



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Centro de Investigación y Desarrollo de Alimentos, CIDCA

**Relación estructura-funcionalidad de
glutelinas y aislados proteicos de
amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*)**

Lilían Elizabeth Abugoch James

Tesis Doctoral
2006

Directora

Prof. Dra. María Cristina Añón

*"Enseñarás a volar, pero no volarán tu vuelo,
enseñarás a soñar, pero no soñarán tu sueño.
Enseñarás a vivir, pero no vivirán tu vida,
sin embargo en cada vuelo, en cada sueño, en cada vida,
perdurará siempre la huella del camino enseñado"*

Madre Teresa de Calcuta

AGRADECIMIENTOS

"El agradecimiento es la memoria del corazón" Lao-Tse

Quiero agradecer el apoyo, solidaridad y confianza, recibidas de muchas personas, para iniciar, continuar y terminar este trabajo, entre (mejor no contar...) las idas y vueltas desde Chile a Argentina.

Al Sr. Decano Prof. Luis Nuñez V., de mi Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, de la Universidad de Chile por confiar en mí, brindarme las facilidades y el apoyo para poder iniciar y llevar a cabo esta ardua tarea.

A los Directores del Depto. de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química, Prof. Fernando Valenzuela; Prof. Lilia Masson; Prof. Luis López por todo el apoyo y la confianza brindadas durante este tiempo.

A la Prof. Lilia Masson por insistir e iniciar el contacto con el grupo de proteínas de la Dra. María Cristina Añón.

Muy especialmente a la Dra. María Cristina Añón, por haberme abierto tan afectuosamente las puertas de su laboratorio, brindándome su tiempo, experiencia, inteligencia y consejos muy valiosos. Por la paciencia que me tuvo durante todos los años que estuve abriendo y cerrando mis cuadernos de tesis.

A la Dra. Nora Martínez, por co-dirigir en forma desinteresada y comprometida este trabajo. El paso de los años nos enseñó a cultivar la amistad y una forma de trabajo conjunta cada vez más afiatada. Por todos sus consejos que me enseñaron a ver en forma más crítica y analítica mis experimentos, su tiempo, su apoyo, por recibirme con cariño entre mis idas y venidas de Chile a La Plata...

Al Prof. Enrique Yáñez, Prof. Eduardo Castro por su interés brindado. A los Prof. de mi Depto. por el apoyo, al CIQ por el respaldo informático.

A los integrantes del CIDCA por recibirme tan gentilmente.

A las amigas, compañeras de todos los años en el laboratorio de proteínas, con las que compartimos ideas, momentos muy agradables, risas, salidas, Adri M., Sarita, Silvana P., Cecilia P.; Adri. S., mil gracias por acogerme tan cariñosamente.

A Francisco por liofilizar incontables veces mis muestras proteicas, por su buena voluntad, compañerismo y su humor tan especial que alegraron los días en el laboratorio.

A los amigos de todos los días en el laboratorio, Isa, Pibui, María P., Paula, Frans, Lorenz, Analía, Cachito, Anita, Victoria, Ariel, Flavio, Diego, Aldo, Manuel, Rodrigo B., muchas gracias por el afecto y por hacer grato el entorno.

A Cristina F., Leo, Gabriela, Fabricio, Ariana, Analía B.; Bruno, Lucy, B., Cyntia, Gonzalo P., Andrés, Pato, Pablo, Lucas, Jerónimo por compartir ideas y momentos en el CIDCA.

A Sara R., Coca, Liliana, Nely, Natalia, Diana y Ana Laura por toda la ayuda y gentilezas brindadas.

Al Dr. Jorge Wagner, por transmitirme en forma tan abierta y gentil sus conocimientos y experiencia.
A la Dra. Alicia Chávez por su ayuda a mis consultas de estadística.

A Lops, Maca, che Carlitos, Graciela, Fernando, Don Jaime, Emma, Nalda por todo su cariño, interés y amistad entregadas.

A Vilma, por el compañerismo, cariño, ánimo constante, buen humor y especialmente por el apoyo entregado, cada vez que requería algún trámite desde la Argentina. A Kelly por su cariño y compañerismo.

A Martita, Don Carlos y Don Manuel por todo su apoyo valioso e indispensable en el laboratorio y por el afecto e interés brindados.

A Beatriz P. a Poncho Vergara, a Juanita muchas gracias.

A Pablo, Néstor, Cafarena, José Luis, Arturo, y Tortu, por su apoyo tecnológico y buen humor.

A Sarita, por su amistad, compañerismo, comprensión, ánimo constante, buenas ondas y por recibirme con mucho cariño desde el primer día y todos los días.....

A Cachito y Fede por su amistad, cariño y todos los momentos muy lindos compartidos.

A Lorenza (con su Santi), por los mates compartidos, las ideas, el cariño y la amistad que se fue cultivando a través de estos años.

A Alejandrita, junto a su Agus, por todo el cariño, comprensión y amistad, por las risas, los momentos lindos, la sencillez de espíritu..

A Paulita por su linda amistad, por tantos momentos compartidos, por soportar, por nombrar algo, mis numerosos olvidos, pérdidas de llaves, de diagonales..en la ciudad de las diagonales, por hacerme reír en tantas momentos.

A la Vikita por quererme, darme aliento, confianza y luz. A mis queridos hermanos, sólo quererme, a Mirian por la fuerza, el apoyo y todo el cariño, a Penelope por todo el cariño, apoyo, consejos y empuje para salir siempre adelante calmando mi espíritu, a Luisito por toda la confianza, aliento, buenos consejos que siempre aclaran mi mente, A Cristiano por todos sus oportunos y valiosos consejos para reubicarme en este planeta. A Marisol por preocuparse por mí. A la Yplita, Doris, Jorge, René, por su interés y cariño.

A Andreita, Crispo, Evelin y Juanito por enseñarme a recibir y entregar el cariño en forma juguetona, alegre, libre y transparente.

A la linda y zarpada Michina por alegrarme la vida.....

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
<i>Antecedentes del Amaranto</i>	1
<i>Proteínas de semillas</i>	5
<i>Proteínas de reserva del amaranto</i>	13
<i>Propiedades funcionales</i>	20
<i>Modificación de proteínas con el propósito de cambiar sus propiedades funcionales</i>	29
<i>Propiedades funcionales de las proteínas de amaranto y estudio de sus modificaciones</i>	31
OBJETIVO GENERAL	33
CAPÍTULO 1	
GLUTELINAS: CARACTERIZACIÓN, ESTUDIO DE SU ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FUNCIONALES	
1.1 INTRODUCCIÓN	35
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS	35
1.2.1. Preparación de harina de amaranto desgrasada	35
1.2.2. Obtención de fracciones proteicas	36
1.2.3. Determinación de proteínas	38
1.2.4. Electroforesis	39
1.2.5. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	40
1.2.6. Cromatografía rápida de proteínas en medio líquido (FPLC), cromatografía de exclusión molecular	41
1.2.7. Análisis Inmunoquímicos	43
1.2.8. Espectros de absorción UV a diferentes fuerzas iónicas	44
1.2.9. Hidrofobicidad superficial	44
1.2.10. Solubilidad de glutelinas	45
1.2.11. Propiedades espumantes	46
1.2.12. Análisis estadístico	47
1.3. RESULTADOS	47
1.3.1. Rendimiento de la fracción glutelinas	47
1.3.2. Caracterización de glutelinas de amaranto	48
1.3.3. Propiedades funcionales de glutelinas	59
1.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	62
CAPÍTULO 2	
AISLADOS PROTEICOS DE AMARANTO: INFLUENCIA DEL PH, LA FUERZA IÓNICA Y LA TEMPERATURA EN SU ESTRUCTURA	
2.1. INTRODUCCIÓN	64
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	65
2.2.1. Obtención de aislados proteicos	65
2.2.2. Modificación de los aislados por efecto del pH	65
2.2.3. Tratamiento de los aislados por diálisis	67
2.2.4. Modificación de los aislados por efecto de la temperatura	67
2.2.5. Determinación de proteínas	67
2.2.6. Electroforesis	67
2.2.7. Soluciones buffers empleadas en este estudio	67
2.2.8. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	68

2.2.9. Cromatografía rápida de proteínas en medio líquido (FPLC): Cromatografía de exclusión molecular.....	68
2.2.10. Hidrofobicidad superficial.....	68
2.2.11. Espectroscopía de fluorescencia.....	68
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
2.3.1. Caracterización de los aislados proteicos de amaranto.....	69
2.3.2. Influencia del pH en la estructura del A9, A9-11 y A11.....	73
2.3.4. Efecto de la temperatura sobre los aislados A9, A11 y A9-11.....	98
2.4 DISCUSIONES Y CONCLUSIONES.....	99
CAPÍTULO 3.....	
AISLADOS PROTEICOS DE AMARANTO: PROPIEDADES FUNCIONALES	
INFLUENCIA DEL PH Y LA FUERZA IÓNICA.....	
3.1 INTRODUCCIÓN.....	103
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	103
3.2.1. Preparación de los aislados.....	103
3.2.1. Solubilidad.....	104
3.2.2. Capacidad de retención de agua (WHC).....	104
3.2.3. Determinación de la capacidad de absorción de agua (WIC).....	105
3.2.4. Propiedades espumantes.....	106
3.3. RESULTADOS.....	106
3.3.1 .Propiedades de hidratación de los aislados A9, A11 y A9-11.....	106
3.3.1.1. Efecto del pH sobre las propiedades de hidratación de los aislados A9, A11 y A9-11.....	107
3.3.1.3. Efecto del tratamiento térmico sobre la capacidad de retención de agua.....	119
3.3.2. Propiedades espumantes de los aislados A9, A11 y A9-11.....	120
3.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	124
CONCLUSIONES GENERALES.....	128
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133

INTRODUCCIÓN

Antecedentes del Amaranto

La mayoría de la población mundial se nutre de unas veinte especies vegetales fundamentalmente trigo, arroz, maíz, mijo, sorgo, papa, mandioca, poroto, maní, soja, caña de azúcar y plátano (FAO, 2005), por lo que conocer las características y propiedades de otros cultivos es importante como los llamados pseudocereales, quinoa y amaranto los que se destacan por su gran valor nutritivo y se presentan como una alternativa al consumo de proteínas de origen animal (Teutónico y Knorr, 1985; Bressani y García-Vela, 1990).

El amaranto se cultivaba en América desde hace 7.000 años AC, se cree que los mayas fueron los primeros en utilizarlo como un cultivo productivo. Cuando los españoles llegaron a América, el amaranto era uno de los granos más apreciados por los aztecas (producían de 15 a 20.000 ton/año) y formaba parte de los tributos que cobraban a los pueblos sometidos.

El amaranto tiene diversos nombres como huauhtli (México); Kiwicha, (Perú); coime (Bolivia); trigo-inca, icapachaqui o quinua de valle (Argentina) y cola de zorra (Fuchsschwanz, Alemania). Era considerado un alimento sagrado, relacionado a ceremonias religiosas, con el que se elaboraban figuras de deidades utilizadas en cultos. A partir de 1519, cuando Cortés invadió América, este cultivo fue prohibido por estar ligado a creencias religiosas

Al igual que la quinoa, el amaranto fue seleccionado para alimentar a los astronautas por su alto valor nutritivo, su aprovechamiento integral, la brevedad de su ciclo de cultivo y por su capacidad de crecer en condiciones adversas. Por todo ello, fue calificado por la NASA como cultivo CELSS (Controlled Ecological Life Support System). La planta remueve el dióxido de carbono de la atmósfera y, al mismo tiempo, genera alimentos, oxígeno y agua para los astronautas. El amaranto germinó y floreció en el espacio durante el vuelo orbital de la nave Atlantis. La Academia Nacional de Ciencias de Estados

Unidos declaró al amaranto como uno de los 36 cultivos potenciales a nivel mundial (National Academy of Sciences, 1975).

No existen antecedentes acerca de la producción mundial de amaranto debido a que la misma ha sido escasa. Se registran en forma parcial datos de Estados Unidos, México, Guatemala, Ecuador, Perú, Bolivia, Argentina, Asia, India, Sri Lanka, Nepal, Birmania, Afganistan, Irán, China, Africa, Nigeria, Uganda, Oceanía, Pakistán, Asia. La demanda en el mercado mundial del amaranto durante el año 2003, fue de 1.038,0 TM, en el que Argentina tuvo una participación del 49,1%, en segundo lugar de importancia está Perú que representa el 45,2%, en tercer lugar de importancia se encuentra México con 3,0%, Bolivia y Ecuador 0,7 % y otros con un 2%; el precio del amaranto en el año 2002 fue de US\$ 14,0 la tonelada métrica, siendo los principales países importadores Alemania, Estados Unidos, los Países Bajos y Japón (Ceprobol, 2003).

Descripción botánica del amaranto

El amaranto es una planta perteneciente a la familia de las amarantáceas, la cual posee 70 géneros y más de 850 especies (Mujica-Sánchez, 1997), de ellas



Figura 1: a) Planta de amaranto, b) Semillas

se utilizan como especies comestibles: *Amaranthus hypochondriacus* (la especie en estudio del presente trabajo), *Amaranthus caudatus* y *Amaranthus cruentus* (National Academy of Sciences, 1975).

La planta de amaranto (ver **Figura 1.a**), cuyo cultivo se da en zonas áridas es resistente a diferentes tipos de suelos y se encuentra dentro del grupo de las plantas C4 que hacen más eficiente que las C3 el uso de CO₂ disponible en el aire y trabajan mejor ante condiciones de stress ambiental; pudiendo realizar la fotosíntesis a temperaturas elevadas (Stallknecht y Schulz, 1993). En el amaranto las semillas se encuentran en las inflorescencias, y su número varía de 1.000 a 3.000/g de semillas (Segura-Nieto y col., 1992). Como se puede ver en la **Figura 1.b**, la semilla de amaranto es muy pequeña, mide entre 1 y 2 mm de diámetro, y es lisa, brillante, ligeramente aplanada y de colores blancos amarillentos, dorados, rojos, rosados, púrpuras y negros.

El amaranto es considerado un pseudocereal, porque no pertenece a las familias de las gramíneas, a diferencia de los verdaderos cereales, pero, al igual que estos últimos produce semillas harinosas (ver **Figura 2**).

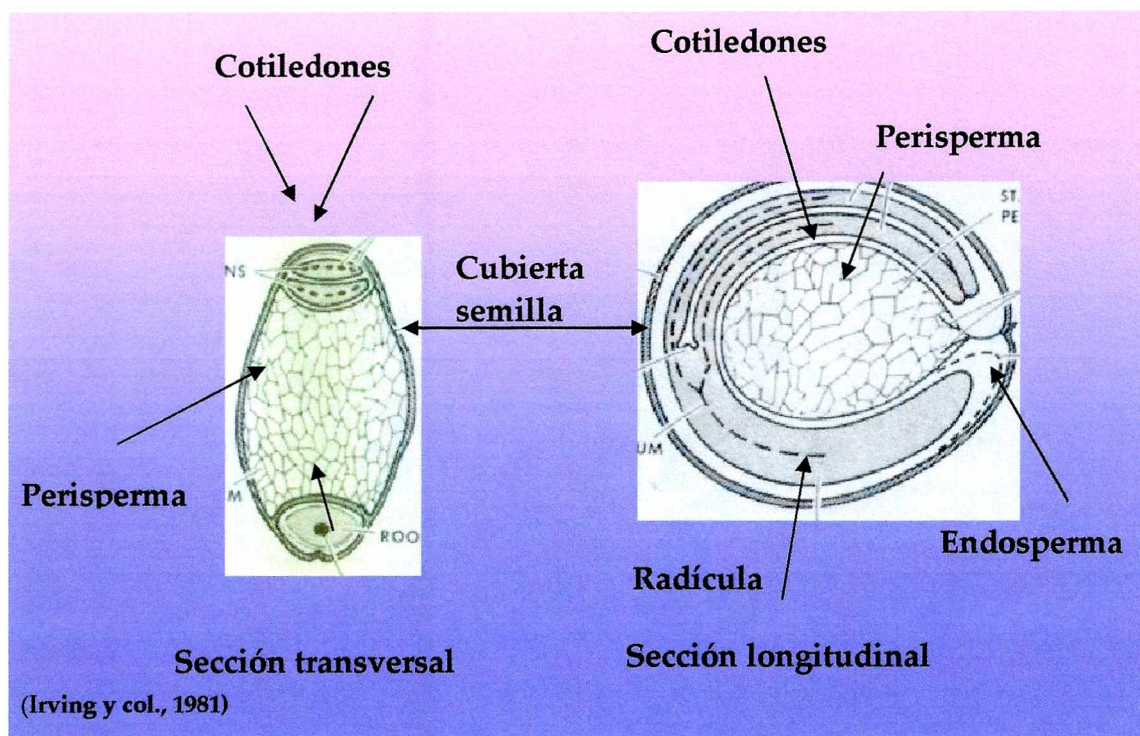


Figura 2: Esquema de una semilla de amaranto

Características nutricionales

Una de las principales propiedades del grano y la razón principal de su consumo es por su alta calidad nutricional. Como se observa en la **Tabla 1**,

Tabla 1: Composición centesimal de amaranto y otros granos

%	Amaranto spp.	Maíz	Arroz	Trigo
Humedad	9,8	10,1	11,6	10,3
Proteína	14,5	9,9	7,1	13,7
Grasa	6,5	5,9	0,7	1,9
Fibra total	9,3	9,4	1,3	12,2
Cenizas	3,0	1,2	0,6	1,6
Carbohidratos	66,2	72,9	80,0	72,6
Calorías	374,0	384,0	357,0	339,0

Fuente: USDA National Nutrient Database for Standard Referente, 2006.

el amaranto posee una alta cantidad de proteína, con valores que oscilan entre 13 a 17%, con un muy buen balance aminoacídico, muy semejante a la proteína ideal propuesta por la FAO-OMS (1973). La composición de aminoácidos de esta semilla ha sido ampliamente estudiada (Singhal y Kulkarni, 1988; Duarte-Correa y col., 1986; Saunders y Becker, 1984; Bressani, 1989). La leucina es el primer aminoácido limitante, mientras que valina, isoleucina y treonina se encuentran en valores cercanos a los requeridos en la dieta humana (FAO-OMS, 1973). La semilla de amaranto es una excelente fuente de lisina, triptofano y aminoácidos azufrados, especialmente metionina, lo cual es una ventaja frente a los cereales, que contienen escasa cantidad de lisina (Andrásófszky y col., 1998). En el amaranto el 65% de las proteínas se encuentra en el embrión mientras que en los cereales el 82% está presente en el endosperma (Betschart y col., 1981). Las proteínas de amaranto no presentan reactividad inmunoquímica cruzada con las proteínas del gluten, por lo que es un alimento apto para celíacos (Chirido y col., 2005; Chirido y col., 1998)

Por otra parte el contenido total de lípidos en las semillas de amaranto fluctúa entre 5,4 a 17 % (b.s.) y en su composición los ácidos grasos poseen un 75 % de insaturación, siendo el ácido linoleico el ácido graso esencial

predominante (Becker y col., 1981). La fracción lipídica es muy singular por su alto contenido en escualeno (5 - 8 %), puede ser usada como una fuente alternativa al aceite de pescado. En su composición lipídica también están presentes tocotrienoles, los cuales son conocidos por bajar los niveles de colesterol en mamíferos (Lyon y Becker 1987; He y col., 2002).

El almidón está compuesto principalmente, por amilopectina, mientras que el contenido en amilosa puede variar entre 4,8 y 7,2% (Saunders y Becker, 1984). En cuanto a su composición de vitaminas y minerales, se destaca el alto contenido de calcio, hierro, fósforo y sodio en comparación con otros cereales y posee vitaminas como el ácido fólico, niacina, vitamina C, vitamina K (USDA, 2006).

Es importante destacar que el amaranto puede ser clasificado como un alimento nutracéutico, ya que posee componentes que aportan un beneficio añadido para la salud, capaz de proporcionar beneficios médicos, inclusive para la prevención y el tratamiento de enfermedades, como en enfermos diabéticos y celíacos (Guerra-Matías y Areas, 2005).

Proteínas de semillas

Clasificación

A principios del siglo pasado Osborne (1924) clasificó a las proteínas vegetales de acuerdo a su solubilidad en diferentes solventes, de la siguiente manera: *albúminas*, solubles en agua; *globulinas*, solubles en soluciones salinas diluidas; *prolaminas*, solubles en alcohol y *glutelinas*, solubles en soluciones alcalinas o ácidas. Siendo los estudios de Osborne (1924) los pioneros, posteriormente se encontró que estas proteínas estaban ampliamente distribuidas en diferentes cereales como el trigo, arroz, centeno, avena maíz (Larmour, 1927).

Las proteínas de las semillas también pueden ser clasificadas en dos categorías, las proteínas "housekeeping" y las proteínas de reserva. Las "housekeeping" son las responsables de mantener el normal metabolismo de la

célula. Otra clasificación las divide en proteínas de almacenamiento, estructurales y biológicamente activas. La mayoría de las proteínas biológicamente activas incluyendo las lectinas son enzimas e inhibidores de enzimas, están presentes en bajas cantidades y pueden tener un mejor balance de aminoácidos. Por otro lado las proteínas de almacenamiento son no enzimáticas y tienen el propósito de ser una fuente de aminoácidos (N y S) durante la germinación y desarrollo de una nueva planta (Mandal y Mandal, 2000).

Actualmente existe una clasificación basada en aspectos genéticos, homología de las secuencias de aminoácidos y mecanismo de acumulación en los cuerpos proteicos. Fukushima (1991) clasificó a las proteínas en *globulinas y prolaminas*. 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 eucariotes no presentan intrones y presentan secuencias de aminoácidos repetitivas en determinadas zonas de la molécula.

Proteínas de almacenamiento

En las semillas se destacan principalmente las proteínas de reserva que constituyen más del 80% del total de ella y son las responsables de la calidad nutricional proteica. Las proteínas de almacenamiento se acumulan en grandes cantidades en la semilla durante el estado de maduración y son usadas durante la germinación, se sintetizan sólo en la semilla ya sea en el cotiledón o en el endosperma y no en otros tejidos, mantienen su actividad funcional durante el almacenamiento y son depositadas en cuerpos proteicos (Bewley y Black, 1994).

Prolaminas

Las prolaminas son reconocidas básicamente por su insolubilidad en solventes acuosos y su solubilidad en mezclas de alcoholes (Osborne, 1924). El

nombre de prolamina deriva por su alto contenido en prolina y glutamina, siendo deficientes en lisina (Eskin, 1990).

El *trigo*, la *cebada* y el *centeno* contienen prolaminas altamente polimórficas, sus MM oscilan entre 30 a 90 kDa. Estas prolaminas se clasifican en tres grupos (Miflin y col., 1983): de alto y bajo contenido en azufre y las prolaminas de alta masa molecular (MM).

Las prolaminas ricas en azufre son las mayoritarias en estas tres especies incluyen entre el 80 al 90% del total de las fracciones de prolaminas, en sus formas poliméricas (estabilizadas por puentes disulfuros entre cadenas) y monoméricas (estabilizadas por puentes disulfuros intracadenas): *β* y *γ* hordeínas de la *cebada*, dos tipos de *γ*-secalina del *centeno* y subunidades de glutenina de baja MM del *trigo*.

Según la clasificación de Osborne (1924) en el *trigo* existen dos tipos de proteínas de reserva las prolaminas solubles en alcohol, conocidas como *gliadinas*, y las *gluteninas* insolubles en alcohol y soluciones acuosas neutras. Las gliadinas contienen las subunidades *ω*, *α*, *β* y *γ* gliadinas, todas monoméricas. Las gluteninas poliméricas que se solubilizan en alcohol luego de reducir sus puentes disulfuro, están constituidas por proteínas de bajo peso molecular (LMW) y proteínas de alto peso molecular (HMW) (Eskin, 1990). Debido a que todas presentan un elevado contenido de prolina y glutamina se las agrupó como prolaminas, y además por su homología de secuencia se las dividió en tres grupos diferentes (Shewry y col., 1986): las prolaminas ricas en azufre (prS), constituidas por *α*, *β* y *γ* gliadinas y las LMW; las prolaminas pobres en azufre (ppS), formadas únicamente por las *ω* gliadinas; y las prolaminas de alto peso molecular (pHMW).

Las prS son las más abundantes en estas semillas, representando el 80% de las proteínas de reserva, poseen un elevado número de residuos de cisteína. Para las *α*, *β* y *γ* gliadinas, estos residuos de azufre no contribuyen a una oligomerización de los polipéptidos, resultando subunidades monoméricas,

mientras que las LMW, presentan puentes disulfuro intercatenarios con otras LMW o con las HMW (Kasarda, 1989).

Las pHMW representan el 10% de las proteínas del grano y pertenecen a un tercer grupo. Por la determinación de su secuencia su tamaño molecular sería 65 kDa (para las x) y 80 kDa (para las y) aunque por electroforesis su movilidad es menor y se corresponde con pesos de 90.000 y 110.000 respectivamente (Field y col., 1987).

Las subunidades HMW están presentes en las semillas como polímeros, estabilizados por enlaces disulfuro. Estos polímeros también pueden contener subunidades prS y tienen pesos moleculares de hasta 1×10^7 .

Las prolaminas que se describieron anteriormente están también presentes en otros cereales. En la *avena*, *las aveninas* (Muench y Okita, 1997), presentan características similares a las prolaminas anteriormente descritas. Poseen al menos doce polipéptidos con tamaños entre 22 y 37 kDa. Los tres que fueron secuenciados presentan una secuencia repetitiva de siete aminoácidos y un extremo N-terminal semejante. Su estructura primaria es similar (en un 68%) a α , β y γ gliadinas de trigo y también está relacionada con las hordeínas de cebada.

En *el arroz*, las *prolaminas*, exhiben un gran polimorfismo en sus subunidades, mediante diversos estudios de los genes de estas prolaminas se han identificado tres clases, I, II y III. Respecto a la composición aminoacídica, todas presentan bajo contenido de lisina, pero las clases II y III a diferencia de la I contienen mayores cantidades de metionina (3%) y cisteína (5,9%). Las secuencias primarias encontradas son distintas de las de prolaminas de maíz, trigo, cebada y centeno, ya que no presentan secuencias repetitivas ricas en prolina (Kim y Okita, 1988).

En el *maíz* están las *zeínas* que son las conocidas como β , γ y δ zeínas, las cuales son ricas en cisteína y/o metionina, residuos deficitarios en las α - zeínas (Thompson y Larkins, 1989). Entre estas proteínas la más abundante es la α

zeína. Presenta dos grupos con masas moleculares aparentes entre 19 y 22 kDa, existiendo microheterogeneidad en cada uno de los grupos. Las α zeínas y su homólogo en *sorgo*, α -*kafirina*, presentan elevados contenidos de glutamina, prolina, alanina y leucina, pero no contienen lisina y triptofano. La estructura primaria de las subunidades presenta una zona central donde un péptido de veinte aminoácidos se repite nueve veces en las de 19 kDa y diez veces en las de 22 kDa. Las γ zeínas le siguen en abundancia a las anteriores, se diferencian del resto por ser más ricas en cisteína, aunque sus principales aminoácidos son Pro y Gln. Son solubles en soluciones alcohólicas en presencia de un agente reductor por lo que algunos autores las han denominado glutelinas 2. Presentan dos tipos de subunidades con masas moleculares de 16 y 27 kDa.

Las β y δ zeínas son las prolaminas más pequeñas, con masas moleculares aparentes de 14 y 10 kDa respectivamente, y se caracterizan por ser ricas en metionina, y en cisteína.

Albúminas, proteínas 2S

Las albúminas pueden ser encontradas en las semillas de las diferentes especies y aunque presentan características moleculares diferentes, se han considerado principalmente como proteínas metabólicas. Sin embargo las albúminas 2S son un tipo de proteínas de reserva y se encuentran tanto en las Angiospermas como en las Gimnospermas, frecuentemente contienen grandes cantidades de aminoácidos azufrados comparadas con las globulinas.

Las albúminas 2S, fueron inicialmente definidas como un grupo sobre la base de su coeficiente de sedimentación (Youle y Huang, 1981). Estas proteínas están ampliamente distribuidas en las semillas de las dicotiledóneas y han sido estudiadas en crucíferas, colza (llamadas napina) y en *arabidopsis*. Por ejemplo, las napinas tienen dos cadenas de polipéptidos con masas moleculares de 9 a 4 kDa unidas a través de puentes disulfuros (Ericson y col., 1986), se han descrito también la conglutina, SFA8 de girasol y albúminas de poroto castor las cuales

difieren en el largo de sus péptidos y en la estructura de sus subunidades (Shewry y col., 1995).

A pesar de las diferencias entre las albúminas 2S, en la estructura de sus subunidades y la síntesis, son proteínas globulares con residuos conservados de cisteína. Se conoce poco acerca del detalle de las estructuras tridimensionales de las 2S.

Globulinas

Las globulinas constituyen el grupo de proteínas más ampliamente distribuidas en las di y monocotiledóneas, y están presentes también en las monocotiledóneas. Pueden dividirse en dos grupos basados en su coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$): globulinas del tipo 7S ó vicilinas y las globulinas 11S ó leguminas. Las globulinas solubles en soluciones salinas diluidas (Osborne, 1924), contienen una alta proporción de aminoácidos con residuos que presentan grupos amidas, aunque una baja concentración de aminoácidos azufrados (Derbyshire y col., 1976).

Leguminas (11S)

Son proteínas oligoméricas solubles en soluciones salinas que presentan masas moleculares aparentes entre 300 y 360 kDa (Marcone y col., 1998). Cada molécula está constituida por seis subunidades denominadas subunidades intermedias y cada subunidad intermedia a su vez está formada por dos polipéptidos unidos por un único puente disulfuro que se ha conservado en la evolución de las globulinas. Ambos polipéptidos se sintetizan como una única molécula denominada proglobulina, este precursor durante el proceso de maduración es clivado por una endoproteasa para rendir los dos polipéptidos mencionados anteriormente (Müntz, 1996). De estos dos polipéptidos en general el más grande posee una masa molecular entre 32 y 40 kDa y punto isoeléctrico (pI) ácido, mientras que para el más pequeño la masa molecular oscila entre 20 y 27 kDa y el pI es básico, en general son llamados polipéptidos ácidos (A) y básicos (B) respectivamente.

Horstmann y col. (1993) encontraron que las proteínas 11S son oligómeros heterogéneos ensamblados al azar durante la formación del hexámero. Con respecto a la heterogeneidad, en glicinina de soja existen al menos cinco subunidades las cuales pueden ser divididas en dos grupos según la homología de sus secuencias, siendo ésta mayor a 90% para las que pertenecen a la misma subfamilia (Nielsen y col., 1989). Los dos tipos principales de proteínas oligoméricas están compuestas por subunidades homólogas aunque no idénticas. El grupo o subfamilia 1, cuyos polipéptidos se denominan G1, G2 y G3 son de menor tamaño y contienen más aminoácidos azufrados que las del grupo 2 (G4 y G5). La variación del tamaño entre las subfamilias se debe a modificaciones en la región C-terminal de las cadenas ácidas, conocida como región hipervariable. Esta región contiene elevadas concentraciones de aminoácidos cargados y se encuentra próxima al sitio de clivaje post-traducciona l en la subunidad precursora (proglobulina) por lo que se encontraría en la superficie de la molécula. Estas proteínas no están generalmente glicosiladas.

Glutelinas de arroz

El mayor tipo de proteínas de almacenamiento que contiene el arroz son glutelinas (80%) y en menor cantidad prolaminas en un 9%. Las glutelinas de arroz son semejantes a las globulinas 11S, el estudio de las glutelinas se hace difícil debido a su insolubilidad, excepto en ácidos o álcalis. Varios autores han coincidido que las especies moleculares que componen las glutelinas de arroz, están conformados como las globulinas 11S, hexámeros estabilizados por puentes disulfuro, los cuales varían en la estequiometría y su masa molecular, dependiendo del estudio y de la variedad de arroz utilizada (Snow y Brooks, 1989; Shewry y Casey, 1999; Chrastil y Zarins, 1992; Yamagata y col. 1982; Abe y col. 1996).

A pesar de su insolubilidad las glutelinas de arroz son homólogas a las 12S de avena y las 11S de las leguminosas, es evidente no solo la similitud entre

el tamaño y la carga de las subunidades ácidas y básicas y su asociación a través de puentes disulfuro, sino también en los patrones de síntesis durante el desarrollo de la semilla y en su reactividad inmunoquímica. A través de ensayos inmunquímicos se ha observado que la globulina de avena 12S y la glutelina de arroz, especialmente las subunidades básicas, están relacionadas estructuralmente a las subunidades de la globulina de diferentes plantas (Shewry y Casey, 1999). Vasco-Méndez y Paredes-López (1995) encontraron cierto grado de homología entre las fracciones de globulina de amaranto y la glutelina de arroz. Se ha observado homología de secuencia entre glutelinas de arroz y leguminas, así las glutelinas de arroz comparten entre el 30-35 % de identidad de secuencia con las globulinas 11S. Tal similitud es evidente no sólo en la secuencia del péptido maduro sino también, en el péptido señal. Además las posiciones de los residuos de cisteína involucrados en la unión de las 2 subunidades de la glicinina de soja están también conservadas en la glutelina de arroz, sugiriendo que estos residuos juegan un rol similar en la mantención de la estructura secundaria de las glutelinas de arroz (Shewry y Casey, 1999).

Aunque las glutelinas de arroz y las globulinas 11S comparten homología, estas similitudes no están distribuidas uniformemente a través de toda la estructura primaria. Las subunidades básicas son más conservadas que las ácidas y además la primera mitad de cada subunidad es más conservada que la segunda. La región más divergente es la cercana al C terminal de la subunidad ácida, zona llamada hipervariable. Esta zona tolera la inserción de péptidos que pueden variar en el tamaño y la carga. La naturaleza hidrofóbica de la región hipervariable, puede tal vez explicar la insolubilidad en agua de estas proteínas (Shewry y Casey, 1999).

Vicilinas (7S)

Las globulinas 7S son proteínas con masas moleculares aparentes que varían en un rango entre 140 y 210 kDa (Casey y col., 1986). Esta diversidad de tamaños es reflejo de la heterogeneidad de las subunidades que constituyen el

trímero, ya que las mismas se pueden dividir en dos grupos: un grupo cuyos tamaños moleculares oscilan entre 45 y 55 kDa y otro con masas moleculares que varían entre 70 y 80 kDa. Si bien son parcialmente homólogas, las de mayor tamaño presentan un inserto cerca del extremo N-terminal (Coates y col., 1985). Además algunas subunidades pueden ser parcialmente clivadas por proteasas y glicosiladas en diferentes grados durante su maduración, lo que aumenta la heterogeneidad de la proteína madura. Por ejemplo, para las globulinas 7S de *Phaseolus vulgaris* que contiene un solo grupo de subunidades, las de 45–55 kDa, se observa un patrón complejo en electroforesis bidimensional debido a que existen subfamilias de diferente masa molecular en el grupo. En el caso de las subunidades más pesadas, de masas moleculares entre 70 y 80 kDa, existe también una diversidad de polipéptidos maduros.

Al igual que las proteínas 11S, los resultados obtenidos para proteína 7S de soja (Thanh y Shibasaki, 1978a) y para 7S de *P. sativum* indican que las subunidades se asociarían al azar durante la formación de los oligómeros. Además Thanh y Shibasaki (1978b) demostraron que los trímeros de β -conglucina de soja se pueden disociar a monómeros, y en ciertas condiciones, reasociarse a trímeros o hexámeros. En este mismo sentido se ha informado la formación de oligómeros 18S en proteína 7S de *P. vulgaris*, lo cual podría estar relacionado con la formación de macroestructuras en los cuerpos proteicos (Nielsen y col., 1997).

Proteínas de reserva del amaranto

Las proteínas de almacenamiento del amaranto han sido aisladas en forma secuencial de acuerdo al clásico método de Osborne (1924), es decir por su solubilidad (Barba de la Rosa y col., 1992a; Martínez, 1997; Castellani, 2000).

Las albúminas, son las proteínas más abundantes del amaranto, con un porcentaje que varía entre 50 y 65%, las segundas en abundancia son las glutelinas, seguidas de las globulinas. Las prolaminas son las proteínas minoritarias de este pseudo-cereal (entre 1,5 y 11%).

Albúminas

Las albúminas están constituidas por polipéptidos de MM entre 10 y 94 kDa (Martínez y Añón, 1996; Marccone, 2000; Segura-Nieto y col., 1992; Barba de la Rosa y col., 1992b, Konishi y col., 1991), en su mayoría son polipéptidos monoméricos y no dissociables por 2-ME.

La estabilidad térmica de esta fracción proteica es muy baja siendo su temperatura de desnaturalización de 64°C (Martínez y Añón, 1996). Mediante ultracentrifugación en gradientes de sacarosa se obtienen dos fracciones 2S y 4,6S. La composición aminoacídica mostró elevados valores de aminoácidos azufrados (4,4 moles %), glutamina-ácido glutámico y glicina (Segura-Nieto y col. 1992). La solubilidad de estas proteínas en presencia de diferentes sales es en general elevada, mayor al 69 %.

Esta fracción presenta un pI de 7,5, elevados niveles de estructura hoja plegada β , y bajo contenido de estructura terciaria. La fracción de albúminas contiene, proteínas con diferente función biológica. Entre estas últimas, se encuentra el inhibidor de tripsina (Segura-Nieto y col., 1994), el cual es un polipéptido de 7,5 kDa y pI 7,5 con elevados contenidos de valina, arginina y ácido glutámico y no contiene metionina (Valdés-Rodríguez y col., 1993).

Globulinas

En el amaranto existen dos tipos de globulinas, las 7S (presentes en baja cantidad) y las 11S (mayoritarias). Por su balance aminoacídico muy bueno, con elevados contenidos de aminoácidos azufrados y ricos en nitrógeno ha sido la más estudiada.

Globulina tipo 7S

Segura-Nieto y col. (1992) encontraron para la fracción de globulinas, tres componentes con diferente coeficiente de sedimentación 2S, 8S y 13S. La fracción 8S presenta, en condiciones no reductoras polipéptidos entre 30 y 90 kDa. Barba de la Rosa y col. (1992b), Martínez (1997) y Martínez y col. (1997) y se encuentra en muy baja proporción. Se purificó proteína glicosilada a partir

de la fracción globulina, con un coeficiente de sedimentación de 9,2S y 7S; encontrando en su composición polipeptídica monómeros de 70-74, 50-46, 37-35, 28-26, 23-21 y 15 kDa. El peso molecular de la proteína nativa mediante exclusión molecular fue 450 kDa por lo que se propuso que en las condiciones empleadas en la cromatografía la proteína se encontraba parcialmente dimerizada. Los estudios realizados por Marcone (1999) sobre esta fracción la caracterizaron como un hetero-oligómero de 186 kDa constituido por ocho subunidades de diferentes tamaños, entre 15 y 90 kDa, unidas de modo no covalente. Posee baja cantidad de hélice α (12,6%) y elevada proporción de estructura secundaria en hoja plegada β (50%). Su punto isoeléctrico se encuentra entre 5,2 y 5,8; a pHs más ácidos su densidad de carga aumenta notablemente y se disocia en sus subunidades (Marcone, 1999).

Globulina tipo 11S

La globulina tipo 11S representa entre el 78 al 81 % del total de la fracción globulínica del amaranto (Konishi y col., 1985; Marcone y Yada, 1991). Está constituida por subunidades polipeptídicas de diferentes tamaños. En condiciones no reductoras se determinó una mayor presencia de los polipéptidos de masas moleculares que van entre 38 a 75,5 kDa, los cuales están ausentes en presencia de 2-ME por lo que se dedujo, al igual que para otras globulinas 11S, que están formados por polipéptidos más pequeños, correspondientes a polipéptidos ácidos y básicos de masas moleculares que varían entre 32 a 19 kDa, unidos por puentes disulfuro (Segura-Nieto y col., 1994). Se han informado, especies proteicas en un amplio rango de masas moleculares, desde 166 kDa (Barba de la Rosa y col., 1992b) hasta 440 kDa (Konishi y col., 1985); Segura-Nieto y col. (1994) y Martínez y col. (1997) determinaron un valor de 302 kDa; Chen y Paredes-López (1997) informaron la presencia de dos especies conteniendo globulina 11S con masas moleculares de 330 y 400 kDa.

Marcone y col. (1994), mediante microscopía electrónica, obtuvieron información de la estructura cuaternaria de la globulina 11S que apoyó el modelo consistente en un dodecámero con sus subunidades organizadas en dos anillos hexagonales ubicados paralelamente resultando en un cilindro oblato con un orificio central. Esta estructura, similar a la propuesta para glicinina de soja (Badley y col., 1975), con una simetría D₆ tiene las siguientes dimensiones: 2,8 nm desde el centro del complejo al centro de la subunidad, 2,8 nm entre subunidades de un anillo y 3,2 nm entre subunidades de anillos opuestos. Cada uno de los anillos tiene un diámetro externo de 9 nm.

La composición aminoacídica de globulina 11S parcialmente purificada sólo fue determinada por Marcone y Yada (1998), su composición coincide en líneas generales con la de la fracción cruda. Los aminoácidos más abundantes son glutamina/ácido glutámico y asparagina/ácido aspártico. En comparación, las globulinas de avena y soja presentan menores cantidades de aminoácidos azufrados y lisina (Segura-Nieto y col., 1994).

La estabilidad térmica, evaluada mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC), fue alta informándose valores de T_d superiores a 95°C (Castellani, 2000; Marcone y col. 1998; Gorinstein y col., 1996a; Martínez y Añón, 1996). Si bien la estabilidad mostrada es comparable con las de otras globulinas 11S, como soja o avena (Scilingo y Añón, 1997; Harwalkar y Ma, 1987), la entalpía de desnaturalización (ΔH) encontrada es mucho menor, entre 4,25 y 8 J/g (Gorinstein y col., 1996b; Martínez y Añón, 1996).

Se determinaron porcentajes de glicosilación entre 4 y 7,8% y de fosforilación entre 0,03 y 0,058% (Marcone y Yada, 1997). Por su parte, Castellani (2000), no encontró glicosilación en esta fracción.

Globulina-P (Gp)

Se ha encontrado una fracción proteica que puede ser extraída con agua, luego de haber extraído las globulinas con solución salina, la que ha sido

denominada en una primera instancia, como albúmina-2 y posteriormente como globulina-P (Chen y Paredes-López, 1997; Castellani y col., 1998).

De acuerdo a Konishi y col. (1991) la albúmina-2, es soluble en agua y soluciones salinas de baja fuerza iónica, pero insoluble en concentraciones de NaCl mayores que 0,1 M. Su pI aparente se encuentra entre 5 y 6 y su composición aminoacídica, comparada con la de albúminas, presenta mayor proporción de prolina, serina, arginina, histidina y fenilalanina, y menor de lisina, metionina, cisteína y valina. A diferencia de la fracción albúminas descrita anteriormente esta proteína posee básicamente cinco polipéptidos de masas moleculares 56, 36, 31, 26 y 22 kDa, más semejante a la composición de globulinas 11S (Konishi y col., 1991).

Una característica particular de esta proteína es su alto grado de polimerización con sólo aproximadamente un tercio de sus moléculas no agregadas. Estas últimas mostraron una masa molecular cercana a 300 kDa (Martínez, 1997; Martínez y col., 1997, Castellani, 2000) siendo ésta otra característica semejante a la de la globulina 11S. Teniendo en cuenta sus aspectos moleculares y su presencia en cuerpos proteicos se sugirió la denominación de globulina polimerizada (globulina-P o Gp).

La Gp es una fracción proteica que está constituida básicamente por hetero-oligómeros de dos tipos, las unidades estructurales (UE) cuya masa molecular es de 280 kDa, y los agregados de alta masa molecular (AAMM) con pesos que van desde 600 kDa hasta agregados superiores de aproximadamente 1.500 kDa (Castellani, 2000).

La Gp parcialmente purificada presentó elevada estabilidad térmica, con una Td = 99,7 °C determinada por DSC. Tanto los polímeros como las moléculas libres poseen la misma estabilidad térmica (Martínez, 1997, Castellani, 2000).

Preparaciones parcialmente purificadas de Gp han sido estudiadas mediante fluorescencia y dicroísmo circular (Gorinstein, 1996a y c). De acuerdo a lo informado esta proteína presenta, frente a otras globulinas, mayor número

de triptofano en su superficie y a su vez muestra mayor hidrofobicidad superficial. La Gp posee un 16% de α hélice, 26% de hoja β y 53% de estructura sin periodicidad. La urea 8 M produce un 33% de desnaturalización y el cloruro de guanidinio modifica su estructura con descenso de α -hélice a la mitad y un 60% de aumento de hoja plegada β .

En estudios inmunológicos, Aphalo y col. (2004) encontraron que la molécula unitaria de la Gp y sus agregados tienen superficies reactivas similares, por otra parte el polipéptido de 56 kDa fue el más reactivo, seguido de las subunidades ácidas. La Gp presentó reacción cruzada con las restantes fracciones de las proteínas de amaranto: globulinas 11S (la más reactiva), glutelinas y albúminas (las menos reactivas). La Gp también presentó una reacción cruzada con globulinas de quinoa y en menor grado con globulinas de girasol y arroz

Glutelinas

La glutelina es una de las fracciones de amaranto menos investigadas hasta el momento. Se ha estudiado su composición polipeptídica en diversas condiciones (Vasco-Méndez y Paredes-López, 1995; Barba de la Rosa y col., 1992b; Segura-Nieto y col., 1992; Gorinstein y col., 1991). En medio desnaturalizante no reductor, se han descrito polipéptidos presentes con masas moleculares entre 50-67 kDa, 30-38 kDa y 20-28 kDa además de subunidades agregadas que no entran en el gel. En presencia de 2-ME se observan subunidades de masas moleculares semejantes a las de globulinas y globulina-p, en general se detecta una banda entre 54-60 kDa, y entre dos y tres bandas en las regiones de 35-38 kDa y 24-26 kDa, están estabilizados por enlaces disulfuro (Gorinstein y col., 1998 y 1991; Barba de la Rosa y col., 1992a).

Existen discrepancias en cuanto al rendimiento de extracción de esta fracción abarcando un rango entre 7 y 56%. El buffer más empleado para la extracción de esta fracción proteica es borato 0,1 M a pH 10, asociado o no con

SDS y/o 2-ME dado que los rendimientos disminuyen bastante en ausencia de los mismos (Segura Nieto y col., 1994; Paredes-López y col., 1993). De sus aminoácidos constituyentes el más abundante es el ácido glutámico/glutamina, después del cual se encuentran en abundancia decreciente arginina, leucina, fenilalanina y tirosina (Bressani y García Vela, 1990).

Mediante estudios inmunológicos se ha determinado, la existencia de homología entre las subunidades ácidas de globulinas y los polipéptidos de 32 kDa y 60 kDa de glutelinas. Además se determinó cierto grado de homología entre estos polipéptidos y los de globulina de avena y glutelina de arroz son proteínas del tipo de las leguminas (Vasco-Méndez y Paredes-López, 1995, Aphalo y col., 2004). Aphalo y col. (2004) describieron cierto grado de homología entre la Gp y la fracción glutelínica de amaranto.

Prolaminas

Al igual que en avena y arroz esta fracción, que se extrae normalmente en propanol 70%, se encuentra en muy baja proporción en amaranto. En lo referente a su composición aminoacídica la leucina y la treonina son los aminoácidos esenciales más abundantes, y a diferencia de las prolaminas más comunes su contenido es bajo (Barba de la Rosa y col., 1992a).

Esta fracción está constituida por polipéptidos de baja masa molecular (entre 10 y 22 kDa), aunque existen algunas discrepancias acerca de los componentes mayoritarios, ya que Gorinstein y col. (1991 y 1996c) detectan subunidades principalmente en la región de 10 a 14 kDa, mientras que Segura-Nieto y col. (1992) las encuentran entre 16 y 22 kDa. Por otro lado Segura-Nieto y col. (1994), han mostrado que el perfil electroforético de prolaminas presenta cambios dependiendo del solvente usado para desgrasar la harina, pudiendo ser una de las causas de estas discrepancias.

Propiedades funcionales.

Se define como propiedad funcional, a las propiedades físicas y químicas que afectan el comportamiento tecnológico de las proteínas en los alimentos durante su procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo (Cheftel y col., 1989; Schwenke, 2001). Para entregar un producto con las propiedades deseables por el consumidor se deben combinar adecuadamente los componentes de un alimento. Es por ello que las investigaciones tendientes a aclarar las características y propiedades funcionales de las proteínas, antes y después de su procesamiento, son fundamentales tanto para el desarrollo de un nuevo producto de calidad sensorial atractiva al consumidor, como para resguardar la calidad nutricional y tecnológica.

Las propiedades funcionales de las proteínas alimenticias pueden clasificarse de acuerdo a Cheftel y col. (1989) y Bourgeois y Le Roux (1986) principalmente en tres grupos:

- i) Propiedades de hidratación, interacción proteína-agua*
- ii) Propiedades dependientes de las interacciones proteína-proteína;*
- iii) Propiedades superficiales.*

El primer grupo considera propiedades tales como la solubilidad, dispersabilidad, humectabilidad, capacidad de retención de agua, floculación y viscosidad. En el segundo grupo se incluyen propiedades que intervienen en fenómenos tales como precipitación, gelificación y formación de otras estructuras. El tercer grupo tiene relación con las propiedades superficiales que pueda presentar la proteína como es la capacidad de formar emulsiones y espumas.

Esta clasificación basada en el tipo de interacción molecular no implica que se establezca un único tipo de interacción, sino que la misma es predominante para ese grupo de propiedades funcionales (Cheftel y col., 1989).

Propiedades de hidratación

El agua es un componente fundamental de los alimentos. El contenido, estado físico y actividad del agua influyen en el comportamiento fisicoquímico

de las proteínas y de los otros componentes del alimento, como también sobre su estabilidad microbiológica (Cheftel y col., 1989; Pilosof, 2000). En muchos casos es necesario rehidratar un sólido proteico que puede actuar como ingrediente o componente alimentario, por lo cual las propiedades de hidratación y rehidratación son de interés en la manufactura de alimentos.

El proceso de hidratación de las proteínas puede representarse a través del esquema mostrado en la **Figura 3**,

Propiedades tales como la absorción de agua, el hinchamiento, la mojabilidad y la capacidad de retención de agua de una proteína tienen relación con las cuatro primeras etapas esquematizadas en la **Figura 3**, mientras que la dispersabilidad y viscosidad involucran también a la quinta etapa.

De acuerdo a Hardy y col. (2002) y Pilosof (2000) las propiedades de hidratación se pueden definir de la siguiente manera:

Adsorción de agua: se refiere a la capacidad de un alimento de adsorber agua espontáneamente cuando se lo coloca en una atmósfera de humedad relativa mayor a la que posee. Si la hidratación alcanzada es elevada se puede producir absorción de agua en el interior del alimento, hinchamiento y solubilización de la proteína.

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, depende del hinchamiento de la proteína.

Retención de agua: 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, depresión o presión osmótica. Esta fracción de agua puede ser asimilable a la suma del agua capilar y el agua unida por puentes de hidrógeno.

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

Dispersabilidad: este término refleja la propiedad de un aislado proteico deshidratado en polvo que permite que el mismo se disperse uniformemente al ponerse en contacto con el agua.

Solubilidad: en química, es una medida de la capacidad de una determinada

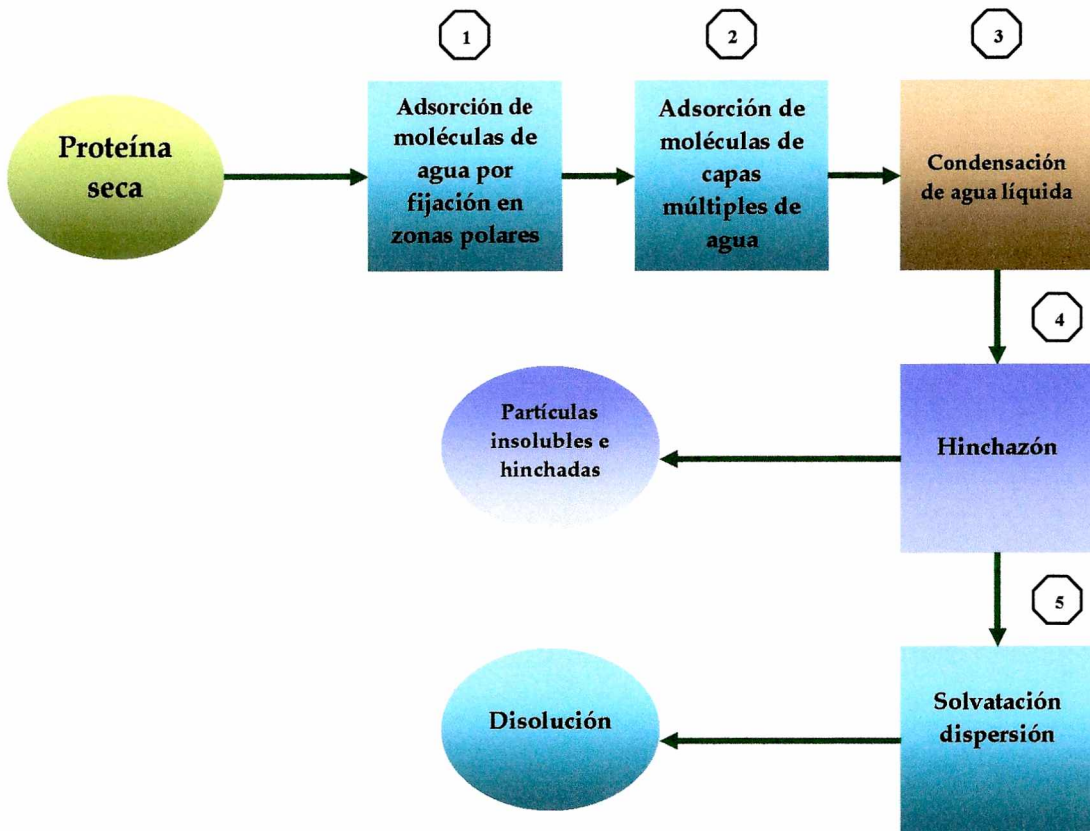


Figura 3: Representación esquemática de las interacciones proteína-agua que se producen durante el proceso de hidratación de un polvo proteico (Cheftel y col., 1989)

sustancia de disolverse en un líquido. En el caso de las proteínas se suele expresar en porcentaje (p/p), e indica la cantidad de proteína soluble de una solución en condiciones predeterminadas.

Algunas propiedades funcionales como la capacidad de formar espumas y emulsiones requieren un grado de hidratación y de solubilización proteica elevado. Otras propiedades como la gelificación, que no requiere de una alta solubilidad proteica conlleva la formación de una red tridimensional de proteínas con un alto grado de hidratación (Cheftel y col., 1989).

Interacción del agua con las proteínas

El agua interacciona con las proteínas por medio de puentes hidrógeno, lo que está directamente relacionado con todos los niveles de estructura de la molécula proteica (secuencia aminoacídica, estructura secundaria, terciaria y Cuaternaria) y por consiguiente con la distribución espacial de los grupos polares localizados en su superficie capaces de establecer enlaces hidrógeno con el agua.

Todos los factores que provoquen cambios en la estructura de la proteína tales como el pH, la temperatura, la fuerza iónica, etc. incidirán directamente en la interacción proteína - agua (Kinsella, 1984; Cheftel y col., 1989).

El *pH* afecta el grado de ionización de las proteínas y su carga neta, lo cual produce modificaciones en las interacciones moleculares que se puedan establecer. En el punto isoeléctrico las interacciones proteína-proteína son más intensas, por lo cual se podría esperar una mínima interacción de la molécula de proteína con el agua, hecho que se debería ver reflejado en una solubilidad, hidratación e hinchamiento mínimos (Hermansson, 1972).

La *fuerza iónica* tiene influencia directa en las propiedades de hidratación, así como también el tipo de sales. A bajas concentraciones salinas la proteína puede incrementar su hidratación mientras que a altas concentraciones predominará la interacción agua-sal y la proteína podría deshidratarse (Lawal, 2006). La efectividad de los iones para producir *salting out* sigue las series de Hofmeister para aniones y cationes: $\text{SO}_4^{2-} > \text{F}^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$ y $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{+2} > \text{Ca}^{+2} > \text{Ba}^{+2}$, el poder precipitante está directamente relacionado con la hidratación del ion (Damodaran y Kinsella, 1982).

Por otra parte el aumento de la *temperatura* puede provocar, dependiendo de las condiciones de ensayo, la desnaturalización de la proteína y su consecuente agregación, en estas condiciones se esperaría que la capacidad de interacción con el agua se viera disminuida. Si el calentamiento provoca sólo

un desplegamiento parcial de la proteína, la cantidad de agua unida puede aumentar (Cheftel y col., 1989; Richardson y Finley, 1985; Phillips y Finley, 1989). La velocidad de absorción de agua y su cuantía dependen también del tamaño de partícula y de la porosidad de las proteínas deshidratadas.

En solución las cadenas aminoacídicas interactúan entre sí mediante fuerzas de Van der Waals, uniones hidrógeno e interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. En general, y para minimizar termodinámicamente la energía libre de estabilización, los residuos hidrofílicos se orientan hacia afuera de la macromolécula y la mayoría de los restos hidrofóbicos se ubican en el interior de la misma, aunque la superficie de algunas proteínas globulares nativas presenta áreas superficiales constituidas por restos hidrofóbicos. La proporción y distribución de la superficie hidrofílica y de estas áreas hidrofóbicas condicionan fuertemente la solubilidad de las proteínas, más aún que la hidrofobicidad total o la densidad de carga de la macromolécula (Vojdani, 1996).

Espumas

Las emulsiones y espumas están presentes en la mayoría de los alimentos procesados. Existe una gran variedad de espumas o batidos alimenticios de consistencias muy diversas, tales como el merengue, marshmallow, productos de pastelería-confitería, crema batida, algunas pastas, helados, suflés, espuma de cerveza, incluso el pan. En los alimentos basados en emulsiones y espumas las proteínas desempeñan el rol de agente surfactante (Cheftel y col., 1989; Damodaran, 1997; Wilde y Clark, 1996).

Las espumas alimentarias son dispersiones de gotas de gas en una fase continua líquida o semisólida, que contienen como se dijo previamente un agente surfactante, como las proteínas. Las proteínas constituyen las principales responsables de esta propiedad ya que forman una barrera protectora entre las burbujas de gas atrapadas (German y Philips, 1994). En la

Figura 4, se muestra la estructura de las burbujas, en la espuma (Wilde y

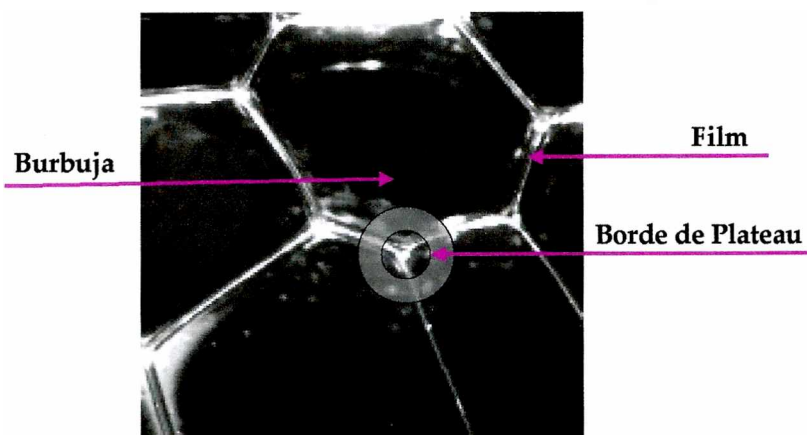


Figura 4: Representación de la estructura de las burbujas de una espuma (Jack y col., 2003)

Clark, 1994)

Al estudiar las propiedades espumantes de las proteínas es necesario 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 formación de la espuma y la segunda con la tensión superficial y viscosidad de la fase continua, las propiedades de la película, la distribución del tamaño de burbuja, la temperatura y el movimiento a que se somete, y la naturaleza de la fase dispersa (Wagner, 2000).

Formación de espumas

Las espumas proteicas requieren la formación de una película flexible y cohesiva alrededor de las burbujas del gas. Las propiedades espumantes van a depender de la capacidad de las proteínas de migrar rápidamente y adsorberse en la interfase, como se muestra en el esquema de la **Figura 5**, además de las propiedades reológicas del film formado (Stainsby, 1986; Poole y Fry, 1987). Para que este proceso ocurra la proteína debe reunir una serie de propiedades como, ser soluble, flexible, tener baja masa molecular, poseer un balance adecuado lipofílico-hidrofílico y presentar propiedades reológicas tales que le

den resistencia y flexibilidad propiedades que van a estar dadas por las interacciones que se puedan establecer entre las proteínas (Wagner, 2000).

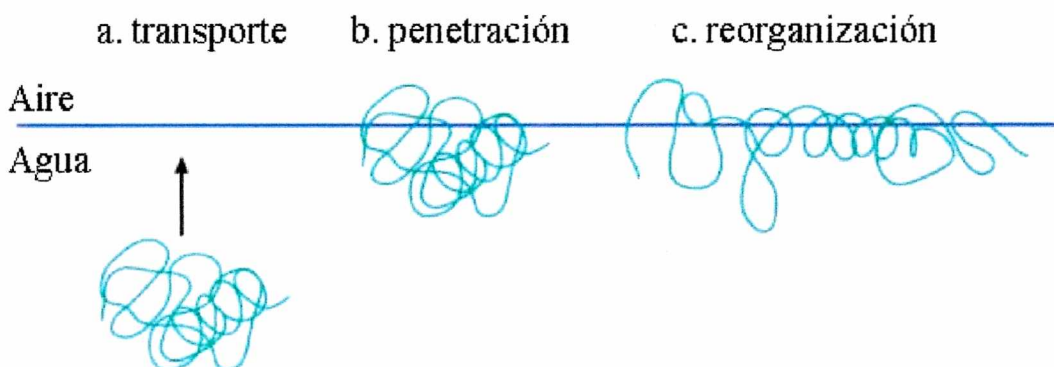


Figura 5: Proceso de adsorción de proteínas. a) Difusión a la interfase; b) adsorción; c) reorganización estructural (Wilde y Clark, 1996)

Una espuma se puede obtener por diferentes métodos, Prins (en German y Philips, 1994) los clasificó en tres tipos: (1) por agitación de una determinada cantidad de líquido en una cantidad de aire ilimitada; (2) agitación o mezclado de un determinado volumen de gas en un volumen de líquido conocido o (3) por burbujeo de un gas en un líquido bajo condiciones especificadas.

Se han descrito varias técnicas para evaluar las propiedades espumantes (Cheftel y col., 1989; German y Phillips, 1994; Poole y Fry, 1987), pero básicamente nos referiremos al método de burbujeo en columna, por las ventajas que posee: permite el uso de volúmenes de líquido pequeños (< 20 ml), trabajar en baja concentración de proteína (< 0,5 %), tiene muy buena reproducibilidad, permite el control del caudal y volumen de aire incorporado, se obtiene un volumen de burbujas más homogéneo, el colapso no es significativo y posibilita el control de la temperatura (Wagner, 2000). Loisel y col. (1993) desarrollaron un equipo de espumado por burbujeo, que permite analizar el proceso de formación de espuma por una medida conductimétrica sobre la solución proteica y registrar en el tiempo la variación del volumen de espuma (ver **Figura 6**).

Como se puede observar en la **Figura 6**, la columna graduada posee un par de electrodos y un disco poroso en su extremo inferior. La espuma se

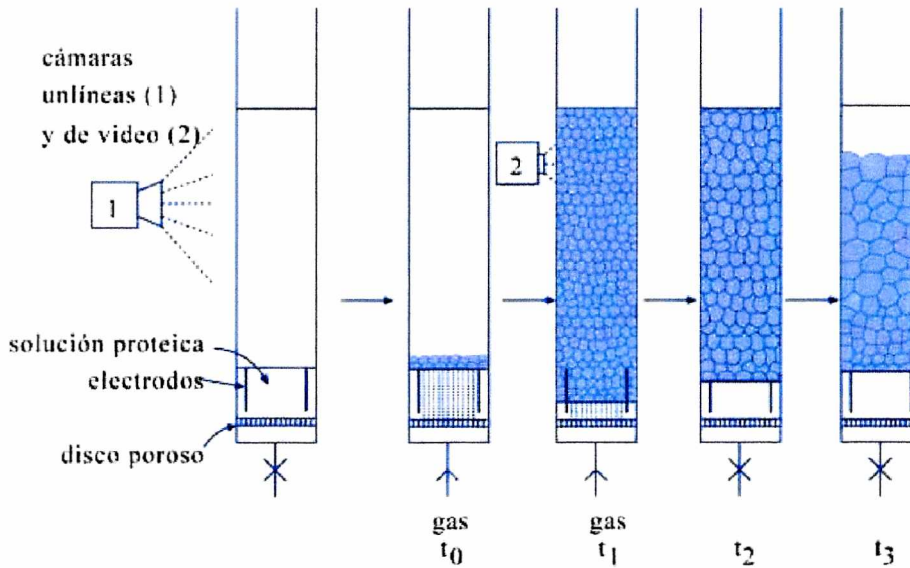


Figura.6: Esquema del método de burbujeo en columna para estudiar las propiedades espumantes de una solución proteica (Wagner, 2000; Loisel y col., 1993)

genera por el paso de gas a un flujo constante; la determinación de la conductividad del líquido permite cuantificar el volumen de líquido en la espuma en función del tiempo y calcular diferentes parámetros que dan cuenta de las propiedades espumantes (Wilde y Clark, 1994; Wagner, 2000). La medida conductimétrica de la fase líquida permite determinar el volumen de líquido en la espuma (V_{LE}) en función del tiempo y a partir del mismo: volumen máximo de líquido retenido de espuma ($V_{LEm\acute{a}x}$), que se presenta a continuación expresado en función de la densidad máxima de la espuma:

$$D_{Em\acute{a}x} = V_{LEm\acute{a}x} \frac{Dl}{V_E}$$

Donde:

Dl: densidad del líquido

V_E : volumen de la espuma

Por otra parte Wagner y col (1996), introdujeron la determinación de la velocidad del pasaje del líquido a la espuma que da información del

comportamiento superficial de la proteína en la etapa inicial de formación de espuma, (v_o), dada por la pendiente inicial de la curva V_{LE} versus el tiempo:

$$v_o = \left(\frac{\Delta V_{LE}}{\Delta t} \right)_o$$

El proceso de desestabilización de una espuma se ha esquematizado en la **Figura 7**. Los mecanismos involucrados en este proceso son: drenaje de líquido por efecto de la fuerza de gravedad; flotación de las burbujas lo que provoca la acumulación de las mismas en la parte superior del recipiente y desproporción o maduración de Ostwald proceso por el cual las burbujas grandes crecen a expensas de las pequeñas por difusión de gas a través de la lamela debido a la diferencia de presión entre ellas. Se puede observar que con el correr del tiempo las espumas pueden colapsar por ruptura de lamelas y las burbujas adoptan una forma poliédrica (Wagner, 2000)

Una vez formada la espuma, es posible evaluar su estabilidad. El concepto de estabilidad es independiente del método de espumado utilizado.

De acuerdo a Loisel y col. (1993), la estabilidad de la espuma se puede

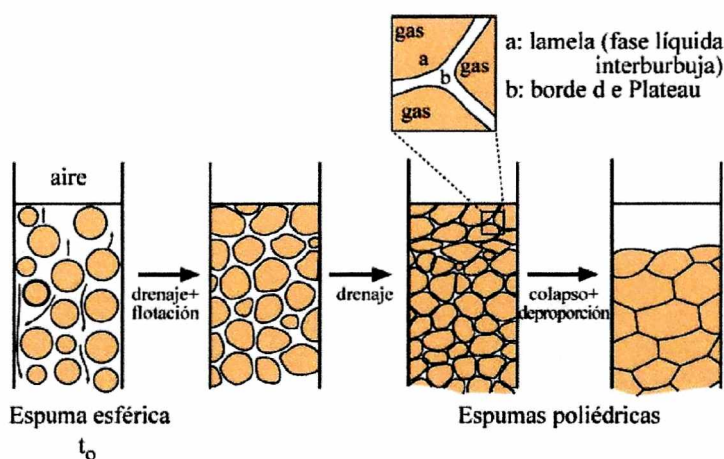


Figura 7: Representación esquemática de los procesos de desestabilización de una espuma (Wagner, 2000).

estudiar por medida conductimétrica del líquido drenado, la determinación de la velocidad de drenaje, da idea de la retención del líquido en la espuma, consiste en medir el volumen del líquido drenado a un tiempo fijo o bien el tiempo medio de drenado ($t_{1/2,d}$), como el tiempo que tarda en drenar el 50 %

del líquido inicial en la espuma o el 50 % del volumen máximo drenado por la espuma (Wagner, 2000; Wilde y Clark, 1994).

Modificación de proteínas con el propósito de cambiar sus propiedades funcionales

Las propiedades funcionales de una proteína están relacionadas con sus propiedades físicas, químicas y estructurales. Entre ellas se encuentran la masa molecular, forma, estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, composición y secuencia aminoacídica, relación hidrofobicidad/hidrofilicidad. Las propiedades funcionales y la estructura de las proteínas se pueden ver modificadas por factores tales como el pH, fuerza iónica y temperatura, como lo demuestran numerosos estudios (Damodaran, 1997, Kinsella y Phillips, 1989). En este sentido se han determinado distintos parámetros como hidrofobicidad superficial o expuesta, carga superficial, tamaño y flexibilidad molecular, contenido de grupos -SH y S-S, etc. los cuales han sido correlacionados con la habilidad para desempeñar una determinada propiedad funcional.

Modificaciones en aislados proteicos

Las modificaciones en la estructura de las proteínas pueden llevarse a cabo por medios físicos, químicos y biotecnológicos. Se ha estudiado, tal como se indicó previamente, el efecto de la temperatura, el pH, la fuerza iónica, hidrólisis enzimática y cambios a nivel genético sobre la estructura de proteínas de origen vegetal y animal, ya sea que se encuentren como aislados o fracciones purificadas, todo ello tendiente a buscar las mejores condiciones de funcionalidad que puedan exhibir dichas proteínas.

Estudios realizados en hidrolizados de proteínas, demuestran que se pueden mejorar ciertas propiedades funcionales de acuerdo al grado de hidrólisis, hidrolizados con un grado de hidrólisis menor al 10 %, son utilizados para mejorar propiedades funcionales como la solubilidad, capacidad emulsificante y espumante, capacidad de absorción de agua, para usos en pan, productos de panadería, helados, mayonesa y derivados de carne, por otra

parte hidrolizados con un grado mayor al 10% de hidrólisis pueden ser utilizados para mejorar el sabor en sopas, salsas, carnes precocidas y productos cárnicos (Pedroche y col., 2003). Es así como por ejemplo la hidrólisis enzimática en caseínas y suero de leche han permitido aumentar propiedades como la solubilidad, capacidad espumante y mantener su calidad nutricional (Pedroche y col., 2003; Sindyikengera y Xia, 2006; Gauthier y Pouliot, 2003; van der Ven y col., 2002).

Kinney (2003) en una revisión publicada sobre soja, señala que el uso de sus proteínas en jugos, bebidas o como sustituto de la carne está determinado por sus propiedades funcionales. Las propiedades funcionales están determinadas por las proteínas de almacenamiento 11S y 7S, las cuales poseen diferentes propiedades fisicoquímicas, lo cual lleva a la obtención de aislados con diferentes características de acuerdo a la proporción de las proteínas 11S y 7S en los aislados proteicos. Petrucelli y Añón (1994) estudiaron el comportamiento de diferentes aislados de soja y los analizaron como agentes surfactantes, encontrando que los aislados de soja presentaron buena actividad emulsificante cuando han sido tratados térmicamente por tiempos cortos y tratados con algunos agentes desnaturizantes. Igualmente estudiaron que en el rango de pH entre 7 y 9 mejoraron esta propiedad, no así la actividad espumante. Por otra parte Arrese y col. (1991) estudiaron la incidencia y el grado de desnaturización de algunos aislados proteicos de soja comerciales (19 aislados de diferentes orígenes) sobre las propiedades. Encontraron entre los aislados comerciales de soja, diferentes grados de desnaturización, desde más nativos hasta muy desnaturizados, lo cual se vió reflejado en valores mayores de solubilidad ($\approx 84\%$) para los aislados más estructurados y valores menores para los desnaturizados ($\approx 21\%$); así también los valores de WIC, en general fueron superiores para los aislados con mayor grado de desnaturización. En relación a la gelificación, determinaron también una relación directa positiva entre esta propiedad y el grado de desnaturización de las proteínas.

Adebowalea y Lawal (2003) investigaron el efecto del pH, la fuerza iónica y la concentración de carbohidratos sobre la solubilidad y capacidad de formar espumas de aislados proteicos de frijol terciopelo (conocido comúnmente como poroto mucuna). La solubilidad fue mínima a pH 4, cercano al pI y máximo en la zona extremadamente alcalina. Estos aislados presentaron a pHs ácidos buena capacidad de formar e espumas y baja estabilidad, en la zona de pH alcalino pH (8-10) se logró mejorar la capacidad de formar espumas, no así su estabilidad. El aumento de la fuerza iónica entre 0,1 a 0,4 aumenta su capacidad y estabilidad.

Para el frijol cowpea se describió el efecto de la fuerza iónica y el pH sobre la solubilidad y la capacidad de formar espumas y emulsiones, encontrando una solubilidad mínima a pHs entre 4 y 6 y máxima a pH 10. La capacidad emulsificante y la espumante evaluadas a pHs ácidos fueron bajas en relación a los pHs alcalinos, la influencia de la fuerza iónica no fue significativa sobre estas dos propiedades superficiales (Ragab y col., 2004; Mwasaru y col., 1999).

Propiedades funcionales de las proteínas de amaranto y estudio de sus modificaciones.

La funcionalidad de las proteínas de amaranto ha comenzado a estudiarse muy recientemente. Mahajan y Dua (2002) evaluaron el efecto de la fuerza iónica y el pH sobre la capacidad de absorción de agua y la solubilidad de la harina de amaranto; la solubilidad fue alta en los valores extremos de pH y mínima a pH 4; por otra parte la capacidad de retención de agua en función de la fuerza iónica presentó un leve aumento en la zona de fuerza iónica, μ 0,4 a 0,6, y un descenso en valores de fuerza iónica superiores en relación al control (en agua destilada). Esta harina presentó escasa capacidad espumante, aun cuando se vio favorecida su estabilidad a fuerzas iónicas bajas (0,2 a 0,6). Por su parte Tapia-Blácido y col. (2005) estudiaron la capacidad de la harina de

amaranto para formar películas, estudiando la influencia del glicerol, pH y temperatura sobre esta propiedad, el estrés de tensión de estas películas fueron menores a las obtenidas con amilosa y amilopectinas puras, pero la tensión de elongación fue muy superior a la de las películas de ambos polisacáridos. Los geles fueron de color amarillo con moderada opacidad y mostraron baja permeabilidad al oxígeno.

Anteriormente Konishi y Yoshimoto (1989) informaron que soluciones de globulinas de amaranto presentaban una actividad emulsificante superior a la de un aislado proteico de soja aunque inferior a la correspondiente a caseína y seroalbumina bovina. Tanto la actividad emulsificante como la estabilidad de las emulsiones obtenidas fueron máximas a pHs alcalinos. Así mismo se determinó que la hidrofobicidad superficial y la actividad emulsificante de la globulina aumentaban en función de la temperatura mostrando una buena correlación hasta 70 °C; el tratamiento a temperaturas superiores provocó la disminución de la solubilidad de estas proteínas.

Paredes-Lopez y col. (1988), Martínez y Añón (1996) y Fidantsi y Doxastakis (2001) han estudiado distintos métodos de obtención de aislados proteicos de amaranto con la finalidad de caracterizarlos y determinar algunas de las propiedades funcionales que exhiben. Así por ejemplo, Fidantsi y Doxastakis, (2001) estudiaron las propiedades emulsificantes y espumantes de aislados proteicos de amaranto enriquecidos en la fracción globulínica y enriquecidos en albúminas y globulinas. Dichos autores investigaron la interacción de las proteínas con polisacáridos (goma xántica y arábica al 0,03%) resultando de estas combinaciones mejoras en las propiedades emulsificantes y espumantes.

Marcone y Kakuda (1999) por su parte, estudiaron la solubilidad, coagulación por calor, actividad para formar y estabilizar espumas y emulsiones así como la capacidad de unir grasas de globulinas de amaranto en

comparación con globulinas de soja. De acuerdo a sus resultados las proteínas de amaranto mostraron un mejor comportamiento que las proteínas de soja.

Scilingo y col. (2002), modificaron aislados proteicos de amaranto mediante una hidrólisis enzimática modificación que condujo a un aumento de la solubilidad. Silva-Sánchez y col. (2004) verificaron que la fracción albúmina de dos especies de amaranto presentaba buenas propiedades de solubilidad, actividad espumante y capacidad de unir grasas a pHs ácidos; por otra parte mostró buenas propiedades reológicas cuando es utilizada en mezclas con harina de trigo. Avanza y col. (2005) determinaron que aislados de amaranto (extraídos a pH 9) enriquecidos en albúminas y globulinas son capaces de formar geles de color amarillo, con propiedades reológicas que fueron mejorando a medida que se incrementaron la concentración proteica (10 a 20 %), la temperatura (70 °C a 95 °C) y el tiempo de calentamiento (10 a 30 min).

Por su parte Cordero de los Santos y col. (2005) obtuvieron dos aislados de amaranto uno por extracción alcalina y precipitación isoelectrica y el otro por extracción a pH neutro y posterior micelización. Ambos aislados no presentaron diferencias en su solubilidad la cual fue mínima en la zona cercana al pI (pH 5) y máxima a pHs alcalinos (pH 9 a 10). En ambos aislados el pH no afectó la capacidad y estabilidad de las espumas, mientras que la actividad emulsionante se favoreció a pH 10.

Objetivo General

El amaranto ha sido estudiado tanto desde el punto de vista agronómico como bioquímico y se ha incentivado su cultivo como una planta aprovechable integralmente. En particular, hay estudios que contemplan la caracterización de las diferentes fracciones de las proteínas, pero menores antecedentes de sus propiedades funcionales.

En el presente trabajo se propuso profundizar el estudio de las proteínas de amaranto, en particular la fracción glutelinas, la cual ha sido poco explorada en relación a la estructura y funcionalidad debido a la dificultad que conlleva su extracción y la pérdida de estructura durante su obtención.

Se estudiará además la relación entre la estructura y la funcionalidad de diferentes aislados proteicos de amaranto en distintas condiciones a efectos de obtener nuevos conocimientos que permitan en un futuro, proponer e incorporar estas proteínas de alto valor nutricional en alimentos destinados al consumo humano.

Objetivos específicos

- Caracterización fisicoquímica y estructural de las glutelinas
- Estudio de la estructura de las glutelinas en distintas condiciones de extracción
- Comparación de las características de la glutelina con la globulina-P de amaranto
- Análisis de las modificaciones estructurales producidas en aislados proteicos en diferentes condiciones del medio.
- Estudio de las propiedades funcionales presentadas por aislados proteicos en distintas condiciones del medio.



CAPÍTULO 1

GLUTELINAS: Caracterización, estudio de su estructura y propiedades funcionales

1.1 INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos interesantes del estudio de la fracción de glutelinas de amaranto, Gt, y sus características fisicoquímicas es poder evaluar su participación en las propiedades fisicoquímicas y funcionales de los aislados proteicos de amaranto. Esta fracción correspondería a las proteínas de reserva más agregadas de la semilla. Las proteínas pertenecientes a la fracción glutelina presentan una composición polipeptídica similar a las glubulinas 11S. Las semillas de amaranto contienen además otras globulinas semejantes a las 11S como la globulina-P (Gp) las cuales presentan propiedades de solubilidad intermedias entre globulinas y glutelinas (Castellani y col., 1998). Por esto la comparación entre Gp y Gt puede ayudar a entender el alto grado de agregación que presentan las glutelinas.

El *objetivo* de este capítulo fue caracterizar el comportamiento fisicoquímico de las glutelinas de amaranto y contribuir al entendimiento de las semejanzas y diferencias entre las glutelinas y la globulina-P. Como se dijo anteriormente ambas proteínas pertenecen a la familia de las globulinas 11S, pero aparentemente sus propiedades fisicoquímicas y estructurales presentarían algunas diferencias atribuibles a distintos estados de agregación en las semillas y a funciones fisiológicas requeridas en diferentes estadios de la germinación.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Preparación de harina de amaranto desgrasada

Las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* (cultivar comercial), fueron cosechadas en la estación experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP, Chapingo, México),

donadas gentilmente por el Dr. Octavio Paredes-López al laboratorio de Proteínas del CIDCA UNLP.

La harina fue obtenida por molienda de las semillas enteras en la cátedra de Cerealicultura de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata. Para ello se utilizó un molino Udy, de 1 mm de mesh. La harina obtenida se tamizó a través de un cedazo de 0,092 mm de mesh y luego se desgrasó mediante tratamiento con n-hexano de grado comercial. Una suspensión de harina al 10% p/v en n-hexano se mantuvo bajo agitación continua durante 24 h a 4 °C. Luego se procedió a separar la harina tratada del hexano mediante filtración y posterior secado a temperatura ambiente. La harina desgrasada así obtenida, se almacenó a 4 °C, en un envase de vidrio hermético. En la caracterización de la fracción glutelinas se utilizaron tres preparaciones diferentes de harina desgrasada.

El contenido proteico de la harina obtenida determinado por el método de Kjeldhal de acuerdo con la AOAC (1984), fue de 17,0% (p/p).

1.2.2. Obtención de fracciones proteicas.

A partir de la harina desgrasada se realizó una extracción secuencial de acuerdo a Osborne (1924). La proporción harina desgrasada/solvente de extracción (g/ml) fue de 1/10 en todos los casos. La secuencia de de extracción de proteínas y los solventes empleados para cada etapa fueron los siguientes:

Fracción albúmina (Alb): Se utilizó agua destilada como solvente de extracción. Luego de 60 min de agitar la suspensión harina/agua se centrifugó a 9.000 × g durante 20 min a 20 °C. El sobrenadante (S1) se separó y el residuo de harina se resuspendió nuevamente en agua durante 30 min con posterior centrifugación en las condiciones antes mencionadas (segundo sobrenadante, S2). Los sobrenadantes S1 y S2 se juntaron y se precipitaron a pH 5 con HCl 2N. El precipitado proteico se separó por centrifugación a 9.000 × g durante 20 min a 4 °C. El material insoluble se resuspendió en agua destilada ajustando el pH a 7,0

con NaOH 0,1N. La suspensión obtenida se congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se liofilizó en un equipo Heto modelo FD4. El precipitado residual de las dos extracciones se utilizó en la etapa siguiente, para la extracción de globulinas.

Fracción globulina (Gl): la extracción se realizó utilizando el precipitado procedente de la extracción de albúmina y como solvente el buffer K_2HPO_4 32,5 mM, KH_2PO_4 2,6 mM (pH 7,5) conteniendo NaCl 0,4 M. Se realizaron dos extracciones sucesivas con posterior precipitación isoelectrica, neutralización y liofilización en las condiciones descritas para la fracción albúminas.

Fracción globulina-P (Gp): En este caso, el solvente de extracción fue agua destilada y se utilizó el residuo de la harina resultante de la extracción de globulinas. El pH de precipitación fue 6,0. La separación de las proteínas se realizó mediante centrifugación en las condiciones anteriormente especificadas. El precipitado se resuspendió en agua destilada y se llevó a pH 7,0 para luego ser liofilizado (Gp).

Fracción glutelina (Gt): Esta fracción proteica fue extraída con dos solventes diferentes a partir del residuo de harina obtenido de la extracción de Gp. Los solventes utilizados fueron:

- borato 0,1 M ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) pH 10 (Gt-bo)
- NaOH 0,1 N (Gt-na)

La precipitación isoelectrica fue llevada a cabo a pH 6,0. Para obtener las fracciones liofilizadas, se procedió de la misma manera que para las fracciones mencionadas anteriormente.

Fracción globulina-P posteriormente modificada con soluciones alcalinas: La Gp liofilizada, se resuspendió en:

- buffer borato ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) 0,1 M pH 10 (Gp-bo)
- NaOH 0,1 N (Gp-na)

Para ello se prepararon suspensiones (1 mg/ml) de la fracción Gp en buffer borato 0,1 M pH 10 o NaOH 0,1 N. Cada suspensión fue agitada durante 1 h a temperatura ambiente ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y posteriormente el pH fue ajustado a 6 con HCl

1 N. Ambos precipitados fueron centrifugados a 10.000 x g durante 20 min a temperatura ambiente. Los precipitados fueron resuspendidos en agua, llevando el pH a 7 y finalmente fueron liofilizados obteniéndose las fracciones de globulina-P modificada con buffer borato (Gp-bo) y con NaOH (Gp-na).

Fracción globulina P-glutelina (Gp-Gt): Cuando fue necesario se obtuvo la fracción en conjunto de globulina-P y glutelina, luego de la obtención de las globulinas, se extrajo inmediatamente con buffer borato 0,1 M pH 10 y se obtuvo la fracción de globulina-P y glutelina (Gp-Gt), siguiendo posteriormente el mismo protocolo de extracción que el descrito anteriormente.

Todas las preparaciones de las fracciones anteriormente descritas se realizaron por cuadruplicado.

La cantidad de proteína correspondiente a cada fracción fue determinada por el método de Lowry y col. (1951) en los extractos obtenidos con cada uno de los solventes indicados previamente.

1.2.3. Determinación de proteínas

Proteínas solubles

La concentración de proteínas solubles fue determinada, en todos los casos, por el método de Lowry y col. (1951). Para la realización de la curva de calibración se utilizó una dilución 1/10 de una solución 10 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) disuelta en el mismo buffer que la muestra o en agua destilada. Las medidas se realizaron a 700 nm en un equipo lector de microplacas Tecan modelo SpectraRainbow (SLT) de acuerdo a lo descrito por Castellani (2000). La medición de proteínas solubles se realizó al menos por duplicado.

Proteínas totales

Las proteínas totales se determinaron por el método de Kjeldahl para lo cual se empleó el equipo micro-Kjeldahl 2040 Digestor FOSS TECATOR. La cantidad de nitrógeno total se midió por colorimetría de acuerdo con la técnica descrita por Nkonge y Ballance (1982). Para determinar el contenido de

proteínas se usó el factor 5,85 g de proteína/g de N (Becker y col., 1981; Segura-Nieto y col., 1994). Las mediciones se llevaron a cabo por cuadruplicado.

1.2.4. Electroforesis

Gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio PAGE-SDS.

Las electroforesis fueron realizadas de acuerdo al método de Laemmli (1970), modificado por Petruccioli y Añón (1995). Se usaron geles en gradiente lineal 6-12% de poliacrilamida o geles continuos al 12% (p/v) con un gel concentrador de acrilamida al 4% (p/v). Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo en un equipo BioRad Mini Protean II Model.

Las masas moleculares de los polipéptidos fueron calculadas usando los siguientes estándares de proteína provistos por Pharmacia: fosforilasa b (94 kDa), seroalbúmina bovina (67 kDa), ovalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa), β -lactoalbúmina (14,4 kDa). Las muestras de proteínas fueron disueltas en buffer de muestra conteniendo 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; glicerol 20% (v/v); SDS 1% (p/v) y azul de bromofenol 0,05% (p/v).

Para las corridas en condiciones reductoras se agregó a las muestras 2-mercaptoetanol (2-ME) 5% (v/v); las mismas fueron posteriormente calentadas a 100 °C por 3 min. Los geles fueron teñidos y fijados con una solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2 % p/v en agua/metanol/ácido acético (10:10:4) durante 12 h y desteñidos con metanol 25% p/v y ácido acético 10% p/v.

Electroforesis bidimensionales (SDS \rightarrow SDS + 2-ME)

La primera dimensión fue llevada a cabo bajo condiciones no reductoras y desnaturizantes usando geles separadores en gradiente lineal de poliacrilamida entre 6-12% (p/v).

Las muestras fueron preparadas de la manera descrita para las corridas en una dimensión. Después de la corrida en la primera dimensión, donde se sembraron muestras por duplicado, una de las calles fue tratada con 10 volúmenes de Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 1% (p/v), sacarosa 20% y 2-ME 0,2

M a 55 °C por 30 min, cambiando la solución dos veces. El duplicado de cada muestra fue fijado y teñido tal como se describió para los geles de una dimensión y se utilizó como control.

La segunda dimensión se corrió en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en un gel continuo 12 % (p/v) de poliacrilamida.

Electroforesis nativas PAGE-nativo

Estos geles se prepararon de igual manera que los geles ya descritos para PAGE-SDS, pero en condiciones no desnaturizantes (sin el uso de SDS en ninguna de sus etapas), en geles de poliacrilamida en gradiente lineal 4 - 7,5% (p/v) a pH 8,3.

Electroforesis bidimensionales (nativa → SDS)

La primera dimensión se llevó a cabo en condiciones no desnaturizantes en geles de poliacrilamida en gradiente lineal, entre el 4 - 7,5% (p/v) a pH 8,3. La segunda dimensión fue llevada a cabo de la misma manera que en los geles bidimensionales ya descritos sin el tratamiento con 2-ME.

Obtención de las imágenes y análisis de los geles

Las imágenes de los geles obtenidos fueron digitalizadas con un equipo BIO-RAD (Gel Doc 1000); el cálculo de las masas moleculares se realizó con el programa Molecular Analyst™/PC (versión 1.5, BIO-RAD).

Todos los geles se realizaron al menos por duplicado.

1.2.5. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los análisis de las muestras se realizaron en un calorímetro Polymer Laboratories (Rheometric Scientific Ltd., U.K.). Para la calibración del equipo se utilizaron como patrones indio, ácido láurico y ácido esteárico de grado analítico, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Para cada corrida se prepararon suspensiones de proteína en agua destilada al 20% p/p. Las muestras, contenidas en cápsulas de aluminio herméticamente selladas a razón de 12-15 mg de suspensión por cápsula, fueron corridas a una velocidad de 10

°C/min desde 300 K (27 °C) a 393 K (120 °C). Como referencia se usó una cápsula doble vacía (ver **Figura I.1**).

Después de cada corrida se determinó el peso seco haciendo una punción en las cápsulas las que fueron mantenidas en estufa a 107 °C hasta peso constante. Los parámetros relacionados con la desnaturalización térmica de las proteínas, fueron calculados usando el software Plus V 5.41 (Martínez y Añón, 1996). Se calculó la temperatura de desnaturalización, T_d , que corresponde a la máxima transición del pico de la endoterma, el grado de cooperatividad, $\Delta T_{1/2}$, que es igual al ancho de la endoterma de transición a la altura media de la temperatura de máxima deflexión y el valor de la entalpía de transición, ΔH , calculado a partir del área bajo la endoterma. Los análisis se realizaron al menos por duplicado.

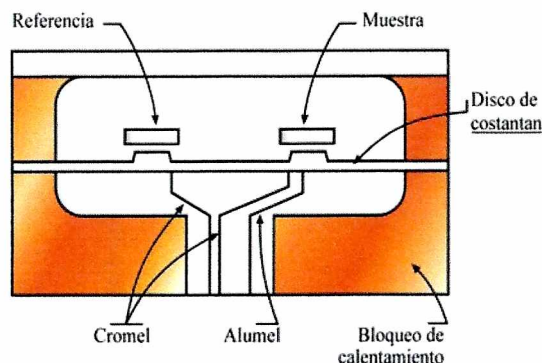


Figura I. 1: Esquema simplificado de un equipo de calorimetría diferencial de barrido (Añón y Jovanovich, 2000)

1.2.6. Cromatografía rápida de proteínas en medio líquido (FPLC), cromatografía de exclusión molecular

Los análisis se llevaron a cabo en un equipo Pharmacia LKB FPLC System. Las fracciones proteicas liofilizadas fueron suspendidas en el buffer indicado en cada experiencia a razón de 25 mg/ml y solubilizadas durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se las centrifugó a 15.000 x g en una microcentrífuga IEC modelo Centra MP4R (International Equipment Company)

durante 20 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue filtrado a través de filtros de nylon de 0,22 μm de poro.

Las cromatografías se realizaron a temperatura ambiente utilizando una columna Pharmacia LKB Superosa 6B HR 10/30. Todos los buffers utilizados fueron previamente filtrados a través de filtros de nitrocelulosa con diámetros de poro de 0,22 μm . Las corridas se desarrollaron en el mismo buffer en el que se solubilizó la muestra. Para equilibrar la columna se pasó una cantidad del buffer correspondiente equivalente a 2 volúmenes de la columna (50 ml). Se inyectaron 0,2 ml de muestra que se corrieron a un flujo de 0,2 ml/min. Se realizó una recolección automática de fracciones del eluido (0,3 ml) empleando el colector FRAC-100 (Pharmacia LKB).

La columna fue calibrada con azul dextrano (para el volumen muerto, V_0), 2-ME (para el volumen incluido, V_i) y las siguientes proteínas de masa molecular conocida: tiroglobulina (669 kDa), apoferritina (443 kDa), β -amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), albúmina (66 kDa) y citocromo C (12,4 kDa), todas provistas por Sigma. Los patrones se disolvieron en un buffer que contenía: K_2HPO_4 32,5 mM, KH_2PO_4 2,6 mM (pH 7,5) y NaCl 0,4 M a una concentración de 4 mg/ml y fueron eluidos de la columna con el mismo caudal que las muestras. Luego se obtuvo una curva de calibración relacionando el logaritmo de la masa molecular (en kDa):

$$\log(MM) = A - (B \times K_{AV})$$

Donde:

$$K_{AV} = \frac{(V_e - V_0)}{(V_T - V_0)}$$

MM: masa molecular en kDa

A: $4,5 \pm 0,2$

B: $5,1 \pm 0,3$

V_e : volumen de elución de la muestra en ml

V_0 : 7,64 ± 0,01 mL

V_T : volumen total de la columna de acuerdo a Pharmacia Biotech, 25,00 ml

1.2.7. Análisis Immunoquímicos.

Los anticuerpos policlonales anti-globulina-P fueron preparados por Castellani (2000), utilizando conejos Nueva Zelanda que fueron inmunizados intradérmicamente cada 3 semanas con 0,4 mL (1 mg/mL) de globulina-P.

ELISA Directo.

Las placas de poliestireno (Maxisorp; Nunc, Roskilde, Denmark) fueron sensibilizados con soluciones de 0,1 a 1 µg/ml (100 µl/fosa) de proteínas Gt-na, Gt-bo, Gp ó Gp-na diluidas en buffer borato 0,1 M, pH 10, durante toda la noche a 4 °C. Después de tres lavados con detergente Tween 20 0,05 % en buffer fosfato 10 mM pH 7,4, NaCl 120 mM, KCl 2,7 mM (PBS-T), las placas fueron bloqueadas con 200 µl por fosa de una solución de PBS que contenía leche descremada 3 % durante 2 h a 37 °C. Posteriormente las placas fueron lavadas con PBS-T y se les adicionó el suero anti-Gp en diluciones seriadas en PBS-T conteniendo 1% de leche descremada (solución diluyente). Después de 1 h de incubación a 37 °C se lavó con PBS-T y se adicionó 100 µl/fosa de un anticuerpo de cabra anti-γ globulinas de conejo conjugado con la enzima peroxidasa (HRP, BioRad) diluido 1:8.000 en solución diluyente. Las placas fueron incubadas por 1 h a 37 °C. Después de un lavado, el contenido de cada fosa se reveló con una solución de *o*-fenilendiamina (1 mg/ml) y agua oxigenada 30% (1 µl/ml) en buffer citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0. La reacción fue detenida después de 20 min con 40 µl de ácido sulfúrico 4 N por fosa y su absorbancia fue leída a 492 nm en un equipo Tecan, modelo SpectraRainbow SLT.

ELISA Competitivo

Las placas de poliestireno se sensibilizaron con Gt-na y Gt-bo separadamente, y se lavaron y bloquearon como se describió anteriormente

Por otra parte, se preparó una dilución seriada en buffer borato 0,1 M pH 10,0 del antígeno (Gt-na o Gt-bo), obteniéndose soluciones en un rango de concentración de proteínas entre 0,8 ng/ml a 4×10^4 ng/ml. Se mezclaron volúmenes iguales de estas soluciones y solución de anticuerpo (dilución 1:4.000) y se incubaron a 4 °C toda la noche. Luego se sembraron 100 µl de esta mezcla en cada fosa y se incubaron por 30 min a 37 °C. Después de lavar con PBS-T las placas fueron incubadas con el antisuero conjugado de cabra y reveladas como se describió en el punto anterior. Los valores de absorbancia fueron transformados con un ajuste logarítmico (Tjissen, 1985):

$$\text{Logit} - p = \frac{\ln p}{(1-p)}$$

Donde:

$$p = \frac{(A - A_o)}{(AM - A_o)}$$

A: es la absorbancia de las fosas y el estándar;

AM: es la absorbancia de cada fosa sin el antígeno competidor y

Ao: es la absorbancia de cada fosa sin la solución de anticuerpo.

1.2.8. Espectros de absorción UV a diferentes fuerzas iónicas

Se prepararon dispersiones de Gt-bo dializada al 1% (p/v) en buffer borato pH = 9 llevado a diferentes fuerzas iónica: 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 y 1,5, por agregado de NaCl (s).

Las dispersiones fueron agitadas durante a 1 h a temperatura ambiente y luego centrifugadas a 10.000 x g. por 30 min a temperatura ambiente. El espectro UV cercano de los sobrenadantes se determinó a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Beckman DU 650 a longitudes de onda entre 250 y 350 nm.

1.2.9. Hidrofobicidad superficial

Para la determinación de la hidrofobicidad superficial (Ho), se empleó el método de (Kato y Nakai, 1980), utilizando como sonda fluorescente 8-anilino-

1-naftalensulfonato de amonio (ANS). Se prepararon soluciones de 1 mg/ml a partir de los liofilizados de las proteínas ensayadas usando como solvente buffer borato 0,1 M pH 10. Luego de 1 h con agitación a temperatura ambiente, las muestras fueron centrifugadas a 9.000 x g durante 15 min y 20 °C. A partir de esta solución se prepararon cinco diluciones seriadas hasta una concentración de 0,025 mg/ml. En el momento del ensayo se preparó una solución de ANS 8 mM en buffer borato 0,1 M pH 10.

Para la cuantificación de la hidrofobicidad superficial se mezclaron 3 ml de cada dilución con 50 µl de la solución de ANS y se midió la fluorescencia en el fluorómetro a 484 nm habiendo producido una excitación a 364 nm. Se utilizó un equipo Perkin Elmer 2000, al cual se le ajustó la sensibilidad del detector llevando a cero con 3 ml de metanol (pureza HPLC) y a 800 unidades de fluorescencia con una mezcla de 3 ml de metanol y 15 µl de ANS 8 mM. Se determinaron dos blancos diferentes: el correspondiente a cada dilución proteica sin el agregado de la sonda fluorescente y una mezcla de 3 ml de buffer borato 0,1 M pH 10 con 50 µl de ANS. La hidrofobicidad superficial, H_o , se calculó a partir de la pendiente obtenida al relacionar las unidades de intensidad de fluorescencia con la concentración de proteína (mg/ml). La concentración proteica, se determinó por el método de Lowry y col. (1951).

$$IF = H_o \cdot [proteínas] + a$$

Donde:

IF: la intensidad de fluorescencia;

[proteínas]: la concentración de proteínas en mg/ml y

H_o : la hidrofobicidad superficial.

1.2.10. Solubilidad de glutelinas

La determinación de solubilidad en los distintos medios utilizados se llevó a cabo dispersando la Gt-bo dializada (1% p/v) en las soluciones descritas en el punto 2.2.3 a diferentes fuerzas iónicas y pH constante = 9, durante 1 h a

temperatura ambiente. Se utilizó un agitador rotativo a velocidad media y con agitación más intensa y periódica, cada 15 min, en un agitador Termolyne Maxi Max a velocidad máxima. Las muestras fueron luego centrifugadas a $10.000 \times g$ durante 30 min a 15°C . El contenido de proteínas en el sobrenadante fue cuantificado por el método de Lowry y col. (1951). La solubilidad se expresó como % de la cantidad de proteína soluble en relación a la cantidad de proteína inicial en la muestra.

1.2.11. Propiedades espumantes

Se prepararon dispersiones de glutelinas (Gt-bo) de amaranto a una concentración de 1 mg/ml en buffer borato 0,1 M a pH 10, se mantuvieron en agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente, posteriormente fueron centrifugadas a $10.000 \times g$ durante 30 min a 15°C y se midieron las propiedades espumantes en el sobrenadante. Se colocaron 6 ml de muestra en una columna de vidrio graduada de 2,5 cm de diámetro interno y 25 cm de altura, semejante al diseño desarrollado por Loisel y col. (1993), que permite analizar el proceso de formación de espuma por medida conductimétrica sobre la solución espumada. La columna posee un par de electrodos verticales localizados en la parte inferior y en su base una placa de vidrio poroso. La dispersión proteica se introdujo dentro del tubo hasta cubrir los electrodos. La espuma fue generada por pasaje de N_2 a la solución de proteína, a una velocidad aproximada de 1,7 ml/s, registrándose la conductividad del líquido y el volumen de espuma durante su formación, deteniendo el burbujeo al alcanzar un volumen de espuma de 100 ml. La medida conductimétrica de la fase líquida permite determinar el volumen de líquido en la espuma (V_{LE}) en función del tiempo y a partir del mismo calcular durante el burbujeo los siguientes parámetros:

- velocidad inicial de formación de espuma, v_i , (ml/min) dada por la pendiente inicial de la curva
- volumen máximo de líquido retenido en la espuma, $v_{m\acute{a}x}$, (ml)

Con posterioridad al burbujeo se determinó:

- tiempo requerido para drenar el 50 % del líquido incorporado a la espuma, $t_{1/2}$ (s)

Además se calculó

- velocidad específica de drenado, K, ($\text{ml}^{-1} \text{min}^{-1}$) como:

$$K = \frac{1}{V_{\text{máx}} \cdot t_{1/2}}$$

1.2.12. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados con el software Statgraphics plus ver 4.0, mediante el cual se realizó un análisis de varianza ($p < 0,05$) y comparación múltiple de medias por el test de Duncan.

1.3. RESULTADOS

Previamente a la caracterización de la fracción glutelina se constató la composición proteica promedio de las harinas utilizadas en el desarrollo del trabajo y se determinaron los perfiles polipéptidicos de las fracciones proteicas presentes. Del total de proteínas extraídas de las harinas un 36 ± 7 % correspondió a albúminas, 33 ± 4 % a globulinas (incluidas las Gp) y 32 ± 6 % a glutelinas (extraídas con NaOH 0,1 N).

La composición de los polipéptidos de las fracciones mencionadas analizada por PAGE-SDS bajo condiciones no reductoras y reductoras (2-ME), concordaron con resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio (Martinez y col. 1997).

1.3.1. Rendimiento de la fracción glutelinas

La fracción de glutelinas se extrajo de la harina, posterior a la extracción de albúminas y globulinas, mediante la utilización de distintos solventes en forma alternativa (Materiales y Métodos ítem 1.2.2)

En la **Figura I.3** se pueden observar los rendimientos de las diferentes fracciones proteicas obtenidas de la harina junto con los de las glutelinas. El

rendimiento de la glutelina extraída con NaOH (Gt-na) fue superior ($32 \pm 6 \%$) al obtenido con buffer borato (Gt-bo, $16,3 \pm 0,5 \%$). Cuando luego de la extracción de proteínas con buffer borato se realiza un tratamiento con SDS 0,1 %, en presencia o ausencia de 2-ME, se extrae un $17,7 \pm 0,3 \%$ de proteína adicional; la suma de las dos últimas extracciones – buffer borato y SDS - arrojó un rendimiento equivalente al logrado con NaOH. Estos resultados sugieren que el tratamiento con NaOH es lo suficientemente drástico como para romper las interacciones que mantienen a la glutelina como agregados insolubles.

Los resultados anteriores no concuerdan con los informados por Barba de la Rosa y col. (1992b) quienes obtuvieron rendimientos similares tanto si las glutelinas se extraían con NaOH como con buffer borato. Esta diferencia puede atribuirse parcialmente a diferencias en la secuencia de extracción utilizada, nosotros obtuvimos globulina-P y glutelinas como dos fracciones separadas en tanto que Barba de la Rosa y col. (1992b) no lo hicieron de igual manera.

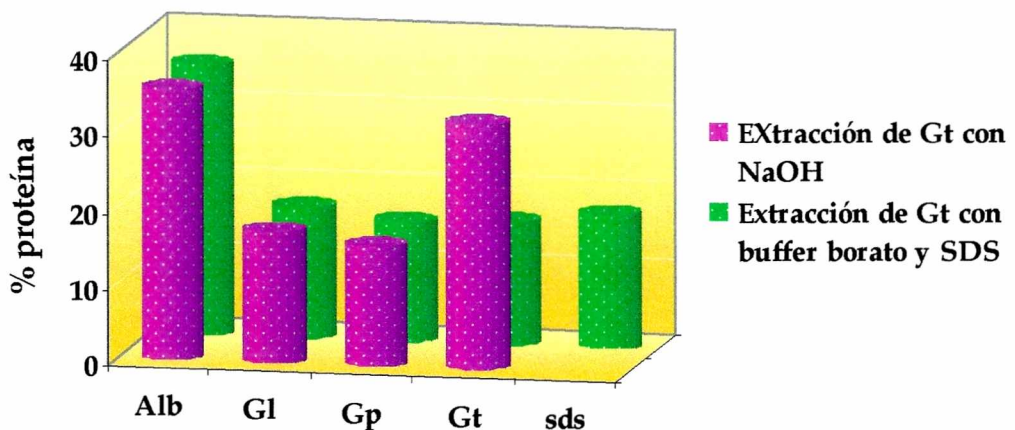


Figura I.3: Obtención y rendimiento de las diferentes fracciones proteicas de la harina de amaranto desgrasada

1.3.2 Caracterización de glutelinas de amaranto

Caracterización de perfiles proteicos de la fracción de glutelinas

Las masas moleculares de los polipéptidos de glutelinas extraídas con NaOH 0,1 N (Gt-na) y glutelinas extraídas con buffer borato 0,1 M, pH 10 (Gt-bo), se presentan en la **Tabla I.1**.

Tabla I.1: Masas moleculares de polipéptidos de las fracciones Gt-na y Gt-bo (kDa)

Gt-na	Gt-bo
55 ± 2	53 ± 2
41 ± 2	40 ± 1
32 ± 1	32 ± 2
25 ± 1	26 ± 1
19 ± 1	20 ± 1
17 ± 2	18 ± 2

En la **Figura I.4** se presentan los perfiles electroforéticos PAGE-SDS de Gt-na, Gt-bo y en forma comparativa el correspondiente a globulina-P (Gp). De acuerdo a estos resultados Gt-na y Gt-bo presentan perfiles similares entre sí y con Gp (**Figura I.4** calles 1, 2 y 3). Se pueden observar bandas proteicas entre 52 a 56 kDa, alrededor de 30 kDa y alrededor de 21-20 kDa. Una diferencia encontrada entre Gt y Gp es la presencia de bandas menores a 20 kDa en la fracción Gt que no las exhibe Gp. Por otro lado en la **Figura I.4.a**, se puede observar que tanto glutelinas como globulina-P presentaron bandas en la zona de 94 kDa y superiores, atribuidas a la presencia de agregados. Se muestra sólo el perfil bidimensional SDS → SDS + 2ME de Gt-bo, ya que fue muy similar a Gt-na. En la misma se pueden observar las subunidades diméricas mayores de la glutelina (D1 en la figura) compuestas por polipéptidos de aproximadamente 30 y 20 kDa, correspondientes a los polipéptidos ácidos (A) y básicos (B) descritos para las globulinas 11S y la Gp (Martinez y col., 1997; Segura-Nieto y col., 1994) y las subunidades diméricas menores (D2 en la figura) integradas por polipéptidos de masas moleculares de alrededor de 20 a 25 kDa.

El perfil de la fracción Gt-na mostró una menor proporción de polipéptidos D₁ (resultados no mostrados) lo cual puede deberse, a un intercambio de puentes disulfuro entre moléculas desplegadas en el medio

alcalino. Estos perfiles de glutelinas son similares a los descritos por Barba de la Rosa y col. (1992a) y Vasco-Méndez y Paredes-López (1995). La glutelina de

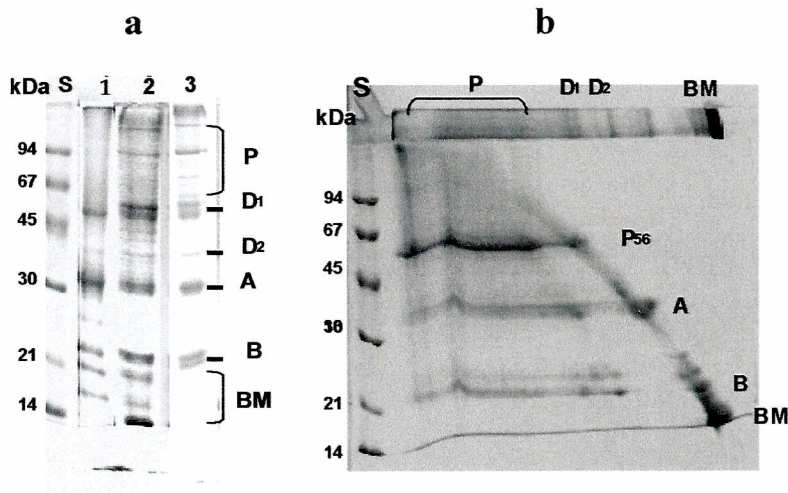


Figura I.4: (a) PAGE-SDS de fracciones glutelínicas de amaranto en condiciones no reductoras al 12 % de acrilamida (p/v). Calle 1, Gt-na; calle 2, Gt-bo; calle 3, Gp, calle S, estándares de proteínas; P, polipéptidos agregados; D₁ y D₂, subunidades dimericas de 55 y 45 kDa respectivamente; A: polipéptido, de 30 kDa. (b) Gel bidimensional (SDS → SDS + 2-ME) al 12 % de acrilamida (p/v) de Gt-bo; P₅₆: polipéptido de 56 kDa, S estándares de proteína de la segunda dimensión

amaranto contiene también una cantidad importante del polipéptido monomérico de 56 kDa (P₅₆, Figura I.4.b) y polipéptidos de masa molecular mayor a 60 kDa (P en la Figura I.4.) compuestos por los polipéptidos agregados característicos de la globulina-P de amaranto (Castellani, 2000).

En la Figura I.5 se muestran los geles bidimensionales PAGE-nativo → SDS-PAGE de Gt-bo y Gt-na. En la electroforesis nativa, Gt-bo presenta una zona no muy definida, como una banda ancha poco intensa mientras que Gt-na, presenta una mancha en todo el gel. De acuerdo al perfil de la segunda dimensión, las moléculas de Gt-bo estaban compuestas principalmente por polipéptidos no reducidos D₁ y D₂ (indicados en la Figura I.5) y agregados P. Por otro lado, en la segunda dimensión, Gt-na mostró polipéptidos disociados de masas moleculares entre 14 a 20 kDa (que migran más rápido en la primera

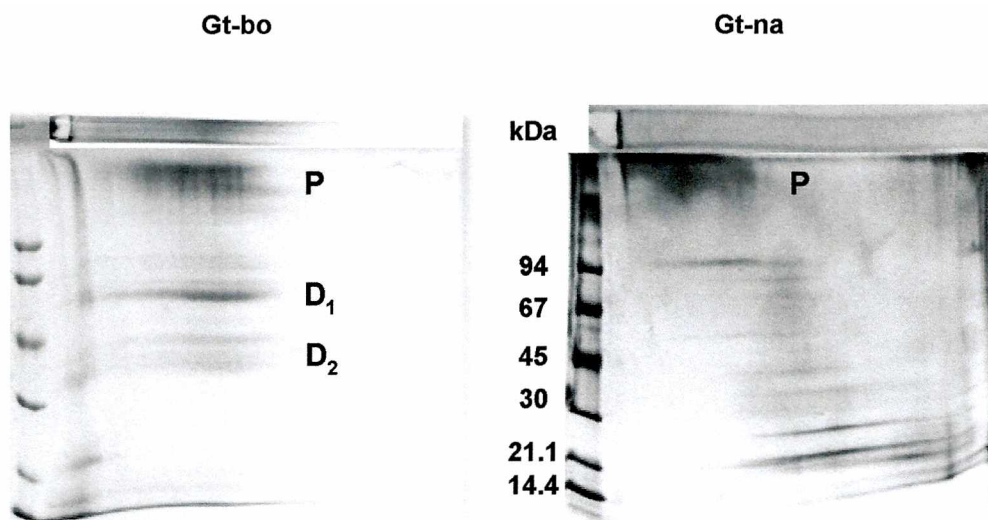


Figura I.5: PAGE nativo→SDS bidimensional de Gt-bo y Gt-na de amaranto. La primera dimensión nativa en gradiente de poliacrilamida entre 4 y 7,5 % (p/v). La segunda dimensión en condiciones desnaturalizantes al 12 % (p/v) de poliacrilamida

dimensión) hasta 80 kDa (P en la **Figura I.5**) con la movilidad más baja en la primera dimensión.

Los resultados presentados sugieren que las glutelinas poseen cierto grado de estructura cuando son extraídas con buffer borato 0,1 M pH 10, y que independiente del tipo de extracción cuando está fracción se encuentra desnaturalizada presenta el mismo perfil proteico.

Estabilidad térmica de las glutelinas comparación con Gp-bo

Gt-bo y Gt-na se analizaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y los termogramas obtenidos se muestran en la **Figura I.6**. Gt-na no presentó ninguna endoterma, indicando que esta proteína estaba desnaturalizada, probablemente debido a las condiciones drásticas utilizadas en la extracción. Por otra parte Gt-bo presentó una endoterma con una temperatura de desnaturalización de 96 ± 1 °C y una entalpía de $4,6 \pm 0,6$ J/g. Este valor de la Td indica que Gt-bo presenta una estabilidad térmica alta, similar a Gp (Castellani, 2000), pero por otra parte presenta un ΔH menor que Gp ($\Delta H = 14,0 \pm 0,2$ J/g, Castellani, 2000), lo cual sugiere que Gt-bo posee una conformación diferente a

la de Gp, ó que las moléculas de Gt-bo estaban parcialmente desplegadas con anterioridad al análisis térmico. El valor de $\Delta T_{1/2}$ calculado fue de $11,6 \pm 0,6$ °C, indicativo de una baja cooperatividad en la desnaturalización, lo cual nos sugiere que las moléculas presentan una conformación más laxa y/o la presencia de moléculas con diferente conformación no distinguibles desde el punto de vista de su estabilidad térmica. En el caso de que el medio básico haya provocado una desnaturalización parcial de la glutelina y dado que las

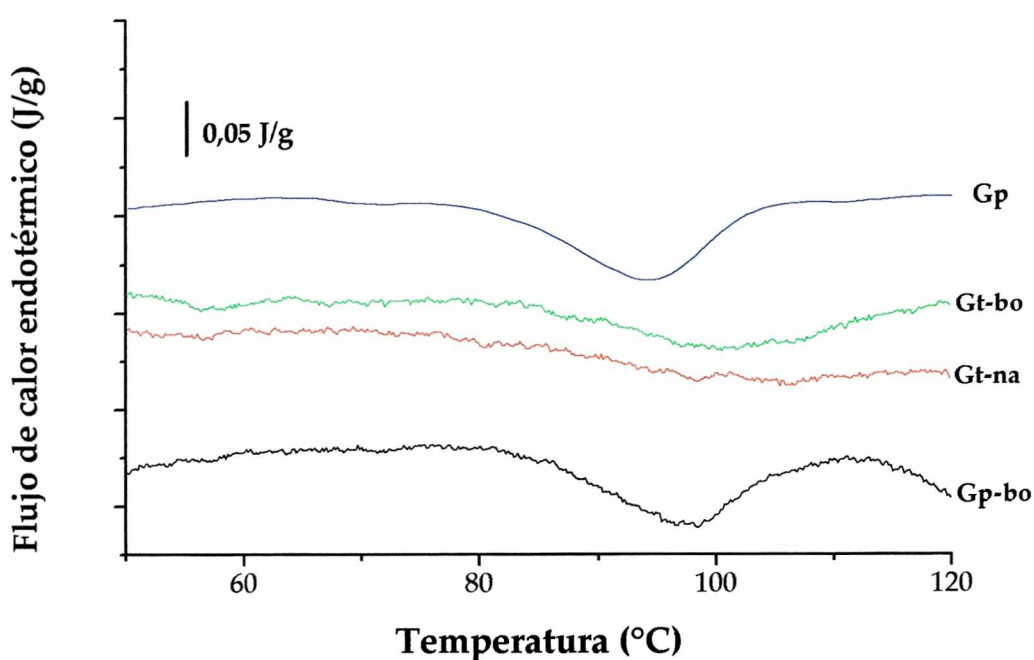


Figura I.6: Termogramas de suspensiones de Gt-bo, Gt-na, Gp-bo y Gp en agua al 20 %

glutelinas poseen una composición polipeptídica y estabilidad térmica muy similar a la globulina-P, cabe la posibilidad que ambas proteínas presenten una conformación similar si son extraídas en el mismo medio. Para investigar esta propuesta se sometió a Gp a un tratamiento alcalino (buffer borato pH 10, Gp-bo ver ítem 1.2.2 en Materiales y Métodos).

En la **Figura I.6** se muestra el termograma de la globulina-P tratada con buffer borato (Gp-bo). El mismo presenta una endoterma más ancha con una entalpía de desnaturalización de $6,0 \pm 0,4$ J/g, menor que la de la globulina-P no

tratada ($\Delta H = 14,0 \pm 0,2$ J/g), lo que indica que en estas condiciones la Gp presenta una estructura parcialmente desplegada, sugiriendo que el tratamiento alcalino ha modificado su estructura. Se supone entonces que los valores de entalpía de Gp-bo similares a los de Gt-bo podrían señalar que el tratamiento alcalino provoca una desnaturalización tanto en Gp como en Gt.

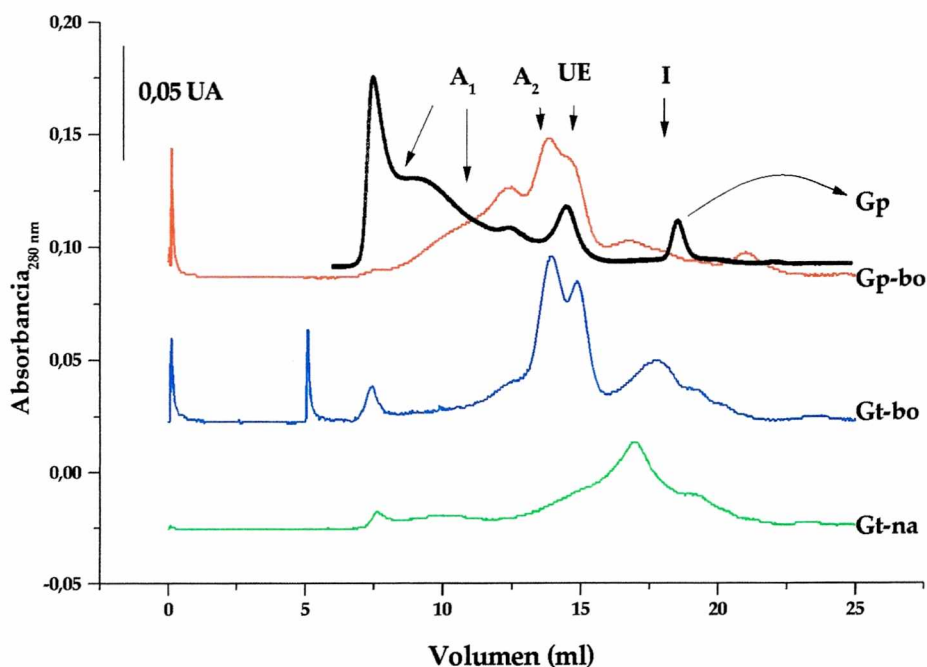


Figura I.7: FPLC en gel filtración. Perfiles de Gt-na, Gt-bo y Gp-bo, todas las fracciones fueron eluidas en buffer borato 0,1 M pH 10. Pico A₁: 30.000 a 600 kDa, A₂ agregados de baja MM: 600 kDa. Pico UE, moléculas estructurales de 300 kD. Pico I polipéptidos menores a 66

Para analizar con más detalle estas similitudes entre Gp y Gt-bo, se estudiaron las moléculas de glutelinas mediante FPLC de gel filtración.

Cromatografía de exclusión molecular

En la **Figura I.7** se presentan los cromatogramas de las glutelinas extraídas con los distintos solventes (Gt-bo y Gt-na) y la Gp-bo. En la la misma se incluye el perfil de elución de la fracción Gp (Martínez, 1997) que está integrada por especies proteicas agregadas de alta masa molecular (mayores a 600 kDa, zona A₁), una especie proteica cuya masa molecular es de 283 kDa (UE en la figura) que se denominó unidad estructural y en menor cantidad

moléculas de masas moleculares menores a 66 kDa (zona pico I). El mismo ensayo para la Gp-bo mostró una cantidad más reducida de agregados de alta masa molecular (componente A₁) y una cantidad mayor de agregados de menor masa molecular (pico A₂) y unidades estructurales (pico UE), lo cual nos está señalando un proceso de desagregación de la Gp como consecuencia del tratamiento alcalino. Por otro lado el perfil de Gt-bo prácticamente no muestra especies A₁ como la Gp, si tiene semejanzas con la Gp-bo debido a la presencia de las especies A₂ y UE. Con respecto al perfil de Gt-na se pudo observar que esta fracción estaba formada por moléculas de diferente tamaño la mayoría de las cuales eluyeron a volúmenes mayores que el pico UE. Estas especies moleculares también se encuentran presentes en la Gt-bo y en menor medida en la Gp-bo. Los resultados obtenidos nos están señalando que el tratamiento alcalino provoca la desagregación de la Gp y que la extracción de glutelina en un medio alcalino más drástico como lo fue el NaOH 0,1 N, provoca la disociación de la fracción glutelina de amaranto. Estos resultados concuerdan con los correspondientes a PAGE-nativo (**Figura I.5**), ambos sugieren que al extraer la fracción de glutelinas con NaOH 0,1 M la proteína se desnaturaliza disociándose sus polipéptidos.

Los estudios de PAGE nativo, FPLC y DSC mostrados anteriormente, reflejan que al extraer la fracción de glutelinas con NaOH 0,1 M la proteína está desnaturalizada, no así cuando se utiliza borato 0,1 M pH 10, condición en la que se logra observar cierto grado de estructura.

Homología inmunológica entre glutelina y globulina-P

ELISA directo

Para caracterizar con mayor profundidad la glutelina y estudiar su homología con la globulina-P, se realizaron estudios inmunoquímicos utilizando anticuerpos policlonales anti-Gp (Aphalo y col., 2004).

Los anticuerpos policlonales consisten en una mezcla heterogénea que puede reconocer un número de sitios de unión con los antígenos o epitopes. Un

epitope puede ser reconocido por su secuencia específica de aminoácidos o por la conformación que esta secuencia adopta en el espacio (Hopp, 1986; Harlow y Lane, 1988). Los primeros se denominan epitopes secuenciales, mientras que los segundos se denominan epitopes conformacionales. Para que exista reconocimiento antígeno/anticuerpo debe existir, además de un epitope y un paratope, región del anticuerpo involucrada en el reconocimiento del antígeno, un grado adecuado de exposición y accesibilidad al sitio reconocido. Los factores que aumentan la probabilidad de que un sitio antigénico se presente expuesto en la superficie son los mismos que afectan el plegamiento de las proteínas en general: grado de hidrofiliidad, movilidad y potencial para formar estructuras con giros- β o "loops"(Hopp, 1986). De lo expuesto se deduce que el reconocimiento de sitios reactivos, ya sea en las moléculas utilizadas para la inoculación o en otras diferentes, por anticuerpos generados a partir de un antígeno particular contiene información valiosa referente a aspectos estructurales.

Castellani (2000) y Aphalo y col. (2004) informaron la existencia de homología entre la Gp y la Gt en buffer fosfato pH 8,5 y buffer borato 0,1 M pH 10, por lo que es lógico suponer que se debería encontrar un grado de homología entre la globulina-P y la glutelina, en medio alcalino.

El nivel de afinidad inmunoquímica entre las fracciones proteicas Gt-bo, Gt-na y Gp (como control), que fueron incubadas en un medio alcalino, se analizó mediante un ensayo de ELISA directo. En la **Figura I.8** se muestran los resultados obtenidos, de acuerdo a ellos Gt-na presentó un título alrededor de 50 - 100 veces menor que el de Gp, en tanto que la reactividad de Gt-bo fue aproximadamente 3 veces menor que la de Gp. Esto nos sugirió que ambas preparaciones de glutelinas (Gt-bo y Gt-na) exponen diferentes superficies al unirse con el anticuerpo anti-Gp, lo cual está señalando diferencias en la superficie y/o la conformación de las moléculas de glutelinas cuando son extraídas con diferentes solventes.

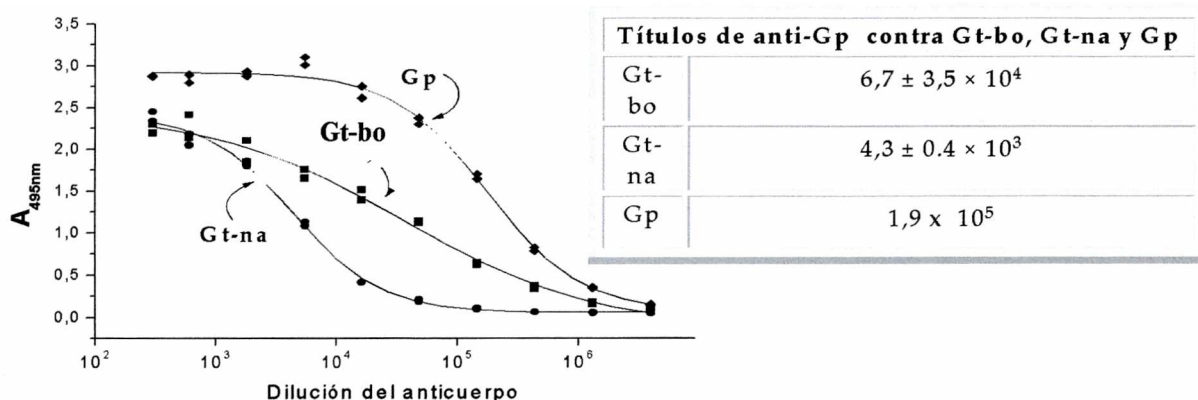


Figura I.8: ELISA directo. Curvas de titulación para anti-Gp con Gt-bo, Gt-na y Gp en buffer borato 0,1 M y pH 10, los títulos están señalados en la tabla anexa a la figura.

ELISA competitivo

Como cabe la posibilidad, que los resultados anteriores se deban a diferencias en la cantidad de proteína adsorbida en la placa y no a diferencias conformacionales, se estudió la reactividad de las proteínas en solución mediante un ELISA competitivo, mostrado en la Figura II.9. Estos resultados nos indican que los valores de las pendientes de los gráficos logit-p son muy similares lo cual señala que Gt-bo y Gt-na tenían similar afinidad por el anticuerpo anti-Gp.

Los resultados obtenidos mediante ELISA directo y competitivo, aparentemente son contradictorios ya que en el primer caso Gt-na y Gt-bo presentarían diferencias de reactividad inmunoquímica en tanto que en el segundo se comportan de manera similar. Por otro lado debemos considerar los resultados obtenidos con FPLC de exclusión molecular que mostraban que Gt-bo presentaba características conformacionales similares a Gp-bo y diferentes a Gt-na. Por esta razón se compararon las reactividades inmunoquímicas de las dos preparaciones de gluteninas con una preparación de Gp modificada por tratamiento con NaOH. En la **Tabla I.2**, se presenta el porcentaje de la reactividad cruzada contra el anticuerpo policlonal anti-Gp con las fracciones

proteicas de amaranto (el anticuerpo estaba diluido 1:105). Gp-na presenta una reactividad mucho menor que la Gp y también más baja que Gt-bo. Estos resultados están señalando que se producen cambios por el tratamiento alcalino de la Gp. La baja inmunoreactividad de la Gt podría ser consecuencia de cambios producidos en la estructura debidos a los tratamientos alcalinos.

Tabla I.2: Porcentaje de reactividad de anti-Gp con proteínas de amaranto (dilución anticuerpo 10⁻⁵)

Fracción proteica	% reactividad
Gp	100
Gt-bo	44
Gt-na	7
Gp-na	24

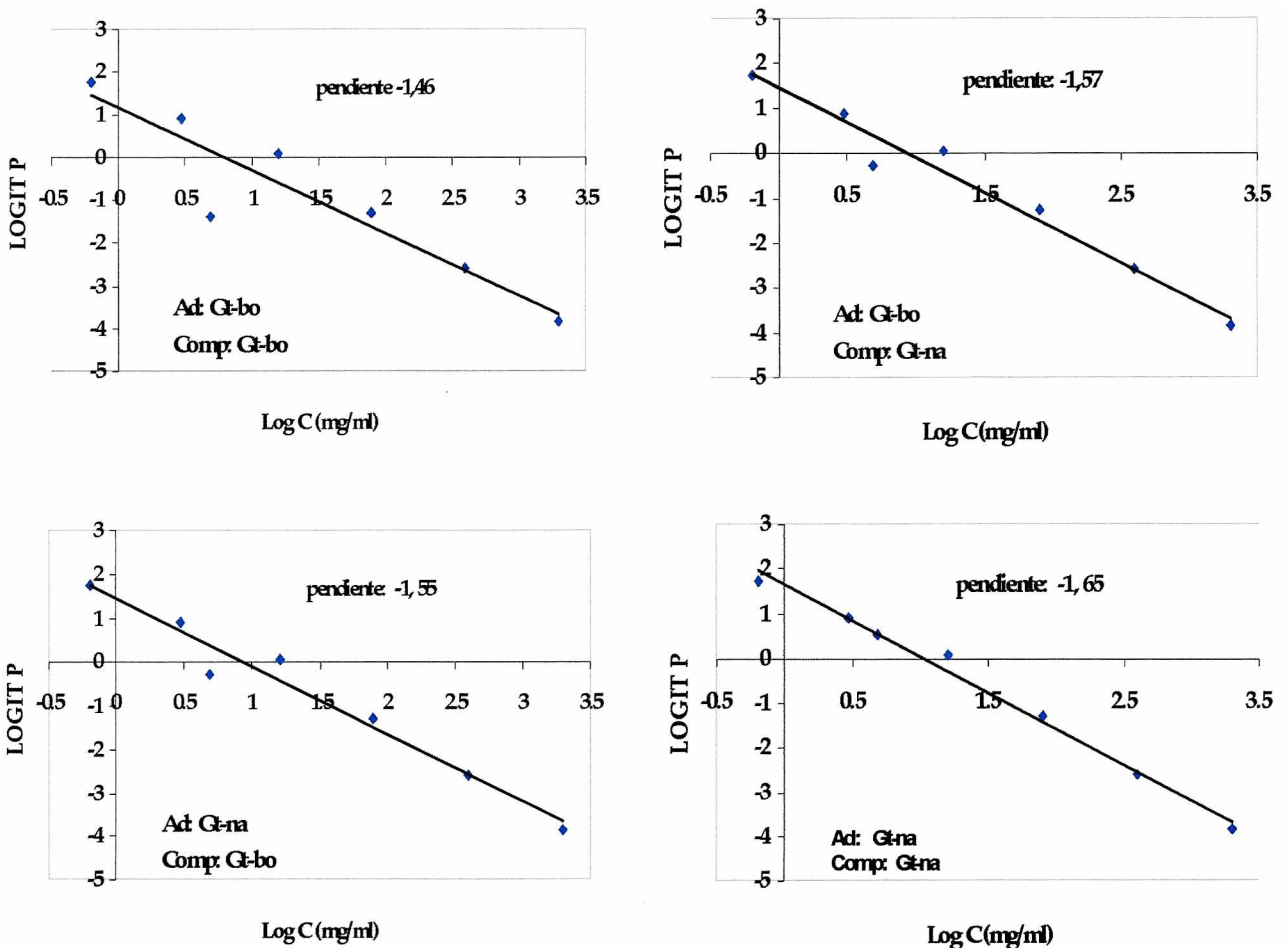


Figura I.9: Curvas Logit-P para anti-Gp en ELISA competitivo con Gt-na y Gt-bo. Ad: proteína adsorbida en la microplaca y Com: proteína incubada con el suero como competidor anti-G. El suero fue diluido 1: 10⁴

Hidrofobicidad superficial

La determinación de la hidrofobicidad superficial de una proteína es útil ya que permite obtener información de la estructura de la misma. Los cambios de la hidrofobicidad superficial o expuesta (Ho) dan idea de cambios en la conformación (Kato y col., 1984; Kinsella, 1979) y/o del estado de agregación-disociación de dichas proteínas (Gueguen, 1989).

La hidrofobicidad superficial es un parámetro que entrega información valiosa por estar relacionada con las propiedades funcionales que puede exhibir una proteína, especialmente con las propiedades funcionales de superficie (Tomotake y col., 2002; Gorinstein y col., 2001; Wagner y col., 2000; Townsend y Nakai, 1983).

Se estudió la hidrofobicidad superficial de las moléculas de glutelina extraídas con los dos solventes (Gt-bo y Gt-na) y se comparó su comportamiento con el de globulina-P y la globulina 11S, estas determinaciones se realizaron sobre las proteínas solubilizadas en buffer borato 0,1 M pH 10 debido a que en condiciones más cercanas a la neutralidad las glutelinas son muy poco solubles.

De acuerdo a los resultados de la **Tabla I.3**, Gt-bo, Gt-na y Gp; no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$) en los valores de hidrofobicidad

Tabla I.3: Hidrofobicidad superficial de las fracciones proteicas de amartanto analizadas en buffer borato

Fracción proteica	Hidrofobicidad superficial (IF / mg/ml) en buffer borato
Glutelina-bo	223 ^a ± 47
Glutelina-na	209 ^a ± 40
Globulina-P	226 ^a ± 3
Globulina 11S	112 ^b ± 2

superficial, los que a su vez son prácticamente el doble del correspondiente a globulinas ($p < 0,05$). Estos resultados no concuerdan con las observaciones

realizadas mediante DSC y FPLC ya que no reflejan las diferencias estructurales encontradas entre Gt-na y las fracciones Gt-bo y Gp. Por otro lado marcan una diferencia de sus características superficiales con las de las globulinas.

1.3.3. Propiedades funcionales de glutelinas

Solubilidad de la fracción Gt-bo en función de la fuerza iónica a pH 9

La solubilidad es una de las propiedades funcionales más importantes, dado que tiene una influencia directa sobre otras propiedades funcionales tales como capacidad de formación de espumas y emulsiones, gelificación, etc. Para que las proteínas puedan ser utilizadas como ingredientes o aditivos alimentarios en el desarrollo, formulación y producción de alimentos se requiere que tengan algún grado de solubilidad (Vojdani, 1996).

Como se mencionara anteriormente las glutelinas son proteínas muy poco solubles en soluciones acuosas neutras, sin embargo es posible solubilizarlas parcialmente a pHs extremos, aún cuando ya observamos que el tratamiento si es muy drástico hace que pierdan estructura. Se estudió el efecto de la fuerza iónica en la solubilidad de las glutelinas, para ello se trabajó a un pH alcalino de 9 y se varió la concentración de sal en el medio.

La **Figura I.10** muestra la solubilidad de Gt-bo dializada en función de la fuerza iónica de soluciones a pH 9. En ella se puede observar que la máxima

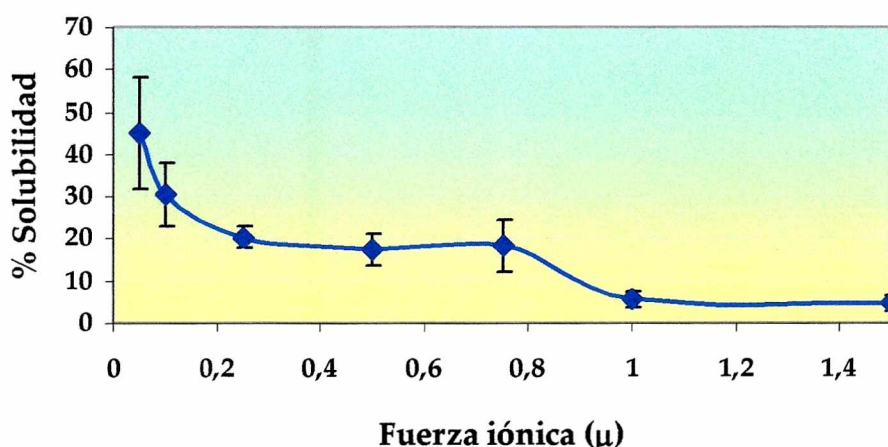


Figura I.10: Solubilidad de glutelina en función de la fuerza iónica, a pH constante = 9

solubilidad se logra a la fuerza iónica más baja ($\mu = 0,05$) alcanzando un valor de 50%. A medida que la fuerza iónica aumenta la solubilidad disminuye abruptamente hasta $\mu = 0,4$ valor a partir del cual se mantiene constante en un 20% hasta la fuerza iónica de $\mu = 0,8$, para después descender hasta un 6%.

De acuerdo a estos resultados el efecto de la fuerza iónica provoca un descenso de la solubilidad de la Gt-bo, siendo mayor su solubilidad a una fuerza iónica baja de $\mu = 0,05$. Este descenso en la solubilidad podría explicarse considerando que las fuerzas más importantes que intervienen en la agregación de las glutelinas, corresponden a las interacciones hidrofóbicas.

A los sobrenadantes obtenidos a diferentes fuerzas iónicas se les determinó el espectro de absorción entre 250 a 350 nm como se muestra en la **Figura I.11**. Dichos espectros muestran una disminución en la absorbancia que se corresponde con el descenso en la solubilidad. Es de destacar la modificación en los espectros correspondientes a las fuerzas iónicas mayores ($\mu = 1$ y 1,5) en los que se detectó un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores. Un

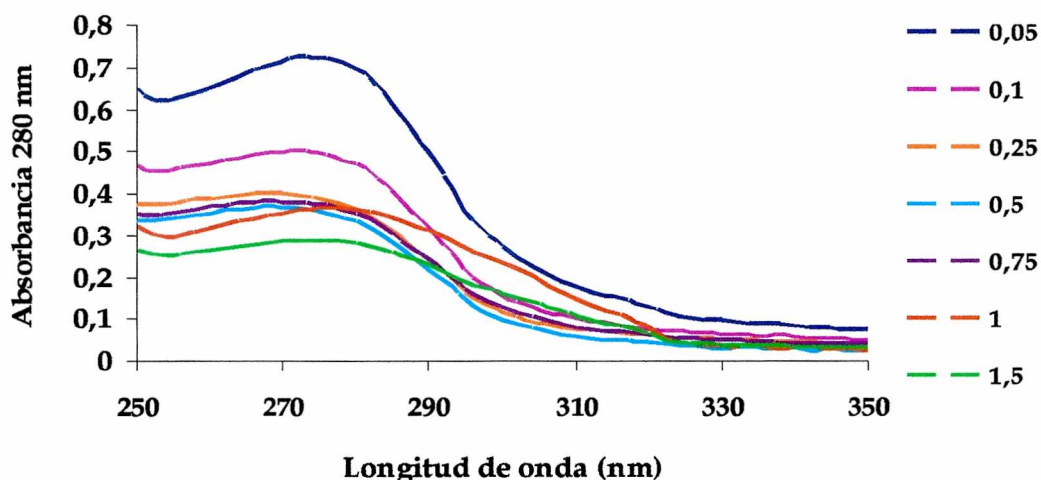


Figura I.11: Espectros de absorción de Gt-bo en función de la fuerza iónica a pH constante = 9

análisis cualitativo de este comportamiento sugiere que en esas condiciones han permanecido solubles proteínas de diferente naturaleza y/o conformación. La

modificación en los espectros coincidió con la disminución de la solubilidad entre las fuerzas iónicas $\mu = 0,75$ y $1,0$.

Capacidad de formar espumas

Las proteínas cuando están en solución o dispersas, poseen la característica de migrar a la interfase estabilizando el sistema ya que disminuyen la tensión superficial, para lo cual deben presentar buena hidrofobicidad superficial, cierta solubilidad y un alto grado de flexibilidad, de tal manera que exista una buena difusión hacia la interfase donde debe desdoblarse. Cuando una proteína entra en contacto con la superficie, los residuos hidrofóbicos de los aminoácidos se orientan hacia la fase no acuosa y la proteína se adsorbe espontáneamente formando una capa monomolecular en ella, la cual puede ser resistente, cohesiva y elástica (Damodaran, 1997).

Las proteínas son las principales responsables de esta propiedad ya que forman una barrera protectora entre las burbujas de gas atrapadas. El volumen y estabilidad de la espuma aumentan con el aumento de la concentración proteica.

Al estudiar las propiedades espumantes de las proteínas es necesario distinguir entre la capacidad de formación de espuma y la estabilidad que presenten. Dentro de los procesos dinámicos de formación de espuma se encuentran el batido o agitación y el burbujeo de un gas inerte a través de la dispersión de proteínas. Entre los factores que afectan la estabilidad y formación de la espuma se pueden mencionar: la concentración proteica, el pH, la presencia de sales, temperatura, condiciones de formación de la espuma.

Se determinó la capacidad de formar espumas (CE) de la fracción Gt-bo en buffer borato pH 10, en la **Tabla I.4** se presentan los parámetros calculados y en ella se incluyen los correspondientes a espumas formadas con proteínas de soja en buffer fosfato 0,1 M pH 8,0 (Molina y Añón, 2000) y seroalbúmina bovina, las condiciones de medida son similares a las descritas en el punto 1.2.11. De acuerdo a estos resultados, la glutelina de amaranto presentó una

buena capacidad de formar espuma ya que la velocidad de formación (v_i) como el volumen máximo alcanzado ($V_{m\acute{a}x}$), tienen valores comparables a soja y a seroalbúmina bovina que poseen buena actividad espumante. Por otro lado, la espuma formada por la glutelina no parece ser muy estable ya que su tiempo de vida media ($t_{1/2}$) es menor que el de la espuma formada por el aislado de soja nativo (Molina y Wagner, 2002) y el de seroalbúmina bovina. Esto también se ve reflejado en los valores de la constante K inversamente proporcional a la estabilidad de la espuma.

Tabla I.4: Parámetros de capacidad y estabilidad de espuma de Gt-bo

Muestra	v_i (ml/s)	V_{max} (ml)	V_f (ml)	$t_{1/2}$ (s)	K ($s^{-1} \cdot ml^{-1}$)
Gt-bo	$0,170 \pm 0,001$	$5,10 \pm 0,04$	$4,02 \pm 0,20$	$51,0 \pm 2,2$	$0,007 \pm 0,001$
BSA (Molina y Wagner, 2002)	$0,150 \pm 0,03$	$5,54 \pm 0,04$		$87,0 \pm 4,0$	0,00207
Soja (Molina y Añón, 2000)	0,2	4,2	4,2	58,0	0,0041

1.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La glutelina de amaranto es similar a la glutelina de arroz, es una proteína del tipo legumina que, debido a su estado de agregación en las semillas, sólo puede ser extraída de la harina usando pHs extremos o condiciones desnaturizantes. Esta sería una razón por la cual las glutelinas de amaranto presenten escaso grado de estructura (Chrastil y Zarins, 1992; Abe y col., 1996; Martinez y col., 1997). En el presente estudio nosotros extrajimos glutelinas de amaranto usando condiciones más suaves de extracción (borato pH 10) (Gt-bo), con el propósito de preservar el grado de estructura que pudieran tener en la semilla. Estas condiciones llevaron a un bajo rendimiento de extracción, menor que cuando se las extrajo con NaOH 0,1 N (Gt-na).

La fracción Gt-na estaba compuesta de moléculas desnaturizadas y disociadas. Por otro lado Gt-bo contenía moléculas más plegadas, que por sus tamaños, composición polipeptídica, estabilidad térmica y entalpía de

desnaturalización fueron similares a Gp cuando ésta ha sido sometida a un tratamiento alcalino con buffer borato pH 10. Estos resultados sugieren que las moléculas de Gt de amaranto pueden ser similares a las leguminas, hexaméricas de aproximadamente 300 kDa. Esta fracción proteica podría permanecer en la semilla en forma más agregada que las otras fracciones de modo tal que su extracción sólo sería posible mediante solventes acuosos de pHs extremos. Esto también puede ser similar para las glutelinas de arroz. Estas proteínas consistían en polipéptidos disociados cuando eran extraídas en condiciones similares a las glutelinas de amaranto (NaOH 0,1 N) y mostraban algún grado de plegamiento cuando eran extraídas en condiciones más suaves (Tecson y col, 1971; Ju y col., 2001).

Por otro lado se encontraron diferencias a nivel inmunoquímico entre las glutelinas extraídas con buffer borato (Gt-bo) y la globulina-P tratada en iguales condiciones (Gp-bo). Estas diferencias podrían deberse a diferencias a nivel de estructura primaria.

En relación a las propiedades funcionales, se puede decir que la solubilidad de Gt-bo en buffer borato pH 9 no superó el 50 %. Al relacionar esta propiedad con los espectros UV, se observaron diferencias a fuerzas iónicas muy altas que sugirieron cambios estructurales importantes inducidos por estas condiciones. Estos cambios serían los responsables de la reducción de la solubilidad. Por otra parte Gt-bo presentó una buena capacidad de formar espumas, aunque no para estabilizarlas, lo cual nos sugiere que estas proteínas contribuirían en la primera fase del espumado en un aislado de amaranto.

Habiéndose mostrado la influencia de los solventes de extracción sobre el rendimiento y las propiedades fisicoquímicas de las glutelinas de amaranto, y el sondeo de algunas propiedades funcionales, nos da una base de las características que tendrán los aislados proteicos enriquecidos en esta fracción proteica. Estos aislados pueden presentar diferentes propiedades funcionales y ser propuestos como ingredientes para diferentes alimentos.



CAPÍTULO 2

*AISLADOS PROTEICOS DE AMARANTO: Influencia
del pH, la fuerza iónica y la temperatura en su
estructura*

2.1. INTRODUCCIÓN

Las proteínas de amaranto poseen alta calidad nutricional pudiendo ser incluidas como ingrediente en la industria alimentaria para lo cual deben poseer propiedades funcionales adecuadas para un fin tecnológico. La obtención de aislados proteicos enriquecidos en diferentes fracciones permite diversificar los usos tecnológicos de las proteínas de amaranto. La proporción de las diferentes fracciones que contenga el aislado va a definir el tipo de propiedades funcionales que pueda tener. Como se mencionara en la introducción se han propuesto diversas alternativas de preparación de aislados de amaranto, conteniendo distintas proporciones de sus fracciones proteicas (Paredes-López y col., 1988, Martínez y Añón, 1996; Fidantsi y Doxastakis, 2001). De los aislados preparados en nuestro laboratorio hemos elegido aquellos extraídos a pH 9 (A9), a pH 11 (A11) y entre pHs 9 y 11 (A9-11). El aislado A9 contiene albúminas, globulinas y globulinas-P las cuales se encuentran plegadas en una conformación cercana a la nativa; el aislado A11 posee albúminas, globulinas, globulina-P y glutelinas parcialmente desnaturalizadas. Finalmente el aislado A9-11 está principalmente compuesto por glutelinas desnaturalizadas (Martínez y Añón, 1996).

Dada la influencia de la fuerza iónica y el pH sobre la estructura de las proteínas y por ende sobre su funcionalidad resulta conveniente estudiar el efecto de estos factores sobre los aislados proteicos para su futura aplicación en alimentos

Como análisis previo al estudio funcional de estos aislados se completó la caracterización estructural iniciada por Martínez (1997) y se estudiaron los cambios estructurales promovidos por cambios en el entorno, variación de pH y fuerza iónica. Se analizaron también los cambios promovidos por tratamientos térmicos.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Obtención de aislados proteicos

Se obtuvieron tres aislados proteicos a partir de harina desgrasada, los que fueron denominados de acuerdo al pH de solubilización. Los aislados preparados fueron A9, A9-11 y A11, su preparación se esquematiza en la **Figura II.1** y se detalla a continuación. Para la obtención de estos aislados se siguió la metodología descrita por Martínez (1997). Se usó una proporción de 1/10 (p/v) de harina y agua destilada a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 9 o pH 11 con NaOH 2N. La dispersión así obtenida se mantuvo con agitación constante luego que se ajustó el pH, durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 9.000 x g por 30 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se precipitó a pH 5,0 con HCl y se centrifugó a 9.000 x g a 4 °C por 30 min, el precipitado así obtenido se suspendió en agua destilada, se llevó a pH 7 y posteriormente fue liofilizado, resultando así los aislados A9 y A11. Luego de la solubilización de la harina a pH 9, el residuo que quedó después de la separación del sobrenadante (A9), se resuspendió en agua destilada (1/10, p/v), se ajustó el pH a 11 y se mantuvo con agitación constante por 30 min, posteriormente se procedió de la forma ya descrita obteniéndose el aislado A9-11.

2.2.2. Modificación de los aislados por efecto del pH

Los aislado A9, A11 y A9-11 obtenidos como se describió anteriormente, fueron suspendidos en agua destilada en proporción aislado/agua = 1/10 (p/v) y se llevaron a pH 3, 5, 7, 9 y 10 con HCl o NaOH, manteniendo cada pH con agitación durante 15 min. Posteriormente se centrifugaron a 9000 x g por 30 min a 15°C, se descartó el sobrenadante y el insoluble fue liofilizado. Para los aislados tratados a pH 9 y 10 además de la preparación ya señalada, luego de la suspensión a cada pH, se liofilizaron juntas la fracción insoluble (I) y la soluble (S).

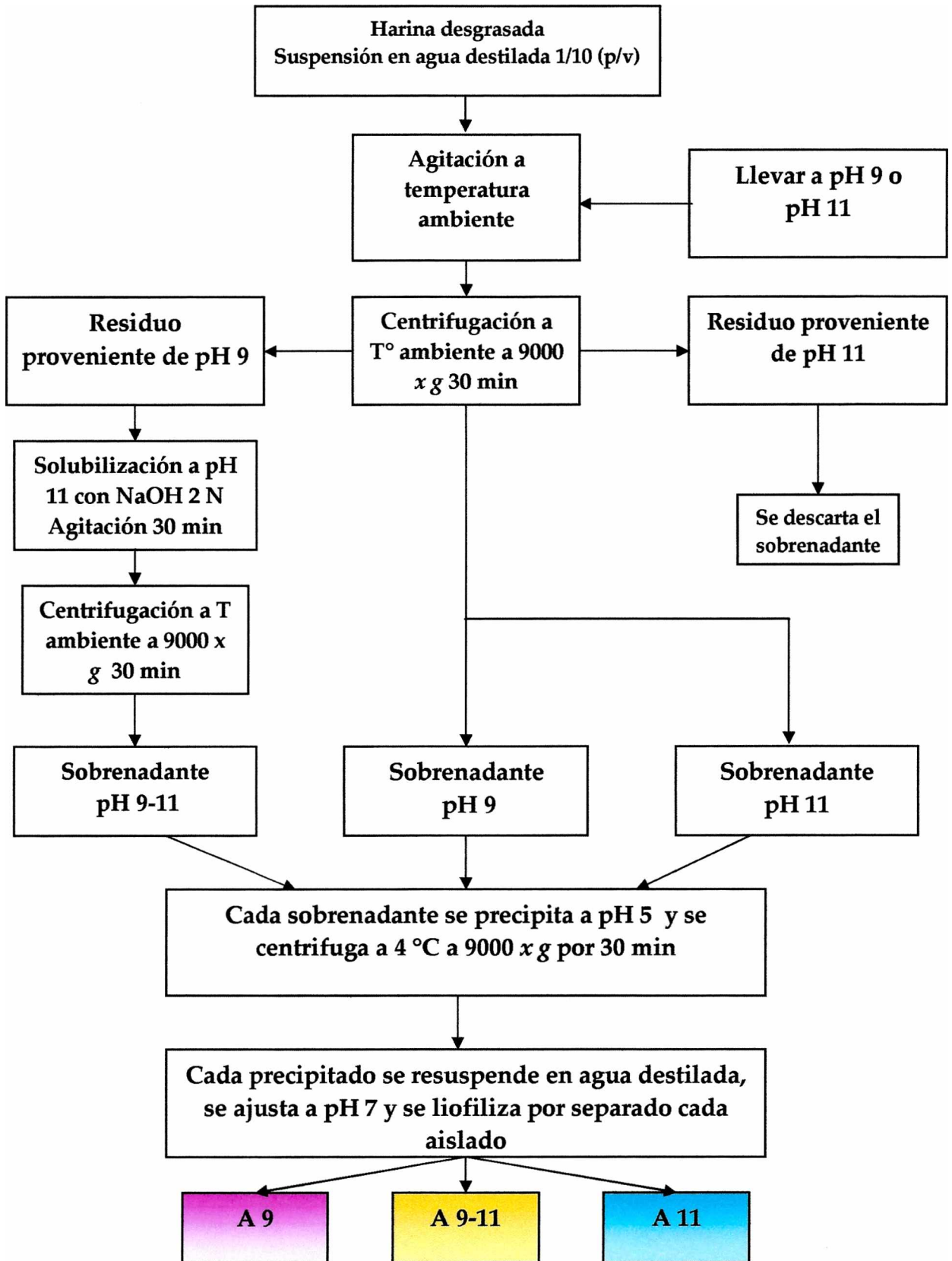


Figura II.1: Preparación de aislados proteicos de amaranto: A9, A9-11 y A11

2.2.3. Tratamiento de los aislados por diálisis

Para el análisis de la influencia de la fuerza iónica se suspendieron los aislados A9, A9-11 y A11 en agua destilada y se dializaron contra agua destilada a 0 °C con agitación constante. Para la diálisis se empleó una membrana con un valor de corte de 10 kDa (Sigma). Posteriormente los aislados ya dializados fueron liofilizados nuevamente.

2.2.4. Modificación de los aislados por efecto de la temperatura

Los aislado A9, A11 y A9-11 fueron suspendidos en agua destilada en una relación de 1/10 (p/v), fueron calentados a 60 °C, 80 °C y 90 °C en un baño termorregulado, y una vez que alcanzaron la temperatura deseada se mantuvieron a esa temperatura por 15 min, la temperatura de la dispersión se determinó introduciendo un termómetro de mercurio en su interior. Posteriormente fueron centrifugados a 9000 x g por 30 min a 15 °C. El sobrenadante fue descartado y el residuo fue liofilizado.

2.2.5. Determinación de proteínas

Las determinaciones de proteínas solubles se llevaron a cabo de la forma como se describiera en el punto 1.2.3.

2.2.6. Electroforesis

Para la caracterización de los polipéptidos por electroforesis se prepararon geles en gradiente 6-12% de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, se siguió la metodología descrita en el punto 1.2.4 del capítulo anterior.

2.2.7. Soluciones buffers empleadas en este estudio

Los buffers empleados para el estudio de la influencia del pH fueron los siguientes:

pH 2,3	: C ₆ H ₈ O ₇ 0,17 M; C ₆ H ₇ O ₇ ⁻ 0,03 M; NaCl 0,436 M
pH 3,1	: C ₆ H ₈ O ₇ 0,08 M; C ₆ H ₇ O ₇ ⁻ 0,12 M; NaCl 0,44 M
pH 4,1	: C ₆ H ₈ O ₇ 0,015 M; C ₆ H ₇ O ₇ ⁻ 0,15 M; C ₆ H ₆ O ₇ ⁼ 0,035 M; NaCl 0,28 M
pH 5,1	: C ₆ H ₇ O ₇ ⁻ 0,06 M; C ₆ H ₆ O ₇ ⁼ 0,14 M; NaCl 0,09 M

pH 6	: H_2PO_4^- 0,18 M; HPO_4^- 0,02 M; NaCl 0,304 M
pH 7	: HPO_4^- 0,2 M; NaOH 0,0336 M; NaCl 0,188 M
pH 8	: HPO_4^- 0,2 M; NaOH 0,0336 M 0,17 M; NaCl 0,172 M
pH 8,5	: K_2HPO_4 0,0333 M; KH_2PO_4 0,0017 M, (buffer B)
pH 8,8	: H_2BO_3^- 0,132 M; H_1BO_3^- 0,068 M; NaCl 0,42 M
pH 9	: H_2BO_3^- 0,046 M; H_1BO_3^- 0,154 M; NaCl 0,42 M
pH 10	: HCO_3^- 0,128 M; CO_3^- 0,072 M; NaCl 0,196 M
pH 11	: HCO_3^- 0,03 M; CO_3^- 0,17 M

Los diferentes buffers fueron llevados a fuerza iónica 0,54 por adición del NaCl indicado.

Los buffers empleados para el análisis de la influencia de la fuerza iónica fueron buffer borato a pH constante = 9 llevados a las fuerzas iónicas de: 0,005; 0,01; 0,03; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 y 2,0 por adición de NaCl (s).

2.2.8. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los análisis de las muestras se realizaron en un calorímetro Polymer Laboratories (Rheometric Scientific Ltd., U.K.), se siguió la técnica ya descrita en el punto 1.2.5.

2.2.9. Cromatografía rápida de proteínas en medio líquido (FPLC): Cromatografía de exclusión molecular

Las determinaciones realizadas por cromatografía de gel filtración se llevaron a cabo como se señala en el punto 1.2.6.

2.2.10. Hidrofobicidad superficial

La hidrofobicidad superficial de los aislados fue realizada con la sonda ANS, tal como se describiera en el punto 1.2.9.

2.2.11. Espectroscopía de fluorescencia

Se preparó una suspensión de cada aislado alrededor de 1 mg/ml, en diferentes condiciones de pH: 3, 5, 7, 9, 10 ajustados con NaOH o HCl y buffer B, dichas suspensiones se agitaron a temperatura ambiente durante 30 min, posteriormente se centrifugaron a $13.500 \times g$ a 15 °C. Posteriormente, en el sobrenadante se determinó la absorción a 280 nm, la lectura así obtenida

corresponde a la concentración en mg/ml, por lo que se procedió a llevar cada muestra a la concentración de 0,02 mg/ml, completando su volumen con la solución correspondiente. La fluorescencia se midió en cada sobrenadante excitando a 270 y 290 nm y obteniendo el espectro de emisión en el rango de 310 a 500 nm a una velocidad de barrido de 300 nm/min. El equipo utilizado fue marca Perkin Elmer LS 50B.

Los espectros de fluorescencia fueron cuantificados por el centro de masa espectral o promedio pesado de emisión de energía (Lima y col., 2004; Vidugiris y Royer, 1998), de acuerdo a la ecuación:

$$vg = \frac{\sum(vi \cdot Fi)}{\sum Fi}$$

Donde:

v g: centro de masa espectral o promedio pesado de emisión de energía

Fi: intensidad de fluorescencia a una determinada longitud de onda v i

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Caracterización de los aislados proteicos de amaranto

Antes de iniciar el estudio de la influencia del pH, la fuerza iónica y la temperatura sobre los A9, A11 y A9-11, se caracterizaron los aislados sin modificar, como se detalla a continuación.

Composición centesimal de los aislados

Como se puede ver en la **Tabla II.1**, la composición proteicas de los aislados A9 y A11 fue similar, presentando un menor contenido proteico el A9-11. Los valores del contenido de proteínas encontrados en base seca fueron para el A9 84,4 %, para el A11 82,2 % y para el A9-11 72,7 %. Por otra parte el contenido de humedad dio valores bajos, que le confieren estabilidad en el tiempo a las proteínas. Si bien el contenido de proteínas es alto, es menor en

relación a lo informado por Martínez (1997) y superior al descrito por Fidantsi y Doxastakis (2001).

Tabla II.1: Composición centesimal de los aislados proteicos de amaranto

% (b.h.)	A 9	A 9-11	A 11
Proteínas	75,1 ± 4,9	65,4 ± 2,3	74,8 ± 5,5
Humedad	11,0 ± 0,2	10,0 ± 0,2	9,0 ± 0,1
Cenizas	2,3 ± 0,0	1,5 ± 0,0	1,4 ± 0,0
Hidratos de carbono*	11,6	23,1	14,8

b.h.: base húmeda

* Hidratos de carbono calculados por diferencia

Composición polipeptídica de los aislados de amaranto

Los resultados del análisis de la composición polipeptídica de estos aislados mediante PAGE-SDS se muestran en la **Figura II.2**. En los perfiles en condiciones reductoras (**Figura II.2 a**, con 2-ME) se destacan los polipéptidos de 56,7 (P_{56}), 37; 33 (A) y 21 (B) kDa, pertenecientes a globulinas 11S, globulinas-P y glutelinas, y polipéptidos de masa molecular menor a 20 kDa correspondientes

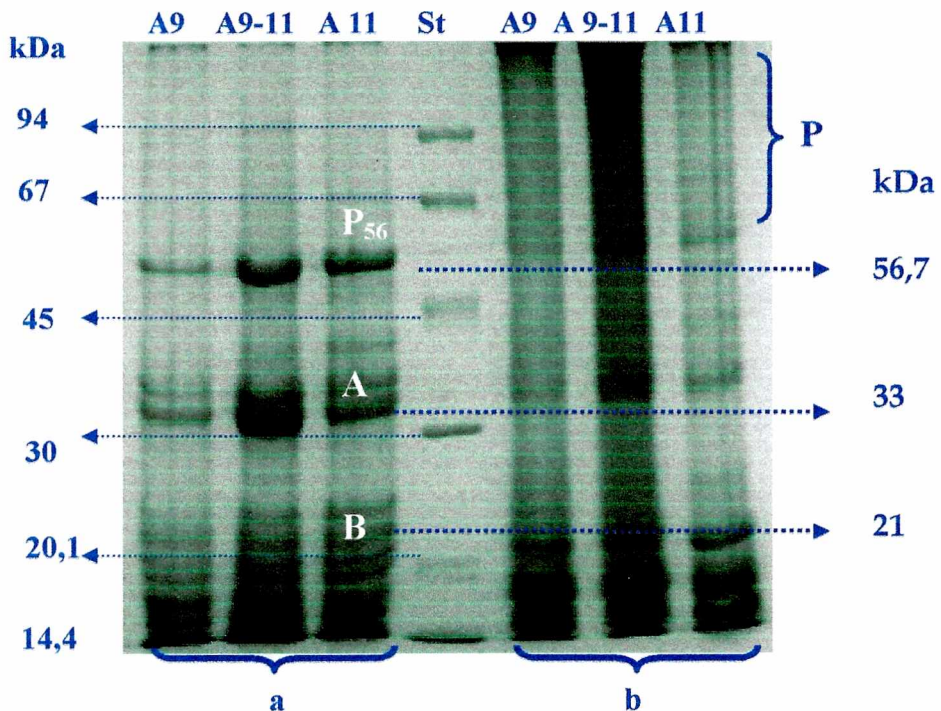


Figura II 2: Electroforesis PAGE-SDS: a) con y b) sin 2-ME, de los A9, A9-11 y A11

a la fracción albúminas. En los perfiles sin 2-ME están presentes polipéptidos agregados de alta masa molecular (P en la **Figura II.2b**) mayoritarios en el aislado A9-11. Los perfiles de los tres aislados concuerdan con una descripción anterior hecha por Martínez y Añón (1996).

Cromatografía de exclusión molecular

Se completó la caracterización de los aislados mediante cromatografía de exclusión molecular. Las proteínas se disolvieron en buffer B por ser éste el solvente en el que presenta mayor solubilidad una de las fracciones con mayor grado de agregación, como es la Globulina-P (Castellani, 2000). En la **Figura II.3** se presentan los resultados obtenidos, en ella se observan los perfiles con 3 picos importantes marcados como I, II y III, la zona I corresponde a una masa molecular de aproximadamente 300 kDa (correspondiente a las moléculas monoméricas), y las zonas II y III a especies de menor masa molecular. El perfil del A9 además de presentar moléculas en estas tres zonas contenía especies de alta masa molecular (A en la figura) correspondientes a los agregados solubles

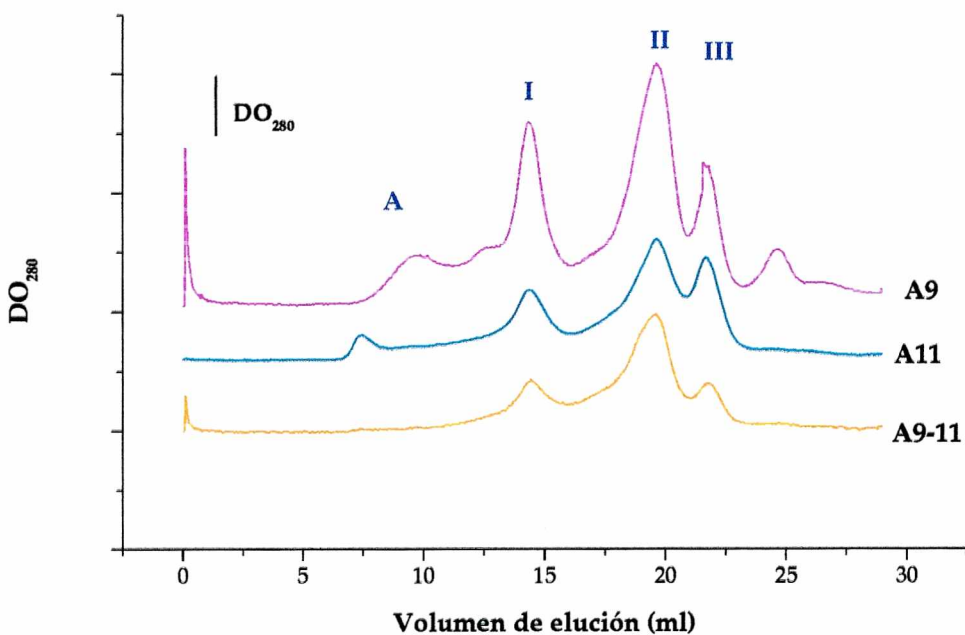


Figura II.3: cromatografías de exclusión molecular de los aislados, A9, A11 y A9-11 en buffer B

de la globulina-P. Las moléculas de la zona I corresponden a las unidades hexaméricas de globulina-P y globulina 11S, que en este aislado constituyen un 23,5 %. En las zonas II y III se encuentran las especies proteicas de albúminas y globulinas de menor tamaño constituyendo el 55,9 % del A9. El A11, presentó muy escasa proporción de agregados de globulina-P, este aislado estaba constituido en un 65 % por especies II y III, lo que está mostrando, en relación al A9, que contenía especies más desnaturalizadas. Además de globulinas y albúminas contendría moléculas de glutelinas las cual se habrían extraído en el tratamiento de la harina a pH 11. El A9-11, cuya composición debería ser predominantemente glutelinas mostró una ausencia de los agregados de globulina-P y un predominio de moléculas de baja masa molecular (77 %), además de moléculas de 280 kDa en un 23 %. Las glutelinas tal como se indicó anteriormente, deberían ser las proteínas predominantes en el aislado A9-11 sin embargo ellas son muy poco solubles en buffer B, buffer de corrida, por lo cual es probable que las especies moleculares de 280 kDa correspondan a globulinas que no hayan sido totalmente extraídas en el paso anterior.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC) para los aislados A9, A11 y A9-11

La **Figura II.4** muestra los termogramas de los aislados, en ellos se puede observar que el A9 es el que mostró claramente dos transiciones térmicas con temperaturas de desnaturalización $T_d = 65,8 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ y $98 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, siendo esta última endoterma la de mayor área lo que sugiere una predominancia de especies más termoestables. Por otro lado el A11 mostró una pequeña endoterma a baja temperatura ($T_d = 66,6 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$) y otra endoterma mucho menos definida en la zona de 95 a 110 $^\circ\text{C}$. Finalmente el A9-11 no presentó ninguna endoterma indicando que las especies moleculares que lo componen estaban desnaturalizadas. La entalpía de desnaturalización que presentó el A9 fue $\Delta H = 4,4 \pm 0,9 \text{ J/g}$ y el A11 $\Delta H = 2,3 \pm 0,7 \text{ J/g}$, estos resultados nos señalan que

las proteínas del A9 se encuentran más plegadas y poseerían una conformación cercana a la nativa a diferencia del A11 conteniendo moléculas más desplegadas. Los termogramas encontrados concuerdan con lo descrito por Martínez y Añón (1996).

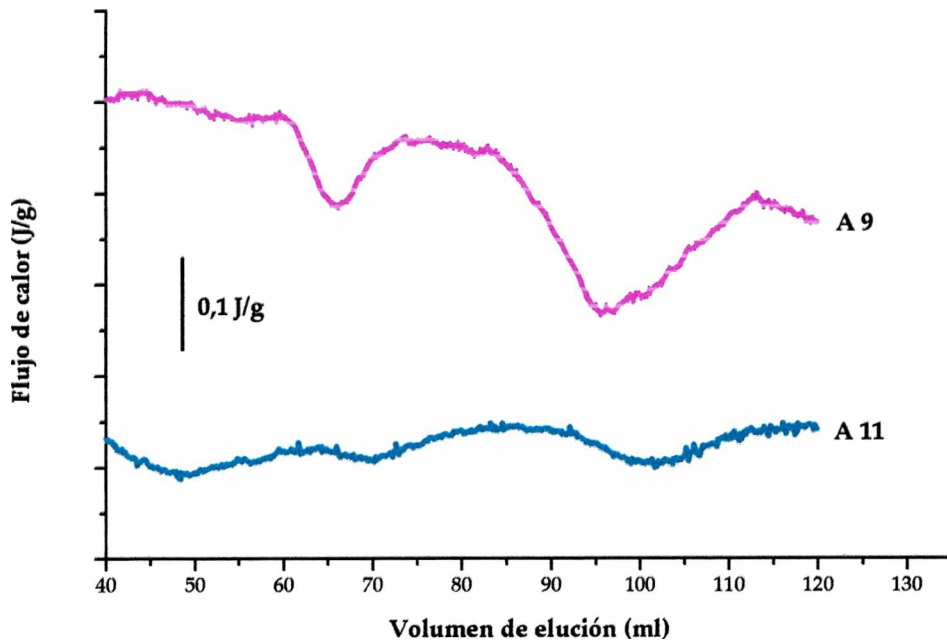


Figura II.4: Termogramas (DSC) de los aislados A9 y A11, en una suspensión al 20% en agua

Todos los resultados anteriores confirman la composición de los aislados A9, A11 y A9-11 informados por Martínez y Añón (1996) y sugieren que en el aislado A11 el efecto desnaturalizante del tratamiento alcalino ha provocado la insolubilización en buffer B de gran parte de las globulinas y globulina-P. Con composición y características estructurales diferentes los tres aislados podrían presentar propiedades funcionales diferentes.

2.3.2. Influencia del pH en la estructura del A9, A9-11 y A11

Como comienzo del estudio de la influencia de las condiciones del medio sobre la estructura y posteriormente la funcionalidad de estos aislados, se analizó el efecto del pH sobre las características estructurales de los aislados. Se estudiaron los cambios estructurales de las proteínas solubles a distintos pH mediante cromatografía de exclusión molecular, espectroscopia de

fluorescencia y determinación de hidrofobicidad superficial. El total de proteínas, solubles e insolubles, se analizaron mediante DSC.

a) Análisis de las fracciones solubles de A9, A11 y A9-11

Se exploró el tamaño de las especies moleculares que integran la fracción soluble de los aislados a los distintos pHs *mediante cromatografía de gel filtración*. En la **Figura II.5** se pueden observar los resultados obtenidos con el A9 a los pHs 3, 5, 7, 9 y 10. De acuerdo al perfil de pH 7 los agregados de la globulina-P (A en la figura) están prácticamente ausentes y las moléculas

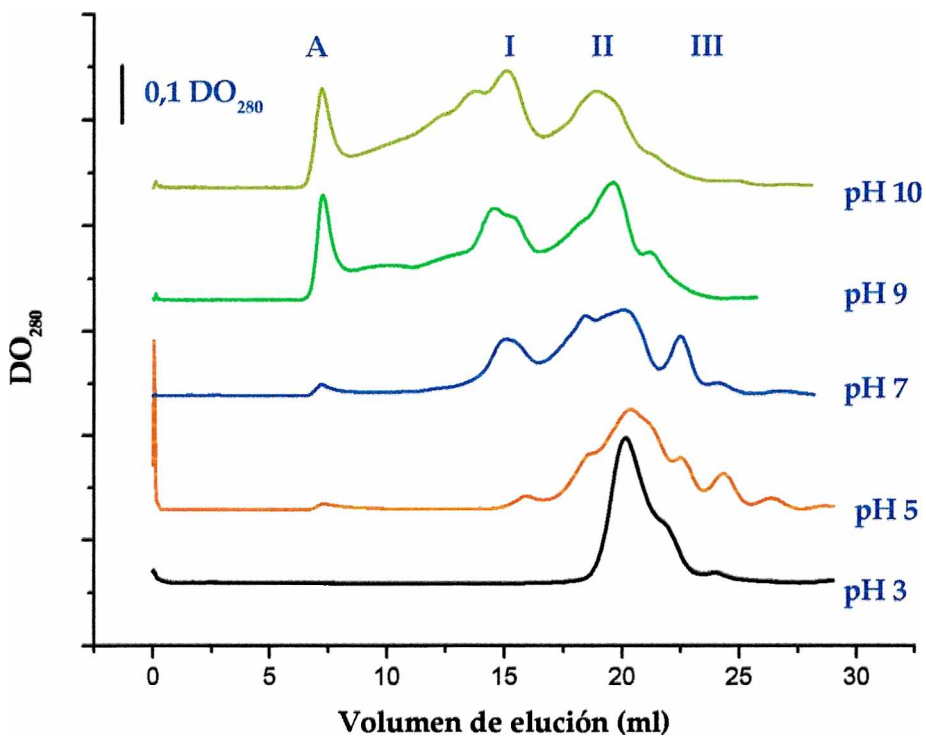


Figura II.5: Cromatografía de exclusión molecular del A9 en función del pH, a fuerza iónica constante = 0,5

hexaméricas de globulina-P y globulina 11S sólo están presentes en un 23%, predominando especies de menor masa molecular que probablemente correspondan a globulinas y albúminas. Este comportamiento se debería a la baja solubilidad de las globulinas a la alta fuerza iónica de los buffers empleados ($\mu = 0,5$). A medida que el pH se hace más ácido, predominan las

moléculas de bajo peso molecular. A pH 5 prácticamente no hay moléculas de 280 kDa (zona I), probablemente porque este pH es cercano al pI de las globulinas, predominando especies de menor masa molecular. A pH 3 se observan moléculas de pequeño tamaño molecular, probablemente polipéptidos disociados en su gran mayoría (zona II y III), debido a que a este pH las proteínas se encuentran desnaturalizadas y disociadas.

El perfil a pH 9 presenta un pico más pronunciado que en el pH 7 de agregados de alta masa molecular (A), los cuales provienen de la solubilización de moléculas de la globulina-P, que son más solubles a pH alcalino. Hay que tener en cuenta que la fuerza iónica de estos buffers fue de 0,5, superior a la del buffer B en el que los aislados presentan mayor proporción de agregados de globulina-P. Además se observa en la zona I junto con las moléculas unitarias, un pico que correspondería a subunidades provenientes de su disociación (indicadas con una flecha). A pH 10 se observa que el efecto de la alcalinización provoca un aumento de los agregados de alta masa molecular (A) y de las subunidades disociadas, como ya lo describiera Castellani y col. (1998) para la globulina -P.

Los resultados anteriores indican que los pHs ácidos provocan una insolubilización y/o disociación de las moléculas mientras que la alcalinización provoca una solubilización de los agregados insolubles y una disociación parcial de las moléculas de globulina.

Los resultados de gel filtración del A11, se muestran en la **Figura II.6**. De acuerdo a ellos este aislado presenta un comportamiento similar al encontrado para el A9. A pH 7, predominan las moléculas de bajo peso molecular, pertenecientes a albúminas, hay un incremento de las moléculas de mayor masa pertenecientes a Gp y G11s a pHs alcalinos y una desaparición de las mismas a pHs ácidos. El perfil de A11 es muy similar al mostrado por A9, con escasas moléculas de agregados de globulina-P y globulina 11S, debido a la insolubilización por la fuerza iónica y desnaturalización, provocada por las

condiciones de extracción de este aislado. Este aislado contiene un alto porcentaje (70%) de especies de masas moleculares bajas. Para los pH 5 y 3 se encuentran mayoritariamente especies moleculares disociadas en la zona III. Observando los perfiles del A11 a pHs alcalinos se puede apreciar que, al igual que con el aislado A9, hay un incremento de especies de alta masa molecular y

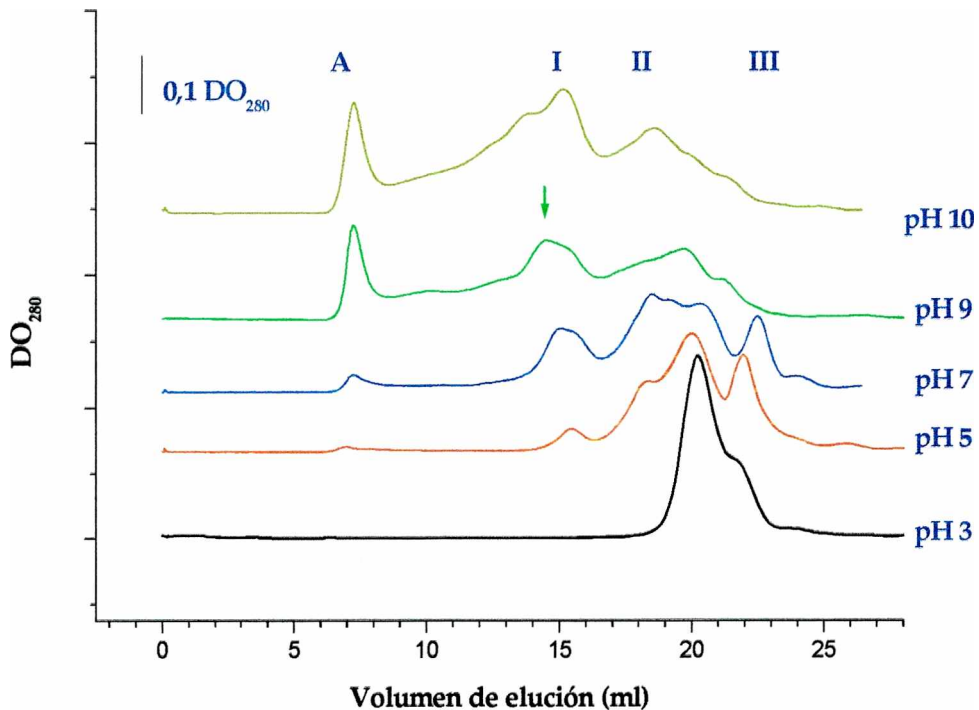


Figura II.6: Cromatografía de exclusión molecular del A11 en función del pH, a fuerza iónica constante = 0,5

disociación parcial de moléculas hexaméricas.

La gran similitud entre los perfiles del A11 y A9 a distintos pHs, sugiere que las especies solubles a los pHs estudiados serían prácticamente las mismas con lo cual la proteína extraída a pH 11 se encontraría mayoritariamente en el insoluble.

Para el aislado A9-11 no se analizaron sus perfiles, dado que el perfil en buffer B presentaba polipéptidos disociados sería esperable, de acuerdo a los resultados A9 y A11, que a pHs extremos se obtuvieran perfiles similares.

Como otra forma de estudiar la conformación de las distintas proteínas que se encuentran solubles a los distintos pHs, se analizaron las características de superficie de las moléculas mediante la determinación de la *hidrofobicidad superficial, Ho*, utilizando la sonda fluorescente ANS (ítem 1.2.9)

En la **Figura II.7** se muestra la hidrofobicidad superficial de los tres aislados a los pHs 4, 7 y 9. A pH 4 los tres aislados muestran una Ho baja, esto se puede atribuir a que las especies proteicas presentes, diferentes a las que se encuentran a pH 7, exponen menor cantidad de grupos hidrofóbicos en su superficie. La hidrofobicidad superficial aumenta con el incremento del pH lo cual podría deberse a un desplegamiento parcial de las especies presentes y a su vez a una disociación de las proteínas como se ha podido visualizar en las cromatografías de gel filtración. Igualmente se observa en la **Figura II.7** que el A9-11, presenta valores menores de Ho ($p < 0,05$) en relación al A9 y al A11, dado que posee diferentes especies proteicas que presentan diferentes Ho. El A11 presenta notoriamente, una mayor Ho en la zona de pH 9, que podría deberse a un mayor grado de desplegamiento de las especies moleculares que lo componen, lo cual concuerda con los resultados de la cromatografía de exclusión molecular.

Es de notar que los aislados A9 y A11, presentan valores diferentes de

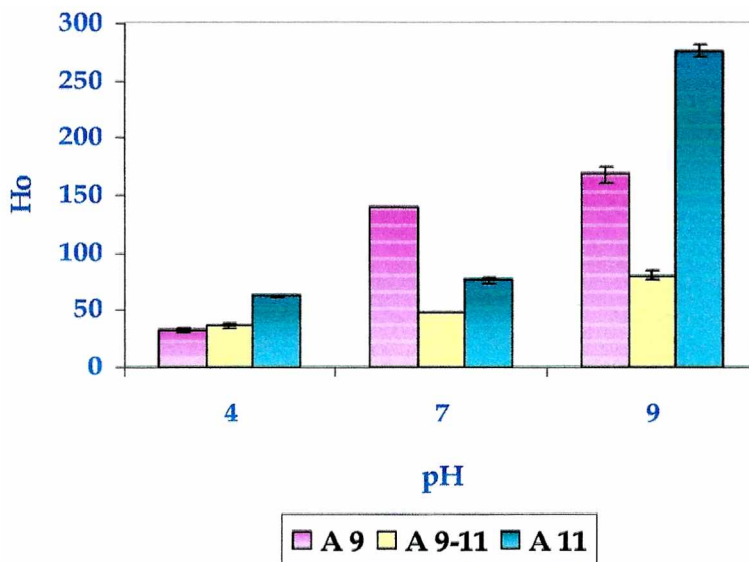


Figura II.7: Hidrofobicidad superficial (Ho) de los A9, A11 y A9-11 en función del pH a fuerza iónica constante = 0,5

hidrofobicidad superficial en las tres condiciones estudiadas lo que sugiere que a pesar que en los estudios cromatográficos mostraron moléculas de tamaños similares, las mismas presentarían diferencias en la composición y/o conformación

Siguiendo con el estudio de los cambios estructurales inducidos por pH se recurrió a la *espectroscopia de fluorescencia*. El comportamiento de los residuos de triptofano, tirosina y fenilalanina puede dar información para caracterizar y detectar modificaciones en proteínas. El triptofano cuando es excitado a 295 nm genera fluorescencia que es muy sensible a los cambios en el entorno vecino a él (Royer, 1995). Este aminoácido da un espectro de mayor intensidad, que fenilalanina y tirosina, que son frecuentemente apagadas por él, siendo por lo tanto el fluoróforo dominante.

El estudio de los espectros de fluorescencia que se obtienen de los aislados solubles a distintos pHs será la resultante de la composición de las proteínas presentes en cada condición y de la influencia de cada pH sobre su conformación.

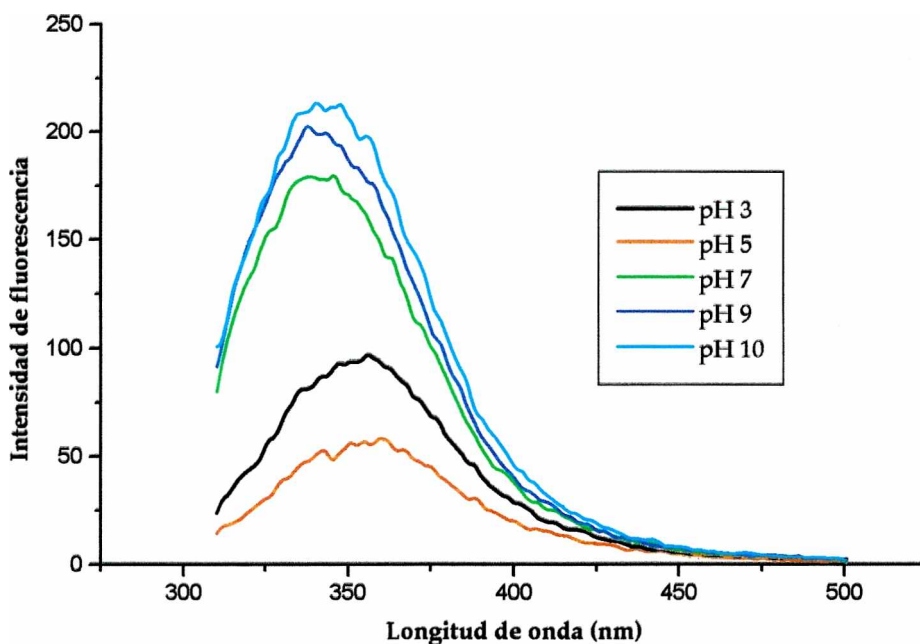


Figura II.8: Espectros de fluorescencia de A9 en función del pH, a una fuerza iónica constante = 0,5

En las Figuras, II.8; II.9 y II.10 se presentan los espectros de emisión de los tres aislados de amaranto en función de diferentes condiciones de pH.

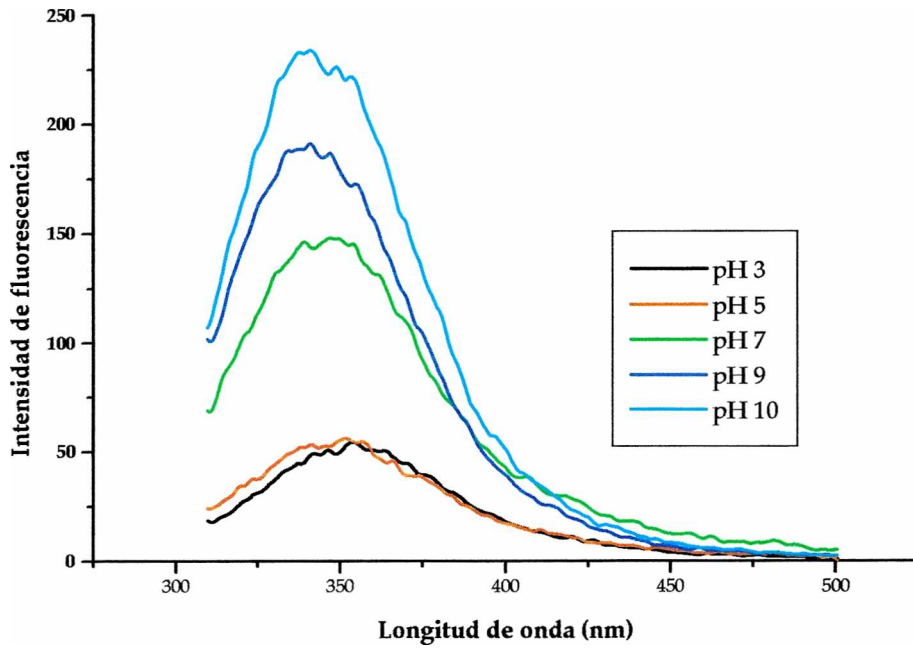


Figura II.9: Espectros de fluorescencia de A11 en función del pH, a una fuerza iónica constante = 0,5

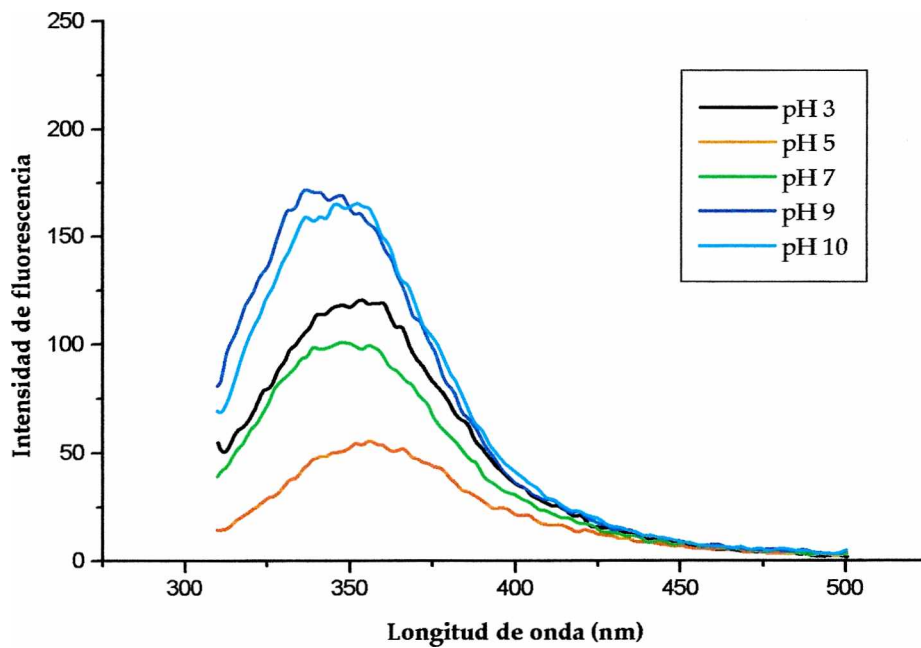


Figura II.10: Espectros de fluorescencia de A9-11 en función del pH a una fuerza iónica constante = 0,5

En los tres aislados se observa que a pHs más ácidos (pH 3 y 5) los espectros presentan mayores diferencias con respecto al pH 7 que los espectros obtenidos a pHs alcalinos. Estas variaciones se pueden atribuir a cambios en el entorno del triptofano inducidos en una misma proteína por efecto del pH o a la presencia de distintas especies proteicas con diferente contenido de triptofano los que tendrían entornos moleculares diferentes.

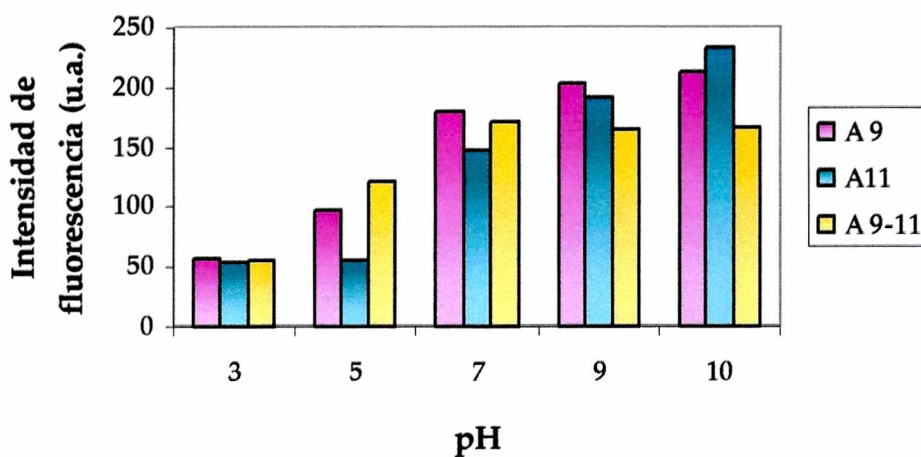


Figura II.11: Intensidad de fluorescencia de los aislados en función del pH a una fuerza iónica constante = 0,5

Como se puede observar en la **Figura II.11** la intensidad de fluorescencia baja en los espectros correspondientes a pHs ácidos y al alcalinizar el medio esta intensidad se ve aumentada. A pHs alcalinos el comportamiento es levemente diferente entre los distintos aislados, lo cual puede deberse a solubilización de nuevas especies o a cambios conformacionales.

La disminución de la IF (intensidad de fluorescencia) a los pHs ácidos es mucho más importante que el aumento a pH alcalino. Se observa además que los valores de longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$, **Tabla II.2**), obtenidos de los espectros muestran un corrimiento hacia valores mayores cuando los aislados se encuentran en medio ácido, mientras que en el medio alcalino no se observan dichos cambios. La disminución de IF acompañada del corrimiento del $\lambda_{\text{máx}}$ hacia el rojo nos estaría indicando la presencia de residuos de triptofano más expuestos al medio polar en las estructuras a pH ácido. Teniendo en cuenta que

en estas condiciones los valores de H_0 son menores los resultados anteriores se pueden interpretar considerando que las especies solubles a pHs ácidos presentan menor contenido de residuos triptofano. Por otro lado, el mayor incremento de IF para el A11 al alcalinizar se correlaciona con una mayor hidrofobicidad superficial de este aislado a pHs básicos (**Figura II.7**), lo que sugiere que la conformación de las proteínas del A11 es diferente a las del A9.

Tabla II.2: Longitud de onda máxima al medir fluorescencia en los tres aislados

pH	A9	A11	A9-11
3	356 ± 0^a	353 ± 1^a	354 ± 1^a
5	356 ± 4^a	353 ± 0^a	354 ± 4^a
7	348 ± 3^b	348 ± 1^b	351 ± 5^b
9	339 ± 2^c	341 ± 0^c	344 ± 8^c
10	342 ± 2^c	342 ± 1^c	345 ± 2^c

En la **Figura II.12** se presenta, para los tres aislados, la emisión de energía promedio en función del pH en la que se observa una tendencia similar entre ellos. Mayores valores de la emisión de energía promedio indican un espectro más cercano al azul. Para el A9, se observó que a valores de pH

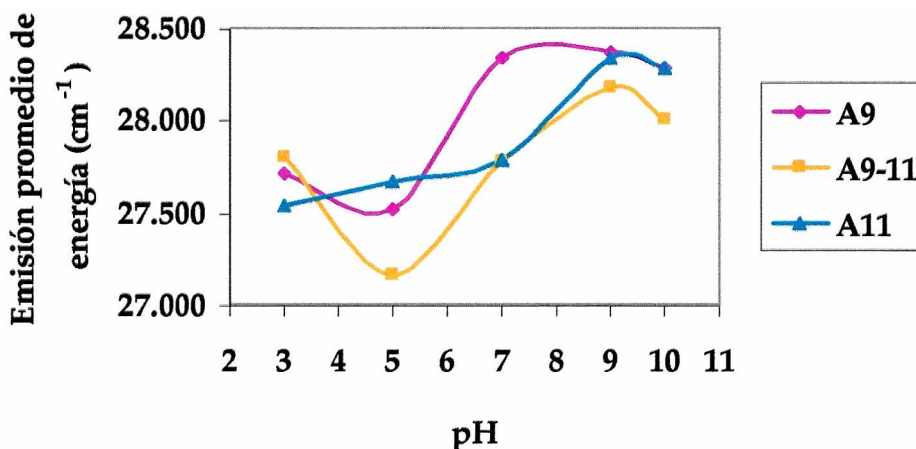


Figura II.12: Energía de emisión promedio de los aislados A9, A11 y A9-11 en función del pH a una fuerza iónica constante = 0,5

mayores que 7 tienen una energía de emisión promedio mayor que para los otros dos aislados, esto sugiere que las proteínas de los aislados A11 y A9-11 se

encuentran más desplegadas que las del A9. A pH ácido se observaron valores menores de emisión de energía promedio en los tres aislados lo que indica una mayor exposición de los residuos de triptofano hacia el medio polar sugiriendo una estructura más desplegada.

Análisis térmico de suspensiones de los aislados

Para completar el estudio de los cambios conformacionales sufridos por las proteínas por el efecto del pH se analizaron suspensiones de los aislados mediante DSC. Estos análisis se llevaron a cabo con los aislados proteicos en dos condiciones diferentes (a) aislados suspendidos a distintos pHs y (b) aislados sometidos a tratamientos previos a distintos pHs (ver punto 2.2.2).

Aislados A9, A11 y A9-11, suspendidos en diferentes condiciones de pH

En la **Figura II.13** se pueden observar los resultados del análisis calorimétrico para el aislado A9 a distintos pHs. Los termogramas obtenidos a

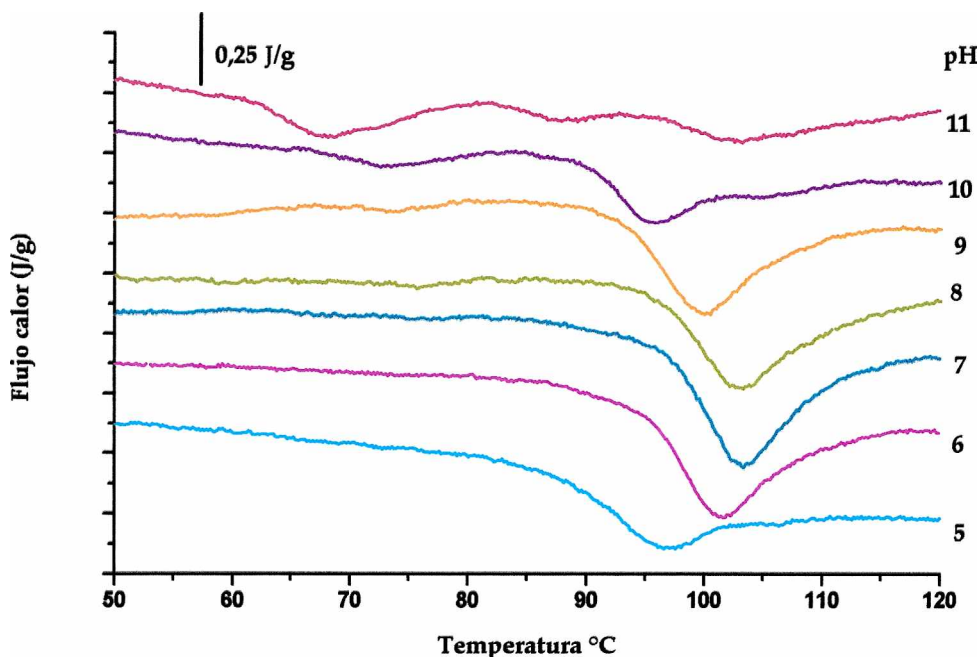


Figura II.13: Termogramas de DSC de A9, dispersiones de 20% en diferentes soluciones buffers de pH, a una fuerza iónica constante = 0,5

los pHs 2, 3 y 4 (no graficados) no presentaron endotermas lo que indicó que las moléculas de proteína no poseían algún grado de estructura. A9 suspendido a

pH 5 presentó cierta estructura con una T_d de $97,2 \pm 0,1$ °C (**Figuras II.13 y II.16**). A partir de pH 6, 7 y 8 se obtienen las condiciones de mayor termoestabilidad para el A9 con valores de T_d que van desde $100,7 \pm 0,1$ °C, hasta $103,3 \pm 0,8$ °C. A pH 9 disminuye la T_d presentando un valor de $99,6$ °C y a pHs 10 y 11 se ven dos endotermas pequeñas; al pH más alcalino la endoterma más importante es la de menor estabilidad. Por otra parte las entalpías de desnaturalización, como se puede observar en la **Figura II.17**, presentan un valor máximo en el rango de pH 6 – 9 (con valores entre 7 a $7,8$ J/g) indicando que las moléculas se encontraban en un estado más estructurado. A pHs 5, 10 y 11 los valores de entalpía de desnaturalización descienden significativamente ($p < 0,05$). Los $\Delta T_{1/2}$ dan cuenta de la cooperatividad del proceso de desnaturalización, en la **Tabla II.3**, se pueden observar estos valores para el A9, los cuales muestran un mayor grado de cooperatividad entre los pHs 6 y 8, siendo el proceso de desnaturalización menos cooperativo en los pH 5, 9 y 10. Los valores de $\Delta T_{1/2}$ encontrados son un poco menores que los descritos por Castellani (2000) para la Gp en medio acuoso.

Para el A11 (**Figura II.14**) se encuentra un comportamiento similar al del A9, pero los resultados nos muestran que las proteínas poseen un menor grado de estructura. A los pH 2, 3 y 4 no se observaron endotermas y en el pH 5 (**Figura II.16**) ya se puede ver la aparición de un pico con una T_d de $97,1 \pm 0,2$ °C. A los pHs 6, 7, 8 y 9 se obtienen valores de T_d que oscilan entre $99,6$ y $103,2$ °C. A un pH superior, pH 10, se observaron dos endotermas una a $72,7 \pm 0,1$ °C más importante y la otra no muy bien definida a 99 °C. A los pH superiores o igual a 10 prácticamente quedan desestructuradas las moléculas de proteínas del A11. Las entalpías de desnaturalización muestran un máximo entre pHs 7 y 9 (**Figura II.17**), con valores entre $5,8$ a $6,6$ J/g, siendo el pH 8 el de mayor entalpía. En la zona alcalina, entre pH 10 y 11 las entalpías son significativamente menores ($p < 0,05$) lo que da cuenta de un menor grado de

estructura. Los $\Delta T_{1/2}$ se pueden observar en la **Tabla II.3** que muestra una mayor cooperatividad en la misma zona ya descrita para el A9.

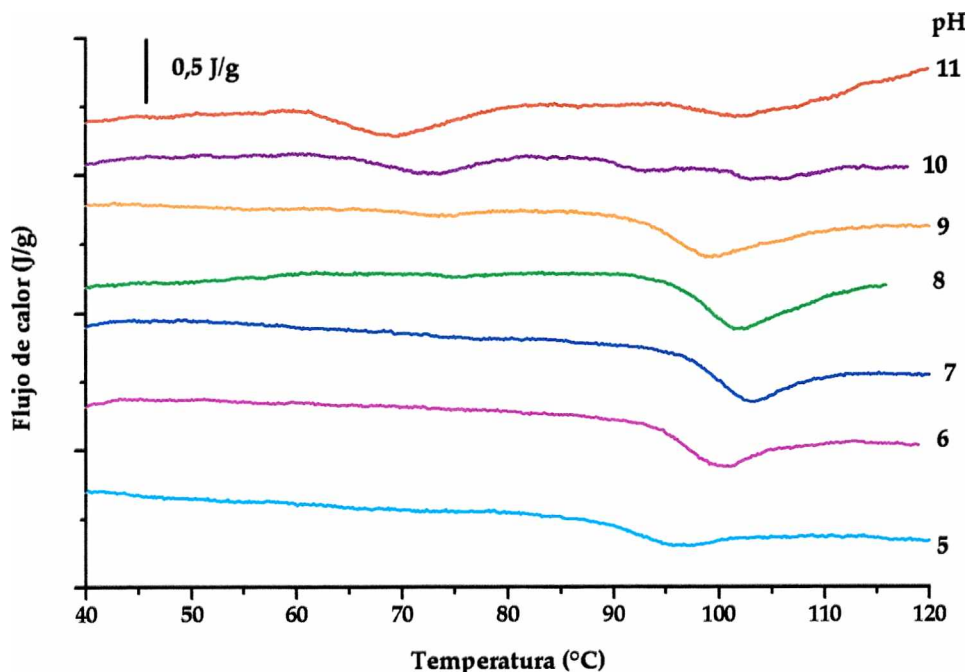


Figura II.14: Termogramas de DSC de A11, dispersiones de 20% en diferentes soluciones buffers de pH a una fuerza iónica constante = 0,5

Cuando se analizó el A9-11 se encontró que a diferencia de lo observado cuando estaba suspendido en agua (descrito en la caracterización inicial), en estas experiencias presentó pequeñas endotermas según el pH aunque las T_{max} de estas endotermas fueron inferiores a las de los otros dos aislados. Como se observa en la **Figura II.15**, los pHs 6, 7 y 8 favorecen la estructura del A9-11, presentando valores de T_d que estuvieron alrededor de 103 °C, (**Figura II.16**). Las entalpías de desnaturalización fueron bajas entre 0,7 y 1,5 J/g, (**Figura II.17**) lo cual está demostrando un alto grado de desnaturalización para este aislado. Los $\Delta T_{1/2}$ para el A9-11, señalan que el proceso es poco cooperativo, destacando valores de mayor cooperatividad en la zona de pHs de 6 a 7 (**Tabla II.3**).

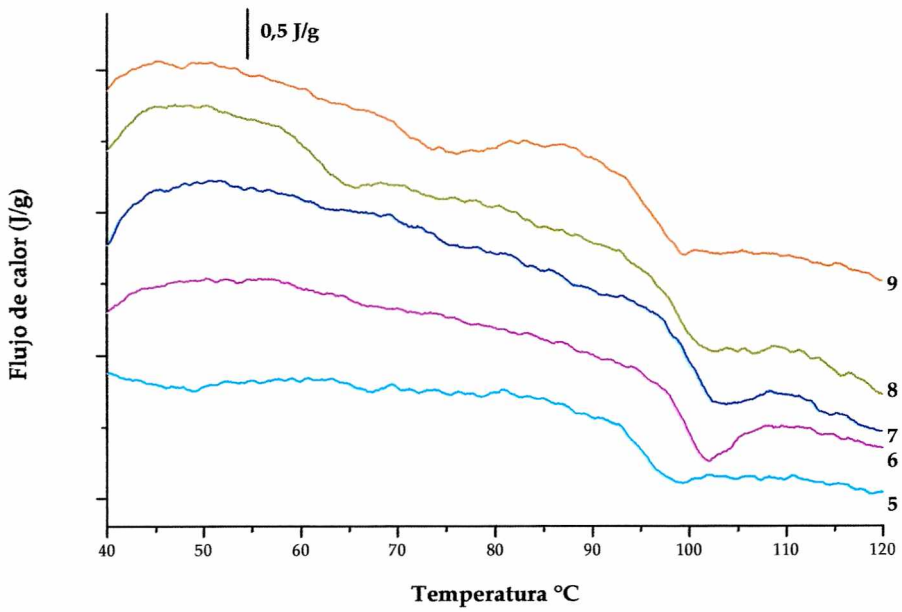


Figura II.15: Termogramas de DSC de A9-11, dispersiones de 20% en diferentes soluciones buffer de pH a una fuerza iónica constante = 0,5

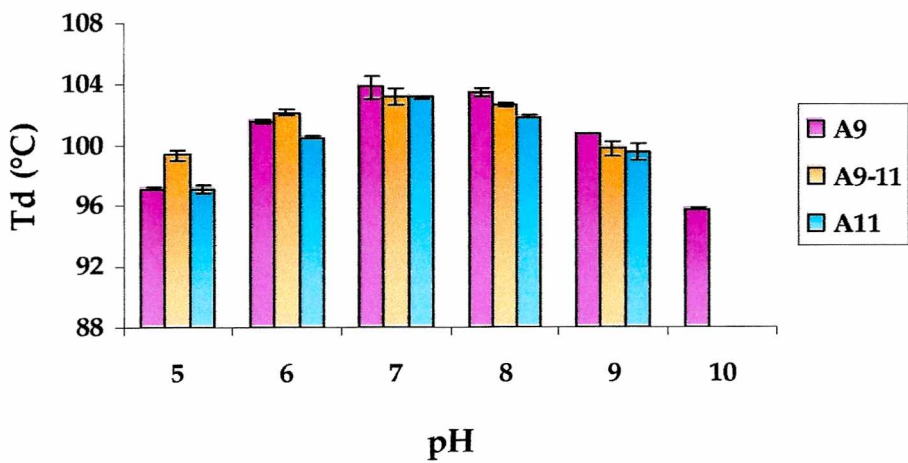


Figura II.16: Td de los aislados A9, A11 y A9-11 en función del pH a una fuerza iónica constante = 0,5

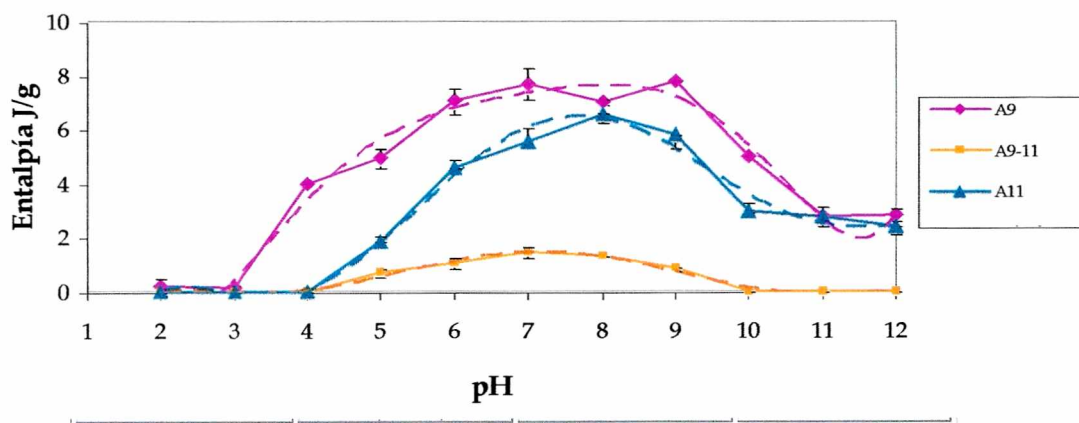


Figura II.17: Entalpías de desnaturalización de los A9, A11 y A9-11 en función del pH, a una fuerza iónica constante = 0,5

Tabla II.3: $\Delta T_{1/2}$ de los aislados A9, A11 y A9-11 en función del pH, a una fuerza iónica constante = 0,5

	A9	A11	A9-11
pH	$\Delta T_{1/2} \text{ } ^\circ\text{C}$		
5	$9,2 \pm 2,1$	$11,5 \pm 2,3$	$12,3 \pm 0,4$
6	$7,2 \pm 0$	$8,3 \pm 2,3$	$8,7 \pm 0,8$
7	$7,0 \pm 0,5$	$8,6 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,2$
8	$6,8 \pm 0,9$	$9,0 \pm 1,6$	$10,0 \pm 0,2$
9	$8,5 \pm 0,7$	$8,8 \pm 0,5$	$9,5 \pm 0,2$
10	$11,5 \pm 1,2$	--	--

Modificación de los aislados A9, A11 y A9-11, por efecto del cambio de pH previo a su análisis térmico

Para la realización de estos estudios se tuvo en cuenta que estos aislados presentan una baja solubilidad a pHs menores a 9 (resultados presentados en el capítulo de propiedades funcionales) y que las proteínas insolubles suelen presentar buena capacidad de absorción y retención de agua.

Se prepararon aislados modificados por pH, para lo cual los aislados fueron tratados por 15 min (ver en Materiales y Métodos ítem 2.2.2) a cada pH de estudio, es decir: 3, 5, 7, 9 y 10 y se analizó la conformación mediante análisis

térmico de las fracciones insolubles liofilizadas (I). Para los pHs 9 y 10 donde la solubilidad fue mayor se trabajó además con las fracciones soluble e insoluble en conjunto (ver Materiales y Métodos ítem 2.2.4).

En las Figuras II.18, y II.19 se muestran los resultados de los análisis por DSC de los A9 y A11 sometidos a los tratamientos ya mencionados.

Al analizar las endotermas de A9 a pHs 3 y 5 (Figura II.18), se observa que este aislado está desnaturizado. A pH 5 se detecta una endoterma a baja

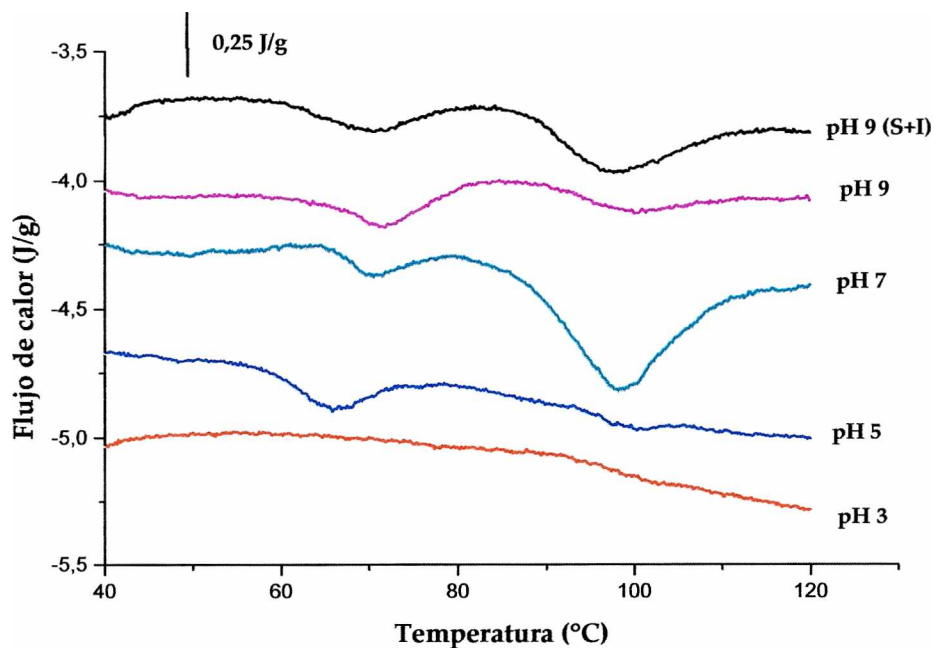


Figura II.18: Termogramas (DSC) del A9 modificado por pH, en una suspensión al 20% en agua

temperatura con una Td de 66,1 °C, que indica la presencia de moléculas con un plegamiento diferente del original. Ya habíamos señalado anteriormente que el pH 3 tenía un efecto desnaturizante sobre la estructura. Sin embargo, no sucedió lo mismo a pH 5 lo cual sugiere que el tratamiento al que fue sometida la muestra, sumado a la acidez del medio, produjo la alteración de la estructura de las proteínas. El A9 muestra cierto grado de estructura a pH 7 presentando dos endotermas una de menor estabilidad térmica con Td de $71,2 \pm 0,2$ °C y otra de mayor estabilidad (Td = $98,7 \pm 0,3$ °C). La entalpía de desnaturización fue

de $6,4 \pm 0,2$ J/g, valor algo menor al obtenido con el A9 suspendido en un buffer a pH 7, pero mayor al del A9 en agua ($4,4 \pm 0,9$ J/g). Ello sugiere una estabilización de la estructura de las proteínas debida a la presencia de sales. El A9 en el pH 9 muestra cierto grado de estructura, presentando dos endotermas una más importante de $69,9$ °C y la otra más indefinida en la zona entre $90,0$ °C a 105 °C, la entalpía de desnaturalización fue de $4,9$ J/g mayormente aportada por la endoterma de menor Td. Al analizar el A9 (S+I), obtenido cuando se liofilizan las fracciones insoluble y el soluble del aislado A9 modificado a pH 9, se obtienen dos endotermas con Tds de $70,7 \pm 0,1$ °C y $98,2 \pm 0,6$ °C. Este perfil (**Figura II.18**) muestra que la endoterma de mayor temperatura está más definida en relación a la endoterma que presenta sólo la fracción insoluble del A9 tratado al mismo pH. De esto se puede deducir que la fracción soluble está compuesta por moléculas de mayor termoestabilidad que corresponderían a las mismas encontradas en la cromatografía de exclusión molecular.

Para el A11 (**Figura II.19**) a partir del pH 5 se empieza a observar la presencia de dos endotermas muy pequeñas, presentando a pH 5 una Td de $67,8$ °C y la otra de $96,5$ °C, ya al pH 7, se presentan dos transiciones térmicas más definidas con Td de $70,6 \pm 0,1$ °C y $99,0 \pm 0,6$ °C y un ΔH de desnaturalización de $3,5 \pm 0,5$ J/g. Estos valores de entalpía son inferiores a los del A11 suspendido en buffer pH 7 (**Figura II.17**). Sin embargo la entalpía del A11 tratado a pH 7 es superior a la descrita para este aislado suspendido en agua.

Se puede deducir que el A9 presentó mayor estructura que el A11 y que cuando ambos aislados fueron tratados a pH 7 sufrieron modificaciones tal que presentaron menor grado de estructura que cuando se analizaron suspendidos en buffer de pH 7. Para el A9-11 no se obtuvo ninguna endoterma por lo cual no se muestran los termogramas, estos resultados indican que los tratamientos a distintos pH por 15 min, desnaturalizan completamente al A9-11.

Podemos decir que el pH, sí tiene efecto sobre la conformación de los aislados, se visualiza que a pH 7 se mantuvo mejor la estructura para los A9 y A11. También se puede decir que a los pHs ácidos entre 3 y 5 y a los pHs alcalinos entre 9 y 11 es donde se produjeron las mayores modificaciones

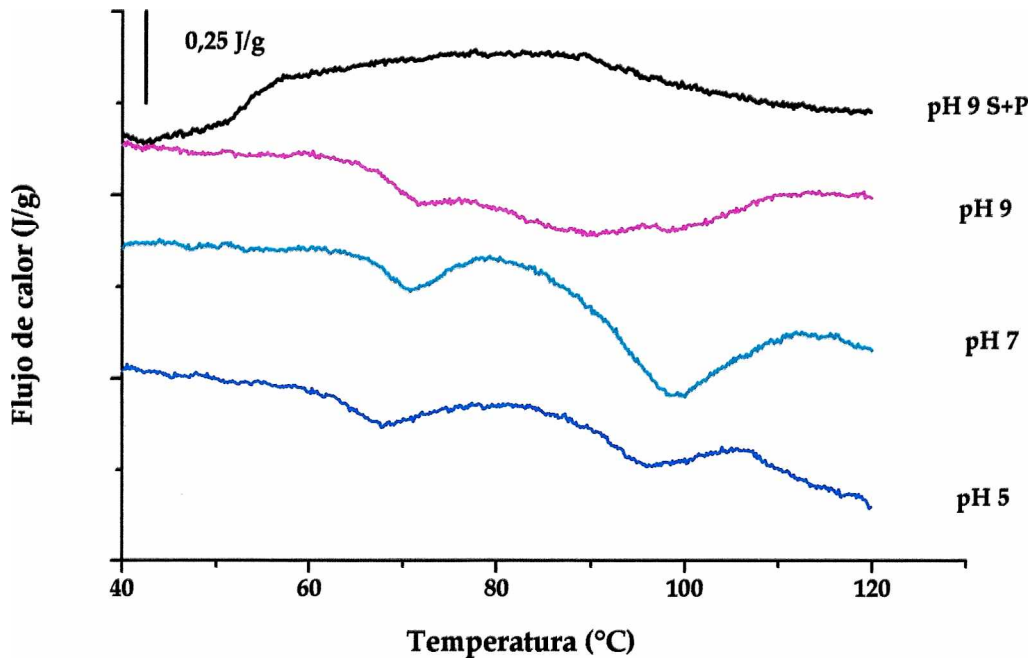


Figura II.19: Termogramas (DSC) del A11 modificado por pH, en una suspensión al 20% en agua

estructurales, siendo los pHs por debajo de 5 los que provocaron las modificaciones más drásticas en la estructura. Entre los tres aislados se encontró que el A9 es el que presentó más estructura que el A11 y a su vez el A11 fue más susceptible al efecto de los pHs ácidos y alcalinos.

2.3.3 Influencia de la fuerza iónica en las características estructurales de los aislados A9, A11 y A9-11

Continuando con el estudio de la estructura de los aislados cuando se provocan cambios en el entorno, se evaluó la influencia de la fuerza iónica sobre los aislados A9, A11 y A9-11. Con el propósito de eliminar las sales presentes en los aislados provenientes de la harina y agregadas durante su preparación, los

mismos fueron previamente dializados (como se indica en Materiales y Métodos ítem 2.2.3). En la **Figura II.20** se pueden observar los perfiles obtenidos por gel filtración para el A9 cuando se ha modificado la fuerza iónica del medio entre μ 0,1 y 1. Si comparamos el perfil del A9 a fuerza iónica $\mu = 0,1$ y pH = 9 con el perfil obtenido en buffer B ($\mu = 0,08$ y pH = 8,5) (**Figura II.3**), condiciones del medio similares, se puede ver una menor cantidad de agregados solubles a $\mu = 0,1$ y las especies correspondientes a la zona III prácticamente desaparecen, estas diferencias serían atribuibles al tratamiento de diálisis y posterior liofilización. De acuerdo a los perfiles de la **Figura II.20** el aumento de la fuerza iónica no ha provocado en este aislado, modificaciones importantes. Por otra parte si comparamos los dos perfiles obtenidos a $\mu = 0,5$ y pH = 9 (**Figuras II.5** y **II.20**) se vuelve a observar la desaparición de especies de baja masa molecular, probablemente provocada por el efecto de diálisis.

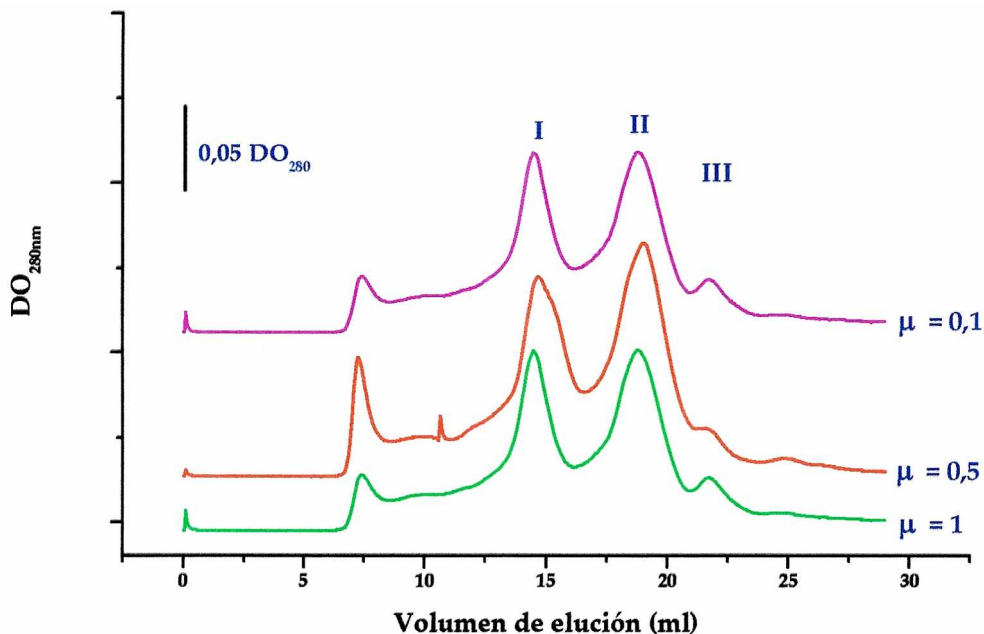


Figura II.20: Cromatografía de del filtración del A9 en función de la fuerza iónica a pH constante = 9

El estudio del efecto de la fuerza iónica para el A11 se muestra en la **Figura II.21**, se puede ver que se produjo una solubilización de agregados de alta masa molecular (A) y para este aislado se observa que la menor fuerza

iónica provoca la mayor solubilización. Por otra parte se observa en la zona I, que a medida que aumenta la fuerza iónica, el pico muestra la presencia de más de una especie en la misma zona. Finalmente se pueden encontrar especies de masa molecular de menor tamaño (zona II) y prácticamente las de la zona III van desapareciendo con el aumento de la fuerza iónica al igual que para el A9.

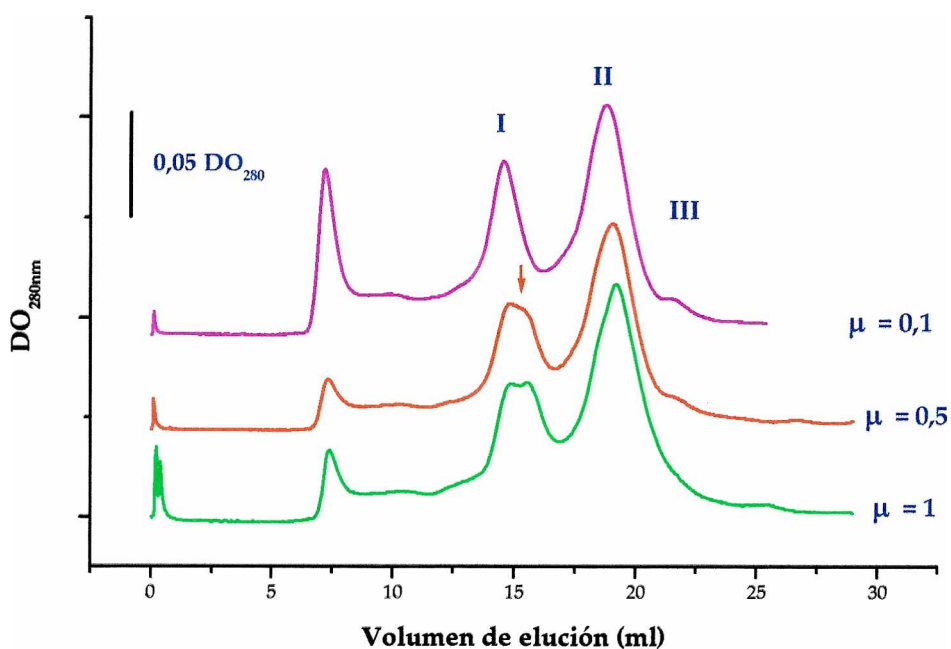


Figura II.21: Cromatografía de del filtración del A11 en función de la fuerza iónica a pH constante = 9

Para el aislado A9-11 se presentan los resultados en la **Figura II.22**, se puede observar que este aislado tendría moléculas de proteínas más insolubles, dado que se observa una baja cantidad de especies solubilizadas en la zona de los agregados moleculares (A). Se muestra que para la fuerza iónica más baja ($\mu = 0,1$), prácticamente no presenta especies moleculares en la zona I y a medida que la fuerza iónica va aumentando a 0,5 y 1 estas especies se solubilizan en mayor cantidad. Las especies de baja MM (zona II) son las mayoritarias en este aislado y las más pequeñas (zona III) son escasas al igual que para el A11.

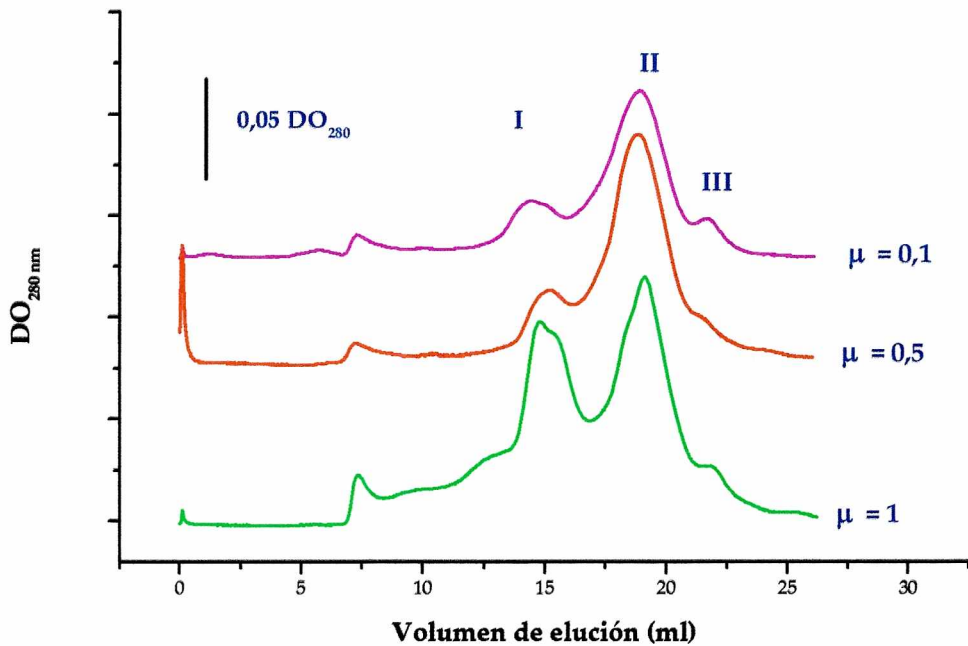


Figura II.22: Cromatografía de del filtración del A9-11 en función de la fuerza iónica a pH constante = 9

Continuando con el estudio de la influencia de la fuerza iónica sobre la estructura de los aislados, se evaluó *la hidrofobicidad superficial* de los mismos modificando la fuerza iónica a pH 9. En la **Figura II.23** se pueden observar los resultados de la hidrofobicidad superficial de los aislados A9, A11 y A9-11 en función de la fuerza iónica. Se muestra que para el A9, a las fuerzas iónicas ensayadas, la H_o no presentó variaciones importantes al igual que el A9-11. Por el contrario el A11 presentó una leve disminución del H_o con el aumento de la fuerza iónica, esta disminución de H_o podría deberse a un posible aumento de la agregación, sin embargo este fenómeno no se alcanzaría a visualizar en los perfiles cromatográficos.

Si comparamos los valores de H_o de los tres aislados a pH =9 y $\mu = 0,5$ con los obtenidos para un aislado sin dializar, en similares condiciones en el estudio del pH (**Figura II.7**), se puede observar que los aislados sometidos a diálisis presentaron valores menores de H_o . Esto sugiere que el tratamiento de los aislados por diálisis y posterior liofilización provocó cambios conformacionales

importantes. Una explicación alternativa es que los polipéptidos de menor masa molecular, eliminados por diálisis, ejercerían un aporte importante a la Ho.

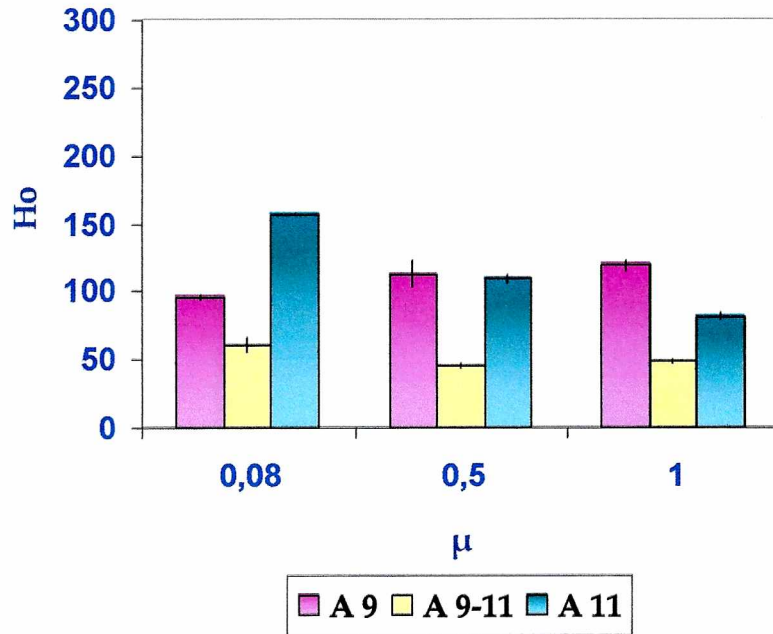


Figura II.23: Hidrofobicidad superficial de A9, A11 y A9-11 en función de la fuerza iónica a pH constante = 9

En la **Figura II.24** se pueden observar los termogramas obtenidos para el A9 en función de la fuerza iónica a pH constante. A partir de la fuerza iónica más baja ($\mu = 0,005$) y hasta la fuerza iónica de 0,1 se obtuvieron dos transiciones térmicas cuyos Td se presentan en la **Figura II.27**. Estos valores oscilan entre 68,9 °C y 72 °C para la primera transición y entre 96,5 °C y 98,1 °C para las endotermas de mayor termoestabilidad. La presencia de dos endotermas nos indica la coexistencia de estructuras de diferente estabilidad térmica que podrían provenir de una disociación y/o desnaturalización parcial. A partir de la fuerza iónica $\mu = 0,2$ se observa una sola endoterma cuyas temperaturas de desnaturalización van en aumento con la fuerza iónica llegando a 110,3 °C a $\mu = 2$ (**Figuras II.24 y II.27**). Estos resultados indican que el

partir de la fuerza iónica ($\mu = 0,2$) se puede observar una endoterma cuya T_d es de $97,3 \pm 0,2$, la cual no varía hasta la fuerza iónica $\mu = 0,5$; posteriormente para

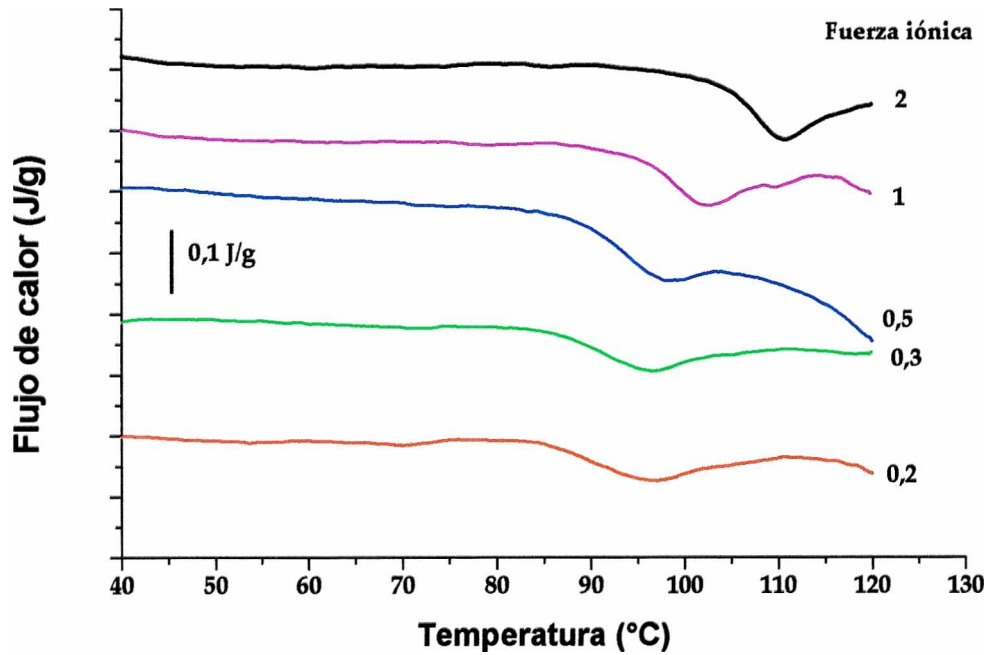


Figura II.25: Termogramas de A11 en dispersiones al 20 % a diferentes fuerzas iónicas a pH constante = 9

mayores fuerzas iónicas aumenta la temperatura en forma significativa llegando a $110,4 \pm 0,6$ °C, similar al valor descrito para el A9. Por otra parte las entalpías de desnaturalización (**Figura II.28**) son menores a las encontradas para el A9, con valores entre 2,2 J/g y 3,7 J/g. En este aislado el aumento de la fuerza iónica también provocó un aumento en la cooperatividad a partir de la $\mu = 0,2$ (**Tabla II.4**). La cooperatividad alcanzada por A11 a la máxima fuerza iónica es menor que la presentada por las proteínas del A9; lo que sugiere que la estructura de las proteínas del A11 presentan un menor grado de compactación.

Los termogramas del aislado A9-11 prácticamente no muestran endotermas, en la **Figura II.26** se presentan sólo los termogramas correspondientes a las fuerzas iónicas 0,5, 1 y 2 donde se evidencia el alto grado de desnaturalización alcanzado por estas proteínas.

El efecto de la alta fuerza iónica ($\mu = 2$) influyó en la temperatura de desnaturalización, en donde se produjo un aumento de la Td de 8 °C para los aislados A9 y A11. Por otra parte la entalpía de desnaturalización no mostró variaciones significativas (**Figura II.28**), sugiriendo que la presencia de alta fuerza iónica durante el tratamiento térmico tiene bajo efecto en las fuerzas que estabilizan las proteínas de los aislados. Los resultados anteriores muestran un efecto desestabilizante de la baja fuerza iónica lo que sugiere la importancia de las interacciones hidrofóbicas en la estabilización de las proteínas de los aislados. Esta desestabilización en proteínas que ya tenían un bajo grado de plegamiento como las pertenecientes a los A11 y A9-11 provocó efectos parcial o totalmente irreversibles respectivamente.

Los resultados obtenidos con el A9 sugieren que a bajas fuerzas iónicas el aumento de la concentración salina colaboraría en la adquisición de una estructura más termoestable la cual tendría el mayor grado de plegamiento a fuerza iónica 0,5. A partir de esta fuerza iónica, el aumento de la concentración salina provocaría una compactación de las estructuras proteicas, evidenciado por un aumento en su termoestabilidad y una mayor cooperatividad en su desnaturalización.

Tabla II.4: $\Delta T_{1/2}$ de los aislados A9 y A11 en función de la fuerza iónica y a pH constante = 9

	A9	A11
pH	$\Delta T_{1/2} \text{ } ^\circ\text{C}$	
0,03	12,0 \pm 0	--
0,05	10,0 \pm 0	--
0,1	14,4 \pm 0,5	--
0,2	11,2 \pm 0,2	15,0 \pm 3,8
0,3	9,4 \pm 0,5	10,5 \pm 1,1
0,5	8,2 \pm 2,1	8,0 \pm 0
1	7,5 \pm 0,2	8,0 \pm 0
2	5,9 \pm 0,2	7,3 \pm 0

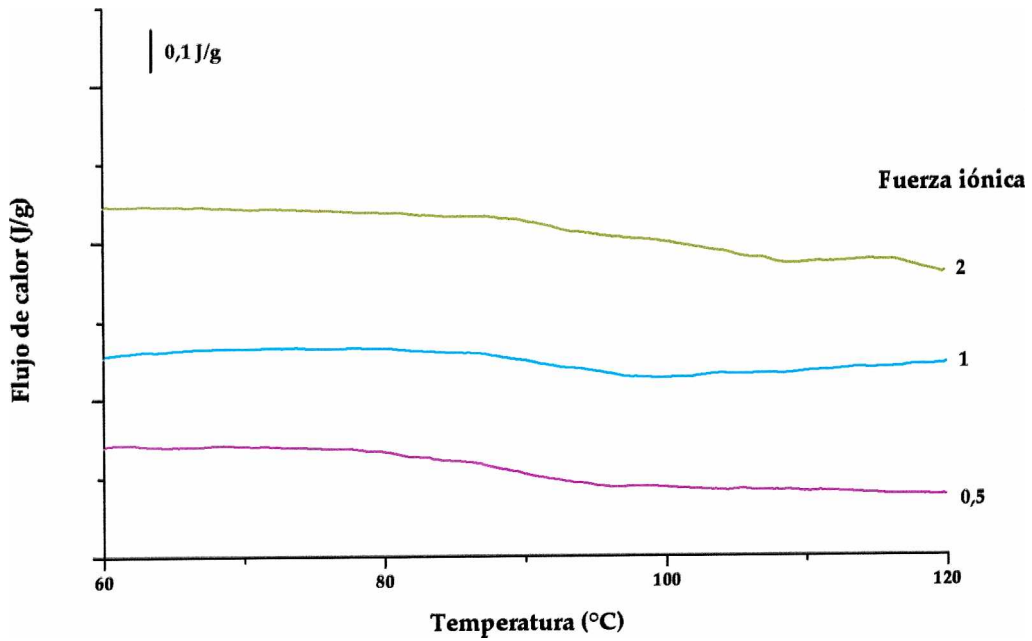


Figura II.26: Termogramas de A9-11 en dispersiones al 20 % a diferentes fuerzas iónicas a pH constante = 9

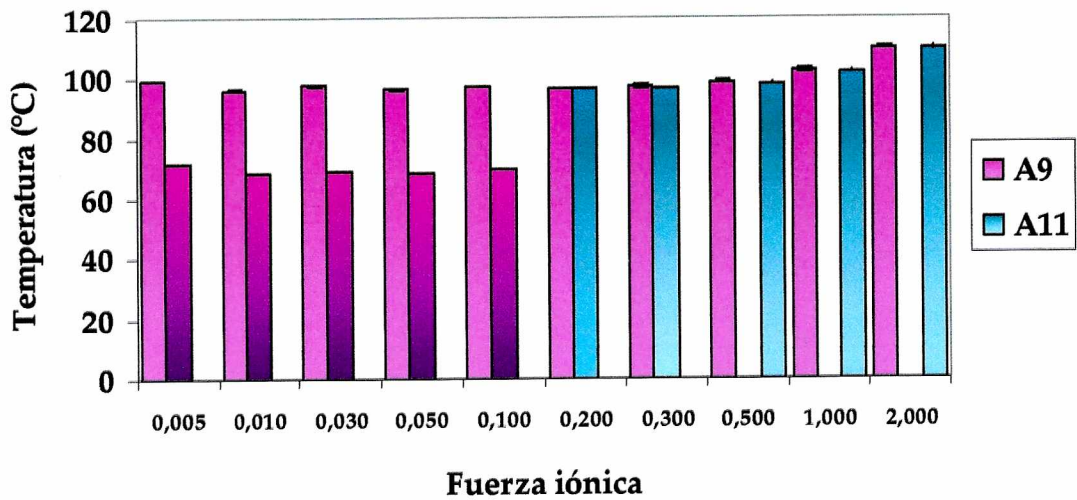


Figura II.27: Temperaturas de desnaturalización de los aislados A9 y A11 en dispersiones al 20 % a diferentes fuerzas iónicas a pH constante = 9

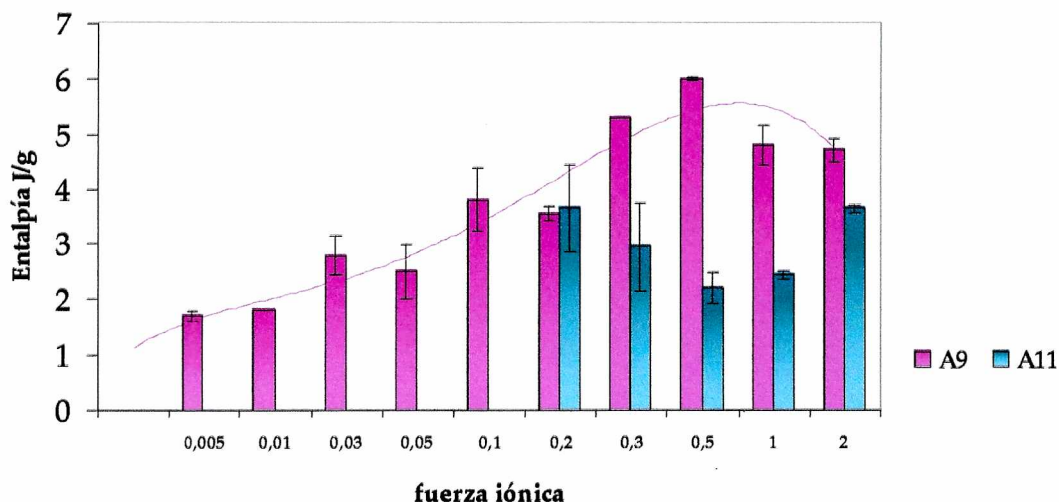


Figura II.28: Entalpías de desnaturalización de los aislados A9 y A11 en dispersiones al 20 % a diferentes fuerzas iónicas a pH constante = 9

2.3.4. Efecto de la temperatura sobre los aislados A9, A11 y A9-11

Considerando que los aislados proteicos de amaranto son para uso alimentario y en la industria se utiliza normalmente la temperatura como parte del procesamiento de los alimentos es que se sometieron a los tres aislados a tratamientos térmicos de 60, 80 y 90 °C por 15 min (ver punto 2.2.4) y se analizaron las propiedades térmicas mediante calorimetría diferencial de barrido. Como se puede observar en la Figura II.29 los termogramas de los aislados tratados no presentan endotermas importantes, indicando que las proteínas fueron desnaturalizadas por efecto del tratamiento térmico. Sólo se graficaron los resultados de los aislados A9 y A11. Teniendo en cuenta que estos aislados por su preparación están constituidos por proteína insoluble, la cual, de acuerdo a estos análisis, se encuentra desnaturalizada no se realizaron los estudios correspondientes a la proteína soluble (FPLC; espectroscopía de fluorescencia) y fueron reservados para el estudio de su funcionalidad.

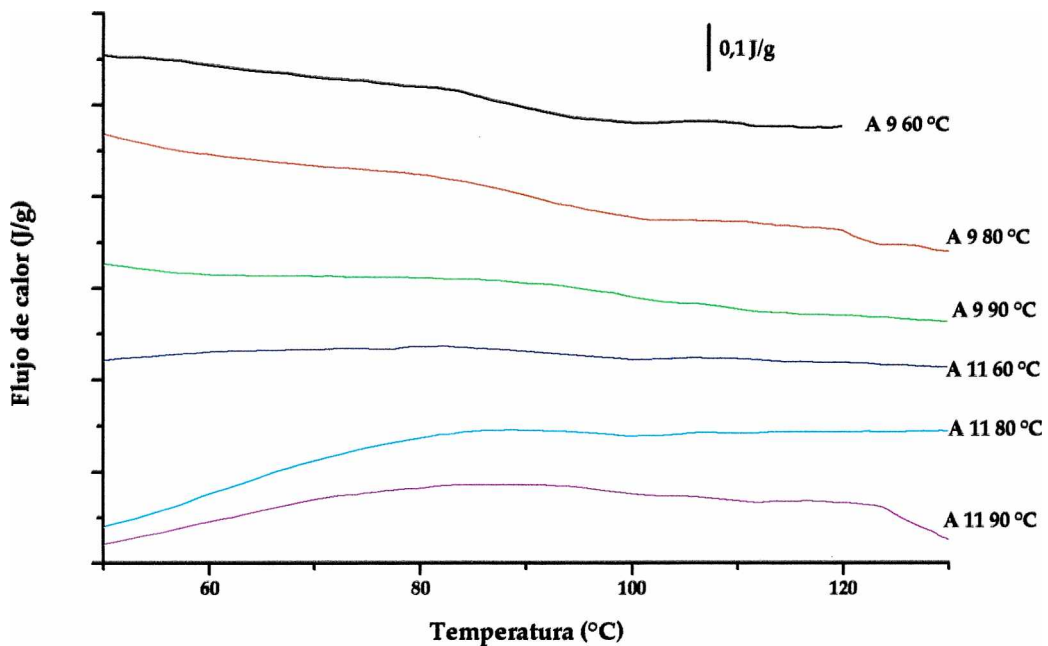


Figura II.29: Termogramas de los A9 y A11 cuando han sido modificados por efecto de la temperatura a 60, 80 y 90 °C

2.4 DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

Mediante extracción a pHs alcalinos y precipitación a pH 5 se prepararon tres aislados A9, A11 y A9-11, los aislados así obtenidos presentan diferente composición en cuanto a las fracciones proteicas que los integran (Martínez, 1997) por lo que se esperaría que cada aislado presente características estructurales diferentes, y por consiguiente propiedades físico-químicas particulares.

Se observaron diferencias en las características estructurales entre los aislados A9, A11 y A9-11, concordando con los resultados obtenidos por Martínez y Añón (1996), siendo el aislado A9-11 el que presentó la estructura más desnaturalizada.

Estudiando la influencia del pH a fuerza iónica constante ($\mu = 0,5$) se encontraron diferencias estructurales marcadas entre las proteínas disueltas a

los pHs ácidos (pH 3 - 4), neutro y alcalinos (pH 9 - 11). En condiciones de neutralidad los tres aislados presentaron diferencias conformacionales, siendo estas diferencias menores entre los aislados A9 y A11. En la zona de pH entre 6 y 8, el A9 mostró un mayor grado de estructura, le siguió el A11 y con menor plegamiento el A9-11. En ambos extremos de pH se observó una pérdida de la estabilidad con parcial desplegamiento que se vió reflejado en un descenso de la temperatura y la entalpía de desnaturalización y un aumento de la $\Delta T_{1/2}$. La proteína soluble presentó, a su vez, cambios en la hidrofobicidad superficial, en los espectros de fluorescencia y en los perfiles de gel filtración. Estos cambios se deben probablemente a la carga neta que poseen las proteínas y a las repulsiones electrostáticas. Las diferencias conformacionales por alcalinización del medio fueron menores que por acidificación. A pHs mayores de siete se observó un aumento en la H_0 y mayor solubilización de agregados moleculares de globulina-P y globulina 11S. En el medio alcalino se observó una disociación parcial como lo describiera Castellani y col. (1998), para la globulina-P y Konishi y col. (1985) y Marcone y Yada (1991) para una subfracción del amaranto. Este fenómeno fue descrito también para la glicinina de soja (Catsimpoolas y col., 1969; Peng y col., 1984) y para la legumina de arveja (Guéguen y col., 1988).

De acuerdo a los resultados de calorimetría diferencial de barrido y espectroscopía de fluorescencia, a partir de pH 5 los cambios estructurales en los tres aislados fueron mayores, siendo el A9 el más estable. En condiciones ácidas sólo permanecieron solubles moléculas muy pequeñas, proveniente de la disociación.

Considerando a los aislados en suspensión en los que están presentes las fracciones soluble e insoluble, se encontraron diferencias estructurales entre los tres aislados en todas las condiciones de pH estudiadas, presentando mayor diferencia el A9-11, el cual presentó el menor grado de plegamiento. Los aislados A9 y A11 mostraron menores diferencias en el rango 7-9,

encontrándose al aislado A9 con un mayor grado de estructura. A pHs ácidos y alcalinos suaves las diferencias conformacionales entre aquellos dos aislados fueron mayores.

En cuanto a la influencia de la fuerza iónica sobre la estructura de las proteínas de los aislados debemos tener en cuenta que los utilizados en este estudio, sometidos a diálisis y posterior liofilización, no presentaron las mismas características conformacionales que los aislados empleados para el estudio del efecto del pH. Las fracciones solubles de los tres aislados no mostraron diferencias importantes en el rango de fuerza iónica entre 0,1 y 1. Sin embargo al estudiar las propiedades térmicas en un rango más amplio de concentración salina se observó una marcada influencia de ésta sobre el estado de plegamiento de las proteínas, siendo desestabilizante la disminución de la fuerza iónica por debajo de 0,5 y estabilizante su aumento por encima de dicha fuerza iónica. El efecto desestabilizante fue más marcado para las proteínas que ya presentaban menor grado de plegamiento (A11 y A9-11), mientras que la acción estabilizante fue más notoria para las proteínas del A9. En un medio de fuerza iónica entre 0,3 - 1 los tres aislados presentaron distinto grado de plegamiento. Al aumentar levemente la fuerza iónica se produjo un incremento de la estabilidad térmica, que se puede deber al aumento de moléculas monoméricas y de agregados moleculares; en estas condiciones las proteínas de los aislados comienzan a estabilizarse térmicamente. Al aumentar aún más la fuerza iónica la estructura que presentaban las proteínas de los A9 y A11 adquirieron gran estabilidad térmica. La elevada cantidad de NaCl favorece el establecimiento de uniones hidrofóbicas estabilizando la estructura proteica (Damodaran y Kinsella, 1982).

Se prepararon aislados insolubles en agua, mediante tratamientos térmicos de los aislados A9, A11 y A9-11, los cuales no mostraron ningún grado de estructuración detectable por calorimetría diferencial de barrido. Se espera que dichos aislados puedan presentar alguna propiedad interesante en lo que respecta a la interacción proteína-agua.

En diferentes condiciones de pH y fuerza iónica, la proteína soluble de los aislados A9 y A11 presentaron características conformacionales similares, sin embargo, cuando se estudió la totalidad del aislado, incluyendo la proteína insoluble, mediante calorimetría diferencial de barrido, el A11 se mostró con un menor grado de estructura. Estos resultados sugieren que las fracciones solubles de los A9 y A11 son las que aportan mayor estructura y mayor termoestabilidad a los aislados.



CAPÍTULO 3

AISLADOS PROTEICOS DE AMARANTO:

*Propiedades funcionales influencia del pH y la fuerza
iónica*

3.1 INTRODUCCIÓN

Para la producción de alimentos es deseable que las proteínas posean propiedades funcionales tales como solubilidad, capacidad de absorción y retención de agua y capacidad de formar espuma entre otras. Sólo recientemente se ha comenzado a producir información y conocimientos relacionados con las propiedades funcionales de las proteínas de amaranto al igual que sobre sus posibles aplicaciones tecnológicas (ver Introducción). Así, se hace importante evaluar las propiedades funcionales de los aislados proteicos de amaranto y conocer cómo influyen las modificaciones que pudieran sufrir sus proteínas por efectos físicos o químicos. En esta sección se incluyen los estudios referentes a las propiedades funcionales de los aislados A9, A11 y A9-11, se investigaron las propiedades de hidratación a saber solubilidad, capacidad de retención de agua y capacidad de absorción de agua y la capacidad de formar espumas. Estas propiedades fueron también evaluadas en función del pH y la fuerza iónica del medio y finalmente se estudió la capacidad de retención de agua de aislados modificados por tratamiento térmico.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Preparación de los aislados

La preparación de los aislados se realizó de acuerdo al método descrito en el punto 2.2.1. Los aislados modificados por pH o temperatura se prepararon de acuerdo a lo señalado en los puntos 2.2.2, y 2.2.4, y para el estudio de la influencia de la fuerza iónica sobre las propiedades funcionales se trataron los aislados como está descrito en el punto 2.2.3.

3.2.1. Solubilidad

La determinación de la solubilidad de los aislados proteicos en estudio se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en el punto 1.2.10. Los medios en los cuales se determinó la solubilidad fueron los señalados en el capítulo anterior (ítem 2.2.7.).

3.2.2. Capacidad de retención de agua (WHC)

Se prepararon dispersiones de los aislados A9, A11 y A9-11 al 1% (p/v) en agua destilada o buffer borato a pH 9 y diferente fuerza iónica. Las dispersiones fueron mantenidas con agitación durante 1 h a temperatura ambiente; se sometieron cada 15 min a una agitación intensa y breve en vórtex. Las muestras fueron centrifugadas 10.000 g por 30 min a 15°C, luego de separar el sobrenadante los tubos de centrífuga fueron invertidos y colocados sobre papel absorbente por 1 min antes de pesarlos. En los sobrenadantes obtenidos se determinó el contenido de proteína soluble por el método de Lowry y col. (1951). Las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

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

$$WHC = \frac{m_2 - (m_1 - m_3)}{m_1 \delta}$$

Donde:

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

m₁: masa del aislado pesada, en g

m₂: masa del precipitado obtenido, en g

m₃: masa de proteína soluble, en g

δ: densidad del agua a 20°C (≈ 1 g/ml)

3.2.3. Determinación de la capacidad de absorción de agua (WIC)

La capacidad de absorción de agua (WIC) se determinó siguiendo la técnica descrita por Torgensen y Toledo (1977), se utilizó un equipo similar al diseñado por Baumann (1967) como se muestra en la **Figura III.1**. Se trabajó en un ambiente a 20 ± 2 °C. Se utilizaron alrededor de 30 mg del aislado proteico los cuales fueron esparcidos en forma de monocapa sobre el filtro de papel embebido en el solvente de medida (agua o soluciones de diferente fuerza

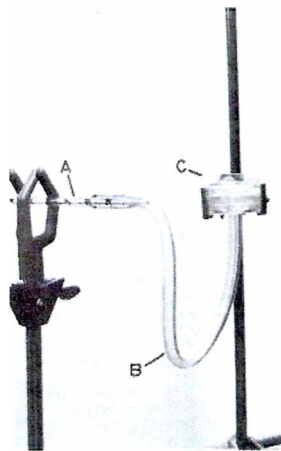


Figura III.1: Esquema del equipo utilizado en la determinación de la capacidad de absorción de agua. A: pipeta de 1 ml, B: manguera transparente y C: embudo (Torgensen y Toledo, 1977)

iónica), mientras se iniciaba la medida del tiempo con un cronómetro. 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 por parte de la muestra. El valor de la capacidad de absorción de agua se obtuvo dividiendo el volumen máximo de agua absorbido por el peso de la muestra. A partir del gráfico (ml de agua absorbidos por la muestra versus tiempo) se calculó la velocidad inicial, v_i , (ml/min) de absorción de agua como la pendiente inicial de la curva y se determinó el tiempo que fue necesario para alcanzar la mitad del volumen máximo de agua absorbida. Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado. Las curvas obtenidas fueron como las presentadas en la **Figura III.2**.

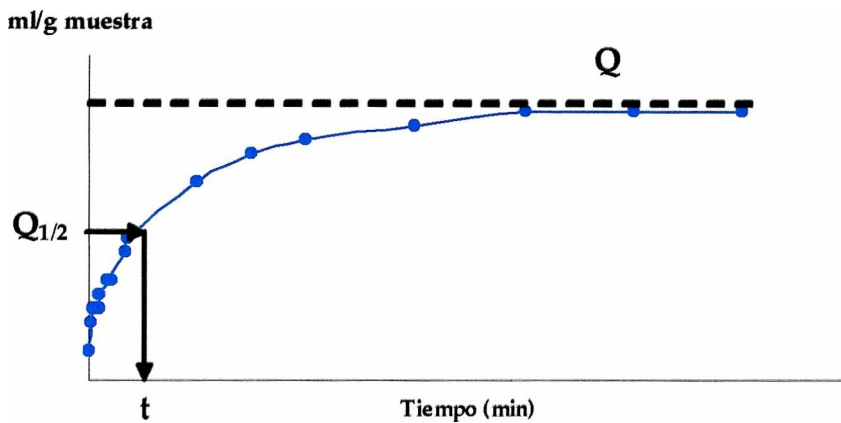


Figura III.2: Curva de absorción de agua: Q la capacidad de absorción de agua, t es el tiempo en el que se alcanza la mitad del volumen máximo

3.2.4. Propiedades espumantes

Se determinaron las propiedades espumantes para los aislados proteicos A9, A9-11 y A11 siguiendo la técnica ya descrita en el ítem 1.2.11. Los buffers utilizados se detallan en el punto 2.2.7.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Propiedades de hidratación de los aislados A9, A11 y A9-11

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 desfavorable, denominado hidratación hidrofóbica. La hidratación es un proceso progresivo donde a partir de una proteína deshidratada se produce una absorción de agua hasta llegar a un hinchamiento, solvatación y disolución en el caso de las proteínas solubles. En

esta sección se incluyen los estudios referentes a la solubilidad, capacidad de retención de agua (WHC) y capacidad de absorción de agua (WIC) de los aislados A9, A11 y A9-11 y la influencia del pH y la fuerza iónica sobre estas funcionalidades de los aislados. Se evaluó también la WHC de los aislados tratados térmicamente.

3.3.1.1. Efecto del pH sobre las propiedades de hidratación de los aislados A9, A11 y A9-11

Solubilidad

Los resultados de la solubilidad en función del pH de los diferentes aislados se presentan en la **Figura III.3**. A pesar de las diferencias estructurales discutidas en el capítulo anterior los tres aislados presentaron solubilidades semejantes en todo el rango de pH analizado. A pH 2 la solubilidad de A9, A11 y A9-11 fue mayor que a pHs 3 a 5, en este rango la solubilidad fue más baja y

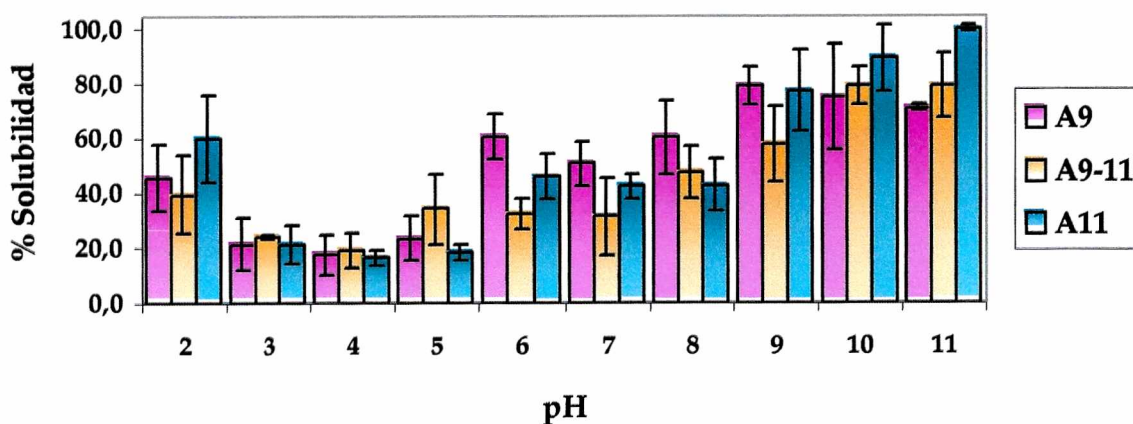


Figura III.3: Solubilidad de los aislados proteicos de amaranto, A9, A11 y A9-11, en función del pH a una fuerza iónica constante = 0,5

tendió a subir significativamente ($p < 0,05$) a los pHs más alcalinos alcanzando valores entre 80-90% entre pHs 9 y 11. Estas variaciones de la solubilidad con el pH, tienen que ver con la modificación de la carga neta de las proteínas y por lo tanto con su balance electrostático; en la zona cercana a su pI (alrededor de pH

5,0) la carga neta de las proteínas tiende a 0 y la variación de la solubilidad es mínima debido al aumento de la atracción entre las moléculas. Del lado alcalino al pI las proteínas tendrán una carga neta negativa y probablemente mayor que la carga neta positiva que presentan en medio ácido, de este modo las fuerzas repulsivas a pHs alcalinos y ácidos extremos serán más importantes que las fuerzas de atracción aumentando la solubilidad.

La variación de la solubilidad con el pH presentada por los aislados de amaranto es concordante con la de las proteínas presentes en harina y globulinas de amaranto (Mahajan y Dua, 2002; Marcone y Kakuda, 1999) así como proteínas de trigo sarraceno, haba, arveja y castaña de caju (Tomotake y col., 2002; Adebowalea y Lawal, 2003; Nieto y col. 2001, Tömösközi y col, 2001). Todas estas proteínas presentan su máxima solubilidad a pHs alcalinos.

Capacidad de retención de agua de los aislados A9, A11 y A9-11 modificados por pH

La capacidad de retención de agua de las proteínas, WHC, es un índice importante en la evaluación del comportamiento de las mismas como ingredientes en productos de panadería, carnes embutidas, salchichas y geles alimentarios. Esta propiedad afecta no sólo las condiciones del procesamiento sino también la calidad final de los productos.

Los valores de WHC para los aislados sin modificar en medio acuoso fueron similares para A9 y A11 ($1,9 \pm 0,5$ ml de agua/g de proteína), mientras que el A9-11 presentó un valor significativamente superior ($p < 0,05$; $2,9 \pm 0,9$ ml agua/g proteína), lo cual podría atribuirse, en principio, al mayor grado de desnaturalización que presentaron las proteínas de este aislado, como lo describimos en el capítulo anterior a través de las propiedades térmicas. En 1994, Petruccelli y Añón encontraron que los aislados que presentaron alta WHC fueron los que presentaron la mínima solubilidad, lo cual coincide con lo obtenido en este trabajo. Si comparamos estos valores con los obtenidos para otros aislados proteicos como los de soja, sésamo y castañas de cajú se observa

que los WHC de las proteínas de amaranto son iguales o superiores a éstos (Khalid y col., 2003; Ragab y col., 2004).

Para evaluar el efecto del pH se trabajó con la fracción insoluble de los aislados A9, A11 y A9-11 modificados por pH (pHs 3, 5, 7, 9 y 10, ver 3.2.2), los resultados obtenidos se presentan en la **Figura III.4**. Para los aislados A9 y A11 se observó que el mayor valor de WHC se obtuvo cuando la modificación se llevó a cabo a pH 3, produciéndose una disminución cuando el pH del

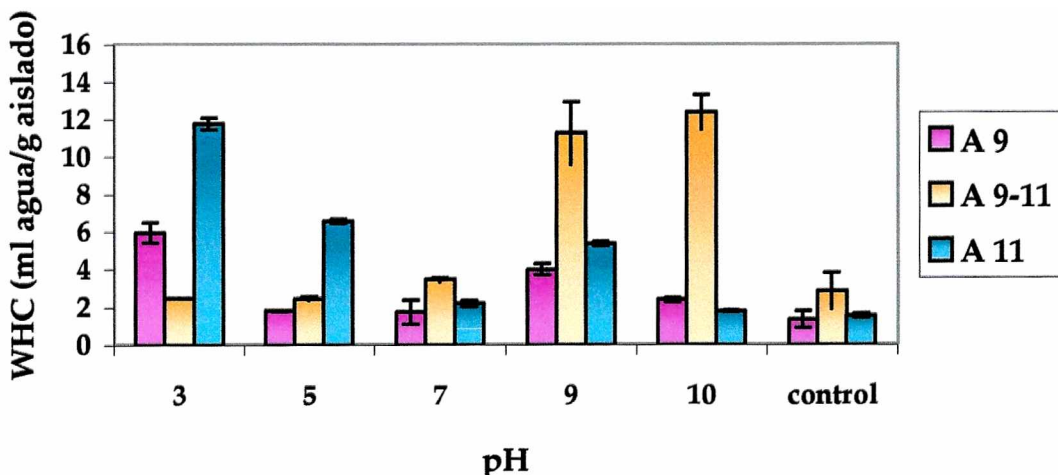


Figura III.4: Capacidad de retención de agua de la fracción insoluble de los aislados proteicos de amaranto, A9, A11 y A9-11 modificados por pH

tratamiento aumentó. Por el contrario para el A9-11 los valores de WHC fueron más bajos en los aislados tratados a pHs 3, 5 y 7, mientras que cuando la modificación se llevó a cabo a pH 9, esta propiedad aumentó significativamente ($p < 0,05$). Para los tres aislados al pH 7 se obtuvieron valores semejantes a los aislados control (agua destilada). Si tenemos en cuenta los resultados discutidos previamente (ver punto 2.3.2), en los que se mostró la ausencia de diferencias estructurales entre los aislados tratados a pH 7 y los sin tratar (ver punto 2.3.1), la similitud en el WHC de estos aislados estaría confirmando que la permanencia en solución y posterior liofilización no tendría efecto sobre las propiedades en estudio. Se ha observado que para los aislados A9 y A11 la máxima WHC se encuentra cuando los mismos fueron tratados a pH 3, de acuerdo a los resultados anteriormente discutidos en esta condición las

proteínas se encuentran totalmente desnaturalizadas (Figuras II.18 y II.19). Esta relación entre WHC y desnaturalización no se cumple para el aislado A9-11, el cual se encuentra en todos los casos desnaturalizado (ver Figura II.15) y tiene su máximo WHC a pHs 9 y 10. Esto sugiere, que para que un aislado presente una alta WHC, no basta solamente con encontrarse desnaturalizado, sino que también es función de cómo se encuentran las moléculas proteicas en los agregados luego del tratamiento. Solamente aquellos agregados en que las proteínas tienen los grupos polares más accesibles al agua serán los que posean mayor WHC.

De los datos obtenidos se puede señalar que la modificación por pH mejora la WHC, especialmente en los pHs extremos (3 y 9).

Por otra parte se estudiaron las fracciones soluble e insoluble de los aislados A9, A11 y A9-11 tratados a los pHs 9 y 10 (ver punto 2.2.2). En la Figura III.5 se presentan los valores de la capacidad de retención de agua. Es notable la menor WHC de estos aislados comparados con los correspondientes a las fracciones insolubles. Estos resultados están señalando que la mayor responsabilidad de la propiedad funcional en estudio reside en la fracción

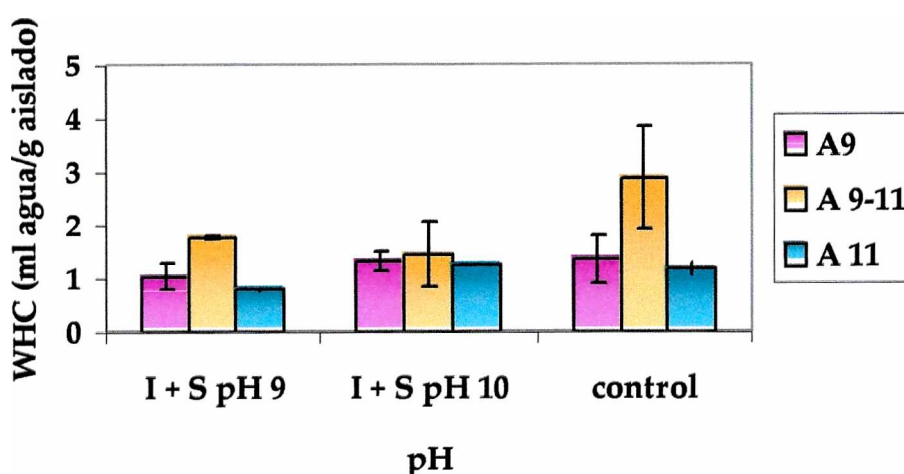


Figura III.5: Capacidad de retención de agua de la fracción insoluble y la fracción soluble de los aislados proteicos de amaranto, A9, A11 y A9-11, modificados por pH

insoluble y que la fracción soluble provoca un descenso importante en esta

propiedad debido a que estas proteínas al solubilizarse pasan a la fase líquida en desmedro de la retención del agua tal como lo lo describieran Petruccelli y Añón (1994) y Sorgentini y col. (1991).

Capacidad de absorción de agua de los aislados (WIC) A9, A11 y A9-11 modificados por tratamientos a diferentes pHs

En la **Figura III.6** se muestran, a modo de ejemplo, las curvas de absorción de agua en función del tiempo, en ellas se observa inicialmente un aumento del volumen de agua espontáneamente absorbida. Luego se llega a la etapa de saturación, donde el aislado ya no es capaz de captar más agua, aunque se mantenga en contacto con el solvente; el tiempo necesario para alcanzar el máximo volumen de agua absorbida se llama tiempo de estabilización. A partir de estas gráficas se pueden calcular la velocidad inicial con la que el aislado deshidratado absorbe el agua (v_i), el volumen máximo de agua absorbido por gramo de aislado (WIC), y el tiempo para alcanzar el equilibrio (t_e), los cuales son característicos para cada muestra y señalan la aptitud de un material para embeber agua en su estructura en forma espontánea cuando se lo pone en contacto con ella (Pilosoph, 2000; Scilingo, 2000).

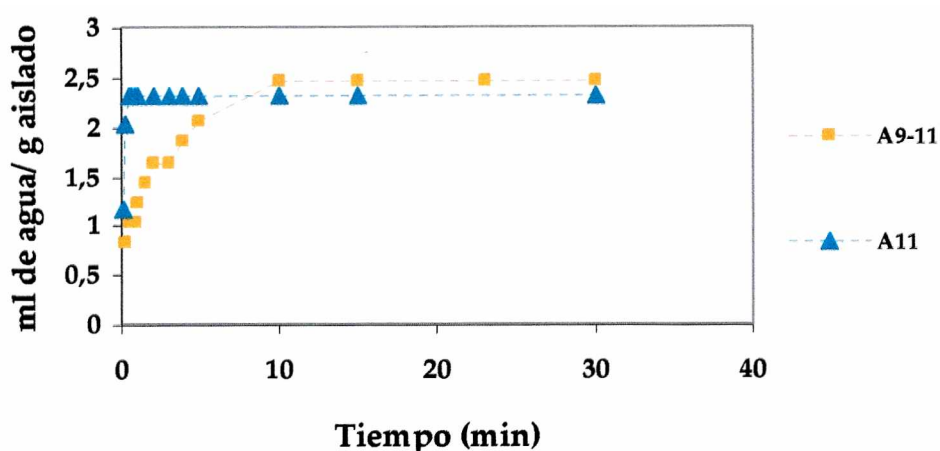


Figura III. 6: Agua espontáneamente captada por el A9-11 y el A11

El aislado A11 presentó la mayor velocidad de absorción inicial de agua

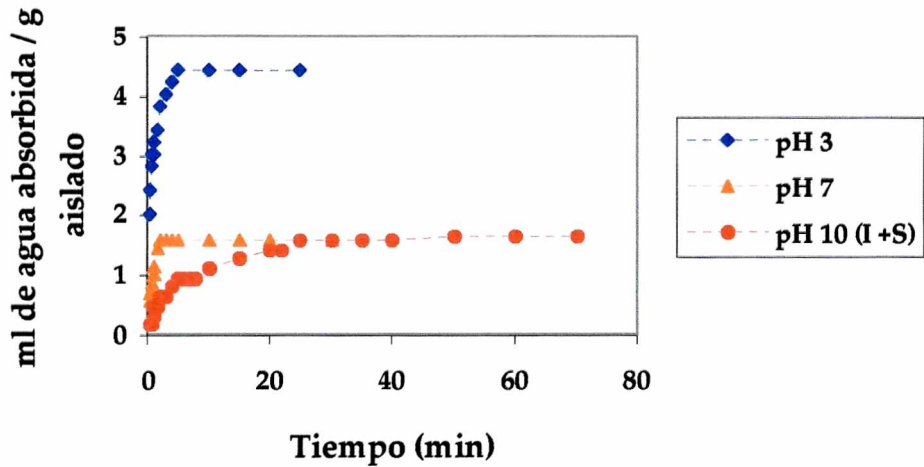


Figura III. 7: Agua espontáneamente captada la fracción insoluble del aislado A9 modificado por pH

($1,1 \pm 0,1$ ml agua/min.g aislado), el aislado A9 mostró un valor de $0,5 \pm 0,1$ ml agua/min.g aislado y el A9-11 un valor levemente menor de $0,4 \pm 0,1$ ml agua/min.g aislado; llegando al equilibrio a los 0,6 min para A11, a los 0,9 min para A9 y a los 5 min para A9-11. Estos resultados están mostrando que los aislados A9 y A11 tienen una alta velocidad de absorción de agua y que este proceso se lleva a cabo en una única etapa. En el caso del aislado A9-11 si bien la velocidad inicial de absorción de agua fue similar a la del A9, el proceso podría ser dividido en más de una etapa con velocidades decrecientes. Los valores de WIC alcanzados por cada aislado fueron para el A9 $1,7 \pm 0,3$ ml agua absorbida/g aislado, para el A11 de $2,5 \pm 0$ ml agua absorbida/g aislado y el A9-11 $2,5 \pm 0,1$ ml agua absorbida/g aislados. Estos resultados muestran una mayor capacidad de imbibición de agua para los dos aislados cuyas proteínas se encuentran más desnaturalizadas.

Se evaluó la influencia del pH sobre la capacidad de absorción de agua de los aislados para lo cual se trabajó, como anteriormente, con la fracción insoluble de los aislados A9, A11 y A9-11 modificados por pHs 3, 5, 7, y con el total (soluble +insoluble) de los aislados modificados a pHs 9 y 10.

La WIC y los parámetros cinéticos t_e y v_i , determinados a partir de curvas como las mostradas en la **Figura III.7**, se presentan en las **Figuras III.8**, **III.9** y **III.10**, donde se graficaron estos parámetros en función del pH.

En cuanto a la velocidad inicial de absorción de agua (v_i), se obtuvieron valores altos entre los pHs 3 y 7 y a pHs alcalinos fueron mucho menores y semejantes a los controles. Estas diferencias de comportamiento podrían asociarse al menor tamaño y mayor grado de disociación de las moléculas presentes a pH ácido. A pH 3 se destaca el valor superior del aislado A9-11 en relación con los otros dos aislados (**Figura III.8**).

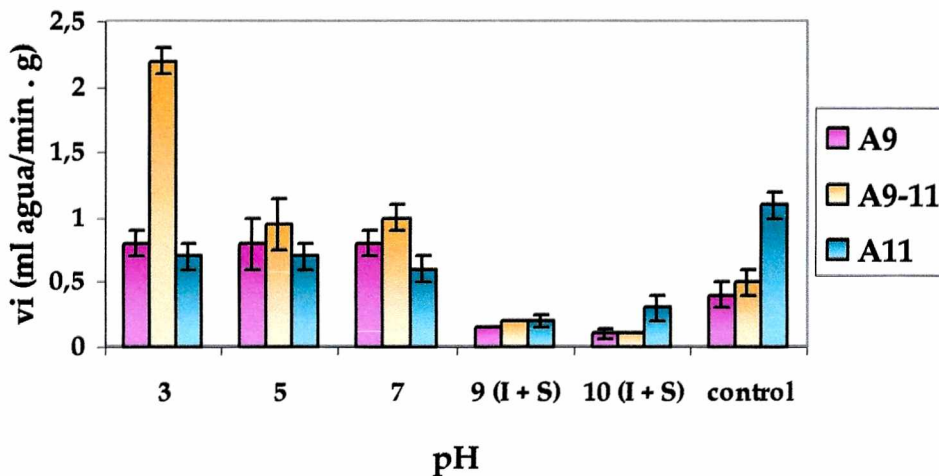


Figura III. 8: Velocidad inicial de absorción de agua de la fracción insoluble de los aislados proteicos de amaranto, A9, A11 y A9-11, modificados por pH y la fracción (I+S) a pHs 9 y 10

La mayor capacidad de imbibición de agua, WIC, se logró con los aislados tratados a pH 3,0 (**Figura III.9**), en esta condición los tres aislados mostraron valores semejantes. Cabe recordar que los aislados tratados a pH 3,0 se encuentran totalmente desnaturalizados. Para los otros tratamientos, los aislados mostraron una capacidad de imbibición de agua similar al control a excepción del aislado A9-11 tratado a pH 9,0 que presentó un valor superior. Este efecto, como se explicara anteriormente, se debería a la diferencia en la composición de las

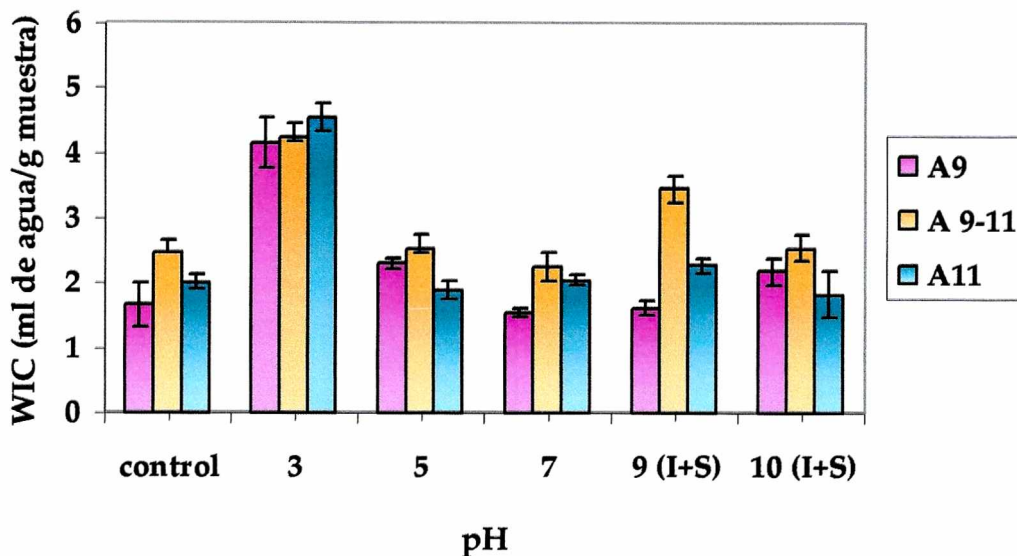


Figura III. 9: Capacidad de absorción de agua de la fracción insoluble de los aislados proteicos de amaranto, A9, A11 y A9-11, modificados por pH

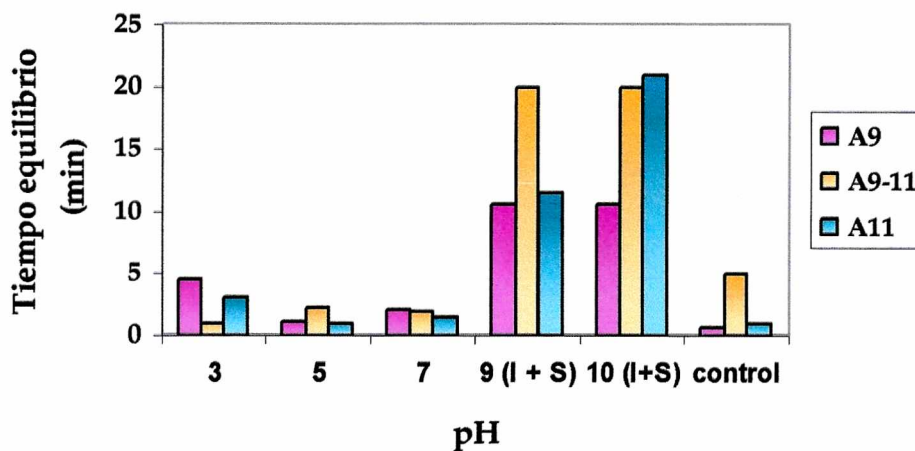


Figura III. 10: Tiempo de equilibrio (t_e) de la cinética de absorción de agua de la fracción insoluble de los aislados proteicos de amaranto, A9, A11 y A9-11, modificados por pH y la fracción (I+S) a pHs 9 y 10

fracciones solubles que intervienen tanto en la velocidad de absorción como en la capacidad que presentan los diferentes aislados.

Se puede observar que el tiempo para alcanzar el equilibrio fue muy similar ($p > 0,05$) para los tres aislados entre los pHs 3 y 7, no así a los pHs 9 y 10, condiciones en las que sube significativamente ($p < 0,05$). El tiempo de

estabilización que hemos encontrado para los aislados de amaranto en función del pH entre 3 y 7 no fue mayor que el control y los tiempos en ese rango de pH fueron menores que para la soja (Scilingo, 2000; Urbanski y col.1983). El tiempo para alcanzar el equilibrio a los pHs 9 y 10 fue muy alto, debido a que en estos pHs los aislados estaban compuestos por ambas fracciones (S+I), y es muy probable que aparte de absorber agua se hayan solubilizado en algún grado retardando de este modo el equilibrio (**Figura III.10**).

3.3.1.2. Efecto de la fuerza iónica sobre las propiedades de hidratación de los aislados A9, A11 y A9-11

Solubilidad

El estudio del efecto de la concentración de sales sobre la estabilidad de las proteínas ha sido ampliamente estudiado. La estabilización o desestabilización de una proteína es altamente dependiente del tipo de ión presente.

En la **Figura III.11** se presentan los resultados de solubilidad para los aislados A9, A11 y A9-11. Los valores de solubilidad fueron más bajos que los esperados, siendo 13% el mayor valor encontrado. Este comportamiento se podría explicar suponiendo que los aislados perdieran polipéptidos de baja

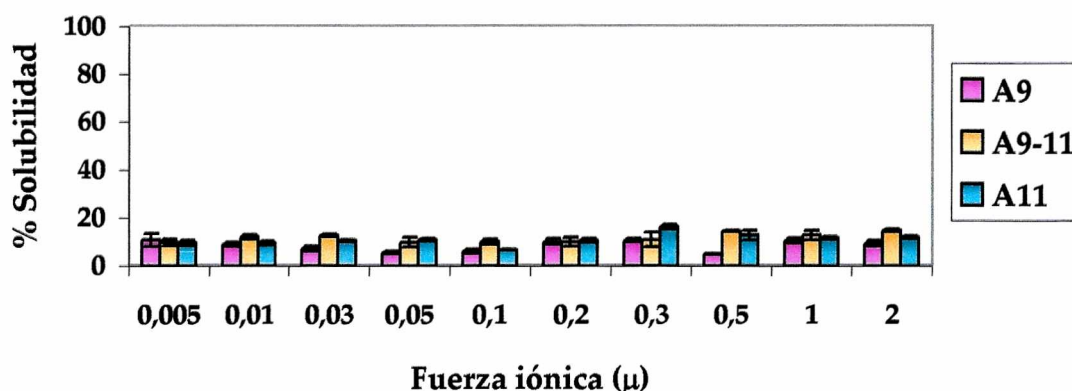


Figura III.11: Solubilidad de los A9, A11 y A9-11 en función de la fuerza iónica a pH constante = 9

masa molecular durante la diálisis (ver punto 2.2.3) y por lo tanto no aportaron a esta propiedad funcional. También pudo influir en el comportamiento

detectado el doble proceso de liofilización al que fueron sometidos los aislados, provocando modificaciones en las moléculas de proteínas que llevaron a una disminución en su solubilidad. Las variaciones encontradas en la solubilidad de los aislados A9, A11 y A9-11 a diferentes fuerzas iónicas no se consideraron de significación tecnológica dado los bajos valores mostrados.

Capacidad de retención de agua

Los resultados obtenidos en la medida de esta propiedad de los aislados en función de la fuerza iónica se muestran en la **Figura III.12**. Se analizarán los resultados de la WHC en conjunto para los tres aislados, dado que el

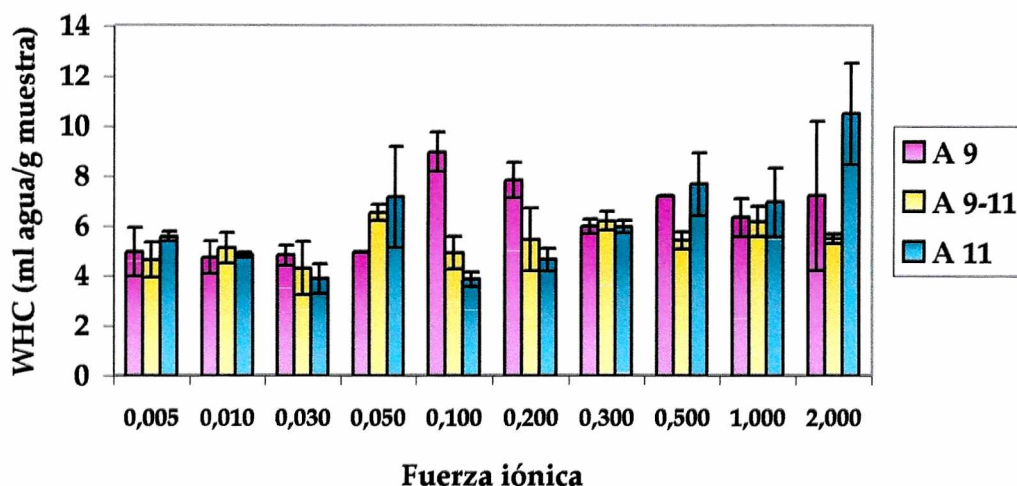


Figura III. 12. Capacidad de retención de agua de los A9, A11 y A9-11 en función de la fuerza iónica a pH constante = 9

comportamiento mostrado por ellos fue similar. Los valores encontrados para los aislados oscilaron entre 4 y 10 ml agua/g muestra, valores significativamente mayores a los de los aislados controles ($p < 0,05$). Cabe recordar que el tratamiento de diálisis y posterior liofilización redujo en forma significativa la solubilidad de los aislados a las diferentes fuerzas iónicas (**Figura III.11**) hecho que pudo haber favorecido la capacidad de retención de agua de los mismos. Los valores de WHC no presentaron grandes cambios para los tres aislados

desde fuerza iónica 0,005 hasta fuerza iónica de 0,03. A partir de fuerza iónica 0,5 los valores WHC obtenidos fueron en general levemente superiores ($p < 0,05$)

Este comportamiento podría atribuirse a la interacción con el agua.

Capacidad de absorción de agua

La capacidad de absorción de agua (WIC) para los aislados proteicos se presenta en la **Figura III.13**, se puede ver que la WIC para tres aislados no sufre grandes variaciones debido al aumento de la fuerza iónica y tampoco en relación con el control no dializado. Igualmente se observa que los valores de WIC presentados por los aislados A9 y A11 son siempre menores que para el A9-11, ello puede atribuirse al mayor grado de desnaturalización que presenta el A9-11.

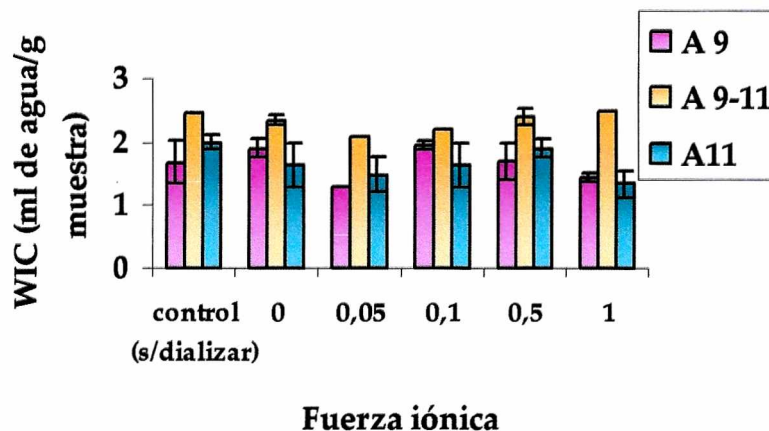


Figura III.13: Capacidad de absorción de agua para los aislados A9, A11 y A9-11 en función de la fuerza iónica a pH constante = 9

Los parámetros cinéticos t_e y v_i se graficaron en función de la fuerza iónica para cada aislado en las **Figuras III.14** y **III.15**. El comportamiento del tiempo para alcanzar el equilibrio en función de la fuerza iónica fue diferente para los tres aislados. El aislado A9 dializado mostró un valor de t_e muy superior al del control sin dializar, valor que se mantuvo hasta $\mu = 0,1$ para descender a $\mu = 0,5$ y $\mu = 1$. Por el contrario, el aislado A9-11 presentó el comportamiento inverso, menores tiempos para alcanzar el equilibrio a fuerzas iónicas inferiores a 0,1

aumentando a mayores fuerzas iónicas. Por otro lado, el aislado A11 presentó un valor relativamente constante en todo el rango de fuerzas iónicas ensayado.

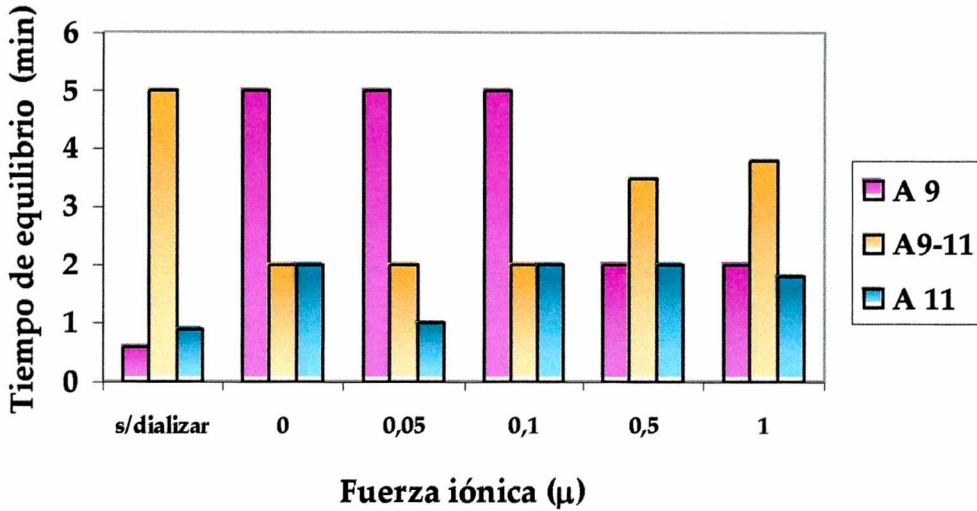


Figura III. 14: Tiempo de equilibrio t_e , de la cinética de absorción de agua de los aislados proteicos de amaranto, A9, A11 y A9-11, en función de la fuerza iónica a pH constante = 9

El tiempo para alcanzar el equilibrio que se ha encontrado para los aislados de amaranto en función de la fuerza iónica fue igual o menor a 5 min, tiempos inferiores a los presentados por aislados de soja (Scilingo, 2000; Urbanski y col., 1983).

En cuanto a la velocidad inicial de absorción de agua (Figura III.15), el

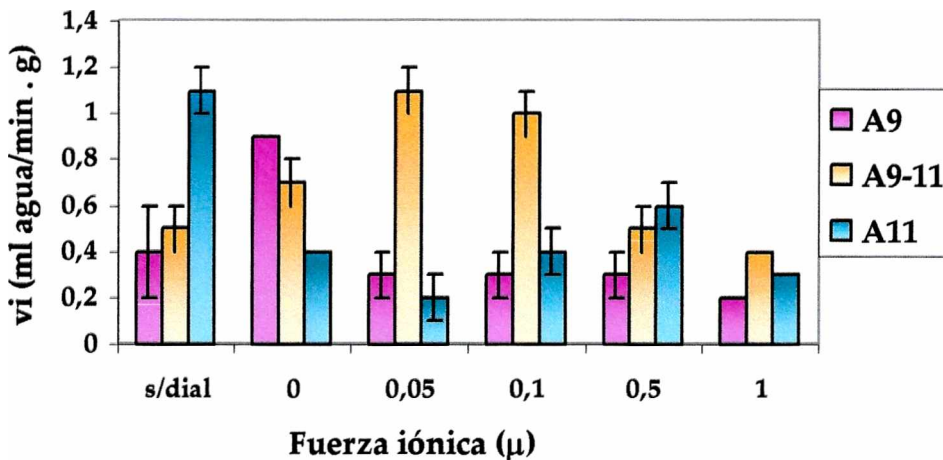


Figura III. 15: Velocidad inicial de absorción de agua de los aislados A9, A11 y A9-11, en función de la fuerza iónica a pH constante = 9

proceso de diálisis influyó en los tres aislados provocando un aumento de este parámetro en A9 y A9-11 y una disminución en A11. El posterior aumento de la fuerza iónica ($\mu = 0,05$ a $0,1$) favorece la velocidad de imbibición en el A9-11, mientras que la reduce para A9. El A11 no mostró cambios en su comportamiento con el aumento de la fuerza iónica. Este comportamiento diferente podría ser atribuido a la diferente composición de los aislados.

3.3.1.3. Efecto del tratamiento térmico sobre la capacidad de retención de agua

En la **Figura III.16** se presentan los resultados de la WHC de los aislados tratados térmicamente. Los aislados A9, A11 y A9-11 que fueron sometidos a tratamiento térmico (ver ítem 2.2.4) presentaron valores mayores de WHC que los aislados nativos. Los aislados tratados térmicamente presentaron capacidades de retención de agua similares, a excepción del A9 tratado a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ que mostró valores inferiores al conjunto y del A9-11 a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ con valores superiores. El comportamiento del aislado A9 tratado a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, podría atribuirse a la presencia de proteínas parcialmente plegadas. Los valores de capacidad de retención de agua encontrados para los aislados proteicos de amaranto sometidos a tratamiento térmico, fueron comparables a los descritos para soja

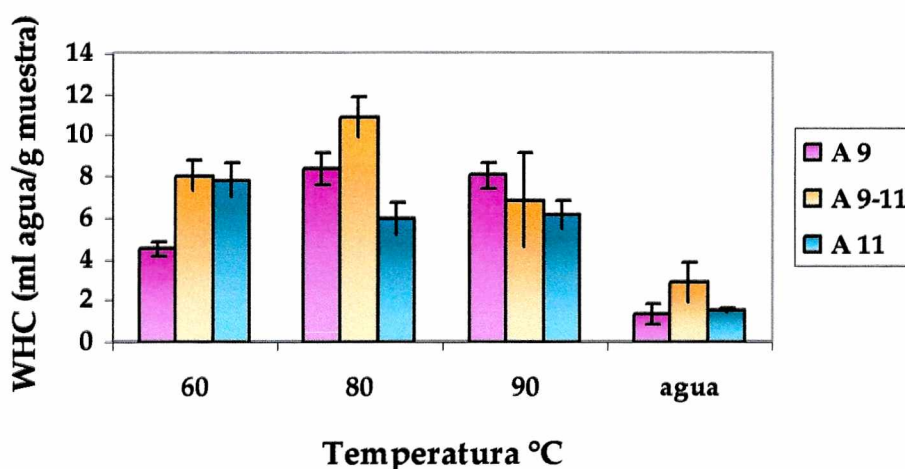


Figura III.16: Capacidad de retención de agua de los aislados A9, A11 y A9-11, tratados térmicamente

tratada térmicamente (Scilingo, 2000).

3.3.2. Propiedades espumantes de los aislados A9, A11 y A9-11

La capacidad de una proteína para actuar como un agente espumante depende de su velocidad de migración a la interfase y habilidad para formar en la misma una película viscoelástica estable.

La actividad espumante de la fracción de albúmina de amaranto ha sido estudiada por Silva-Sánchez y col. (2004), por otra parte, Fidantsi y Doxastakis (2001) han llevado a cabo algunos estudios con aislados proteicos de amaranto.

Influencia del pH

Inicialmente se analizó la influencia del pH (pHs 4, 7 y 9 y $\mu = 0,5$) sobre la capacidad para formar y estabilizar espumas de los aislados A9, A11 y A9-11. Los perfiles correspondientes a la formación de espuma obtenidos se presentan en la **Figura III.17**. Se grafica sólo el aislado A9, dado que los otros dos aislados

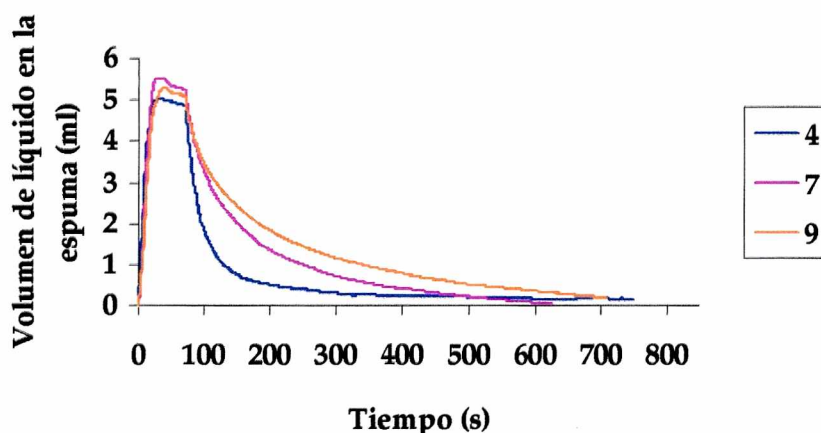


Figura III.17: Volumen de líquido incorporado a la espuma del A9 en función del pH a fuerza iónica constante = 0,5

presentaron un comportamiento similar. Se puede observar que los perfiles obtenidos son similares, excepto para el pH más ácido, donde se produjo un descenso más pronunciado del líquido incorporado a la espuma, hecho que se repitió para los aislados A11 y A9-11.

En la **Figura III.18**, se presentan los valores calculados de la velocidad inicial de formación de espuma. Los mismos oscilaron entre 9 y 19 ml/min,

valores semejantes a los descritos por Sorgentini y Wagner (2002) para aislados proteicos de soja nativos en función del pH. La velocidad inicial de incorporación de líquido a la espuma de los tres aislados no fue afectada significativamente por la variación de pH.

La estabilidad de la espuma se evaluó a través de la constante de velocidad de drenaje, K (ver ítem 1.2.11) cuyos valores se presentan en la **Figura**

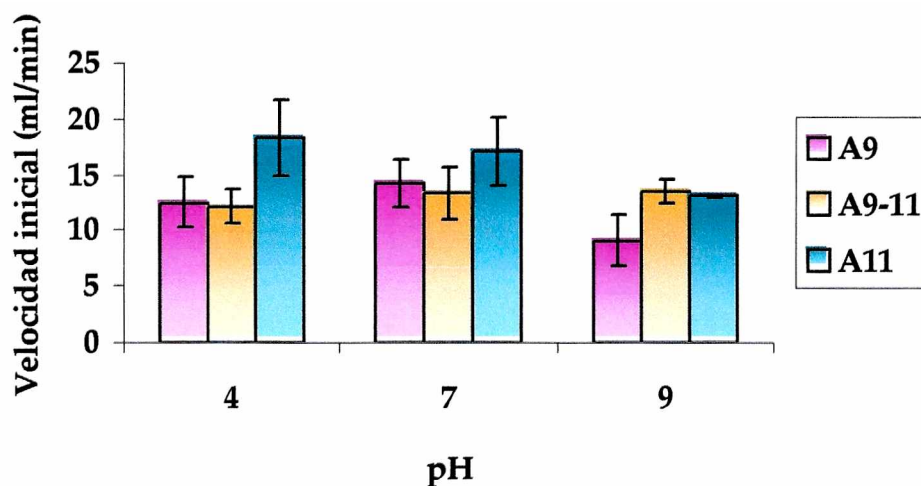


Figura III.18: Velocidad inicial de incorporación del líquido a la espuma de los aislados A9, A11 y A9-11 en función del pH a fuerza iónica constante = 0,5

III.19, se puede observar que la estabilidad de la espuma formada por los tres

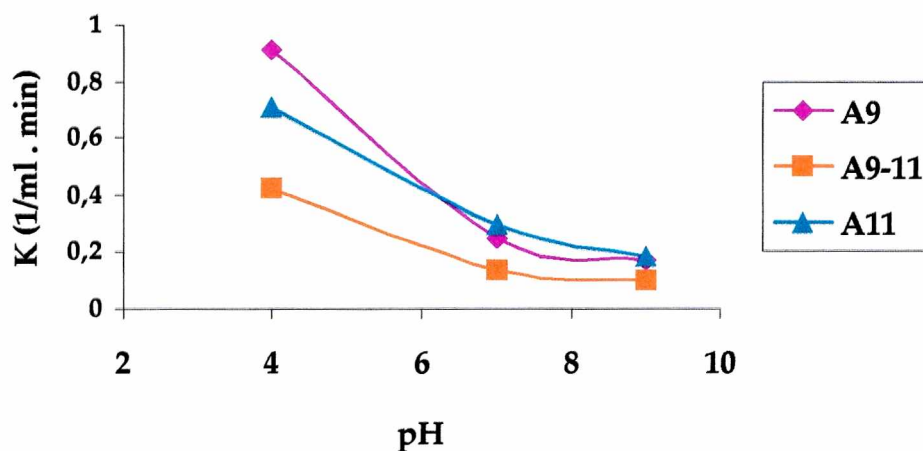


Figura III.19: Constante de velocidad de drenaje, K de las espumas en función del pH de los aislados A9, A11 y A9-11 a fuerza iónica constante = 0,5

aislados aumentó con el incremento del pH. A pH ácido la estabilidad fue mayor para el A9-11, lo sigue el A11 y finalmente el A9. Estas diferencias se hacen menores a medida que se incrementa el pH. Las espumas de amaranto resultaron ser más inestables que las formadas por seroalbúmina bovina en medio ácido o neutro. A pH alcalino la espuma formada por los aislados de amaranto, igualan la estabilidad de la espuma de seroalbúmina bovina, con una constante de velocidad de drenaje igual a $0,12 \text{ ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, (Molina y Wagner, 2002).

Influencia de la fuerza iónica

En la **Figura III.20**, se muestra el tipo de comportamiento que presentaron los aislados en función de la fuerza iónica, a modo de ejemplo se grafica el aislado A9. Se observa un aumento de la velocidad de drenaje a la mayor fuerza iónica indicando una disminución de la estabilidad de la espuma formada. Por otra parte los aislados de amaranto mostraron velocidades iniciales de formación de espuma, v_i , similares entre ellos y a todas las fuerzas iónicas estudiadas (**Figura III.21**). Los valores de la v_i , oscilaron entre 12 y 18 ml/min, valores comparables a los informados por Sorgentini y Wagner (2002)

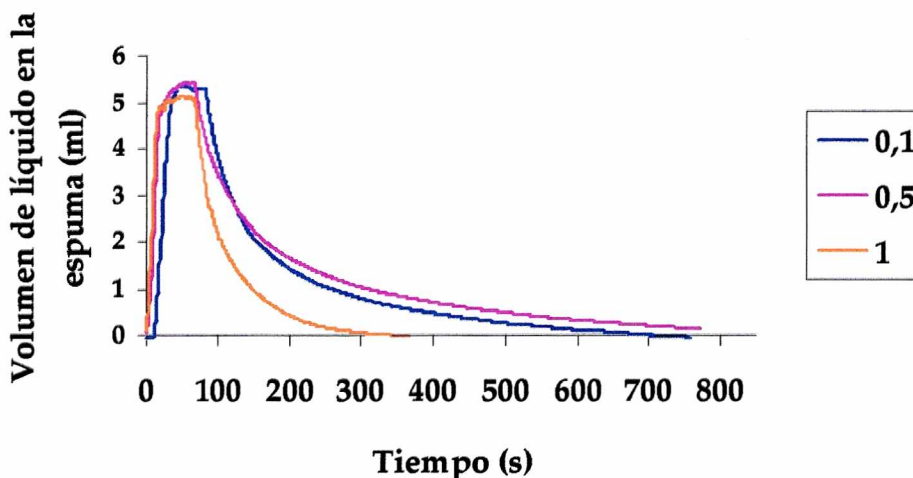


Figura III.20: Volumen de líquido incorporado a la espuma del A9 en función de la fuerza iónica a pH constante = 9

para aislados proteicos de soja y a los discutidos previamente para los aislados de amaranto a diferentes pHs (**Figura III. 18**).

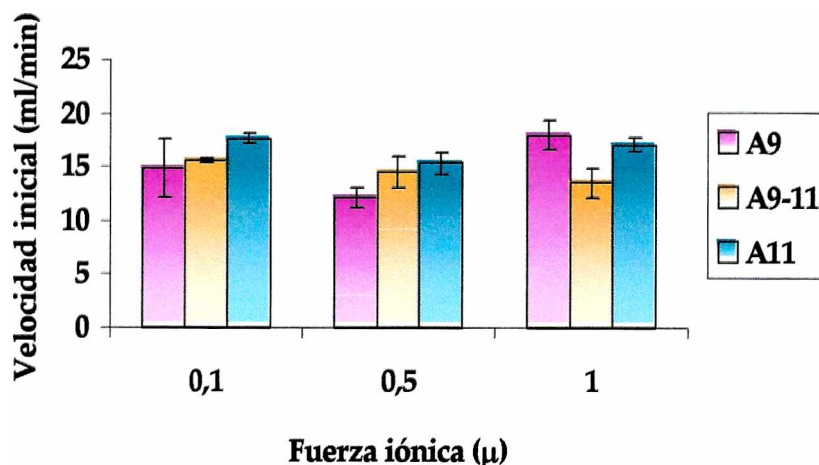


Figura III.21: Velocidad inicial de incorporación de líquido a la espuma de los aislados A9, A11 y A9-11 en función de la fuerza iónica, a pH constante = 9

En la **Figura III.22**, se presentan los valores de la constante de velocidad de drenaje, K. Se puede observar que los aislados A9 y A9-11 no se ven mayormente afectados por el efecto de la fuerza iónica, no así el aislado A11 que muestra una tendencia de aumento de la K, a medida que la fuerza iónica se incrementa, por consiguiente muestra una disminución de la estabilidad de la espuma a altas fuerzas iónicas. Para la actividad espumante no fue notorio el efecto de la fuerza iónica, lo cual es concordante con los resultados de estructura donde nos mostraron que la fuerza iónica no tuvo gran influencia en un rango amplio de fuerza iónica, a excepción de fuerzas iónicas superiores a 1 donde las moléculas de proteínas se mostraron más plegadas.

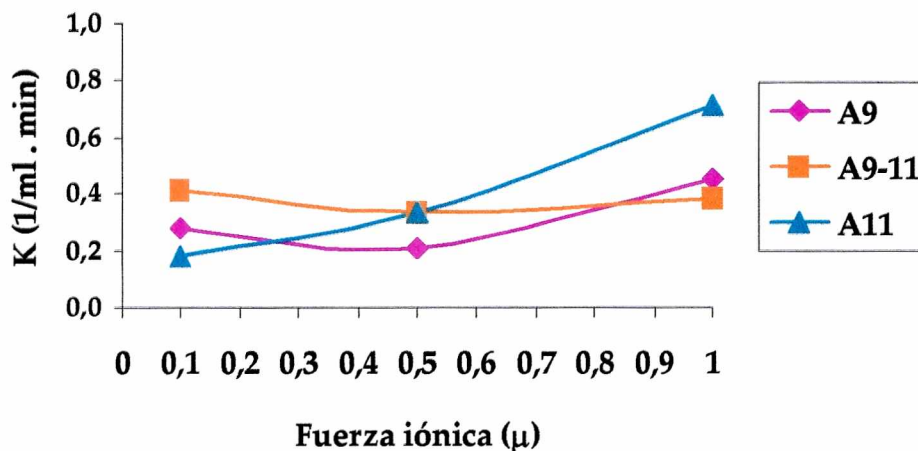


Figura III.22: Constante de velocidad de drenaje, K de las espumas en función de la fuerza iónica de los aislados A9, A11 y A9-11 a pH constante = 9

3.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La variedad estructural de las proteínas de amaranto permitió la preparación de aislados con diferentes composición y estructura que podrían presentar distintas propiedades funcionales. Se estudiaron las propiedades de hidratación de estos aislados así como la actividad espumante, como una propiedad funcional de superficie, determinándose el efecto del pH y la fuerza iónica sobre ellas.

Numerosos autores han descrito la variación de la solubilidad de proteínas alimentarias en función del pH, determinando zonas en las que la solubilidad es mínima (cerca del pI) y otras de mayor solubilidad (pHs extremos). A9, A11 y A9-11 presentaron la mayor solubilidad a pHs alcalino, similar al comportamiento descrito para proteínas de origen vegetal (Mahajan y Dua, 2002; Tomotake y col., 2002; Adebowalea y Lawal, 2003; Nieto y col. 2001, Khalid y col., 2003; Cordero-de-los-Santos y col., 2005). De acuerdo a los resultados encontrados, en la zona alcalina las proteínas se encuentran parcialmente desnaturalizadas a diferencia de pH ácido donde se encuentran

totalmente desplegadas. Este comportamiento es coincidente con una menor tendencia a la agregación de las proteínas en la zona alcalina.

En relación a la capacidad de retención de agua, esta fue muy afectada por las características fisicoquímicas y estructurales de los aislados no detectándose una correlación entre WHC y el grado de desnaturalización de las proteínas presentes. Del mismo modo tampoco se pudo observar un comportamiento de los tres aislados con el pH al que fueron tratados.

Finalmente, la capacidad de absorción de agua, WIC, fue mayor para los aislados tratados a pH ácido (pH = 3), condición en la cual los tres aislados mostraron un menor grado de estructura. La disminución de esta propiedad a pH 5 (cerca al pI) nos estaría indicando la necesidad que las proteínas presenten una carga determinada que mediante sus repulsiones facilite la formación de una estructura abierta que permita la inclusión y retención del agua. Este comportamiento es coincidente con el observado para otras proteínas (Sorgentini y col., 1991; Remondetto y col., 2001; Khalid y col., 2003).

Al estudiar el efecto de la fuerza iónica sobre las propiedades de hidratación, se pudo observar que la solubilidad encontrada para los tres aislados en todo el rango de fuerza iónica fue baja. Lo esperable era encontrar valores de solubilidad superiores en la zona de *salting-in* y menores en la zona de *salting-out*. Este comportamiento podría estar asociado a la pérdida de polipéptidos de baja masa molecular durante la diálisis a la cual fueron sometidos los aislados. Por otro lado es probable que el doble proceso de liofilización haya provocando una modificación en las moléculas de proteínas que llevó a una disminución de su solubilidad.

La capacidad de retención de agua fue levemente afectada por la fuerza iónica mostrando un aumento similar para los tres aislados a partir de μ de 0,5. Dado que los resultados obtenidos demostraron que este aumento de la fuerza iónica lleva a la formación de estructuras proteicas más compactas y termoestables el aumento de WHC no sería atribuible a los cambios

estructurales de las proteínas. El efecto a la fuerza iónica sobre esta propiedad funcional podría asociarse a la interacción del agua con la mayor concentración de iones presentes.

Por otra parte tampoco hubo una influencia marcada de la fuerza iónica sobre la capacidad de absorción de agua de los aislados proteicos ensayados.

Un mayor efecto sobre el WHC fue obtenido mediante el tratamiento térmico de los aislados, como consecuencia del mayor grado de desnaturalización alcanzado y probablemente la mayor cantidad de grupos expuestos afines al agua. Resultados similares han sido descritos para otras proteínas (Scilingo, 2000; Petruccelli y Añón, 1994).

Teniendo en cuenta que la actividad espumante esta íntimamente ligada a las características estructurales de las moléculas proteicas y dado los cambios conformacionales detectados en las proteínas de los aislados ensayados por variación del pH sería esperable que estas condiciones del medio tuvieran una influencia en la mencionada propiedad funcional. Los resultados obtenidos no mostraron el comportamiento esperado en cuanto a la capacidad de formar espumas. Esto podría atribuirse al hecho que las modificaciones estructurales sufridas por las proteínas fueran de una magnitud tal que no afectaran sus propiedades tensioactivas y/o al efecto que podría estar ejerciendo la fracción insoluble en la interfase agua-aire. Cordero de los Santos y col. (2005) observaron para un aislado de amaranto, obtenido por precipitación isoeléctrica, una disminución en la capacidad de formación de espumas con el aumento del pH; es de notar que estos autores emplearon condiciones experimentales diferentes a las del presente trabajo. Por otro lado, el pH del medio influyó directamente en la estabilidad de las espumas obtenidas a partir de los aislados estudiados, estas resultaron ser inestables en condiciones ácidas o neutra. La menor solubilidad y la presencia de especies proteicas disociadas y desnaturalizadas en condiciones ácidas serían las responsables de este

comportamiento. En condiciones alcalinas se obtuvieron espumas de alta estabilidad, equivalente a la obtenida con seroalbúmina bovina, señalando la importancia del tipo de especies proteicas presentes como son los agregados solubles de alta masa molecular y cierto grado de estructura. Cordero de los Santos y col. (2005) no observaron influencia del pH sobre la estabilidad de las espumas, obteniendo en todas las condiciones ensayadas valores altos. Este comportamiento podría atribuirse a la alta concentración proteica utilizada en estos ensayos (100 mg/ml).

La variación de la fuerza iónica del medio no tuvo una influencia importante sobre la capacidad para formar espumas de los aislados ensayados. Esta variable ejerció una influencia en la estabilidad de las espumas obtenidas en el caso de A11, dichas espumas fueron más estables a baja fuerza iónica. Bajo estas condiciones las proteínas presentes en este aislado se encontrarían desplegadas. Este resultado es coincidente con el obtenido por Mahajan y Dua (2002) para harina de amaranto.

Todos los resultados obtenidos indican que, en las proteínas de amaranto, la variación del pH del medio presenta un mayor efecto que de la fuerza iónica sobre las propiedades funcionales de las proteínas de amaranto estudiadas



CONCLUSIONES GENERALES

Con el fin de obtener conocimientos que sirvan de aporte para futuros desarrollos en la utilización de las proteínas de amaranto como ingrediente en alimentos destinados al consumo humano, en este trabajo hemos realizado estudios sobre la estructura y la funcionalidad de dichas proteínas.

Primeramente se caracterizó el comportamiento fisicoquímico de *las glutelinas* de amaranto y se analizaron las semejanzas y diferencias entre las glutelinas y la globulina-P. Las glutelinas de amaranto difieren en sus características de las glutelinas de trigo, cebada y maíz, ya que, por su estructura, estas últimas pertenecen a la familia de las prolaminas, mientras que las glutelinas de amaranto, al igual que las glutelinas de arroz, son del tipo globulina-11S. Debido a la baja solubilidad de esta fracción es necesario extraerla de la harina en condiciones extremas de pH, por lo que es difícil su obtención con la estructura que tendría en la semilla.

En este trabajo se pudieron obtener glutelinas de amaranto conservando cierto grado de plegamiento mediante la extracción con buffer borato pH 10 0,1 M (Gt-bo). El rendimiento encontrado al extraerlas con este buffer fue considerablemente menor al obtenido cuando se las extraía con NaOH 0,1M (Gt-na). Se pudo observar que la fracción Gt-na estaba desnaturalizada presentando en su composición moléculas disociadas. Por otro lado Gt-bo presentó un menor grado de estructura y menor solubilidad que la globulina-p.

Al tratar la globulina-P en un medio básico (Gp-bo), condiciones semejantes a las empleadas en la extracción de glutelina-bo, se observaron características moleculares semejantes entre Gp-bo y Gt-bo. Estos resultados sugirieron que el tratamiento alcalino modificaría la estructura de las glutelinas durante su extracción.

En base a los resultados obtenidos se concluye que las moléculas de glutelinas de amaranto presentan similitudes estructurales con las leguminas, se trataría de moléculas hexaméricas de aproximadamente 300 kDa. Esta

fracción proteica se encontraría en la semilla en forma más agregada que las otras fracciones de modo tal que su extracción sólo sería posible mediante solventes acuosos de pHs extremos.

Gt-bo presentó una solubilidad baja en buffer borato y buena capacidad para formar espumas aunque las mismas fueron poco estables. Estas propiedades responderían a una proteína parcialmente desnaturizada y agregada

A efectos de caracterizar posibles ingredientes proteicos alimentarios se analizaron algunas propiedades estructurales y funcionales de *aislados proteicos de amaranto*. Se prepararon tres aislados los cuales tenían diferentes características tanto en composición como en estructura, a saber, el A9, rico en globulinas y albúminas; el A11 compuesto por todas las fracciones proteicas y el A9-11 enriquecido en glutelinas. El A9 fue el que presentó mayor grado de estructura seguido del A11 y finalmente el A9-11, el cual presentó la estructura más desnaturizada al igual que lo describieran Martínez y Añón (1996). Las características moleculares de las proteínas de los aislados A9 y A11 fueron parecidas, con la presencia de agregados moleculares solubles, unidades estructurales y especies disociadas, no así en el caso de A9-11, que mostró principalmente especies disociadas. En todas las condiciones estudiadas se pudo observar que las fracciones solubles de los A9 y A11 fueron las que aportaron mayor estructura y mayor termoestabilidad a los aislados.

Estudios realizados en varios laboratorios han relacionado el efecto del pH sobre la conformación y la funcionalidad de las proteínas (Mahajan y Dua, 2001; Marcone y Kakuda, 1999; Tomotake y col., 2002; Adebowalea y Lawalb, 2003; Nieto y col. 2001, Tömösközi y col, 2001). En este trabajo se estudió la influencia del pH sobre la estructura y propiedades funcionales de los tres aislados mencionados, se encontraron diferencias estructurales notorias de estos aislados cuando los mismos, se encontraban en condiciones ácidas, neutra ó

básicas. Tanto en las zonas extremadamente básicas como ácidas se produjeron cambios conformacionales que incluyeron la disociación de las especies moleculares presentes. Los cambios conformacionales encontrados por alcalinización del medio fueron menores que por acidificación. De acuerdo a los datos de hidrofobicidad superficial y espectroscopía de fluorescencia se concluyó que, en los tres aislados, las especies solubles presentes a pHs ácidos eran diferentes de las encontradas en la región alcalina, estas últimas especies presentaron la máxima hidrofobicidad superficial. Por otro lado, en todo el rango de pH estudiado, se mantuvieron las diferencias en el grado de plegamiento de los aislados, así el A9 presentó un mayor grado de estructura que el A11 y a su vez el A11 mayor grado que el A9-11.

A pHs ácidos extremos y cercanos al pI (pH 3 a 5) hay un marcado descenso de la solubilidad de los aislados lo cual se correlaciona con un menor grado de estructura encontrado en esta zona de pH. Si bien la hidrofobicidad superficial es menor en los tres aislados en este extremo del pH, lo cual favorecería la solubilidad, es probable que haya influido más una disminución en la carga neta (menos repulsiones) que la disminución de las zonas hidrofóbicas. Del mismo modo, el incremento significativo de la solubilidad a pHs más alcalinos se podría atribuir a un mayor número de cargas negativas.

Como fuera mencionado en la literatura para aislados proteicos de soja, los valores altos de capacidad de absorción de agua se obtienen en condiciones de desnaturalización (Arrese y col., 1991; Añón y col., 2001; Remondetto y col., 2001) así como también un mayor grado de desplegamiento de una proteína favorece la capacidad de retención de agua (Scilingo, 2000), en las proteínas de amaranto se observó que, tanto la capacidad de absorción como la de retención de agua (WIC y WHC) adquirieron valores superiores cuando las proteínas se encontraban desnaturalizadas. Es así que los tres aislados mostraron mejor WIC

y WHC en los extremos de pH. A su vez, los aislados que presentaron mejor capacidad de imbibición de agua fueron aquellos cuyas proteínas se encuentran más desnaturalizadas, es decir el A11 y el A9-11. Finalmente la actividad espumante que presentaron los aislados fue semejante a la descrita para las proteínas de soja nativas, las espumas de amaranto resultaron ser más inestables, en medio ácido o neutro y a pH alcalino se logró alcanzar una espuma estable, comparable a la que presenta la seroalbúmina bovina.

En relación al efecto de la variación de la fuerza iónica sobre la estructura y propiedades de las proteínas de amaranto es importante destacar que, con el objeto de poder cuantificar la fuerza iónica, las proteínas utilizadas fueron sometidas a un proceso previo de diálisis y liofilización. Se pudo observar que este tratamiento influyó directamente tanto en las características conformacionales, provocando una mayor desnaturalización, como en las propiedades funcionales que presentaron los aislados, lo que se vió reflejado en un descenso considerable de la solubilidad.

Las proteínas de amaranto estudiadas se mostraron desplegadas a muy bajas fuerzas iónicas, denotando la importancia de las interacciones hidrofóbicas en la consolidación de su estructura. A una fuerza iónica superior a 0,5 las proteínas comenzaron a mostrar cierto grado de plegamiento, el cual se vió consolidado al aumentar la concentración salina del medio. La hidrofobicidad superficial fue mayor para los aislados A9 y A11, este parámetro no se vió significativamente afectado por la fuerza iónica.

En cuanto a las propiedades funcionales, estos aislados mostraron una baja solubilidad en todo el rango de fuerza iónica estudiada, probablemente debida al tratamiento previo de diálisis, como se mencionara anteriormente. Asimismo, estos aislados mostraron una capacidad de retención de agua significativamente superior a la de los aislados no dializados, la fuerza iónica

provocó un aumento progresivo leve de la WHC, especialmente en el A11. La capacidad de imbibición de agua, WIC, aunque en todos los casos fue superior a los del control sin dializar, no fue afectada por la adición de sales en ninguno de los casos. Correlacionando con estos resultados el tratamiento térmico de los aislados, que condujo a una desnaturalización y notaria disminución de la solubilidad, también favoreció las propiedades de hidratación mencionadas. Estos aislados presentaron buena capacidad de imbibición y retención de agua.

La actividad espumante de los aislados A9 y el A9-11 no fue significativamente afectados por el efecto de la fuerza iónica, no así el aislado A11, que mostró una tendencia a la disminución de la estabilidad de la espuma con el aumento de la fuerza iónica; la actividad espumante fue semejante a la de los aislados sin dializar a pH 9 y fuerza iónica 0,5.

Los tres aislados presentaron buenas propiedades de solubilidad y espumado a pH neutro y alcalino y fuerza iónica intermedia. Esto los haría aptos para ser incluidos por ejemplo en helados, cremas de repostería y postres. Las diferencias en solubilidad, WHC, WIC y características estructurales encontradas permitirían la utilización de dichos aislados en alimentos con diferente requerimiento funcional.

Este estudio contribuye a la caracterización fisicoquímica y funcional, de las glutelinas y aislados proteicos de amaranto, también hace notoria la necesidad de modificar las proteínas de amaranto en vías de incrementar sus propiedades funcionales. Esto podría lograrse mediante modificaciones físicas, químicas, enzimáticas y biotecnológicas, así como utilizando los aislados proteicos en mezclas con otras proteínas o macromoléculas como hidrocoloides. Por otro lado se ve la necesidad de investigaciones tecnológicas para promover la obtención de aislados proteicos de amaranto a nivel industrial. También sería importante propender a la educación del consumidor a efectos de mostrar las ventajas del consumo de amaranto y así llegar a su utilización a nivel masivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, T.; Gusti, R. S.; Ono, M. y Sasahara, T. Variations in glutelina and high molecular weight endosperm proteins among subspecies of rice (*Oriza sativa* L) detected by two-dimensional gel electrophoresis. *Genes Genet. Syst.* **1996**; 71, 63-68.
- Adebowale, O y Lawal, S. Foaming, gelation and electrophoretic characteristics of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrates. *Food Chem.*, **2003**; 83, 237-246.
- Andrásófszky, E.; Szöcs, Z.; Fekete, S. y Jelenits K. Evaluation of the nutritional value of the amaranth plant. I. Raw and heat-treated grain tested in experiments on growing rats. *Acta Veter. Hungarica*, **1998**; 46: 47-59.
- Añón, M.C. y Jovanovich, G. Calorimetría diferencial de barrido. Editorial Universitaria de Buenos Aires. 1ª Edición, **2000**, pp. 99.
- Añón, M.C.; Sorgentini, D. y Wagner, J. Relationships between different hydration properties of commercial and laboratory soybean isolates. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49: 4852-4858.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists Inc. *Official Methods of Analysis*, ed. 14; Ed. Williams, S.; Arlington, VA, **1984** ; Método 2.057, pp 16.
- Aphalo, P.; Castellani, O.; Martínez, N. y Añón, M.C. Surface physicochemical properties of globulin-P amaranth protein. *J. Agric. Food Chem.* **2004**; 52: 616-622.
- Arrese, E.; Sorgentini, D.; Wagner, J. y Añón, M.C. Electrophoretic, solubility, and functional properties of commercial soy protein isolates. *J. Agr. Food*

Chem., 1991, 39, 1029-1032.

Avanza MV, Puppo MC, y Añón MC.. Structural characterization of amaranth protein gels. *J. Food Sci.*, 2005, 70, 3: E223-229.

Badley, R.; Atkinson, D.; Hauser, H.; Oldani, D.; Green, J. y Stubbs, J. The Structure, Physical and Chemical Properties of the Soybean Protein Glycinin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1975; 412: 214-228.

Barba de la Rosa, A. P.; Paredes-López, O. y Gueguen, J. Characterization of Amaranth Globulins by Ultracentrifugation and Chromatographic Techniques. *J. Agric. Food Chem.* 1992a; 40: 937-940.

Barba de la Rosa, A. P.; Gueguen, J.; Paredes-López, O. y Viroben, G. Fractionation Procedures, Electrophoretic Characterization, and Amino Acid Composition of Amaranth Seed Proteins. *J. Agric. Food Chem.* 1992b; 40: 931-936.

Becker, R.; Wheeler, E.; Lorenz, K.; Stafford, A.; Grosjean, O.; Betschart, A. y Saunders, R. A Compositional Study of Amaranth Grain. *J. Food Sci.* 1981; 46: 1175-1180.

Baumann, H. Apparatur nach Baumann zur testimmung der flussigkeitsaufnahme von pulvrigen substanzen. Glas-und instrumententechnik. *Fachzeitschrift für das laboratorium*, 1967;11, 540-548.

Becker, R., Wheeler, E.L., Lorenz, K., Stafford, A.E., Grosjean, O.K., Betschart, A.A. y Saunders, R.M. A compositional study of amaranth grain. *J. Food Sci.*, 1981; 46, 1175.

Betschart, A. A.; Irving, D. W.; Shepherd, A. D. y Saunders, R. M. *Amaranthus Cruentus*: Milling characteristics, distribution of nutrients within seed

- components, and the effects of temperature on nutritional Quality. *J. Food Sci.* **1981**; 46: 1181-1187.
- Bewley, J.D. and M. Black. Seeds. Physiology of development and germination, 2nd Edn. Plenum Press, New York, **1994**; p. 445.
- Bourgeois, C. y Le Roux, P. Proteínas animales. 1ª edición. Editorial El manual Moderno. México, **1986**.
- Bressani, R. The proteins of grain amaranth. *Food Rev. Inter.* **1989**; 5: 13-38.
- Bressani, R y García-Vela, L. A. Protein fractions in amaranth grain and their chemical characterization. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38: 1205-1209.
- Casey, R.; Domoney, C. y Ellis, T. H. N. Legume storage proteins and their genes. *Oxf. Surv. Plant Mol. Cell Biol.* **1986**, 3: 1-95.
- Castellani, O. Caracterización estructural y física de la globulina-P de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). Tesis doctoral, UNLP, **2000**.
- Castellani, O.; Martínez, N. y Añón, M.C. Structural modifications of an amaranth globulin induced by pH and NaCl. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 4846-4853.
- Catsimpoolas, N.; Campbell, T. y Meyer, E. Association-dissociation phenomena in glycinin. *Arch. Biochem. Biophys.* **1969**, 131: 577-586.
- Ceprobol. Sistema de información y asesoramiento en comercialización para productores agrícolas. Amaranto boliviano: <http://www.ceprobol.gov.bo/perfilesMercado/perfilAmaranto.htm>
- Cheftel, J.; Cuq, J. y Lorient, D. Proteínas alimentarias.. Editorial Acribia, Zaragoza, España. **1989**; Capítulo 4, pp. 49-100.

- Chen, S. y Paredes-López, O. Isolation and characterization of the 11s globulin from amaranth seeds. *J. Food Biochem.* **1997**; 21: 53-65.
- Chirido, F., Rumbo, M.; Añón, M.C. y Fossati A. Presence of high levels of non-degraded gliadin in breast milk from healthy mothers. *Scand J Gastroenterol.*, **1998**, 33, 11, 1186-92.
- Chirido, F.; Garrote, J. y Arranz, E. Enfermedad celíaca. Nuevas perspectivas terapéuticas basadas en un mejor conocimiento de su patogenia molecular. *Acta Gastroenterol. Latinoam.*, **2005**, 35, 183-189.
- Chrastil, J.; Zarins, Z. Influence of storage on peptide subunit composition of rice oryzenin. *J. Agric. Food Chem.* **1992**; 40, 927-930.
- Coates, J. B.; Medeiros, J. S.; Thanh, V. H. y Nielsen, N. C. Characterization of the Subunits of β Conglycinin. *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**; 243: 184-194.
- Cordero-de-los-Santos, J.; Osuna-Castro, A.; Borodanenko A. y Paredes-López O. Physicochemical and functional characterisation of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellisation. *Food Sci. and Tech. Inter.*, **2005**, 11, 4, 269-280.
- Damodaran, S. Protein-stabilized foams and emulsions. En S. Damodaran & A. Paraf Eds., *Food proteins and their applications*, New York, Marcel Dekker, **1997**; Cap. 3, 57-110.
- Damodaran, S. y Kinsella, J. E. Effects of Ions on Protein Conformation and Functionality. En: *Protein Deterioration*. Ed. Cherry, J., Food Ithaca, NY 14853: Am. Chem. Soc.; **1982**; pp. 301-357
- Derbyshire, E.; Wright, D. J. y Boulter, D. Legumin and vicilin, storage proteins

- of legume seeds. *Phytochemistry*. **1976**; 15: 3-24.
- Duarte-Correa, A.; Jokl, L. y Carlsson, R. Amino Acid Composition of Some Amaranthus Sp. Grain Proteins and of Its Fractions. *Arch. Latinam. Nutr.* **1986**; 26: 466-476.
- Ericson, M.L., Rodin, J., Lenman, M., Glimelius, K., Josefsson, L.-G. y Rask, L. Structure of the rapeseed 1.7 S storage protein, napin, and its precursor. *J. Biol. Chem.* **1986**; 261, 14576-14581.
- Eskin, M. Biochemistry of foods. Segunda Edición. Academic Press, California, **1990**, pp. 176-182.
- FAO. Sistema mundial de información sobre la agricultura y la alimentación. Perspectivas alimentarias. **2005**; Febrero N ° 1.
- FAO/OMS Ad Hoc Expert Committee. Energy and Protein Requirements. *Tech. Report Series 522; FAO Nutrition Meetings Report Series No. 52*. WHO, Geneva, FAO, Rome. **1973**.
- Fidantsi, A. y Doxastakis, G. Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2001**; 21 119-124.
- Field, J. M.; Tatham, A. S. y Shewry, P. R. The Structure of a High-Mr Subunit of Durum Wheat (*T. Durum*) Gluten. *Biochem. J.* **1987**; 247: 215-221.
- Fukushima, D. Recent progress of soybean protein foods: chemistry, technology, and nutrition. *Food Rev. Intern.* **1991**; 7: 323-351.
- Gauthier, S. y Pouliot, Y. Functional and biological properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, **2003**, 86, E78-E87.

- German, B y Phillips L. Protein interaction in foams: Protein-gas phase interactions. Cap. 6 Protein Functionality in Food Ssystems Editadso por N. Hettiarachchy y G. Ziegler. Marcel Decker, 1994, Nueva York, pag. 181-208.
- Gorinstein, S.; Moshe, R.; Greene, L. y Arruda, P. Evaluation of four amaranthus species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition. *J. Agric. Food Chem.* 1991; 39: 851-854.
- Gorinstein, S.; Zemser, M.; Friedman, M.; Vasco-Méndez, N. y Paredes-López, O. Denaturant induced conformations of globulins. *J. Agric. Food Chem.* 1996a; 44: 93-99.
- Gorinstein, S.; Zemser, M. y Paredes-López, O. Structural stability of globulins. *J. Agric. Food Chem.* 1996b; 44: 100-105.
- Gorinstein, S.; Zemser, M.; Friedman, M.; Rodrigues, W. A.; Martins, P. S.; Vello, N. A.; Tosello, G. A. y Paredes-López, O. Physicochemical characterization of the structural stability of some plant globulins. *Food Chem.* 1996c; 56: 131-138.
- Gorinstein, S.; Zemser, M.; Fliess, A.; Shnitman, I.; Paredes-López, O.; Yamamoto, K.; Kobayashi, S. y Taniguchi, H. Computational Analysis of the Amino Acid Residue Sequences of Amaranth and Some Other Proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998; 62(10): 1845-1851.
- Gorinstein, S.; Delgado-Licon E.; Pawelzik E.; Permady H.; Weisz M. y Trakhtenberg S. Characterization of soluble amaranth and soybean proteins based on fluorescence, hydrophobicity, electrophoresis, amino Acid analysis, circular dichroism, and differential scanning calorimetry measurements. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49, 11:5595-601.

- Gueguen, J.; Chevalier, M. y Barbot, J. y Schaeffer F. Dissociation and aggregation of pea legumin induced by ph and ionic strength. *J. Sci. Food Agric.* **1988**; 44: 167-182.
- Gueguen, J. Relation between conformation and surface hydrophobicity of pea (*Pisum sativum* L.) globulins. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, 37, 1236-1241.
- Guerra-Matias, A. y Areas, M. Glycemic and insulinemic responses in women consuming extruded amaranth (*Amaranthus cruentus* L). *Nutrition Research*, **2005**, 24, 815–822.
- Hardy, j.; Scher, j. y Banon, S. Review: Water activity and hydration of dairy powders. *Lait*, **2002**, 82, 441 – 452.
- Harlow, E. y Lane, D. Antibody-antigen interactions. En: *Antibodies: A laboratory manual*. Plainview, NY; **1988**; pp. 23-35.
- Harwalkar, V. R. y Ma, C. Y. Study of thermal properties of oat globulin by differential scanning calorimetry. *J. Food Sci.* **1987**; 52: 394-398.
- He, H; Ca, Y. y Corke, H. Extraction and purification of squalene from amaranthus Grain. *J. Agric. Food Chem.* **2002**; 50, 368-372.
- Hermansson, A.. Functional properties of proteins for foods-swellings. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **1972**; 5, 24-29.
- Hopp, T. P. Protein surface analysis: methods for identifying antigenic determinants and other interaction sites. *J. Immunol. Methods.* **1986**; 88: 1-18.
- Horstmann, C.; Schlesier, B.; Otto, A.; Kostka, S. y Müntz, K. Polymorphism of legumin subunits from field beans (*Vicia Faba* L. *var.* *minor*) and its relation to the corresponding multigene family. *Theor. Appl. Genet.* **1993**; 86, 867-874.
- Irving, D.W., Betschart, A.A., and Saunders, R.M. Morphological studies on

- Amaranthus cruentus. *J. Food Sci.* **1981**; 46, 1170.
- Jack, L.; Durand, M. y Stone, H. Timing film formation during T1 process. Harvard deas reu program, final report, **2003**. http://www.eduprograms.deas.harvard.edu/reu03_papers/Jack.L.FinReport03.pdf.
- Ju, Z. Y.; Hettiarachchy, N. S. y Rath, N. Extraction, denaturation and hydrophobic properties of rice flour proteins. *J. Food Sci.* **2001**; 66, 229-232.
- Kasarda, D. Glutenin structure in relation to wheat quality. En: Wheat is unique. : Pomeranz. St. Paul, Mn.: Amer. Assoc. Cereal Chem. **1989**; 277-302.
- Kato, A. y Nakai, S. Hydrophobicity Determined by a Fluorescence Probe Method and Its Correlation With Surface Properties of Proteins. *Bioch. Biophys. Acta.* **1980**; 624: 13-20.
- Kato, A.; Matsuda, T.; Matsudomi, N. y Kobayashi, K. Determination of protein hydrophobicity using a sodium dodecyl sulfate binding method. *J. Agric. Food Chem.* **1984**, 32, 284-288.
- Khalid, E.; Babikerb, E. y Tinay, A. Solubility and functional properties of sesame seed proteins as influenced by pH and/or salt concentration. *Food Chemistry*, **2003**, 82, 361-366.
- Khalil, A. Nutritional improvement of an Egyptian breed of mung bean by probiotic lactobacilli. *African J. of Biotech.* **2006**; 5, 2, 206-212.
- Kim, W.T., y Okita, T.W. Structure, expression, and heterogeneity of the rice seed prolamines. *Plant Physiol.* **1988**; 88, 649-655.
- Kinney, A. Engineering soybeans for food and health. *Ag.Bio. Forum.* **2003**; 6,

18-22.

- Kinsella, J. E. Functional properties of soy proteins. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1979**; 56: 242-258.
- Kinsella, J.E. Milk proteins: physicochemical and functional properties. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1984**; 21, 3, 197-262.
- Kinsella, J. E. y Phillips, L. Structure: function relationships in food proteins, film and foaming behaviour. En: *Food Proteins*. Ed. Kinsella, J. y Soucie, W. Champaign, IL. Am. Oil Chem. Soc. **1989**; pp. 52-77.
- Konishi, Y. y Yoshimoto, N. Amaranth Globulin As a Heat-Stable Emulsifying Agent. *Agric. Biol. Chem.* **1989**; 53: 3327-3328.
- Konishi, Y.; Horikawa, K.; Oku, Y.; Azumaya, J. y Nakatani, N. Extraction of Two Albumin Fractions From Amaranth Grains: Comparison of Some Physicochemical Properties and the Putative Localization in the Grains. *Agric. Biol. Chem.* **1991**; 55: 1745-1750.
- Konishi, Y.; Fumita, Y.; Ikeda, K.; Okuno, K. y Fuwa, H. Isolation and Characterization of Globulin From Seeds of *Amaranthus Hypochondriacus*. *J. Agric. Biol. Chem.* **1985**; 49: 1453-1459
- Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* **1970**; 227: 680-685.
- Larmour, R. K. A comparative study of the glutelins of the cereal grains. *J Agricultural Research.* **1927**; 35, 12, 1091-1118.
- Lawal, O. Kosmotropes and chaotropes as they affect functionality of a protein isolate. *Food Chem.* **2006**; 85, 101-107.

- Lima, M.; Zingali, R.; Fogue, D. y Monteiro, R. New insights into conformational and functional stability of human α -thrombin probed by high hydrostatic pressure. *Eur. J. Biochem.* **2004**; 271, 3580–3587.
- Loisel, W.; Guéguen, J. y Popineau, Y. A new apparatus for analysing foaming properties of proteins". In *Food Proteins: Structure and Functionality*, K.D. **1993**; Schwenke and R. Mothes (Eds.), VHC Publishers, New York, pp 320-323.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall, R. J. Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**; 193: 265-275.
- Lyon, C.K. y R. Becker. Extraction and refining of oil from amaranth seed. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1987**, 64, 233-236.
- Mahajan y Dua. Salts and pH induced changes in functional properties of amaranth (*Amaranthus tricolor L.*) Seed Meal. *Cereal Chem.*, **2002**, 79, 6, 834–837.
- Mandal, S. y Mandal, R. Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering. *Current Science*, **2000**, 79, 5, 10.
- Marcone, M. F. Evidence Confirming the Existence of a 7S globulin-like storage protein in *Amaranthus hypochondriacus seed*. *Food Chem.* **1999**; 65: 533-542.
- Marcone, M. F. First Report of the Characterization of the threatened plant species *Amaranthus Pumilus* (Seabeach Amaranth). *J. Agric. Food Chem.* **2000**; 48: 378-382.
- Marcone, M. F. y Yada, R. Y. Evidence for the phosphorylation and

- glycosylation of the amaranth 11s globulin (Amaranthin). *J. Food Biochem.* **1997**; 21: 341-369.
- Marcone, M. F. y Yada, R. Y. Structural Analysis of Globulins Isolated From Genetically Different *Amaranthus* Hybrid Lines. *Food Chem.* **1998**; 61: 319-326.
- Marcone, M. F. y Yada, R. Y. Isolation, purification, and characterization of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus Hypochondriacus*. *Agric. Biol. Chem.* **1991**; 55: 2281-2289.
- Marcone, M. F.; Beniac, D.; Harauz, G. y Yada, R. Quaternary structure and model for the oligomeric seed globulin from *Amaranthus Hypochondriacus* K343. *J. Agric. Food Chem.* **1994**; 42: 2675-2678.
- Marcone, M. F.; Kakuda, Y. y Yada, R. Y. Salt-soluble seed globulins of dicotyledonous and monocotyledonous plants II. Structural characterization. *Food Chem.* **1998**; 63: 265-274.
- Marcone, M. y Kakuda, Y. Functional properties of amaranth and soybean globulins. A comparative study of the functional properties of amaranth and soybean globulin isolates. *Nahrung/Food.* **1999**; 43: 6, 368 – 373.
- Martínez, E. N. Tesis Doctoral. Caracterización de proteínas de amaranto. *Universidad Nacional De La Plata.* **1997**.
- Martínez, E. N.; Castellani, O. F. y Añón, M. C. Common molecular features among amaranth storage proteins. *J. Agric. Food Chem.* **1997**; 45: 3832-3839.
- Martínez, N. E. y Añón M. C. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An Electrophoretic and calorimetric study. *J. Agric. Food Chem.* **1996**; 44: 2523-2530.

- Miflin, B.J., Feld, J.M., y Shewry, P.R. Cereal storage proteins and their effects on technological properties. In *Seed Proteins*, J. Daussant, J. Mosse, and J. Vaughan, eds (London: Academic Press), **1983**, pp. 255-319.
- Molina, S. y Wagner, J. Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food Research International*. **2002**; 35: 511–518.
- Molina, S. y Añón, M.C.. Análisis of products, mechanisms of reaction and some functional properties of soy protein hydrolysates. *JAOCS*. **2000**; 77: 1293-1301.
- Mujica-Sánchez, A. El cultivo del amaranto (*Amaranthus* spp.): producción, mejoramiento genético y utilización. Oficial Regional de Producción Vegetal, FAO, **1997**.
- Müntz, K. Proteases and Proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledoneous seeds. *J. Exp. Botany*. **1996**; 47: 605-622.
- Muench, D. G. y Okita, T. W. The storage proteins of rice and oats. En: *Cellular and molecular biology of plant seed development*. Ed. Larkins, B. A. y Vasil, I. K., Netherlands: Kluwer Academic Publishers. **1997**; pp. 289-330.
- Mwasaru, M.; Muhammad, M.; Bakar, J. y Che Man, Y. Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeonpea (*cajanus cajan*) and cowpea (*vigna unguiculata*) protein isolates.ii. functional properties. *Food Chem*. **1999**; 67: 445 – 452.
- National Academy of Sciences. Underexploited tropical plants with promising economic value. Editado por National Academy of Sciences Press,

Washington, 1975.

Nielsen, N. C.; Bassüner, R. y Beaman. T. En: The biochemistry and cell biology of embryo storage proteins. Cellular and molecular biology of plant seed development. Ed. Larkins, B. A. y Vasil, I. K. Netherlands: Kluwer Academic; 1997; 151-220.

Nielsen, N. C.; Dickinson, C. D.; Cho, T.-J.; Thanh, V. F.; Scallon, B. J.; Fischer, R. L.; Sims, T. L.; Drews, G. N. y Glodberg, R. B. Characterization of the glycinin gene family in soybean. *Plant Cell*. 1989; 1: 313-328.

Nieto, V.; Narain, N.; Silva, J. y Bora, P. Functional properties of raw and heat processed cashew nut (*Anacardium occidentale, L.*) kernel protein isolates. *Nahrung/Food*. 2001; 45: 4, 258 – 262.

Nkonge, C. y Balance, M. A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in micro-Kjeldhal digests. . *J. Agric.Food Chem*. 1982; 30: 416-420.

Osborne, T. En. The Vegetable Proteins. 2da. edición ed. Longmans y Green, Nueva York.; 1924.

Paredes-Lopez, O.; Mora-Escobedo, R. y Odorica-Falomir, C. Isolation of amaranth proteins. *Lebensm. Wiss. Technol*. 1988; 21: 59-61.

Paredes-López, O.; Mendoza, V. y Mora, R. Isolation of amaranth flour proteins by fractionation procedures and sonication. *Plant Foods Hum. Nutr*. 1993; 43: 37-43.

Pedroche, J. Yust, M.; Girón-Calle; Vioque, J.; Alaiz, M. y Millán, F. Plant protein hydrolysates and tailor-made foods. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem*. 2003, 2: 1, 233-235.

- Peng, I. C.; Quass, D. W.; Dayton, W. R. y Allen, C. E. The Physicochemical and functional properties of soybean 11s globulin- A Review. *Cereal Chem.* **1984**; 61: 480-490.
- Petrucelli, S. y Añón, M.C. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 1 Structural and hydration properties. *J. Agric. Food Chem.* **1994**; 42, 2161-2169.
- Petrucelli, S. y Añón, M. C. Partial reduction of soy protein isolate disulfide bonds. *J. Agric. Food Chem.* **1995**; 43; 2001-2004.
- Phillips R. D. y J.W. Finley Protein quality and the effects of processing. Marcel Dekker. USA.Inc. **1989**.
- Pilosof, A. Propiedades de hidratación en: Caracterización funcional y estructural de proteínas. Editorial Universitaria de Buenos Aires. 1ª Edición, **2000**, pp- 17 – 39.
- Poole, S y Fry, J. High performance protein foaming and gelation systems. En *Developments in Food Proteins*, 5, **1987**, J. F. Hudson. Elsevier Applied Science, Londres, pg. 258-263.
- Ragab, D.; Babiker E. y Eltinay, A. Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration. *Food Chem.* **2004**; 84: 207–212.
- Remondetto, G; Añón, M.C. y González, R. Hydration Properties of Soybean Protein Isolates. *Brazilian Arch. Of Biol. Tech.* **2001**; 44, 4: 425 – 431.
- Richardson, T. y J.W. Finley Chemical changes in food during processing. AVI Publishing Company, Inc. **1985** USA.
- Royer, C. Approaches to teaching fluorescence spectroscopy. *Biophysical Journal.* **1995**; 68: 1191-119.
- Saunders, R. y Becker R. Amaranthus: a potential food and feed resource. En:

Advances in Cereal Science and Technology. Ed. Pomeranz, Y. St. Paul.:
American Association of Cereal Chemists; 1984; pp. 357-397.

Schwenke, K.D. Reflections about the functional potential of legume proteins.
Nahrung. 2001; 45:377-381.

Scilingo, A. Propiedades estructurales y funcionales de aislados proteicos de soja
modificados. Efecto de la presencia de calcio. Tesis Doctoral, 2000,
Universidad Nacional de La Plata.

Scilingo, A. y Añón, M. C. Calorimetric study of soybean protein isolates: effect
of calcium and thermal treatments. *J. Agric. Food Chem.* 1997; 44: 3751-3756.

Scilingo, A.; Molina, S.; Martínez, N. y Añón, M.C. Amaranth protein isolates
modified by hydrolytic and thermal treatments. Relationship between
structure and solubility. *Food Res. Int.* 2002; 35: 855-862

Segura-Nieto, M.; Barba de la Rosa, A. P. y Paredes-López, O. Biochemistry of
amaranth proteins. En: Amaranth. Biology, Chemistry, and Technology. Ed.
Paredes-López, O. Boca Ratón: CRC; 1994; pp. 75-106.

Segura-Nieto, M.; Vázquez-Sánchez, N.; Rubio-Velázquez, H.; Olguín-Martínez,
L. E. y Rodríguez-Néster, C. E. y Herrera-Estrella L. Characterization of
amaranth (*Amaranthus Hypochondriacus L.*) seed proteins. *J. Agric. Food
Chem.* 1992; 40: 1553-1558.

Shewry, P. R.; Tatham, A. S.; Forde, J.; Kreis, M. y Mifflin, B. J. The Classification
and nomenclature of wheat gluten proteins: A Reassessment. *J. Cereal Sci.*
1986; 4: 97-106.

Shewry, J.; Napier, A. y Tatham A. Seed storage proteins: structures and
biosynthesis. *The Plant Cell*, 1995, 7, 945-956.

- Shewry, P. y Casey, R. Seed proteins, Edited by Academic Publishers **1999** Netherlands. Cap 17.
- Snow, S. y Brooks, J. Fractionation of rice glutelin polypeptides using gel filtration chromatography. *J. Food Sci.* **1989**; 54: 730-733.
- Sindayikengera, S. y Xia, W. Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from Protamex. *J Zhejiang Univ Sci.* **2006**; 7: 2, 90-98.
- Silva-Sánchez, A; González-Castañeda, J.; De León-Rodríguez, A. y Barba de la Rosa, A. Functional and rheological properties of amaranth albumins extracted from two mexican varieties. *Plant Foods for Human Nutrition.* **2004**; .59: 169-174.
- Singhal, R. S. y Kulkarni, P. R. Composition of the seeds of some amaranthus species. *J. Sci. Food Agric.* **1988**; 42: 325-331.
- Sorgentini D.A.; Wagner, J.R.; Arrese, E.L. y Añón, M.C.. Water imbibing capacity of soy protein isolates: influence of protein denaturation. *J. Agric. Food Chem.* **1991**; 39: 1386-1391.
- Sorgentini, D. y Wagner, J. Comparative study of foaming properties of whey and isolate soybean proteins. *Food Research Intern.* **2002**; 35: 721-729.
- Stallknecht, G.F. y J.R. Schulz-Schaeffer. Amaranth rediscovered. p. 211-218. En: J. Janick y J.E. Simon (eds.), *New crops*. Wiley, New York, **1993**. Consulta internet, 2006, <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1993/V2-211.html>.
- Stainsby, G. Foaming and emulsification. *Cáp. 7 Functional properties of Food Macromolecules*. Editado por J.R. Mitchel y D. A. Ledward. Elsevier Applied Science Publishers. **1986**, 315-351.

- Tapia-Blácido, D.; Sobral, P. y Menegalli, F. Development and characterization of biofilms based on amaranth flour (*Amaranthus caudatus*). *J. of Food Eng.* **2005**; 67: 215–223.
- Tecson, E. M. S.; Esmama, B. V.; Lontok, L. P. y Juliano, B. O. Studies on the extraction and composition of rice endosperm glutelin and prolamin. *Cereal Chem.* **1971**; 48: 168-181.
- Teutonico, R.A. y Knorr, D.. Amaranth: Composition, properties and applications of a rediscovered food crop. *Food Technol.* **1985**; 39: 49-61.
- Thanh, V. H. y Shibasaki, K. Major Proteins of soybean seeds. subunit structure of β conglycinin. *J. Agric. Food Chem.* **1978a**; 26: 692-695.
- Thanh, V. H. y Shibasaki, K. Major Proteins of Soybean Seeds. Reconstitution of β Conglycinin From Its Subunits. *J. Agric. Food Chem.* **1978b**; 26: 695-698.
- Thompson, G. A. y Larkins, B. A. Structural elements regulating zein gene expression. *BioEssays.* **1989**; 10: 108-113.
- Tjissen, P. Quantitative enzyme immunoassay techniques. In Practice and Theory of Enzyme Immunoassays; *Tjissen, P., Burdon, R., Van nippenberg, P., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1985* Chapter 14.
- Tömösközi, S.; Lúszity, R.; Haraszi, R. y Baticz. Isolation and study of the functional properties of pea proteins. *Nahrung/Food.* **2001**; 45: 6, 399- 401.
- Tomotake, H.; Shimaoka, I.; Kayashita, J.; Nakajoh, M. y Kato, N. Physicochemical and functional properties of buckwheat protein product. *J. Agric. Food Chem.* **2002**; 50: 2125–2129.

- Torgersen, H. y Toledo, R.T. Physical properties of protein preparations related to their functional characteristics in comminuted meat systems. *J. Food Sci.* **1977**, 42, 6, 1615-1618.
- Townsend, A. y Nakai, S. Relationships between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins. *J. Food Sci.* **1983**; 48: 588.
- Urbanski, G.E.; Wei, L.S.; Nelson, A.I. y Steimberg, M.P. Flow characteristics of soybean constituents controlled by ratio of total to imbibed water. *J. Food Sci.* **1983**; 48: 691-694.
- USDA National Nutrient Database for Standard Reference, 2006.
<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>.
- Valdes-Rodriguez, S.; Segura-Nieto, M.; Chagolla-Lopez, A.; Verver ; Vargas-Cortina A. y Martinez-Gallardo, N. y Blanco-Labra A. Purification, characterization, and complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from amaranth (*Amaranthus Hypochondriacus*) seeds. *Plant Physiol.* **1993**; 103: 1407-1412.
- Van der Ven, C.; Gruppen, H.D.; de Bont, B. y Voragen, A. . Correlations between biochemical characteristics and foam forming and stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* **2002**; 50: 2938–2946.
- Vasco-Méndez; N. L. y Paredes-López, O. Antigenic homology between amaranth glutelins and other storage proteins. *Food Chem.* **1995**; 18: 227-238.
- Vidugiris, G y Royer, C. Dtermination of the volume changes for pressure-induced transitions of apomyoglobin between the native, molten globule, and unfolded status. *Biophysical Journal.* **1998**; 75: 63–470.

- Vojdani, F. Solubility. En: Methods of testing protein functionality. Editado por G.M. Hall, London. **1996**; Cap. 2, pp 11-60.
- Wagner, J.R. y Añón, M.C. Influence of denaturation, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates. *J. Food Sci.* **1990**; 55: 765-770.
- Wagner, J.; Sorgentini, D. y Añón, M.C. Thermal and electrophoretic behavior, hydrophobicity, and some functional properties of acid-treated soy isolates. *J. Agric. Food Chem.* **1996**: 44: 1881-1889.
- Wagner, J.; Sorgentini, D. y Añón, M.C. Relation between solubility and surface hydrophobicity as an indicator of modifications during preparation processes of commercial and laboratory-prepared soy protein isolates. *J. Agric. Food Chem.* **2000**; 48: 3159-3165.
- Wagner, J. Caracterización funcional y estructural de proteínas: Propiedades superficiales. Gualterio Bartholomai y Ana Pilosof Editores, Cytod, **2000** Editorial Universitaria de Buenos Aires, pg. 55-70.
- Wilde, P. y Clark, D. Methods of testing protein functionality. Cap. 5 Foam formation and stability. Edited by G. Hall Blackie Academic y Professional. **1996**. Primera edición pg. 111-148
- Yamagata, H.; Sugimoto, T.; Tanaka, K. y Kasai, Z. Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds. *Plant Physiol.* **1982**; 70: 1094-1100.
- Youle, R. y Huang A. Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species. *Amer. J. Bot.* **1981**; 68: 1, 44-48.