

134 20j



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

## MODIFICACION ENZIMATICA DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DEL GLUTEN DE TRIGO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

T E S I S  
M A N C O M U N A D A  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A N :

CARLA GABRIELA SANCHEZ FERNANDEZ  
MARCELA BEATRIZ TREVIÑO SANTA CRUZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**INDICE**

	<b>PAGINA</b>
<b>1 RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2 INTRODUCCION</b>	<b>2</b>
<b>3 OBJETIVOS E HIPOTESIS</b>	
3.1 Objetivos Generales	4
3.2 Objetivos Particulares	4
3.3 Hipótesis	5
<b>4 GENERALIDADES</b>	
4.1 Propiedades Funcionales	6
4.2 Proteínas Funcionales	13
4.3 Fuentes de Proteínas Alternativas	15
4.3.1 Gluten de Trigo	17
4.4 Modificación de las Propiedades Funcionales	21
4.4.1 Modificación Enzimática de Propiedades Funcionales	24
<b>5 ANTECEDENTES</b>	<b>28</b>
<b>6 MATERIALES Y METODOS</b>	
6.1 Determinación de Proteína	33
6.1.1 Método de Kjeldahl	33
6.1.2 Método de Lowry	35
6.1.3 Método de Weatherburn	37
6.2 Determinación de Actividad sobre Caseína de Enzimas Proteolíticas: Método de Northrop	39
6.3 Determinación de las Condiciones de Inactivación de Proteasas	40

6.4	Modificación Enzimática de Gluten de Trigo	42
-----	--	----

## 7 RESULTADOS Y DISCUSION

7.1	Selección de la Metodología para la Evaluación de las Propiedades Funcionales	46
7.2	Selección del Sustrato Proteico	60
7.3	Modificación Física del Sustrato	60
7.4	Selección de Enzima para la Modificación de Proteínas	63
7.5	Propiedades Funcionales de los Sustratos	71
7.6	Primer Experimento de Modificación Enzimática	73
7.7	Propiedades Funcionales (Primer Experimento de Modificación Enzimática)	75
7.8	Segunda Determinación de Actividad de las Enzimas Proteolíticas	86
7.9	Segundo Experimento de Modificación Enzimática	87
7.10	Propiedades Funcionales (Segundo Experimento de Modificación Enzimática)	88
7.11	Influencia del Almidón Presente en el Gluten en las Propiedades de Emulsificación	108
7.12	Escalamiento a Nivel Planta Piloto	112
7.13	Propiedades Funcionales de los Productos	

Obtenidos en Planta Piloto

117

8 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

125

9 BIBLIOGRAFIA

130

## INDICE DE TABLAS

	PAGINA
TABLA 1 Clasificación de las propiedades funcionales de las proteínas basada en sus propiedades fisicoquímicas	9
TABLA 2 Precios de las proteínas funcionales más utilizadas en la industria	14
TABLA 3 Clasificación de las fracciones proteicas del trigo de acuerdo a su solubilidad	16
TABLA 4 Características de las fracciones proteicas del trigo	17
TABLA 5 Precios de materia prima	60
TABLA 6 Contenido de proteína de glútenes de trigo comerciales	62
TABLA 7 Análisis químico proximal del gluten de trigo Rafmex III	62
TABLA 8 Precios de proteasas industriales	65
TABLA 9 Precios y actividad de proteasas microbianas	65
TABLA 10 Información técnica de las enzimas seleccionadas	66
TABLA 11 Actividad de las enzimas proteolíticas	67
TABLA 12 Efecto del tiempo y temperatura de inactivación sobre la actividad proteolítica de las enzimas neutra y alcalina	68

TABLA 13	Propiedades funcionales nativas de los sustratos gluten y gluten tratado térmicamente y de dos diferentes productos emulsificantes comerciales	72
TABLA 14	Valores promedio de pH de los hidrolizados determinados al final de la hidrólisis (primer experimento de modificación enzimática)	74
TABLA 15	Nitrógeno Soluble (primer experimento de modificación enzimática)	75
TABLA 16	Capacidad de Emulsificación (primer experimento de modificación enzimática)	78
TABLA 17	Estabilidad de la Emulsión (primer experimento de modificación enzimática)	80
TABLA 18	Actividad de la Emulsión (primer experimento de modificación enzimática)	82
TABLA 19	Resumen de propiedades funcionales (primer experimento de modificación enzimática)	85
TABLA 20	Valores promedio de pH de los hidrolizados determinados al final de la hidrólisis (segundo experimento de modificación enzimática)	89
TABLA 21	Nitrógeno Soluble (segundo experimento de modificación enzimática)	90

TABLA 22	Capacidad de Emulsificación (segundo experimento de modificación enzimática)	92
TABLA 23	Estabilidad de la Emulsión (segundo experimento de modificación enzimática)	94
TABLA 24	Actividad de la Emulsión (segundo experimento de modificación enzimática)	97
TABLA 25	Resumen de propiedades funcionales (segundo experimento de modificación enzimática)	100
TABLA 26	Propiedades funcionales (experimentos 1 y 2 de modificación enzimática con la proteasa alcalina)	101
TABLA 27	Capacidad de Emulsificación de dos productos comerciales y de los sustratos de gluten antes y después de la modificación enzimática	107
TABLA 28	Propiedades emulsificantes del hidrolizado GT-ALC-30 antes y después del tratamiento con una amilasa	110
TABLA 29	Propiedades emulsificantes de los hidrolizados GT-ALC-30 adicionados con almidón	112
TABLA 30	Sólidos retenidos en el tamizado (planta piloto)	115
TABLA 31	Rendimiento del proceso de modificación y del secado por aspersión en planta piloto	116
TABLA 32	Propiedades funcionales de los productos obtenidos en planta piloto	118

**TABLA 33 Propiedades funcionales de los mejores  
productos obtenidos en el laboratorio**

## INDICE DE FIGURAS

	PAGINA	
FIGURA 1	Procesos de obtención de gluten a partir de harina de trigo	22
FIGURA 2	Distribución de enzimas industriales	26
FIGURA 3	Esquema del aparato utilizado para la determinación de Capacidad de Emulsificación	53
FIGURA 4	Curvas de inactivación de la enzima neutra	69
FIGURA 5	Curvas de inactivación de la enzima alcalina	70
FIGURA 6	Efecto del tiempo de hidrólisis sobre la solubilidad (primer experimento de modificación enzimática)	76
FIGURA 7	Efecto del tiempo de hidrólisis sobre la Capacidad de Emulsificación (primer experimento de modificación enzimática)	79
FIGURA 8	Efecto del tiempo de hidrólisis sobre la Estabilidad de la Emulsión (primer experimento de modificación enzimática)	81
FIGURA 9	Efecto del tiempo de hidrólisis sobre la Actividad de la Emulsión (primer experimento de modificación enzimática)	83
FIGURA 10	Efecto del tiempo de hidrólisis sobre la solubilidad (segundo experimento de modificación enzimática)	91
FIGURA 11	Efecto del tiempo de hidrólisis sobre la Capacidad de Emulsificación (segundo experimento de modificación enzimática)	93
FIGURA 12	Efecto del tiempo de hidrólisis sobre la Estabilidad de la Emulsión (segundo experimento de modificación enzimática)	95

FIGURA 13	Efecto del tiempo de hidrólisis sobre la Actividad de la Emulsión (segundo experimento de modificación enzimática)	98
FIGURA 14	Efecto del tiempo de hidrólisis sobre la solubilidad (experimentos 1 y 2 de modificación enzimática con la proteasa alcalina)	102
FIGURA 15	Efecto del tiempo de hidrólisis sobre la Capacidad de Emulsificación (experimentos 1 y 2 de modificación enzimática con la proteasa alcalina)	103
FIGURA 16	Efecto del tiempo de hidrólisis sobre la Estabilidad de la Emulsión (experimentos 1 y 2 de modificación enzimática con la proteasa alcalina)	104
FIGURA 17	Efecto del tiempo de hidrólisis sobre la Actividad de la Emulsión (experimentos 1 y 2 de modificación enzimática con la proteasa alcalina)	105
FIGURA 18	Resultados globales de solubilidad	121
FIGURA 19	Resultados globales de Capacidad de Emulsificación	122
FIGURA 20	Resultados globales de Estabilidad de la Emulsión	123
FIGURA 21	Resultados globales de Actividad de la Emulsión	124

## 1 RESUMEN

Se modificaron las propiedades funcionales de las proteínas del gluten de trigo mediante una hidrólisis enzimática controlada con el objeto de obtener una proteína soluble y con buenas propiedades emulsificantes. Se prepararon hidrolizados de gluten de trigo y de gluten de trigo tratado térmicamente empleando dos diferentes enzimas proteolíticas de origen bacteriano -una neutra y una alcalina- y diferentes tiempos de hidrólisis. El tratamiento con la proteasa neutra no mejoró las propiedades funcionales estudiadas del gluten. El gluten hidrolizado con la proteasa alcalina no mostró un aumento significativo en la solubilidad pero presentó una elevada capacidad de emulsificación así como una alta estabilidad de la misma, este aumento fue mayor cuando el gluten fue sometido a un tratamiento térmico previo a la hidrólisis. De esta manera se obtuvieron varios productos que mostraron capacidades de emulsificación mayores a las obtenidas con aditivos comerciales preparados a partir de proteína aislada de soya. Finalmente se escaló el proceso de modificación enzimática a nivel planta piloto y se caracterizaron los productos obtenidos en términos de solubilidad, capacidad de emulsificación y estabilidad y actividad de la emulsión.

## 2 INTRODUCCION

La industria alimentaria requiere constantemente de nuevos ingredientes proteicos para la elaboración de alimentos. En los últimos años han cobrado especial importancia cierto tipo de proteínas por las propiedades funcionales que poseen ya que imparten características específicas a los productos alimenticios.

Las tres proteínas funcionales más importantes son la caseína, la clara de huevo y la proteína de soya, y han sido usadas por la industria alimentaria por más de veinte años. Debido por un lado a la escasez y al encarecimiento crecientes de estas proteínas y por el otro a la creciente demanda de alimentos, se investiga actualmente la forma de producir proteínas funcionales alternativas a menor costo.

Las proteínas vegetales se encuentran disponibles para la industria de alimentos en diversas formas, tales como harinas, concentrados, aislados y proteína vegetal texturizada. Sin embargo, muchas veces estos productos carecen de propiedades funcionales o las poseen pero no son óptimas y necesitan ser modificadas para tener nuevas aplicaciones. Esto puede lograrse mediante diversos procesos de modificación.

Aunque la modificación química ha sido extensamente explorada para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas como ingredientes funcionales en alimentos, la preocupación sobre toxicidad y alteración del valor nutricional ha evitado su adopción. En años recientes se ha demostrado que una hidrólisis enzimática limitada ofrece un medio específico y conveniente para mejorar ciertas propiedades funcionales de las proteínas (Tanimoto & Kinsella, 1988).

El gluten de trigo es una proteína de bajo costo y alta disponibilidad ya que es un subproducto en el proceso de obtención de almidón a partir de harina de trigo. Es el componente proteico funcional de la harina de trigo cuyas propiedades viscoelásticas han sido aplicadas para producir las características de textura del pan. Actualmente el gluten de trigo cuenta con un mercado como proteína funcional purificada y se utiliza por ejemplo en la elaboración de cereales preparados, como ligante de trozos de carne de desecho o como extensor de productos cárnicos.

En el presente estudio se pretende modificar las propiedades funcionales del gluten de trigo mediante una hidrólisis enzimática controlada, con el objeto de obtener una proteína soluble con elevada capacidad de emulsificación, alta estabilidad y actividad de la emulsión.

### 3 OBJETIVOS E HIPOTESIS

#### 3.1 OBJETIVOS GENERALES

- Estudiar (escala laboratorio) el efecto del tratamiento térmico y de la hidrólisis enzimática sobre la solubilidad y propiedades de emulsificación del gluten de trigo.
- Escalar a nivel de planta piloto un proceso de hidrólisis enzimática que permita mejorar las propiedades funcionales del gluten de trigo.

#### 3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Seleccionar las propiedades funcionales proteicas de mayor interés para la industria de los alimentos.
- Seleccionar y montar en el laboratorio los métodos de evaluación de las propiedades funcionales a estudiar.
- Seleccionar un sustrato proteico de origen vegetal y una enzima proteolítica con base en costo y disponibilidad.
- Combinar la modificación enzimática de las propiedades funcionales con un proceso previo de modificación física del sustrato.
- Determinar el efecto que produce una hidrólisis enzimática moderada sobre las propiedades funcionales de interés en el sustrato seleccionado.
- Evaluar la funcionalidad de los hidrolizados por comparación con proteínas funcionales comerciales utilizadas en la industria de los alimentos.

- En caso de encontrar un proceso enzimático que mejore las propiedades funcionales del sustrato, escalarlo a nivel de planta piloto.

### 3.3 HIPOTESIS

- Se ha demostrado que la hidrólisis enzimática modifica las características funcionales de las proteínas vegetales de manera benéfica. Si esto es así, entonces podría ser posible obtener mediante un proceso controlado de hidrólisis enzimática de gluten de trigo, un producto con características funcionales comparables a las de proteínas funcionales comerciales usadas en la industria de los alimentos.

#### 4 GENERALIDADES

##### 4.1 PROPIEDADES FUNCIONALES

Las proteínas constituyen uno de los componentes principales de los alimentos por lo que la industria alimentaria busca constantemente nuevos ingredientes proteicos para la elaboración de los mismos. Existen básicamente dos características importantes en las proteínas que determinan su uso dentro de la industria alimentaria: el valor nutricional y la funcionalidad.

Dado que las propiedades funcionales confieren características a los alimentos durante su procesamiento, preparación y almacenamiento afectando la calidad y aceptación del mismo, son consideradas de primera importancia en el desarrollo de productos alimenticios.

La propiedad funcional de un material proteico puede definirse como una propiedad tecnológica específica que influye de forma característica en el aspecto físico, la calidad organoléptica y el comportamiento de un producto alimenticio, la cual resulta de la naturaleza fisicoquímica intrínseca del material proteico y de sus interacciones con otros constituyentes en un sistema alimenticio

multicomponente. Sin embargo, el término funcionalidad implica conceptos distintos para los diferentes investigadores dependiendo de su respectivo campo de interés, por lo que en un sentido amplio el término denota cualquier propiedad de una proteína, excepto su valor nutricional, que determine su uso ya sea como aditivo o como el contribuyente directo de los atributos del producto alimenticio.

Se han propuesto diversos criterios de clasificación de las propiedades funcionales según las preferencias e intenciones del investigador. A continuación se presenta una clasificación basada en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, dividiendo las propiedades funcionales según la propiedad molecular que las determina (A.C.S., 1979):

- Propiedades hidrofílicas: dependientes de la afinidad de la proteína al agua y a otros solventes polares.

- Propiedades interfásicas: dependen de la capacidad de las proteínas para formar películas de unión o separación entre dos medios inmiscibles.

- Propiedades intermoleculares: dependen de la capacidad que tienen las proteínas para formar uniones inter e

intramoleculares.

- Propiedades organolépticas: se manifiestan a través de los sentidos.

- Otras propiedades: propiedades físicas o químicas que pertenecen a proteínas específicas.

En la Tabla 1 se presentan las propiedades funcionales de las proteínas clasificadas con base en las propiedades fisicoquímicas que las determinan.

Ya que las propiedades funcionales de las proteínas están determinadas por su estructura, los factores que la afectan repercuten sobre la funcionalidad. Entre estos factores son de especial interés aquellos que intervienen durante el procesamiento de los productos proteicos (A.C.S., 1979):

- Extracción de la proteína: Tanto la extracción de la proteína a partir de su fuente como la extracción de los componentes para su purificación afectan la funcionalidad debido a la acción de los agentes físicos y químicos involucrados.

- Temperatura: El tratamiento térmico de las proteínas

produce un efecto importante en su calidad dependiendo de factores tales como tiempo, contenido de humedad y presencia o ausencia de sustancias reductoras.

**TABLA 1 CLASIFICACION DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEINAS BASADA EN SUS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS (A.C.S., 1979)**

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS	PROPIEDADES FUNCIONALES	
HIDROFILICAS	Solubilidad Hidratación Hinchamiento Absorción de agua	
INTERFASICAS	Emulsificación Espumado Coacervación	
INTERMOLECULARES	Viscosidad Espumado Cohesión Dureza Elasticidad Flexibilidad Estabilidad al calor Formación de masa, películas, fibras y complejos	Gelificación Adhesión Pegajosidad Untabilidad Plasticidad Fijación
ORGANOLEPTICAS	Olor Sabor Textura	Color Fragilidad
OTRAS	Actividad enzimática Digestibilidad	

- Secado: El proceso de secado puede producir cambios

indeseables en los atributos de las proteínas. Esto se debe a que dichos procesos involucran la exposición de la proteína a temperaturas extremas, presión, atomización, condiciones de oxidación y fuerzas de superficie.

- Condiciones iónicas: La exposición de la proteína a diferentes condiciones de pH afecta su grado de desnaturalización y su conformación. También la presencia de ciertos iones puede alterar drásticamente su funcionalidad debido a la formación de complejos con propiedades diversas.

- Impurezas: La presencia de otros compuestos como lípidos y carbohidratos tiene un gran efecto sobre la funcionalidad ya que puede ocasionar formación de compuestos que alteren las propiedades de las proteínas.

- Almacenamiento: Afecta en diferente grado la estabilidad de un producto proteico. Aún en refrigeración se pueden originar otras reacciones químicas no siempre benéficas. El contenido de humedad durante el almacenamiento es un factor importante que altera las características del producto.

La solubilidad es una de las propiedades funcionales de mayor interés en la industria alimenticia. Esto se debe a

que las proteínas deben ser solubles para que sea posible su incorporación en sistemas alimenticios líquidos o semilíquidos; además, la manifestación de otras propiedades funcionales depende de la solubilidad (Adler-Nissen, 1986).

La forma más comúnmente utilizada para expresar la solubilidad de una proteína es el Índice de Solubilidad de Nitrógeno (Adler-Nissen, 1986), el cual se determina midiendo la cantidad de nitrógeno solubilizado después de haber centrifugado una disolución de la proteína en cuestión. Las condiciones de centrifugación, temperatura, pH, fuerza iónica y concentración de proteína son establecidas por cada investigador, lo que dificulta la comparación entre diversos trabajos.

La formación y estabilización de emulsiones compuestas por agua, lípidos y proteínas son decisivas para la calidad organoléptica de una gran variedad de alimentos. Para formar una emulsión, las proteínas que actúan como emulsificantes se distribuyen alrededor de la superficie de las gotas de aceite. Debido a su naturaleza anfófila, las proteínas son adsorbidas en la interfase aceite-agua causando una disminución pronunciada de la tensión superficial en la interfase.

La propiedad emulsificante de una proteína se evalúa mediante tres tipos de determinaciones: Capacidad de Emulsificación, Estabilidad y Actividad de la Emulsión. Se ha desarrollado un gran número de métodos de evaluación diferentes, cada uno diseñado de acuerdo a las características particulares del tipo de emulsión requerido en el producto alimenticio por lo que no se han estandarizado las técnicas de determinación de la mayoría de las propiedades funcionales. En términos generales, la Capacidad de Emulsificación expresa la cantidad máxima de aceite emulsificado por unidad de peso de proteína independientemente de las condiciones del ensayo y del método de detección del punto de inversión de la emulsión. La Estabilidad de la Emulsión denota el tiempo que perduran las emulsiones (preparadas con diferentes proporciones aceite/agua dependiendo de los intereses del investigador) después de someterlas a una acción térmica o mecánica de características que varían según el método empleado. La Actividad de la Emulsión evalúa el comportamiento de una emulsión preparada con una proporción 1:1 de aceite/agua al someterla a una acción mecánica, y guarda una estrecha relación tanto con la Capacidad de Emulsificación como con la Estabilidad de la Emulsión.

#### 4.2 PROTEINAS FUNCIONALES

El concepto de propiedades funcionales no nació sino hasta los años 50's e inicialmente, las únicas proteínas funcionales producidas comercialmente fueron alimentos frescos deshidratados, como la clara de huevo y la leche descremada en polvo. Estos productos eran similares a sus equivalentes frescos y no se intentó purificar o fraccionar las proteínas. La producción de proteínas funcionales para uso alimentario se aceleró en los años 60's con la producción de aislado de soya y de caseinato de sodio.

Las proteínas de soya, los caseinatos y la clara de huevo deshidratada son utilizados ampliamente en la industria para impartir propiedades funcionales a los alimentos. La clara de huevo espuma bien y gelifica con calor, el caseinato de sodio es un buen emulsificante y el aislado de soya absorbe y retiene bien el agua. Sin embargo, los costos de estas proteínas son altos, tal como se puede observar en la Tabla 2.

**TABLA 2 PRECIOS DE LAS PROTEINAS FUNCIONALES MAS UTILIZADAS EN LA INDUSTRIA**

PROTEINA	PRECIO <sup>a</sup>	
	(\$/kg)	(US \$/kg)
CASEINATO DE SODIO	20,000	7.2
CLARA DE HUEVO	19,000 <sup>b</sup>	6.8 <sup>b</sup>
AISLADOS DE SOYA		
PURINA 500E	10,500	3.8
PURINA 590	11,500	4.1

a Precios de 1990

b Precios de 1989

Debido al encarecimiento creciente de las proteínas funcionales convencionales se busca actualmente la forma de producir proteínas funcionales alternativas de menor costo. Se han propuesto muchas proteínas nuevas como alternativas, pero sólo las proteínas producidas a partir de suero de queso han alcanzado un uso extenso; las otras no han logrado obtener gran aceptación por su falta de funcionalidad, su mal sabor o la presencia de compuestos tóxicos.

Dentro de las fuentes de proteínas funcionales alternativas que se han propuesto se encuentran las siguientes: suero, sangre, microorganismos, pescado, hojas, papa, harina de huesos y trigo.

#### 4.3 FUENTES DE PROTEINAS ALTERNATIVAS

Para que una nueva proteína tenga éxito en el mercado, debe mejorar el comportamiento de una de las tres proteínas funcionales estándar o presentar una funcionalidad aceptable y ser mucho más barata.

Las proteínas vegetales representan una de las fuentes alternativas con mayor disponibilidad y menor costo. Aunque la importancia de la proteína vegetal es reconocida como parte constituyente de muchos alimentos el uso de concentrados de proteína de semilla (PCS) es limitado. Algunos PCS, tales como el gluten de trigo, han sido usados como componentes en alimentos durante varios años, pero la investigación del potencial para la producción y uso de PCS en alimentos representa un desarrollo comparativamente reciente. En 1980 la producción mundial de proteína fue de un total de 290 millones de toneladas, de las cuales cuatro quintas partes eran de origen vegetal y una quinta parte de origen animal (Pomeranz, 1985). Del total de proteínas vegetales más de dos terceras partes provienen de cereales y alrededor de una quinta parte se deriva de semillas oleaginosas.

Los cereales contienen en general alrededor del 10% de proteína. Su producción se está aumentando mediante la

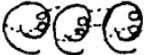
introducción de nuevas especies y variedades con mejores rendimientos y mayor contenido de proteína. El valor nutricional de la proteína del cereal es limitado principalmente por su deficiencia en lisina, mientras que el de las oleaginosas tiene deficiencias en metionina, lisina, treonina y triptofano. Sin embargo dichas proteínas pueden ser suplementadas mediante la adición de leche descremada en polvo, harina de pescado y aminoácidos sintéticos.

Dentro de los principales cereales producidos mundialmente se encuentra el trigo. Este tiene un contenido promedio del 13% de proteína cuyas fracciones se clasifican en cuatro grupos de acuerdo a su solubilidad, según se puede apreciar en la Tabla 3. Las características de estas fracciones se presentan en la Tabla 4.

**TABLA 3 CLASIFICACION DE LAS FRACCIONES PROTEICAS DEL TRIGO DE ACUERDO A SU SOLUBILIDAD (INGLETT, 1980)**

GRUPO	SOLUBILIDAD
ALBUMINAS	EN AGUA
GLOBULINAS	EN SOLUCION SALINA NEUTRA
GLIADINAS	EN ETANOL AL 70%
GLUTENINAS	EN ACIDOS, EN BASES, EN SOLVENTES DISRUPTORES DE ENLACES DE HIDRO- GENO E HIDROFOBICOS

**TABLA 4 CARACTERISTICAS DE LAS FRACCIONES PROTEICAS DEL TRIGO (INGLETT, 1980)**

GRUPO	ESTRUCTURA	PROPIEDADES	CONTENIDO	ORIGEN
ALBUMINAS		ENZIMATICAS	15-20%	PROTEINAS CITOPLAS- MICAS
GLOBULINAS		ESPUMANTES EMULSIFICANTES		
GLIADINAS		EXTENSIBILIDAD	40%	PROTEINAS DE RESERVA
GLUTENINAS		ELASTICIDAD TENACIDAD	40%	

#### 4.3.1 GLUTEN DE TRIGO

El gluten de trigo es un complejo viscoelástico formado por gliadinas y gluteninas asociadas con lípidos, minerales y carbohidratos en proporciones variables. La composición y la funcionalidad del gluten de trigo varían ampliamente dependiendo de la variedad de trigo, las condiciones ambientales de su cultivo y cosecha y el proceso de separación a partir de la harina de trigo.

La gliadina es una proteína formada por una cadena peptídica sencilla de bajo peso molecular cuya conformación

estructural se encuentra estabilizada por dos enlaces disulfuro intramoleculares. La glutenina está constituida por cadenas de polipeptidos de diferente peso molecular unidos por enlaces disulfuro intermoleculares y algunos intramoleculares. Algunas de las unidades se parecen a la gliadina pero otras son únicas de la glutenina.

El gluten de trigo presenta una deficiencia considerable de lisina así como una deficiencia marginal de metionina y triptofano; sin embargo, tales deficiencias no son significativas en una dieta mixta normal.

Son características distintivas de las proteínas del gluten su alto contenido de prolina y de ácido glutámico generalmente en forma de glutamina. Alrededor de uno de cada tres aminoácidos es glutamina y uno de cada siete residuos es prolina. El alto contenido de esta última en el gluten altera la estructura de alfa hélice de las cadenas polipeptídicas; las irregularidades en las cadenas provocan un enredamiento de las proteínas confiriéndoles elasticidad.

El 2% de los aminoácidos del gluten son residuos de cisteína cuyas cadenas laterales juegan un papel importante, ya que al mantener las estructuras terciaria y cuaternaria de las cadenas polipeptídicas mediante la formación de puentes disulfuro intra e intercatenarios, proporcionan

cohesión y elasticidad a la proteínas del gluten, especialmente a la glutenina.

Las proteínas del gluten tienen fuertes tendencias de agregación que resultan del alto potencial de enlace de hidrógeno debido al gran número de cadenas laterales de glutamina, del elevado potencial de enlace apolar por el gran número de cadenas laterales no polares y de su poco carácter iónico debido al bajo contenido de lisina, histidina y arginina; en consecuencia, son usualmente insolubles pues tienen igual número de cargas positivas y negativas en la mayoría de los solventes acuosos. Esto provoca que las proteínas del gluten tengan un rango isoeléctrico que comprende el intervalo de pH entre 6 y 9. Dichas proteínas son moderadamente solubles a pH alto, pero bajo estas condiciones los enlaces disulfuro pueden romperse. Son moderadamente insolubles a valores de pH menores de 4 ó 5, pues al tener tan pocas cadenas laterales capaces de ionización no desarrollan un exceso de carga aún a pH bajo. Frecuentemente se utilizan disolventes disruptores de puentes de hidrógeno tales como la urea, el hidrocloreuro de guanidina y la dimetilformamida para solubilizar las proteínas del gluten bajo condiciones de pH o fuerza iónica en que normalmente no serían solubles, pero estos disolventes pueden también desdoblarse estructuras de

las proteínas ya que compiten por los sitios de enlace de hidrógeno que las estabilizan.

El gluten de trigo es el componente proteico funcional de la harina de trigo cuyas propiedades viscoelásticas han sido aplicadas durante mucho tiempo para producir las cualidades características del pan. Posee además de la viscoelasticidad, otras propiedades funcionales que tienen aplicación en la industria; entre ellas se encuentran las siguientes: cohesividad, adhesividad, extensibilidad, capacidad de absorción de agua y capacidad de formación de geles y películas. Actualmente el gluten de trigo encuentra por sí mismo un mercado como proteína funcional purificada y se utiliza por ejemplo en la elaboración de cereales preparados, para mejorar la calidad de las harinas de panificación, como extensor de productos cárnicos o como ligante de trozos de carne de desecho.

El gluten de trigo es una proteína de bajo costo y alta disponibilidad ya que es un subproducto en el proceso de obtención de almidón a partir de harina de trigo. La producción total de gluten es relativamente pequeña pues únicamente el 0.2% del trigo producido en el mundo se destina a la obtención de almidón y gluten.

Existen básicamente dos procesos de obtención de gluten a partir de la harina de trigo los cuales se esquematizan en la Figura 1.

El gluten obtenido bajo las condiciones moderadas del proceso Raisio retiene mejor sus propiedades viscoelásticas y se le conoce como gluten vital. Aunque éste es una de las pocas proteínas vegetales que tienen propiedades funcionales óptimas en su estado nativo, carece de otras propiedades funcionales importantes tales como solubilidad y capacidad de emulsificación. Afortunadamente, existen herramientas en la actualidad que permiten producir cambios en la estructura molecular de las proteínas para generar en ellas nuevas propiedades funcionales o mejorar las ya existentes.

#### 4.4 MODIFICACION DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES

La modificación de una proteína se refiere a tratamientos físicos, químicos o enzimáticos que cambian su conformación, su estructura, y en consecuencia sus propiedades fisicoquímicas y funcionales. Estos procesos se utilizan para mejorar o dar nuevas propiedades funcionales a las proteínas y así ampliar sus posibilidades de utilización.

**FIGURA 1 PROCESOS DE OBTENCION DE GLUTEN A PARTIR DE HARINA DE TRIGO (INGLETT,1980)**

---

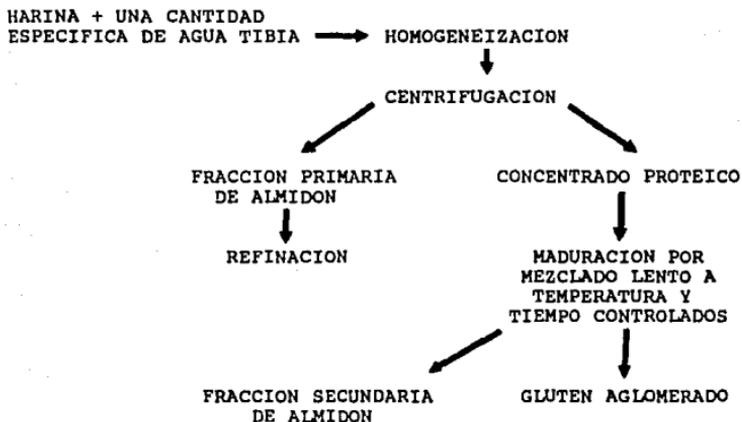
**1. PROCESO MARTIN**



TOTAL DE AGUA UTILIZADA =  $10\text{m}^3$ /TON DE HARINA  
 AGUA RESIDUAL = 5-8  $\text{m}^3$ /TON DE HARINA

---

**2. PROCESO RAISIO**



TOTAL DE AGUA UTILIZADA =  $3\text{m}^3$ /TON DE HARINA  
 NO HAY AGUA RESIDUAL

---

Dentro de la modificación física, el tratamiento térmico es el que produce un efecto de mayor importancia en cuanto a la calidad de la proteína. Los tratamientos térmicos pueden tener una influencia benéfica o perjudicial dependiendo de factores tales como tiempo, temperatura, contenido de humedad y la presencia o ausencia de sustancias reductoras.

El tratamiento térmico mejora el valor nutricional de la mayoría de las proteínas de origen vegetal mediante la inactivación o destrucción de inhibidores de tripsina y otros componentes antinutricionales; también mejora la digestibilidad y la disponibilidad de los aminoácidos azufrados. Sin embargo, un calentamiento excesivo puede deteriorar el sabor, o bien causar una disminución sustancial en el valor nutricional por oxidación de aminoácidos, alteración de algunos enlaces entre aminoácidos que retardan su liberación durante la digestión o por formación de nuevos enlaces entre aminoácidos que no son susceptibles de ser hidrolizados por enzimas digestivas. A pesar del daño y la destrucción que se ocasionan invariablemente en las proteínas vegetales como resultado de un tratamiento térmico convencional, tales pérdidas se consideran relativamente insignificantes.

En los procesos de modificación química y enzimática las reacciones de hidrólisis son las más comúnmente utilizadas.

En términos generales, en las condiciones suaves características de los procesos enzimáticos una proteína tiende a retener mejor su valor nutritivo que en una hidrólisis ácida o alcalina tradicional; además, se evitan los riesgos de toxicidad que presenta la hidrólisis química por formación de enlaces no peptídicos entre los aminoácidos o por racemización de los mismos.

#### 4.4.1 MODIFICACION ENZIMATICA DE PROPIEDADES FUNCIONALES

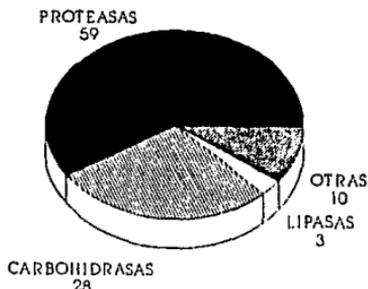
La hidrólisis enzimática aplicada a materias primas que contienen proteínas ha sido una herramienta ampliamente utilizada en la industria alimentaria para incrementar rendimientos en los procesos de recuperación y actualmente representa una opción para mejorar ciertas propiedades funcionales en las proteínas (Adler-Nissen, 1986).

Más del 80% de todas las enzimas industriales son hidrolíticas y son empleadas para la depolimerización de sustratos naturales. Del conjunto de enzimas hidrolíticas el 59% son enzimas proteolíticas (Godfrey & Reichelt, 1983). Se estima que el mercado de enzimas industriales es de

alrededor de 75,000 toneladas de producto con un costo de 600 millones de dólares en 1985. Las enzimas proteolíticas tienen por lo tanto un mercado cuyo valor estimado es de aproximadamente 350 millones de dólares; las carbohidrasas y lipasas completan el mercado de las enzimas industriales más importantes.

Se calcula que la venta mundial de enzimas alcanzará 1,500 millones de dólares en 1990 (Knor & Sinsky, 1985), de las cuales el 48% corresponderá a proteasas o mezclas de proteasas y carbohidrasas. La Figura 2 muestra la distribución de las enzimas más utilizadas en la industria.

Dentro de la variedad de usos que tienen las enzimas en la modificación y mejoramiento de proteínas, la hidrólisis proteica es el proceso más ampliamente utilizado. La hidrólisis involucra la acción de enzimas proteolíticas selectivas que rompen enlaces peptídicos específicos de las proteínas ocasionando alteraciones en la configuración molecular y liberando péptidos de menor peso molecular.



**FIGURA 2 DISTRIBUCION DE ENZIMAS INDUSTRIALES (GODFREY & REICHELTL, 1983)**

A pesar de que la modificación enzimática puede mejorar las características funcionales de las proteínas, una hidrólisis excesiva puede ocasionar la formación de péptidos amargos por lo que las condiciones del proceso deben ser cuidadosamente controladas.

Las proteasas pueden clasificarse de acuerdo a su origen en proteasas animales, vegetales y microbianas. Las enzimas usadas en el procesamiento de alimentos tienen por lo menos una característica en común, deben ser grado alimenticio y si son de origen microbiano, el organismo productor debe ser no patógeno, GRAS conforme a la FDA.

En una proteína típica formada por 20 diferentes aminoácidos existen 380 enlaces peptídicos diferentes como blancos para la acción enzimática y una determinada enzima es capaz de romper sólo ciertos tipos; como condición adicional los enlaces deben estar físicamente disponibles para la enzima. En las proteínas nativas los enlaces se encuentran con frecuencia ocultos en la estructura tridimensional de la proteína y pueden ser susceptibles sólo a una hidrólisis limitada, pero en muchos procesos empleados en la industria alimentaria las proteínas son parcial o totalmente desnaturalizadas en los procesos de extracción o durante un tratamiento térmico ocasionando una desintegración de la estructura tridimensional que aumenta la susceptibilidad a la hidrólisis.

## 5 ANTECEDENTES

La modificación enzimática ha sido usada extensamente para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas y ajustarlas a ciertas necesidades específicas (Ponnampalam et al., 1987). Aunque la funcionalidad puede alterarse con muchos diferentes tipos de enzimas (Phillips & Beuchat, 1979), la mayoría son enzimas proteolíticas, las cuales han sido empleadas en la modificación de una gran variedad de proteínas, tales como caseínas (Chobert et al., 1988; FEBS, 1977); concentrados de proteína de pescado (Cheftel et al., 1971; Phillips & Beuchat, 1979); proteínas de suero de queso (Phillips & Beuchat, 1979); aislados de proteína de soya (Adler-Nissen et al., 1983; Mohri & Matsushita, 1984; Ponnampalam et al., 1987; y Phillips & Beuchat, 1979), harinas de cacahuete, proteínas de semilla de algodón, proteína concentrada de semilla de colza (Phillips & Beuchat, 1979); harinas de avena (Ponnampalam et al. 1987); etc.

En cuanto a las proteínas del trigo se refiere, las enzimas proteolíticas microbianas se han usado durante décadas para mejorar las características funcionales de la harina de trigo (Phillips & Beuchat, 1979), incluyendo las propiedades de manejo de la masa, la elasticidad y textura

del gluten obtenido de ésta, y el volumen del pan (Phillips & Beuchat, 1979). Estos autores también estudiaron la acción de la pepsina sobre la glutenina y reportaron que la ruptura de sólo unos cuantos enlaces peptídicos rápidamente producía polipéptidos de alto peso molecular. Verma & McCalla (1966) estudiaron la acción de la pepsina, la papaína y una proteasa fúngica comercial en el gluten de trigo. Todas las enzimas actuaron efectivamente sobre el gluten en dispersión, sin embargo, la acción de las diferentes enzimas produjo diferentes tipos de hidrolisados. Dependiendo de las características deseadas en el manejo de las masas preparadas con harina de trigo tratada, se pueden seleccionar diversos tratamientos proteolíticos.

Como se observa, la modificación de las proteínas de trigo por hidrólisis enzimática se ha explotado básicamente para mejorar sus propiedades en panificación. En cuanto a las propiedades de emulsificación del gluten de trigo, Tscimirov et al. (1983) demostraron que mediante una hidrólisis enzimática limitada puede aumentarse la capacidad de emulsificación del gluten.

Por otro lado, también se ha estudiado el efecto del calor en la funcionalidad de las proteínas, el cual es especialmente importante en aquellas proteínas obtenidas como subproductos en la obtención de aceites a partir de

semillas oleaginosas, cuyos procesos de extracción requieren de tratamientos térmicos. El efecto del tratamiento en los prensados de cacahuete y coco ha sido estudiado por Phillips & Beauchat, (1979), y en la harina de linaza por Madhusudhan & Singh (1985).

Dresse et al. (1988), estudiaron el efecto del tratamiento térmico sobre las propiedades reológicas del gluten de trigo y encontraron que al calentar masas de gluten-agua a temperaturas superiores a los 55°C se producen cambios reológicos irreversibles proporcionales al contenido de almidón de la proteína. Estos autores proponen que los cambios pueden deberse a la gelatinización del almidón y/o a la formación de nuevos enlaces en las proteínas del gluten; sin embargo concluyen que los cambios que se producen en el gluten a causa de un tratamiento térmico, son directamente proporcionales al contenido de almidón presente en el gluten de trigo. Jean Jean et al. (1980) estudiaron el efecto de el tratamiento térmico sobre la solubilidad y las propiedades viscoelásticas del gluten de trigo. Este fue calentado entre 0 y 7 minutos en un baño de agua en ebullición, con lo cual disminuyó la compresibilidad y aumentó la firmeza del gluten. Observaron también que algunas proteínas solubles en etanol al 60% se insolubilizan debido a la formación de enlaces disulfuro, y que las propiedades viscoelásticas del gluten están altamente

relacionadas con el contenido de dichas proteínas. Lupano & Añón (1987) estudiaron la desnaturalización de las proteínas del trigo durante el secado, y observaron que éste disminuye la solubilidad de las proteínas y provoca una disminución en el volumen del pan por reacciones de intercambio SH-SS. También reportan que la fracción de glutenina es más sensible al tratamiento térmico que la fracción de gliadina, teniendo acción este tratamiento particularmente sobre los enlaces disulfuro.

De acuerdo con Pomeranz (1985) es muy baja la desnaturalización del gluten de trigo, medida como pérdida de solubilidad en ácido acético diluido, por un calentamiento a temperaturas menores de 70°C. Un calentamiento a temperaturas mayores provoca una rápida desnaturalización. Pence et al. también midieron el efecto del contenido de humedad (H) sobre el grado de desnaturalización del gluten por calor. La curva de solubilidad mostró que la desnaturalización a 90°C es rápida si el H es mayor de 35%. A menores niveles de humedad, la desnaturalización era más lenta, y a un H del 5% la desnaturalización era despreciable aún a 90°C.

Wu et al. (1976), estudiaron la posibilidad de producir mediante una hidrólisis ácida, un agente emulsificante y espumante. Estos autores observaron que la capacidad de

emulsificación y estabilidad de la emulsión mejoró notablemente con el tratamiento ácido, produciendo un mejor agente emulsificante que los elaborados a partir de aislados de proteína de soya. Por otro lado, una fracción extraída a pH=5.2 por precipitación, mostró excelentes propiedades de espumado. Asimismo reportan que el tratamiento ácido no produce daño significativo a los aminoácidos esenciales de las proteínas del gluten.

## 6 MATERIALES Y METODOS

A continuación se describe la metodología empleada en este trabajo.

### 6.1 DETERMINACION DE PROTEINA

Para la determinación del contenido de proteína de los sustratos se utilizó el método de Kjeldahl. El método de Lowry se empleó en las determinaciones de actividad proteolítica y el de Weatherburn en la evaluación de la solubilidad de las proteínas.

#### 6.1.1 METODO DE KJELDAHL

(AOAC, 1975)

#### REACTIVOS:

- Acido sulfúrico concentrado
- Solución de hidróxido de sodio al 40%
- Mezcla digestora:
  - sulfato de cobre 7%
  - sulfato de potasio 93%
- Solución de rojo de metilo

- Solución de ácido bórico al 4%
- Solución de ácido sulfúrico 0.1 N

**METODO:****DIGESTION**

Se colocan de 0.5 a 1.0 g de muestra (1 ml si es líquida) en un matraz Macro Kjeldahl, se adicionan 8.5 g de mezcla digestora, 4 perlas de vidrio y 25 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se calienta en una parrilla hasta que la muestra esté completamente transparente y dejen de salir vapores blancos; se deja enfriar a temperatura ambiente.

**DESTILACION**

Se colocan en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, 65 ml de ácido bórico y 2 gotas del indicador y se coloca a la salida del refrigerante de manera que el tubo colector quede sumergido en la solución.

Se adicionan cuidadosamente 250 ml de agua destilada a la muestra digerida y se agita lentamente; a continuación se adicionan 110 ml de hidróxido de sodio y se conecta inmediatamente el matraz al aparato de destilación. Una vez destilados 200 ml se apaga el aparato de destilación.

## TITULACION

Se titula la solución destilada con la solución normalizada de ácido sulfúrico hasta el vire del indicador.

$$\% N = \frac{(\text{vol. de H}_2\text{SO}_4 \text{ en ml}) (N \text{ H}_2\text{SO}_4) (0.014) (100) (F)}{\text{peso de la muestra en g}}$$

F = 5.70 para proteínas de trigo

6.25 para proteínas de maíz

## 6.1.2 METODO DE LOWRY

(Lowry et al., 1951)

## REACTIVOS:

- Solución estándar de albúmina sérica bovina (Sigma no. A-7906) 100  $\mu$ g/ml
- Solución A: carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1 M
- Solución B: tartrato de sodio y potasio al 1%
- Solución C: sulfato de cobre al 0.5%
- Solución de proteínas:  
100 ml de soln. A + 1 ml de soln. B + 1 ml de soln. C
- Solución de reactivo de fenol Folin-Ciocalteu (Sigma no. 2790) al 50%

**METODO:****CURVA ESTANDAR**

En tubos de ensaye de 16x150 se colocan distintos volúmenes de la solución estandar de albúmina y se completa el volumen a 1 ml con agua destilada para dar concentraciones finales de proteína entre 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$ . Se agregan 5 ml de solución de proteínas, se mezcla y se deja reposar 10 minutos. Se adicionan 0.5 ml de solución de Folin, se mezcla y se deja reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lee la absorbancia a 625 nm contra un blanco de agua destilada tratado de la misma forma.

**MUESTRA PROBLEMA**

En un tubo de ensaye de 16x150 se coloca una alícuota de 0.2 ml de la muestra, completando el volumen a 1 ml con agua destilada y se trata de la misma manera que la curva estándar. Se lee la absorbancia a 625 nm y el valor se interpola en la curva estándar de albúmina sérica bovina.

### 6.1.3 METODO DE WEATHERBURN

(Weatherburn, 1967)

#### REACTIVOS:

- Acido sulfúrico concentrado
- Mezcla digestora:
  - sulfato de cobre (7%)
  - sulfato de potasio (93%)
- Solución estándar de sulfato de amonio (10 mg/ml)
- Solución de fenol nitroprusiato (A), 1 lt:
  - fenol 10 g
  - nitroprusiato de sodio 0.05 g
- Solución de hipoclorito-hidróxido de sodio (B), 1 lt:
  - 7.4 ml de hipoclorito de sodio al 12%
  - 5 g de hidróxido de sodio
- Solución de hidróxido de sodio al 4%

#### METODO:

##### DIGESTION POR MICRO KJELDAHL

Se coloca en un matraz micro Kjeldahl 1 ml de la muestra, de 0.5 a 1.0 g de mezcla digestora, 4 perlas de vidrio y 7 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se calienta

en una parrilla hasta que la muestra esté completamente transparente y se deja enfriar a temperatura ambiente.

#### CURVA ESTANDAR DE AMONIACO

En tubos de 16x150 se colocan diferentes volúmenes de la solución estándar de amoniaco, completando el volumen a 1 ml con agua destilada. Se adicionan 5 ml de solución A y 5 ml de solución B, se agita y se deja reposar durante 30 minutos. Se lee la absorbancia a 625 nm contra un blanco de agua destilada tratado de la misma forma.

#### MUESTRA PROBLEMA

Las muestras digeridas y frías, se aforan a 100 ml y se dejan enfriar nuevamente. Se diluyen desde 1:1000 hasta 1:10000 de manera que las muestras no contengan menos de 1 mg ni más de 5 mg de  $\text{NH}_3$ /ml; antes de aforar se ajusta el pH con la solución de hidróxido de sodio a un valor entre 2.5 y 3.5; de esta dilución se toma por duplicado 1 ml de muestra, se coloca en un tubo de 16x150 y se trata de igual manera que la curva estándar. Los valores de absorbancia se interpolan en la curva estándar de amoniaco.

6.2 DETERMINACION DE ACTIVIDAD SOBRE CASEINA DE ENZIMAS  
PROTEOLITICAS: METODO DE NORTHROP  
(Godfrey & Reichelt, 1983)

REACTIVOS:

- Enzima neutra (Bacillus subtilis)
- Enzima alcalina (Bacillus subtilis)
- Solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M pH=7.4
- Solución amortiguadora de carbonatos 0.2 M pH=9.5
- Solución de caseína (Merck 2244) al 2% en amortiguador de fosfatos
- Solución de caseína (Merck 2244) al 2% en amortiguador de carbonatos
- Soluciones al 1% de cada una de las enzimas en solución amortiguadora de fosfatos para la neutra y de carbonatos para la alcalina
- Solución de ácido tricloracético al 5% (TCA)

METODO:

En un tubo de ensaye de 16x150 se colocan 2 ml de solución de caseína y 1 ml de solución de enzima y se incuba a 37°C durante 30 minutos, al cabo de los cuales se detiene

la reacción adicionando 4 ml de solución de TCA; se filtra con papel Whatman no. 1 y se determina la proteína en el filtrado por el método de Lowry (ver Sección 6.1.2). Se corre un blanco sin enzima, poniendo 1 ml de amortiguador en lugar de 1 ml de enzima y un blanco con la enzima inactivada al inicio de la reacción por adición de TCA.

La actividad enzimática se reporta en términos de unidades Northrop, definidas como la cantidad de enzima que produce un 40% de hidrólisis de un sustrato conocido de caseína bajo las condiciones del ensayo.

### 6.3 DETERMINACION DE LAS CONDICIONES DE INACTIVACION DE PROTEASAS

#### REACTIVOS:

- Enzima neutra (Bacillus subtilis)
- Enzima alcalina (Bacillus subtilis)
- Solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M pH=7.4
- Solución amortiguadora de carbonatos 0.2 M pH=9.5
- Solución de caseína (Merck 2244) al 2% en amortiguador de fosfatos
- Solución de caseína (Merck 2244) al 2% en amortiguador de carbonatos

- Soluciones al 1% de cada una de las enzimas en solución amortiguadora de fosfatos para la neutra y de carbonatos para la alcalina
- Solución de ácido tricloroacético al 5% (TCA)

#### DISEÑO EXPERIMENTAL

Las condiciones de tiempo y temperatura necesarias para inactivar las enzimas proteolíticas se determinan de acuerdo al siguiente diseño experimental:

Temp (°C)	65	70	75	80
Tiempo (min)				
	0			
	2			
	4			
	6			
	8			

#### METODO:

Se colocan alícuotas de 3 ml de la solución de enzima en 5 tubos de ensayo de 13x100 y se preincuban en un baño a 55°C durante 5 minutos.

Uno de los tubos se coloca en un baño de agua helada (tiempo 0) y el resto en un baño a la temperatura de inactivación, transfiriendo uno de ellos a un baño de agua helada cada 2 minutos. El procedimiento se repite para cada una de las temperaturas de inactivación.

Posteriormente se determina la actividad residual de las enzimas por el método de Northrop (ver Sección 6.2).

#### 6.4 MODIFICACION ENZIMATICA DE GLUTEN DE TRIGO

##### REACTIVOS:

- Gluten de trigo (Rafmex S.A. de C.V.)
- Enzima neutra (Bacillus subtilis)
- Enzima alcalina (Bacillus subtilis)
- Solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M, pH=7.4
- Solución amortiguadora de carbonatos 0.2 M, pH=9.5
- Solución de HCl 0.1 M
- Solución de NaOH 0.1 M

##### DISEÑO EXPERIMENTAL

El primer experimento de modificación enzimática se realizó conforme al siguiente diseño experimental:

## ENZIMA NEUTRA

TIEMPO DE HIDROLISIS (MIN)		0	10	20	30
SUSTRATO	REPETICION				
GLUTEN	1	G1N0	G1N10	G1N20	G1N30
	2	G2N0	G1N10	G2N20	G2N30
GLUTEN TRATADO	1	T1N0	T1N10	T1N20	T1N30
	2	T2N0	T2N20	T2N20	T2N30

## ENZIMA ALCALINA

TIEMPO DE HIDROLISIS (MIN)		0	10	20	30
SUSTRATO	REPETICION				
GLUTEN	1	G1A0	G1A10	G1A20	G1A30
	2	G2A0	G2A10	G2A20	G2A30
GLUTEN TRATADO	1	T1A0	T1A10	T1A20	T1A30
	2	T2A0	T2A10	T2A20	T2A30

El segundo experimento de modificación enzimática se llevó a cabo de acuerdo al siguiente diseño experimental:

ENZIMA	NEUTRA				ALCALINA			
	15	30	45	60	15	30	45	60
TIEMPO DE HIDROLISIS (MIN)								
SUSTRATO								
GLUTEN G. TRATADO	GN15 TN15	GN30 TN30	GN45 TN45	GN60 TN60	GA15 TA15	GA30 TA30	GA45 TA45	GA60 TA60

**METODO:**

En un frasco de vidrio con tapa de rosca se coloca la cantidad de gluten de trigo que contenga 8 g de proteína (basado en un análisis Kjeldahl) y se añade un volumen de 60 ml de solución amortiguadora de fosfatos para la hidrólisis con enzima neutra, o de carbonatos en el caso de la alcalina. Se reajusta con NaOH el pH de la dispersión al valor original del amortiguador. Se preincuba a 55°C en agitación (120 rpm) durante 5 minutos en un baño de agua (Reciprocating Water Bath Shaker New Brunswick Scientific Co. Inc.) y a continuación se adiciona la solución de enzima a la concentración deseada. Se incuba en las condiciones antes mencionadas durante el tiempo deseado, al cabo del cual se transfiere el frasco a un baño de agua en ebullición (92°C), dejándolo el tiempo necesario para inactivar la

enzima (7 min). El hidrolizado se liofiliza (Liofilizadora Labconco 5).

## 7 RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1 SELECCION DE LA METODOLOGIA PARA LA EVALUACION DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES

Considerando que la metodología empleada en la medición de propiedades funcionales es muy amplia y no se ha establecido un criterio de selección de la técnica más adecuada para cada tipo de proteína y aplicación, presentamos como primera parte de la sección de resultados diversos aspectos relacionados con las técnicas empleadas hasta la fecha y algunos comentarios sobre su implementación en el laboratorio y la técnica final desarrollada.

Las propiedades funcionales de las proteínas más importantes para la industria alimentaria son: solubilidad, emulsificación, gelificación y espumado (Smith & Brekke, 1985; Puski, 1976). Dado que no existen métodos estandarizados para evaluar estas propiedades, se procedió a realizar una recopilación de la metodología utilizada en las últimas décadas. En general, las determinaciones se basan en el mismo principio, pero existe una gran variación en las condiciones y en los parámetros de evaluación pues cada investigador los ajusta de acuerdo a las características del sustrato en estudio y el equipo del que dispone.

## GELIFICACION POR CALOR

Esta propiedad se determina preparando un gel de dimensiones específicas y evaluando sus características de dureza y resistencia ya sea cualitativamente en forma sensorial (Sathe & Salunkhe, 1981; Schmidt & Illingworth, 1978; Sathe et al., 1982) o cuantitativamente mediante el uso de instrumentos especialmente diseñados para ese fin (Schmidt & Illingworth, 1978; Smith & Brekke, 1985). Se realizaron pruebas preliminares para preparar los geles de gluten de trigo, presentándose dificultades en la obtención de geles homogéneos con las dimensiones requeridas, pues al ser el gluten insoluble y no mantenerse en dispersión, sólo gelifica el sedimento, sin incorporar toda el agua presente.

## FORMACION DE ESPUMA

Esta propiedad se estudia bajo dos diferentes conceptos, que son "foaming" (Sathe et al., 1982; Koyoro & Powers, 1987; Sathe & Salunkhe, 1981; Anusuya & Venkataraman, 1984; Bera & Mukherjee, 1989) y "whipping" (Kramer & Kwee, 1977; Thompson et al., 1982; Watanabe et al., 1981; Shaidi et al., 1984); sin embargo, no existe una clara diferencia entre dichas propiedades, y los métodos utilizados para evaluarlas sólo difieren en el parámetro que se toma en cuenta para expresar el resultado. Debido a esto, se decidió considerar estas dos

propiedades como la misma, llamándola espumado, dentro de la cual se evalúan dos aspectos: capacidad de formación de espuma y estabilidad de la espuma. La evaluación de estas propiedades es semicuantitativa y se utilizan básicamente dos formas para incorporar aire a la suspensión de proteína; en la primera de ellas el aire se incorpora por agitación mecánica en una licuadora (Sathe et al., 1982; Anusuya & Venkataraman, 1984; Bera & Mukherjee, 1989). La otra forma consiste en inyectar burbujas de aire a presión (Koyoro & Powers, 1987). El valor de capacidad de formación de espuma se expresa como el volumen de espuma formado o como el porcentaje de aumento de volumen de la dispersión debido a la formación de espuma. La estabilidad de la espuma se determina midiendo el volumen de espuma que perdura a diferentes tiempos. En las pruebas preliminares se utilizó agitación mecánica para la formación de espuma y se observó que al ser insoluble el gluten de trigo, éste no se encuentra disponible en la forma adecuada para propiciar la incorporación de aire y formar una espuma estable.

#### SOLUBILIDAD

Todos los métodos utilizados para determinar la solubilidad consisten en agitar cierto tiempo una dispersión de la proteína, centrifugarla y finalmente cuantificar la proteína presente en el sobrenadante (Aoki et al., 1980; Torgersen & Toledo, 1977). Las variaciones que

presentan estos métodos de determinación se deben a diferencias en cuanto a la concentración de proteína en la dispersión, valores de pH de la misma, condiciones de agitación y de cantrifugación y el tipo de reacción empleado para medir la cantidad de proteína en el sobrenadante. Para la determinación de la solubilidad del gluten de trigo se implementó una técnica de acuerdo al equipo disponible en el laboratorio, adaptando y modificando los métodos reportados por General Foods y Adler-Nissen (1986), expresando el resultado como porciento de nitrógeno soluble (N.S.). Este método modificado se describe a continuación.

#### TECNICA IMPLEMENTADA PARA LA DETERMINACION DE SOLUBILIDAD

##### REACTIVOS:

- Hidróxido de sodio 0.1 M
- Acido clorhídrico 0.1 M

##### METODO:

La solubilidad se determina basándose en los métodos reportados por Adler-Nissen (1986), por la compañía General Foods , y por Aoki et al. (1980). Se coloca la cantidad de

proteína necesaria para preparar 100 ml de dispersión al 1% (P/V) en un vaso de precipitados de 250 ml, se agregan 70 ml de agua destilada, se agita durante 30 minutos con un agitador magnético (Molda Agitherm modelo 53166) a velocidad mínima ajustando continuamente el pH con NaOH o HCl 0.1 M a un valor de 7.0; al término del período de agitación se completa el volumen de la dispersión a 100 ml con agua destilada. Se toman dos alícuotas de 25 ml cada una y se centrifugan a 11,000 rpm, a 4°C durante 30 minutos (Centrífuga Sorvall RC5). Se toma una alícuota de 1 ml del sobrenadante y se determina su contenido de nitrógeno por el método de Weatherburn (1967). El porcentaje de nitrógeno soluble se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ N.S.} = \frac{\text{N SOLUBLE}}{\text{N TOTAL}} \times 100$$

## EMULSIFICACION

### CAPACIDAD DE EMULSIFICACION

La Capacidad de Emulsificación es considerada la determinación más importante en la evaluación de las

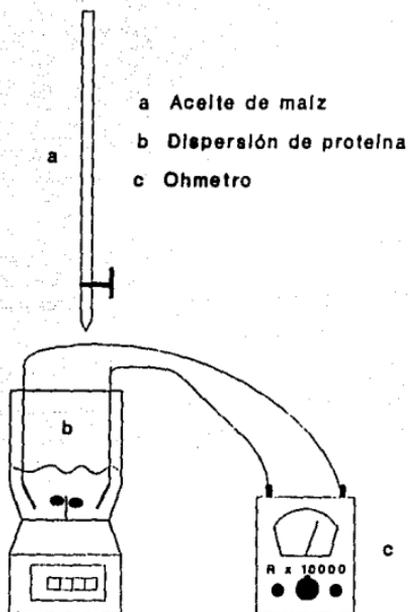
propiedades de emulsificación. Cabe señalar que no sólo es relevante la cantidad de aceite que la proteína es capaz de emulsificar, sino qué tan estable es la emulsión formada, lo cual se evalúa mediante las determinaciones de Estabilidad y Actividad de la Emulsión.

Todos los métodos reportados para determinar la Capacidad de Emulsificación (C.E.) se basan en la determinación de la cantidad de aceite que la proteína es capaz de incorporar a la dispersión de manera homogénea formando una emulsión. La diferencia esencial entre estos métodos radica en la forma de detección del punto de inversión de la emulsión en el cual ocurre una inversión de fases y la emulsión aceite en agua pasa a ser agua en aceite. En el método reportado por Beauchat (1977) el punto de inversión de la emulsión se detecta en forma visual y auditiva por un cambio en la consistencia de la emulsión. Este método es el más sencillo y fue el que se probó inicialmente en el laboratorio, pero presenta dificultades en la detección del punto final al trabajar con proteínas que presentan una alta capacidad de emulsificación, pues el cambio en la emulsión no era siempre el mismo en las distintas muestras evaluadas haciendo poco confiable la determinación.

La detección del punto final en el método reportado por Marshall et al. (1975) se realiza en forma visual utilizando un colorante liposoluble (Oil Red O), el cual hace que la

emulsión en el punto de inversión cambie de color rosa a rojo intenso. Se probó en el laboratorio este método y a pesar de que es también sencillo y ampliamente utilizado no se adoptó, ya que al evaluar proteínas con baja C.E. el cambio de color en la detección del punto final no se observa claramente.

Dado que la detección del punto final en los métodos antes mencionados es subjetiva, no es posible obtener resultados reproducibles y confiables. Por esta razón se probó el método conductimétrico descrito por Webb (1970) y modificado por Smith & Brekke (1985), en el que el punto de inversión se detecta con un óhmetro al presentarse un cambio repentino en la resistencia que presenta la emulsión. Este cambio ocurre debido a que en la emulsión aceite en agua, la fase continua es el agua y ésta permite el paso de la corriente eléctrica; al invertirse la emulsión la fase continua es el aceite y la resistencia eléctrica es infinita. Este método es el más ampliamente utilizado pues es el más reproducible. En la Figura 3 se muestra un esquema del aparato que se implementó para realizar la determinación de C.E., el cual fue construido en el Departamento de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, con ayuda del Taller de Mantenimiento del mismo instituto.



**FIGURA 3 ESQUEMA DEL APARATO PARA LA DETERMINACION DE CAPACIDAD DE EMULSIFICACION**

Idealmente se debería utilizar un agitador ultra-turrax para controlar mejor la velocidad de agitación, y usar una bomba peristáltica para adicionar el aceite con un flujo constante. Sin embargo, el método fue adaptado de acuerdo al material disponible en el laboratorio, por lo que aún cuando para los fines comparativos que se necesitan el método es

útil, es necesario tener presente que no se controlan los factores de desgaste de las aspas de la licuadora, velocidad en la adición de aceite, tamaño de las gotas de aceite, temperatura y velocidad real de agitación según la viscosidad de la emulsión.

Las condiciones del experimento se establecieron tomando elementos de los métodos de Marshall et al. (1975), Koyoro & Powers (1987) y Schachtel (1981), proponiendo el siguiente procedimiento:

#### TECNICA IMPLEMENTADA PARA LA DETERMINACION DE CAPACIDAD DE EMULSIFICACION

##### REACTIVOS:

- Dispersión de proteína al 1% (basado en el análisis por Kjeldahl de la muestra seca).
- Aceite de maíz La Gloria (Arancia S.A. de C.V.)
- Solución de hidróxido de sodio 0.1 M
- Solución de ácido clorhídrico 0.1 M

##### METODO:

Se preparan 100 ml de dispersión de proteína al 1% ajustando el pH al valor deseado antes de aforar. Se colocan 50 ml de ésta dispersión en el vaso de una licuadora

(Osterizer Modelo L-54) se introducen en ella las terminales de un multímetro (TMK Modelo 500), se agita a velocidad mínima; al cabo de treinta segundos de agitación se comienza a añadir el aceite con una bureta, en forma continua y sin dejar de agitar. Se continúa añadiendo aceite hasta alcanzar el punto de inversión de la emulsión, el cual se detecta cuando el óhmetro, cuya escala se encuentra ajustada a Rx10000, marque resistencia infinita. El volumen de aceite agregado se lee en la bureta después de permitir que éste drene durante un minuto.

La Capacidad de Emulsificación se reporta como el volumen de aceite emulsificado (ml)/100 mg de proteína.

$$C.E. = \frac{VOL\ ACEITE\ (ML)}{5}$$

#### ESTABILIDAD DE LA EMULSION

De los métodos reportados para determinar la Estabilidad de la Emulsión (E.E.) algunos la evalúan después de someter la emulsión a un período de reposo (Koyoro & Powers, 1987; Sathe & Salunkhe, 1981) y otros después de someter la emulsión a una acción mecánica por centrifugación (Aoki et al., 1980; Eisele & Brekke, 1981; Thompson et al., 1982). Además de esta diferencia, los métodos varían en la proporción de aceite-dispersión utilizada para preparar la emulsión, en las condiciones de temperatura, tiempo y

agitación, así como en el parámetro considerado para expresar el resultado.

De los métodos probados en el laboratorio se seleccionó el método reportado por Eisele & Brekke (1981), en el que se somete la emulsión a una fuerza mecánica. Las condiciones del ensayo fueron establecidas tomando elementos de los diferentes métodos consultados (Aoki et al., 1980; Thomson et al., 1982). De esta manera se estableció el siguiente procedimiento:

#### TECNICA IMPLEMENTADA PARA LA DETERMINACION DE ESTABILIDAD DE LA EMULSION

##### REACTIVOS:

- Dispersión de proteína al 1% (basado en el análisis por Kjeldahl de la muestra seca)
- Aceite de maíz La Gloria (Arancia S.A. de C.V.)
- Solución de hidróxido de sodio 0.1 M
- Solución de ácido clorhídrico 0.1 M

##### METODO:

Se preparan 100 ml de dispersión de proteína al 1%, ajustando el pH a un valor de 7.0 con NaOH o HCl antes de aforar. Se colocan 50 ml de esta dispersión en un vaso de

licuadora (Osterizer modelo 440) y se agita durante 30 segundos a una velocidad constante, al cabo de los cuales se añade un volumen de aceite equivalente al 30 % del total utilizado en la determinación de C.E.; se continúa agitando hasta completar 3 minutos. Se transfieren 2 alícuotas de 15 ml de la emulsión formada a tubos de centrifuga graduados; se centrifugan durante 2 minutos (Centrifuga SME, 3000 rpm). Se lee el volumen total en el tubo y el volumen de agua separada de la emulsión y se calcula la Estabilidad de la Emulsión de la siguiente manera:

$$\% \text{ E.E.} = 100 - \frac{(\text{VOL. AGUA SEPARADA} \times 100)}{\text{VOL. TOTAL}}$$

#### ACTIVIDAD DE LA EMULSION

Los métodos reportados para evaluar la Actividad de la Emulsión determinan la cantidad de emulsión que perdura después de someterla a la acción mecánica de la centrifugación durante un tiempo determinado. Existen varias diferencias en las condiciones experimentales de estos métodos, pero la principal de ellas consiste en la proporción aceite/dispersión utilizada para formar la emulsión.

Se modificaron los métodos de Eisele & Brekke (1981) y de Watanabe et al. (1981) de acuerdo a pruebas preliminares

realizadas en el laboratorio estableciendo la siguiente metodología:

TECNICA IMPLEMENTADA PARA LA DETERMINACION DE  
ACTIVIDAD DE LA EMULSION

REACTIVOS:

- Dispersión de proteína al 1% (basado en el análisis por Kjeldahl de la muestra seca)
- Aceite de maíz La Gloria (Arancia S.A. de C.V.)
- Solución de hidróxido de sodio 0.1 M
- Solución de ácido clorhídrico 0.1 M

METODO:

Se realiza en la misma forma que la determinación de Estabilidad de la Emulsión pero añadiendo un volumen de aceite igual a 50 ml. Después de centrifugar, se lee el volumen total en el tubo y el volumen de emulsión que perdura; la Actividad de la Emulsión (A.E.) se expresa como porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ A.E.} = \frac{\text{VOLUMEN DE EMULSION}}{\text{VOLUMEN TOTAL}} \times 100$$

Se decidió estandarizar las condiciones de las técnicas de evaluación de propiedades funcionales en cuanto a pH y concentración de proteína de la dispersión. Aunque es conveniente evaluar las propiedades funcionales a diferentes valores de pH, en las técnicas propuestas se indica realizar las determinaciones sólo a pH neutro. Esto se debe a que en este trabajo sólo se realizarán estudios comparativos entre las diferentes proteínas, y de acuerdo con Puski (1976). las características funcionales que presenta una proteína a pH neutro son las que más se asemejan al comportamiento que la proteína presentara al ser incorporada en un sistema complejo. En lo que respecta a la concentración de proteína, se seleccionó una concentración del 1% por ser la que utilizan la mayor parte de los investigadores.

## 7.2 SELECCION DEL SUSTRATO PROTEICO

Entre las fuentes de proteína que pueden utilizarse como alternativas para la producción de proteínas funcionales se seleccionaron las proteínas de origen vegetal sobre aquellas de origen animal ya que en general presentan actualmente mayor disponibilidad y menor costo; además, representan un sustrato proteico homogéneo, lo cual facilita el control del proceso de modificación enzimática.

Se consideraron como posibles sustratos dos proteínas vegetales: gluten de maíz y gluten de trigo. En la Tabla 7 se presentan el precio y el contenido de proteína reportado por el fabricante de cada uno de estos productos.

**TABLA 5 PRECIOS DE MATERIA PRIMA**

PRODUCTO	PRECIO (\$/KG)	CONTENIDO DE PROTEINA (%)
GLUTEN DE MAIZ	700	APROX. 50
GLUTEN DE TRIGO	1,400	70 - 80
GLUTEN DE TRIGO VITAL	3,500	> 80

El gluten de maíz es una proteína barata pues es un subproducto en la elaboración de aceite de maíz y sólo se aprovecha como ingrediente en alimentos balanceados para animales. Esta proteína no posee ninguna propiedad funcional

intrínseca conocida y en experimentos preliminares se observó que es completamente insoluble en agua y no se dispersa fácilmente.

El gluten de trigo común es un subproducto en el proceso de obtención de almidón que al igual que el gluten vital tiene diversas aplicaciones en la industria de los alimentos. Sin embargo el gluten de trigo vital es más caro pues se obtiene mediante un proceso especial que conserva su alta viscoelasticidad. A pesar de que el gluten de maíz es una proteína más barata que el gluten de trigo, se decidió trabajar inicialmente con este último ya que es una proteína más homogénea y posee propiedades funcionales ya conocidas.

Una vez seleccionado el gluten de trigo como sustrato para la modificación enzimática, se determinó por el método de Kjeldahl el contenido de proteína de diferentes glútenes de trigo comerciales. Los resultados se presentan en la Tabla 6.

Como se observa, existe una gran variabilidad en el contenido de proteína no sólo de una marca comercial a otra sino entre un lote y otro de un mismo fabricante. Debido a esto, no fue posible seleccionar una marca comercial que garantizara un contenido de proteína constante, y se decidió utilizar el gluten Rafmex por tenerlo disponible en mayor cantidad. Con el fin de conocer la composición del sustrato

seleccionado se realizó un análisis químico proximal del gluten Rafmex 3 cuyos resultados se muestran en la Tabla 7.

**TABLA 6 CONTENIDO DE PROTEINA DE GLUTENES DE TRIGO COMERCIALES**

PRODUCTO	CONTENIDO DE PROTEINA (%)
GLUTEN RAFMEX 1	56.32
GLUTEN RAFMEX 2	69.32
GLUTEN RAFMEX 3	52.87
GLUTEN MON	67.44
GLUTEN SUPRAVITAL	61.47
GLUTEN LOR	57.28

**TABLA 7 ANALISIS QUIMICO PROXIMAL DEL GLUTEN DE TRIGO RAFMEX 3**

	BASE HUMEDA	BASE SECA
MATERIA SECA (%)	87.88	
HUMEDAD (%)	12.12	
PROTEINA CRUDA (Nx5.7)	56.32	64.09
EXTRACTO ETHEREO (%)	00.68	00.77
CENIZAS (%)	01.14	01.29
FIBRA CRUDA (%)	00.37	00.43
EXTRACTO LIBRE DE NITROGENO	29.37	33.42
T.N.D. <sup>1</sup> (% APROX) BASE SECA	65.83	74.91
E.D. <sup>2</sup> (KCAL/KG) APROX	2902.44	3302.73

1 T.N.D. = Total de Nutrientes Digeribles

2 E.D. = Energía digerible

### 7.3 MODIFICACION FISICA DEL SUSTRATO

El tratamiento térmico es un procedimiento de modificación física de las proteínas mediante el cual se pueden producir cambios en sus propiedades funcionales por alteración de su estructura. En el presente trabajo se estudian como sustratos un gluten de trigo tratado térmicamente y uno sin tratamiento.

Las condiciones de dicho tratamiento se seleccionaron con base en experimentos preliminares en los que se observó que con calor húmedo el gluten forma bloques compactos muy difíciles de romper; también se observó que el tratamiento con temperaturas inferiores a 100°C no mejora la dispersabilidad en agua del gluten, mientras que a temperaturas superiores, aunque se mejora, el gluten se quema desarrollando un olor desagradable. La duración del tratamiento térmico se estableció bajo el mismo criterio considerando las observaciones anteriores; el tratamiento térmico se realizó a 100°C con calor seco en una estufa Felisa (modelo FE293) durante 12 hrs.

### 7.4 SELECCION DE ENZIMA PARA LA MODIFICACION DE PROTEINAS

El comportamiento de las proteínas en los sistemas alimenticios puede modificarse por la acción de muchos diferentes tipos de enzimas, la mayoría de las cuales son

proteasas (Phillips & Beuchat, 1979; Chobert et al., 1988). Por esto se decidió usar una proteasa, cuya selección se basó inicialmente en el aspecto económico. En la Tabla 8 se muestran los precios de algunas enzimas proteolíticas industriales y como se puede observar, las proteasas de origen microbiano resultan más económicas que las de origen vegetal o animal.

De las proteasas microbianas con que se contaba, se optó por utilizar una proteasa neutra y una alcalina seleccionándolas de acuerdo al costo por unidad de actividad, después de haberla cuantificado mediante el método de Northrop. En la Tabla 9 se presentan los precios por kilogramo y por unidad de actividad de las proteasas microbianas consideradas para la selección.

El precio por kilogramo de las enzimas de origen fúngico es menor que el de las de origen bacteriano; sin embargo, presentan muy baja actividad proteolítica y por tanto mayor costo por unidad de actividad. En consecuencia se decidió trabajar con las dos proteasas bacterianas que presentan menor costo por unidad de actividad, la Neutra I y la

TABLA 8 PRECIOS DE PROTEASAS INDUSTRIALES

ENZIMA	ORIGEN	PRECIO (PESOS/KG)
<b>VEGETALES<sup>1</sup></b>		
BROMELINA	PIÑA	639,240
PROLASA CRUDA	PAPAYA	180,000
PAPAINA CRUDA	LATEX DE PAPAYA	75,000
<b>ANIMALES<sup>1</sup></b>		
TRIPSINA	DE PANCREAS PORCINO	3,332,000
PEPSINA	MUCOSA DE ESTOMAGO PORCINO	370,000
<b>MICROBIANAS<sup>2</sup></b>		
FUNGICA NEUTRA I	<u>A. oryzae</u>	3,700
FUNGICA NEUTRA II	<u>A. oryzae</u>	5,750
BACTERIANA ALCALINA I	<u>B. subtilis</u>	36,573
BACTERIANA ALCALINA II	<u>B. subtilis</u>	56,000
BACTERIANA ALCALINA III	<u>B. subtilis</u>	57,500
BACTERIANA NEUTRA I	<u>B. subtilis</u>	21,131
BACTERIANA NEUTRA II	<u>B. subtilis</u>	45,620
BACTERIANA NEUTRA III	<u>B. subtilis</u>	38,120

1 Precios de 1989

2 Precios consultados a la industria (1988)

TABLA 9 PRECIOS Y ACTIVIDAD DE PROTEASAS MICROBIANAS

ENZIMA	PRECIO <sup>a</sup> (PESOS/KG)	ACTIVIDAD <sup>b</sup> (UN <sup>c</sup> /G)	PRECIO (PESOS/UN)
FUNGICA NEUTRA I	3,700	4.1	0.90
FUNGICA NEUTRA II	5,750	7.6	0.76
BACTERIANA ALCALINA I	36,573	231.4	0.14
BACTERIANA ALCALINA II	56,000	273.1	0.21
BACTERIANA NEUTRA I	21,131	129.6	0.16
BACTERIANA NEUTRA II	45,620	263.3	0.17

a Precios consultados a la industria (1988)

b Información disponible en el laboratorio

c Unidades Northrop de actividad (ver Sección 5.2)

Alcalina I, a las que en lo sucesivo se les llamará simplemente enzima neutra y alcalina respectivamente.

La información técnica reportada por los fabricantes de las enzimas seleccionadas se encuentra resumida en la Tabla 10.

**TABLA 10 INFORMACION TECNICA DE LAS ENZIMAS**

	ENZ. ALCALINA	ENZ. NEUTRA
FUENTE BACTERIANA	B. subtilis	B. subtilis
ACTIVIDAD REPORTADA	590,000 MDU/g	200 UN/g
TIPO	Alcalina	Neutra
PH OPTIMO	9.0 a 9.5	6.5 a 8.0
PH EFECTIVO	6.5 a 10.0	5.0 a 9.5
TEMPERATURA OPTIMA	50 a 60°C	45 a 55°C
TEMPERATURA EFECTIVA	30 a 65°C	Hasta 60°C

Es necesario conocer la actividad de las enzimas utilizadas en un proceso de modificación para poder controlar la hidrólisis y de esta manera obtener un producto con propiedades funcionales constantes.

Se determinó la actividad proteolítica de las enzimas alcalina y neutra sobre un sustrato de caseína de acuerdo al método de Northrop. Los resultados se presentan en la Tabla 11.

TABLA 11 ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS PROTEOLITICAS

ENZIMA	ACTIVIDAD (UN/G ENZIMA)
NEUTRA	129.6
ALCALINA	72.8

En el proceso de modificación enzimática el grado de hidrólisis se controla midiendo el tiempo de la reacción, por lo que es necesario inactivar la enzima una vez transcurrido el tiempo establecido. Esta inactivación debe ser efectiva para asegurarse de que la enzima no presente actividad residual, pues además de que esto no está permitido por las regulaciones sanitarias, la hidrólisis del sustrato continuaría fuera de control variando las propiedades funcionales con el tiempo.

Se determinaron las condiciones de tiempo y temperatura necesarias para inactivar las enzimas proteolíticas considerando cinco tiempos y cuatro temperaturas. Esta determinación se realizó por duplicado de acuerdo al método descrito en la Sección 6.3, obteniéndose los resultados que se presentan en la Tabla 12 y en las Figuras 4 y 5.

**TABLA 12 EFECTO DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE INACTIVACION SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE LAS ENZIMAS NEUTRA Y ALCALINA**

ENZIMA NEUTRA: ACTIVIDAD RESIDUAL (%)				
TEMPERATURA (°C)	65	70	75	80
TIEMPO (MIN)				
0	100.0	100.0	100.0	100.0
2	87.2	78.6	0.2	0.2
4	91.1	65.2	0.2	0.2
6	60.7	50.2	0.1	0.0
8	37.2	30.8	0.0	0.0

ENZIMA ALCALINA: ACTIVIDAD RESIDUAL (%)				
TEMPERATURA (°C)	65	70	75	80
TIEMPO (MIN)				
0	100.0	100.0	100.0	100.0
2	60.2	9.8	2.6	1.1
4	45.7	6.2	1.8	0.0
6	34.9	3.7	0.2	0.0
8	31.3	2.9	0.0	0.0

En las Figuras 4 y 5 se observa que la actividad proteolítica de las enzimas neutra y alcalina disminuye más

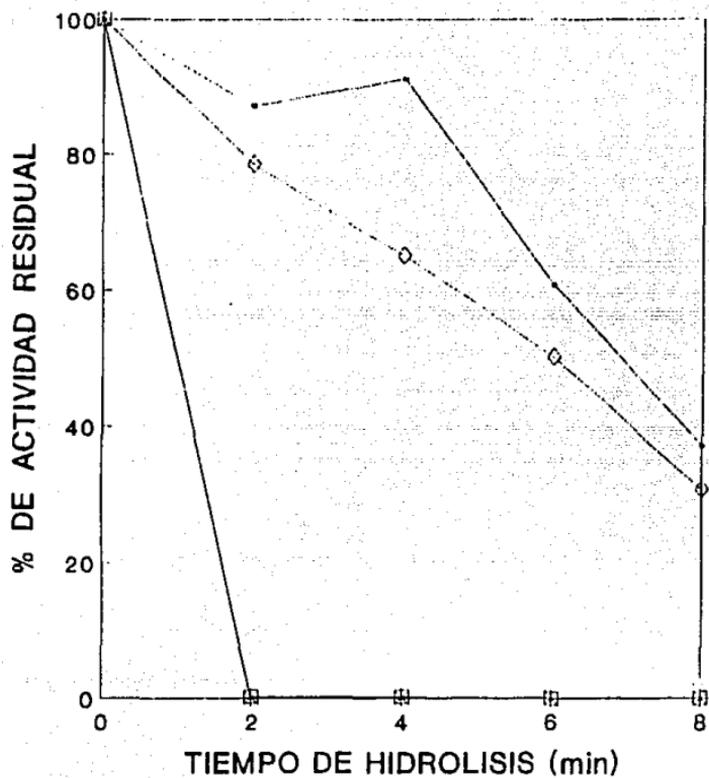


FIGURA 4 CURVAS DE INACTIVACION DE LA ENZIMA NEUTRA  
65°C (•), 70°C (◊), 75°C (◐), 80°C (◑).

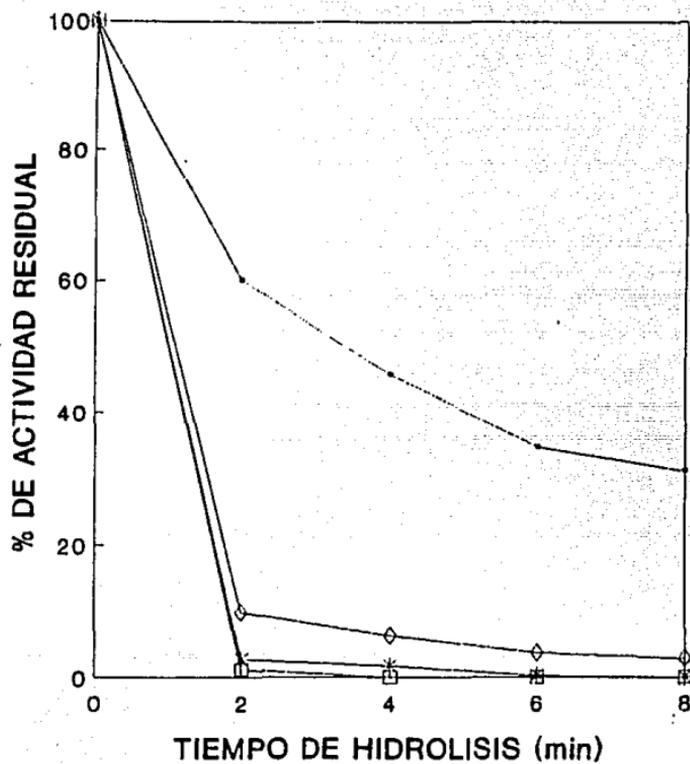


FIGURA 5 CURVAS DE INACTIVACION DE LA ENZIMA ALCALINA  
65°C (\*), 70°C (◊), 75°C (+), 80°C (◻).

rápida al incrementarse la temperatura de inactivación que al aumentarse el tiempo de inactivación.

En el caso de la proteasa neutra, a temperaturas de 70°C o menores, la inactivación ocurre más lentamente que a temperaturas mayores en las que ésta es muy rápida.

La enzima alcalina es más sensible al calor ya que a temperaturas mayores de 65°C se logra una disminución de más del 90% de la actividad de la enzima durante los primeros dos minutos de exposición.

Con base en estos resultados se establecieron las condiciones de inactivación de las proteasas. Con el fin de lograr una inactivación rápida se decidió realizarla a una temperatura de 80°C durante dos minutos. Para lograr esto se usó un baño de agua en ebullición en la cual se introduce la muestra durante siete minutos, pues la temperatura de ésta toma cinco minutos en subir de 55°C (temperatura de hidrólisis) a 80°C.

#### 7.5 PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS SUSTRATOS

Con objeto de evaluar los cambios que la modificación enzimática produzca en los sustratos, se determinaron sus

propiedades funcionales nativas. También se determinaron las propiedades funcionales de dos aditivos emulsificantes (proteína aislada de soya) con el fin de usarlas como referencia. Los resultados se presentan en el la Tabla 13.

**TABLA 13 PROPIEDADES FUNCIONALES NATIVAS DE GLUTEN Y GLUTEN TRATADO TERMICAMENTE Y DE DOS DIFERENTES PRODUCTOS EMULSIFICANTES COMERCIALES**

SUSTRATO	N.S. <sup>a</sup>	PROPIEDADES C.E. <sup>b</sup>	FUNCIONALES E.E. <sup>c</sup>	A.E. <sup>d</sup>
GLUTEN	0.78	4.9	16.0	0
GLUTEN TRATADO	0.63	5.7	9.0	0
PURINA 500E	2.53	28.9	91.4	91
PURINA 590	1.77	24.2	82.5	89
AGUA		4.3		

a N.S.= Nitrógeno Soluble (%)

b C.E.= Capacidad de Emulsificación (ml de aceite /100 mg de proteína)

c E.E.= Estabilidad de la Emulsión (%)

d A.E.= Actividad de la Emulsión (%)

Aunque se ha reportado (Chobert et al., 1988; Phillips & Stenberg, 1977) que las propiedades de emulsificación de los aislados de soya están directamente relacionadas con su solubilidad, los productos comerciales analizados presentan alta Capacidad de Emulsificación y forman emulsiones muy estables y viscosas a pesar de ser muy poco solubles. No obstante, estos productos forman dispersiones homogéneas muy estables a diferencia del gluten, cuyas dispersiones son muy

inestables. Además, la Capacidad de Emulsificación del gluten es prácticamente nula si se considera que el agua pura es capaz de emulsificar en las condiciones del ensayo 21.3 ml de aceite (equivalente a 4.26 ml/100 mg, si se expresa el valor como si fuera proteína). Las determinaciones de estabilidad y actividad de la emulsión indican también que las emulsiones formadas con gluten son inestables.

#### 7.6 PRIMER EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA

La modificación enzimática de las propiedades funcionales de las proteínas requiere de una hidrólisis moderada por lo que se decidió utilizar una baja concentración de enzima (de alrededor del 1% P/P de la enzima menos activa con respecto a la proteína del sustrato): esta concentración equivale aproximadamente a 0.625 UN de enzima/g de proteína en el sustrato.

Manteniendo constante la concentración de enzima, se estudió el efecto del tiempo de hidrólisis sobre las propiedades funcionales de cada sustrato, de acuerdo con el diseño experimental presentado en la Sección 6.4.

La hidrólisis enzimática se realizó en forma completamente aleatoria distribuyendo las 36 distintas

combinaciones (TIEMPOxSUSTRATOxENZIMAxREPETICION) en 4 bloques de 8 repeticiones cada uno.

Al término de la hidrólisis se determinó el valor de pH de cada uno de los hidrolizados con el fin de asegurarse que el amortiguador utilizado mantuviera el sistema en el valor de pH óptimo de la enzima. En la Tabla 14 se presentan los valores promedio de pH inicial de las dispersiones de gluten, los valores de pH a los que se ajustó antes de realizar la hidrólisis y los valores promedio de pH final para cada combinación sustrato-enzima.

**TABLA 14 VALORES PROMEDIO DE PH DE LOS HIDROLIZADOS DETERMINADOS AL FINAL DE LA HIDROLISIS (PRIMER EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA)**

SUSTRATO-ENZIMA	PH INICIAL	PH AJUSTADO	PH FINAL
GLUTEN-NEUTRA	7.21	7.40	7.37
G. TRATADO-NEUTRA	7.18	7.40	7.30
GLUTEN-ALCALINA	9.16	9.50	9.07
G. TRATADO-ALCALINA	9.08	9.50	8.80

7.7 PROPIEDADES FUNCIONALES (PRIMER EXPERIMENTO DE  
MODIFICACION ENZIMATICA)

Las determinaciones de las propiedades funcionales se realizaron por duplicado y en forma aleatoria. En la Tabla 15 se presentan los valores de solubilidad (Nitrógeno Soluble %) de cada uno de los hidrolizados. La variación de dicha propiedad funcional respecto al tiempo de hidrólisis se observa en la Figura 6.

**TABLA 15 NITROGENO SOLUBLE (PRIMER EXPERIMENTO DE  
MODIFICACION ENZIMATICA)**

SUSTRATO	ENZIMA NEUTRA				ENZIMA ALCALINA				
	GLUTEN		G. TRATADO		GLUTEN		G. TRATADO		
	N.S. <sup>a</sup>	ES <sup>b</sup>	N.S.	ES	N.S.	ES	N.S.	ES	
TIEMPO DE HIDROLISIS (MIN)									
0	0.89	0.1	1.41	0.1	6.46	1.6	5.31	0.3	
10	1.53	0.2	1.74	0.1	12.53	1.7	11.49	0.8	
20	2.25	0.1	1.93	0.1	13.55	0.5	14.97	0.3	
30	2.68	0.1	2.29	0.1	17.30	0.8	16.07	0.7	

a N.S.= Nitrógeno Soluble (%)

b ES= Error Estándar

En la Figura 6 se observa que las curvas de solubilidad de la enzima alcalina parten de un valor inicial mayor que las curvas de la enzima neutra; dado que estos valores

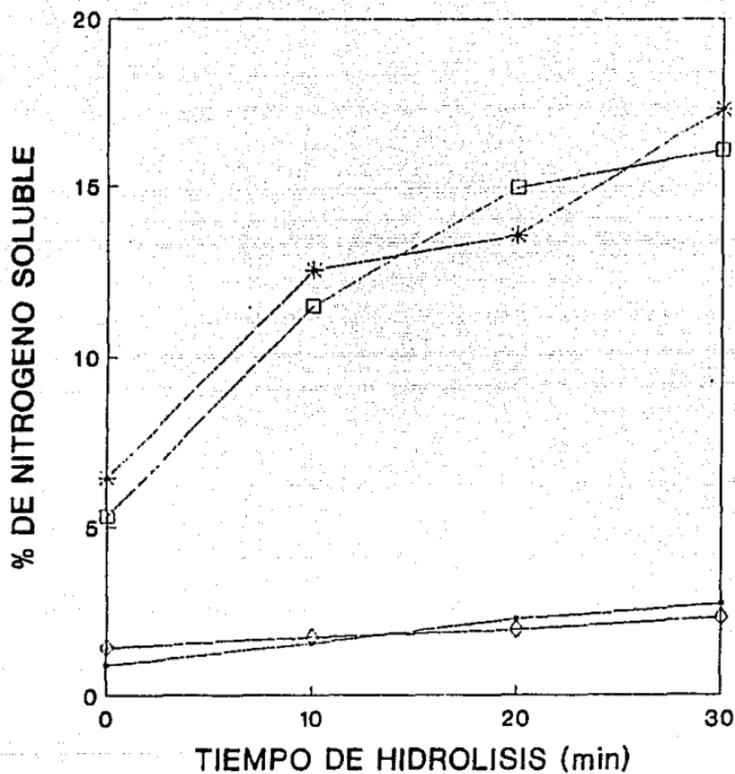


FIGURA 6 EFECTO DEL TIEMPO DE HIDROLISIS SOBRE LA SOLUBILIDAD (PRIMER EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA);  
 Enzima neutra-gluten (\*)  
 Enzima neutra-gluten tratado (o)  
 Enzima alcalina-gluten (•)  
 Enzima alcalina-gluten tratado (□)

corresponden a los controles de tiempo = 0 min, es posible que la diferencia radique únicamente en la exposición del sustrato a diferentes condiciones de pH y que a pH alcalino el gluten sufra una ligera modificación.

Los sustratos tratados con la enzima neutra no aumentaron su solubilidad. Esto puede explicarse por el hecho de que las proteínas del gluten tal vez no tengan un gran número de enlaces peptídicos para los que la enzima neutra es específica, por lo que el número de cortes sería reducido y sólo se podrían liberar cadenas peptídicas muy grandes y por lo tanto insolubles.

La especificidad de la enzima alcalina, en cambio, la hace más activa sobre gluten; a pesar de que sólo se solubiliza un 11% de la proteína en 30 minutos (ver Tabla 15) se obtuvieron productos que formaban dispersiones más estables y homogéneas que los sustratos originales. El grado de solubilización alcanzado con la enzima alcalina es similar para ambos sustratos.

Los valores de Capacidad de Emulsificación de los hidrolizados se muestran en la Tabla 16 y el efecto del tiempo sobre esta propiedad se puede apreciar en la Figura 7.

**TABLA 16 CAPACIDAD DE EMULSIFICACION (PRIMER EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA)**

SUSTRATO	ENZIMA NEUTRA				ENZIMA ALCALINA			
	GLUTEN		G. TRATADO		GLUTEN		G. TRATADO	
	C.E. <sup>a</sup>	ES <sup>b</sup>	C.E.	ES	C.E.	ES	C.E.	ES
TIEMPO DE HIDROLISIS (MIN)								
0	6.1	0.09	5.8	0.08	11.7	1.77	8.7	0.14
10	5.9	0.07	6.1	0.13	16.1	1.05	17.9	0.65
20	6.0	0.05	5.9	0.06	19.9	0.74	24.2	0.49
30	6.1	0.10	6.3	0.16	25.3	0.45	30.0	1.04

a C.E.= Capacidad de Emulsificación (ml aceite/100 mg proteína)

b ES= Error Estándar

La Figura 7 muestra que al igual que para la solubilidad, la exposición inicial del gluten a un pH alcalino aumenta la capacidad de emulsificación de la proteína. El tratamiento con la enzima alcalina produce una modificación positiva en la propiedad de capacidad de emulsificación, sobre todo en el gluten tratado. A los 20 minutos de hidrólisis la C.E. es igual a la del producto comercial Purina 590 y a los 30 minutos la C.E. incluso supera en un 4% a la del producto comercial Purina 500E.

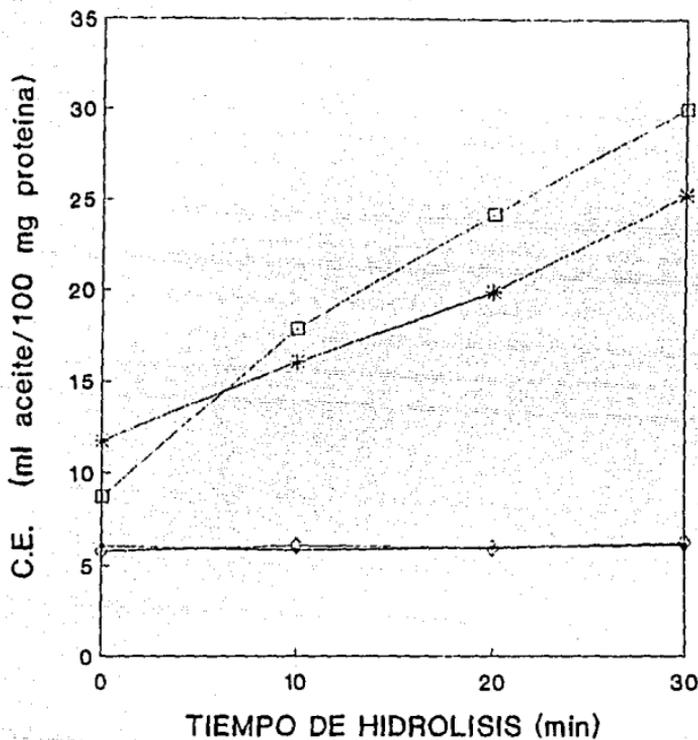


FIGURA 7 EFECTO DEL TIEMPO DE HIDROLISIS SOBRE LA CAPACIDAD DE EMULSIFICACION (PRIMER EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA);  
Enzima neutra-gluten (\*)  
Enzima neutra-gluten tratado (◊)  
Enzima alcalina-gluten (\*)  
Enzima alcalina-gluten tratado (◻)

En la Tabla 17 se presentan los valores de Estabilidad de la Emulsión y en la Figura 8 se observa la variación de la E.E. con respecto al tiempo.

**TABLA 17 ESTABILIDAD DE LA EMULSION (PRIMER EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA)**

SUSTRATO	ENZIMA NEUTRA				ENZIMA ALCALINA			
	GLUTEN		G.TRATADO		GLUTEN		G.TRATADO	
	E.E. <sup>a</sup>	ES <sup>b</sup>	E.E.	ES	E.E.	ES	E.E.	ES
TIEMPO DE HIDROLISIS (MIN)								
0	18.2	3.2	18.0	1.9	33.5	1.7	29.0	1.9
10	22.2	2.5	20.5	1.2	45.0	0.7	50.5	0.6
20	24.3	2.4	24.0	2.6	44.5	0.5	62.0	1.2
30	21.6	2.5	22.0	2.5	50.0	0.4	76.0	0.7

a E.E.= Estabilidad de la Emulsión (%)

b ES= Error Estándar

Como puede observarse, la estabilidad de la emulsión también se ve influenciada por la exposición inicial de la proteína a las condiciones de pH alcalino. En este caso el tratamiento con la enzima neutra tampoco modifica la propiedad funcional de E.E.. La modificación con la enzima alcalina, por el contrario, mejora notablemente la E.E. de los sustratos, en particular la del gluten tratado.

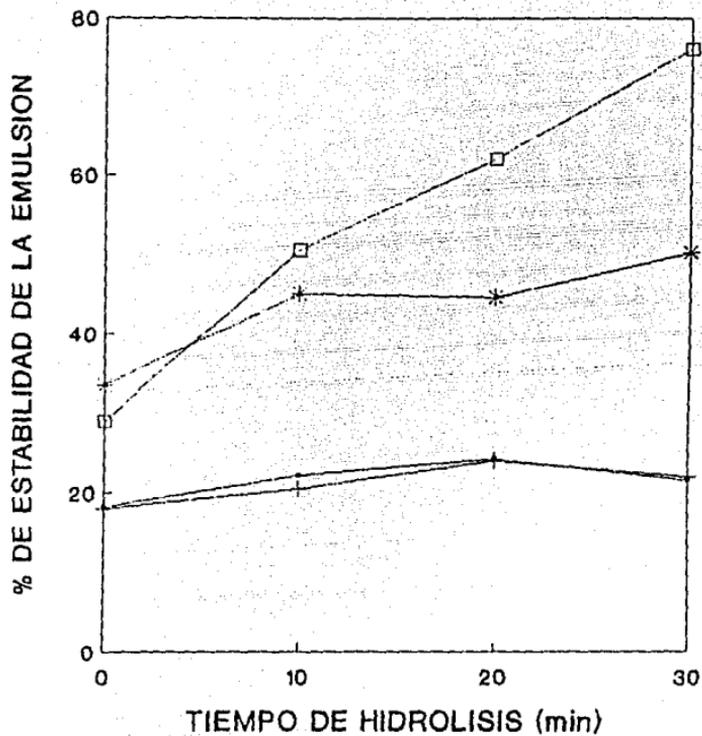


FIGURA 8 EFECTO DEL TIEMPO DE HIDROLISIS SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA EMULSION (PRIMER EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA);  
 Enzima neutra-gluten (\*)  
 Enzima neutra-gluten tratado (○)  
 Enzima alcalina-gluten (▲)  
 Enzima alcalina-gluten tratado (□)

En la Tabla 18 se presentan los valores de Actividad de la Emulsión cuya variación respecto al tiempo de hidrólisis se representa en la Figura 9.

**TABLA 18 ACTIVIDAD DE LA EMULSION (PRIMER EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA)**

SUSTRATO	ENZIMA NEUTRA				ENZIMA ALCALINA			
	GLUTEN		G. TRATADO		GLUTEN		G. TRATADO	
	A.E. <sup>a</sup>	ES <sup>b</sup>	A.E.	ES	A.E.	ES	IAE	ES
TIEMPO DE HIDROLISIS (MIN)								
0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	7.0	0.3
10	0.0	0.0	2.0	0.3	0.0	0.0	7.0	1.3
20	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	65.0	3.0
30	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	72.0	1.5

a A.E.= Actividad de la Emulsión (%)

b ES= Error Estándar

En la Figura 9 se puede observar que sólo el gluten tratado térmicamente hidrolizado con la enzima alcalina experimenta un aumento en cuanto a la A.E. Los cambios producidos en las proteínas por la exposición inicial a condiciones alcalinas de pH parece no tener efecto alguno en la Actividad de la Emulsión.

Para apreciar el efecto de la hidrólisis enzimática sobre las propiedades de solubilidad y emulsificación del

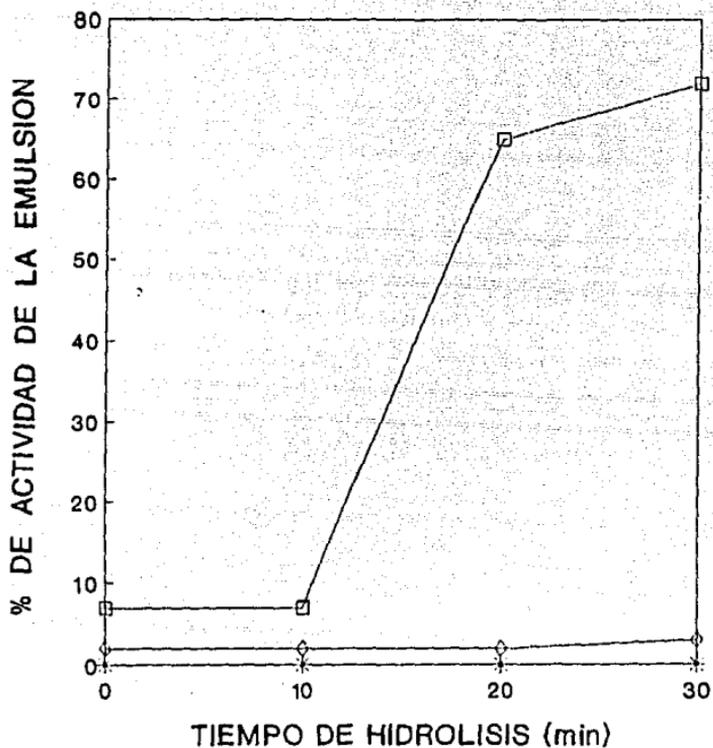


FIGURA 9 EFECTO DEL TIEMPO DE HIDROLISIS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA EMULSION (PRIMER EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA);  
Enzima neutra-gluten (+)  
Enzima neutra-gluten tratado (o)  
Enzima alcalina-gluten (\*)  
Enzima alcalina-gluten tratado (□)

gluten, se muestran en la Tabla 19 los valores de Nitrógeno Soluble, Capacidad de Emulsificación, Estabilidad de la Emulsión y Actividad de la Emulsión de los hidrolizados.

En la Tabla 19 se observa que el tratamiento con la enzima neutra produce en general cambios menores que el tratamiento con la enzima alcalina. La modificación enzimática con la proteasa alcalina produjo aumentos considerables en las propiedades de emulsificación de ambos sustratos llegando a ser el valor de C.E. de 25.3 ml de aceite/100 mg de proteína en el caso del gluten y de 30.0 en el caso del gluten tratado. Asimismo es más notorio el aumento en la E.E. en el caso de gluten tratado que es de 76% mientras que en el caso del gluten sin tratar el valor llega a ser tan sólo 50%. En cuanto a la A.E. únicamente se aprecia un aumento en el gluten tratado de una valor inicial de 7% a un valor final de 72%. Se observa que las propiedades funcionales de los sustratos mejoran conforme el tiempo de hidrólisis aumenta. Dado que los valores máximos se alcanzan con el tiempo mayor de hidrólisis (30 min), no es posible determinar si la modificación enzimática alcanzó su máxima eficiencia, por lo que se consideró necesario realizar una segunda hidrólisis enzimática bajo las mismas condiciones pero aumentando los tiempos de hidrólisis. De esta manera se espera conocer la cinética de la modificación enzimática.

**TABLA 19 RESUMEN DE PROPIEDADES FUNCIONALES (PRIMER EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA)**

**ENZIMA NEUTRA**

SUSTRATO	GLUTEN				GLUTEN TRATADO			
	N.S. <sup>a</sup>	C.E. <sup>b</sup>	E.E. <sup>c</sup>	A.E. <sup>d</sup>	N.S.	C.E.	E.E.	A.E.
TIEMPO DE HIDROL. (MIN)								
0	0.9	6.0	18.2	0.0	1.4	5.8	18.0	2.0
10	1.5	5.9	22.2	0.0	1.7	6.1	20.5	2.0
20	2.3	6.0	24.5	0.0	1.9	5.9	24.0	2.0
30	2.7	6.1	21.6	0.0	2.3	6.2	22.0	3.0

**ENZIMA ALCALINA**

SUSTRATO	GLUTEN				GLUTEN TRATADO			
	N.S. <sup>a</sup>	C.E. <sup>b</sup>	E.E. <sup>c</sup>	A.E. <sup>d</sup>	N.S.	C.E.	E.E.	A.E.
TIEMPO DE HIDROL. (MIN)								
0	6.4	11.7	33.5	0.0	5.3	8.6	29.0	7.0
10	12.5	16.1	45.0	0.0	11.5	17.9	50.5	7.0
20	13.5	19.9	44.5	0.0	14.9	24.2	62.0	65.0
30	17.3	25.3	50.0	0.0	16.1	29.9	76.0	72.0

a N.S.= Nitrogeno Soluble (%)

b C.E.= Capacidad de Emulsificación (ml aceite/100 mg proteína)

c E.E.= Estabilidad de la Emulsión (%)

d A.E.= Actividad de la Emulsión (%)

Debido a que no se observaron cambios en la funcionalidad de los sustratos tratados con la enzima neutra a pesar de haber utilizado concentraciones de actividad equivalentes para ambas enzimas, se pensó que podría existir un error en los valores de actividad determinados experimentalmente, por tanto antes de llevar a cabo la segunda modificación enzimática se procedió a determinar nuevamente la actividad de ambas proteasas.

#### 7.8 SEGUNDA DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS NEUTRA Y ALCALINA

La determinación de actividad proteolítica de las enzimas se realizó por el método de Northrop descrito en la Sección 6.2. Para realizar esta determinación se utilizaron reactivos recién preparados y se obtuvieron los siguientes resultados: 170.7 UN/g para la proteasa neutra y 186.7 UN/g para la alcalina.

Los valores obtenidos en esta determinación de actividad difieren de los encontrados inicialmente lo cual puede atribuirse al hecho de que en la primera determinación no se utilizaron reactivos recién preparados. Por tanto los resultados obtenidos en esta segunda determinación fueron confirmados repitiendo la determinación en diferentes

ocasiones. Por otro lado se intentó determinar la actividad de las enzimas sobre gluten y gluten tratado con el fin de poder establecer una equivalencia que nos permitiera alcanzar un grado de hidrólisis similar en estos sustratos, independientemente de la especificidad y la actividad de cada proteasa. Desafortunadamente, no fue posible basarse en los resultados obtenidos ya que la imposibilidad de formar dispersiones homogéneas hace que las determinaciones no sean reproducibles.

#### 7.9 SEGUNDO EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA

Una vez confirmada la actividad de las enzimas se procedió a repetir la modificación enzimática de los sustratos, usando como tiempos de hidrólisis 15, 30, 45 y 60 minutos. Dado que en el primer experimento de modificación enzimática las propiedades funcionales de los sustratos mejoraron notablemente con el tratamiento de la enzima alcalina, el segundo experimento de modificación enzimática se realizó sin alterar la concentración de dicha enzima, y usando ésta como referencia para reajustar la concentración de la enzima neutra conforme a los nuevos valores de actividad.

La concentración de cada enzima usada en esta hidrólisis fue de 1.586 UN/g proteína; la cantidad de la enzima

alcalina en ambas hidrólisis es equivalente en peso, pero los valores expresados en UN difieren por estar referidos a diferentes determinaciones de actividad.

El segundo experimento de modificación enzimática se llevó a cabo según el diseño experimental que se presenta en la Sección 6.4.

La hidrólisis se realizó en forma completamente aleatoria distribuyendo las 16 distintas combinaciones (TIEMPOxSUSTRATOxENZIMA) en dos bloques de ocho combinaciones cada uno.

Al igual que en el primer experimento de modificación enzimática, se midió el pH final de cada sistema de hidrólisis con lo cual se comprobó que aún con tiempos de acción enzimática mayores, el pH se mantiene dentro del intervalo deseado. En la Tabla 20 se presentan los valores promedio de pH de los hidrolizados obtenidos en el segundo experimento de modificación enzimática.

#### 7.10 PROPIEDADES FUNCIONALES (SEGUNDO EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA)

Estas determinaciones también se hicieron por duplicado y de manera aleatoria. En lo que respecta a los controles

**TABLA 20 VALORES PROMEDIO DE PH DE LOS HIDROLIZADOS DETERMINADOS AL FINAL DE LA HIDROLISIS (SEGUNDO EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA)**

SUSTRATO-ENZIMA	PH INICIAL	PH AJUSTADO	PH FINAL
GLUTEN-NEUTRA	7.26	7.4	7.32
G.TRATADO-NEUTRA	7.25	7.4	7.35
GLUTEN-ALCALINA	9.08	9.5	8.97
G.TRATADO-ALCALINA	8.92	9.5	8.85

de tiempo 0 min, se consideró innecesario realizarlos nuevamente ya que para los fines de referencia para los que son requeridos se pueden utilizar los valores obtenidos en el primer experimento de modificación enzimática.

En la Tabla 21 se muestran los valores de solubilidad expresados como porcentaje de Nitrógeno Soluble y en la Figura 10 se aprecia el efecto del tiempo de hidrólisis sobre esta propiedad.

En la Figura 10 se observa que la solubilidad después de 30 min de hidrólisis con la enzima alcalina permanece prácticamente constante. Es decir que después de 30 min de reacción, el aumento en la solubilidad de los sustratos bajo estas condiciones de hidrólisis es despreciable. Esto puede

**TABLA 21 NITROGENO SOLUBLE (SEGUNDO EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA)**

SUSTRATO	ENZIMA NEUTRA		ENZIMA ALCALINA	
	GLUTEN	G. TRATADO	GLUTEN	G. TRATADO
TIEMPO DE HIDROLISIS (MIN)	N.S. <sup>a</sup> ES <sup>b</sup>	N.S. ES	N.S. ES	N.S. ES
0 <sup>c</sup>	0.89	1.41	6.46	5.31
15	1.05	1.07	11.80	12.77
30	2.07	2.04	15.73	16.93
45	2.51	3.04	16.48	17.27
60	2.52	3.12	16.27	17.57

- a N.S. = Nitrógeno Soluble (%)  
 b ES = Error Estándar  
 c Valores tomados del experimento 1

deberse al hecho de que los péptidos que la enzima está liberando no son lo suficientemente pequeños para solubilizarse.

En el caso de la hidrólisis con la proteasa neutra, el aumento total en la solubilidad es tan sólo de 1.64%, por lo que puede decirse que la actividad de esta enzima sobre gluten es prácticamente nula para el propósito buscado.

En la Tabla 22 se presentan los resultados de Capacidad de Emulsificación de los hidrolizados obtenidos en el segundo experimento de modificación enzimática. El efecto

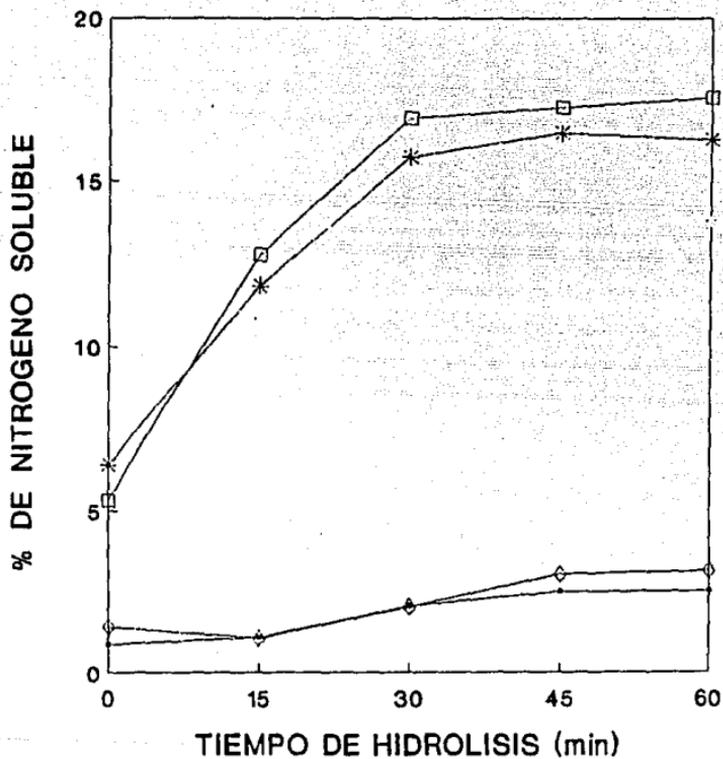


FIGURA 10 EFECTO DEL TIEMPO DE HIDROLISIS SOBRE LA SOLUBILIDAD (SEGUNDO EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA);  
 Enzima neutra-gluten (o)  
 Enzima neutra-gluten tratado (o)  
 Enzima alcalina-gluten (\*)  
 Enzima alcalina-gluten tratado (□)

del tiempo de hidrólisis en la C.E. se presenta en la Figura 11.

En la Figura 11 se observa que al menos en los tiempos estudiados, la hidrólisis con la enzima neutra no tiene efecto alguno en la C.E. del gluten.

**TABLA 22 CAPACIDAD DE EMULSIFICACION (SEGUNDO EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA)**

SUSTRATO	ENZIMA NEUTRA				ENZIMA ALCALINA			
	GLUTEN		G.TRATADO		GLUTEN		G.TRATADO	
	C.E. <sup>a</sup>	ES <sup>b</sup>	C.E.	ES	C.E.	ES	C.E.	ES
TIEMPO DE HIDROLISIS (MIN)								
0 <sup>c</sup>	6.0	0.09	5.8	0.08	11.7	1.77	8.7	0.14
10	6.3	0.06	6.4	0.18	16.6	0.27	26.6	1.57
30	6.0	0.05	6.0	0.03	23.8	0.10	31.2	1.23
45	6.3	0.04	6.4	0.13	21.9	0.28	29.9	0.39
60	7.6	0.69	6.3	0.14	18.4	0.61	24.7	0.81

a C.E.= Capacidad de Emulsificación (ml aceite/100 mg proteína)

b ES= Error Estándar

c Valores tomados del experimento 1

Por el contrario, el tratamiento con la enzima alcalina produce un aumento en la C.E. de los sustratos con un máximo a los 30 min de hidrólisis. A tiempos mayores de hidrólisis esta propiedad disminuye nuevamente. Aunque el incremento

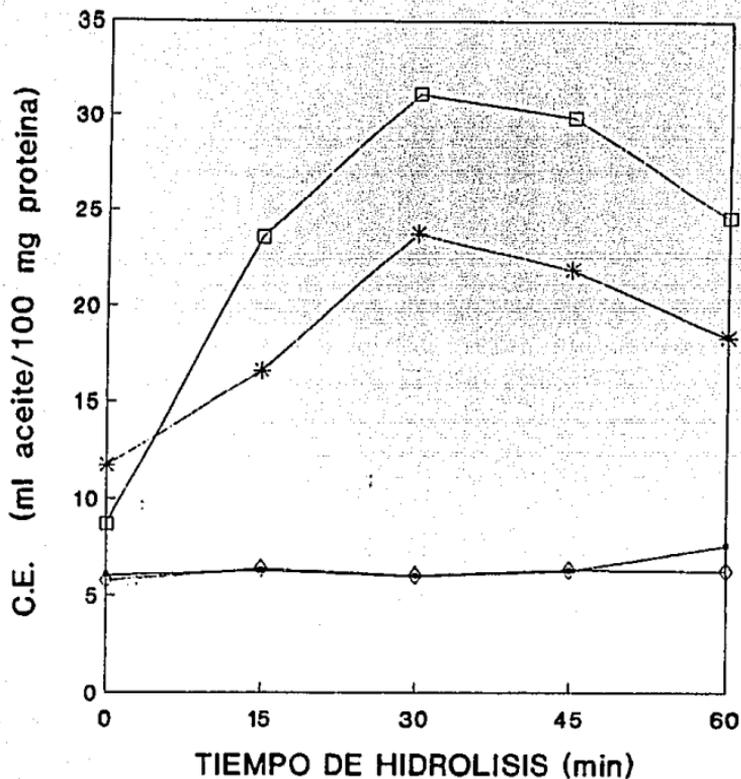


FIGURA 11 EFECTO DEL TIEMPO DE HIDROLISIS SOBRE LA CAPACIDAD DE EMULSIFICACION (SEGUNDO EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA);  
 Enzima neutra-gluten (\*)  
 Enzima neutra-gluten tratado (◊)  
 Enzima alcalina-gluten (●)  
 Enzima alcalina-gluten tratado (□)

en la C.E. es considerablemente mayor en el caso del gluten tratado térmicamente, la cinética de modificación de ambos sustratos sigue el mismo patrón de comportamiento.

Los resultados de Estabilidad de la Emulsión del segundo experimento de modificación enzimática se presentan en la Tabla 23 y en la Figura 12 se muestra el efecto del tiempo de hidrólisis sobre esta propiedad.

**TABLA 23 ESTABILIDAD DE LA EMULSION (SEGUNDO EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA)**

SUSTRATO	ENZIMA NEUTRA				ENZIMA ALCALINA			
	GLUTEN		G. TRATADO		GLUTEN		G. TRATADO	
	E.E. <sup>a</sup>	ES <sup>b</sup>	E.E.	ES	E.E.	ES	E.E.	ES
TIEMPO DE HIDROLISIS (MIN)								
0 <sup>c</sup>	18.2	3.2	5.8	1.9	33.5	1.7	29.0	1.9
15	29.0	1.5	23.0	1.0	47.5	0.5	57.3	0.0
30	29.0	0.5	25.5	0.5	57.5	0.5	92.0	0.0
45	28.0	1.0	26.0	0.8	57.5	0.5	92.0	0.0
60	27.0	0.5	25.5	0.5	57.0	0.0	92.0	0.0

a E.E.= Estabilidad de la Emulsión (%)

b ES= Error Estándar

c Valores tomados del experimento 1

En la Figura 12 se puede observar que el tratamiento con la enzima neutra produce un ligero aumento en la E.E. del gluten después de 15 minutos de hidrólisis, y a partir de

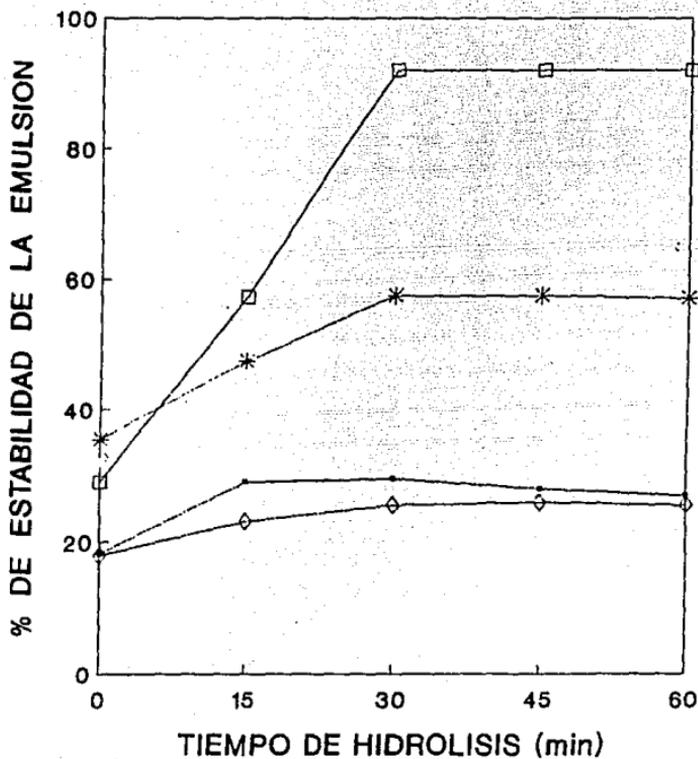


FIGURA 12 EFECTO DEL TIEMPO DE HIDROLISIS SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA EMULSION (SEGUNDO EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA);  
 Enzima neutra-gluten (\*)  
 Enzima neutra-gluten tratado (◊)  
 Enzima alcalina-gluten (●)  
 Enzima alcalina-gluten tratado (○)

entonces disminuye gradualmente hasta alcanzar prácticamente el valor inicial. Asimismo, el cambio en la E.E. del gluten tratado por efecto de la hidrólisis con la enzima neutra es despreciable.

En el caso de la modificación con la enzima alcalina el aumento en la E.E. de ambos sustratos es muy pronunciado durante los primeros 30 min de hidrólisis, tiempo en el que el valor llega a un máximo y a partir de entonces se mantiene constante. Sin embargo, a partir de los 15 min de hidrólisis el aumento en la E.E. se vuelve más pronunciado en el caso del gluten tratado. El valor final es 50% mayor para gluten tratado e hidrolizado con la enzima alcalina que para el no tratado.

En la Tabla 24 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de Actividad de la Emulsión de los hidrolizados obtenidos en el segundo experimento de modificación enzimática. El efecto que tiene el tiempo de hidrólisis sobre la A.E. se puede observar en la Figura 13.

En la Figura 13 se puede observar que durante los 60 min de hidrólisis con la enzima neutra, el aumento producido en la A.E. del gluten tratado y sin tratar es de sólo 10 %. Por el contrario, la A.E. del gluten tratado se incrementa marcadamente durante la hidrólisis con la enzima alcalina, alcanzando un máximo a los 45 minutos, después de los cuales

**TABLA 24 ACTIVIDAD DE LA EMULSION (SEGUNDO EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA)**

SUSTRATO	ENZIMA NEUTRA				ENZIMA ALCALINA			
	GLUTEN		G.TRATADO		GLUTEN		G.TRATADO	
TIEMPO DE HIDROLISIS (MIN)	A.E. <sup>a</sup>	ES <sup>b</sup>	A.E.	ES	A.E.	ES	A.E.	ES
0 <sup>c</sup>	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	7.0	0.3
15	2.0	0.0	6.0	0.0	3.0	0.0	32.0	0.0
30	5.0	0.0	7.0	0.0	5.0	0.0	82.0	0.0
45	7.0	0.0	6.0	0.0	58.0	0.0	91.0	0.0
60	9.0	0.0	8.0	0.0	10.0	0.0	24.0	0.0

a A.E.= Actividad de la Emulsión (%)

b ES= Error Estándar

c Valores tomados del experimento 1

ocurre un drástico descenso. Si se considera que la E.E. permanece en el valor máximo a este tiempo de hidrólisis dicho cambio repentino en la A.E. es aparentemente inesperado. Sin embargo, este hecho resalta la importancia de evaluar diferentes aspectos de las propiedades emulsificantes, pues el efecto que pueden tener pequeños cambios en la estructura y/o el peso molecular de las proteínas obedece a interacciones moleculares muy complejas y difícilmente predecibles. Un ejemplo de este comportamiento se observa en la hidrólisis del gluten con la

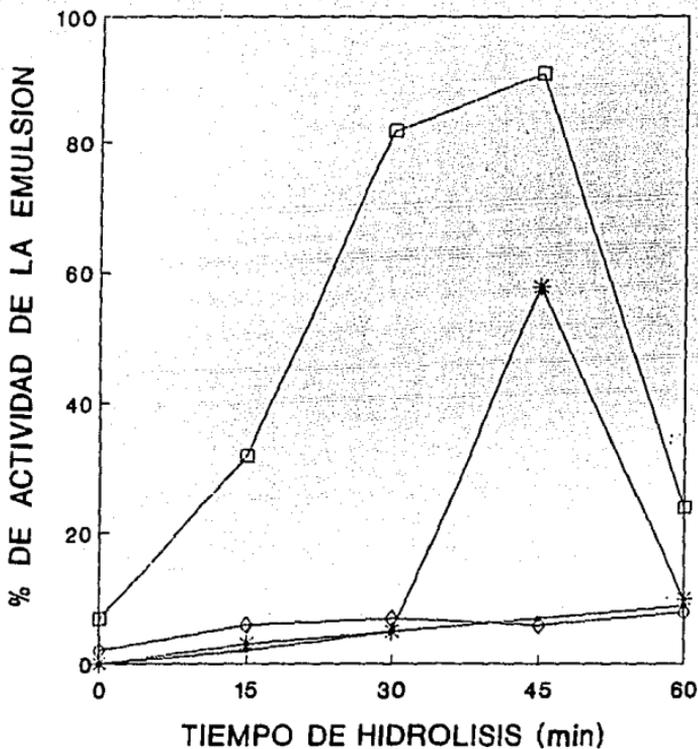


FIGURA 13 EFECTO DEL TIEMPO DE HIDROLISIS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA EMULSION (SEGUNDO EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA)  
 Enzima neutra-gluten (+)  
 Enzima neutra-gluten tratado (◊)  
 Enzima alcalina-gluten (\*)  
 Enzima alcalina-gluten tratado (○)

enzima alcalina en la que la A.E. sólo cambia a los 45 min de reacción, alcanzando un valor aproximado de 60%.

En la Tabla 25 se concentran los resultados de Solubilidad, Capacidad de Emulsificación, Estabilidad de la Emulsión y Actividad de la Emulsión.

En la Tabla 25 se puede apreciar que después de 30 min de hidrólisis las propiedades funcionales de los productos se mantienen prácticamente constantes o incluso llegan a disminuir.

En la Tabla 26 se presentan integrados los resultados de los dos experimentos de modificación enzimática con la proteasa alcalina para poder apreciar en forma global la cinética de la misma. Los resultados de las modificaciones con la enzima neutra no se integrarán de esta forma pues no se detectan cambios en las propiedades funcionales de los sustratos y se utilizaron diferentes concentraciones de enzima en cada una de ellas.

En las Figuras 14, 15, 16 y 17 se grafican los valores presentados en la Tabla 26 en función del tiempo. En estas

**TABLA 25 RESUMEN DE PROPIEDADES FUNCIONALES\* (SEGUNDO EXPERIMENTO DE MODIFICACION ENZIMATICA)**

**ENZIMA NEUTRA**

SUSTRATO	GLUTEN				GLUTEN TRATADO				
	TIEMPO HID (MIN)	N.S. <sup>a</sup>	C.E. <sup>b</sup>	E.E. <sup>c</sup>	A.E. <sup>d</sup>	N.S.	C.E.	E.E.	A.E.
0 <sup>e</sup>	0.9	6.0	18.2	0.0	1.4	5.8	18.0	2.0	
15	1.0	6.3	29.0	2.0	1.1	6.4	23.0	6.0	
30	2.1	6.0	29.5	5.0	3.0	6.3	26.0	6.0	
45	2.5	6.3	28.0	7.0	3.0	6.3	26.0	6.0	
60	2.5	7.6	27.0	8.0	3.1	6.3	25.5	8.0	

a N.S.= Nitrógeno Soluble (%)

b C.E.= Capacidad de Emulsificación (ml aceite/100 gr proteína)

c E.E.= Estabilidad de la Emulsión (%)

d A.E.= Actividad de la Emulsión (%)

e Valores tomados del experimento 1

**ENZIMA ALCALINA**

SUSTRATO	GLUTEN				GLUTEN TRATADO				
	TIEMPO HID (MIN)	N.S. <sup>a</sup>	C.E. <sup>b</sup>	E.E. <sup>c</sup>	A.E. <sup>d</sup>	N.S.	C.E.	E.E.	A.E.
0 <sup>e</sup>	6.5	11.7	33.5	0.0	5.3	8.6	29.0	7.0	
15	10.3	16.6	47.5	3.0	12.7	26.6	57.2	32.0	
30	15.3	23.8	57.5	5.0	16.9	31.4	92.0	82.0	
45	16.5	21.9	57.5	58.0	17.3	29.9	92.0	91.0	
60	16.3	18.4	57.5	10.0	17.6	24.7	92.0	24.0	

a N.S.= Nitrógeno Soluble (%)

b C.E.= Capacidad de Emulsificación (ml aceite/100 gr proteína)

c E.E.= Estabilidad de la Emulsión (%)

d A.E.= Actividad de la Emulsión (%)

e Valores tomados del experimento 1

**TABLA 26 PROPIEDADES FUNCIONALES (EXPERIMENTOS 1 Y 2 DE MODIFICACION ENZIMATICA CON LA PROTEASA ALCALINA)**

TIEMPO DE HIDROL. (MIN)	GLUTEN				GLUTEN TRATADO			
	N.S. <sup>a</sup>	C.E. <sup>b</sup>	E.E. <sup>c</sup>	A.E. <sup>d</sup>	N.S.	C.E.	E.E.	A.E.
0	6.40	11.7	33.5	0.0	5.31	8.7	29.0	7.0
10	12.53	16.1	45.0	0.0	0.49	17.9	50.5	7.0
15	11.80	16.6	47.5	3.0	12.77	26.6	57.3	32.0
20	13.55	19.9	45.5	0.0	14.94	24.2	62.0	65.0
30	16.52	24.7	53.8	2.0	16.50	30.6	84.0	76.0
45	16.48	21.9	57.5	58.0	17.27	29.9	92.0	91.0
60	16.27	18.4	57.0	10.0	17.57	24.7	92.0	24.0

a N.S.= Nitrógeno Soluble (%)

b C.E.= Capacidad de Emulsificación (ml aceite/100 mg proteína)

c E.E.= Estabilidad de la Emulsión (%)

d A.E.= Actividad de la Emulsión (%)

figuras se puede observar que el proceso de modificación enzimática es reproducible y se aprecia en forma global el curso del mismo.

En la Figura 14 se observa que el aumento en la solubilidad en los dos sustratos se produce durante los primeros 30 min de hidrólisis, alcanzando un máximo que permanece constante al aumentar el tiempo de reacción.

En la Figura 15 se observa que la modificación producida por la hidrólisis con la enzima alcalina aumenta la C.E. de ambos sustratos alcanzando un máximo a los 30 min de

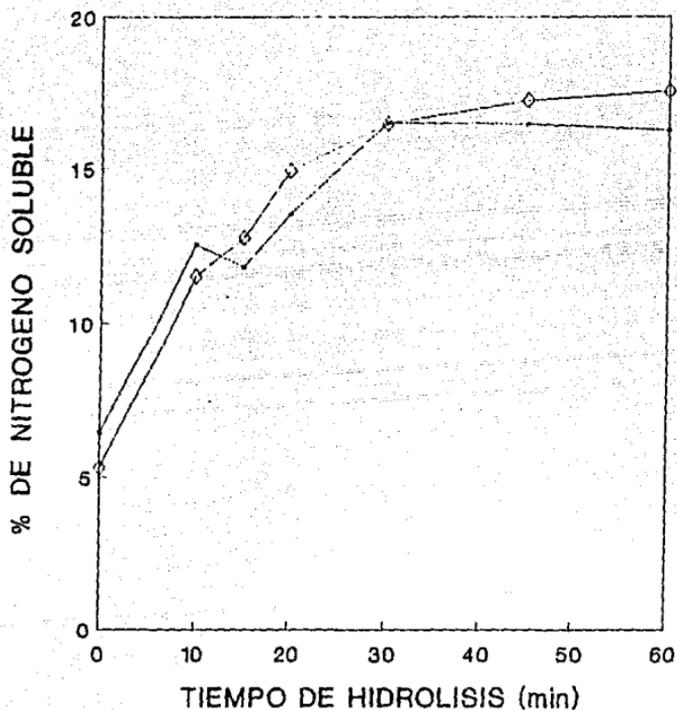


FIGURA 14 EFECTO DEL TIEMPO DE HIDROLISIS SOBRE LA SOLUBILIDAD (EXPERIMENTOS 1 Y 2 DE MODIFICACION ENZIMATICA CON LA PROTEASA ALCALINA); gluten (+), gluten tratado (o)

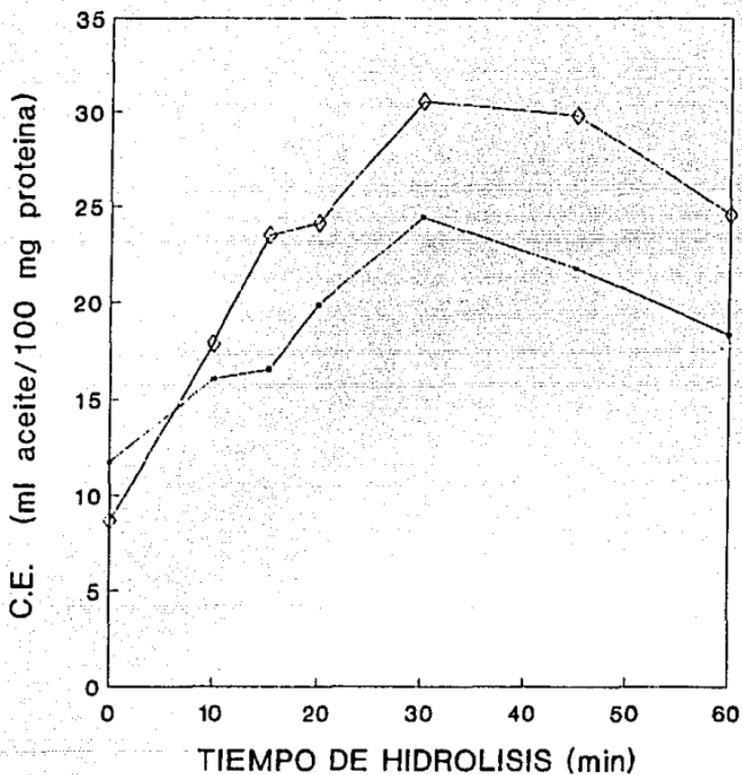


FIGURA 15 EFECTO DEL TIEMPO DE HIDROLISIS SOBRE LA CAPACIDAD DE EMULSIFICACION (EXPERIMENTOS 1 Y 2 DE MODIFICACION ENZIMATICA CON LA PROTEASA ALCALINA); gluten (●), gluten tratado (◊)

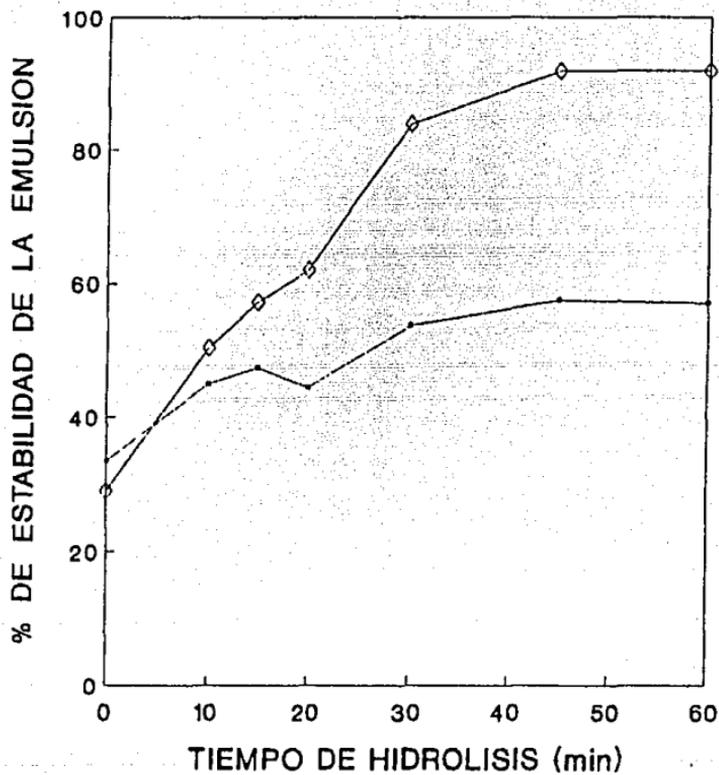


FIGURA 16 EFECTO DEL TIEMPO DE HIDROLISIS SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA EMULSION (EXPERIMENTOS 1 Y 2 DE MODIFICACION ENZIMATICA CON LA PROTEASA ALCALINA); gluten (\*), gluten tratado (o)

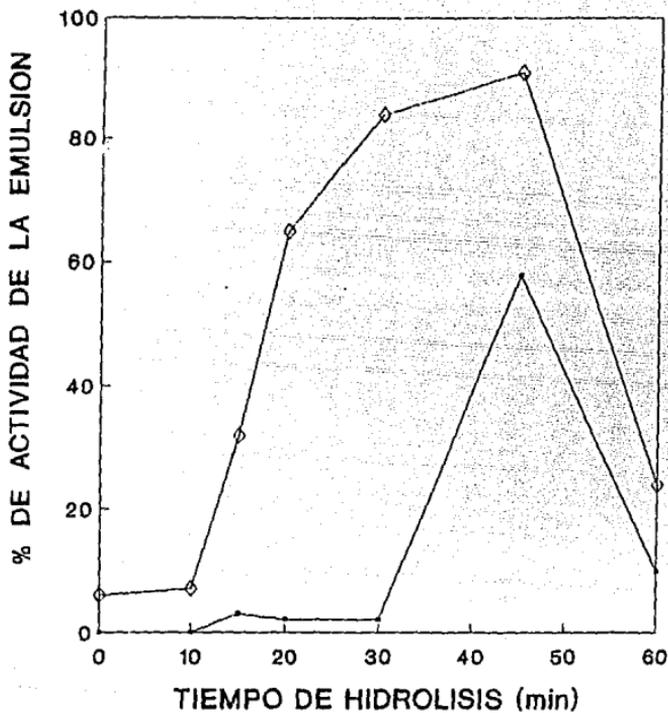


FIGURA 17 EFECTO DEL TIEMPO DE HIDROLISIS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA EMULSION (EXPERIMENTOS 1 Y 2 DE MODIFICACION ENZIMATICA CON LA PROTEASA ALCALINA); gluten (\*), gluten tratado (♦)

hidrólisis. Las diferencias en C.E. que se presentan entre los dos sustratos pueden deberse a los cambios estructurales que sufre el gluten durante el tratamiento térmico, posiblemente por ruptura de enlaces disulfuro, activación del almidón, o el efecto sinérgico que ocurre entre estos cambios y las proteínas modificadas durante la hidrólisis enzimática. Asimismo, se puede considerar la posibilidad de que durante el tratamiento térmico se produzcan cambios conformacionales tales que se modifique la exposición de los enlaces susceptibles a la hidrólisis con la enzima alcalina.

El valor de C.E. que el gluten alcanza a los 30 min de hidrólisis con la enzima alcalina se encuentra entre los valores de los aislados de soya utilizados como referencia, mientras que el producto obtenido a partir de gluten tratado supera la C.E. de dichos productos. Este estudio comparativo se presenta en la Tabla 27.

Aunque como ya se dijo muchos autores reportan que la C.E. de la proteína tiene una relación directa con su solubilidad, en el caso de la presente modificación dicha relación se manifiesta sólo hasta cierto punto, ya que aún cuando la solubilidad de los hidrolizados permanece constante después de los 30' de reacción se produjo una disminución considerable de la C.E. Por otro lado, no fue necesario alcanzar una elevada solubilización del gluten para obtener un aumento considerable en su C.E. Es posible

**TABLA 27 CAPACIDAD DE EMULSIFICACION DE DOS PRODUCTOS COMERCIALES Y DE LOS SUSTRATOS DE GLUTEN ANTES Y DESPUES DE LA MODIFICACION ENZIMATICA**

PRODUCTO	C.E. <sup>a</sup> ORIGINAL	C.E. FINAL <sup>b</sup>
PURINA 590	24.17	
PURINA 500E	28.90	
GLUTEN	4.90	23.76
GLUTEN TRATADO	5.66	31.45

a C.E. = Capacidad de Emulsificación  
(ml aceite/100 mg proteína)

b Después de 30 min de hidrólisis con la enzima alcalina.

que después de 30 min de hidrólisis la enzima continúe escindiendo enlaces peptídicos, modificando de tal forma la estructura de las proteínas, que la C.E. disminuye sin que por la ruptura de enlaces se estén liberando péptidos pequeños que se solubilicen y aumenten el valor de N.S.

En la Figura 16 se muestra que la E.E. de los dos sustratos aumenta conforme el tiempo de hidrólisis se incrementa y alcanza su valor más alto a los 30 min. El patrón de comportamiento de la E.E. es similar en ambos sustratos, pero los valores de alcanzados por el gluten tratado son 1.6 veces mayores.

En la Figura 17 se puede apreciar que la A.E. del gluten tratado, modificado con la enzima alcalina, aumenta de 0.07

a 0.91 entre los 10 y 45 min de hidrólisis y cae después de los 45 min. En el caso del gluten sin tratar, la A.E. aumenta a los 45 min de reacción y a los 60 min cae nuevamente a un valor cercano al inicial.

#### 7.11 INFLUENCIA DEL ALMIDÓN PRESENTE EN EL GLUTEN EN LAS PROPIEDADES DE EMULSIFICACION

El producto utilizado como sustrato es gluten comercial que contiene aproximadamente 30 % de almidón, y la presencia de éste puede afectar las propiedades funcionales de los hidrolizados. Debido a que el gluten nativo utilizado como sustrato no tiene buenas propiedades funcionales, se podría asumir que el almidón no aporta por sí mismo funcionalidad al sistema; esto, sin embargo, no excluye la posibilidad de que interaccione con las proteínas hidrolizadas produciendo un efecto sinérgico en cuanto a las propiedades de emulsificación se refiere. Es importante estudiar esta posible interacción pues como ya se dijo, el gluten disponible comercialmente constantemente presenta variaciones en su contenido de proteína, y por lo tanto en su proporción proteína-almidón.

En el caso de que el almidón contribuyera a las propiedades de emulsificación del producto hidrolizado, una variación en la proporción proteína-almidón podría modificar

el resultado y se haría necesario disponer de un sustrato de composición constante. Con este fin, se intentó eliminar el almidón del hidrolizado que presentó mejores propiedades de emulsificación: gluten tratado/enzima alcalina/30 min de hidrólisis (GT-ALC-30) mediante una hidrólisis con una amilasa y se probaron nuevamente sus propiedades de emulsificación.

Se empleó como enzima amilolítica una alfa-amilasa en la que se detectaron proteasas contaminantes al medir actividad proteolítica por el método de Northrop. Esto hizo necesario eliminar las proteasas, lo cual se intentó hacer con un tratamiento térmico a 70°C durante 20 minutos (condiciones en las que la enzima amilolítica es estable). Aún después de dicho tratamiento se detectó presencia de actividad proteolítica, por lo que se realizó un segundo tratamiento térmico de la enzima, esta vez a 90°C durante 1 hora. Con este tratamiento se logró eliminar por completo la actividad proteolítica contaminante de la amilasa, lo cual permite asegurar que, después de un tratamiento con esta enzima, cualquier cambio en las propiedades emulsificantes del hidrolizado se debe exclusivamente a la disminución en el contenido de almidón.

La hidrólisis del almidón del producto seleccionado (GT-ALC-30) se efectuó en un medio amortiguador de fosfatos 0.2 M pH=7.0 a 70°C durante 1 hora con una concentración de

amilasa del 1% V/V. El producto se liofilizó para su posterior evaluación. Los resultados se muestran en la Tabla 28.

**TABLA 28 PROPIEDADES EMULSIFICANTES DEL HIDROLIZADO GT-ALC-30 ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO CON UNA AMILASA**

	SUSTRATO	C.E. <sup>a</sup>	E.E. <sup>b</sup>	A.E. <sup>c</sup>
ANTES DE HID	GT-ALC-30	30.0	76.0	0.71
DESPUES DE HID	GT-ALC-30	18.0	50.0	0.09

a C.E.= Capacidad de emulsificación (ml aceite/100 mg proteína)

b E.E.= Estabilidad de la Emulsión (%)

c A.E.= Actividad de la Emulsión (%)

En la Tabla 28 se observa que después del tratamiento con la enzima amilolítica, las propiedades emulsificantes disminuyen pero no alcanzan los valores iniciales del sustrato original, por lo que es posible que exista una relación sinérgica entre las proteínas hidrolizadas y el almidón presente en el gluten, donde las proteínas hidrolizadas por sí solas presentan buenas propiedades de emulsificación, pero junto con el almidón éstas mejoran notablemente.

Sin embargo no es posible asegurar lo anterior, ya que la exposición a temperaturas elevadas puede ocasionar cambios en las proteínas que modifiquen su funcionalidad, por lo que la disminución detectada en las propiedades de emulsificación pudo haber sido ocasionada, al menos en parte, por la exposición del sustrato a la temperatura de 70°C, a la cual se realizó la hidrólisis con la amilasa. Para poder establecer que los cambios en el hidrolizado de gluten se deben exclusivamente a la hidrólisis del almidón, sería entonces necesario manejar paralelamente un blanco sin amilasa.

Aunque es necesario estudiar más a fondo y en forma sistemática la influencia del almidón en las propiedades funcionales de los hidrolizados de gluten de trigo, se realizaron pruebas sencillas restituyendo al hidrolizado GT-ALC-30 el almidón eliminado por el tratamiento con la amilasa, en una proporción almidón/proteína aproximadamente igual a la del sustrato original. Por otro lado, se adicionó la misma cantidad de almidón soluble (Merck 1252) al hidrolizado GT-ALC-30 obtenido en planta piloto pero sin tratamiento con amilasa, con el fin de determinar si una mayor proporción de almidón produce un efecto en las propiedades de emulsificación. Los resultados se presentan en la Tabla 29 concluyéndose que la adición de almidón en la proporción empleada prácticamente no afecta las propiedades emulsificantes de los hidrolizados de gluten. Las

diferencias que se observan en los valores determinados son despreciables y se deben a variaciones inherentes a los métodos de determinación.

#### 7.12 ESCALAMIENTO A NIVEL PLANTA PILOTO

Independientemente de la influencia que pueda tener el almidón en las propiedades funcionales de los hidrolizados, se escaló el proceso a nivel planta piloto con el fin de disponer de mayores cantidades de los productos, suficientes

**TABLA 29 PROPIEDADES EMULSIFICANTES DE LOS HIDROLIZADOS GT-ALC-30 ADICIONADOS CON ALMIDON**

SUSTRATO	C.E. <sup>a</sup>	ES <sup>b</sup>	E.E. <sup>c</sup>	ES	A.E. <sup>d</sup>	ES
GT-ALC-30 TRATADO CON AMILASA	18.0	0.5	50.0	0.0	0.09	0.0
GT-ALC-30 TRATADO CON AMILASA + ALMIDON	19.2	0.7	48.0	0.0	0.05	0.0
GT-ALC-30 <sup>e</sup>	21.1	0.8	72.0	0.0	0.78	0.0
GT-ALC-30 + ALMIDON	20.7	0.9	69.0	0.5	0.64	0.0

a C.E.= Capacidad de Emulsificación (ml aceite/100 mg proteína)

b ES = Error Estándar

c E.E.= Estabilidad de la Emulsión (%)

d A.E.= Actividad de la Emulsión (%)

e Hidrolizado de la primera prueba en planta piloto

para someterlos a una posterior evaluación de la funcionalidad a nivel industrial.

El proceso de modificación enzimática se llevó a cabo con tres diferentes sustratos: gluten Rafmex III, gluten Rafmex II tratado, y gluten Rafmex III tratado y la misma concentración de enzima alcalina empleada en las pruebas a nivel laboratorio. Para evitar la necesidad de reajustar con NaOH el pH del sistema después de la incorporación del sustrato, se utilizó un amortiguador de carbonatos 0.2 M con un pH inicial de 10.0 para tener un pH final de alrededor de 9.5.

#### PRUEBAS EN PLANTA PILOTO

##### PRIMERA PRUEBA

En esta prueba se usó como sustrato 1 kg de gluten Rafmex III tratado térmicamente, en 5 litros de amortiguador, empleando una jarra de fermentación de 14 litros de capacidad. La hidrólisis se realizó en un módulo de agitación Fermentation Design Inc. Allentown, P.A. a temperatura controlada aproximadamente entre 54.8 y 56.0°C, con agitación de 260 rpm, durante 30 minutos. Al término de este tiempo se inactivó la enzima calentando a 87°C por

introducción directa al sistema de una corriente de vapor a presión. El pH inicial fué de 9.6 y al final de la hidrólisis de 8.84.

#### SEGUNDA PRUEBA

Esta prueba se realizó con 2 kg de gluten tratado Rafmex II en 9 litros de amortiguador, bajo las mismas condiciones que la primera prueba y aumentando la velocidad de agitación a 680 RPM por tratarse de un volumen mayor. El pH inicial del sustrato fué de 9.55 y el final de 8.70.

#### TERCERA PRUEBA

Esta prueba se efectuó bajo las mismas condiciones que la segunda pero utilizando como sustrato gluten Rafmex II. El pH inicial del sustrato fué de 9.63 y el final de 9.02.

#### SECADO DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS EN PLANTA PILOTO

Se secaron los productos por aspersión en vez de liofilizarlos. El secado se realizó en un secador NIRO Atomizer Copenhagen, Denmark., utilizando como temperatura de entrada 179°C y de salida 90°C. Para esto fue necesario tamizar previamente los productos por mallas 30 y 40. Los sólidos retenidos se secaron por separado en una estufa a

60°C y se determinó el peso de los mismos. En la Tabla 30 se muestra el porcentaje de sólidos retenidos en cada prueba.

**TABLA 30 SÓLIDOS RETENIDOS EN EL TAMIZADO (PLANTA PILOTO)**

CORRIDA	MALLA 30 (%)	MALLA 40 (%)	TOTAL (%)
G. TRATADO RAFMEX III	0.0	1.8	1.8
G. TRATADO RAFMEX II	0.0	0.6	0.6
GLUTEN RAFMEX II	3.2	0.2	3.4

\* % referido a la cantidad de producto final

En la Tabla 30 se observa que el porcentaje de sólidos retenidos al tamizar el hidrolizado sin tratamiento térmico es 1.9 y 5.6 veces menor que el de los tratados térmicamente (gluten Rafmex III y gluten Rafmex II respectivamente). Esto se debe a que el gluten sin tratar conserva aún sus propiedades viscoelásticas formando aglomerados al humedecerse, los cuales no están expuestos a la acción hidrolítica de las proteasas.

La diferencia que se observa entre el porcentaje de sólidos retenidos en los hidrolizados de gluten tratado térmicamente pueden deberse a que se trata de lotes de

gluten Rafmex diferentes, que presentan diferente contenido de partículas retenidas en la malla 40.

Con el propósito de determinar si el método de secado tiene alguna influencia sobre las propiedades funcionales del producto, se tomaron muestras de los hidrolizados y se secaron por liofilización.

El rendimiento del secado se determinó tomando alicuotas de 10 ml de cada hidrolizado y secándolas en una estufa a 60°C. Los resultados se presentan en la Tabla 31.

**TABLA 31 RENDIMIENTO DEL PROCESO DE MODIFICACION Y DEL SECADO POR ASPERSION EN PLANTA PILOTO**

PRUEBA	RENDIMIENTO DEL SECADO (%)	RENDIMIENTO DEL PROCESO (%)
G. TRATADO RAFMEX III	71.1	66.6
G. TRATADO RAFMEX II	97.2	92.5
GLUTEN RAFMEX II	86.0	83.7

En la Tabla 31 se observa que a pesar de haber manejado volúmenes pequeños en planta piloto, el rendimiento del proceso es bueno. En el secado el rendimiento es alto porque el producto es un polvo muy fino que no se adhiere a las paredes del secador y esto facilita su recolección.

Las principales pérdidas de producto se deben a que el gluten húmedo se adhiere fácilmente a cualquier superficie. También es importante considerar los sólidos retenidos en el tamizado previo al secado.

#### 7.13 PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS EN PLANTA PILOTO

Las determinaciones se realizaron por duplicado y en forma aleatoria los resultados se presentan en la Tabla 32.

Con el fin de comparar las propiedades de los productos obtenidos en planta piloto con las de los obtenidos previamente en el laboratorio bajo condiciones análogas, se presenta en la Tabla 33 un resumen de las propiedades funcionales de estos últimos.

Comparando el N.S. de los productos de planta piloto (Tabla 32) los obtenidos en el laboratorio (Tabla 33), se puede observar que a pesar de haber empleado condiciones análogas de tiempo, temperatura, pH y concentración de enzima, la solubilización del gluten alcanzada en planta piloto fue aproximadamente 30% menor a la obtenida en el laboratorio. Esto puede deberse a que no se alcanzó el

**TABLA 32 PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS EN PLANTA PILOTO**

P <sup>a</sup>	M.S. <sup>b</sup>	N.S. <sup>c</sup>	ES <sup>d</sup>	C.E. <sup>e</sup>	ES	E.E. <sup>f</sup>	ES	A.E. <sup>g</sup>	ES
1 <sup>h</sup>	L	11.82	0.6	21.1	2.7	72.0	0.5	78.0	0.5
	A	13.99	0.1	19.8	0.0	100.0	0.0	64.0	1.4
2 <sup>i</sup>	L	11.19	2.0	19.6	0.1	100.0	0.0	0.0	0.0
	A	11.35	0.4	16.3	0.2	52.0	2.0	6.0	0.0
3 <sup>j</sup>	L	10.15	5.0	15.3	1.1	48.0	0.5	7.0	0.7
	A	11.42	3.0	15.7	0.2	42.0	1.0	7.0	1.4

a P= Prueba

b M.S.= Método de Secado (L= Liofilización, A= Aspersión)

c N.S.= Nitrógeno Soluble (%)

d ES= Error Estándar

e C.E.= Capacidad de Emulsificación (ml aceite/100 mg proteína)

f A.E.= Actividad de la Emulsión (%)

g E.E.= Estabilidad de la Emulsión (%)

h Sustrato = Gluten Tratado Rafmex III

i Sustrato = Gluten Tratado Rafmex II

j Sustrato = Gluten Rafmex II

**TABLA 33 PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS MEJORES PRODUCTOS OBTENIDOS EN EL LABORATORIO**

PRODUCTO	N.S. <sup>a</sup>	C.E. <sup>b</sup>	E.E. <sup>c</sup>	A.E. <sup>d</sup>
G-ALC-30	0.1652	24.5	53.8	0.02
GT-ALC-30	0.1650	30.6	84.0	0.84

a N.S.= Nitrógeno Soluble (%)

b C.E.= Capacidad de Emulsificación (ml aceite/100 mg proteína)

c E.E.= Estabilidad de la Emulsión (%)

d A.E.= Actividad de la Emulsión (%)

mismo grado de hidrólisis en todos los procesos, lo cual repercute a su vez en las propiedades emulsificantes de los productos.

El hecho de que los productos de planta piloto presenten menor solubilidad que los de laboratorio puede deberse a la forma en que se inactivó la enzima, pues al usar una corriente de vapor se alcanza más rápidamente la temperatura de inactivación que utilizando un baño de agua en ebullición; en este último caso, la enzima continúa hidrolizando el gluten mientras se alcanza la temperatura de inactivación, por lo que el tiempo real de hidrólisis en el laboratorio es mayor de 30 minutos. También puede ser que el vapor dañe a la proteína y por lo tanto disminuyan sus características funcionales.

Por otro lado, el método de secado parece influir únicamente en la Estabilidad de la Emulsión de los hidrolizados de gluten tratado (primera y segunda pruebas). Sin embargo el efecto del tipo de secado no es el mismo, pues mientras que en la prueba 1 el producto secado por aspersión presenta mayor E.E. que el liofilizado, en la segunda prueba ocurre lo contrario.

El hidrolizado de gluten Rafmex III tratado fue el que presentó mejores propiedades de emulsificación, lo cual puede significar que las condiciones óptimas de modificación

pueden variar de un lote de gluten a otro, ya sea porque las proteínas del gluten sean diferentes dependiendo de la variedad de trigo del que provienen o porque la relación proteína/almidón en el sustrato efectivamente influye en las propiedades funcionales del producto. Esto requeriría establecer en forma muy precisa las condiciones de la hidrólisis enzimática, incluyendo un control o ajuste al cambiar de lote de gluten.

También es necesario considerar que las diferencias entre los productos de planta piloto y los obtenidos en el laboratorio pudieron originarse debido a que las condiciones del proceso no han sido optimizadas, por lo que el escalamiento no se realizó en forma rigurosa. Esto, como ya se dijo, involucró cambios en las condiciones del proceso y sería necesario determinarlos.

En las Figuras 18, 19, 20 y 21 se presentan los resultados obtenidos en forma global, representados en gráficas de barras para poder realizar fácilmente observaciones comparativas.

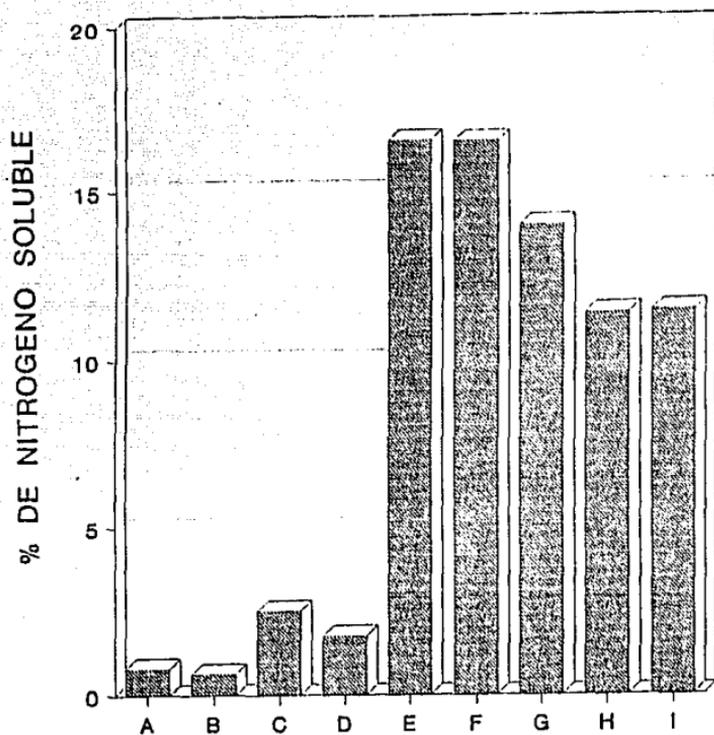


FIGURA 16 RESULTADOS GLOBALES DE SOLUBILIDAD

A	Gluten	B	Gluten tratado
C	Purina 600E	D	Purina 690
E	Enzima alcalina-gluten-30' hidrólisis		
F	Enzima alcalina-gluten tratado-30' hidrólisis		
G	Planta piloto 1	H	Planta piloto 2
I	Planta piloto 3		

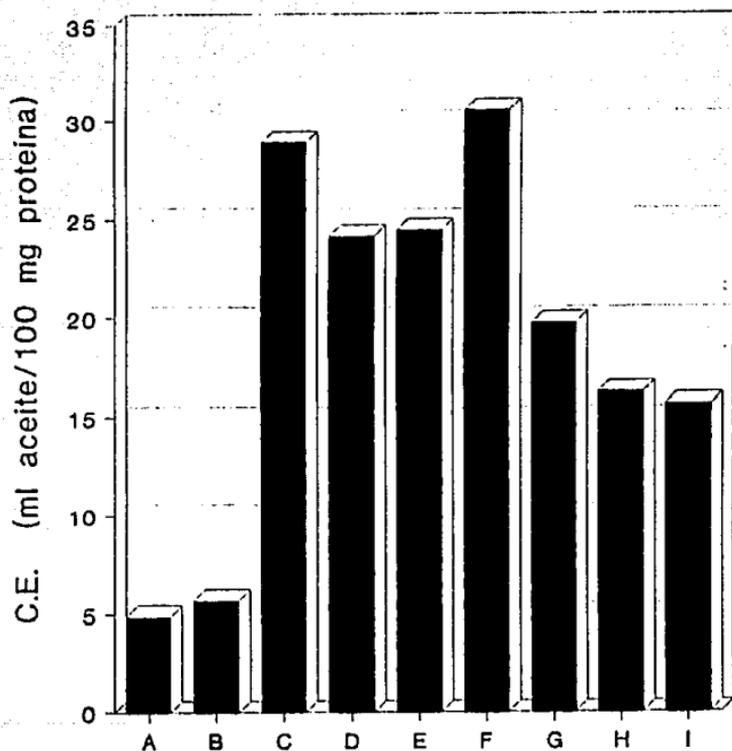


FIGURA 19 RESULTADOS GLOBALES DE CAPACIDAD DE EMULSIFICACION

A	Gluten	B	Gluten tratado
C	Purina 500E	D	Purina 590
E	Enzima alcalina-gluten-30' hidrólisis		
F	Enzima alcalina-gluten tratado-30' hidrólisis		
G	Planta piloto 1	H	Planta piloto 2
I	Planta piloto 3		

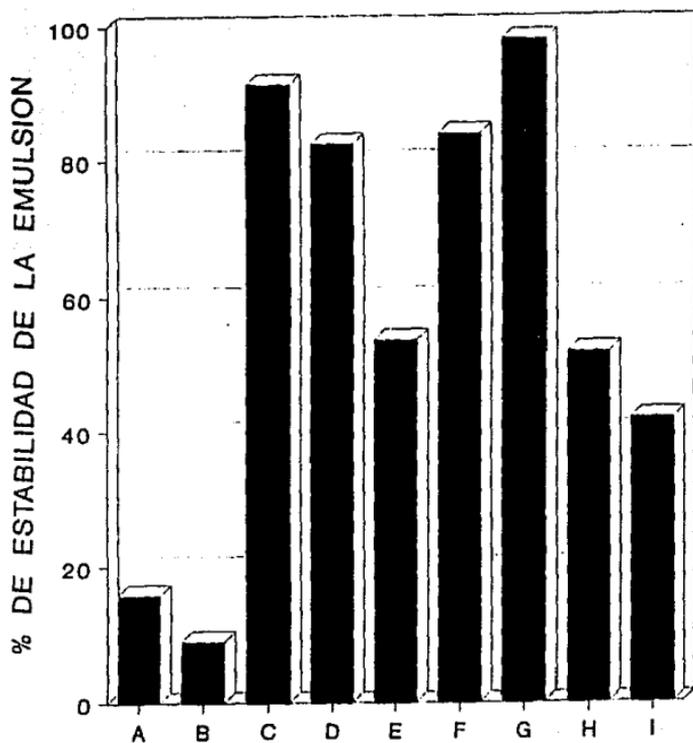


FIGURA 20 RESULTADOS GLOBALES DE ESTABILIDAD DE LA EMULSION

A	Gluten	B	Gluten tratado
C	Purina 500E	D	Purina 590
E	Enzima alcalina-gluten-30' hidrólisis		
F	Enzima alcalina-gluten tratado-30' hidrólisis		
G	Planta piloto 1	H	Planta piloto 2
I	Planta piloto 3		

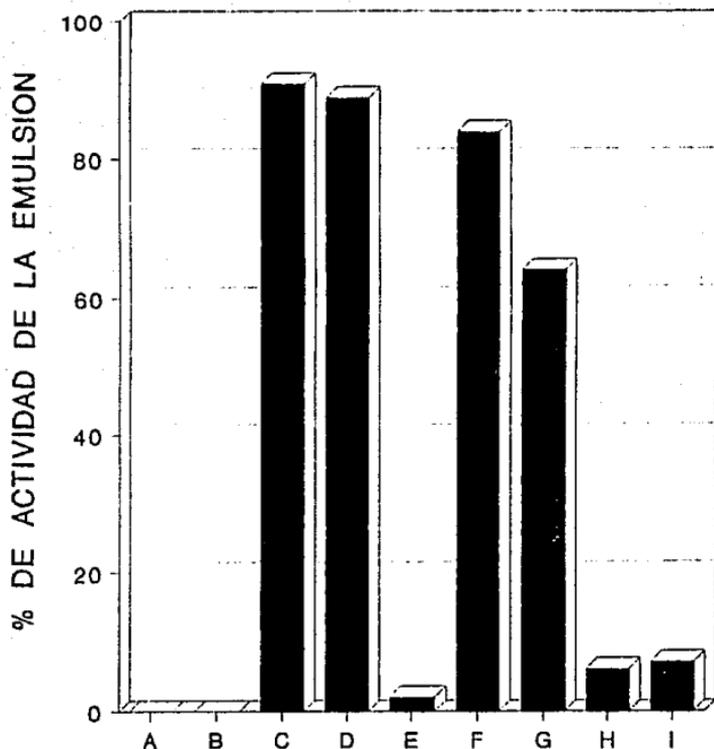


FIGURA 21 RESULTADOS GLOBALES DE ACTIVIDAD DE LA EMULSION

A	Gluten	B	Gluten tratado
C	Purina 500E	D	Purina 590
E	Enzima alcalina-gluten-30' hidrólisis		
F	Enzima alcalina-gluten tratado-30' hidrólisis		
G	Planta piloto 1	H	Planta piloto 2
I	Planta piloto 3		

## 8 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las propiedades funcionales que se evaluaron son: solubilidad y emulsificación. Dentro de la última están comprendidas la capacidad de emulsificación, la estabilidad y actividad de la emulsión.

Aunque los métodos de determinación de propiedades funcionales seleccionados permiten establecer en forma comparativa las diferencias existentes entre los sustratos y los productos evaluados, es necesario tomar en cuenta que los resultados que se obtienen distan mucho de representar el comportamiento funcional que tendrán las proteínas en sistemas alimenticios complejos, en los que existirán interacciones con otros componentes y estarán sometidas a condiciones químicas y físicas diferentes.

Con base en el estudio realizado se seleccionaron las proteasas bacterianas que presentaron menor costo por unidad de actividad: proteasa neutra I y proteasa alcalina I. En cuanto al sustrato, se trabajó con gluten de trigo ya que es una proteína homogénea, barata y posee propiedades funcionales ya conocidas.

Con respecto a los objetivos generales, los resultados muestran que la hidrólisis enzimática con la proteasa

alcalina, en las condiciones de concentración y tiempo empleadas, mejora la solubilidad y las propiedades de emulsificación del gluten de trigo. Por otro lado, la hidrólisis con la enzima neutra no produce ningún cambio favorable en las propiedades funcionales de dicha proteína.

La hidrólisis del gluten con la enzima alcalina produce por sí sola cambios en la estructura de la proteína que le confieren propiedades emulsificantes comparables con las de aditivos comerciales preparados a partir de proteína aislada de soya. La combinación de esta hidrólisis con el tratamiento térmico efectuado previamente al sustrato da como resultado un producto con propiedades de emulsificación aún mejores que las de dichos aditivos. Con la obtención de estos productos se cumple la hipótesis propuesta. Se observa también que la simple exposición de la proteína a condiciones de pH alcalino produce cambios en su funcionalidad.

Se encontró que, a diferencia de lo que propone Adler-Nissen (1983), no es necesario alcanzar una alta solubilización de la proteína para que ésta presente alta Capacidad de Emulsificación. Más bien se observó que, tal como establece Adamson (1976), basta que la proteína se disperse en agua para que participe efectivamente en la formación de una emulsión aceite en agua.

El tiempo de hidrólisis como parámetro de control de la modificación enzimática fue adecuado para los experimentos realizados a escala laboratorio; sin embargo, al escalar el proceso a nivel de planta piloto no fue posible controlar el tiempo de la reacción en forma exacta. Sería necesario controlar el proceso de modificación por medición del grado de hidrólisis (DH), definido como el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos. La ventaja de utilizar este parámetro de control es que las propiedades del hidrolizado están dadas por el valor de DH, hasta cierto punto en forma independiente de otros parámetros tales como relación enzima-sustrato, cantidad de proteína en el sustrato, temperatura, tiempo de hidrólisis, pH y agitación. La utilización del DH como medida de control de la hidrólisis permitiría optimizar las condiciones del proceso en forma menos restringida pues las condiciones antes mencionadas no tendrían que establecerse en forma estricta.

El presente trabajo constituye la etapa inicial de un proyecto global que pretende encontrar proteínas funcionales alternativas mediante la modificación enzimática de proteínas vegetales. Los resultados obtenidos cumplen con los objetivos propuestos y sientan las bases que nos permiten definir cuáles son los aspectos más relevantes que se deben considerar para continuar la investigación.

Sería recomendable estudiar el efecto del método de inactivación de la enzima, pues al tratarse de un tratamiento térmico, se modifica la estructura de las proteínas y por lo tanto las propiedades funcionales de las mismas.

A pesar de que se realizaron algunos experimentos preliminares para determinar la influencia del almidón en las propiedades emulsificantes de los hidrolizados, es necesario llevar a cabo un estudio sistemático que permita establecer el papel que juega el almidón en dichas propiedades. Esto es especialmente importante debido a la variabilidad en el contenido de almidón que presentan los diferentes lotes y marcas comerciales de gluten.

Sería interesante caracterizar las fracciones proteicas presentes en los hidrolizados al momento de alcanzarse el máximo en la Capacidad de Emulsificación por efecto de la hidrólisis enzimática, así como determinar cuáles de ellas son las que confieren las características de Capacidad de Emulsificación, Estabilidad y/o Actividad de la Emulsión. Esto permitiría también establecer si las diferencias en las proteínas del gluten dadas por la variedad y cosecha del trigo, y el tipo y contenido de glutenina y gliadina, afectan las propiedades funcionales del producto hidrolizado final.

Por otro lado, se recomienda evaluar las propiedades funcionales del gluten modificado a diferentes valores de pH ya que los alimentos no siempre tienen pH neutro y las propiedades de un mismo producto pueden variar considerablemente en función del pH. Por razones económicas, en este estudio sólo se valoraron las propiedades funcionales a pH neutro.

Se recomienda también investigar si los hidrolizados presentan otras propiedades funcionales de interés para la industria de los alimentos tales como la termocoagulación y en particular la capacidad de formación de espuma, la solubilidad isoeléctrica y la viscosidad, que de acuerdo con Adler-Nissen (1983), se ven profundamente afectadas por los cambios en la Capacidad de Emulsificación. Una vez caracterizada en el laboratorio la funcionalidad de los hidrolizados, es necesario evaluar su comportamiento al ser incorporados como aditivos en los sistemas alimenticios de interés.

**BIBLIOGRAFIA**

**A.C.S.** (American Chemical Society) (1979). Functionality and protein structure. Pour-El editores.

**ADLER-NISSEN, J., ERIKSEN, B., and OLSEN, H. S.** (1983). Improvement of the functionality of vegetable proteins by controlled enzymatic hydrolysis. Qual. Plant Plant Foods Nutr. 32:411.

**ADLER-NISSEN, J.** (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers. U.S.A.

**ANUSUYA, D. M. and VENKATARAMAN, L. V.** (1984). Functional properties of protein products of mass cultivated blue-green Algae Spirulina platensis. J. Food Sci. 49:24

**AOAC** (Association of Official Agricultural Chemistry). (1975). Official Methods of Analysis. 11<sup>th</sup> ed. Ed. AOAC. U.S.A.

**AOKI, H., TANEYAMA, O., INAMI, M.** (1980). Emulsifying properties of soy protein: characteristics of 7s and 11s proteins. J. Food Sci. 45:534.

AOKI, H., TANEYAMA, O., ORIMO, M., KITAGAWA, I. (1981). Lipophilization of soy protein on its emulsion stabilizing properties. J. Food Sci. 46:1192.

AOKI, H., SHIRASE, Y., KATO, J. and WATANABE, Y. (1984). Emulsion stabilizing properties of soy protein isolates mixed with sodium caseinates. J. Food Sci. 49:212.

BARNES STONE, M. and CAMPBELL, A. M. (1980). Emulsification in systems containing soy protein isolates, salt and starch. J. Food Sci. 45:1713.

BELITZ, H. D., KIEFFER, R., SEILMEIER, W. and WIESER, H. (1986). Structure and function of gluten proteins. Cereal Chem. 63(4):336.

BERA, M. B. and MUKHERJEE, R. K. (1989). Solubility, emulsifying and foaming properties of rice brand protein concentrates. J. Food Sci. 54(1):142.

BERK, Z. (1983). Braverman's introduction to the biochemistry of foods. 2nd ed. Elsevier Scientific Publishing Co. Netherlands.

BEUCHAT, L. R. (1977). Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. J. Agric. Food Chem. 25(2):258.

BLANSHARD, J. M. V. and LILLFORD, P. (1987). Food structure and behaviour. Academic Press. U.S.A.

CHARLEY, H. (1982). Food science. 2<sup>nd</sup> ed. MacMillan Publishing Co. U.S.A.

CHEN, B. H. Y. and MORR, C. V. (1985). Solubility and foaming properties of phytate-reduced soy protein isolate. J. Food Sci. 50:1139.

CHOBERT, J. M., SITOBY, M. Z. and WHITAKER, J. R. (1988). Solubility and emulsifying properties of caseins modified enzymatically by Staphylococcus aureus V8 protease. J. Agric. Food Chem. 36:220.

DEV, D. K. and MUKHERJEE, K. D. (1986). Functional properties of rapeseed protein products with varying phytic acid contents. J. Agric. Food Chem. 34:775.

DREESE, P. C., FAUBION, J. M. and HOSENEY, R. C. (1988). Dynamic rheological properties of flour, gluten, and gluten-starch doughs. I. Temperature-depending changes during heating. Cereal Chem 65(4):348

**EISELE, T. A. and BREKKE, C. J.** (1981). Chemical modification and functional properties of acylated beef heart myofibrillar proteins. *J. Food Sci.* 46:1095.

**EWART, J. A. D.** (1988). Studies on disulfide bonds in glutenin. *Cereal Chem.* 65(2):95.

**FEBS** (Federation of European Biochemical Societies). (1977). Proceeding of the 11<sup>th</sup> Meeting. Pergamon Press. Copenhagen.

**GALLUZZO, B. J. and REGENSTEIN, J. M.** (1978). Emulsion capacity and timed emulsification of chicken breast muscle myosin. *J. Food Sci.* 43:1757.

**GARARD, I. D.** (1978). Introductory food chemistry. The AVI Publishing Co. Inc. U.S.A.

**GODFREY, T. and REICHEL, J.** (1983). Industrial Enzymology. The Application of Enzymes in Industry. The Nature Press. U.S.A.

**GOFFORTH, D. R., FIMNEY, K. F., HOSENEY, R. C. and SHOGREN, M. D.** (1977). Effect of strenght and concentration of acid on the functional properties of solubilized glutes of good- and poor-quality bread flours. *Cereal Chem.* 54(6):1249.

HAQUE, Z. and KINSELLA, J. E. (1989). Emulsifying properties of food proteins: development of a standardized emulsification method. *J. Food Sci.* 54(1):39.

IGE, M., OGUNSUA, A. O. and OKE, O. L. (1984). Functional properties of the proteins of some nigerian oilseeds: conophor seeds and three varieties of melon seeds. *J. Agric. Food Chem.* 32:822.

INGLETT, G. (1974). *Wheat: production and utilization.* The AVI Publishing Co. Inc. U.S.A.

INGLETT, G. (1980). *Cereals for food and beverages.* Lars Munck Academic Press. U.S.A.

JEAN JEAN, M. F. and FEILLET, P. (1979). Physicochemical properties of wheat gel proteins: effects of isolation conditions. *Cereal Chem.* 55(6):864.

JEAN JEAN, M. F., DAMIDAUX, R. and FEILLET, P. (1980). Effect of heat treatment on protein solubility and viscoelastic properties of wheat gluten. *Cereal Chem.* 57(5):325.

**KATO, A., FUJISHIGE, N., MATSUDOMI, N. and KOBAYASHI, K.** (1985). Determination of emulsifying properties of some proteins by conductivity measurements. *J. Food Sci.* 50:56.

**KATO, A., TANAKA, A., LEE, Y., MATSUDOMI, N. and KOBAYASHI, K.** (1987). Effects of deamidation with chymotrypsin at pH 10 on the functional properties of proteins. *J. Agric. Food Chem.* 35:285.

**KOYORO, H. and POWERS, J. R.** (1987). Functional properties of pea globulin fractions. *Cereal Chem.* 64(2):97.

**KRAMER A. and KWEE, W. H.** (1977). Functional and nutritional properties of tomato protein concentrates. *J. Food Sci.* 42:207

**KRUGER, J. E., LINEBACK, D. and STAUFFER, C. E.** (1987). Eds. *Enzymes and their role in cereal technology.* American Association of Cereal Chemists Inc. U.S.A.

**LIM, C. B. and ZAYAS, J.** (1987). Protein solubility, emulsifying stability and capacity of two defatted corn germ proteins. *J. Food Sci.* 52:1615.

**LOFFLER, A.** (1986). Proteolytic enzymes: sources and applications. *Food Tech.* Jan:63.

LOWRY, D. H., ROSENBROUGH, M. J., FARR, A. and RANDALL, R. (1951). J. Biol. Chem. 183:256.

LUFANO, C. E. and ANON, M. C. (1987). Denaturation of wheat endosperm proteins during drying. Cereal Chem. 64(6):437.

MADHUSUDHAN, K. T. and SINGH, M. (1985). Effect of heat treatment on the functional properties of linseed meal. J. Agric. Food Chem. 33(6):1223.

MARSHALL, W. H., DUTSON, T. R., CARPENTER, Z. L. and SMITH, G. C. (1985). A simple method for emulsion end-point determinations. J. Food Sci. 40:896.

MOHRI, M. and MATSUSHITA, S. (1984). Improvement of water absorption of soybean protein by treatment with bromelain. J. Agric. Food Chem. 32:486.

NATH, J. P. and NARASINGA RAO, M. S. (1981). Functional properties of guar proteins. J. Food Sci. 46:1255.

PARKS, L. L. and CARPENTER, J. A. (1987). Functionality of six nonmeat proteins in meat emulsion systems. J. Food Sci. 52(2):271.

PHILLIPS, D. R. and BEUCHAT, L. R. (1979). Enzyme modification of proteins. Pour-El ed. American Chemical Society.

PHILLIPS, D. R. and STERNBERG, M. (1979). Corn protein concentrate: functional and nutritional properties. J. Food Sci. 44:1152.

POMERANZ, Y. (1978). Wheat chemistry and technology. American Association of Cereal Chemists Inc. U.S.A.

POMERANZ, Y. (1985). Functional properties of food components. Academic Press. U.S.A.

PONNAMPALAM, R., GOULET, G., AMIOT, J. and BRISSON, G. J. (1987). Some functional and nutritional properties of oat flours as affected by proteolysis. J. Agric. Food Chem. 35:279.

POUR-EL, A. and SWENSON, T. (1976). Gelation parameters of enzymatically modified soy protein isolates. Cereal Chem. 53(3):438.

PUSKI, G. A. (1976). Review of methodology for emulsification properties of plant proteins. Cereal Chem. 53(5):650.

RHAM, O., KRUSEMAN, J. and HIDALGO, J. (1978). Nongelling soy protein hydrolysate for use in concentrated fluids complex foods. J. Food Sci. 43:642.

SATHE, S. K. and SALUNKHE, D. K. (1981). Functional properties of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: emulsion, foaming, viscosity, and gelation properties. J. Food Sci. 46:71.

SATHE, S. K., DESHPANDE, S. S. and SALUNKHE, D. K. (1982). Functional properties of lupin seed (*Lupinus mutabilis*) proteins and protein concentrates. J. Food Sci. 47:491.

SCHACHTEL, A. P. (1981). Effects of preparative processes on the composition and functional properties of protein preparations from Candida utilis. J. Food Sci. 46:377.

SCHMIDT, R. H. and ILLINGWORTH, B. L. (1978). Heat-induced gelation of peanut protein in whey protein blends. J. Food Sci. 43:613.

SESE, H., WATANABE, M., ARAI, S. and OGAWA, Y. (1987). Functional and sensory properties of meat emulsions produced by using enzymatically modified gelatin. J. Food Sci. 52:893.

SHAHIDI, M., NACZEK, L. J., RUBIN and DIOSADY, L. L. (1984).  
Functional properties of blood globin. J. Food Sci. 49:370.

SMITH, D. M. and BREKKE, C. J. (1985). Enzymatic  
modification of the structure and functional properties of  
mechanically deboned fowl proteins. J. Agric. Food Chem.  
33:631.

SMITH, D. M. (1988). Meat proteins: functional properties in  
comminuted meat products. Food Tech. Apr:116

SOSULSKI, F. (1976). Functional properties of rapeseed  
flours concentrates and isolates. J. Food Sci. 41:1349.

TANIMOTO, S. and KINSHELLA, J. E. (1988). Enzymatic  
modification of proteins: effects of transglutaminase cross-  
linking of some physical properties of beta-lactoglobulin.  
J. Agric. Food Chem. 36:281.

TASNEEM, R. and SUBRAMANIAN, M. (1986). Functional  
properties of guar (Cyamopsis tetragonoloba) meal protein  
isolates. J. Agric. Food Chem. 34(5):851.

**THOMPSON, L. U., LIU, R. F. K. and JONES, J. D. (1982).** Functional properties and food applications of rapeseed protein concentrate. *J. Food Sci.* 47:1175.

**TORGENSEN, H. and TOLEDO, R. T. (1977).** Physical properties of protein preparations related to their functional characteristics in comminuted meat systems. *J. Food Sci.* 42:11615.

**VERMA, S. C. and McCALLA, A. G. (1966).** Enzymatic hydrolysis of dispersed wheat gluten. *Cereal Chem.* 43:28.

**VOLKERT, M. A. and KLEIN, B. P. (1979).** Protein dispersibility and emulsion characteristics of four soy products. *J. Food Sci.* 44(1):93

**VUILLEMARD, J. C. et al.** Development of a standardized method to determine the emulsifying capacity of food proteins. *J. Food Sci.* (in press)

**WANG, J. C. and KINSELLA, J. E. (1976).** Functional properties of novel proteins: alfalfa leaf protein. *J. Food Sci.* 41:286.

WATANABE, M., TOYOKAWA, H., SHIMADA, A. and ARAI, S. (1981). Proteinaceous surfactants produced from gelatin by enzymatic modification: evaluation for their functionality. J. Food Sci. 46:1467.

WEATHERBURN, M. W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal. Chem. 39(8):971.

WEST, S. I. (1984). Food proteins: sources and properties. J. Chem. Tech. Biotech. 34B:176.

WHITAKER, J and TANNENBAUM, S. (1970). Food Proteins. AVI Publishing Co. Inc. U.S.A.

WU CHIV, H. et al. (1976). Preparations and properties of acid-solubilized gluten. J. Agr. Food Chem. 24:504.

WU, J. S., WISAKOWSKY, E. E. and BURNS, E. E. (1976). Emulsion capacity and foam stability of re-extracted sunflower meal (*Helianthus annuus*). J. Food Sci. 41:965.

YAMAUCHI, K., SHIMIZU, M. and KAMIYA, T. (1980). Emulsifying properties of whey proteins. J. Food Sci. 45:12370