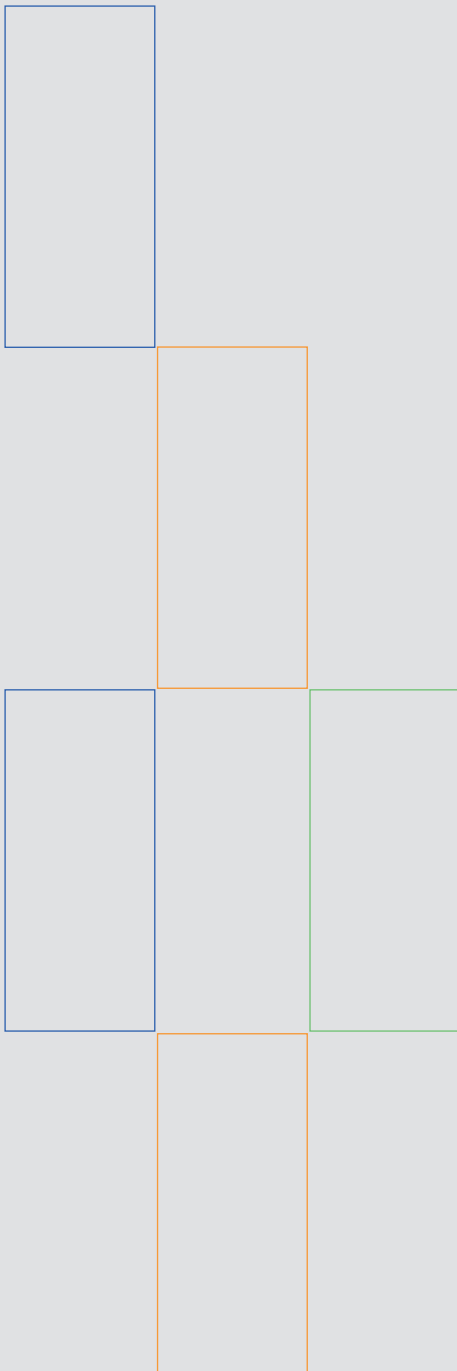


PROTEÍNAS DE ARROZ

PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES

María Pincioli / Año 2010



PROTEÍNAS DE ARROZ

PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES

Ingeniero Agrónomo: María Pincirolí²

Director: Dra. Estela Nora Martínez¹

Co-Director: Ing. Agr. Alfonso Andrés Vidal²

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Alimentos (CIDCA).
Calle 47 y 116, La Plata, Buenos Aires.

(2) Programa Arroz, Universidad Nacional de La Plata.
Calle 66 y 167, Los Hornos - La Plata, Buenos Aires, Argentina.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Magister en Tecnología e Higiene de los Alimentos
Programa Arroz

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
Centro de Investigación y Desarrollo en
Criotecnología de Alimentos



Año 2010

*Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas
de pronto cambiaron todas las preguntas.*

Mario Benedetti

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi Directora, quien me ha guiado con un dedicado y exhaustivo seguimiento de todas las tareas de laboratorio y de gabinete realizadas.

A todo el cuerpo jerárquico y docente del Magister en Tecnología e Higiene de los Alimentos, en especial, a su Directora y Secretario quienes en el año 2004 me impulsaron a realizarlo y a los integrantes del Programa Arroz de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales por permitirme completar la tesis.

Asimismo no tengo palabras para agradecerles de corazón a todos los queridos jóvenes del laboratorio de proteínas por su alegría permanente y su generosidad sin límites.

María.



ÍNDICE

ÍNDICE

1 / INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del cultivo de arroz	
1.1.1 Importancia mundial de cultivo de arroz. Comercialización	1
1.1.2 Importancia del cultivo en Argentina	2
1.1.3 Morfología del grano	2
1.1.4 Industrialización (molinado). Fracciones de molino	3
1.2 Composición química de los cereales. Composición química del grano de arroz	4
1.3 Proteínas de almacenamiento en las semillas de los cereales en general	
1.3.1 Definición - Generalidades	6
1.3.2 Clasificación	6
1.3.3 Síntesis, transporte y acumulación	8
1.4. Proteínas de reserva del grano arroz	
1.4.1 Fracciones proteicas	8
1.4.1.a Albúminas	8
1.4.1.b Globulinas	9
1.4.1.c Prolaminas	10
1.4.1.d Glutelinas	10
1.4.2 Síntesis, transporte y almacenamiento de las proteínas del grano de arroz	11
1.4.3 Composición aminoacídica. Valor nutricional y metabolismo proteico	12
1.5. Concentrados y aislados proteicos	
1.5.1 Generalidades	15
1.5.2 Concentrados y aislados proteicos de arroz	15
1.5.2a Obtención de aislados y concentrados proteicos a partir del salvado	16
1.5.2b Obtención de aislados y concentrados proteicos a partir del endosperma	17
1.6 Propiedades funcionales	17
1.6.1 Propiedades dependientes de la interacción agua-proteína	18
1.6.1a Solubilidad	20
1.6.1b Capacidad de retención de agua (WHC)	21

1.6.1c Capacidad de imbibición de agua (WIC)	21
1.6.2 Propiedades de superficie	22
1.6.2a Espumas	23
1.6.2b Emulsiones	24
1.6.3. Propiedades dependientes de la interacción proteínas – lípidos	
1.6.3a Absorción de aceite	26
1.7 Propiedades funcionales de proteínas de arroz	26
1.8 Hipótesis de trabajo y objetivos	27

2 / MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales: Semillas y harinas	29
2.2 Preparación de muestras	
2.2.1 Extracción de las fracciones y subfracciones proteicas	30
2.2.2 Extracción de proteínas totales	30
2.2.3 Preparación de aislados proteicos	31
2.3 Electroforesis	
2.3.1 Reactivos generales	31
2.3.2 Preparación de las muestras	32
2.3.3 SDS-PAGE. Desarrollo	32
2.3.3a PAGE-urea	32
2.3.3b PAGE-Tricina	33
2.3.3c Electroforesis bidimensionales (SDS-PAGE → SDS-PAGE + 2-ME)	33
2.3.4 Coloración	33
2.3.5 Obtención de las imágenes	33
2.4 Determinación de la composición aminoacídica	33
2.5 Digestibilidad <i>in vitro</i>	34
2.6 Solubilidad de las subfracciones y de los aislados proteicos	35
2.7 Capacidad de absorción de agua (WIC)	35
2.8 Capacidad de retención de agua (WHC)	36
2.9 Actividad espumante	37
2.10 Actividad emulsificante	38
2.11 Absorción de aceite	39
2.12 Análisis estadístico de los resultados y programas utilizados	39

3 / RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO I. Caracterización estructural de las proteínas de las variedades Nutriar y El Paso 144	
I.1 Caracterización polipeptídica	40
I.2 Análisis cuantitativo de las fracciones proteicas en harinas de grano integral y pulido.....	44
I.3 Preparación de aislados proteicos y elección del método a utilizar	46
I.4 Estructura de aislados extraídos a diferentes pHs	46
I.5 Rendimiento en la extracción de los aislados a diferentes pHs	49
I.6 Conclusiones	50
CAPITULO II. Caracterización nutricional y funcional de los aislados pulido e integral extraídos a pH 12	
II.A Caracterización nutricional de los aislados pulido e integral extraídos a pH 12	
II.A.1 Contenido proteico	52
II.A.2 Determinación de la composición aminoacídica de los aislados	53
II.A.3 Digestibilidad <i>in vitro</i>	55
II.B. Caracterización funcional de los aislados proteicos extraídos a pH 12	56
II.B.1 Propiedades de hidratación	
II.B.1a Solubilidad proteica de los aislados	57
II.B.1b Solubilidad en agua. Capacidad de retención e imbibición de agua (WHC y WIC)	59
II.B.1c Capacidad de retención de agua a pHs 3, 6 y 9 ..	60
II.B.2 Propiedades de superficie	
II.B.2a Actividad espumante	62
II.B.2b Actividad emulsificante	63
II.B.3 Absorción de aceite	66
II.B.4 Correlación entre propiedades funcionales evaluadas	67
II.C Conclusiones	68
4 / CONCLUSIONES GENERALES	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1 INTRODUCCIÓN

I / INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del cultivo de ARROZ

1.1.1 Importancia mundial del cultivo de arroz. Comercialización

El arroz (*Oryza sativa* L.) es cultivado y consumido por la humanidad desde hace más de 5000 años y en la actualidad es producido en 112 países cubriendo todos los continentes. Constituye uno de los principales alimentos para el 60% de la población mundial, siendo la base de la alimentación en los países asiáticos donde la población tiene una tasa de crecimiento del 1,8% anual (Katsube–Tanaka *et al.*, 2004 a).

Tabla 1 : Principales productores mundiales de arroz elaborado

Países Productores	Producción (TN)	Porcentaje del Total Mundial
China	125.363.000	31,17
India	85.310.000	21,21
Indonesia	34.250.000	8,52
Vietnam	22.716.000	5,65
Tailandia	17.070.000	4,24
Filipinas	9.445.000	2,35
Japón	7.944.000	1,98
Brasil	8.996.000	2,24
Resto del mundo	91.115.000	22,65
Total Mundial	402.209.000	100

Fuente: USDA; Marzo 2006.

La producción total mundial de arroz es de aproximadamente 400 millones de toneladas de arroz elaborado (SAGPyA, 2008) siendo el segundo cereal después del trigo en producción y uso para la alimentación. El 95% del total de la producción mundial de arroz se lleva a cabo en los países en desarrollo, y China e India, juntos, son responsables de más de la mitad de esta producción. China es el principal productor, participando con un 31% de la producción, seguida de India, Indonesia, Vietnam y Tailandia (Tabla 1). La producción del MERCOSUR es de

aproximadamente 11 millones de toneladas de las cuales un millón es producido por nuestro país lo que representa un 0,25% de la producción mundial (SAGPyA, 2008).

1.1.2 Importancia del cultivo en Argentina

En Argentina, la producción de arroz se concentra en el litoral. Entre Ríos y Corrientes son las provincias de mayor producción, según datos de la última campaña representan el 38 y el 48% respectivamente. Entre ambas representan el 87-88% de la superficie total de cultivo de arroz del país; el 12% restante se reparte entre las provincias de Santa Fe, Chaco, Formosa y Misiones.

1.1.3 Morfología del grano

El grano de arroz, comúnmente llamado semilla, recién cosechado está formado por el fruto cariopse y por la cáscara, está última compuesta por las glumelas (palea y lema). Industrialmente se considera al arroz cáscara aquel comprendido por el conjunto de cariopse y glumelas (Figura 1).

A su vez el cariopse, está formado por el embrión, el endosperma, capas de aleurona (tejido rico en proteínas), tegmen (cubierta seminal), y el pericarpio (cubierta del fruto).

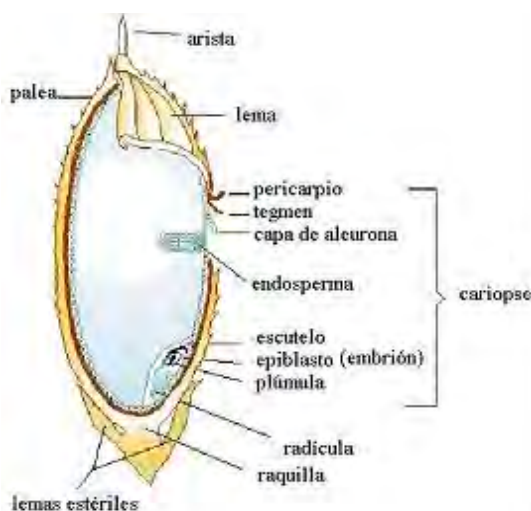


Figura 1. Partes constitutivas del grano de arroz

El pericarpio es piloso y tiene un espesor de aproximadamente 10 μm . Las capas de aleurona están compuestas por 1 a 7 capas de células de parénquima cuadrangular o rectangular, de 1-3 μm de espesor. El embrión es extremadamente pequeño, localizado en la zona ventral del cariopse. El endosperma consiste en células de parénquima que se elongan en forma radial y está compuesto por gránulos de almidón y algunos cuerpos proteicos

(Juliano, 1980; Juliano, 1985). La representatividad de estas capas del grano es importante dado que influyen en el rendimiento industrial.

1.1.4 Industrialización (molinado). Fracciones de molino

El destino principal de la producción total es el consumo interno. Sobre una producción de 1.027.000 toneladas, el 84,5 % corresponde al tipo comercial largo fino (LF) y el 15,5% restante al tipo largo ancho o doble carolina (LA) (SAGPyA, 2008). El número de molinos arroceros ha decrecido en los últimos años debido a las distintas crisis que atravesó el sector arroceros en particular y el país en general. Actualmente se cita la existencia de 49 molinos arroceros, distribuidos de la siguiente manera: 35 en la provincia de Entre Ríos, 9 en Corrientes, 3 en Santa Fe, 1 en Misiones y 1 en Buenos Aires.

El proceso de industrialización tradicional del arroz, involucra las actividades que transforman el arroz cáscara (materia prima) en arroz elaborado (blanco o pulido), con el objetivo de hacer el



Figura 2. Productos y rendimiento del arroz en molino (Shih, 2003)

producto apto para el consumo humano (Figura 2). A diferencia de los otros cereales, en donde el grano es molido para convertirlo en harina, en la elaboración de arroz el objetivo consiste en mantener la mayor cantidad posible de granos intactos como arroz entero. La eficacia técnica del proceso de elaboración, o sea, el rendimiento industrial, se juzga por la cantidad de arroz entero obtenido a partir de una cantidad determinada de arroz cáscara.

Del arroz cosechado, aproximadamente 20 % es cáscara, y 10

% es salvado, ambos elementos se eliminan en los procesos de descascarado y pulido respectivamente. El resto (70%), está formado por granos de arroz blanco o pulido, entero y partido (o quebrado). El arroz pulido está constituido fundamentalmente por el endosperma, el salvado por el embrión y las capas externas (aleurona, tegmen, y pericarpio) y el arroz integral por ambos (endosperma y salvado).

En Argentina, como en la gran mayoría de los países consumidores, el uso más difundido de este cereal es como grano pulido constituido fundamentalmente por el endosperma, aunque en la actualidad se está incentivando el consumo de arroz integral (solamente descascarado, endosperma más aleurona, embrión y

pericarpio). Los granos enteros son ricos en fibra, vitaminas del complejo B, minerales, tocoles y fitonutrientes. Estudios epidemiológicos demuestran una relación inversa entre las raciones ingeridas diariamente de granos enteros o de alimentos que los contienen y el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles como la enfermedad cardiovascular, diabetes tipo 2 y cáncer (Nelina y Ruíz, 2005). El efecto protector parece estar mediado por la acción combinada y sinérgica de los diferentes compuestos encontrados en los granos enteros. La ingesta de granos enteros puede contribuir a elevar la capacidad antioxidante corporal por lo que posiblemente sea uno de los mecanismos a través de los cuales los granos enteros prevengan tales enfermedades. Entre los antioxidantes encontrados en los granos se cuentan los ácidos fenólicos, flavonoides, tocoferol, tocotrienoles, selenio, zinc, fibra soluble y ácido fítico (Nelina y Ruíz, 2005).

Más allá de la amplia utilización del grano entero de arroz existen subproductos industriales como el arroz partido y el salvado de arroz, de bajo valor comercial por su escasa funcionalidad. A partir de estos productos se pueden obtener ingredientes que, presentando buenas propiedades nutricionales y funcionales, constituyan un aporte para la industria alimentaria. Es así como la industria procesa el arroz partido y la harina de arroz para la obtención de almidón quedando la proteína como subproducto no aprovechado.

1.2 Composición química de los cereales. Composición química del grano de arroz

En la Tabla 2 se puede observar comparativamente la composición química del arroz con respecto a la de otros cereales.

Si bien su contenido de proteína es bajo (7-9% promedio en peso) el grano de arroz es la mayor fuente proteica en los países consumidores de este cereal aportando el 60% de la proteína total de la dieta en Asia (Shih, 2003). Se conocen variedades de arroz salvaje en China y Estados Unidos con 12,0 y 15,2% de proteína en grano integral (Zhai *et al.*, 2001).

El contenido de proteína del arroz es diferente según la fracción de molino que se considere como podemos observar en la Tabla 3. El mayor contenido proteico corresponde al embrión pero su tamaño es muy pequeño.

Tabla 2. Composición y balance de energía de cereales*

Propiedad	Arroz integral	trigo	maíz	cebada	sorgo	centeno	avena
Proteína ^a (Nx6,25)	7,3	10,6	9,8	11,0	8,3	8,7	9,3
Lípidos ^a	2,2	1,9	4,9	3,4	3,9	1,5	5,9
Carbohidratos ^a	64,3	69,7	63,6	55,8	58,0	71,8	62,9
Fibra cruda ^a	0,8	1,0	2,0	3,7	4,1	2,2	5,6
Cenizas ^a	1,4	1,4	1,4	1,9	2,6	1,8	2,3
Digestibilidad verdadera ^a	99,7	96,0	95,0	88,0	84,8	77,0	84,1
Utilización neta de la proteína ^a	73,8	53,0	58,0	62,0	50,0	59,0	59,1
Energía digestible ^b	1550	1360	1450	1320	1290	1330	1160

Fuente: Juliano, 1985. *Datos calculados a 14%H; ^avalores expresados en %; ^bvalores expresados en KJ.100⁻¹.

Tabla 3. Composición aproximada del grano de arroz y sus fracciones*

	Arroz cáscara	Grano integral	Grano pulido	cáscara	salvado	embrión
Proteína	6,7-8,3	8,3-9,6	7,3-8,3	2,3-3,2	13,2-17,3	17,7-23,9
Lípidos	2,1-2,7	2,1-3,3	0,4-0,6	0,4-0,7	17,0-22,9	19,3-23,8
Fibra cruda	8,4-12,1	0,7-1,2	0,3-0,6	40,1-53,4	9,5-13,2	2,8-4,1
Cenizas	3,4-6,0	1,2-1,8	0,4-0,9	15,3-24,4	9,2-11,5	6,8-10,1
Almidón	62,1	77,2	90,2	1,8	16,1	2,4
Fibra dietaria	19,1	4,5	2,7	77,3	27,6-33,3	-

Fuente: Pomeranz and Ory, 1982. * Datos calculados en base seca.

Características de las variedades Nutriar FCyF y El Paso 144

El Programa Arroz de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de La Plata es un programa de mejoramiento que tiene entre sus objetivos no solo, obtener variedades con mayores rendimientos, sino también mejorar la tolerancia a bajas temperaturas, y acentuar caracteres especiales entre ellos el contenido proteico. Entre sus logros se destaca el cultivar Nutriar inscripto en el año 2003. Esta variedad se caracteriza por poseer valores de proteína en grano que superan en un 25 a 30 % el promedio de las variedades cultivadas en la actualidad (Bezus *et al.*, 2002). Es una variedad de tipo semi-enano, con alta capacidad de

macollaje que ha mostrado altos rendimientos. El grano es de tipo comercial largo fino, con una relación largo/ancho de 3 para grano elaborado y un peso de 26g/ mil granos cáscara. Posee buenos valores de rendimiento industrial con un 63% de grano entero. (Bezus *et al.*, 2002). Su calidad culinaria está caracterizada por valores bajos de amilosa e intermedios de temperatura de gelatinización.

El cultivar El Paso 144 fue lanzado por la Estación Experimental del Este (República Oriental del Uruguay) en 1986. En Argentina fue inscripto como introducción en el año 1994. Es de origen tropical, de tipo semienano, con alto potencial de rendimiento, alta capacidad de macollaje y hojas erectas, pubescentes, de color verde claro. Su altura media es de 87 cm dependiendo de las condiciones de crecimiento. Posee grano tipo largo fino, con cáscara color pajizo, pubescente, con aristas de tamaño variable, una relación largo/ancho mayor de 3 para grano elaborado y un peso de 26,5g/ mil granos cáscara. Su calidad molinera presenta valores de grano entero superiores a la base de comercialización (57%). Su calidad culinaria está caracterizada por un alto porcentaje de amilosa, una temperatura de gelatinización baja que le imprime un comportamiento de arroz suelto después de la cocción (Libore, 2006).

1.3 Proteínas de almacenamiento en las semillas de los cereales en general

1.3.1 Definición – Generalidades

Si bien en las semillas existen tres grupos de proteínas: las estructurales, las biológicamente activas llamadas “housekeeping” y las de reserva o almacenamiento, estas últimas constituyen más del 80% y son por lo tanto las que más influyen en la calidad nutricional proteica de la semilla. Las proteínas de almacenamiento son aquéllas cuya velocidad de síntesis se incrementa notablemente durante el desarrollo de la semilla y se acumulan en vesículas rodeadas de membrana denominadas cuerpos proteicos. Posteriormente, durante la germinación, estas proteínas son degradadas para proveer, principalmente, nitrógeno reducido y secundariamente carbono, con el fin de sostener el crecimiento del brote y el desarrollo inmediato luego de la germinación.

1.3.2 Clasificación

Los trabajos de Osborne fueron pioneros en la sistematización del estudio de las proteínas de plantas e introdujeron una clasificación, ampliamente utilizada, que

se basa en la solubilidad mostrada por las proteínas en diferentes medios a lo largo de una extracción secuencial (Osborne, 1924). Los grupos proteicos extraídos en cada etapa de la serie de extracciones se denominan "fracciones de Osborne" y son los siguientes: *albúminas*, solubles en agua; *globulinas*, solubles en soluciones salinas diluidas y neutras; *prolaminas*, solubles en alcohol o en mezclas de alcohol-agua y *glutelinas*, solubles en soluciones alcalinas o ácidas. Esta clasificación fue introducida antes de que se posea un detallado conocimiento de la estructura y características genéticas de las diferentes proteínas, por lo que con el correr del tiempo se han desarrollado otras clasificaciones.

Posteriormente se elaboró una clasificación basada en la estructura de los genes, la homología de las secuencias de aminoácidos y su mecanismo de acumulación en los cuerpos proteicos (Fukushima, 1991). Esta clasificación divide a las proteínas de reserva en dos tipos, las *globulinas* y las *prolaminas*.

Tabla 4. Clasificación de las proteínas de almacenamiento de vegetales en base a sus características moleculares y genéticas

	GLOBULINAS	PROLAMINAS
Mecanismos de acumulación en los cuerpos proteicos	Acumulación en vacuolas	Acumulación directa
Estructura genética	Con intrones	Sin intrones
Secuencia de aminoácidos	Sin secuencias que se repiten	Con secuencias que se repiten
Proteínas de almacenamiento	Globulina de arroz Glutelina de arroz Glicinina de soja Conglicinina de soja Legumina de arveja Vicilina de arveja Faseolina de poroto Globulina de avena	Prolamina de arroz Zeína de maíz Hordenina de cebada Glutenina APM de trigo Gliadina de trigo Glutenina APM de centeno Secalina de centeno

Fuente: Fukushima, 1991.

Las primeras se caracterizan por acumularse en cuerpos proteicos o vacuolas derivadas del aparato de Golgi, sus genes contienen varios intrones y la estructura primaria de la proteína no presenta secuencias repetitivas. Por otro lado las prolaminas se acumulan dentro de cuerpos proteicos derivados del retículo endoplásmico, sus genes a pesar de ser eucariotas llamativamente no presentan intrones y presentan secuencias de aminoácidos repetitivas en determinadas zonas

de la molécula. En la Tabla 4 se muestra el agrupamiento de diferentes proteínas de almacenamiento de origen vegetal de acuerdo a esta última clasificación realizada en base a datos compilados por Fukushima (1991).

1.3.3 Síntesis, transporte y acumulación

Las proteínas de los cereales se caracterizan en su conjunto por acumularse en el endosperma en lugar de hacerlo en el embrión como en leguminosas. Estas diferencias se reflejan en algunas propiedades fisicoquímicas y van acompañadas por modificaciones en los mecanismos de síntesis, transporte y/o almacenamiento en las semillas. Las especies de cereales más estudiadas son el trigo, cebada, centeno, maíz, arroz y avena.

1.4 Proteínas de reserva del grano de arroz

La calidad nutricional de las proteínas de arroz es sólo inferior a la avena y supera a la del trigo y maíz. Son hipoalergénicas y poseen propiedades anticancerígenas (Tang *et al.*, 2003). Por lo que el arroz es considerado un alimento funcional.

1.4.1 Fracciones proteicas

El componente proteico mayoritario del grano de arroz lo constituyen las glutelinas en proporción de 75-90% con respecto a la proteína total. Son las únicas proteínas de cereales ricas en glutelinas y pobres en prolaminas (Juliano, 1985). En la Tabla 5 se presenta la proporción de las diferentes fracciones proteicas en el grano de arroz según los diferentes autores.

1.4.1a Albúminas

Electroforéticamente responde a un patrón muy heterogéneo. En SDS-Page aparecen 12 bandas de peso moleculares que van desde 8,5 a 95 kDa, con tres polipéptidos principales de 8,5; 11 y 16 kDa (Juliano, 1980). Se localizan fundamentalmente en la aleurona (Juliano, 1985).

1.4.1b Globulinas

Esta fracción proteica se extrae del residuo de harina resultante de la extracción de las albúminas con soluciones de pH cercano a la neutralidad y concentraciones salinas elevadas (en general fuerza iónica entre 0,4 y 1,1).

Presentan una banda característica que corresponde a polipéptidos de 25-26 kDa (Krishnan *et al.*, 1992; Komatsu *and* Hirano, 1992; Furukawa *et al.*, 2003; Kumagai *et al.*, 2006) y otra a los 16-18 (Juliano, 1980; Krishnan *et al.*, 1992). Estudios realizados en el endosperma del grano establecen que ambos polipéptidos (25 y 16 kDa) se localizan en zonas discretas dentro de los cuerpos proteicos irregulares (Krishnan *et al.*, 1992), fundamentalmente en las capas externas del pericarpio del grano (Juliano, 1980) y en el embrión (Sawai *and* Morita, 1970). Estudios inmunológicos realizados por Robert *et al.* (1985) revelan que esta fracción tiene gran similitud con las glutelinas.

Tabla 5. Abundancia relativa de las diferentes fracciones proteicas del grano de arroz pulido e integral

Fracción proteica	Abundancia ^a		Abundancia ^a	
	Arroz pulido	Referencia	Arroz integral	Referencia
Albúminas	2-5	(1)	5-17	(2)
	8	(5)	11	(3) y (4)
	1-5	(6)		
	5	(8)		
	9,7-14,2	(7)		
Globulinas	2-10	(1)	4-12	(2)
	10	(5)	15	(3)
	4-15	(6)	10	(4)
	13,5-18,9	(7)		
	12	(8)		
Glutelinas	75-90	(1)	73-86	(2)
	70	(5)	71	(3)
	80	(6) y (8)	77	(4)
	63,8-73,4	(7)	66-67,7	(7)
Prolaminas	1-5	(1)	2-5	(2)
	3-5,4	(7)	3	(3)
	2-8	(6)	2	(4)
	3	(8)	12,5-14,5	(7)

^aAbundancia como % respecto al total de proteína. (1) Juliano, 1985; (2) Mitra *and* Das, 1975; (3) Chavan *and* Duggal, 1978; (4) Wieser *et al.*, 1980; (5) Padhye *and* Salunkhe, 1979; (6) Krishnan *and* Withe, 1997; (7) Zhou *et al.*, 2002; (8) Juliano, 1994.

1.4.1c Prolaminas

Las prolaminas constituyen polipéptidos heterogéneos con masas moleculares variables entre 10 y 23 kDa, según los diferentes autores.

Las bandas más marcadas corresponden a los 17 y 23 kDa según Juliano (1980) y a los 10, 13 y 16 kDa según estudios más actuales (Furukawa *et al.*, 2003, Kumagai *et al.*, 2006).

1.4.1d Glutelinas

Constituyen la fracción mayoritaria de las proteínas de reserva del arroz. Esta fracción es la que determina el valor nutricional de la proteína de arroz que la convierte en una de las mejores proteínas vegetales (Qu *et al.*, 2001).

El contenido de proteína total se correlaciona positivamente con el de glutelinas (Villareal *and* Juliano, 1978; Udaoka *et al.*, 2000). Se localizan en el endosperma del grano (Villareal *and* Juliano, 1978). Se caracterizan por su gran insolubilidad que se debe fundamentalmente a la abundancia de puentes disulfuro formando agregados de alto peso molecular (Juliano, 1985). Las glutelinas son prácticamente insolubles excepto en ácidos o álcalis diluidos. A pesar de su insolubilidad en soluciones salinas neutras las glutelinas presentan una estructura general y propiedades fisicoquímicas similares a las globulinas 11S (leguminas) de las leguminosas (Robert *et al.*, 1985). Según Utsumi (1992), existe una homología con la familia de las globulinas por su composición en aminoácidos, y su similar biosíntesis y proceso de acumulación, por lo cual en la clasificación, de Fukushima (1991) integrarían dicha fracción.

Al igual que las leguminas, la fracción glutelina está constituida por dos polipéptidos alfa y beta, ambos unidos por puentes disulfuro (Utsumi, 1992) y por la proglutelina, un polipeptido de 55 kDa no procesado, todos estos polipéptidos estarían formando agregados mediante uniones disulfuro.

Actualmente se han identificado seis genes que las codifican y permiten establecer una clasificación en dos subfamilias: GluA y GluB de acuerdo a la secuencia de nucleótidos que generan. Estas diferencias se trasladan a sus propiedades nutricionales ya que GluB contiene mayor cantidad del aminoácido esencial lisina (Katsube–Tanaka *et al.*, 2004b) y a sus propiedades estructurales ya que presentan diferencias en su grado de polimerización. Estas últimas se reflejan en la solubilidad y estabilidad estructural afectando procesos alimentarios como gelación, formación de espumas y emulsiones (Katsube–Tanaka *et al.*, 2004a).

1.4.2 Síntesis, transporte y almacenamiento de las proteínas del grano de arroz

Las glutelinas son sintetizadas en la membrana del retículo endoplásmico como preproglutelina de 59 kDa. Luego pasan al aparato de Golgi formando el grupo de proglutelinas con una masa molecular de 55-59 kDa (57 kDa). Finalmente son procesadas en subunidades alfa y beta o ácidas y básicas con pesos moleculares de 37-39 kDa y 20-22 kDa respectivamente. Poseen diferente punto isoeléctrico y son depositadas en vacuolas o cuerpos proteicos (Yamagata *et al.*, 1982; Qu *et al.*, 2001).

Por otro lado las prolaminas, son sintetizadas y se depositan en cuerpos proteicos en el retículo endoplásmico.

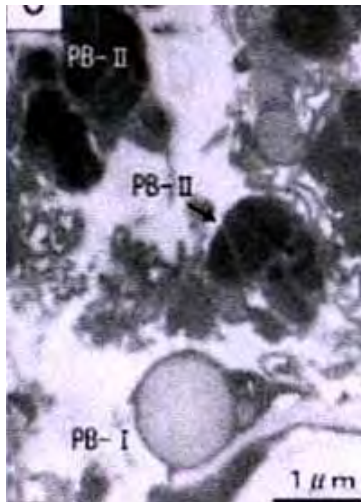


Figura 3. Micrografía electrónica de harina de arroz. PB-I: cuerpos proteicos tipo I y PB-II: cuerpos proteicos tipo II (Kumagai *et al.*, 2006).

En arroz, el almacenamiento de las proteínas tiene lugar en dos tipos de cuerpos proteicos diferentes, característica que lo distingue del resto de los cereales y leguminosas (Figura 3).

Los cuerpos proteicos tipo I (PB-I), son claros y esféricos en el microscopio electrónico, se encuentran asociados con el RER (retículo endoplásmico) y están rodeados de una membrana con ribosomas. Los cuerpos proteicos tipo II (PB-II), se observan opacos y de forma irregular al microscopio electrónico, se encuentran depositados en vacuolas y se los asocia con el aparato de Golgi.

Estudios posteriores determinaron que los PB-I están constituidos fundamentalmente por prolaminas (debido a que los pesos moleculares oscilan entre 10-16 kDa) y los PB-II por glutelinas (Yamagata, 1982; Juliano, 1985, Furukawa *et al.*, 2003; Kumagai *et al.*, 2006; Nishimura *et al.*, 2009). Ambos tipos de cuerpos proteicos se hayan distribuidos a lo largo del endosperma y un aumento en el contenido proteico del grano resulta en un incremento en el número de cuerpos proteicos (Juliano, 1972).

La distribución de las proteínas en los cuerpos proteicos del endosperma es variable según los cultivares. Los PB-II contienen el 60-65% de las proteínas de almacenaje del endosperma, los PB-I el 20-25% y los restantes 10-15% serían

albúminas y globulinas presentes en el citoplasma (Zhou *et al.*, 2002). Según Furukawa *et al.* (2003) los PB-I pueden presentar entre 20 y 42% de las proteínas totales y los PB-II entre 36 y 59%.

Durante el periodo de llenado del grano, las proteínas se van acumulando en diferente orden. A los 5 días después de la floración (antesis) aparecen las subunidades básicas y ácidas (22-23 y 37-39 kDa) de las glutelinas, 10 días después aparecen los polipéptidos de bajo peso molecular correspondiente a las prolaminas 10-16 kDa. Más tarde, en el desarrollo del cariopse, aparecen los polipeptidos de 76-57 kDa y se acumulan en los PB-II junto con las globulinas (Yamagata *et al.*, 1982).

1.4.3 Composición aminoacídica. Valor nutricional y metabolismo proteico

Tabla 6. Aminoácidos en proteínas de distintos orígenes

Origen de la proteína	Ile *	Leu	Thr	Lys	Met	Val	Arg	Tyr	Phe
Animales	5,5	8,2	4,4	8,4	2,9	6,0	4,8	1,5	4,5
Cereales	4,4	8,5	3,4	2,7	2,2	5,7	4,8	1,1	4,8
Leguminosas	4,4	7,9	4,2	7,3	1,3	4,7	7,6	1,3	5,4

*Aminoácidos, expresados en g/16g N, mediante su símbolo de tres letras.

La función fundamental de la proteína en la dieta es la de proporcionar aminoácidos esenciales y nitrógeno aminoacídico para la síntesis de las proteínas y otras sustancias nitrogenadas que intervienen en la composición corporal (Cheftel *et al.*, 1993).

La calidad nutricional está gobernada fundamentalmente por la composición aminoacídica.

La proteína del salvado de arroz contiene abundante ácido glutámico y aspártico (FAO, 2004) y aunque en menor proporción, aminoácidos esenciales como treonina, valina, tirosina, histidina y arginina (Tang *et al.*, 2003). La Organización Mundial de la Salud de las Naciones Unidas propone el patrón ideal de los aminoácidos que conforman la proteína (FAO/WHO, 1973). Esta establece como buena una proporción de aminoácidos esenciales con respecto a aminoácidos totales de 36%. La proteína total del arroz pulido según los trabajos realizados por Padhye *and* Salunkhe (1979) excederían este valor (41,0%). La proteína de arroz

pulido está integrada por un 40,1% de aminoácidos hidrofóbicos, 21,8 de polares, 12,2 de básicos y 26% de aminoácidos ácidos (Padhye *and* Salunkhe, 1979).

Si bien en los cereales, la **lisina** es un aminoácido limitante como podemos observar en la Tabla 6; el arroz contiene cantidades considerables de este aminoácido esencial (Juliano, 1985; Chandi *and* Sogi, 2007a). Las cantidades en salvado oscilan entre 3,99 y 5,3 g de lisina/100g de proteína (Wang *et al.*, 1999 y Tang *et al.*, 2003 respectivamente), se localiza fundamentalmente en las capas externas por este motivo la proteína del arroz integral tiene mayor contenido de lisina que el pulido (Baldi *et al.*, 1976; Cagampang *et al.*, 1976; Villareal *and* Juliano, 1978) y dentro de la fracción glutelina la subunidad ácida es la de mayor contenido (Juliano, 1980). Mientras que las albúminas y glutelinas son ricas en lisina, las prolaminas al igual que en otros cereales, presentan bajos niveles de este aminoácido.

Las prolaminas poseen altos contenidos de glutamina, histidina, cisteína y metionina (Mandac *and* Juliano, 1978; Padhye *and* Salunkhe, 1979; Shyur *et al.*, 1994). Esta fracción es rica en leucina, tirosina, fenilalanina pero es la que presenta menor contenido de arginina y glicina (Juliano, 1980). Se diferencian de las prolaminas de maíz, trigo, cebada y centeno, ya que no presentan secuencias repetitivas ricas en prolina.

La fracción globulinas es rica en aminoácidos azufrados cisteína y metionina (Juliano, 1985).

Los aminoácidos más abundantes en fracción glutelinas son ácido glutámico/glutamina, ácido aspártico/asparagina, arginina, glicina alanina y treonina (Wen *and* Luthe, 1985; Juliano, 1985). Esta composición influye en gran medida sobre su solubilidad. Los grupos aminos en las cadenas de glutamina y asparagina juegan un importante rol promoviendo la asociación de las moléculas de glutelinas mediante puentes hidrógeno (Anderson *et al.*, 2001). No obstante las subunidades tienen diferente composición aminoacídica, la subunidad básica tiene más leucina, tirosina, ácido aspártico y menos glutámico que la subunidad ácida (Villareal *and* Juliano, 1978).

Para que estos aminoácidos sean aprovechados es necesario que los mismos puedan ingresar al torrente sanguíneo para lo cual las proteínas deben ser adecuadamente digeridas.

Esta digestión es realizada por las enzimas proteolíticas del tracto intestinal, primero por la pepsina, presente en el jugo gástrico, y luego por las proteasas segregadas por el páncreas (tripsina, quimiotripsina, caboxipeptidasas A y B y

elastasa) y por las células de la mucosa intestinal (aminopeptidasas y dipeptidasas). La mayor parte de estas enzimas catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos específicos. Los aminoácidos libres y los pequeños péptidos se absorben a través de las células en cepillo y de borde estriado de la mucosa intestinal. Existen mecanismos específicos de absorción de péptidos de aminoácidos neutros, ácidos y básicos. La mayor parte de los péptidos absorbidos son hidrolizados en el interior de las células intestinales. Los aminoácidos absorbidos pasan luego a la vena porta para su transporte al hígado.

Algunos factores como el calor, pueden incrementar la digestibilidad al modificar la estructura terciaria y secundaria o sea al desnaturalizar la proteína (Cheftel *et al.*, 1993).

La digestibilidad resulta un factor muy importante, determinante de la capacidad de la proteína de ser utilizada en mezclas dietarias.

Como podemos observar en la Tabla 2, la digestibilidad del nitrógeno en arroz así como la proteína neta utilizable es la mayor de los 7 cereales comparados (Juliano, 1985). Estudios realizados sugieren que la proteína producida mediante extracción alcalina presenta mayor digestibilidad que la de la harina (Kumagai *et al.*, 2006) y que la obtenida por degradación del almidón (Morita *and* Kiriyaama, 1993; Kumagai *et al.*, 2006). Morita *and* Kiriyaama (1993) han encontrado que dietas con un 40-50% de aislado proteico de harina de arroz tiene digestibilidad similar a formulaciones con un 25% de caseína.

Si bien los cuerpos PB-I son prácticamente indigeribles (Furukawa *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2009), la digestibilidad de la proteína de arroz cocido en humanos oscila entre un 80-87% (FAO, 2008) y un 85-90% (FAO/WHO/UNU, 1985). La digestibilidad varía según las fracciones proteicas, estudios realizados por Steenson *and* Sathe (1995) indican que las prolaminas son más resistentes a la digestión enzimática *in vitro* que las albúminas y globulinas.

La proteína de arroz es fácilmente extraída por tratamiento alcalino de tipo industrial y por su alta calidad puede ser utilizada en manufactura de alimentos (Kumagai *et al.*, 2006). Posiblemente la preparación de concentrados y aislados proteicos estaría potenciando la posibilidad de obtener ingredientes proteicos con mejorada digestibilidad.

1.5 Concentrados y aislados proteicos

1.5.1 Generalidades

La disponibilidad de fuentes proteicas vegetales junto con la tendencia a reducir la ingesta de proteínas animales, hace que en los últimos años se esté produciendo un gran desarrollo en los procesos de extracción y mejora de proteínas vegetales para su uso en la alimentación humana.

Se denominan **concentrados** proteicos a productos alimenticios sólidos o semisólidos conteniendo entre 60 y 80% de proteína, mientras que un **aislado** es un ingrediente con un contenido proteico superior al 80%.

La mejora de la nutrición es la razón primera para el uso de los concentrados y aislados proteicos en fórmulas infantiles, bebidas nutritivas para adultos y suplementos (Vioque *et al.*, 2001). Las ventajas de estos ingredientes proteicos es que permite su inclusión en formulaciones adecuadas a distintos requerimientos, ya sea para personas con alteraciones de salud específicas o proporcionando beneficios a personas con un alto nivel de colesterol o triglicéridos en sangre (Vioque *et al.*, 2001). En los últimos años se han producido aislados proteicos de otros cultivos como colza (Mahajan *and* Dua, 1995), trigo (Hettiarachchy *et al.*, 1996; Ahmedna *et al.*, 1999), maíz (Lin *and* Zayas, 1987), garbanzo (Sánchez-Vioque *et al.*, 1999), girasol (Saeed *and* Cheryan, 1988), *Phaseolus* (Apostolatos, 1984) y amaranto (Martínez *and* Añón, 1996).

En arroz, la vía más conveniente y simple para obtener productos de alto contenido proteico resulta ser la extracción alcalina seguida de una precipitación ácida (Shih, 2003). No obstante se han estudiados diversos métodos enzimáticos y físicos con el propósito de conservar o mejorar las propiedades nutricionales y funcionales del producto obtenido.

1.5.2 Concentrados y aislados proteicos de arroz

Con la finalidad de utilizar la proteína del arroz a partir de los co-productos del molinado se han propuestos diferentes procesos de obtención de concentrados y aislados proteicos. Los co-productos más utilizados para tal fin han sido el salvado de arroz y el grano pulido o quebrado. Las principales metodologías pueden agruparse en: extracción alcalina, métodos enzimáticos y físicos. Los trabajos se iniciaron en 1966 con Cagampang *et al.* quienes realizaron una extracción del 97% de la proteína del endosperma del grano de arroz con NaOH 0,1 N durante 6 hs.

Los estudios realizados para la obtención de aislados y concentrados proteicos pueden ordenarse según la extracción se haya realizado a partir del a) *salvado* o b) *endosperma* y por medio de solventes alcalinos, métodos enzimáticos o métodos físicos.

1.5.2a Obtención de aislados y concentrados proteicos a partir del salvado

Extracción alcalina. Los trabajos a partir de salvado de arroz comenzaron en 1969 con Lynn, Chen *and* Houston (1970); Desikachar *and* Parpia (1970); Barber *and* Barber (1974), Lew *et al.* (1975); le siguió Connor *et al.* (1976) quienes propusieron una extracción con hidróxido diluido a 24°C obteniendo concentrados de 33-38% de proteína en peso, Betschart *et al.* (1977); Maki *and* Misao (1983); Bera *and* Mukherjee (1989). Posteriormente, Prakash *and* Ramnatham (1995) propusieron extracción a pH 11 obteniendo concentrados de 71-73%, 39,5 y 54,5% de proteína en peso según se partiera de salvado de arroz no estabilizado, estabilizado con calor o parbolizado. En forma similar, Gnanasambandam *and* Hettiarachchy (1995) a partir de un producto comercial de salvado de arroz estabilizado y no estabilizado con calor sugirieron extraer a pH 9,5 durante 30 min obteniendo concentrados de 71,5 y 50,9 % de proteína en peso respectivamente. En la actualidad, Chandi *and* Sogi (2007a) estudiaron aislados proteicos extraídos de diferentes variedades de arroz a pH 9 durante 1h logrando concentraciones entre 52,5 y 90,6% de proteína según variedad.

Métodos enzimáticos. En esta metodología las enzimas actúan sobre extracciones acuosas. En general las proteasas resultan más efectivas que las carbohidrasas. Los estudios se iniciaron con Ansharullah *et al.* (1997) removiendo la pared celular con carbohidrasas como celulasas, pectinasas, hemicelulasa y xilanasas. Posteriormente, Hamada en 1999 y 2000 obtuvo aislados a partir de hidrólisis con proteasas alcalinas. Wang *et al.* (1999) obtuvieron aislados con un 92% de proteína en peso utilizando glicosidasas y en la actualidad aparecen los trabajos de Shih *and* Daigle (2000) y Tang *et al.* (2003) utilizando en forma combinada proteasas y carbohidrasas.

Métodos físicos. Si bien son más deseables porque no producen alteraciones en las proteínas, son más costosos. Anderson *and* Guraya (2001) proponen la extracción con agua a partir de salvado de arroz formando primero una suspensión coloidal que se somete a homogeneización y se separa por centrifugación.

1.5.2b Obtención de aislados y concentrados proteicos a partir del endosperma

Extracción alcalina. Hasta un 97% de proteína básicamente glutelina puede ser extraída con una solución de hidróxido de sodio o de potasio 0,1 N (Cagampang *et al.*, 1966; Tecson *et al.*, 1971).

Métodos enzimáticos. Debido a que el endosperma es mayoritariamente almidón se utilizan enzimas como amilasa, glucoamilasas y pululanasa para separar la proteína de la harina de arroz por solubilización y remoción del almidón. Morita *and* Kiryama (1993) han recuperado hasta un 90% de la proteína mediante la utilización de α -amilasa a 97°C durante 2 horas. Shih *and* Daigle (1997) logran concentrados de 47-65% de proteína mediante un tratamiento con α -amilasa a 90°C durante 45 minutos.

Métodos físicos. Kung *et al.* (1987) han separado por centrifugación una emulsión de harina de arroz en presencia de esteroil lactilato de sodio.

1.6 Propiedades funcionales

Se puede definir como toda propiedad no nutricional que imparte a un alimento o ingrediente determinadas características sensoriales o determinado comportamiento físico, durante su preparación, procesamiento, almacenamiento o consumo (Cheftel *et al.*, 1989, Schwenke, 2001). No solo son importantes en definir la calidad del producto final, sino también en facilitar el proceso de producción.

Las propiedades funcionales son un reflejo de las propiedades intrínsecas de la proteína *per se*. Estas dependen del tamaño molecular, forma, composición aminoacídica, secuencia, carga y distribución de la misma, estructura secundaria (α -hélice, β -plegada y estructuras aperiódicas), ordenamientos terciarios y cuaternarios de los segmentos peptídicos, cross-linking intra e inter caternarios, relación hidrofobicidad/hidrofilicidad y relación rigidez/flexibilidad en respuesta a las condiciones externas. Estas propiedades pueden ser alteradas por diversos factores tales como condiciones de procesos, métodos de aislamiento, factores ambientales (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica del medio), interacción con otros componentes (agua, iones, lípidos, hidratos de carbono, proteínas), concentración de la proteína, modificaciones sufridas por métodos físicos, químicos y enzimáticos, entre otros.

Las propiedades funcionales se pueden clasificar en tres grupos según la interacción que predomine en el proceso (Cheftel *et al.*, 1989 y Bourgeois *and* Le Roux 1986):

- Propiedades dependientes de la interacción agua-proteína (hidratación, solubilidad, capacidad de retención de agua, capacidad de imbibición de agua)
- Propiedades superficiales (habilidad para formar espumas y emulsiones)
- Propiedades dependientes de la interacción proteínas-lípidos
- Propiedades dependientes de la interacción proteína-proteína (gelificación, texturización: formación de películas por coagulación térmica, formación de fibras).

1.6.1 Propiedades dependientes de la interacción agua-proteína

El agua es un ingrediente universal en los sistemas alimentarios. La interacción proteína-agua determina las propiedades de hidratación que influyen en aquellos aspectos inherentes a la formulación, procesamiento y almacenamiento de los alimentos (Pilosof, 2000). La base de la interacción fisicoquímica del agua con los ingredientes alimenticios es una materia de investigación extensa. Las propiedades de hidratación de las proteínas son consecuencia de su capacidad para interactuar con las moléculas de agua a través de grupos polares y no polares presentes en su estructura. Los grupos polares interactúan con el agua a través de puentes de hidrógeno, enlaces dipolo-dipolo e interacción con grupos ionizados, en tanto que los no polares lo hacen mediante el proceso, termodinámicamente favorable, denominado hidratación hidrofóbica. Cuando el agua es agregada en exceso a un alimento, parte del agua interactúa con los sólidos y constituye el agua ligada y el resto es agua libre. Las proteínas que contienen numerosas cadenas polares laterales junto con las uniones peptídicas, resultan hidrofílicas. Por lo tanto, tienden a absorber y retener agua cuando están presentes en sistemas de alimentos. En el caso de los grupos ionizables la polaridad es afectada por las condiciones de pH. La retención de agua está a un mínimo cuando el pH está cercano al punto isoeléctrico y se incrementa rápidamente cuando el pH aumenta o disminuye (Wijeratne, 2005).

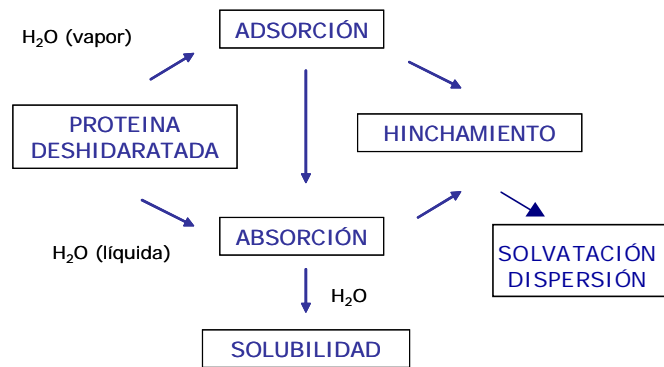


Figura 4. Etapas de la hidratación y propiedades funcionales involucradas (Pilosoph, 2000).

En la Figura 4 se ve representado el esquema del proceso de hidratación de una proteína. De acuerdo a Hardy *et al.* (2002) y Pilosoph (2000) en el mismo se pueden reconocer diversas etapas:

a) Adsorción de agua es la capacidad de un alimento de adsorber agua espontáneamente cuando se lo coloca en una atmósfera con un porcentaje de humedad relativa mayor a la que posee.

b) Absorción de agua indica la aptitud de un material de embeber agua espontáneamente en su estructura por inmersión o cuando se lo pone en contacto con una superficie que se mantiene húmeda. Este es un parámetro importante desde el punto de vista tecnológico. En productos horneados, una alta capacidad de absorción de agua contribuye a reducir la pérdida de humedad de los productos envasados, lo que permite que se mantengan frescos (Chandi *and* Sogi, 2007a). Por otro lado, es una propiedad fundamental vinculada a la práctica de rehidratación que normalmente se realiza antes de la utilización de cualquier ingrediente proteico.

c) Hinchamiento o "*swelling*" se refiere al cambio de volumen que acompaña a la hidratación.

d) Solvatación o dispersabilidad es la propiedad de un aislado proteico deshidratado en polvo que permite que el mismo se disperse uniformemente al ponerse en contacto con el agua.

e) Solubilidad en proteínas alimentarias representa la capacidad de una miscela proteica de formar una solución coloidal. Este proceso involucra, simultáneamente, humectación, hinchamiento, solvatación y disolución.

1.6.1a Solubilidad

Desde un punto de vista termodinámico, la solubilidad supone: separación de moléculas del disolvente, separación de moléculas de proteína y dispersión de estas últimas en las primeras con máxima interacción entre proteína y disolvente. Para ser soluble, la proteína debe, por consiguiente, interaccionar tanto cuanto sea posible con el disolvente (puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo, e interacciones iónicas). La solubilidad depende de factores como el pH, la fuerza iónica y la temperatura, entre otros.

Influencia del pH: A valores de pH superiores o inferiores al punto isoeléctrico, la proteína arrastra una carga eléctrica negativa o positiva y las moléculas de agua pueden interaccionar con estas cargas contribuyendo así, a la solubilización. Además, las cadenas proteicas que llevan cargas eléctricas del mismo signo tienen una tendencia a repelerse y a disociarse o desplegarse. Si se representa la solubilidad de una determinada proteína en función del pH, suele obtenerse una gráfica en forma de V o de U, cuyo mínimo se corresponde con el punto isoeléctrico. Esta característica es utilizada para la extracción de numerosas proteínas, especialmente las procedentes de semillas. A valores del pH no alejados del punto isoeléctrico, las cargas netas son lo suficientemente bajas como para permitir que las cadenas polipeptídicas se aproximen y se formen algunos agregados, lo que puede conducir a la precipitación proteica. La velocidad de la precipitación proteica aumenta cuando la densidad global de los agregados difiere considerablemente de la del disolvente y cuando el diámetro de los agregados neoformados es considerable.

Influencia de la fuerza iónica: a concentraciones salinas elevadas, la solubilidad de la proteína desciende, lo que puede conducir a la precipitación. Este efecto (precipitación por salado) es consecuencia de la competencia entre la proteína y los iones salinos por las moléculas de agua necesarias para sus respectivas solvataciones. A altas concentraciones salinas no hay suficientes moléculas de agua disponibles para la solvatación de la proteína, puesto que la mayor parte de las moléculas de agua están fuertemente ligadas a las sales. Así, las interacciones proteína-proteína dominan sobre las interacciones proteína-agua, lo que puede conducir a la formación de agregados seguida por la precipitación de las moléculas proteicas.

Influencia de la temperatura (a pH y fuerza iónica constantes): En general, la solubilidad de las proteínas aumenta con la temperatura, entre 0 y 40-50 °C.

Cada una de las etapas de hidratación proteica tendrá relevancia de acuerdo al sistema alimentario que se trate. La adsorción es importante en productos de bajo contenido de agua y en procesos de secado y almacenamiento; la absorción-hinchamiento-retención en productos semisólidos como embutidos, masas, geles por la influencia que tiene sobre la textura de los mismos (Cheftel *et al.*, 1993) y la solubilidad en bebidas y productos emulsionados o espumados.

1.6.1b Capacidad de retención de agua (WHC)

La capacidad de *retención de agua* (WHC) se define como la capacidad de un alimento hidratado para retener agua en la matriz proteica, cuando es sometida a fuerzas externas como la centrifugación, compresión, vacío o presión osmótica. Esta fracción de agua puede ser asimilable a la suma del agua capilar y el agua unida por puentes de hidrógeno a los grupos de la proteína. Esta propiedad funcional depende no solo del tamaño de los poros y de los capilares sino también de las características de las moléculas proteicas como interacciones hidrofóbicas, puentes hidrogeno, puentes disulfuro, ácidos, bases y de fuerzas de Van der Waalls presentes. Asimismo se ve influida por parámetros del medio como fuerza iónica especies iónicas, pH, temperatura y el tiempo consumido en alcanzar el equilibrio (Kneifel *et al.*, 1991). La capacidad de los ingredientes proteicos de absorber y retener agua juega un importante papel en la textura de diversos alimentos especialmente en masas horneadas (Cheftel *et al.*, 1993) y en la viscosidad intrínseca, importante especialmente, en la elaboración de quesos, masas dulces y variados productos no alimenticios (Kneifel *et al.*, 1991).

Esta propiedad está vinculada directamente con la solubilidad; Were *et al.* (1997) encontraron relación entre WHC y solubilidad en aislados proteicos de soja.

1.6.1c Capacidad de imbibición de agua (WIC)

La capacidad de imbibición de agua (WIC) se define como la capacidad de un alimento deshidratado para absorber agua espontáneamente contra la fuerza de gravedad. Según Chou *and* Morr (1979) el proceso de hidratación de una proteína deshidratada consta de las siguientes etapas: adsorción de las moléculas de agua por fijación en zonas polares, adsorción multicapa de agua; condensación de agua líquida; hinchamiento y solvatación o dispersión.

1.6.2 Propiedades de superficie

Las espumas y emulsiones están presentes en la mayoría de los alimentos procesados. Existe una gran variedad de espumas o batidos en alimentos de consistencias muy diversas, tales como merengues, malvaviscos, productos de pastelería-confitería, cremas batidas, aderezos, algunas pastas, helados, suflés, espuma de cerveza, incluso en el pan.

Las propiedades superficiales requieren un grado de hidratación y de solubilización proteica elevado (Chandi *and* Sogi, 2007a). En los alimentos basados en emulsiones y espumas, las proteínas desempeñan un rol fundamental como agentes tensioactivos (Cheftel *et al.*, 1989; Wilde *and* Clark, 1996; Damodaran, 1997).

Una espuma o una emulsión alimenticia es una dispersión de burbujas de gas o de gotitas en una fase continua líquida o semilíquida, ambas fases no miscibles. La proteína, como agente tensioactivo, es la principal responsable de esta propiedad ya que forma una barrera protectora conteniendo las burbujas o gotitas. La habilidad de las proteínas para actuar como agentes tensioactivos y estabilizar espumas y emulsiones depende de su habilidad para adsorberse a las interfases, reducir la tensión interfasial y formar un film cohesivo. Las proteínas, contribuyen tanto a la formación como a la estabilidad de la emulsión (Cheftel *et al.*, 1993). Estas son buenos agentes espumantes o emulsionantes debido a que por su naturaleza anfifílica, tienen acción tensioactiva, y por su tendencia a desnaturalizarse y agregarse en interfases, forman películas de rigidez y elasticidad variables (Wagner, 2000). Se supone que una vez que una zona de una molécula proteica ha hecho contacto con la interfase los restos aminoacídicos apolares se orientan hacia la fase no acuosa, la energía libre del sistema disminuye y el resto de la proteína se adsorbe espontáneamente. Durante la adsorción, la mayor parte de las proteínas sufren un acusado desplegamiento y si se halla disponible una superficie grande, se extiende formando en ella una capa monomolecular ($1\text{mg}/\text{m}^2$, 10-20 Å de espesor) (Cheftel *et al.*, 1993). La proteína se adsorbe en la interfase gotas de aceite o aire (fase dispersa)/disolución acuosa (fase continua) y contribuyen a las propiedades físicas y reológicas (espesor, viscosidad y elasticidad-rigidez) que determinan la resistencia del sistema. La formación de este sistema requiere aporte de energía, proporcional a la superficie creada y a la tensión entre las fases. Es un sistema termodinámicamente inestable debido a la elevada área interfasial creada, acompañada por una alta tensión superficial, lo cual genera un aumento de la energía libre del sistema.

1.6.2.a Espumas

Al estudiar las propiedades de las proteínas se debe distinguir entre la capacidad de formación de espuma que estas presenten y su capacidad para estabilizar el sistema. La primera está relacionada con la velocidad de las proteínas de migrar y adsorberse rápidamente en la interfase y formar una lamela alrededor de la burbuja, proceso que se ve representado en la Figura 5.

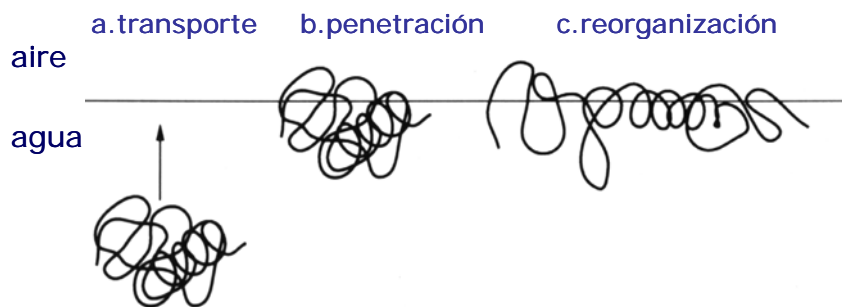


Figura 5. Proceso de adsorción de proteínas. a) difusión a la interfase b) adsorción, c) reorganización estructural (Wilde y Clark, 1996)

Para que esto ocurra, la proteína debe ser soluble, flexible, tener baja masa molecular y poseer un balance adecuado lipofílico-hidrofílico. No todas las proteínas pueden espumar, y aquellas que lo hacen varían ampliamente en su capacidad espumante (MacRitchie, 1998). Paralelamente, para que el sistema resulte estable, esta película creada debe mantenerse en el tiempo; para lo cual, debe poseer determinadas propiedades reológicas que le confieran resistencia, cierta rigidez y flexibilidad e involucran las estructura secundaria y terciaria de la proteína (Tang *et al.*, 2003). Las moléculas de proteína tienen que asociarse entre sí ya sea por interacciones hidrofóbicas o por puentes disulfuro para formar agregados de gran tamaño, mínima carga superficial y alta capacidad de absorción de agua (Wagner, 2000). Debido a que el sistema es termodinámicamente inestable se produce la destabilización de la espuma. Este proceso involucra mecanismos como: drenaje de líquido por efecto de la fuerza de gravedad; acumulación de burbujas en la parte superior del recipiente por flotación y maduración de Ostwald, las burbujas grandes crecen a expensas de las pequeñas (Figura 6).

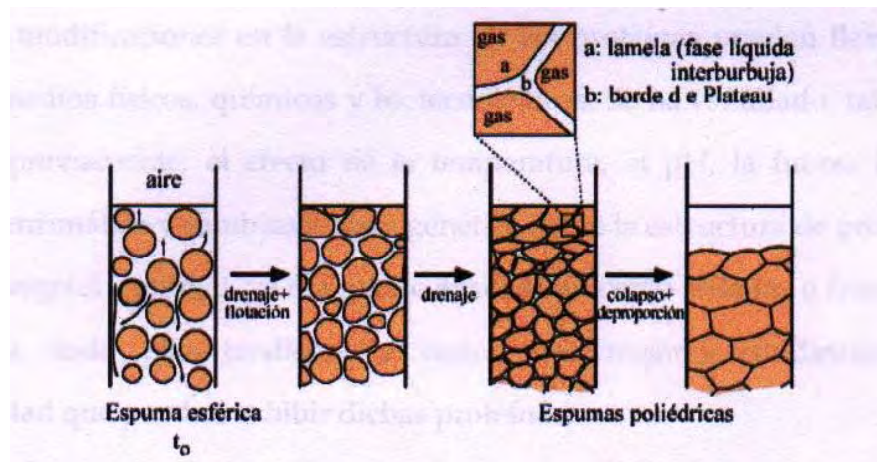


Figura 6. Representación esquemática de los procesos de desestabilización de una espuma (Wagner, 2000)

Se puede observar que con el pasar del tiempo las espumas pueden colapsar por ruptura de las películas creadas por las proteínas y las burbujas adoptan una forma poliédrica (Wagner, 2000).

Las propiedades espumantes se ven afectadas por factores dependientes del medio como son la concentración y solubilidad proteica, el pH, la concentración y tipo de sales e hidratos de carbono presente en la solución o suspensión considerada.

1.6.2.b Emulsiones

Las emulsiones son dispersiones de dos líquidos no miscibles, uno se encuentra bajo la forma de pequeñas gotitas dispersas y el otro es la fase continua dispersante. La mayor parte de las emulsiones alimenticias son emulsiones de aceite en agua o bien agua en aceite. La estabilidad de una emulsión está entonces determinada o afectada por distintos factores como son la distribución del tamaño de gota (generalmente en el rango de 0,1-100 μ m), la viscosidad de la fase continua, la temperatura, la diferencia de densidad entre fases, la relación volumétrica entre fase, las propiedades de la película interfacial y el trabajo mecánico (agitación, batido) al que se somete la emulsión (Wagner, 2000).

El proceso de emulsificación involucra la formación estabilización y desestabilización de la emulsión. Semejante al proceso descrito en las espumas, la formación de una emulsión depende de la rápida adsorción, desenrollamiento en la interfase y reorientación de las proteínas. Desde el momento en que se forma una emulsión, por dispersión de una fase en otra, comienza simultáneamente el proceso

de desestabilización, que tiende a una disminución del área interfacial y origina finalmente la separación parcial o total de las dos fases inmiscibles. Según Halling (1981), los mecanismos que contribuyen simultánea y sinérgicamente a la desestabilización de una emulsión son la *desproporción*, la *floculación*, el *cremado*, la *coalescencia* y la *inversión de fase*. La *desproporción* es el crecimiento de las gotas de mayor tamaño a expensas de las más pequeñas. La *floculación* es la aproximación e interacción de las gotas entre sí, que conduce a la formación de agregados o "floculos"; la velocidad de este proceso depende de la naturaleza de los grupos constitutivos (provenientes de los residuos polares de las cadenas polipeptídicas, de fosfolípidos, de sales). El *cremado* es la separación de la dispersión en una emulsión "concentrada" superior y una emulsión "diluida" inferior, debido a la diferencia de densidad entre la fase continua y la dispersa. La emulsión "concentrada" esta constituida mayoritariamente por la fase dispersa y se denomina fase cremada. El proceso de cremado esta favorecido por el mayor tamaño de la gota y por la *floculación*, ya que los agregados "creman" más rápidamente que las gotas aisladas. Estos dos procesos, *floculación* y *cremado*, se pueden revertir generalmente con una agitación más o menos vigorosa. Ambos procesos, junto a la *desproporción*, son los precursores de la *coalescencia*, la cual es irreversible. La *coalescencia* resulta de la ruptura del film interfacial, fusión de las gotas y separación final de las dos fases. La resistencia a la *coalescencia* depende de numerosos parámetros como son las propiedades reológicas del film proteico interfacial, la viscosidad de la fase continua, la distribución de tamaño de gota, la temperatura y la relación entre fases. La *inversión de fase* es la transformación de una emulsión aceite/agua en agua/aceite, o a la inversa, ocurre generalmente en emulsiones con alta relación fase dispersa-fase continua cuando es sometida a un trabajo mecánico energético.

La capacidad de formar y estabilizar una emulsión está altamente relacionada con la solubilidad de la proteína (Bera *and* Mukherjee, 1989; Cheftel *et al.*, 1993) y con la flexibilidad de las moléculas (Paranam *et al.*, 2007). Las proteínas no disueltas contribuyen muy poco a la emulsión (Cheftel *et al.*, 1993). El pH también influye sobre esta propiedad ya que en sus puntos isoeléctricos son escasamente solubles (Cheftel *et al.*, 1993).

1.6.3 Propiedades dependientes de la interacción proteínas – lípidos

1.6.3a Absorción de aceite

A veces resulta conveniente que los ingredientes proteicos deshidratados adsorban cierta cantidad de aceite y la retengan (Cheftel *et al.*, 1993). Esta propiedad es esencial en la formulación de sistemas alimentarios como salchichas, batidos, mayonesas o aderezos salados. La materia grasa en un alimento es fundamental para aumentar la palatabilidad del mismo.

En numerosos alimentos son frecuentes las interacciones entre proteínas y lípidos, sobre todo fosfolípidos y triacilgliceroles. En estas interacciones no participan enlaces covalentes sino interacciones hidrofóbicas entre cadenas alifáticas apolares de los lípidos y regiones apolares de las proteínas. Los triacilgliceroles neutros se ligan a las proteínas a través de interacciones hidrofóbicas y pueden eliminarse mediante solventes apolares; los fosfolípidos en cambio, se ligan aun más intensamente a través de enlaces polares y para separarlos se necesita recurrir a disolventes polares. La interacción proteína-lípido esta relacionada con la solubilidad: las proteínas insolubles son las que mayor cantidad de aceite fijan y tanto más cuanto más hidrófobas sean (Cheftel *et al.*, 1993). Las lipoproteínas de baja densidad, en polvo, con tamaño de partícula pequeño adsorben o atrapan más aceite que las de alta densidad (Cheftel *et al.*, 1993).

1.7 Propiedades funcionales de proteínas de arroz

El estudio de las propiedades funcionales de las proteínas de arroz se inició sobre concentrados y aislados de salvado de arroz con evaluaciones de solubilidad (Chen *and* Houston, 1970), posteriormente se estudió la capacidad espumante y su relación con la estructura (Kinsella, 1981) y la variación de la capacidad espumante y emulsificante con el pH y la fuerza iónica (Bera *and* Mukherjee, 1989) continuando hasta la actualidad con estudios más detallados evaluando, además, propiedades de hidratación y absorción de aceite (Chandi *and* Sogi, 2007a).

A partir del año 2000 y hasta nuestros días la investigación se ha centrado en el estudio de las propiedades funcionales de hidrolizados proteicos: Hamada (2000) estudia solubilidad y capacidad emulsificante, Tang *et al.* (2003) agregan capacidad espumante e hidrofobicidad superficial y en nuestros días Bandyopadhyay *et al.* (2008) estudian solubilidad, capacidad espumante y

emulsificante a partir de hidrolizados de arroz pero con diferente grado de hidrólisis.

Solo unos pocos trabajos evalúan las propiedades funcionales de las fracciones proteicas (Ju *et al.*, 2001) o solamente de las glutelinas (Anderson *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2002; Agboola *et al.*, 2005). Menor aún es la cantidad de trabajos que estudian las diferencias de las propiedades funcionales entre variedades diferentes de arroz (Agboola *et al.*, 2005).

Si bien la proteína de arroz es valorada por su sabor suave, la ausencia de color, su riqueza en aminoácidos esenciales, y por ser hipoalergénica, es escasa y fragmentaria la información con que se cuenta hasta el momento sobre diferentes modos de preparación de aislados proteicos provenientes de grano integral ó pulido, y la diferente funcionalidad que estos aislados puedan presentar al obtenerse a partir de variedades específicas. Como fuera mencionado en la Estación Experimental "Julio Hirschhorn", La Plata, Buenos Aires, Argentina y en el marco del Programa de Incentivos Docentes, el Programa Arroz de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales ha desarrollado la variedad Nutriar con un 30% más de proteína que los cultivares normales. Dependiendo de la ubicación y la fracción proteica a la que pertenezca, esta proteína extra podría presentar propiedades que permitan un mejoramiento en la obtención de aislados proteicos con buenas propiedades funcionales.

1.8 Hipótesis de trabajo y objetivos

Por todo lo anterior se ha elaborado la siguiente hipótesis de trabajo:

A partir de la variedad de arroz Nutriar, de alto contenido en proteínas, se podrían obtener aislados proteicos de buena calidad nutricional y funcional.

En el marco de esta hipótesis nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

Objetivo general

- Estudiar las proteínas de arroz de la variedad Nutriar desde el punto de vista estructural y funcional provenientes de grano pulido e integral. Compararlas con las de una variedad de amplio uso local, de calidad tropical.

Objetivos particulares

- Determinar la composición proteica, cuali y cuantitativamente de la variedad Nutriar en comparación con la variedad de referencia.
- Explorar distintos métodos de preparación de aislados proteicos mediante la variación del pH de extracción de proteínas. Elección del método más adecuado.
- Caracterización estructural, nutricional y funcional de los aislados obtenidos con la metodología de elección.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

II - MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales: Semillas y harinas

Se utilizaron granos de arroz cáscara de las variedades Nutriar FCAyF (Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata) de alto contenido proteico y El Paso 144 ROU, variedad de amplia difusión local (Figuras 1 y 2).

El material se obtuvo de los ensayos que se condujeron en la Estación



Nutriar

El Paso 144

Figura 1: variedades Nutriar y El Paso 144 cultivadas en la Estación Experimental Julio Hirschhorn, La Plata, Bs. As.

Experimental Julio Hirschhorn (Lat.: 34°52´S y Long.: 57°57´W) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata.

Los granos fueron cosechados maduros, trillados en forma manual y secados en estufa a 40°C hasta humedad de 13,5%. Se obtuvieron las fracciones de grano integral y pulido por medio de un molino experimental (tipo universal Giudetti y Artioli, USA).

Las harinas de grano integral y pulido fueron molidas en la cátedra de Cerealicultura de la Facultad antes mencionada utilizando un molino Udy, de 1 mm de mesh y tamizadas a través de un cedazo de mesh 10xx. Las harinas así obtenidas, se almacenaron a 4 °C.



Nutriar

El Paso 144

Figura 2: grano pulido de las variedades Nutriar y El Paso 144

2.2 Preparación de muestras

2.2.1 Extracción de las fracciones y subfracciones proteicas

A partir de harina integral de las variedades Nutriar y El Paso 144 se realizó una extracción secuencial de las distintas fracciones proteicas según el método de Osborne modificado. La relación "harina/solvente de extracción (gr/ml)" fue de 1/10 en todos los casos. En primera instancia se extrajo la fracción **albúminas** utilizando agua destilada como solvente. Luego de 60 minutos de agitación constante la suspensión harina/agua se centrifugó a 15.000 rpm durante 20 minutos a 20 °C y se separó el sobrenadante. Con el residuo precipitado se procedió a la extracción de las **globulinas** utilizando Buffer A: K_2HPO_4 32,5 mM, KH_2PO_4 2,6 mM (pH 7,5) conteniendo NaCl 0,4 M. Después de 60 minutos de agitación se centrifugó, se separó el sobrenadante y a partir del precipitado se realizó la extracción de glutelinas (NaOH 0,1N). Por último a partir de este residuo se extrajo la fracción **prolamina** con etanol al 70%.

En una preparación independiente se obtuvieron las **subfracciones Gt0,01** y **Gt0,1** a partir del residuo remanente luego de la extracción de globulinas. La subfracción Gt0,01 se extrajo utilizando NaOH 0,01N con agitación constante durante 60 minutos a 25°C. Se centrifugó a 15000 rpm, durante 20 minutos, a 20°C. El precipitado se re-suspendió con NaOH 0,1N y se extrajo la subfracción Gt0,1 en forma similar a la anterior.

2.2.2 Extracción de proteínas totales

Se realizó la extracción de proteínas a pHs 2, 9, 10, 11 y 12 a partir de harina de arroz pulido e integral de las variedades Nutriar y El Paso 144 con una relación final harina/solución de extracción de 1:10 p/v. En el caso de pH 2 se disolvió la harina en agua destilada y se mantuvo el pH con HCl 0,1N durante 60 minutos con agitación constante, a temperatura ambiente. En los casos de extracción alcalina se procedió del mismo modo pero manteniendo el pH con NaOH 0,1N. Después de cada extracción se centrifugó a 15.000 rpm, durante 20 minutos, a 20°C y se conservó el sobrenadante.

En todos los casos se cuantificó el contenido proteico o rendimiento en la extracción del sobrenadante mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

2.2.3 Preparación de aislados proteicos

En el caso de las subfracciones (Gt0,01 y Gt0,1) y los aislados a pH 12 a partir de los sobrenadantes obtenidos en la forma descrita se obtuvieron los liofilizados proteicos de la siguiente manera:

En cada caso el sobrenadante se llevó a pH 6. El precipitado proteico obtenido se separó por centrifugación a 12.000 rpm, durante 20 minutos, a 8 °C. El mismo se re-resuspendió en agua destilada ajustando el pH a 7,0. Se congeló a -80 °C y se liofilizó en un equipo Heto modelo FD4. Los liofilizados se mantuvieron en cámara (4°C).

El contenido proteico de los aislados se cuantificó por el método de micro-Kjeldahl de acuerdo con la AOAC (1970). El factor de conversión utilizado fue 5,95 (Juliano, 1985).

2.3 Electroforesis

2.3.1 Reactivos generales

Buffer de electrodo: hidroximetil aminometano-HCl (Tris-HCl) 0,025 M, glicina 0,192 M (pH 8,3), con o sin dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,1% p/v, para electroforesis desnaturalizante o nativa respectivamente.

Buffer de gel apilador o de concentración: Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8) con o sin SDS 0,1% p/v.

Buffer de gel separador: Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8) con o sin SDS 0,1% p/v.

N⁺, N⁻, N⁺, N⁻, tetrametiletilendiamina (TEMED): en ambos buffers (separador o apilador) se utilizó una concentración 0,1% v/v.

Buffer de tratamiento para electroforesis bidimensional: Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), SDS 0,1% p/v, sacarosa 20% p/v, con o sin 2-ME 0,2 M.

Buffer de muestra para geles:

desnaturalizantes (SDS-PAGE): Tris-HCl 0,185 M (pH 8,8), glicerol 12,5% v/v, azul de bromofenol 0,05% p/v y SDS 0,1% p/v, con o sin 2-mercaptoetanol (2-ME) 5% v/v, para obtener condiciones reductoras o no reductoras, respectivamente.

no desnaturalizantes (PAGE-nativo): similar al anterior pero sin el agregado de SDS 0,1% p/v

en presencia de urea (PAGE-urea): similar al anterior pero con el agregado de urea 6 M.

Electroforesis con tricina: buffer anódico (colocado fuera del contenedor de electrodos) Tris-HCl 0,2 M (pH 8,9); buffer catódico (colocado dentro del contenedor de electrodos) Tris-HCl 0,2 M (pH 8,25) Tricina 0,1M, SDS 0,1% p/v; gel buffer Tris-HCl 3M (pH 8,45), SDS 0,3% p/v (Schägger *and* Jagow, 1987).

2.3.2 Preparación de las muestras

Las muestras se prepararon disolviendo la proteína liofilizada en buffer de muestra o, cuando se trataba de soluciones proteicas, agregando 3 volúmenes de las mismas a 1 volumen de buffer de muestra 4x. En las electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras las muestras fueron tratadas con 2-mercaptoetanol al 5% v/v, durante un minuto, a 100 °C. Todas las muestras, antes de ser cargadas en el gel correspondiente, se centrifugaron a 15.000 rpm durante 15 minutos a 20 °C en una microcentrífuga IEC (Centra MP4R, International Equipment Company), y los sobrenadantes se sembraron a razón de 30-50 µg de proteína/calle.

2.3.3 SDS-PAGE. Desarrollo

Las electroforesis se realizaron en miniplacas con un equipo BIO-RAD, modelo Mini Protean II.

Se utilizó el sistema de buffers descrito por Laemmli (1970), que se detalló previamente. Las electroforesis se llevaron a cabo a un voltaje constante de 200 V (aproximadamente 1,5 horas). Se utilizaron geles de concentración constante de acrilamida 14% p/v con gel apilador en su parte superior, con una concentración de acrilamida de 4% p/v.

La mezcla de proteínas patrón utilizadas para la estimación de las masas moleculares de los polipéptidos fueron suministradas por Pharmacia en un único vial y son: fosforilasa b (94.000 Da); seroalbúmina bovina (67.000 Da); ovoalbúmina (45.000 Da); anhidrasa carbónica (30.000 Da); inhibidor de tripsina (20.100 Da) y α -lactoalbúmina (14.400 Da).

2.3.3a PAGE-urea. Para estas electroforesis se empleó el mismo sistema buffer que para las no-desnaturalizantes pero con el agregado de urea 6 M y en remplazo de SDS se empleó Chaps 0,005M. Se utilizaron geles de acrilamida de 7,5% p/v. Se llevaron a cabo a un voltaje constante de 200 V durante aproximadamente 2 horas.

2.3.3b PAGE-Tricina. Con la finalidad de obtener mayor resolución en muestras de menor peso molecular, se utilizó el sistema de buffers descrito por Schägger and Jagow, (1987). Se utilizaron geles de acrilamida de 16% p/v para el separador, 10% para el spacer y 4% p/v en el stacking. Las electroforesis se llevaron a cabo a un voltaje inicial de 30V, una vez atravesado el stacking se continuó la corrida a 90V durante 2,5 horas aproximadamente.

2.3.3c Electroforesis bidimensionales (SDS-PAGE → SDS-PAGE + 2-ME).

Luego de correr la primera dimensión (geles de 0,75 mm de espesor) se cortó la porción del gel correspondiente a dos calles con la proteína a analizar, y se la sumergió en 30 ml de buffer de tratamiento (descrito previamente en el punto 2-3-1), manteniéndola a 55 °C durante 30 minutos con dos cambios de la solución. La porción de gel tratada se colocó sobre el gel de la segunda dimensión de 1 mm de espesor (SDS-PAGE o SDS-PAGE + 2-ME según correspondiera). En este mismo gel, en una calle aparte y como referencia, se sembró la mezcla de proteínas patrón de masa molecular conocida. La electroforesis se desarrolló de la misma manera que las anteriores.

2.3.4 Coloración

Los geles fueron fijados y teñidos al mismo tiempo con Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0,192% p/v en agua/metanol/ácido acético (10:10:4) durante 12 horas y desteñidos con metanol 25% p/v y ácido acético 10% p/v.

2.3.5 Obtención de las imágenes

Las imágenes de las electroforesis fueron digitalizadas mediante un equipo BIO-RAD (Gel Doc 1000).

2.4 Determinación de la composición aminoacídica

Previo el análisis de aminoácidos, la proteína de los aislados Ni y Ei fue purificada según el método descrito por Mooney *and* Thelen (2004).

La determinación de la composición aminoacídica fue realizada en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (Lanais-Pro, CONICET-UBA) perteneciente al departamento de Química Biológica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

2.5 Digestibilidad *in vitro*

Se determinó la digestibilidad *in vitro* de los aislados Ei, Ni, Ep y Np por simulación gástrica e intestinal (Nakano *et al.*, 1994).

Las enzimas utilizadas fueron: Pancreatina: (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y Pepsina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

Se prepararon suspensiones con los aislados proteicos (25 mg/ml) ajustadas a pH 2 con HCl 1 N. Se preincubaron durante 30 minutos a 37°C con agitación constante. Se agregó pepsina al 1% en HCl 0,1 N; NaCl 0,03 M, solución que simula el fluido gástrico, se incubaron durante 60 minutos a 37°. Posteriormente se llevó a pH 6 con NaOH 1 N, se agregó pancreatina al 5% en NaHCO₃ 0,1 N (solución que simula el fluido intestinal), nuevamente, se incubaron 60 minutos a 37°. La reacción se interrumpió sumergiendo la muestra en baño maría (T=80°C durante 10 minutos). Se centrifugó y se recuperó el sobrenadante.

Se utilizó el método TNBS propuesto por Adler-Nissen (1979) para determinar la extensión de los péptidos. Se tomó como referencia el aminoácido *leucina* para realizar la curva patrón y considerando que el total de grupos aminos posibles en un grado máximo de hidrólisis es de 8 meq de leucina/litro de solución.

Posteriormente luego de la hidrólisis enzimática, se calculó, en base al mencionado valor, el Grado de Hidrólisis (GH) mediante la utilización de la expresión matemática:

$$\text{GH} = \frac{(\text{NH}_2)_m - (\text{NH}_2)_o}{(\text{NH}_2)_\infty - (\text{NH}_2)_o} \times 100$$

Siendo:

GH= Grado de hidrólisis en porcentaje

(NH₂)_m = meq de leucina/l de la muestra digerida

(NH₂)_o = meq de leucina/l de la muestra sin digerir

(NH₂)_∞ = meq de leucina/l totales de la proteína = 8

El número de meq de leucina/l totales de la proteína fue ajustado por el porcentaje de proteína del aislado.

2.6 Solubilidad de las subfracciones y de los aislados proteicos

Para el estudio de la solubilidad de las subfracciones proteicas (Gt0,01 y Gt0,1) se utilizó buffers borato, (pH 10) en concentraciones de 0,030 y 0,1 M $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_2\text{BO}_3^-$.

Para el estudio del efecto del pH sobre la solubilidad de los aislados proteicos se utilizaron distintos buffers de concentración 0,2 M:

- ácido cítrico /citrato (pH 2,3; pH 3,1; pH 4,1; pH 4,7 y pH 5,1)
- ácido fosfórico/fosfato, (pH 6,3 y pH 7,5)
- ácido bórico/borato (pH 8,8 y pH 9,7)
- ácido carbónico/carbonato (pH 10,1 y pH 11,0).

Se prepararon suspensiones de las muestras (1 mg/ml) en agua o en las soluciones correspondientes. Se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con agitación cada 15 minutos, se centrifugaron a 12.000 rpm, durante 20 minutos, a temperatura ambiente y se calculó el contenido de proteína del sobrenadante mediante el método de Lowry. Finalmente el porcentaje de solubilidad se calculó dividiendo la concentración proteica del sobrenadante (mg/ml, calculada por el método de Lowry) por el contenido proteico del aislado (calculada por el método Micro-kjeldahl, mg de proteína/mg de aislado).

2.7 Capacidad de absorción de agua (WIC)

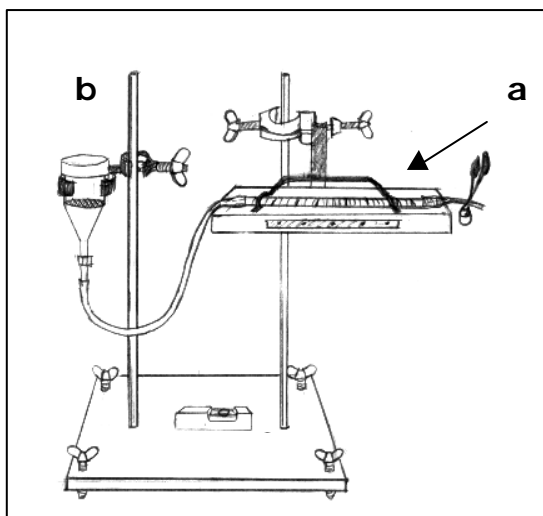


Figura 3. Esquema del equipo utilizado en la determinación de la capacidad de absorción de agua de los aislados proteicos. a) pipeta graduada, b) embudo con papel de filtro.

La capacidad de absorción de agua (WIC, *water imbibing capacity*) se determinó siguiendo la técnica Torgensen *and* Toledo (1977), utilizando un equipo similar al aparato diseñado por Baumann (Baumann, 1967) que se esquematiza en la Figura 3.

Tal como lo describiera Silingo en su Tesis doctoral

(2000), el principio del método se basa en determinar la cantidad de agua que un polvo proteico es capaz de absorber espontáneamente a una temperatura dada, cuando se pone en contacto con una cantidad ilimitada de agua. El equipo consiste en una pipeta de pequeño volumen, graduada, cuyo eje longitudinal se encuentra al mismo nivel que la superficie de contacto entre el agua y la proteína en polvo. La proteína se coloca sobre un papel de filtro que está apoyado en una superficie plana que continua en un embudo. Ambos, la pipeta y el embudo, se conectan a través de un tubo. Para medir la WIC de los aislados, se colocó una cantidad conocida de muestra (de aproximadamente 30 mg) de una vez, en forma de monocapa sobre el papel de filtro húmedo luego de enrasar la pipeta y antes de tapar el embudo. Se registró el retroceso de la columna de agua en la pipeta en función del tiempo hasta que se llegó a un valor constante de absorción. Todo el proceso se llevó a cabo en un ambiente a $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Las curvas ideales de absorción de agua en función del tiempo tienen forma hiperbólica. Los valores obtenidos fueron graficados. La WIC se obtuvo dividiendo el volumen de agua absorbido en la región de equilibrio (saturación) por la masa de muestra empleada en la determinación. A partir la curva de cinética se obtuvo el volumen máximo de absorción y el tiempo de equilibrio que fue el necesario para alcanzar el volumen máximo de absorción

2.8 Capacidad de retención de agua (WHC)

Se determinó la capacidad de retención de agua aproximada (WHC, *water holding capacity*) por el método de Quinn *and* Paton (1979). Se prepararon dispersiones de los aislados al 1% (p/v) en agua destilada se mantuvieron con agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 14.000 rpm durante 30 minutos a 15°C . Luego de separar el sobrenadante los tubos de centrifuga fueron invertidos y colocados sobre papel absorbente por 1 minuto antes de pesarlos. Se determinó la masa húmeda de los sedimentos y el contenido de proteína soluble en los sobrenadantes obtenidos por el método de Lowry. WHC es expresado como mililitros de agua retenida por la fracción insoluble de la proteína total (Petruccelli *and* Añón, 1994).

La capacidad de retención de agua se calculó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{WHC} = (\text{mh} - \text{md} + \text{mp}) / \text{md} \times \bar{d}$$

Siendo WHC: capacidad de retención de agua, en ml de agua/g de muestra

- md: masa del aislado proteico deshidratado
- mh: masa del pellets hidratado (proteína insoluble)
- mp: masa de proteína soluble
- δ : densidad del agua a 20°C (1g/ml)

2.9 Actividad espumante

La actividad espumante de los aislados se determinó utilizando un equipo similar al diseñado por Loisel *et al.* (1993). El equipo genera espuma por burbujeo de N₂ y registra la conductividad eléctrica del líquido (en nuestro caso solución proteica). Este equipo permite el seguimiento del proceso de formación de espuma y el registro de la variación del volumen de la solución en función del tiempo, según el principio propuesto por Wagner *et al.* (1996). A partir de la planilla generada por el mismo, se pueden calcular diferentes parámetros que dan cuenta de las propiedades espumantes de la proteína (Wilde *and* Clark, 1996; Wagner, 2000). Este método tiene numerosas ventajas ya que permite trabajar con bajas concentraciones de proteína (inferiores a 0,5%), usar volúmenes de líquidos pequeños (inferiores a 20ml), permite controlar el caudal y volumen de aire incorporado, además de obtener un volumen de burbujas homogéneo y tener una buena reproducibilidad (Wagner, 2000).

En nuestro caso particular, las espumas de los aislados se formaron por burbujeo de N₂ a flujo constante (caudal 1,7 ml/seg) a través de 6 ml de dispersiones 1 mg proteína total/ml en buffer H₃BO₃/H₂BO₃⁻ a pHs 3 y 9 y fuerza iónica $\mu = 0,2M$.

Se determinó la *capacidad de formar espuma* como el volumen máximo de líquido incorporado a la espuma (V_{max}), y la *estabilidad de la espuma* como el tiempo que tarda en drenar el 50% del volumen máximo ($t_{1/2}$); parámetros que pueden visualizarse gráficamente en la Figura 4.

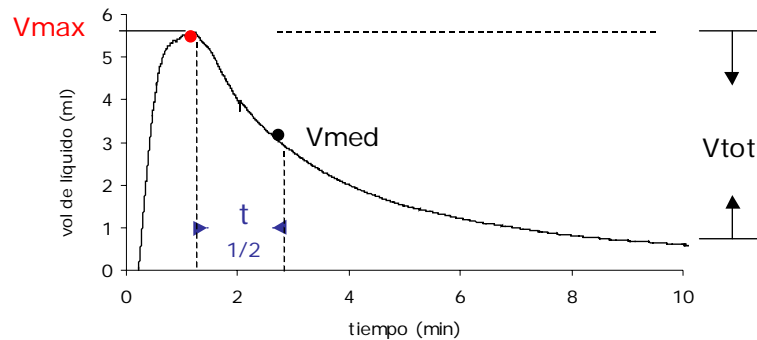


Figura 4 . Parámetros determinados a partir de la curva de volumen incorporado a la espuma en función del tiempo.

V_{max} =volumen máximo del líquido incorporado a la espuma; $t_{1/2}$ = tiempo que tarda en drenar el 50% del V_{max} ; V_{medio} = 50% de V_{max} ; V_{tot} = Volumen total de líquido incorporado a la espuma en 10 minutos.

2.10 Actividad emulsificante

Se prepararon suspensiones a partir de 7 ml de aceite puro de girasol con 14 ml de una suspensión de muestras de aislados (1,5 mg de muestra/ml) en buffer borato pH 3 y 9 y fuerza iónica $\mu=0,2M$. Estas muestras fueron homogeneizadas mediante un equipo Ultraturrax (T-25, S25N10G, IKA Labortechnik, Karlsruhe, Alemania) operando a 20.000 rpm durante 90 segundos a 25 °C. La evolución de las diferentes emulsiones se determinó por medidas de dispersión de la luz en un analizador óptico vertical QuickScan (Beckman Coulter, Fullerton, USA). Este equipo permite hacer un barrido de la emulsión a lo largo del tubo de medida en diferentes instantes, obteniéndose una serie de perfiles del porcentaje de backscattering (%BS) en función del tiempo (Pan *et al.*, 2002).

Las muestras homogeneizadas fueron colocadas en recipientes cilíndricos o tubo de medida para determinar los perfiles de backscattering (%BS) registrando el valor de porcentaje cada 60 segundos durante 1 hora a lo largo del tubo (altura total: 60 mm).

El backscattering inicial (%BS_{in}) fue medido al comienzo de la determinación como promedio del barrido a $t = 0$ min, a lo largo de todo el tubo de medida. La cinética de cremado (%BS_{10-30mm}) fue determinada mediante los valores promedio de backscattering en la parte inferior del tubo (entre 10 y 30 mm) en función del tiempo.

Los parámetros calculados para caracterizar la estabilidad de la emulsión fueron:

$t_{0,1}$ como el tiempo que tarda en disminuir en un 10% el valor de % BS_{10-30mm} y la constante cinética ($K_{0,1}$) según la expresión matemática:

$$K_{0,1} = (\%BS_{10-30mm} \times t_{0,1})^{-1}$$

La coalescencia (%BS_{50-60mm}) se midió como la variación de los promedios de backscattering en la zona superior del tubo (50-60 mm) en función del tiempo de estacionamiento de la emulsión.

2.11 Absorción de aceite

Se prepararon dispersiones de los aislados al 1% (p/v) en aceite puro de girasol, se mantuvieron con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 14.000 rpm durante 30 min a 15°C. Luego los tubos fueron invertidos y colocados sobre papel absorbente por 1 minuto antes de pesarlos.

2.12 Análisis estadístico de los resultados y programas utilizados

Los resultados numéricos obtenidos fueron analizados estadísticamente empleando el programa *Statgraphics Plus 4.0*, *Statistical Statgraphics Corp.*, Rockville, MD. Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

Con los parámetros evaluados se realizaron análisis de varianza (ANOVA), una sola vía comparando las medias por Test de LSD ($p < 0,05$). Letras iguales en las tablas representan diferencias no significativas.

Con los valores obtenidos al evaluar los diferentes parámetros que caracterizaron las propiedades funcionales estudiadas a pH 9 y fuerza iónica $\mu = 0,2M$, se realizó una Matriz de Correlación de Pearson.

Se utilizaron las herramientas proporcionadas por Office Microsof 1997-2003 y el OriginPro 7.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3 / RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO I. Caracterización estructural de las fracciones proteicas de las variedades Nutriar y El Paso 144

I.1 Caracterización polipeptídica

Se estudiaron las proteínas de arroz de las variedades Nutriar y El Paso 144 mediante electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).

En una primera instancia se observó el perfil que presentaban las harinas de

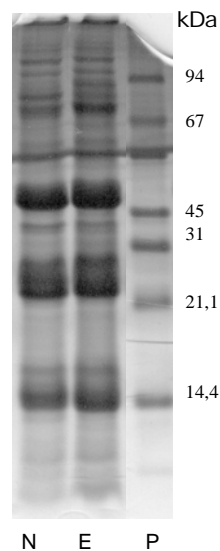


Figura 1. SDS-PAGE de harina integral de las variedades **N**: Nutriar y **E**: El Paso 144. **P**: patrón molecular. Se indican las masas de las proteínas patrones en kDa.

las variedades en estudio (Figura 1). Tanto la distribución como la intensidad de las bandas muestran una gran similitud entre Nutriar y El Paso 144. Se distinguen claramente los polipéptidos de: 13-16 kDa, alrededor de 26 kDa, entre 30 y 40 kDa y 55-59 kDa correspondientes a la fracción glutelina. Ambos perfiles sólo se diferencian en la intensidad de algunas bandas, especialmente las de mayor peso molecular.

Se analizó la composición polipeptídica de las fracciones proteicas de las dos variedades en estudio.

La fracción **albúminas**, tanto en grano pulido como integral, presentó numerosas bandas con pesos moleculares entre 95 y 14,4 kDa conforme a lo observado por Juliano (1980). No obstante, la mayor abundancia, correspondió a

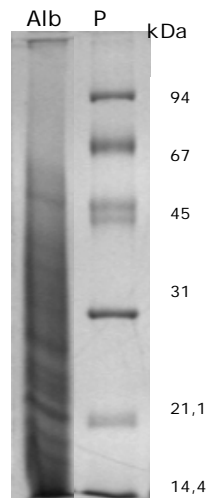


Figura 2. Perfil tipo de la fracción albúmina en condiciones no reductoras.

polipéptidos de peso molecular inferior a 45 kDa. En la Figura 2 podemos ver un perfil representativo de la fracción que se encontró en las muestras estudiadas.

En cuanto a la fracción **globulina**, en condiciones no reductoras, su perfil presentó polipéptidos entre 45 y 67 kDa, entre 31 y 45 kDa y bandas de aproximadamente 26, 21 y 14 kDa (Figura 3, sin β -ME). En condiciones reductoras, las bandas de pesos moleculares altos disminuyen en intensidad, mientras se distingue marcadamente la banda de 26 kDa descrita como mayoritaria de las globulinas de arroz (Komatsu *and* Hirano 1992; Furukawa *et al.*, 2003; Kumagai *et al.*, 2006; entre otros).

Como se puede observar en la Figura 4, que muestra el perfil bidimensional de globulina de la variedad Nutriar, algunos de los polipéptidos de alrededor de 50 kDa serían dímeros unidos por puentes disulfuro. Por otro lado, el polipéptido de alrededor de 26 kDa corre por encima de la diagonal en la segunda dimensión, lo que indica que en su estructura están presentes uniones disulfuro internas (intracatenarios).

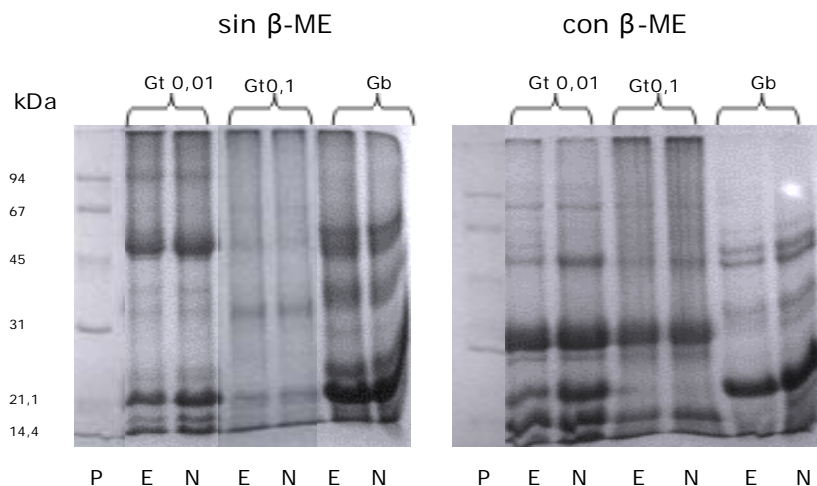


Figura 3. SDS-PAGE de las subfracciones proteicas de harina integral. **Gt0,01** y **Gt0,1**. **E:** El Paso 144 y **N:** Nutriar; **Gb:** globulinas. **P:** masas de las proteínas patrones de peso molecular.

La fracción **glutelina** se caracteriza por la abundancia de polipéptidos de alto peso molecular que no entran al gel o si lo hacen, se distribuyen con dificultad en la parte superior.

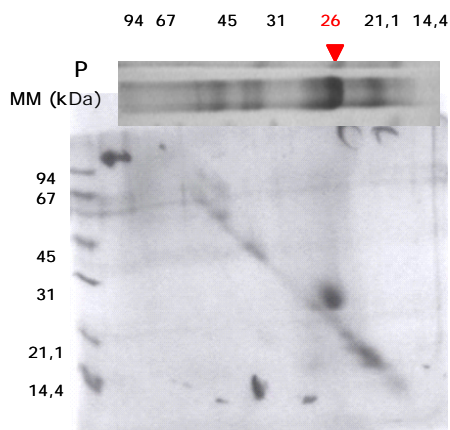


Figura 4. Electroforesis bidimensional de la fracción globulina de harina de grano integral de la variedad Nutriar.

Por ser la fracción mayoritaria del arroz y, teniendo en cuenta los resultados de Abugoch *et al.* (2003) en glutelinas de amaranto, la fracción glutelinas fue extraída en dos solventes diferentes. En una primera extracción se utilizaron condiciones más suaves (NaOH 0,01N) con el objeto de preservar la estructura molecular, si la hubiera, y se completó la extracción mediante condiciones más drásticas con NaOH 0,1N.

En condiciones no reductoras, **la subfracción Gt0,01** presentó una banda de alrededor de 94 kDa, otra más abundante de aproximadamente 57 kDa que correspondería a dímeros y otras de 22-23 y de 16 y 14 kDa, mientras **la subfracción Gt0,1** presentó una mayor proporción de los polipéptidos de aproximadamente 30 y 20 kDa y menor del polipéptido de alrededor de 57 kDa (Figura 3, sin β -ME). Esto nos estaría indicando que hubo un intercambio disulfuro-sulfhidrilos (S-S/SH) favorecido por la desnaturalización generada en condiciones alcalinas extremas. La extracción con NaOH 0,1N posibilitó el desplegamiento de la estructura proteica con la consecuente exposición de los grupos SS-SH que en otras condiciones estarían ubicados en el interior de la misma.

En condiciones reductoras, se pudo observar, tanto en Gt0,01 como en Gt0,1 la presencia del polipéptido de alrededor de 57 kDa que corresponde a la proglutelina (Qu *et al.*, 2001; Kumagai *et al.*, 2006) y de los polipéptidos integrantes de los dímeros de 37-39 y 22-23 kDa, subunidades ácida y básica respectivamente (Figura 3, con β -ME). Este comportamiento responde a la constitución propia de la glutelina mencionada por diversos autores (Yamagata *et al.*, 1982; Robert *et al.*, 1985; Qu *et al.*, 2001; Furukawa *et al.*, 2003; Kumagai *et al.*, 2006; entre otros).

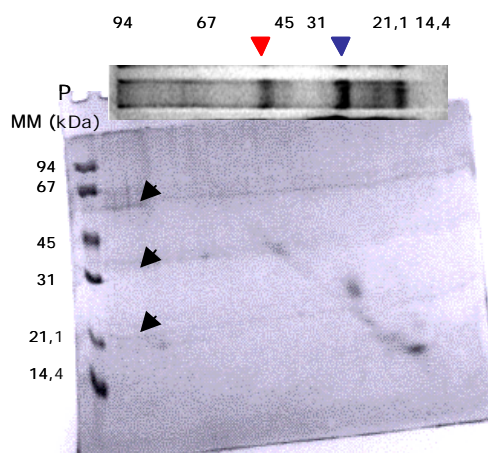


Figura 5. Electroforesis bidimensional de la fracción de glutelina de harina de grano integral de la variedad Nutriar.

mientras que el polipéptido de aproximadamente 57 kDa (flecha roja, figura 5) estaría integrado por polipéptidos de alrededor de 30 y 20 kDa, aunque la mancha del de 20 kDa no está intensa en la Figura 5.

Con posterioridad se corrió un gel desnaturante con urea en concentraciones 8 y 6 M. Este perfil presentó agregados, probablemente unidos por puentes disulfuro, debido a la exposición de los grupos SS y SH por el efecto desnaturante de la urea. Los perfiles reflejaron similar comportamiento de los polipéptidos tanto en las diferentes concentraciones de urea como en las diferentes variedades estudiadas (Figura 6).

Después de realizar un detallado estudio de la composición polipeptídica de las fracciones proteicas pudimos observar escaso polimorfismo entre las variedades Nutriar y El Paso 144 (Chandi *and* Sogi, 2007b).

La diferencia entre ambas subfracciones pudo observarse en una banda adicional de aproximadamente 26 kDa, solo presente en la subfracción Gt0,01 (flecha azul, figura 5).

Observando en detalle la fracción glutelina de harina integral de la variedad Nutriar, en la segunda dimensión puede verse que agregados de alto peso molecular que no entraron al gel, se estarían fraccionando en subunidades de aproximadamente 60, 32 y 21 kDa,

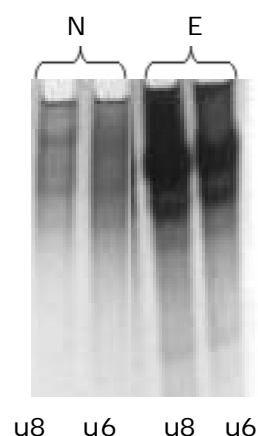


Figura 6. PAGE-nativo de la subfracción **Gt0,1** extraída a partir de harina integral de las variedades **E**: El Paso 144 y **N**: Nutriar; u6 y u8: molaridad de la urea.

I.2 Análisis cuantitativo de las fracciones proteicas en harinas de grano integral y pulido

En la Tabla 1 podemos observar la participación relativa de las diferentes fracciones proteicas en harina de arroz de grano pulido e integral de las variedades Nutriar y El Paso 144. En general todas las fracciones fueron más abundantes en el grano integral que en el pulido, con las excepciones de las globulinas en la variedad Nutriar con un contenido de 19% menor en integral que en pulido, y de las glutelinas en El Paso 144 con contenidos en grano integral y pulido equivalentes.

Tabla 1. Fracciones proteicas en harina de arroz de grano pulido e integral de las variedades Nutriar y El Paso 144 expresada en g/100g harina

	Albúmina	Globulina	Prolamina	Glutelina	Total de proteína*
Nutriar grano integral	1,14 ±0,05 a	0,65 ±0c	0,39±0,01 c	10,18±0,18 a	12,36±0,25a
Nutriar grano pulido	0,21±0,01 c	0,80±0,01 b	0,29±0 d	7,98±0,05 b	9,28±0,05 b
El Paso 144 grano integral	1,03 ±0,04 b	0,89±0,02a	0,63±0,02 a	7,59±0,44 bc	10,14±0,51b
El Paso 144 grano pulido	0,06±0 d	0,62±0,02c	0,57±0,02 b	6,90±0,40 c	8,15±0,44c

*g/100g harina. Letras diferentes en columnas representan diferencias significativas (LSD, $p < 0,05$).

El contenido total de proteínas para ambas variedades fue significativamente superior (LSD, $p < 0,05$) en la harina de grano integral que en la de pulido (Tabla 1). Este resultado es consecuencia de que en la harina de grano integral, además del endosperma, se encuentran presentes las cubiertas externas del grano (aleurona, testa y pericarpio) ricas en proteínas y el embrión, especialmente rico en albúminas y globulinas (Kishrnan *and* Withe, 1997). Asimismo, no se puede descartar que en el proceso de pulido se haya eliminado una pequeña porción de endosperma.

Los contenidos de cada fracción expresados en porcentaje de proteínas totales oscilaron entre 0,7-10,2% en las albúminas, 5,3-8,8% en las globulinas, 3,1-7% en las prolaminas y entre un 74,8-86,0 % en la fracción glutelina. Estos valores coinciden en uno u otro caso, con los diferentes autores que han estudiado la abundancia relativa de las fracciones proteicas sobre diferentes variedades de arroz a lo largo del tiempo como figura en Introducción (Tabla 5, página 9).

Paralelamente, se evaluó la proporción de las subfracciones de glutelinas (Gt0,01 y Gt0,1) en las dos variedades en estudio cuyos resultados se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2. Contenido de las subfracciones de glutelinas en harina integral expresado en g/100g de harina

Fracciones proteicas	Nutriar	El Paso 144
Gt0,01	1,86 ± 0,25 a A	2,37 ± 0,31 a A
Gt0,1	8,78 ± 1,65 b A	5,44 ± 0,73 b A

Letras diferentes minúsculas en columna y mayúsculas en filas representan diferencias (LSD, $p < 0,05$).

El contenido de la fracción Gt0,01 en ambas variedades fue muy bajo y similar entre ambas. En la variedad El Paso 144 la proporción de Gt0,01 en el total de glutelinas es mayor (30,34%) que en la variedad Nutriar (17,48%). Si consideramos que la Gt0,01 corresponde a la glutelina con menor grado de agregación, este resultado nos sugiere que el contenido extra de glutelinas que presenta la variedad Nutriar se encontraría entre la proteína más agregada (Gt0,1).

El total de glutelinas fue significativamente mayor en la variedad de alto contenido proteico (10,64 y 7,81% para N y E). Esto es coincidente con lo observado por Juliano (1980) y Udaka *et al.* (2000) quienes sostienen que un incremento en el contenido proteico del grano de arroz se correlaciona positivamente con un incremento de la fracción glutelina.

Con posterioridad se procedió a caracterizar estas dos subfracciones, en lo que se refiere a su solubilidad, utilizando buffer borato pH 10 a diferentes fuerzas iónicas.

Tabla 3. Solubilidad de las subfracciones de glutelinas de grano integral a pH 10 y distinta fuerza iónica expresada en g/100g de proteína

	Borato 0,03 M (pH10)		Borato 0,1 M (pH10)	
	Nutriar	EP 144	Nutriar	EP 144
Gt 0,01	22,7 ± 0,52 a A	9,35 ± 0,89 a B	12,5 ± 0,98 a A	5,81 ± 0,71 a B
Gt 0,1	2,31 ± 0,19 b A	2,21 ± 0,41 b A	1,44 ± 0,13 b A	1,15 ± 0,11 b A

Letras diferentes, minúsculas en columna y mayúsculas en filas para cada uno de los solventes, representan diferencias (LSD, $p < 0,05$).

Las subfracciones mostraron diferencias en su solubilidad (Tabla 3). La fracción Gt0,1 resultó de muy escasa solubilidad siendo significativamente menor que la subfracción Gt0,01 en ambas concentraciones de solvente y ambas variedades. Este resultado responde a las características propias de las glutelinas descritas por numerosos autores, entre ellos Agboola *et al.* (2005), quienes explican su insolubilidad debido al alto peso molecular y a la abundancia en puentes disulfuro (alto grado de agregación).

La solubilidad Gt0,01 de la variedad Nutriar fue significativamente superior a El Paso 144 en ambas concentraciones de solvente. Este resultado nos estaría indicando la existencia de diferencias en el grado de agregación ó en la estructura de los agregados entre las glutelinas de ambas variedades. Estas diferencias podrían reflejarse en diferencias en la funcionalidad de las proteínas de las variedades Nutriar y El Paso 144.

En términos generales, la solubilidad de las glutelinas fue mayor en el solvente de menor concentración salina (Tabla 3). El gran número de iones en solución favorecería la formación de agregados estabilizados por interacciones hidrofóbicas que la tornan más insoluble.

Podríamos decir, de acuerdo a estos resultados, que el nuevo genotipo contiene glutelinas en mayor cantidad que la variedad control y con su solubilidad mejorada.

I.3 Preparación de aislados proteicos y elección del método a utilizar

Con el fin de estudiar cual sería el método más conveniente para producir un aislado de alto rendimiento y buenas propiedades para ser utilizado como ingrediente proteico en la industria alimentaria, se realizaron extracciones de la proteína a diferentes pHs con posterior precipitación a pH 6.

Posteriormente, se realizó la caracterización estructural y el rendimiento de los aislados obtenidos para luego seleccionar el más adecuado para continuar la investigación.

I.4 Estructura de aislados extraídos a diferentes pHs

Los aislados obtenidos a partir de la extracción a diferentes pHs presentaron diferente composición polipeptídica (Figura 7).

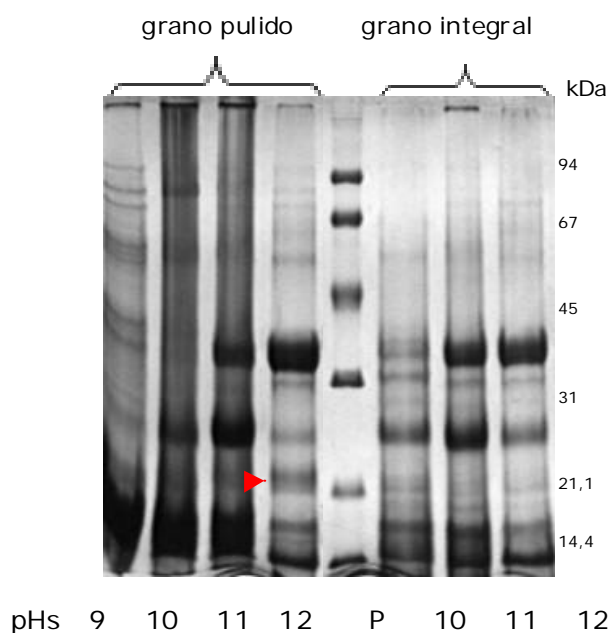


Figura 7. SDS-PAGE en condiciones reductoras de los aislados extraídos a diferentes pHs en harina de grano pulido e integral de la variedad Nutriar.

El aislado **pH 9** de grano pulido presentó alrededor de 12 bandas entre 95 y 14,4 kDa conforme a lo observado por Juliano (1980) para la fracción albúminas. Si comparamos con las Figuras 2 y 3 podemos decir que este aislado estaría compuesto

fundamentalmente por las fracciones albúminas y

globulinas, con polipéptidos comprendidos entre 60 y 14,4 kDa (Figura 3, con β -ME).

El aislado **pH 10** en grano pulido, presentó dos bandas más importantes: una de alrededor de 26 kDa mayoritaria de la fracción globulina y presente en Gt0,01 y otra formada por polipéptidos de bajo peso molecular pertenecientes, posiblemente, a las albúminas. En menor proporción y propios de globulinas y glutelinas, se encuentran polipéptidos de alto peso molecular (alrededor de 90 kDa) y de 55-59 kDa correspondientes a la proglutelina. En grano integral, no se observaron polipéptidos de alto peso molecular pero se observó, con mayor intensidad, la banda de 37-39 kDa que correspondería a la subunidad ácida (Yamagata *et al.*, 1982; Kumagai *et al.*, 2006) de la fracción glutelina. Si bien la electroforesis bidimensional del aislado a pH 10 (grano pulido) sólo muestra las manchas de mayor intensidad sobre la diagonal, el perfil es muy similar al de la fracción globulina, con predominancia del polipéptido de alrededor de 26 kDa, lo que confirmaría que el mismo está mayoritariamente integrado por esta fracción. Asimismo los resultados nos sugieren que este aislado estaría formado además por albúminas y no se puede descartar que parte de Gt0,01 también esté presente.

Los aislados extraídos a **pH 11**, a partir de harina de grano pulido e integral presentaron un perfil electroforético muy similar. En la Figura 7 se pueden observar

tres bandas bien marcadas: 37-39, 26-23 y 17-14,4 kDa, por lo que se deduce que ambos estarían constituidos fundamentalmente por las fracciones glutelinas y globulinas.

Contrariamente a los aislados de pH 11, los **aislados** extraídos a **pH 12**, presentaron diferencias en la composición polipeptídica de la proteína que se solubilizó en la harina de grano pulido e integral (Figura 7). Ambos aislados presentaron una banda más marcada entre 33-37 kD y bandas menos intensas de alrededor de 26, 23, 17 y 14 kDa. Se observó una diferencia en el perfil del aislado proveniente de grano pulido con una menor intensidad en la banda de alrededor de 26 kDa y mayor intensidad en la de 23 kDa (Figura 7, flecha roja). Dado que la banda de 26 kDa era más intensa en la subfracción Gt0,01 estos resultados nos indican que esta subfracción estaría mayoritariamente localizada en las capas externas del grano.

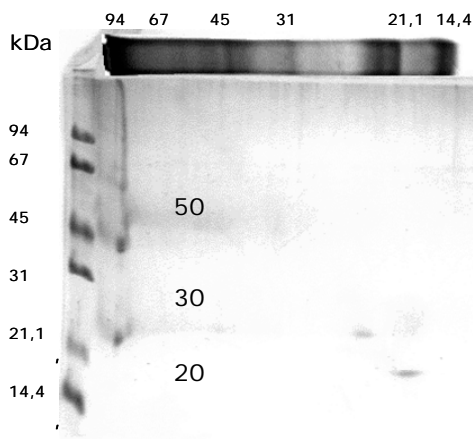


Figura 8. Electroforesis bidimensional del aislados pH 12 de grano integral de variedad Nutriar.

En la segunda dimensión, en el aislado pH 12, los agregados de alto peso molecular que no entran al gel, se estarían fraccionando en subunidades de aproximadamente 50, 30 y 20 kDa (Figura 8). La gran similitud con la segunda dimensión de las glutelinas (Figura 5), nos confirma la participación de esta fracción en la constitución del aislado a pH 12 presentando polipéptidos de alto peso molecular con abundantes uniones disulfuro. Paralelamente, y sobre la diagonal se pueden distinguir los polipéptidos de alrededor de 26 kDa y

entre 17-14 kDa propios de las globulinas y glutelinas respectivamente. Como hemos visto anteriormente, estos aislados también estarían constituidos fundamentalmente por estas dos fracciones.

I.5 Rendimiento en la extracción de los aislados a diferentes pHs

Tabla 4. Rendimiento de los aislados extraídos a distintos pH de harinas de grano integral y pulido de las variedades Nutriar y El Paso 144 (g/100g de harina)

Harina	pH 9	pH 10	pH 11	pH 12	pH 2
Nutriar integral	2,64 ± 0,09aD	5,23 ± 0,69 aC	6,51 ± 0,34 aB	12,67 ± 0,49aA	0,78 ± 0,05cE
Nutriar pulido	0,43 ± 0,29 cD	1,0 ± 0,01cD	2,67 ± 0,25bC	10,72 ± 0,41 bA	3,90 ± 0,04aB
El Paso 144 integral	1,64 ± 0, 01 bC	2,24 ± 0,04 bC	3,01 ± 0,10bB	9,56 ± 0,51 bcA	0,78 ± 0,04cD
El Paso 144 pulido	0,52 ± 0,10 cD	1,11 ± 0,19 cD	1,90 ± 0,08cC	8,26 ± 0,58cA	3,39 ± 0,09 bB

Letras diferentes minúsculas en las columnas y mayúsculas en filas, representan diferencias (LSD, $p < 0,05$).

El rendimiento en proteína extraída fue diferente dependiendo del pH y del tipo de harina considerado (Tabla 4).

En términos generales, los mayores rendimientos en extracciones alcalinas correspondieron a las harinas de grano integral y entre estas la variedad Nutriar presentó los mayores valores. Esto está relacionado con su mayor contenido proteico y con la mayor solubilidad de la fracción glutelina expresada en la Tabla 3.

En medio alcalino, los rendimientos obtenidos en los aislados se fueron incrementando al aumentar el pH. Es sobresaliente el comportamiento de la variedad Nutriar en la que, a partir de pH 10 mostró un marcado incremento en el rendimiento, mientras que en la variedad El Paso 144 sólo se obtuvo un rendimiento aceptable en la extracción a pH 12.

También se realizaron extracciones a pH ácido (Tabla 4, pH 2). En general los rendimientos fueron inferiores a la extracción a pH 12, sin embargo los resultados mostraron un comportamiento diferente entre las harinas de grano pulido e integral. Mientras que en las harinas integrales la extracción a pH 2 mostró un rendimiento muy inferior a todas las extracciones en medio alcalino, las extracciones a pH 2 de harinas de grano pulido mostraron un rendimiento superior a las de los pHs 9, 10 y 11. Este comportamiento diferencial se vio reflejado en las propiedades funcionales que se desarrollaran más adelante.

I.6. Conclusiones

Las fracciones proteicas de las variedades Nutriar y El Paso 144 presentaron una gran similitud estructural cualitativa; las estructuras observadas en las distintas fracciones concordaron con las descritas en bibliografía.

Los resultados presentados mostraron que, al igual que las glutelinas de amaranto, las glutelinas de arroz presentan distintas características estructurales que permiten dividir las en dos subfracciones de distinta solubilidad ó extractabilidad.

Las observaciones que muestran a la fracción globulina de similar composición a las glutelinas concuerdan con la hipótesis de Robert *et al.* (1985) quien mostró que esta fracción presenta reactividad inmunoquímica cruzada con glutelinas. Esta fracción se asemeja mayormente a Gt0,01 ya que, además de los polipéptidos de alrededor de 57, 30 y 20 kDa ambas contienen el polipéptido de 26 kDa, que no forma parte de las subunidades diméricas (Figuras 4 y 5) y está prácticamente ausente en Gt0,1. Estos resultados nos permiten proponer a globulinas y glutelinas como productos de un elevado polimorfismo propio de las proteínas de almacenamiento que lleva a una heterogeneidad molecular (Robert *et al.*, 1985). En este caso polipéptidos provenientes de genes isomorfos formarían agregados que difieren en sus características de solubilidad. También se ha observado en globulinas (Delseny *and* Raynal, 1999) y en especial en globulinas de amaranto (Abugoch *et al.*, 2003; Quiroga *et al.*, 2007) la existencia de subunidades provenientes de diferentes subfamilias genéticas intercambiables en diferentes oligómeros confirmando particulares propiedades fisicoquímicas (Quiroga *et al.*, 2007); inclusive se han observado variaciones entre cultivares (Drzewiecki, 2001).

En las preparaciones de aislados se demostró que los mayores rendimientos de extracción se llevan a cabo en las harinas integrales de la variedad Nutriar. Los rendimientos aumentaron con la alcalinidad del solvente de extracción lo que se correspondió con la solubilización de la fracción mayoritaria (glutelina). La preparación de aislados a pH 2 permitió detectar diferencias entre las proteínas provenientes de granos pulido e integral.

Los resultados obtenidos indicaron que las condiciones óptimas de extracción correspondían a la utilización de solvente a pH 12.

CAPITULO II. Caracterización nutricional y funcional de los aislados extraídos a pH 12

A partir de los resultados presentados en el capítulo anterior y como consecuencia de un mayor rendimiento en la extracción, fueron seleccionados los aislados extraídos a pH 12 para un posterior y exhaustivo estudio como posibles ingredientes proteicos de alto valor alimentario.

La nomenclatura de los aislados a estudiar se encuentra en la Tabla 1.

Tabla 1. Nomenclatura de los aislados en función de la variedad y del tipo de harina utilizada en la extracción

	Nutriar	El Paso 144
grano integral	Ni	Ei
grano pulido	Np	Ep

II.A Caracterización nutricional de los aislados proteicos extraídos a pH 12

II.A.1 Contenido proteico

En la Tabla 2 se compara el contenido proteico de los granos de los cultivares en estudio. Nutriar superó en un 27,5 % en grano integral y en un 19,8% en grano pulido a la variedad El Paso 144.

Tabla 2. Contenido proteico de harinas y aislados pH 12

Contenido proteico de la harina (% p/p)		
	Nutriar (N)	El Paso 144 (E)
grano integral (i)	12,42 ± 0,16	9,74 ± 0,05
grano pulido (p)	10,36 ± 0,71	8,65 ± 0,03
Contenido proteico del aislado (%)		
grano integral	83,3 ± 0,8	77,4 ± 0,5
grano pulido	86,1 ± 0,9	86,0 ± 0,4

Np y Ni: aislados de la variedad Nutriar grano pulido e integral. Ep y Ei aislados de El Paso144 de grano pulido e integral.

Estos resultados indican que el incremento en proteína se concentra fundamentalmente en el grano integral o sea que estaría localizada en las capas externas del grano.

Por otro lado, observando el contenido proteico de los aislados, se puede corroborar que esta proteína (la correspondiente al grano integral de la variedad Nutriar) es más soluble al pH correspondiente a la extracción (es más fácilmente extraíble) que la de El Paso 144 (Tabla 2).

II.A.2 Determinación de la composición aminoacídica de los aislados

Se estudió la composición aminoacídica de los aislados y se compararon con los valores característicos del grano de arroz y con los requerimientos dietarios de aminoácidos esenciales de adultos y niños (Tabla 3).

De acuerdo a lo informado por el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (Lanais-Pro, UBA) los datos de metionina y glicina, en las muestras, no corresponden a los valores reales. La hidrólisis ácida de las proteínas ocasiona una destrucción parcial del aminoácido esencial metionina. La glicina, en cambio, se encuentra sobredimensionada por ser un gran contaminante.

El aislado Ni presentó mayores valores de glicina, tirosina, arginina y lisina que Ei. En ambos aislados, la suma de tirosina y fenilalanina resulta limitante, mientras que los valores de los aminoácidos treonina, valina e histidina se presentan cercanos a los requeridos en la dieta humana (FAO/WHO/UNU, 1985). Ambos aislados cubren los requerimientos de los adultos en los aminoácidos leucina e isoleucina, pero no el de los niños (FAO/WHO, 1973).

Tanto Ni como Ei poseen menores valores de algunos aminoácidos comparando con los contenidos publicados por Cagampang *et al.* (1976) a excepción de serina, alanina y glicina posiblemente por limitaciones del método utilizado.

Los aislados de arroz poseen elevadas proporciones de ácido glutámico y/o glutamina, ácido aspártico y/o asparagina, como ha sido observado en otras proteínas de almacenamiento (Shotwell *and* Larkins, 1989; Galili, 1997; FAO, 2008). Si bien la proteína de arroz es rica en aminoácidos azufrados (Juliano, 1985), por las causas antes mencionadas, los valores de metionina presentes en la tabla resultan limitantes.

Tabla 3. Análisis de aminoácidos de los aislados Ni y Ei, de grano integral de arroz y patrón de aminoácidos esenciales

Aminoácidos	Ni	Ei	Grano de arroz integral*	Patrón ideal de algunos aminoácidos esenciales		
				FAO/WHO ^a		FAO/ OMS/ UNU ^b
				adultos	niños	
Asp	7,45	14,3	9,0			
Thr	2,85	3,0	3,9	0,9	4,3	3,4
Ser	5,85	7,3	5,8			
Glu	11,15	20,0	16,8			
Pro	2,4	2,4	4,9			
Gly	35,75*	14,1*	4,8			
Ala	6,45	7,2	5,8			
Val	3,75	5,6	6,6			3,5
Met	0,8	0,7	2,6			2,5 ^c
Ile	2,45	3,7	4,5	1,3	4,6	2,8
Leu	4,75	8,1	8,3	1,9	9,3	6,6
Tyr	1,35	0,7	4,0			
Phe	2,55	4,3	5,3			
Tyr + Phe	3,9	5,0	9,3			6,3
His	1,9	2,0	2,6			1,9
Lys	3,9	3,4	4,4	1,6	6,6	5,8
Arg	6,65	4,6	9,0			

Ref.: *Cagampang *et al.*, 1976. ^aFAO/WHO, 1973; ^bFAO/WHO/UNU, 1985; ^cMet + Cys.

Una forma de cuantificar la calidad nutricional es calculando el cociente E/T, relación entre aminoácidos esenciales (E) y totales (T). La Organización Mundial de la Salud de las Naciones Unidas (1973) establece como buena una relación mayor o igual a 36% (Padhye *and* Salunkhe, 1979). Los valores del cociente E/T fueron 38,7 y 30,95% para Ei y Ni, con lo cual sólo tiene un valor bueno el aislado de la variedad El Paso 144. Debemos considerar que estos resultados pueden ser algo inferiores a los reales debido al método que subvalora aminoácidos esenciales.

Como ya ha sido mencionado por varios autores, si bien los cereales son pobres en lisina, el grano de arroz tiene un contenido de este aminoácido esencial mayor que el resto. No obstante, tanto en Ni como en Ei resultó ser un aminoácido limitante según los requerimientos de los niños estimados por la FAO, pero no de los adultos (FAO/WHO, 1973).

El aislado Ni presentó mayores valores lisina que Ei. Los valores detectados de lisina coinciden con el valor encontrado por Wang *et al.* (1999) de 3,99/100g de proteína.

II.A.3 Digestibilidad *in vitro*.

Más allá de una composición aminoacídica balanceada, la calidad nutricional de una proteína depende de su facilidad para hidrolizarse y que los aminoácidos liberados sean asimilados e ingresen al torrente sanguíneo. Por esta razón se decidió determinar la digestibilidad *in vitro* de los aislados Ni, Ei, Np y Ep por simulación gástrica e intestinal como un aporte más a la caracterización nutricional de estos aislados.

En la Figura 1, se puede observar que los aislados Ni y Ei presentaron mayor grado de hidrólisis que los aislados provenientes de harina de grano pulido (Np y Ep) al transcurrir 120 minutos del proceso. Esto nos indica que los aislados provenientes de harina integral sufrieron mayor destrucción durante la

digestión enzimática a la que fueron sometidos. El endosperma está constituido, fundamentalmente, por glutelinas de alto peso molecular y con gran cantidad de puentes disulfuro, mientras el grano integral posee mayor proporción de albúminas y globulinas que el pulido que son más fácilmente hidrolizables por enzimas como la

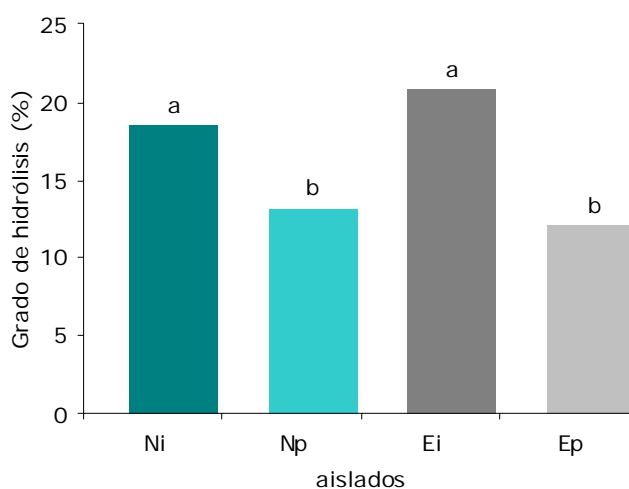


Figura 1. Grado de hidrólisis de los aislados Ni, Np, Ei y Ep alcanzados al finalizar la digestión gastrointestinal simulada. Letras diferentes representan diferencias significativas (LSD, $p < 0,05$).

pepsina y la tripsina tal como sostienen los autores Steenson *and* Sathe (1995). Este motivo, junto con la posibilidad de diferencias estructurales entre las proteínas provenientes de grano integral ó pulido podrían ser causales de la diferente digestibilidad.

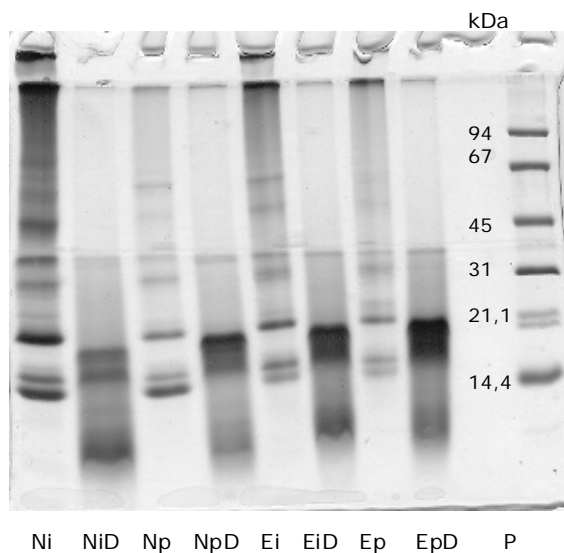


Figura 2. PAGE-tricina de los aislados proteicos sin digerir y digeridos con pepsina + pancreatina. NiD, NpD, EiD y EpD aislados digeridos.

El análisis de la electroforesis (Figura 2) permite observar que la digestión enzimática provocó una hidrólisis de los péptidos de alto peso molecular reduciéndolos, en todos los casos, a péptidos de peso molecular inferior a 35-40 kDa sin presentar diferencias importantes entre los aislados estudiados. De acuerdo a los resultados de grado de hidrólisis las diferencias estarían en los péptidos más pequeños que no se visualizan en el gel.

II.B Caracterización funcional de los aislados proteicos extraídos a pH 12

Hasta el momento hemos observado que se presentan diferencias estructurales y nutricionales entre los diferentes aislados proteicos de arroz según sean las condiciones en que hayan sido extraídos y el tipo de harina a partir de la cual se haya realizado la preparación. Estas diferencias pueden reflejarse en las propiedades funcionales de los mismos, información que resulta en general, escasa y fragmentaria en la bibliografía existente hasta la actualidad. Es deseable que las proteínas posean propiedades funcionales tales como solubilidad, capacidad de formar espuma, entre otras, no sólo para definir la calidad del producto final, sino también para facilitar el proceso de producción. Por las razones expuestas, se hace importante evaluar las propiedades de los aislados proteicos de arroz.

En esta sección se incluyen estudios referentes a las propiedades funcionales de los aislados extraídos a pH 12, a partir de harina de grano integral y pulido de

las variedades Nutriar y El Paso 144 (Ni, Np, Ei y Ep). Se investigan las propiedades de hidratación como solubilidad, capacidad de retención de agua y capacidad de absorción de agua; las propiedades de superficie como capacidad de formar y estabilizar espumas y emulsiones, capacidad de absorción de aceite, y se evalúan las diferencias y relaciones que presentan entre sí.

II.B.1 Propiedades de hidratación

Dentro de esta clasificación se evaluaron, por un lado la solubilidad de los aislados proteicos a distintos pH y en agua destilada, y por otro las propiedades de hidratación como capacidad de imbibición de agua destilada (WIC) y capacidad de retención de agua a diferentes pHs (WHC a pHs 3, 6 y 9 y en agua pura).

II.B.1a Solubilidad proteica de los aislados

La solubilidad a diferentes pHs de la proteína de los aislados se presenta en la Figura 3. En ella podemos ver que, en términos generales, los cuatro aislados presentaron muy baja solubilidad a pHs neutros y moderados pero exhibieron mayor solubilidad a pHs extremos, lo que se corresponde con las características propias de su componente mayoritario, la fracción glutelina (Bera *and* Mukhejee, 1989; Anderson *et al.*, 2001, Agboola *et al.*, 2005). Los valores oscilaron entre 79,4 % y 0,25%; ambos puntos extremos fueron registrados en el aislado Ni a pHs 11 y

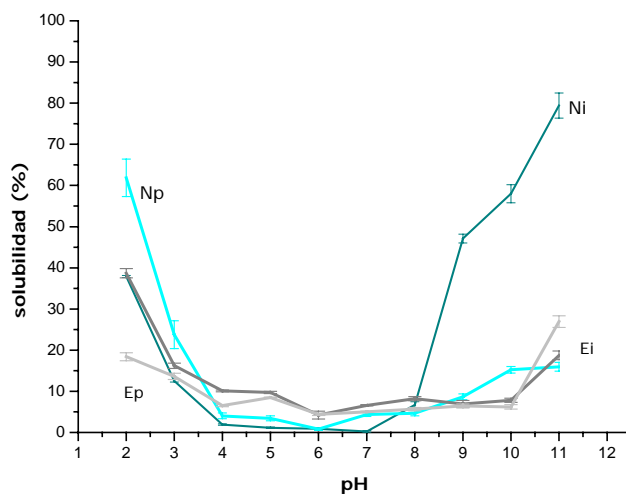


Figura 3. Solubilidad de los aislados Ni, Np, Ei y Ep a diferentes pHs ajustadas con el porcentaje proteico de cada aislado.

7 respectivamente.

Estos valores máximos fueron semejantes a los obtenidos en aislados proteicos de salvado de arroz extraídos a pH 12 (Tang *et al.*, 2003) y a los obtenidos por extracción enzimática (Wang *et al.*, 1999).

Si analizamos en detalle, se muestran diferencias significativas a pHs extremos. En estas condiciones, las proteínas de los aislados de la variedad El Paso

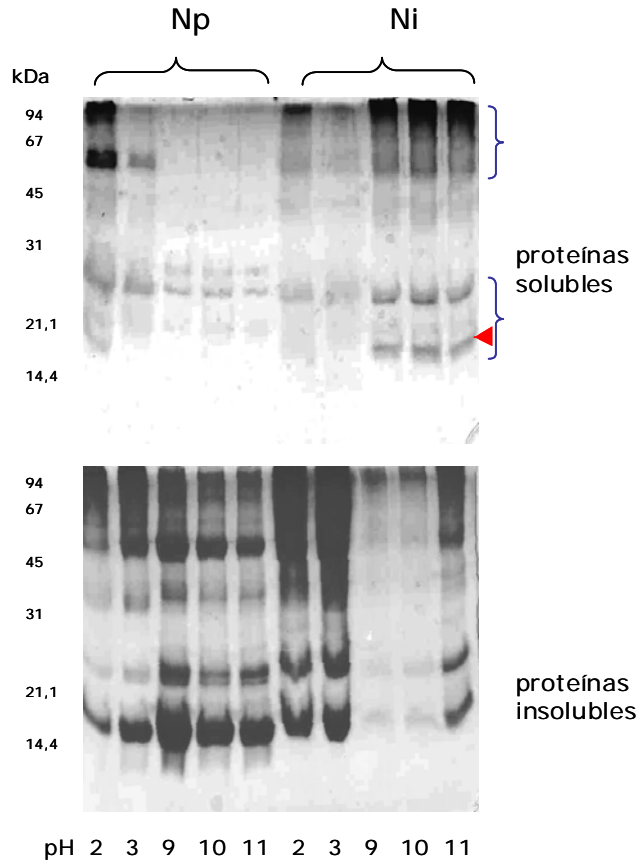


Figura 4. SDS-Page de proteínas solubles (gel superior) e insolubles (gel inferior) a distintos pHs. Las calles de los geles están alineadas y se corresponden. En la parte superior están indicadas las calles en las que se sembraron los aislados Ni y Np respectivamente.

presenta menor grado de polimerización (Glu A).

Asimismo se pudieron observar diferencias entre la solubilidad de los aislados de harina de grano integral y pulido. El aislado Ni presentó mejor solubilidad en medio alcalino (pHs 9, 10 y 11), mientras que Np mostró máxima solubilidad en medio ácido (pHs 2 y 3).

A partir de esta observación se procedió a analizar mediante SDS-PAGE las proteínas solubles e insolubles de los dos aislados a distintos pHs. En la Figura 4 se muestran los respectivos perfiles. En ellos se observa que por la intensidad de las bandas, los perfiles de solubles e insolubles son complementarios y concuerdan con los valores de solubilidad de la Figura 3 (aislados Ni y Np). Es así que los perfiles de las proteínas solubles del aislado Ni a pHs 9, 10 y 11 y del aislado Np a pHs 2 y 3 muestran mayor intensidad.

144 presentaron menor solubilidad que las de la variedad Nutriar. Esto sugiere que existen diferencias estructurales entre las proteínas de ambas variedades. Considerando la existencia de dos subfamilias de polipéptidos de las glutelinas que exhiben diferente grado de polimerización (GluA y GluB) (Katsube-Tanaka *et al.*, 2004a), es posible que la variedad Nutriar sea rica en la subfamilia que

A su vez, en los perfiles, la mayoría de las bandas más intensas son similares, tanto para Ni como para Np (indicados con llaves azules en la Figura 4), lo que sugiere que a esos pHs se solubilizan especies proteicas semejantes. En los solubles del aislado Np (pH ácido), la banda de 16 kDa (señalada con una flecha roja en la Figura 4) está mucho más débil lo que indica que, en esas condiciones, dicho polipéptido es menos soluble que en Ni a pH alcalino. Los polipéptidos que se estarían solubilizando, pueden corresponder a la fracción globulina, y/o a oligómeros o polipéptidos provenientes de genes isomorfos de la fracción glutelina que, si bien tienen peso molecular similar a las globulinas, difieren en sus características de solubilidad como hemos discutido en el Capítulo I.

II.B.1b Solubilidad en agua. Capacidad de retención e imbibición de agua (WHC y WIC)

Dado que las propiedades funcionales WIC y WHC están relacionadas con la solubilidad de las proteínas en las mismas condiciones, en forma paralela se analizó la solubilidad en agua de las proteínas en estudio.

Solubilidad en agua. En la Tabla 4 podemos observar los valores medios de solubilidad de los aislados en agua. Con excepción de Ni, que presentó muy baja solubilidad, el resto de los aislados resultaron prácticamente insolubles. Estos resultados se corresponden con las solubilidades de los mismos a pHs neutros presentados en la Figura 3 y ambos permiten corroborar con la bibliografía existente (Agboola *et al.*, 2005; entre otros) la baja solubilidad de las proteínas de arroz debido a la abundancia de puentes disulfuro, sumado a su elevado peso molecular.

Capacidad de retención e imbibición de agua (WHC y WIC). Las propiedades de retención de agua (WHC) por parte de la proteína de arroz fueron similares en los cuatro aislados, aunque algo superiores en los aislados de harina de grano integral (Tabla 4). Posiblemente la presencia de otros componentes no proteicos como fibras, presentes en las cubiertas externas del grano influyan en alguna medida sobre la capacidad de retención de agua de los aislados estudiados.

La capacidad de imbibición (o absorción) de agua, se desdobló por un lado en la capacidad del aislado en absorber agua (WIC) y por otro el tiempo que demora el proceso en alcanzar el equilibrio (te). Los valores de WIC resultaron inferiores en la variedad El Paso 144 (Tabla 4). En valores absolutos son

comparables con los observados por Chandi *and* Sogi (2007a) en concentrados proteicos de salvado de distintas variedades de arroz (2,5 y 5,6 g/g), superiores a los encontrados en diferentes concentrados proteicos de hojas por Aletor *et al.* (2002) (2,7 g/g,) y algo inferiores a aislados proteicos de soja (4,3 g/g, Gandhi *et al.*, 2000). Los valores resultan cercanos a los considerados críticos para alimentos viscosos como sopas, salsas o jugos por lo que pueden resultar ingredientes de alta calidad para alimentos de estas características (Aletor *et al.*, 2002).

Tabla 4. Propiedades de hidratación de los aislados proteicos con respecto al agua pura

	Solubilidad en agua	WHC*	Capacidad de imbibición de agua	
			WIC*	te
Ni	3,79 ± 0,28a	7,17 ± 0,44 a	4,22 ± 0,30 a	15,0 ± 0 a
Np	0,93 ± 0,42 bc	4,45 ± 0,36 bc	4,07 ± 0,24 a	1,0 ± 0 b
Ei	1,81 ± 0,55 b	5,67 ± 1,28 ab	3,19 ± 0,11 b	1,5 ± 0,71 b
Ep	0,35 ± 0 c	2,60 ± 0,27 c	2,85 ± 0,37 b	1,0 ± 0 b

Letras diferentes en columnas representan diferencias significativas (LSD, $p < 0,05$); WHC: capacidad de retención agua; * ml de agua/g de muestra; te: tiempo que se requiere en alcanzar el equilibrio (min).

En cuanto a la forma en que se realizó la absorción o sea el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio fue diferente: los aislados Np, Ei y Ep la absorbieron rápidamente mientras que en Ni, el proceso fue mucho más lento.

Considerando que Ni presentó elevados valores de solubilidad en agua, WHC, WIC y el tiempo mayor en alcanzar el equilibrio en el proceso de absorción de agua pura (Tabla 4), podemos corroborar la existencia de diferencias estructurales en este aislado con respecto a los demás, en este caso dichas estructuras provocarían una disminución de la velocidad de hidratación.

II.B.1c Capacidad de retención de agua a pHs 3, 6 y 9 (WHC)

Se evaluó la capacidad de retención de agua de los aislados a pHs 3, 6 y 9 (Figura 5). La misma osciló entre 1,67 y 9,96 ml de agua/g de muestra, valores similares a los encontrados en aislados proteicos de amaranto (Abugoch, 2006).

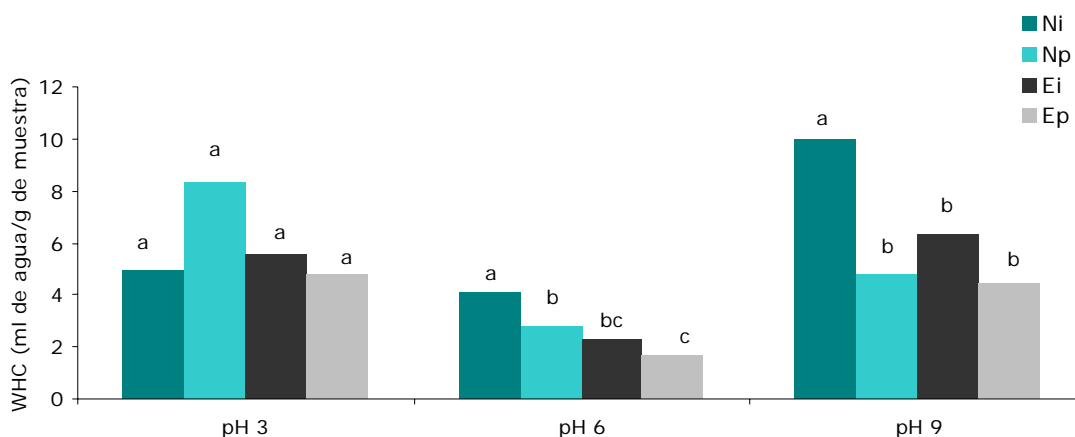


Figura 5. Capacidad de retención de agua (WHC) de los aislados Ni, Np, Ei y Ep a los pHs 3, 6 y 9. Letras diferentes representan diferencias significativas (LSD, $p < 0,05$).

El comportamiento de los aislados fue diferente según el pH de la solución. A pH 3 no se observaron diferencias en el WHC entre aislados mientras que a pH 6 y 9, Ni se destacó del resto (LSD, $p < 0,05$) con valores mayores. Esta propiedad funcional depende, no solo del tamaño de los poros y de los capilares, sino también de las características de las moléculas proteicas. Estos resultados se correlacionan con la mayor solubilidad del aislado Ni en agua y a pHs alcalinos lo cual es contradictorio con la propuesta del aumento de WHC con la insolubilidad proteica. En este caso se podría explicar considerando que estas proteínas son altamente insolubles por lo cual en las condiciones estudiadas aun los mejores valores de solubilidad son bajos. La mayor solubilidad estaría entonces relacionada con una mayor capacidad de interaccionar con el agua lo cual concuerda con la capacidad de retención de agua.

II.B.2 Propiedades de superficie

Con el objeto de profundizar la investigación y analizando la solubilidad de los aislados (Figura 3) se consideró la condición menos extrema en la que los aislados pueden presentar buenas propiedades funcionales de superficie a la vez que expresen diferencias entre sí.

Conforme con este criterio, se seleccionaron los pHs 3 y 9 ($\mu = 0,2$ M) para evaluar la capacidad de los aislados de formar y estabilizar espumas y emulsiones.

II.B.2a Actividad espumante

La capacidad de formar espumas se evaluó mediante la determinación del volumen máximo de líquido incorporado a la espuma (V_{\max}) y la estabilidad de las espumas expresada como el tiempo medio o sea el tiempo que tarda en drenar el 50% del volumen máximo ($t_{1/2}$). En la Tabla 5 pueden observarse los parámetros que caracterizan a las espumas de los aislados estudiados.

Tabla 5. Parámetros de la capacidad de formar y estabilizar espumas de los aislados Ni, Np, Ei y Ep (pH 3 y 9, $\mu=0,2$ M)

	pH 3		pH 9	
	V_{\max}^a	$t_{1/2}^b$	V_{\max}	$t_{1/2}$
Ni	1,80 ± 0,02 d	0,50 ± 0,02 c	4,98 ± 0,21a	0,78 ± 0,16a
Np	4,66 ± 0,06 a	0,62 ± 0,01 a	1,42 ± 0,06 b	0,58 ± 0,03 ab
Ei	2,39 ± 0,11 c	0,64 ± 0,01 a	0,54 ± 0,11 c	0,45 ± 0 b
Ep	3,21 ± 0,01 b	0,58 ± 0 b	1,47 ± 0,02 b	0,64 ± 0,01 ab

Letras diferentes minúsculas en columnas representan diferencias significativas (LSD, $p < 0,05$); ^a V_{\max} : volumen máximo de líquido incorporado a la espuma (ml); ^b $t_{1/2}$: tiempo que tarda en drenar el 50% del volumen máximo (min).

Los aislados presentaron diferencias en su actividad espumante. Si analizamos, en primera instancia, los valores de V_{\max} vemos que a pH 3, Np presentó la mayor capacidad de formar espumas y Ni la menor (Tabla 5); mientras que a pH 9, Ni resultó el aislado con mejores espumas.

Complementariamente, si analizamos la estabilidad de las espumas vemos que a pH 3 resultó mayor en Np y Ei; intermedio en Ep y mínimo en Ni; mientras que a pH 9, solo se diferenciaron los tiempos medios de los aislados de harina integral de las variedades Nutriar y El Paso 144 (Tabla 5). Estas diferencias no son muy relevantes ya que en todos los casos el tiempo medio fue reducido, lo que nos está determinando que las espumas resultaron inestables. Un comportamiento similar fue observado en aislados proteicos de salvado de arroz que presentaron propiedades espumantes similares a la clara de huevo pero con menor estabilidad (Wang *et al.*, 1999).

Las espumas de la variedad Nutriar en el aislado de grano integral a pH 9 resultaron compactas, de burbujas pequeñas y esféricas (Figura 6B), mientras el resto de las espumas presentó burbujas poliédricas y laxas (Figura 6A). Analizando

en forma conjunta estos resultados y comparándolos con los de solubilidad, representados en la Figura 3, se puede confirmar, en esta variedad, la importancia de las proteínas solubles como principales participantes en el proceso de espumado de las proteínas.

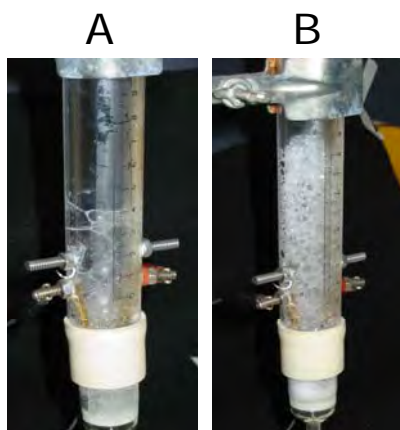


Figura 6. Espumas de distinta estabilidad. A: con burbujas poliédricas B: con burbujas esféricas. (Fotografía: F. Speroni).

La capacidad de formar espumas de los aislados provenientes de la variedad Nutriar resultó superior a la de los aislados proteicos de soja ($V_{\max}=2,96$ ml; Ventureira, comunicación personal) y superiores a los observados por Tang *et al.* (2003) en aislados de salvado de arroz. Cabe aclarar que estos

análisis fueron hechos en condiciones desfavorables (baja concentración proteica); posiblemente, variando las condiciones se podrían conseguir espumas más estables.

II.B.2b Actividad emulsificante

Se evaluó la actividad emulsificante de los aislados en soluciones a pH 9 y fuerza iónica $\mu=0,2$ M a través del análisis de los perfiles del backscattering (%BS) tanto en la zona de cremado (zona inferior del tubo de medida) como en la de coalescencia (zona superior del tubo de medida).

En una primera instancia se evaluaron los parámetros que caracterizan las emulsiones: backscattering inicial (%BS_{in}) y en la zona de **cremado**: tiempo en que el %BS_{10-30mm} decrece un 10% ($t_{0,1}$) y constante cinética ($K_{0,1}$), valores que se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros que caracterizan las emulsiones de los aislados Ni, Np, Ei y Ep (pH 9, $\mu=0,2$ M)

	BS_{in}^a	t_{0,1}^b	K_{0,1}^c
Ni	26,47 ± 0,47a	6,03 ± 1,25a	0,39 ± 0,09 b
Np	17,71 ± 1,96 b	2,06 ± 0,15 b	1,65 ± 0,06 a
Ei	19,11 ± 0,83 b	3,62 ± 0,02 b	0,87 ± 0,04 b
Ep	19,49 ± 1,84 b	2,11 ± 0,35 b	1,50 ± 0,38 a

Letras diferentes representan diferencias significativas (LSD, $p<0,05$); ^a %BS_{in}: backscattering inicial (%); ^b t_{0,1}: tiempo en que el %BS_{10-30mm} decrece un 10% (min); ^cK_{0,1}: constante cinética.

El elevado valor de %BS_{in} del aislado Ni indicó que el mismo formó una emulsión más estable diferenciándose del resto de los aislados estudiados (Tabla 6). Se considera que existe una correlación lineal inversa entre el backscattering inicial y el tamaño de partícula de cada emulsión en condiciones iniciales y con la misma proporción volumétrica de aceite (Palazolo *et al.*, 2004). En otras palabras, un valor mayor de %BS_{in} implica un menor tamaño de gota y, de esta manera, esta propiedad constituye una buena medida de la capacidad de la proteína de generar emulsiones.

Analizando la cinética de backscattering en esta zona de cremado, zona inferior del tubo de medida (%BS_{10-30mm}) en función del tiempo podemos determinar la estabilidad de las emulsiones (Figura 7). La mejor estabilidad de Ni puede observarse comparando los valores superiores de t_{0,1} y algo inferiores de K_{0,1} (Tabla 6). Comparando los perfiles de los cuatro aislados se nota la superioridad de Ni en la estabilidad de la emulsión.

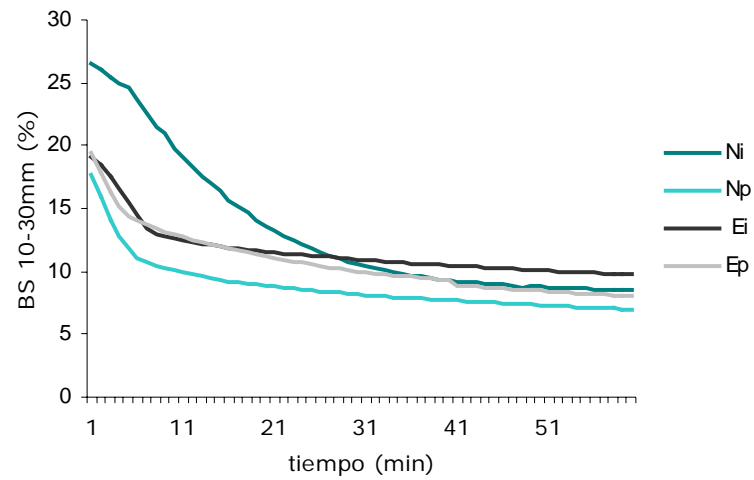


Figura 7. Porcentaje promedio de backscattering en la zona inferior del tubo de medida ($\%BS_{10-30mm}$) a diferentes tiempos de estacionamiento de las emulsiones preparadas con los aislados Ni, Np, Ei y Ep.

En una segunda instancia estudiamos la **coalescencia**, ilustrada en la Figura 8 mostrando la cinética de los valores promedios de backscattering de la parte superior de tubo de medida ($\%BS_{50-60mm}$).

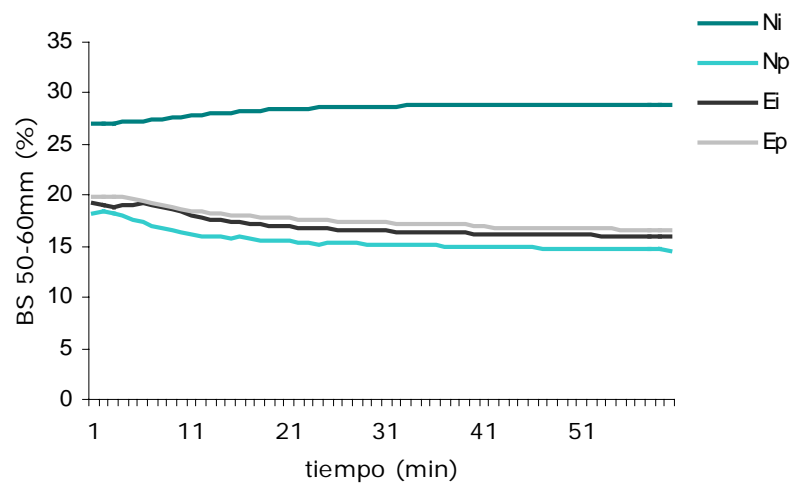


Figura 8. Porcentaje promedio de backscattering en la zona superior del tubo de medida ($\%BS_{50-60mm}$) a diferentes tiempos de estacionamiento de las emulsiones preparadas con los aislados Ni, Np, Ei, y Ep.

El backscattering en la zona superior es la resultante de los procesos de cremado (aumento de BS) y coalescencia (disminución). La disminución de este parámetro está indicando la ocurrencia de coalescencia en los aislados Np, Ei y Ep, especialmente teniendo en cuenta que estas emulsiones mostraron un cremado temprano (Figura 7). Mientras que los valores elevados de Ni manifiestan que la coalescencia no es un componente significativo en el proceso de desestabilización de la emulsión de este aislado.

Estos resultados nos permiten concluir que Ni, superior en solubilidad a pH 9 (Figura 3), presentó mayor actividad emulsificante que el resto de los aislados.

II.B.3 Absorción de aceite

Por último, se determinó la capacidad de los aislados de absorber aceite tal como se detalla en materiales y métodos.

Los resultados presentados en Tabla 7, muestran que, si bien por el grado de precisión del método, y/o el número de repeticiones realizadas, las diferencias entre aislados encontradas no fueron estadísticamente significativas (LSD $p < 0,05$).

Los valores son superiores a los observados por Chandi *and* Sogi (2007a) en la variedad Basmati 370 y en la caseína y similares a los de la variedad Basmati 386.

Por otro lado, también resultaron semejantes a los valores obtenidos en concentrados proteicos de hojas de vegetales (Aletor *et al.*, 2002) y en aislados proteicos de soja (Gandhi *et al.*, 2000).

Tabla 7. Valores medios de absorción de aceite de los aislados Ni, Np, Ei y Ep (expresados en g/g)

	Absorción de aceite
Ni	7,59 ± 0,54 a
Np	7,57 ± 2,65 a
Ei	8,64 ± 2,73 a
Ep	11,34 ± 0,47 a

*g/g de aislado. Letras diferentes representan diferencias significativas (LSD, $p < 0,05$).

II.B.4 Correlación entre propiedades funcionales evaluadas

Dada la existencia de bibliografía contradictoria acerca de la influencia de la solubilidad proteica sobre las propiedades funcionales de hidratación y de superficie se realizó un análisis de correlación para los parámetros estudiados a pH 9, y fuerza iónica $\mu=0,2$ M de los aislados Ni, Np, Ei y Ep (Tabla 8).

Tabla 8. Matriz de correlación entre los parámetros de las propiedades funcionales evaluadas a pH 9 y $\mu=0,2$ M

	Solubilidad proteica	WHC	Capacidad espumante		Capacidad emulsificante	
			V _{max}	t _{1/2}	%BSin	t _{0,1}
WHC ^a	0,9128 (0,0016)					
V _{max} ^b	0,9775 (0,0000)	0,8299 (0,0108)				
t _{1/2} ^c	0,7386 (0,0364)	0,4933 (0,2142)	0,8405 (0,0090)			
%BSin ^d	0,9225 (0,0011)	0,8791 (0,0040)	0,9036 (0,0021)	0,6755 (0,0660)		
t _{0,1} ^e	0,8718 (0,0048)	0,9314 (0,0008)	0,7708 (0,0252)	0,3445 (0,4034)	0,8767 (0,0043)	
K _{0,1} ^f	-0,7652 (0,0269)	-0,8502 (0,0075)	-0,6441 (0,0848)	-0,2910 (0,4845)	-0,8495 (0,0076)	-0,9342 (0,0007)

Entre paréntesis figura el valor de probabilidad (p): p<0,05=correlación significativa; p<0,01= correlación altamente significativa, p>0,05=correlación no significativa; ^a WHC: capacidad de retención agua (ml/g); ^b V_{max}: volumen máximo de líquido incorporado a la espuma (ml); ^c t_{1/2}: tiempo que tarda en drenar el 50% del volumen máximo (min); ^d %BSin: backscattering inicial (%); ^e t_{0,1}: tiempo en que el %BS_{10-30mm} decrece un 10% (min) y ^f K_{0,1}: constante cinética.

Se ha observado una alta correlación (p<0,01) entre la solubilidad proteica y capacidad de retención de agua (WHC). En esta oportunidad, las propiedades de hidratación se relacionaron con la solubilidad de los aislados. Por su parte, Were *et al.* (1997) estudiando aislados proteicos de soja, encontraron relación directa entre WHC y solubilidad. Asimismo, la capacidad de retención de agua se correlacionó con la capacidad de formar espumas y de formar y estabilizar emulsiones.

La capacidad de formar espumas se correlacionó en forma altamente significativa con la solubilidad (p<0,01), mientras la capacidad de estabilización lo

hizo en forma significativa ($p < 0,05$). Varios autores han encontrado que al aumentar la solubilidad de las moléculas, se incrementa la capacidad de formar espumas entre ellos Anderson *et al.* (2001) estudiando hidrolizados de glutelinas de arroz y Agboola *et al.* (2005) corroborando esta relación directa a diferentes pHs.

Se ha observado una fuerte relación entre los parámetros que caracterizan la emulsión y la solubilidad. Tanto el %BSin, como el $t_{0,1}$ presentaron una correlación altamente significativa con la solubilidad, mientras que el $K_{0,1}$ se correlacionó en forma significativa y negativa dada la relación inversa entre este parámetro y la capacidad de estabilizar una emulsión. Existen posiciones encontradas en cuanto a la relación entre la solubilidad y la capacidad para formar y estabilizar emulsiones. Varios autores han encontrado una correlación positiva (Crenwelge *et al.*, 1974; Volkert and Klein, 1979; McWatters and Holmes, 1979; Voutinas *et al.*, 1983; Bera and Mukherjee, 1989; Qi *et al.*, 1997; entre otros); mientras que otros mencionan que ambas propiedades no están necesariamente relacionadas (Wang and Kinsella, 1976; Aoki *et al.*, 1980, Voutinas *et al.*, 1983).

Por otro lado, se ha observado que la capacidad de estabilizar la espuma ($t_{1/2}$) y los parámetros de la emulsión no se correlacionan en forma significativa ($p > 0,05$), mientras y como es de esperar, los que caracterizan a la emulsión están altamente correlacionados entre sí (Tabla 8).

Bera and Mukherjee (1989) estudiando concentrados proteicos de salvado de arroz encontraron una fuerte influencia del pH y la concentración salina sobre la solubilidad del nitrógeno y la capacidad de formar espumas y emulsiones. Al aumentar la concentración de sales decrecen la solubilidad, y la capacidad de formar espumas y emulsiones siendo inverso el comportamiento con la variación de pH.

II.C Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos, la variedad Nutriar, se caracterizó por su mayor contenido proteico tanto en grano integral como en pulido y con valores del aminoácido esencial lisina algo superiores.

Si bien todos los aislados presentaron baja solubilidad a pHs neutros, con moderada a alta solubilidad a pHs extremos la variedad Nutriar se destacó por su mayor solubilidad tanto a pHs ácidos (Np) como a pHs alcalinos (Ni), características diferenciales que se vieron expresadas en sus propiedades funcionales.

Los aislados de esta variedad presentaron mejores propiedades de hidratación, expresadas en elevados valores de WHC en agua. Por otro lado el aislado Ni presentó mejor capacidad de formar y estabilizar espumas y emulsiones.

Entre grano integral y pulido las diferencias se manifestaron en su digestibilidad, así como en sus valores de solubilidad y de WHC en agua siendo en todos los casos superior en aquellos aislados provenientes de grano integral. En cuanto a las propiedades de superficie, también se observaron diferencias entre aislados de grano pulido e integral; mientras los aislados de grano pulido presentaron mayor capacidad espumante en medio ácido, los de grano integral mostraron mejores propiedades en medio alcalino.

Estas características permiten diferentes aplicaciones de los productos y coproductos de la elaboración del grano de arroz. Los aislados, preparados a partir del quebrado (pulido) pueden ser buenos ingredientes para incluirlos en formulaciones alimenticias ácidas, mientras los aislados preparados a partir del grano completo incluyendo embrión y cubiertas externas le confieren características fisicoquímicas y nutricionales diferenciales. Las condiciones de pH en que estos aislados presentan sus propiedades de superficie óptimas constituyen una limitación para su utilización como ingrediente alimentario. Sin embargo las correlaciones analizadas especialmente a pH 9 y las observadas en el resto de los solventes utilizados permitieron reconocer una alta relación de la funcionalidad con la solubilidad de las proteínas de arroz. De esta manera, esta fuerte relación hace suponer que posibles modificaciones en la molécula proteica (como hidrólisis o acilación) que provoquen un incremento en su solubilidad permitirían la utilización de aislados proteicos de arroz como potenciales ingredientes para la industria.

4 CONCLUSIONES GENERALES

4 / CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados del presente trabajo permiten destacar al arroz de la variedad Nutriar con ventajas desde el punto de vista alimentario frente al arroz tradicional.

Su caracterización ha permitido concluir que:

- Esta variedad, de alto contenido proteico, posee una superioridad en la fracción glutelina, incremento que está localizado fundamentalmente, en los tegumentos externos del grano o salvado.
- Sus proteínas presentaron mayor solubilidad en la mayoría de las condiciones estudiadas. Posiblemente la existencia, en la fracción glutelina, de subunidades provenientes de diferentes subfamilias genéticas con mayor o menor grado de polimerización le confieran propiedades fisicoquímicas que se traducen después en propiedades funcionales diferenciales.
- Esta mayor solubilidad les permitió expresar mejor funcionalidad presentando a sus aislados proteicos como ingredientes alimentarios de elección. A su vez la mayor solubilidad y extractabilidad permitirían mayores rendimientos en la obtención de aislados a nivel industrial y con un mayor contenido proteico.

Se han encontrado diferencias entre proteínas de esta variedad provenientes de grano pulido e integral. Estas diferencias permiten proponer variadas aplicaciones.

- Mientras que las proteínas provenientes del grano pulido presentaron una mayor solubilidad, extractabilidad y funcionalidad a pHs ácidos las provenientes de grano integral se mostraron superiores en medio alcalino.

Este interesante comportamiento se observó en las dos variedades estudiadas y no se ha podido explicar desde el punto de vista molecular.

- En especial el aislado de harina integral, se destacó en sus valores de capacidad de retención de agua (WHC) y a pHs 6 y 9, en su capacidad de absorción de agua (WIC), así como en su capacidad de formar y estabilizar espumas y emulsiones.
- La capacidad de estos aislados de absorber y retener agua jugaría un importante papel en la textura de diversos alimentos y podrían utilizarse especialmente en la elaboración de quesos, masas dulces y variados productos; mientras que por sus propiedades de superficie los aislados de grano pulido serían buenos agentes espumantes a pHs ácidos y los de integral a pHs alcalinos.
- Los aislados de grano integral en ambas variedades presentaron mayor digestibilidad que los correspondientes a grano pulido lo que sería destacable en formulaciones infantiles.
- La elevada correlación entre solubilidad y funcionalidad observada en las proteínas de arroz estudiadas, permiten suponer que posibles modificaciones químicas en la molécula proteica, como hidrólisis o acilación mejorarían la solubilidad de la proteína y posibilitarían la utilización de aislados proteicos como potenciales ingredientes para la industria alimentaria.
- Asimismo podría determinarse la funcionalidad de estos aislados proteicos en la formación de geles lo que abriría aun más el abanico de posibilidades de su utilización como ingrediente, recurso valioso, disponible y económico, posible de ser utilizado en la elaboración de alimentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. 1970. Association of Official Analytical Chemists Inc. Official Methods of Analysis of AOAC International. 11th ed., AOAC International. Gaithersburg, M.D. p.858.
- Abugoch, L. E.; Martínez, E. N. and Añon, M. C. 2003. Influence of the extracting solvent upon the structural properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) glutelin. *Journal of Agricultural Food Chemistry*; 51: 4060-4065.
- Abugoch, L. E. 2006. Relación estructura-funcionalidad de glutelinas y aislados proteicos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Centro de Investigación y Desarrollo de Alimentos, CIDCA; 151p.
- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenosulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27: 1256.
- Agboola, S.; Darren, N. and Mills, D. 2005. Characterization and functional properties of Australian rice protein isolates. *Journal of Cereal Science*, 41: 283-290.
- Ahmedna, M.; Prinyawiwatkul, W. and Rao, R. M. 1999. Solubilized wheat protein isolate: functional properties and potential food applications. *Journal of Agricultural Food Chemistry*; 47: 1340-1345.
- Aletor, O.; Oshodi, A. A. and Ipinmoroti, K. 2002. Chemical composition of common leaf vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates. *Food Chemistry*; 78: 63-68.
- Anderson, A. K. and Guraya, H. S. 2001. Extractability of protein in physically processed rice bran *Journal of American Oil Chemistry Society*; 78 (9): 969-972.
- Anderson, A.; Hettiarachchy, N. and Ju, Z. Y. 2001. Physicochemical properties of pronase-treated rice glutelin. *Journal of the American Oil Chemists' Society*; 78: 1-6.
- Ansharullah, J.; Hourigan, A.; Chesterman, C. F. 1997. Application of Carbohydrases in Extracting Protein from Rice Bran. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 74 (2): 141-146.
- Aoki, H.; Taneyama, O. and Inami, M. 1980. Emulsifying properties of soy protein: Characteristics of 7S and 11S proteins. *Journal of Food Science*; 45: 534.
- Apostolatos, G. 1984. Protein isolate rich in methionine from the edible dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal Food Technology*; 19: 233-237.

- Baldi, G.; Fossati, G. and Fantone, G. C. 1976. By-products of rice. II-Protein fractions and amino acid composition. *Riso (Italian)*; 25: 347-356.
- Bandyopadhyay, K.; Misra G. and Ghosh, S. 2008. Preparation and characterization of protein hydrolysates from indian defatted rice bran meal. *Journal of Oleo Science*; 57 (1): 47-52.
- Barber, S. and Barber, C. B. 1974. Basic and applied research needs for utilization of rice bran as food and feed. *Proceedings of the International Conference Rice-by-Products Utilization*, Sept.29-Oct.2. Spain.
- Baumann, H. 1967. Apparatur nach Baumann zur testimmung der flussigkeitsaufnahme von pulvrigen substanzen. *Glas-und instrumenten-technik. Fachzeitschrift für das laboratorium*; 11: 540-548.
- Bera, M. B. and Mukherjee, R. K. 1989. Solubility, emulsifying and foaming properties of rice bran protein concentrates. *Journal of Food Science*; 54 (1): 142-145.
- Betschart, A. A.; Fong, R. Y. and Saunders, R. M. 1977. Rice by products, Comparative extraction and precipitation of nitrogen from U. S. and Spanish bran and germ. *Journal of Food Science*; 42: 1088.
- Bezus, R.; Vidal, A. A. y Asenjo, C. 2002. Nuevo genotipo de alto potencial de rendimiento y contenido proteico. I Congresso da Cadeia Produtiva de Arroz. *Anais*, ISSN 1516-7518; p.47
- Bourgeois, C. and Le Roux, P. 1986. *Proteínas animales*. 1 ed. Editorial El Manual Moderno. México.
- Cagampang, G. B.; Cruz, L. J.; Espiritu, S. G.; Santiago, R.G and Juliano, B.O. 1966. Studies on the extraction and composition of rice proteins. *Cereal Chemistry*; 43: 145-155.
- Cagampang, G. B.; Perdon, A. A. and Juliano, B.O. 1976. Changes in salt-soluble proteins of rice during grain development. *Phytochemistry*; 15: 1425-1430.
- Chandi, G. K. and Sogi, D. S. 2007a. Functional properties of rice bran protein concentrates. *Journal of Food Engineering*; 79: 592-597.
- Chandi, G. K. and Sogi, D. S. 2007b. Biochemical characterization of rice protein fraction. *International Journal of Food Science and Technology*; 42: 1357-1362.
- Chavan, J. K. and Duggal, S. K. 1978. Studies on the essential amino acid composition protein fractions and biological value (BV) of some new varieties of rice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 29: 29-233.
- Cheftel, J.; Cuq, J. and Lorient, D. 1989. *Proteínas alimentarias*. Editorial Acribia, Zaragoza, España. Cap. 4: 49-100.
- Cheftel, J.; Cuq, J. y Lorient, D. 1993. Aminoácidos, péptidos y proteínas. En *Química de los Alimentos*. Director O. Fennema. Acribia; 275-414.

- Chen, L. and Houston, D. F. 1970. Solubilization and recovery of protein from defatted rice bran. *Cereal Chemistry*; 47: 72.
- Chou, D. and C.U. Morr, 1979. Protein-water interactions and functional properties. *Journal of the American Oil Chemist Society*; 56: 53-58.
- Connor, M. A.; Saunders, R. M.; Kohler, G. O. 1976. Rice bran protein concentrates obtained by wet alkaline extraction. *Cereal Chemistry*; 53 (4): 488-496.
- Crenwelge, D. D.; Dill, C. W.; Tybor, P. T. and Landmann, W. A. 1974. A comparison of the emulsification capacities of some protein concentrate. *Journal of Food Science*; 39: 175.
- Damondaran, S. 1997. Protein-stabilised foams and emulsions. *In*: S. Damondaran, & A. Paraf Eds., *Food proteins and their applications*, New Corp., Marcel Dekker, Cap. 3: 57-110.
- Delseny, M. and Raynal, M. 1999. *In*: Shewry, P. and Casey, R. *Seed proteins*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands; 427-475.
- Desikachar, H. S. R. and Parpia, H. A. B. 1970. Processing and utilization of rice bran with special reference to its possibility for human food. *Proceedings of 5th World Cereal and Bread Congress*, G.D.R.
- Drzewiecki, J. 2001. Similarities and differences between *Amaranthus* species and cultivars and estimation of outcrossing rate on the basis of electrophoretic separations of urea-soluble seeds proteins. *Euphytica*; 119: 279-287.
- FAO. 2004. <http://www.fao.org/rice2004/es/f-sheet/hoja3.pdf>. Fecha de consulta: 28/9/09.
- FAO. 2008. <http://www.fao.org/docrep/t0567e/T0567E08.htm>. Fecha de consulta: 12-12-08.
- FAO/WHO. 1973. Ad Hoc Expert Committee. Energy and Protein Requirements. *Tech. Report Series 522*; *FAO Nutrition Meetings Report Series No. 52*. WHO, Geneva, FAO, Rome.
- FAO/WHO/UNU. 1985. Energy and Protein Requirements. *Technical Report Series No. 724*; WHO: Geneva.
- Fukushima, D. 1991. Recent Progress of Soybean Protein Foods: Chemistry, Technology, and Nutrition. *Food Reviews International*; 7: 323-351.
- Furukawa, S.; Mizuma, T.; Kiyokawa, Y.; Masumura, T.; Tanaka, K. and Wakai, Y. 2003. Distribution of storage proteins in Low-glutelin rice seed determined using a fluorescent antibody. *Journal of Bioscience and Bioengineering*; 96 (5): 467-473.
- Galili, G. and Herman, E. M. 1997. Protein Bodies: Storage Vacuoles in Seeds. *Adv. Bot. Res.*; 25: 113-140.

- Gandhi, A. P.; Khare, S. K. and Jha, K. 2000. Preparation and characterization of protein isolates from soymeal. *Journal of Food Science and Technology*; 37: 624-626.
- Gnanasambandam, R. and Hettiarachchy, N. S. 1995. *Journal of Food Science*; 60: 1066-1069, 1074.
- Halling, P. J. 1981. Protein-stabilized foams and emulsions. *CRC Critical Reviews in Food Science & Nutrition*; 12: 155-203.
- Hamada, J. S. 1999. Use of proteases to enhance solubilization of rice bran proteins. *Journal of Food Biochemistry*; 23: 307-321.
- Hamada, J. S. 2000. Characterization and functional properties rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases. *Journal of Food Science*; 65 (2): 305-310.
- Hardy, J.; Scher, J. and Banon, S. 2002. Review: Water activity and hydration of dairy powders. *Lait*; 82:441-452.
- Hettiarachchy, N. S., Griffin, V. K. and Gnanasambandam, R. 1996. Preparation and functional properties of a protein isolate from defatted wheat germ. *Cereal Chemistry*; 73: 364-367.
- Ju, Z. Y.; Hettiarachchy, N. S. and Bath, N. 2001. Extraction, denaturation and hydrophobic properties of rice flour proteins. *Journal of Food Science*; 66 (2): 229-232.
- Juliano, B. O. 1972. The rice caryopsis and its composition. P: 16-74. *In: Rice: Chemistry and Technology*. 1st ed. DF Houston, ed. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota.
- Juliano, B. O. 1980. Cap X. Properties of rice caryopsis, pp.403-438. *In: Luh B. S. Rice production and utilization*. Ed AVI Publishing Company, Inc. 924p.
- Juliano, B. O. 1985. *Rice Chemistry and Technology*. 2nd Edition (edited by B.O. Juliano). American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA; 774 p.
- Juliano, B. O. 1994. Polysaccharides, proteins, and lipids of rice. *In: Rice: Chemistry and Technology* Ed. St. Paul, Minnesota, American Association of Cereal Chemists; 98-141.
- Katsube-Tanaka, T.; Duldulao, J. B. A.; Kimura Y.; Iida S.; Yamaguchi T.; Nakano, J. and Utsumi, S. 2004a. The two subfamilies of rice glutelin differ in both primary and higher-order structures. *Biochimica et Biophysica; Acta* 1699; 95-102.
- Katsube-Tanaka, T.; Endo, T.; Iida, S.; Yamaguchi, T. and Nakano, J. 2004b. Quality assessment of rice seed protein using the capillary electrophoresis method. *Actas del 4 International Crop Science Congress, I.C.S.C.*, 1-5.

- Kinsella, J. E. 1981. Functional properties of protein: Possible relationships between structure and function in foams. *Cereal Chemistry*; 7: 273-288.
- Kneifel, W.; Paquin, P.; Abert, T. and Richard, J. P. 1991 Dairy foods. Water-holding capacity of proteins with special regard to milk proteins and methodological aspects - A Review. *Journal of Dairy Science*; 74: 2027-2041.
- Komatsu, S. and Hirano, H. 1992. Rice seed globulin: A protein similar to wheat seed glutenin *Phytochemistry*; 31 (10): 3455-3459.
- Krishnan, H. B.; White, J. A. and Pueppke, S. G. 1992. Characterization and localization of rice (*Oryza sativa* L.) seed globulins. *Plant Science*; 81: 1-11.
- Krishnan, H. B. and White, J. A. 1997. Protein body formation and immunocytochemical localization of globulins and glutelins in developing rice (*Oryza sativa* L.) embryos. *Crop Science*; 37: 932-939.
- Kumagai, T.; Kawamura, H.; Fuse, T.; Watanabe, T.; Saito, Y.; Masumura, T.; Watanabe, R. and Kadowaki, M. 2006. Production of rice protein by alkaline extraction improves its digestibility. *Nutrition Science Vitaminol*; 52: 467-472.
- Kung, L.; Chen, H. and Sung, H. J. 1987. *Chinese Agricultural Chemical Society*; 25: 299-307.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680-685.
- Lew, E. J. L.; Houston, D.F. and Feller, D. A. 1975. A note on protein concentrate from full-fat rice bran. *Cereal Chemistry*; 52: 748.
- Libore, A. B. 2006. Cultivares de arroz (pp. 95-110). *In: El Arroz. Su cultivo y sustentabilidad en Entre Ríos*. Ed. Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER) y Universidad Nacional del Litoral (UNL); 1: 314p.
- Lin, C. S., and Zayas, J. F. (1987). Functionality of defatted corn germ proteins in a model system: fat binding capacity and water retention. *Journal of Food Science*; 52: 1308-1311.
- Loisel, W.; Guéguen, J. and Popineau, Y. 1993. *In: Food Proteins. Structure and functionality*. K. D. Schwenke and R. Mothes, Eds. VCH Weinheim. Germany; 320-323.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*; 193: 265-275.
- Lynn, L. 1969. Edible rice bran foods. *In: Protein-enriched cereal food for World Needs*. Ed. Milner, M. American Association of Cereal Chemists Inc. St. Paul, MN. 154 p.
- MacRitchie, F. 1998. *In: Proteins at liquid interfaces*; Moebius, D., Miller, R., Eds.; Elsevier: Amsterdam; 149p.

- Mahajan, A. and Dua, S. 1995. Functional properties of rapeseed protein isolates. *Journal of Food Science Technology*; 32:162-165.
- Maki, Z. and Misao, T. 1983. Nutritional significance of rice bran protein concentrate with trypsin inhibitor activity. *Journal of Nutritional Science Vitaminology*; 29: 293.
- Mandac, B. E. and Juliano, B. O. 1978. Properties of prolamin of mature and developing rice grain. *Phytochemistry*; 17: 611-614.
- Martínez, E. N. and Añón, M. C. 1996. Composition and structural characterization of *Amaranthus* protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural Food Chemistry*; 44: , 2523-2530.
- McWatters, A. and Holmes, M. 1979. Influence of moist heat on solubility and emulsification properties of soy and peanut flours. *Journal of Food Science*; 44, 774-7765.
- Mitra, G. N. and Das, B. 1975. Nutritive value of some rice varieties grown in Orissa. I. Protein content and composition of protein. *J. Res. Orissa University of Agriculture and Technology*; 5:51-57.
- Mooney, B. P. and Thelen, J. J. 2004. High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins. Automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification. *Phytochemistry*; 65: 1733-1744.
- Morita, T. and Kiryama, S. 1993. Mass production method for rice protein isolate and nutritional evaluation. *Journal of Food Science*; 58: 1393-1396, 1406.
- Nakano, T.; Shimatani, M.; Murakami, Y; Sato, N. and Idota, T. 1994. Digestibility and absorption of enzymatically hydrolyzed whey protein. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Sciences*; 47: 203-208.
- Nelina, A. y Ruíz, F. 2005. Efectos beneficiosos de una dieta rica en granos enteros. *Revista Chilena de Nutrición*; 32 (3): 191-199.
- Nishimura, M.; Morita, R. and Kusaba, M. 2009. Review: Utilization and molecular characterization of seed protein composition mutants in rice plants. *Japan Agricultural Research Quarterly*; 43 (1): 1-5 <http://www.jircas.affrc.go.jp>.
- Osborne, T. 1924. *In: The Vegetable Proteins*. 2da. Edición. Ed. Longmans and Green, Nueva York.
- Padhye, V. W. and Salunkhe, D. K. 1979. Extraction and characterization of rice proteins *Cereal Chemistry*; 56 (5): 389-393.
- Palazolo, G. G.; Sorgentini, D. A. and Wagner, J. R. 2004. Emulsifying properties and surface behavior of whey soy proteins in comparison other proteins. *Creaming*

- stability of oil-in water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*; 81:625-632.
- Pan, L. G.; Tomas, M. C. and Añón, M. C. 2002. Effect of sunflower lecithin on the stability o water-in-oil and oil-in-water emulsions. *Journal of surfactants and detergentes*; 5: 135-143.
- Paranam, L.; Hettiarachchy, N. S.; Schaefer, C. and Beck, M. I. 2007. Hydrophobicity, solubility and emulsifying properties of enzyme-modified rice endosperm protein. *Cereal Chemistry*; 84 (4):343-349.
- Petruccelli, S. and Añón, M. C. 1994. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 1. Structural and hydration properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 42: 2161-2169.
- Pilosof, A. M. R. 2000. Cap I. Propiedades de Hidratación. *In: Pilosof A. M. R. y Bartholomai G.B. Caracterización funcional y estructural de proteínas* Ed. CYTED-EUDEBA; 17-29.
- Pomeranz, Y. and Ory, R. L. 1982. Rice processing and utilization. In *CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture*; Wolff, I. A., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL; Vol. II, 139–186.
- Prakash, J. and Ramanatham, G. 1995. Effect of stabilisation treatment of rice bran on nutritional quality of protein concentrates. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*; 46 (2): 177-184.
- Qi, M.; Hettiarachchy, N. S. and Kalapathy, U. 1997. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. *Journal of Food Science*; 62 (6): 1110-1111.
- Qu, L.; Satoh, H.; Ogawa, M. and Wei, X. 2001. Improved eletrophoretical analyses for rice seed storage protein. *Acta Genetica Sinica*; 28 (8):730-737.
- Quinn, J. R. and Paton, D. 1979. A practical measurement of water hydration capacity of protein materials. *Cereal Chemistry*; 56: 38-40.
- Quiroga, A. V.; Martínez, E. N. and Añón, M. C. 2007. Amaranth globulin polypeptide heterogeneity. *The Protein Journal*; 26 (5): 327-333.
- Robert, L. S.; Nozolillo, C. and Altosaar, I. 1985. Homology between rice glutelin and oat 12S globulin. *Biochimica et Biophysica Acta*; 829: 19-26.
- Saeed, M. and Cheryan, M. 1988. Sunflower protein concentrates and isolates low in polyphenols and phytate. *Journal of Food Science*; 53: 1127-1131.
- SAGPyA.
<http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/00/agricultura/otros/granos/arroz0405.php>, pagina web de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos.
Fecha de consulta: el 7/10/2008.

- Sánchez-Vioque, R.; Clemente, A.; Vioque, J.; Bautista, J. and Millán, F. 1999. Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*; 64: 237-243.
- Sawai, H. and Morita, Y. 1970. Studies of γ globulin of rice embryo. Part II. Separation of three components of γ globulin by ion exchange chromatography. *Agricultural Biology and Chemistry*; 34:53.
- Schägger, H. and von Jagow, G. 1987. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of poprteins in the range from 1 to 100kDa. *Analytical Biochemistry*; 166: 368-379.
- Schwenke, K. D. 2001. Reflections about the functional potential of legume proteins. *Nahrung*; 45: 377-381.
- Shih, F. F. and Daigle, K. W. 1997. Use of enzymes for the separation of protein from rice flour. *Cereal Chemistry*; 74 (4): 437-441.
- Shih, F. F. and Daigle, K. W. 2000. Preparation and characterization of rice protein isolates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*; 77, 8:885-889.
- Shih, F. F. 2003. Review: An update on the processing of high-protein rice products. *Nahrung/Food*; 47 (6): 420-424.
- Shotwell, M. A. and Larkins, B. A. 1989. The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. En: *The biochemistry of plants, a comprehensive treatise*. Ed. Marcus, A. New York: Academic Press; 297-345.
- Shyur, L.; Wen, T. and Chen, C. H. 1994. Purification and characterization of rice prolamins. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*; 35: 65-71.
- Silingo, A. 2000. Propiedades estructurales y funcionales de aislados proteicos de soja modificados. Efecto de la presencia de calcio. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Ciencias Biológicas; 193p.
- Stenson, D. F. and Sathe, S.K. 1995. Characterization and digestibility of Basmati rice (*Oryza sativa* L. var. Dehraduni) storage proteins. *Cereal Chemistry*; 72(3): 275-280.
- Tang, S.; Hettiarachchy, N. S.; Ju, Z., and Cossen, A. 2002. Surface hydrophobicity and protein cross-linking in rice subjected to varying drying and tempering condition. *Journal of Food Science*; 67(8): 2930-2933.
- Tang, S.; Hettiarachchy, N. S.; Horax, R. and Eswaranandam, S. 2003. Physicochemical properties and functionality of rice bran protein hydrolyzate prepared from heat-stabilized defatted rice bran with the aid of enzymes. *Journal of Food Science*; 68 (1): 152-157.

- Tecson E. M. S.; Esmama B. V.; Lontok, L. P. and Juliano, B. O. 1971. Studies on the extraction and composition of rice endosperm glutelin and prolamin. *Cereal Chemistry*; 48 (2): 168-181.
- Torgensen, H. and Toledo, R. T. 1977. Physical properties of protein preparations related to their functional characteristics in comminuted meat systems. *Journal of Food Science*; 42 (6): 1615-1618.
- Udaka, J.; Koga, T.; Tsuji, H.; Kimoto, M. and Takumi, K. 2000. Efficient extraction and some properties of storage proteins (prolamin and glutelin) in ancient rice cultivars. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*; 42 (2): 84-90.
- Utsumi, S. 1992. Plant food protein engineering. *In*: J. E. Kinsella (Ed) *Advances in Food Nutrition Research*, Academic Press, San Diego CA; 36: 89-208.
- Villarreal, R. M. and Juliano, O. B. 1978. Properties of glutelin of mature and developing rice grain. *Phytochemistry*; 17: 177-182.
- Vioque, J.; Sánchez-Vioque, R.; Pedroche, J.; Yust, M. y Millán, F. 2001. Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. *Grasas y Aceites*; 52 (2): 127-131.
- Volkert, M. A. and Klein, B. P. 1979. Protein dispersibility and emulsion characteristics of flour soy products. *Journal of Food Science*; 44: 93.
- Voutinas, L. P.; Cheung, E. and Nakai, S. 1983. Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured protein. *Journal of Food Science*; 48: 26-32.
- Wagner, J. R.; Sorgentini, D. A. and Añón, M. C. 1996. Thermal electrophoretic behavior, hydrophobicity, and some functional properties of acid-treated soy isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 44:1881-1889.
- Wagner, J. R. 2000. Capítulo III. Propiedades superficiales. *In*: Pilosof A. M. R. y Bartholomai G.B. *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. Ed. CYTED-EUDEBA: 41-74.
- Wang, J. C. and Kinsella, J. E. 1976. Functional properties of novel proteins: alfalfa leaf proteins. *Journal of Food Science*; 41: 286.
- Wang, M.; Hettiarachchy, N. S.; Qi M.; Burks, W. and Siebenmorgen, T. 1999. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 47: 411-416.
- Wen, T. N. and Luthe, D. S. 1985. Biochemical characterization of rice glutelin. *Plant Physiology*; 78: 172-177.
- Were, L.; Hettiarachchy, N. S. and Kalapathy, U. 1997. Modified soy proteins with improved foaming and water hydration properties. *Journal of Food Science*; 62 (4): 821-823 y 850.

- Wieser, H.; Seilmeier, W. and Belitz, H. D. 1980. Vergleichende untersuchungen über partielle aminosäuresequenzen von prolaminen und glutelinen verschiedener getreidearten. I Protein fraktionierung nach Osborne. Z. Lebensm. Unters. Forsch; 170:17-26.
- Wijerante, W. B. 2005. Propiedades funcionales de las proteínas de soya en un sistema de alimentos. Alimentaria Ed. Alfa editores. Noviembre- diciembre 2005.<http://www.alfaeditores.com/alimentaria/Noviembre%20Diciembre%2005/TECNOLOGIA>. Fecha de consulta: 23/09/09.
- Wilde, P. and Clark, D. 1996. Methods of testing protein functionality. Cap.V. Foam formation and stability. Edited by G. Hall Blackie Academic y Professional. Primera edición; 111-148.
- Yamagata, H.; Sugimoto, T.; Tanaka, K. and Kasai, Z. 1982. Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds. Plant Physiology; 70: 1094.
- Zhai, C. K.; Lu, C. M.; Zhang, X. Q.; Sun, G. J. and Lorenz, K. J. 2001. Comparative study on nutritional value of Chinese and North American wild rice. Journal of Food Composition and Analysis; 14: 371-382.
- Zhou, Z.; Robards, K.; Helliwell, S. and Blanchard, C. 2002. Review: Composition and functional properties of rice. International Journal of Food Science and Technology; 37:849-868.