



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**" EFECTO DE LA MODIFICACION ENZIMATICA
CON PROTEASAS SOBRE LAS PROPIEDADES
FUNCIONALES DE UN CONCENTRADO
PROTEINICO DE SEMILLA DE AMARANTO
OBTENIDO POR SUCCINILACION."**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A :
MARGARITA MORALES TELLEZ

ASESOR: DR. JORGE SORIANO SANTOS
COASESOR: I.B.Q. SATURNINO MAYA RAMIREZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1967

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES, CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo

"Efecto de la modificación enzimática con proteasas sobre
las propiedades funcionales de un concentrado proteínico
de semilla de amaranto obtenido por succinilación"

que presenta la pasante: Margarita Morales Téllez
con número de cuenta: 4322794-0 para obtener el TÍTULO de:
Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 16 de Junio de 1997

PRESIDENTE	I.B.Q. J. Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	I.B.Q. Rosa M. Arriaga Orihuela	
SECRETARIO	I.B.Q. Saturnino Maya Ramírez	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. S. Patricia Miranda Castro	
2do. SUPLENTE	Dra. Sara E. Valdés Martínez	

AGRADECIMIENTOS

Mi reconocimiento a la Fundación Internacional para la Ciencia por su apoyo y financiamiento parcial a este trabajo (Núm. de trabajo E/ 2185).

Tambien fue apoyado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la de la UAM-Iztapalapa, a través del proyecto: "Industrialización de la semilla de amaranto".

Así mismo, agradezco al Dr. Benito Manríquez, Director General de "San Miguel de Proyectos Agropecuarios S.P.R. de R.S." por haber proporcionado la harina de amaranto utilizada en este estudio.

Al Dr. Jorge Soriano Santos por su paciencia y su confianza al desarrollo de este trabajo.

Al IBQ, Saturnino Maya Ramirez por su confianza, su amistad y asesoría al presente estudio.

Sin olvidar al M. C. Marco Aurelio Córdoba Salgado, por su paciencia, su amistad y asesoría para la terminación de este trabajo.

También agradezco a mis sinodales las observaciones hechas al presente trabajo.

Dedicado

Con todo mi amor a Ricardo, mi esposo, mi amigo y compañero quien me motivó y me enseñó a volar

A mi pequeño Kishi, que con su inocencia y avidez por descubrir al mundo, me muestra que en las pequeñas cosas se encuentra una maravilla diferente

A mi mamá Adelfa, que siempre me ha dado un amor incondicional, A mi papá y a mis hermanas Yolanda, Jesús, Adriana, Sonia, Manuel y Blanca con cariño. A Rosalini, Ana María, Ana Luisa, Alejandra, Pety y Taido, mis amigas

Y a mi abuelita Margarita que aunque no se encuentra ya, entre nosotros, se que compartiría con alegría cada grado momento

A los profesores que formaron mi educación,

A Laura Cortazar, Saturnino Maya y Arnulfo Chavando, mis amigos y profesores consentidos, que compartieron susris y retos.

Pero sobre todas las cosas gracias a ti Dios, por darme la oportunidad de vivir, de creer y crecer.

***Piensa en grande y tus hechos crecerán.
Piensa en pequeño y quedarás atrás.
Piensa que puedes y podrás.
Todo está en el estado mental.***

Rudyard Kipling

Este Trabajo se realizó en el Depto. de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la asesoría del Dr. Jorge Soriano Santos.

Así mismo, en la FES-C se realizó la cuantificación de fibra cruda en el Laboratorio de Ciencia Básica III y IV; con la coasesoría del IBQ. Saturnino Maya Ramirez.

México D.F. 1997

INDICE GENERAL

Indice de figuras	1
Indice de tablas	2
Resumen	5
Capitulo I: INTRODUCCION	6
OBJETIVOS	9
ACTIVIDADES	10
Capitulo II: GENERALIDADES	11
1. Amaranto	
1.1. Definición	11
1.2. Características agronómicas del amaranto	12
1.3. Morfología	13
1.4. Producción y rendimiento	15
1.5. Composición química y valor nutritivo	16
1.6. Industrialización	19
2. Proteínas	22
2.1. Proteínas de las semillas de consumo humano	23
2.2. Composición de las proteínas de la semilla de amaranto	25
a) Composición de a.a. de las diferentes fracciones proteicas de la semilla de <i>Amaranthus spp.</i>	
2.3. Factores que afectan la solubilidad de las proteínas	28
2.4. Concentrados proteínicos	31
2.5. Propiedades funcionales de las proteínas	33
a) Propiedades de absorción, b) Solubilidad, c) Capacidad de emulsión d) Capacidad de espumado	
2.6. Alteraciones o mejora de las propiedades funcionales	44
2.7. Modificaciones químicas específicas	44

2.8. Modificaciones enzimáticas	46
Capítulo III: MATERIALES Y METODOS	51
3.1. Concentrado proteínico de amaranto	52
3.2. Preparación del concentrado proteínico por el método de succinilación	52
3.3. Análisis químico proximal	53
3.4. Modificación enzimática proteolítica	53
3.5. Electroforesis	56
a) Determinación de los pesos moleculares	58
3.6. Grado de hidrólisis	58
3.7. Evaluación de las propiedades funcionales	59
a) Solubilidad de nitrógeno b) Capacidad de absorción de agua o aceite	
c) Emulsificación d) Espumado	
3.8. Análisis Estadístico	62
Capítulo IV: RESULTADOS Y DISCUSION	63
4.1. Características químicas del concentrado proteínico obtenido por succinilación	63
4.2. Modificación enzimática proteolítica	
a) Evaluación cualitativa de la modificación enzimática	65
b) Evaluación cuantitativa de la modificación enzimática	69
4.3. Propiedades funcionales de los concentrados proteínicos de amaranto modificados enzimáticamente	71
a) Solubilidad de nitrógeno	71
b) Capacidad de absorción de agua o aceite	74
c) Actividad y estabilidad de emulsificación	76
d) Actividad y estabilidad de espumado	82
CONCLUSIONES	88
Anexo 1	91
BIBLIOGRAFIA	93

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.-Cortes de la semilla de amaranto que muestran su morfología.

Figura 2.-Producción nacional del amaranto 1990-92.

Figura 3.-Utilización integral del amaranto.

Figura 4.- Proceso de obtención de HPAD-29 por clasificación neumática.

Figura 5.-Representación esquemática de las interacciones proteína-agua que se producen durante el proceso de hidratación de un polvo proteico.

Figura 6.-Principales cambios en proteínas por varias modificaciones químicas.

Figura 7.-Diagrama metodológico general.

Figura 8.-Metodología seguida para la modificación enzimática del CPM con Tripsina o α -quimotripsina.

Figura 9.-Perfil de electrofóresis de los concentrados proteínicos de la semilla de amaranto, modificados enzimáticamente con tripsina o α -quimotripsina.

Figura 10.-Grado de hidrólisis de CPM modificado enzimáticamente.

Figura 11.-Solubilidad de nitrógeno de concentrados proteínicos de amaranto modificados enzimáticamente en función del pH.

Figura 12.-% Actividad de emulsión de un concentrado proteínico de amaranto modificado enzimáticamente en función del pH.

Figura 13.-% Estabilidad de emulsión de concentrados proteínicos de amaranto modificados enzimáticamente en función del pH.

Figura 14.-% Actividad de espumado de un concentrado proteínico de amaranto modificados enzimáticamente en función del pH.

Figura 15.-% Estabilidad de espumado de concentrados proteínicos de amaranto modificados enzimáticamente en función del pH.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.-Usos y Areas de origen de las principales especies de *Amaranthus*.

Tabla 2.-Composición de la semilla de amaranto

Tabla 3.-Composición de harinas integrales

Tabla 4.-Productos de amaranto

Tabla 5.-Clasificación de las proteínas de granos de cereales.

Tabla 6.-Contenido de lisina y cuenta química en proteínas de diversos alimentos

Tabla 7.-Composición de aminoácidos esenciales de la semilla de amaranto y otras semillas.

Tabla 8.-Composición de las proteínas de diferentes cereales y semilla de amaranto.

Tabla 9.-Composición de aminoácidos de las fracciones proteínicas de amaranto.

Tabla 10.-Composición de aminoácidos de distintas globulinas

Tabla 11.-Propiedades funcionales de las proteínas de los granos de importancia en aplicaciones en alimentos.

Tabla 12.-Factores que afectan las propiedades de emulsión de las proteínas

Tabla 13.-Factores que afectan las propiedades espumantes de las proteínas.

Tabla 14.-Clasificación y subclasificación de enzimas proteolíticas.

Tabla 15.-Enzimas proteolíticas

Tabla 16.-Hidrólisis enzimática de proteínas vegetales y su efecto sobre su funcionalidad.

Tabla 17.-Análisis Químico Proximal

Tabla 18.-Concentración enzima-sustrato ensayadas para la modificación del CPM.

Tabla 19.-Condiciones ensayadas para la activación e inactivación de las enzimas usadas para la modificación del CPM.

Tabla 20.-Composición Dalton Mark de aplicación en electroforesis .

Tabla 21.-Análisis químico proximal de la harina de semilla de amaranto obtenida por clasificación neumática (HPA), del HPA desengrasado (HPAD) y del concentrado proteínico obtenido por succinilación (CPM).

Tabla 22.-Condiciones óptimas de concentración enzima-sustrato para modificar al CPM.

Tabla 23.-Peso Molecular aparente calculado para los diferentes polipéptidos presentes en los perfiles de electroforesis de los concentrados proteínicos de amaranto.

Tabla 24.-Solubilidad de nitrógeno de concentrados proteínicos de amaranto modificados enzimáticamente en función del pH.

Tabla 25.-Absorción de agua o aceite de concentrados proteínicos de amaranto por succinilación modificados enzimáticamente.

Tabla 26.-% Actividad y Estabilidad de emulsificación de concentrados proteínicos de amaranto modificados enzimáticamente en función del pH.

Tabla 27.-% Actividad y % de estabilidad de espumado de concentrados proteínicos de amaranto modificados enzimáticamente en función del pH.

Tabla 28.-Principales propiedades funcionales de los concentrados modificados con proteasas.

RESUMEN

La semilla de amaranto se ha reconocido como una excelente fuente de proteína y presenta un gran potencial de aplicación en diversos alimentos. En este estudio un concentrado proteínico de harina de amaranto (CPM) obtenido por el método químico de succinilación al 50%, se modificó con dos enzimas proteolíticas: α -quimotripsina o tripsina a tres diferentes tiempos de exposición hidrolítica: 5, 10 y 30 min.. Las condiciones para la modificación enzimática se establecieron al observarse una leve modificación del patrón original evaluado por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS en gradiente lineal 10-20%. Estas condiciones de concentración enzima-sustrato para la modificación del CPM fueron: α -quimotripsina [0.37%, 5%), tripsina [0.25%, 7%). Una vez preparados los diferentes concentrados se determinó el grado de hidrólisis y se evaluaron las siguientes propiedades funcionales: solubilidad de nitrógeno, absorción de agua o aceite, actividad y estabilidad de emulsificación, actividad y estabilidad de espumado, estas propiedades fisicoquímicas se evaluaron en función del pH; y se compararon con las del concentrado original o CPM. La solubilidad de nitrógeno que presentaron los concentrados modificados con α -quimotripsina o tripsina mostraron una mayor solubilidad en el rango de pH de 5-7, destacando por su alta solubilidad. Los concentrados modificados a los 5 min. de hidrólisis, independientemente del tipo de enzima utilizada. Los concentrados modificados enzimáticamente presentaron la más alta capacidad de dispersibilidad en agua, así mismo la absorción de aceite se mejoró por los concentrados modificados con α -quimotripsina a 10 y 30 min. y con tripsina a 10 y 30 min. Los concentrados modificados con tripsina, son los que presentaron la mayor actividad de espumado, aunada a una buena estabilidad que en general presentaron. Los concentrados modificados presentaron una buena actividad y alta estabilidad de emulsión a pH de 6, continuando los tratamientos a pH 2 y 8.

1.-INTRODUCCION

La alimentación en el mundo actual plantea problemas tanto cuantitativos como cualitativos. En lo que concierne al aspecto cuantitativo, la problemática del hambre en el mundo es una preocupación general a causa del aumento de la población (aumento que es mucho más acusado en determinados países), pues no va acompañado de un crecimiento paralelo de aportes alimenticios, especialmente proteínicos. Esta es la razón por lo que en los últimos años se ha procurado a la búsqueda de nuevas fuentes de alimentos, y entre estos, aquellos ricos en proteínas. Por otro lado, el aspecto cualitativo es también importante, ya que las proteínas alimenticias que deben suministrarse al hombre, necesariamente tienen que incluir a los aminoácidos esenciales, para la formación de sus propias proteínas.

Sin embargo, en ocasiones no estamos conformes con la estructura, la textura, el sabor, el color, el valor nutritivo o la capacidad de conservación de los alimentos, por lo que además, no podemos olvidar el problema de las cualidades sensoriales. La Industria Alimentaria tiene que suministrar grandes cantidades de productos de calidad constante y de buena conservación. Entre estos productos destacaremos a los que son ricos en proteínas en donde algunos se fundamentan en las propiedades particulares emulsificantes, gelificantes, etc., que pueden proporcionar esas proteínas.

Hermannson (1979) define las propiedades funcionales como aquellas características que proporcionan información del comportamiento fisicoquímico de las proteínas en un sistema alimenticio. Las propiedades funcionales reflejan atributos intrínsecos de las proteínas tales como: composición, secuencia de aminoácidos, conformación, estructura, así como posibles interacciones con otros componentes de los alimentos. Las propiedades funcionales pueden ser afectadas por variables de su entorno fisicoquímico: pH, temperatura, fuerza iónica, métodos de extracción (Kinsella, 1979). Se ha comprobado que cambios mínimos en la estructura de las proteínas, a través de modificaciones químicas

pueden mejorar ciertas propiedades funcionales requeridas para la aplicación en alimentos (Choi y col 1981).

La disponibilidad de las proteínas alimenticias en cantidad suficiente plantea numerosos problemas, porque su producción representa elevados costos en comparación de los glúcidos o los lípidos. Con el fin de satisfacer este crecimiento continuado de la demanda de proteínas, hay que encontrar nuevas fuentes proteicas, así como mejores tecnologías para su utilización. Por estas razones es importante que las proteínas alimenticias conserven sus propiedades químicas, físicas y biológicas, y resulta fundamental conocer los efectos de los diferentes tratamientos tecnológicos sobre ellas, porque esto permite una mejora de su calidad nutricional y de sus propiedades funcionales (Cheffel y col., 1989; Márquez-Moreno, 1993)

En nuestro país, se realizan diversas investigaciones que tienen como objetivo el transformar productos vegetales ricos en proteína, en una amplia gama de productos alimenticios deseables y nutritivos.

El amaranto, es una planta que posee características agronómico-alimentarias prometedoras, tiene una gran versatilidad de uso como forraje, como grano y como verdura. Los granos de amaranto contienen cerca del 12 al 16 % de proteína cruda. Con respecto a la calidad nutricional de los granos de amaranto, se han publicado numerosos informes que sostienen que es similar a la de la caseína de la leche (Shingal y Kulkarni, 1988).

En relación a las propiedades fisicoquímicas de la semilla de amaranto, Konishi y Yoshimoto (1989), han informado que la globulina del amaranto parece ser agente emulsificante relativamente estable a la temperatura y presenta una hidrofobicidad muy alta en relación con otras proteínas vegetales.

En el departamento de Biotecnología de la UAM-I, se desarrolla un proyecto que tiene como objetivo principal la industrialización de la semilla de amaranto. Como primer paso se planteó la preparación de concentrados proteínicos por diferentes métodos de solubilización del nitrógeno proteico y la posible incorporación a diferentes alimentos mediante la medición de sus propiedades funcionales. En esta primera fase, las perspectivas de uso de los concentrados obtenidos han sido alentadoras. Tomando en cuenta lo anterior el presente trabajo de investigación, tiene como objetivo la evaluación del efecto sobre las propiedades funcionales de la modificación enzimática con proteasas de un concentrado de amaranto obtenido por succinilación.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto sobre las propiedades funcionales de un concentrado proteínico obtenido por el método de succinilación a partir de semilla de amaranto, cuando se modifica enzimáticamente con proteasas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar las condiciones de cada enzima, para la modificación enzimática proteolítica del concentrado obtenido por succinilación, utilizando tripsina o α -quimotripsina.**
- 2.- Evaluar las propiedades funcionales del concentrado proteínico succinilado y modificado con tripsina o α -quimotripsina.**

ACTIVIDADES

- a) **Obtener un concentrado proteínico de harina de semilla de amaranto por el método químico de succinilación:**
- a.) **Extraer las proteínas por modificación química. Utilizando una disolución acuosa a pH 8-8.5 con posterior succinilación con anhídrido succínico al 50%.**
- b) **Realizar el Análisis Químico Proximal del concentrado proteínico obtenido.**
- b.) **Determinar el contenido de humedad, proteína, fibra cruda, grasa, cenizas y carbohidratos.**
- c) **Modificar enzimáticamente el concentrado succinilado con las enzimas: α -quimotripsina o tripsina.**
- c.) **Monitorear la extensión de la hidrólisis enzimática, por cada enzima, mediante los perfiles electroforéticos de cada concentrado proteínico. En condiciones desnaturalizantes en presencia de sulfato dodecil de sodio.**
- c.) **Evaluar el grado de hidrólisis.**
- d) **Evaluar las siguientes propiedades funcionales: absorción de agua, absorción de aceite, actividad y estabilidad de espuma, actividad y estabilidad de emulsificación y solubilidad.**
- e) **Realizar el Análisis Estadístico: Análisis de varianza (ANOVA) y Análisis de Duncan a los resultados obtenidos. Se utilizará el paquete de computación: SAS (Statistical Analytical System).**

II.-GENERALIDADES

II.1.- AMARANTO

El amaranto es un cultivo procedente de América, específicamente de México, Guatemala y Perú. En tiempos precolombinos, los granos de amaranto eran uno de los alimentos básicos del nuevo mundo, tan importante como el maíz, el frijol y la chía; servía para hacer tamales, atoles y se agregaba a la masa para hacer tortillas, también preparaban una bebida a base de semilla tostada, molida y disuelta en aguamiel, no sólo aprovechaban la semilla o "huautli" ("alegría"), sino también eran consumidas sus espigas tiernas a las que llamaban huauzontli, mientras que la planta tierna en general era conocida como quintonil. Su cultivo surgió hace unos 7000 años A.C., siendo México, uno de sus centros de origen en donde tuvo mayor relevancia, alrededor del amaranto se entretienen leyendas y rituales que ocuparon varios días en el calendario religioso; las mujeres aztecas ponían gran empeño al mezclar la semilla de amaranto con miel de abeja o con sangre humana (de niño, principalmente), amoldando a un sinfín de formas de bocados: pájaros, venados, dioses y montañas para finalmente comerse los durante las ceremonias rituales, llamadas "Tecuato" o "comerse al Dios". Fue a partir de la conquista en donde su cultivo se prohíbe por ser una planta de gran importancia religiosa y mística entre los aztecas, y por lo cual los pueblos dominados por estos últimos rendían un tributo anual de 2000 manojos de amaranto a la gran Tenochtitlan. Esto trajo consigo que decayera el consumo de uno de los principales complementos alimenticios de la época (Sánchez-Marroquín, 1980 y 1983; Soriano-Santos 1987).

1.1) DESCRIPCIÓN: A m a r a n t o .- De las plantas amarantáceas del latín *Amaranthaceae* y del género *amaranthus*. Planta de la familia de las centrospermas de flores generalmente hermafroditas con los filamentos estaminales a menudo soldados en su base por medio de un tubito petaloide. Son arbustos con tallos estriados y lampiños de cerca de un metro de altura. El

amaranto es una de esas raras plantas que pueden ser utilizadas como vegetal, cereal y forraje. Las principales especies de amaranto y sus nombres científicos pueden verse en la Tabla 1.

Tabla 1: Usos y Areas de origen de las principales especies de *Amaranthus*.

Especies	Como se da	Uso	Lugar de origen
<i>A. blitum</i> (<i>A. lividus</i> , <i>A. oleraceus</i>)	Cultivado	Vegetal,	Asia
<i>A. caudatus</i> (<i>A. robustus</i> , <i>A. mategazzianus</i>)	Cultivado	Grano, vegetal,	SuLamerica (Andes)
		Ornamental	
<i>A. cruentus</i> / <i>A. paniculatus</i>	Cultivado	Grano, vegetal	SuLamerica (Guatemala)
<i>A. dubidius</i>	Silvestre, Cultivado	Vegetal	SuLamerica
<i>A. hybridus</i>	Silvestre	Vegetal	SuLamerica
<i>A. hypochondriacus</i> / <i>A. leucocarpus</i> / <i>A. leucosperma</i> , <i>A. flavus</i>	Cultivado	Grano, vegetal	Norteamerica (Mexico)
<i>A. retroflexus</i>	Silvestre	Vegetal	Norteamerica
<i>A. spinosus</i>	Silvestre	Vegetal	Asia
<i>A. tricolor</i> (<i>A. gangeticus</i> , <i>A. mangostanus</i>)	Cultivado	Vegetal, ornamental	Asia
<i>A. viridis</i> (<i>A. aviculans</i> , <i>A. gracilis</i>)	Silvestre	Vegetal	Africa

Teutinger B y Knorr D (1985). Food Technology 39:1.

El papel del amaranto como una planta de baja explotación, hoy en día promete un gran valor económico que ha sido reconocida por la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de Norteamerica (1975). Como se puede observar en la tabla anterior, las especies que han sido cultivadas en el viejo y nuevo mundo desde tiempos antiguos han sido aprovechadas para cosechar el grano, como hierbas y plantas ornamentales.

1.2) CARACTERISTICAS AGRONOMICAS DEL AMARANTO

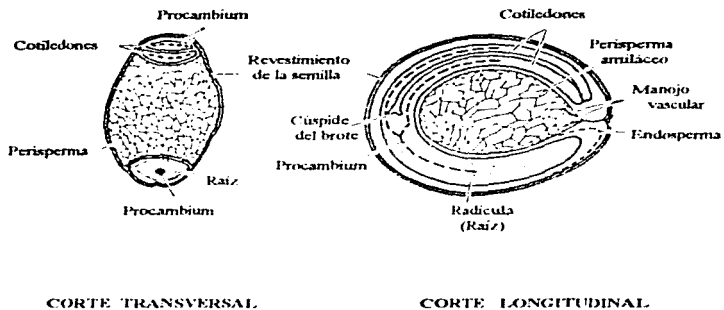
Sánchez-Marroquín (1983), refiere que el Centro de Estudios Económicos y Sociales del Tercer Mundo (CEESTEM) ha tratado de rescatar del olvido al amaranto, ya que constituye una importante fuente de nutrimentos en la dieta

tradicional de algunas regiones de Latinoamérica. Se han realizado esfuerzos de diversa índole con miras a mejorar los métodos tradicionales de cultivo particularmente con relación a la cosecha y separación de la semilla mediante la introducción de equipo para reducir los costos de producción, así como la diversificación de su uso en la industria con el objeto de mejorar la situación económica de las regiones donde actualmente se cultiva. El amaranto, al igual que otros cereales y vegetales, obtiene su mejor crecimiento en suelos ricos en nutrientes, que para el caso de esta semilla requiere de suelos con alto contenido de potasio y nitrógeno, así también como de suelos bien drenados y con pH de 6.0. El amaranto o "alegría" es uno de los pocos cultivos con gran potencial como cereal, las especies que se cultivan en nuestro país son *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

A. cruentus es una especie originaria de México y Guatemala en donde es utilizada como grano y como vegetal. Manteniendo este cultivo su permanencia en virtud de la utilización del grano en la elaboración de dulces tradicionales, mientras que el vegetal se ha utilizado para la extracción de colorante rojo, empleado para la coloración de ciertos alimentos elaborados a base de maíz. *A. hypochondriacus*, es una de las especies más resistente a las condiciones climáticas, siendo originario de la parte central de México. Algunos tipos de *A. hypochondriacus* son de hojas tupidas y sin ramas, los que se dan particularmente en áreas tropicales de gran altura y en condiciones secas. Las semillas son de calidad excelente y presentan un gran potencial como ingrediente para alimentos (Jaimes B., 1986).

1.3) MORFOLOGÍA

La semilla de amaranto es de forma lenticular, con un diámetro de 1 a 1.5 mm., un gramo de semilla puede contener de 1,000 a 3,000 semillas. La semilla tipo grano generalmente tiene colores pálidos, pero el color puede variar desde blanco hueso a beige, café claro, rojo y negro. El embrión (germen) circunda el perispermo (Fig. 1). La envoltura de la semilla y el perispermo se encuentran



CORTE TRANSVERSAL

CORTE LONGITUDINAL

Fig. 1.-Cortes de la semilla de amaranto que muestran su morfología
 (Irwing-Wood y col. (1981) *J. Food Sci.* 46, p1172)

unidos firmemente el uno con el otro (Irwing y col., 1981), pero pueden separarse por molinada abrasiva. El revestimiento de la semilla es una capa delgada y única, cuya porción exterior contiene el pigmento que imparte color a la semilla, las partículas proteicas se localizan en el embrión y endospermo. En el endospermo estas partículas miden entre 1.5 y 2 μm de diámetro, mientras que la parénquima del embrión es 3 a 5 μm . En el perispermo la proteína se presenta en forma de depósitos entre los pequeños gránulos amiláceos, que son de 0.75 a 1.25 μm . de diámetro (Soriano-Santos, 1987).

1.4) PRODUCCION Y RENDIMIENTO

El amaranto en nuestro país es actualmente cultivado en los estados de Morelos, Tlaxcala, Puebla, D.F., Hidalgo y Edo. de México, siendo estas áreas las responsables de la producción nacional. En la **figura 2** se presenta, la producción nacional de amaranto de los años 1990, 1991 y 1992, cuyo ciclo anual de producción es de primavera-verano, proporcionada por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). El rendimiento del amaranto se ha comparado satisfactoriamente con los del promedio de otros cultivos agrícolas en México; el rendimiento que presentan el *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* son de 800 - 1,200 kg./ha (Sánchez-Marroquín, 1980). El rendimiento que presenta el amaranto según el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) y el Colegio de Posgraduados de Chapingo, es del orden de 1,500 a 3,900 kg./ha., cuando es cultivado en monocultivo por un periodo de 3 a 4 meses, rendimiento relativamente mayor que el del maíz por temporal, cuyo rendimiento promedio es de 1,400 kg./ha. Estas diferencias de rendimiento del amaranto se debe a las condiciones que se involucran tales como el lugar de cultivo, las condiciones de suelo, rotación de cultivos, condiciones climáticas, etc., (SARH, 1992; Sánchez-Marroquín, 1980).

Figura 2.- Producción Nacional de Amaranto 1990-92.

Tabla a.- Chile: Primavera Verano 1990/1990 (mita agrada)

Estado	Superficie Sembrada (ha)		Superficie Cosechada (ha)		Rendimiento (ton/ha)		Producción (ton.)					
	Riego	Temp. Total	Riego	Temp. Total	Rieg.	Temp. Total	Rieg.	Temp. Total				
D.F.	0	120	120	0	120	120	0	0,908	133	0	109	109
HIDALGO	0	17	17	0	17	17	0	1,471	2	0	25	25
MEXICO	0	30	30	0	30	30	0	2,00	1,89	0	60	60
MORELOS	0	118	118	0	118	118	0	1,00	0,3	0	118	118
PUEBLA	0	352	352	0	352	352	0	0,548	1,2	0	191	191
TLAXCALA	6	141	147	6	140	146	1,0	1,00	1,44	6	140	146
TOTAL NACIONAL	6	798	804	6	797	801	1,0	0,834	0,831	6	665	671

Tabla b.- Chile: Primavera Verano 1991/1991 (mita agrada)

Estado	Superficie Sembrada (ha)		Superficie Cosechada (ha)		Rendimiento (ton/ha)		Producción (ton.)					
	Riego	Temp. Total	Riego	Temp. Total	Rieg.	Temp. Total	Rieg.	Temp. Total				
D.F.	0	166	166	0	166	166	0	1,33	1,31	0	182	182
HIDALGO	3	6	3	3	0	32	2	0	2	6	0	6
MEXICO	2	66	68	2	66	68	3	1,86	1,89	6	129	135
MORELOS	0	190	190	0	190	190	0	0,5	0,5	0	95	95
PUEBLA	0	117	117	0	40	40	0	1,2	1,2	0	48	48
TLAXCALA	20	186	186	20	186	206	1,7	1,44	1,44	34	219	271
TOTAL NACIONAL	25	703	720	25	628	653	1,84	1,1	1,13	46	619	739

Tabla c.- Chile: Primavera Verano 1992/1992 (mita agrada)

Estado	Superficie Sembrada (ha)		Superficie Cosechada (ha)		Rendimiento (ton/ha)		Producción (ton.)					
	Riego	Temp. Total	Riego	Temp. Total	Rieg.	Temp. Total	Rieg.	Temp. Total				
D.F.	0	156	156	0	156	156	0	1,03	1,03	0	161	161
HIDALGO	5	9	14	5	9	14	1	1	1	5	9	14
MEXICO	2	72	74	2	72	74	2	1,95	1,89	4	140	144
MORELOS	0	150	150	0	138	150	0	1,0	1,0	0	138	138
PUEBLA	0	203	203	0	193	203	0	1,0	1,0	0	193	193
TLAXCALA	25	253	255	24	253	255	1,3	1,24	1,14	31	316	349
TOTAL NACIONAL	32	847	879	31	825	856	1,24	1,1	1,18	40	959	999

Anuario Estadístico de la producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. SARH, (1990, 1991, 1992)
ha.- hectárea, ton.- tonelada, \$mill.- millones de pesos; Temp - temporal, Rieg.- riego

Y, por los datos mostrados en la **figura 2**, se deduce que las condiciones en las que se desarrolla el cultivo influyen en forma importante sobre la producción total; al comparar la tabla a, con la tabla b y la c se observa que la superficie sembrada y cosechada son diferentes, así mismo los rendimientos, y es por este último que la producción nacional de amaranto difiere pese a que la superficie sembrada en 1991 fue menor que la de 1990, y tomando en cuenta la producción total nacional de amaranto de cada año, esta va en aumento.

1.5) COMPOSICION QUIMICA Y VALOR NUTRITIVO

La **Tabla 2** muestra la composición de la semilla de amaranto, la cual varía principalmente a causa de las prácticas agronómicas.

Tabla 2.-Composición de la semilla de amaranto

Componente	% en peso
Proteína	12 - 16
Lípidos	6 - 7.5
Almidón	62 - 69
Azúcares totales	2 - 3
Cenizas	3 - 3.5
Fibra	4 - 7.2

Soriano-Santos, (1987) Tesis Facultad de Química (UNAM)

La mayoría de los investigadores (Sánchez-Marroquín, 1983; Teutónico y Knorr, 1985) han observado que la semilla de amaranto contiene un nivel promedio más alto de proteína (**Tabla 3**), si se compara con otros cereales convencionales. Los cortes anatómicos y las técnicas de molienda han sido usadas para demostrar que

la proteína de *A. cruentus* está distribuida en un 65% en la envoltura de la semilla y el germen, y 35% en el perispermo amiláceo (Irving, 1981; Sánchez-Marroquín, 1985). Los ácidos grasos del amaranto están constituidos en un 76% por los ácidos oleico (C18:1), linoléico (C18:2), y palmítico (C16:0); 20% de ácido esteárico (C18:0) con trazas de linolénico (C18:3) y 4% de escualeno (Soriano-Santos, 1987); contiene además cantidades traza de esteroides y ésteres de esteroles (Bressani, 1983). El almidón es el carbohidrato más abundante de la semilla de amaranto y está constituido principalmente por amilopectina, con un 5 ó 7% de amilosa.

Tabla 3.-Composición de harinas integrales

Componentes	Amaranto	Triticale	Cebada	Maz	Trigo	Quinoa
Humedad	10.00	11.00	11.00	11.72	10.10	10.3
Cenizas	2.50	2.06	2.07	1.56	1.05	2.3
Proteína	15.74	2.46	14.19	8.51	12.00	14.6
Fibra cruda	4.94	2.38	2.18	1.75	1.20	3.4
Grasa cruda	7.03	1.46	4.18	5.51	1.80	6.8
Carbohidratos	60.82	70.60	69.37	70.95	76.60	64.3

Sánchez-Marroquín, 1980. Potencialidad agroindustrial del amaranto, CEESTEM

El contenido mineral de las especies de amaranto generalmente es más alto que el de los cereales de consumo tradicional estando presentes el fósforo, magnesio, potasio, calcio y hierro precisamente en ese orden. Estudios de molienda han demostrado que las cenizas están concentradas en un 66% en el revestimiento de la semilla y en la fracción del germen. El revestimiento es rico en calcio, sodio y magnesio, mientras que el hierro y cobre están concentrados en el germen. La semilla de amaranto es rica en vitamina C, niacina y vitaminas B1 y B2 además de B-caroteno (Teutónico y Knorr, 1985).

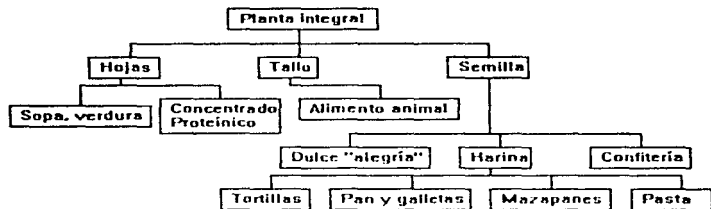
El contenido mineral de las especies de amaranto generalmente es más alto que el de los cereales de consumo tradicional estando presentes el fósforo, magnesio,

potasio, calcio y hierro precisamente en ese orden. Estudios de molienda han demostrado que las cenizas están concentradas en un 66% en el revestimiento de la semilla y en la fracción del germen. El revestimiento es rico en calcio, sodio y magnesio, mientras que el hierro y cobre están concentrados en el germen. La semilla de amaranto es rica en vitamina C, niacina y vitaminas B1 y B2 además de B-caroteno (Teutónico y Knorr, 1985).

El amaranto contiene factores antinutricionales, como inhibidores de tripsina, polifenoles y saponinas (actividad hemolítica), aunque su concentración es baja y similar a las presentes en leguminosas, el valor nutritivo disminuye considerablemente, si no son eliminadas antes del consumo. Afortunadamente estos factores son termolábiles y el proceso de cocción es el adecuado para su eliminación (Soriano-Santos, 1987).

1.6) INDUSTRIALIZACION

Desde el punto de vista industrial son varias las aplicaciones del amaranto, según el Centro de Estudios Económicos y Sociales del Tercer Mundo. En la Fig. 3 se aprecia la ruta que las diferentes partes de la planta siguen para su uso industrial, de acuerdo con las características químicas de cada una de ellas. Así, los tallos serán destinados a forraje, las hojas a alimento para consumo humano (modificando su sabor ya que en algunas especies es amargo) y las semillas, que representan la parte más valiosa para la industria, podrán emplearse directamente como confituras o bien ser sometidas a molienda para la obtención de harinas (Sánchez-Marroquin, 1983). Estas últimas podrán emplearse en industrias específicas tales como panadería, pastelería, pastas alimenticias, galletas, mazapanes, hojuelas, etc.



Sánchez-Marroquín, 1983. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 33, 11-32.

Figura 3.- Utilización integral del amaranto

En la **Tabla 4** se indican los principales usos de los productos. En los momentos actuales se tiende a establecer pequeñas industrias en varios países, para lo cual es conveniente y urge introducir primero un mejoramiento en los métodos de separación de la semilla. Así se podrán reducir los costos de operación economizando tiempo y mano de obra, aunque sin eliminar ésta en forma radical, así como diseñar equipo adecuado para el trillado, limpieza de la semilla, el tostado o reventado de las semillas ("popping"), etc. Para la separación de la semilla se ha propuesto un modelo adecuado es de bajo precio, fácil operación, fabricación simple y eficiencia verificada.

Los proyectos de industrialización del amaranto vía harinas son muy atractivos si se toma en consideración que su calidad nutricional compite ventajosamente con los cereales. A este respecto cabe señalar que en los programas de enriquecimiento de cereales con diversas finalidades, la harina de amaranto y la de soya entre otras, representa una forma muy conveniente y económica de lograr

un apreciable incremento en el valor alimenticio de diversos productos muy populares en la dieta latinoamericana tales como tortillas, crepas, panes, galletas, pastas, etc.,.

El uso industrial del amaranto es muy amplio, si se toman a consideración su empleo directo o en productos cocidos, ya sea reventados o tostados en diversas aplicaciones de confitería (Sánchez-Marroquín, 1983).

Tabla 4.- Productos de amaranto

Productos	Usos Principales
Crudos	
-Semilla perlada	Sopas, guisos, etc.
-Semilla entera	Granola, confitería, harinas, pastas, repostería
-Semilla germinada	Directo, en alimentos especiales
-Hoja entera	Ensaladas, concentrados proteínicos
-Tallo	Forrajes
-germen	Aceites
Cocidos	
Semilla reventada, cocida o tostada	Confitería, sopas, estofados, hojuelas, galletas, etc. Pastas, pan, harinas, tortillas, tamales.
Precocidos	
-Semilla	Alimentos infantiles, alimentos de humedad intermedia

Sánchez-Marroquín, 1983. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 33, 11-32

II.2.-PROTEÍNAS

Las proteínas son macromoléculas complejas que pueden constituir el 50 % o más del peso seco de las células vivas y tienen un papel fundamental en su estructura y su función. Numerosas proteínas han sido aisladas y purificadas, su masa varía de 5.000 a varios millones de daltons. Estos biopolímeros están constituidos por carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y en la mayoría de las veces con azufre; además de otros elementos como el hierro, cobre, fósforo o zinc (Badui, 1990; Toporek, 1985).

Los aminoácidos son los monómeros constituyentes de las proteínas, su distribución y concentración determinan fundamentalmente las propiedades de las proteínas. En su mayoría los aminoácidos son ácidos α -amino carboxílicos con carácter anfotérico debido a la presencia de los grupos amino y carboxilo se encuentran en el carbono α de la molécula. En la naturaleza se encuentran varios aminoácidos, sin embargo la mayoría de las proteínas están estructuradas solamente por 20 ó 21 de ellos, los cuales se encuentran enlazados los unos a los otros por enlaces de amida sustituida, llamados enlaces peptídicos. Las cadenas polipeptídicas así formadas pueden contener varios cientos de unidades (Badui, 1990; Cheffle y col., 1989; Toporek, 1985).

Cada proteína está caracterizada por su conformación es decir, por su organización tridimensional. Así, las proteínas fibrosas están constituidas de cadenas polipeptídicas enlazadas a lo largo de un eje común lineal, que conduce a la formación de fibras (colágeno, queratina, elastina, fibroína). Por otra parte las proteínas globulares, están compuestas de una o varias cadenas polipeptídicas enrolladas sobre sí mismas, para formar en el espacio una estructura tridimensional (formas esféricas o globulares). Algunas moléculas poseen a la vez las propiedades de las proteínas fibrosas y globulares como la actina y fibrinógeno (Toporek, 1985; Cheffle y col., 1989; Badui, 1990).

La estructura primaria corresponde a la secuencia de los aminoácidos en una proteína. La estructura secundaria y terciaria se refiere a la organización tridimensional de la cadena polipeptídica. La estructura cuaternaria, corresponde a la distribución geométrica entre las diversas cadenas polipeptídicas unidas entre sí por los enlaces que, en la mayoría de los casos no son covalentes (Badui, 1990; Lenhinger, 1990).

Las proteínas alimenticias incluyen a una variedad de proteínas que bien pueden también ser reconocidas como estructurales o biológicamente activas por su origen, por lo que no constituyen un único grupo. Las proteínas alimenticias son simplemente aquellas que resultan digeribles, no tóxicas y económicamente utilizables por el hombre (Cheffel y col., 1989).

2.1) PROTEÍNAS DE LAS SEMILLAS DE CONSUMO HUMANO.

Las proteínas de los granos pueden clasificarse en dos categorías muy amplias de acuerdo a su función del grano: a) proteínas de reserva, sin actividad catalítica; b) proteínas con gran actividad enzimática sobre las reservas de carbohidratos, los productos de las hidrólisis son indispensables para los procesos de germinación de la semilla. Las proteínas de almacenamiento actúan como reserva de material crudo que puede ser rápida y eficientemente movilizando para ayudar al crecimiento inicial de la germinación. Así mismo, estas proteínas se caracterizan por estar abundantemente en las semillas en forma de cuerpos proteínicos, no exhibir una intensa actividad enzimática y por tener como función, ser fuente de nitrógeno y carbono durante la germinación (Córdoba-Salgado, 1995).

Desde los trabajos de Osborne en 1907, las proteínas de los cereales se clasifican según sus características de solubilidad. La sistemática seguida para la extracción de estas proteínas se esquematiza en la **Tabla 5**. Se puede decir que las técnicas modernas de separación de proteínas (solubilización por agentes disociantes, cromatografía) han complementado, sin modificar, este esquema

inicial de extracción. El fraccionamiento, separación y caracterización de las diferentes proteínas plantea problemas difíciles a causa de su insolubilidad, polimorfismo y o del fuerte grado de polimerización de las proteínas de reserva (Chellé y col., 1989)

Tabla 5.- Clasificación de las proteínas de granos de cereales.

Tipo de proteínas	Albuminas	Globulinas	Prolaminas	Glutelinas	Glutelinas de elevada masa molecular
Caracteres de solubilidad	Solubilizadas por las soluciones salinas y permanecen solubles durante la diálisis frente al agua	Solubilizadas por soluciones salinas y precipitan por per dialisis frente al agua	Solubilizadas por soluciones acuosas de alto contenido (30%) en etanol	Solubilizadas por soluciones ácidas (ác. acético o acético diluido) o por diluidas o por solución de agentes disociantes (SDS, jabones, etc., guanidino)	Insolubles en las soluciones precedentes

Chellé y col., 1989. Proteínas Alimentarias, Acribia, p. 239.

Las principales proteínas de almacenamiento de las cereales son las prolaminas (solubles en alcohol); en el trigo, la cebada y el centeno se encuentran presentes en 40-50%, en tanto que las glutelinas comprenden alrededor del 35-40%. Las prolaminas de estos cereales se subdividen en gliadinas, jordaninas y escaloninas. En el maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*) y mijo (*Pennisetum americanum*), las prolaminas se encuentran de 50-60%, en tanto que las glutelinas son 35-40% de las proteínas totales. La avena y el arroz presentan globulinas y glutelinas respectivamente, como principales proteínas y también presentan bajas cantidades de prolaminas. (Córdoba-Salgado, 1995)

Nitrogeno y Proteína cruda

El contenido de proteína de los alimentos puede estimarse a partir del contenido de nitrógeno determinado por el procedimiento de Kjeldahl, por las características

plásticas de las proteínas es necesario determinarlas en forma global como nitrógeno proteico o en la de sus componentes, los aminoácidos; los factores usados para convertir nitrógeno en proteína cruda están basados en el contenido promedio de nitrógeno en las proteínas de ciertos alimentos en particular (De León-Simón, 1985). Para *A. caudatus* el factor de conversión de nitrógeno a proteína es 5.85; en otras especies de amaranto los factores de conversión a proteína varían entre 5.2 y 5.6. Sin embargo, la National Research Council (NRC)(1984) considera adecuado para cualquier especie de amaranto el factor 5.85. (Soriano-Santos, 1987).

2.2) COMPOSICION DE LAS PROTEINAS DE LA SEMILLA DE AMARANTO

En forma genérica se puede decir que las proteínas vegetales son deficientes principalmente en lisina, mientras que las proteínas de legumbres y hojas o forrajes son deficientes en metionina. Esta deficiencia primaria de aminoácidos principalmente de lisina o metionina es intensificada en muchos casos por deficiencias secundarias, por ejemplo, treonina o triptófano; sin embargo, la proteína de amaranto es excepcional porque su balance de aminoácidos es cercano al balance óptimo requerido por el humano, por lo tanto, suplementa a los cereales convencionales que son deficientes en lisina. Su contenido de lisina (Tabla 6) es casi tres veces mayor que el maíz, y casi el doble del que contiene el trigo, de hecho el contenido de este aminoácido en el amaranto es similar al de la leche (NRC, 1984) y aunque la proteína de amaranto se ha encontrado limitante en leucina, este aminoácido se encuentra en exceso en los demás cereales (Sánchez-Marroquin, 1983; NRC, 1984; Teutonico y Knorr, 1985). Por trabajos realizados por autores como Soriano-Santos (1987), Ricardo Bressani y col. (1990), se puede deducir que no es la leucina el limitante, a juzgar por los aminogramas reportados por lo que se ha sugerido que el triptófano pudiese ser el aminoácido limitante.

Tabla 6.-Contenido de lisina y cuenta química en proteínas de diversas fuentes

Fuente	% de lisina	cuenta química
Amaranto	5.5 - 6.21	75 - 87
Leche en polvo	7.9	72
Trigo	3.4	57
Arroz	4.4	--
Cebada	3.6	62
Maíz	2.8	41
Maíz opaco-2	3.9	--
Maíz harinero-2	3.3	--
Sorgo	1.04	48
FAO (1973)	5.5	100

Sonano-Santos, 1987 Tesis de Maestra Facultad de Químicas, UNAM

En la tabla 7 se presenta la composición de aminoácidos de la semilla de amaranto y otras semillas.

Tabla 7.- Composición de aminoácidos esenciales de la semilla de amaranto y otras semillas.

grano	g./100 g. proteína							
	Trp	Met	Ihr	Ile	Val	Lys	Leu	Phe/Tyr
amaranto	1.4	4.1	3.4	3.6	4.2	5.1	5.1	6.0
trigo	0.9	4.3	3.1	3.5	4.7	3.1	7.1	8.0
avena	1.3	4.7	3.5	4.0	5.5	4.0	7.8	8.9
soya	0.7	3.0	4.5	4.0	4.4	6.4	8.4	8.4
maíz	0.6	3.2	4.0	4.6	5.1	1.9	13.0	10.6
arroz	1.0	3.0	3.7	4.5	6.7	3.8	8.2	9.1
FAO/WHO	1.0	3.5	4.0	4.0	5.0	5.4	7.0	6.0

Singhal y Kulkarni (1988) Int. J. Food Sci. Technol. 23, 125-139

Cuando se elabora una mezcla del 50% de harina de amaranto con 50% de harina de maíz, la combinación resultante satisface los requerimientos de

aminoácidos esenciales para el humano, lo que es importante cuando se piensa en el enriquecimiento de productos como la tortilla (Soriano-Santos, 1987); más sin embargo esta mezcla no resulta satisfactoria en cuanto a las cualidades sensoriales de consumo, no obstante con la mezcla de harina de maíz (80%) y de harina de amaranto (20%) se obtiene una tortilla que reúne las características especificadas por las normas oficiales con buen nivel nutricional (Sánchez-Marroquín, 1980). La relación de eficiencia protéica (PER) para el grano cocido es similar al de caseína que es de 2.5, con una digestibilidad del 90.0% y un valor biológico (BV) de 75 que es cercano al balance ideal de aminoácidos esenciales que teóricamente es de 100.0 (NRC, 1984).

Ciertas proteínas se caracterizan por la presencia de algunos aminoácidos en exceso, que pueden afectar la utilización de la proteína. Estos efectos pueden clasificarse como: a) desbalance de aminoácidos, b) antagonismo de aminoácidos, c) toxicidad de aminoácidos. En el primer caso, se ha demostrado que cuando el gluten del trigo (que está pobremente balanceado en aminoácidos) se incluye en las dieta de las ratas, como fuente de lisina, el requerimiento de este aminoácido para un máximo crecimiento también se incrementó. En el antagonismo de aminoácidos ácidos, el exceso de un aminoácido abate la utilización de aminoácidos estructuralmente similares, como en el caso del maíz, donde el exceso de leucina, no permite la utilización de isoleucina (Kakade, 1974).

A) COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LAS DIFERENTES FRACCIONES PROTEINICAS DE LA SEMILLA DE *Amaranthus spp.*

La proteína de la semilla de *Amaranthus spp.* está conformada principalmente por globulinas y albuminas. Las gluteninas representan aproximadamente el 30% de los cuerpos proteínicos, en tanto que las prolaminas a diferencia del resto de los cereales (Tabla 8) sólo se presentan en pequeñas cantidades (Paredes-López y col., 1988; Barba de la Rosa y col. 1992).

Tabla 8.-Composición de las proteínas de diferentes cereales y semilla de amaranto.

grano	% albuminas	% globulinas	% prolaminas	% glutelinas
maíz	6		55	40
trigo	15		69	16
avena	79 - 81		10 - 16	5
sorgo	16		52	32
amaranto	56 - 62		1 - 3.1	22 - 30

Córdoba-Salgado, 1995 Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-I
 Chefel y col., 1989 Proteínas Alimentarias, Acribia, p239

Las distintas fracciones proteínicas de la semilla de *Amaranthus spp.* presentan distintos patrones de distribución de aminoácidos; las albuminas y globulinas contienen altas proporciones de ácido glutámico y aspártico, así como de lisina y valina, en tanto que las glutelinas son ricas en leucina, histidina y treonina (Tabla 9).

Tabla 9.-Composición de aminoácidos de las fracciones proteínicas de la semilla de amaranto.
 gr. de aa./100 gr. proteína

aminoácido	albumina	globulina	prolamina	glutelina
Ile	3.2	3.5	6.2	5.8
Leu	4.6	5.4	5.7	10.5
Lys	6.6	4.7	4.2	4.6
Met	2.1	3.4	7.4	3.1
Phe	3.0	4.5	9.0	6.8
Tyr	2.5	2.4	4.0	3.8
Thr	4.3	3.2	3.2	8.6
Val	4.6	4.4	2.7	3.8
His	1.5	2.2	1.1	4.7
Ala	6.1	5.0	4.7	3.6
Arg	7.5	7.5	9.4	2.7
Asp	7.2	7.2	6.2	6.1
Glu	20.1	20.0	13.4	13.2
Gly	13.1	9.6	4.4	4.9
Pro	4.3	5.9	4.7	4.6
Ser	5.6	5.8	5.1	5.3

Córdoba-Salgado, 1995 Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-I

Cuando se realizó la comparación de la composición de aminoácidos de varias globulinas, provenientes de distintos granos de uso frecuente, (Tabla 10) se encontró que existía un patrón de distribución similar para la globulinas de soya y el amaranto.

Tabla 10.-Composición de aminoácidos de distintas globulinas

Aminoácido	gr. a.a. / 100 gr. proteína		
	amaranto	soya	cebada
Asp	10.1	11.8	9.2
Thr	4.1	4.2	7.0
Ser	8.6	6.6	19.1
Glx	16.6	18.8	19.1
Pro	5.4	6.3	4.9
Gly	9.2	7.8	7.5
Ala	6.2	6.7	6.0
Cys	0.9	1.1	1.1
Val	6.1	5.6	6.4
Met	1.2	1.0	0.9
Ile	5.2	4.6	6.4
Leu	7.5	7.2	7.4
Tyr	2.7	2.5	3.5
Phe	5.3	3.9	5.2
His	2.8	1.8	2.2
Lys	3.7	4.1	2.9
Arg	7.9	5.9	6.6

Córdoba-Salgado, 1995 Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-1

Así mismo, se ha realizado la secuenciación de aminoácidos para tratar de encontrar una homología entre varias globulinas. Ha sido claro que existen un considerable grado de homología entre estas, y que las diferencias encontradas están restringidas a un número de regiones variables o inserciones de frecuencias, hay al menos tres de tales regiones, las cuales están localizadas en el polipéptido α en contraste del polipéptido β que se conserva, con sólo una mínima cantidad de variación presente cerca del carbono terminal de la cadena (Wright, 1972).

2.3) FACTORES QUE AFECTAN LA SOLUBILIDAD DE LAS PROTEINAS

Las proteínas de reserva de las semillas se caracterizan por estar abundantemente en forma de cuerpos proteínicos y tienen gran influencia sobre la composición de aminoácidos que inciden en la calidad nutricional que presenta. Actualmente se han desarrollado técnicas de mutación que permiten obtener de fuentes vegetales, proteínas de reserva ricas en lisina (Soriano-Santos y Córdoba-Salgado, 1995).

Al investigar la naturaleza de las proteínas de reserva de origen vegetal, por ejemplo, para modificar sus proporciones originales de la semilla, no es suficiente la información que se obtiene de su aislamiento y su caracterización química. También es necesario el estudio de su función en la semilla, para identificar como, cuando y donde se sintetizan, para reconocer su destino durante el desarrollo de la semilla, maduración y germinación, para determinar su genética y definir otros factores que regulen su abundancia dentro de la semilla (Córdoba-Salgado, 1995).

El paso inicial para la caracterización química de las proteínas comienza con su aislamiento. Estas tradicionalmente se han aislado y fraccionado por extracciones sucesivas utilizando diferentes solventes (Tabla 5). El agua y las soluciones salinas de fuerza iónica baja, extraen la fracción definida como albúminas, las soluciones salinas las globulinas, el etanol las prolaminas y los ácidos y álcalis extraen las glutelinas. De acuerdo a la clasificación mencionada anteriormente, las albúminas y las globulinas pueden tratarse como un solo grupo de proteínas solubles en soluciones salinas.

Se han reportado análisis de aminoácidos de fracciones de albuminas y globulinas preparadas por diálisis de la fracción de la semilla soluble en solución salina, separando la globulina por centrifugación y la albúmina por coagulación por calor. La razón de realizar este procedimiento en lugar de realizar una

extracción secuencial con agua seguida por NaCl, es porque la presencia de las sales en todos los materiales vegetales, hace imposible la extracción acuosa de una albúmina verdadera (Soriano-Santos y Córdoba-Salgado, 1995). Soriano-Santos y col. (1992) ha utilizado sales divalentes en lugar de NaCl, por ejemplo, extracciones múltiples de proteínas en K_2SO_4 ó Na_2SO_4 , obteniendo extracciones reproducibles.

La solubilidad de las proteínas en agua depende desde el punto de vista termodinámico, de una disociación simultánea de las moléculas del disolvente y de las moléculas de las proteínas, previa a una dispersión de estas últimas en el disolvente, con una superficie interfacial de máximo contacto entre las proteínas y el disolvente con el que reaccionan enlaces hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo e iónicas.

La solubilidad depende fundamentalmente del pH, fuerza iónica, tipo del disolvente y temperatura. Una proteína con valores de pH superiores o inferiores del punto isoelectrico (pI), tiene carga negativa o positiva y las moléculas del agua reaccionan con estas contribuyendo a su solubilización. Además, las cadenas proteínicas que llevan cargas eléctricas del mismo signo, tienden a repelerse y por tanto a disociarse y desdoblarse. Este comportamiento se ha utilizado para solubilizar las proteínas de reserva de las semillas. La solubilidad es mayor con pH alcalinos que a pH ácidos; en efecto, en estas proteínas el número de residuos cargados negativamente a $pH > pI$ (ácido aspártico y glutámico) es superior al número de residuos cargados positivamente $pH < pI$ (lisina, por ejemplo). La solubilidad y extractibilidad (rendimiento de un aislado proteínico) a pH neutro o alcalino pueden mejorarse por aumento de la carga eléctrica neta de las proteínas. Esto puede realizarse, por ejemplo, por succinilación o maleilación de los radicales lisil, que resultan así portadores de grupos carboxílicos ionizables. También es posible hacer reaccionar las proteínas con moléculas anfipolares que posean zonas hidrófobas e ionizadas diferentes (dodecil sulfato de sodio, p. ej.). En este caso, los residuos hidrófobos se convierten en asociación con estos

compuestos, en portadores de cargas negativas (Choi y col., 1982; Cheffel y col., 1989).

Compuestos como el 2-mercaptoetanol y el ditioneitol a bajas concentraciones, inhiben la formación de puentes disulfuro entre proteínas con grupo sulfhidrilo libres, reduciendo la polimerización y la insolubilización, la adición de estos compuestos en los medios de extracción incrementa la extracción de proteínas (Córdoba-Salgado, 1995). Los iones de las sales neutras, en un rango de 0.5 a 1 Molar (M), pueden aumentar la solubilidad de las proteínas (efecto "salting-in"). Los iones reaccionan con las cargas de las proteínas y rebajan la atracción electrostática entre las cargas opuestas de grupos próximos. Por otro lado la solvatación, debido a estos iones, permite aumentar la solvatación de las proteínas y por lo tanto su solubilidad. Si la concentración de las sales neutras es superior a 1 M, la solubilidad de las proteínas decrece y puede conducir a una precipitación. Este efecto "salting-out" resulta de la competencia entre la proteína y los iones salinos por las moléculas de agua necesarias para su solvatación respectiva. Con una fuerte concentración salina, no hay bastantes moléculas de agua disponibles para la solvatación de una proteína, porque la mayor parte de agua está fuertemente ligada a las sales. En estas condiciones, las interacciones proteína - proteína resultan más importantes que las interacciones proteína-agua y esto puede conducir a la agregación seguida de la precipitación de las moléculas proteínicas (Cheffel y col., 1989).

Así también, la extracción de las proteínas está influenciada por numerosos factores, p. ej. tamaño de partícula del harina, tratamiento previo en la obtención de las harinas, así como el tiempo de almacenamiento de ésta, temperatura, pH, solvatación, fuerza iónica y relación con la solución extractora. Generalmente, agua, álcali diluido (pH 8), solución salina (0.5 M) en una relación 1:10, a temperatura de 25-30°C representan las condiciones normales para obtener proteínas no desnaturalizadas. La inclusión de agentes tioles (2-mercaptoetanol) en la solución extractora incrementa el rendimiento de proteína (Kinsella, 1979).

2.4) CONCENTRADOS PROTEINICOS

Actualmente no existen valores estandarizados del contenido proteínico de concentrados y aislados de diferentes fuentes proteínicas. Sin embargo, en el caso de granos como el cártamo y la soya, se considera que una harina de alto contenido proteínico debe contener entre 50-60% de proteína total, un concentrado entre 60-80% y un aislado más del 80%. Los concentrados comerciales de soya contienen aproximadamente 70% de proteína cruda o nitrógeno total (NT), evaluada por el método de Kjeldahl, lo que representa una concentración de la proteína del 233%, esto es porque originalmente, el frijol de soya contiene alrededor del 30% de proteína cruda (Soriano-Santos y Córdoba-Salgado, 1995).

El procedimiento más ampliamente utilizado en la preparación de concentrados y aislados proteínicos de leguminosas y oleaginosas es la precipitación isoelectrica (Paredes-López y col.1988), después de una solubilización alcalina (pH 8-10) de las proteínas y remoción del material insoluble por centrifugación, las proteínas precipitan por la adición de un ácido hasta alcanzar el punto isoelectrico. Otro proceso denominado "micelización" para el aislamiento de las proteínas de semillas involucra la precipitación de un extracto en sales neutras por dilución en agua fría. La proteína producida de esta manera posee una estructura micelar antes de secarse; las interacciones hidrofóbicas pueden jugar un papel en la estabilización de los aislados (Córdoba-Salgado, 1995).

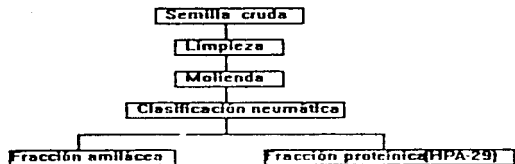
A partir de diferentes fuentes vegetales se pueden obtener concentrados y aislados proteínicos; siendo el frijol de soya hasta ahora, la fuente vegetal que ha rendido las mayores expectativas de uso, los granos de soya son ricos en aceite y proteína, esta última además es de buena calidad, con propiedades funcionales adecuadas para utilizarla como sustituto de proteínas animales en la fabricación de algunos alimentos. A nivel comercial son numerosos los productos que se ofrecen en forma de concentrados o aislados, como complementos nutricionales,

como sustitutos en productos lácteos o derivados cárnicos, todos ellos complementados con concentrados o aislados de soya. Las aplicaciones que han alcanzado las proteínas de soya, en sus diferentes presentaciones, significa al menos, las primeras perspectivas por alcanzar de algún otro grano, considerando los atributos intrínsecos que presente el grano en particular (Kinsella, 1979)

Otra forma de concentrar la proteína de semillas, es mediante la utilización de un proceso de clasificación neumática en la que se da una separación de los materiales a causa de la diferente densidad que se tiene entre las fracciones amilácea y proteínica de las harinas (Chefel y col., 1989), método que es empleado para la obtención de concentrados proteínicos a gran escala, donde la clasificación por aire no modifica el estado nativo de los carbohidratos y las proteínas de reserva del material en proceso (Sanchez-Marroquin y col., 1983)

a) Concentrados proteínicos de amaranto

Como antecedentes del conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de amaranto, se encuentran los estudios realizados por Soriano-Santos (1993, 1994, 1995) y Córdoba-Salgado (1995) en donde una harina proteínica desengrasada de la semilla de amaranto, obtenida por el método de clasificación neumática (Fig. 4), se utilizó para la obtención de diferentes concentrados proteínicos por los métodos de: a) solubilización con agua (pH 7), b) solubilización con NaCl ó Na_2SO_4 a diferentes concentraciones y fuerzas iónicas (μ 0.05-2); c) solubilización con álcali (pH 9, 10 ó 11) y d) modificación química (desde 10% - 110% de succinilación). A los diferentes concentrados proteínicos obtenidos se les evaluaron las propiedades funcionales encontrándose que los concentrados que presentaron un aumento de las propiedades funcionales evaluadas con respecto al original fueron los obtenidos por tratamientos desnaturalizantes.



Soriano-Santos, 1993. Ciencia, 44, 505-515

Figura 4.- Proceso de obtención de HPA-29 (29% proteína) por clasificación neumática

2.5) PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEINAS

El término "propiedad funcional" que se aplica a los ingredientes alimenticios, se puede definir, como toda propiedad no nutricional que influencia la utilidad de un ingrediente en un alimento. Las propiedades funcionales pueden ser afectadas por variables de su entorno fisicoquímico: pH, temperatura, fuerza iónica, métodos de extracción, etc., (Kinsella, 1979). Se ha comprobado que cambios mínimos en la estructura de las proteínas, a través de modificaciones químicas pueden mejorar ciertas propiedades funcionales requeridas para la aplicación en alimentos (Choi y col. 1981).

La mayor parte de las propiedades funcionales influyen sobre las propiedades sensoriales del alimento (en especial, la textura). Las propiedades funcionales de las proteínas, son propiedades fisicoquímicas que le permiten contribuir a las características deseadas de un alimento (Tabla 11).

Tabla 11.- Propiedades funcionales de las proteínas de los granos de importancia en aplicaciones en alimentos.

PROPIEDADES	ATRIBUTOS FUNCIONALES
Sensorial	Color, Olor, Sabor
Hidratación	Humedad, Absorción de agua, Solubilidad, Capacidad de retención de agua
Surfactante	Emulsificación, Espumado, Formación de película lípido-proteína, incorporación de lípidos y de sales
Estructurales y Reológicas	Viscosidad, Elasticidad, Adherencia, Coherencia, Formación de masa, Agregación, Gelación, Formación de redes y fibras, Texturización
Otras	Compatibilidad con aditivos, estabilizantes enzimáticos

Kausella (1979) J AM OIL CHEMISTS SOC, 56, 242-258

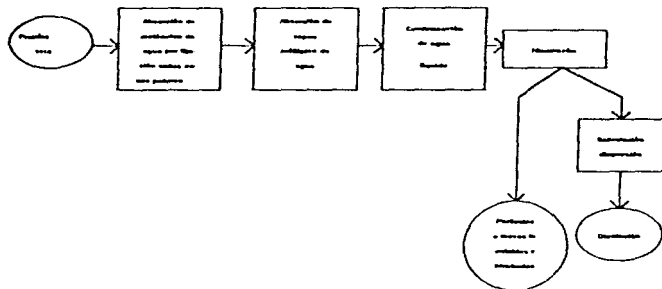
Recientemente dentro de la industria alimentaria ha surgido una rama dedicada a la obtención de ingredientes proteicos, siendo numerosas las empresas que ofrecen una amplia gama de productos proteicos líquidos, concentrados, granulados, congelados, deshidratados, etc., que poseen propiedades funcionales bien definidas (Cheffel y col., 1989).

Como se puede observar en la Tabla 11 las proteínas proporcionan características fisicoquímicas a los alimentos muy amplias, y a continuación se mencionan algunas de esas propiedades funcionales.

a) PROPIEDADES DE ABSORCIÓN:

ai) Capacidad de retención o absorción de agua. La conformación de una proteína en solución depende fundamentalmente de sus interacciones con el agua. Casi todos los alimentos son sistemas sólidos hidratados y el comportamiento fisicoquímico y reológico de las proteínas y los demás constituyentes están influenciados, por la presencia del agua, además de la actividad del agua, por otro lado al utilizar concentrados o aislados secos de proteína, hay que hidratarlos. La

hidratación progresiva de las proteínas a partir de un estado seco puede admitir las etapas sucesivas esquematizadas en la Fig. 5.



Chefel y col., (1989). Proteínas Alimentarias. Acribia. p52.

Figura 5.-Representación esquemática de las interacciones proteína-agua que se producen durante el proceso de hidratación de un polvo proteico.

Naturaleza de las interacciones proteína-agua.

Se pueden distinguir seis clases o estados de agua ligada o asociada a las proteínas, el agua presente en cada uno de esos estados puede determinarse cuantitativamente por algún método físico específico:

i) *El agua de "estructura" o de "constitución"*, ligada a la proteína por los enlaces hidrógeno, que contribuye a estabilizar la estructura de la proteína y no esta disponible como disolvente o reactivo.

ii) *El agua "de la capa monomolecular"*, absorbida en sitios específicos de la proteína (cadenas laterales polares ionizadas o no ionizadas) por intermedios de enlaces hidrógeno o de interacciones dipolo-dipolo. Estas moléculas no estan disponibles como disolventes o reactivos y forman una primera "capa" en torno a la molécula proteica.

iii) *El agua "no congelable"*, que puede determinarse por calorimetria diferencial. Sus fuertes interacciones con la proteina impiden que cristalice durante el proceso de descenso de la temperatura. El agua no congelable incluye el agua de estructura y la de la capa monomolecular. La mayor parte de esta agua se encuentra bajo la forma de "capas" sucesivas, en torno a la proteina. Estas capas estan ligadas las unas a las otras por medio de enlaces hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo. La cantidad de agua no congelable está en relación directa con el contenido de aminoácidos de la cadena lateral polar.

iv) *El agua "capilar o embebida"* que está retenida físicamente entre las moléculas proteicas. Constituye la mayor parte del agua, incluso por los "poros" de los alimentos húmedos, más o menos gelificados, tales como el queso, la carne, etc.,

v) *El agua de hidratación hidrodinámica* que rodea las moléculas proteicas en solución y que durante los movimientos de difusión u otros se desplaza con estas. Se comporta como el agua libre. La esfera de hidratación hidrodinámica puede determinarse por medición de la viscosidad, ya que modifica las propiedades hidrodinámicas de la proteína (densidad, volumen, forma) (Chettel y col., 1989).

Diversos factores, tales como la concentración, pH, temperatura, tiempo, fuerza iónica y presencia de otros constituyentes, afectan a las fuerzas que intervienen entre las interacciones proteína-proteína, y proteína-agua. La mayoría de las propiedades funcionales vienen determinadas por el equilibrio entre estas fuerzas. Las variaciones de pH al modificar la ionización y la carga neta de las moléculas proteicas, alteran las fuerzas atractivas y repulsivas entre proteínas y la capacidad de estas últimas para asociarse con el agua. En el punto isoeléctrico las interacciones proteína-proteína, son máximas y las proteínas asociadas y plegadas sobre ellas mismas, manifiestan el mínimo de hidratación e hinchamiento (Cheffel y col., 1989).

b) SOLUBILIDAD

La solubilización desde un punto de vista termodinámico, corresponde a una disociación de las moléculas de proteína, previa a una dispersión de estas últimas sobre un disolvente, con una superficie interfacial de máximo contacto entre la proteína y el disolvente. Por ejemplo, para que una proteína pueda solubilizarse en agua es necesario que reaccione en todo lo posible, con el disolvente (enlaces hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo e iónicas). La solubilidad depende fundamentalmente del pH, fuerza iónica, tipo del disolvente y temperatura; así los valores de solubilidad pueden variar según el proceso seguido para establecer las condiciones finales de pH, fuerza iónica, temperatura y concentración proteica. La solubilidad bajo distintas condiciones, da una buena indicación de las aplicaciones potenciales de las proteínas. Esto se debe al hecho de que el grado de insolubilidad es, probablemente, la medida más práctica de la "desnaturalización-agregación" proteica y porque las proteínas que existen al comienzo de un estado desnaturalizado, parcialmente agregado, muestran frecuentemente un descenso de capacidad de gelificación, emulsión o formación de espuma (Cheffel y col., 1989; Córdoba-Salgado, 1995).

Frecuentemente la solubilidad proteínica a pH neutro o a pH isoelectrico, son las primeras propiedades funcionales que se muden en cada etapa de preparación o de transformación de un ingrediente proteico. Sin embargo, las pruebas más utilizadas son el índice de solubilidad del nitrógeno (NSI) y el perfil de solubilidad en función del pH, de la fuerza iónica o de un tratamiento térmico (Córdoba-Salgado, 1995)

La solubilidad de la mayoría de las proteínas se reduce en forma irreversible durante el calentamiento. No obstante, los tratamientos térmicos pueden ser indispensables para alcanzar otros objetivos, como la eliminación de microorganismos, de agua, de olores indeseables, etc. Aun los tratamientos más suaves, tales como los que se usan para la extracción o purificación de las proteínas, pueden provocar cierto grado de desnaturalización y de insolubilidad. Así, las harinas de soya, lo mismo que los concentrados y aislados, presentan proporciones de solubilidad de nitrógeno que varían del 10 al 90% (Kinsella, 1979). Por otra parte, no siempre es correcto afirmar que las proteínas deben tener una elevada solubilidad inicial, para que otras propiedades funcionales sean buenas. Por ejemplo, la absorción de agua de un ingrediente proteico puede algunas veces mejorarse con su desnaturalización e insolubilización previa.

c) CAPACIDAD DE EMULSIFICACION

Una emulsión alimenticia es fundamentalmente, un sistema de dos fases que consta de un líquido o lípido plástico (aceites, grasas o ceras o aceites esenciales) y agua. La definición clásica de emulsión dice: "es un sistema de al menos dos fases de líquidos inmiscibles, uno de ellos disperso en finos glóbulos en el otro. En la mayoría de los casos el diámetro de las gotitas líquidas dispersas está comprendido entre 0.1 y 50 μm , con un grado variable de dispersión en torno al valor medio" (Kinsella, 1979).

Una emulsión sencilla de dos líquidos tiende a ser inestable, y si se deja en reposo un corto tiempo, las gotitas dispersas ascienden y se unen para constituir una capa superficial o se depositan y reúnen en un sedimento, según sea la densidad de ambas fases. Esto puede anticiparse debido a que al incrementar el área superficial producida por la dispersión incrementa en gran medida, la energía libre superficial del sistema y con tal incremento en el nivel energético, el sistema es inestable. Por el proceso de coalescencia esta energía libre superficial obtiene un nuevo valor mínimo. La energía libre superficial depende del área superficial (factor de capacidad) y de la tensión interfacial (factor de intensidad).

Obviamente que la energía libre superficial no hace más que incrementarse cuando el área superficial aumenta durante la dispersión. Por lo que si se quiere producir una emulsión estable, es necesario añadir un tercer material llamado estabilizante, los cuales pueden ser divididos en dos categorías, a) moléculas pequeñas b) macromoléculas. El término estabilizador se usa para denotar a aquellos compuestos que no son surfactantes activos pero, que imparten estabilidad a las emulsiones; por la restricción de las interacciones interfaciales, las proteínas forman películas interfaciales, por lo que se han clasificado como emulsificadores, mientras que los polisacáridos, son estabilizadores, aunque hay proteínas que pueden desarrollar ambas funciones (Cheffert y col., 1989).

Las proteínas actúan como surfactantes en muchas emulsiones de alimentos. En la formación de la emulsión, las moléculas de la proteína se difunden y son absorbidas en interfase aceite/agua. La migración de las proteínas de la solución a la interfase es termodinámicamente favorable, debido a que una parte de la energía conformacional e hidratación de la proteína es perdida en la interfase. Una vez en la interfase, la mayoría de las proteínas se desenrollan en diferente grado, se reorientan y reacomodan para formar una película continua adhesiva, donde los segmentos hidrofóbicos se orientan en la fase apolar (aceite), mientras que los segmentos polares, lo hacen en la fase acuosa, además de que la mayor parte de la proteína ocupa la interfase, interactúa con moléculas vecinas impartiendo firmeza

y viscosidad a la película. Las propiedades reológicas y mecánicas de tales películas son importantes en la formación y estabilización de las emulsiones en alimentos y varían con el tipo de proteína, concentración, pH, fuerza iónica, temperatura, por lo que la información concerniente a las propiedades de formación de estas películas es útil para entender las propiedades emulsificantes de las proteínas en los alimentos. Además de la estabilización, las proteínas también sirven para modificar textura, retención de sabor y sobre todo influyen determinadamente en la aceptabilidad de las emulsiones en los alimentos (Franzen y Kinsella, 1976; Chetel y col., 1989; Córdoba-Salgado, 1995).

Tanto la capacidad de emulsificación como la estabilidad de emulsión son usadas frecuentemente en la caracterización funcional de las proteínas. La capacidad de emulsificación se define como la máxima cantidad de aceite que puede ser emulsificada por una dispersión de proteína, mientras que la estabilidad de la emulsión se refiere a la habilidad o la cualidad de la emulsión a permanecer sin cambios. La estabilidad de la emulsión se puede apreciar visualmente por la cremación o separación de aceite (Hermansson, 1979).

Hay varios procesos que pueden presentarse en una emulsión y que pueden causar inestabilidad, entre los que se encuentran los siguientes:

i) **Cremado**: En el cual por diferencia de densidades de los componentes aceite/agua, se presenta la tendencia a la formación de un gradiente de densidad. La velocidad del cremado dependerá de la forma de la gota, la diferencia de densidades entre las fases de aceite y agua y la viscosidad del medio.

ii) **Floculación**: Es un proceso en el cual dos o más gotas se agregan sin perder su identidad. Si bien este proceso modifica las propiedades físicas de la emulsión y especialmente las propiedades reológicas, la distribución del tamaño de las partículas permanece sin cambios. El flóculo se dispersa rápidamente, si las interacciones son débiles, aunque éstas pueden ser fuertes. La floculación de las

emulsiones depende de la naturaleza de la proteína estabilizante y de las condiciones de solución, tales como pH y fuerza iónica (Das y Kinsella, 1990).

iii) **Coalescencia:** Proceso en el cual la colisión de dos o más gotas resulta en la formación de una gota, más grande. El aumento del tamaño produce la separación de las fases aceite/agua. La coalescencia es la principal causa de inestabilidad de las emulsiones, ya que implica el rompimiento de la película interfacial y es irreversible. Varios factores tales como la solubilidad del emulsificador, pH, sales, concentración del emulsificador, relación fase/volumen, temperatura y propiedades de la película, afectan la estabilidad a la coalescencia de las emulsiones (Das y Kinsella, 1990).

Sin embargo, diversos fenómenos tienden a estabilizar las emulsiones, las que a continuación se presentan en la siguiente **tabla 12**.

Tabla 12.- Factores que afectan las propiedades de emulsificación de las proteínas

<u>Factores estabilizantes</u>	
Reducción de la tensión superficial interfacial	Inferior a 5 dinas, debido a la naturaleza de sus fases. Añadiendo tensioactivos
Presencia de una capa interfacial resistente	Película de proteínas adsorbidas, se opone mecánicamente a la coalescencia.
Cargas electrostáticas del mismo signo	Formación de una doble capa difusa de contrasiones. repulsión electrostática que se opone a las interacciones de Van der Waals.
Diámetro pequeño de las gotas y Fuerte viscosidad de la fase continua	Formación lenta de cremas o sedimentación.
Agentes emulsionantes	Surfactantes de polisacáridos o de proteína

Cheffé y col. 1989. Proteínas alimentarias. ed. Acirba, p 79

Generalmente, las proteínas son estabilizantes mediocres de emulsiones agua/aceite. Esto puede atribuirse a la naturaleza fundamentalmente hidrófila de la mayoría de las proteínas, lo que hace que la mayor parte de una molécula proteica absorbida se encuentra en la zona acuosa de la interfase (Cheffell y col., 1989).

d) PROPIEDADES ESPUMANTES

En general las espumas alimenticias son dispersiones de gotas de gas en una fase continua líquida o semisólida que contienen un surfactante soluble. La capacidad de las proteínas para formar espumas estables es debida a la formación de una película impenetrable conformada por proteínas, que mantienen atrapadas moléculas de gas. Estas bajan la tensión superficial entre el aire y el agua, facilitando la deformación y la expansión del líquido contra su tensión superficial. Las proteínas aptas para desarrollar espumado deberán ser solubles en la fase acuosa; concentrarse en la interfase; desenrollarse para formar capas cohesivas de proteína y circundar las burbujas de aire; así como poseer la suficiente viscosidad y fuerza mecánica para prevenir la ruptura y coalescencia de las burbujas. La interfase gas/líquido puede alcanzar 1 m por ml de líquido. Al igual que las emulsiones, se necesita energía mecánica para crear esta interfase. Las burbujas de gas de una espuma pueden variar de tamaño desde un diámetro de 1µm a varios cm, a causa de los numerosos factores involucrados, tales como: la tensión superficial y viscosidad de la fase líquida, el aporte de energía, etc. Habitualmente, una distribución uniforme de burbujas pequeñas, da al alimento suavidad y ligereza, así como un aumento de la dispersión y perceptibilidad de aromas. Una diferencia significativa entre las emulsiones y las espumas, está en el hecho que en estas, la fracción de volumen ocupada por la fase dispersa (gas) varía en la escala mucho mayor que con las emulsiones. Frecuentemente las espumas son inestables, porque tienen mayor superficie de interfase. Existen básicamente tres mecanismos de desestabilización.

i) *Drenado o pérdida del líquido de la lamina líquida por gravedad.* Por la diferencia de presión y/o variación. En las espumas de baja densidad, las burbujas tienden a presionarse estrechamente las unas con las otras, lo que aumenta la pérdida del líquido de las laminillas. Tensiones interfaciales bajas y diámetros de burbujas grandes disminuyen la presión interna y pérdida del líquido. Esto se produce durante la formación de la espuma, continuando la salida de los líquidos, lo que aumenta más el valor al nivel de expansión y reduce el espesor y resistencia en las laminillas líquidas. La pérdida del líquido se reduce cuando la fase líquida es viscosa (lo que se puede conseguir con la adición de azúcar) y ocurre también cuando es alta la viscosidad de la película de proteínas absorbidas. Esta viscosidad depende de la intensidad de las interacciones proteína/proteína y proteína/agua.

ii) *Difusión de gas* de las burbujas pequeñas hacia las burbujas grandes, difusión que es posible por la disolución de gas en la fase acuosa.

iii) *Ruptura de la laminilla líquida que separa las burbujas de gas*, ésta ruptura provoca un aumento del tamaño de las burbujas por coalescencia y conduce, en definitiva a un derrumbe de la espuma. Existe una interdependencia entre la pérdida de líquidos y la ruptura, porque ésta última aumenta la salida de líquidos y esto puede reducir el espesor y la resistencia de las laminillas. También surge la ruptura cuando las dos películas proteínicas absorbidas se aproximan la una a la otra a una distancia de unos 50 a 150 Å, como resultado de la pérdida de líquidos o por un debilitamiento del producto de las coaliciones. No se sabe si a estas distancias son importantes las repulsiones electrostáticas y/o las atracciones moleculares entre las dos películas proteicas absorbidas. Finalmente se sabe que cuando las películas absorbidas son espesas y elásticas, estas presentan una mayor resistencia a la ruptura (Cheffel y col., 1989). Por otra parte hay factores que contribuyen a estabilizar las espumas de las proteínas (Tabla 13)

Tabla 13.- Factores que afectan las propiedades espumantes de las proteínas.

<u>Factores estabilizantes</u>	
Viscosidad superficial	Desnaturalización y asociación de las proteínas
Concentración	Solubilidad, velocidad de difusión, en fase dispersa
Doble capa eléctrica	La repulsión afecta los iones ahines, en solución
pH	Teóricamente óptimo cerca del pH isoelectrico
Surfactantes complementarios	Otras proteínas, polisacáridos (no lípidos)
Desnaturalizantes	Una desnaturalización limitada puede ayudar a la formación de la película

Kinsella, 1979 JAOCS, 56, 242-258

2.6) ALTERACIONES DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES

Las proteínas utilizadas normalmente como ingredientes alimenticios sufren durante su preparación y empleo distintos tratamientos físicos y químicos. Por lo general, durante su extracción y purificación se trata de no alterar sus propiedades estructurales y funcionales, sin embargo las proteínas aisladas pueden modificarse deliberadamente para mejorar así sus propiedades o darles otras. Además, de que después de su incorporación al alimento final, las proteínas aún pueden sufrir otras modificaciones (Chefftel y col., 1989; Kinsella, 1979).

2.7) MODIFICACIONES QUIMICAS ESPECIFICAS.

La estructura primaria de las proteínas pueden modificarse químicamente para mejorar sus propiedades funcionales. La introducción de grupos carboxilos ionizables puede realizarse por acilación con anhídridos internos de ácidos dicarboxílicos (succinilación, malcilación , etc.) (Fig. 6).

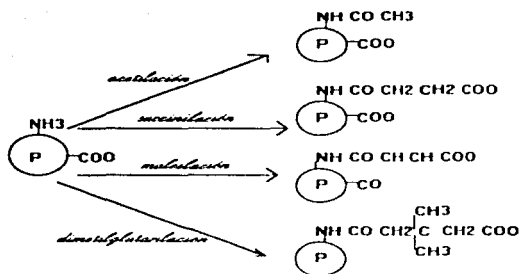


Figura 6.- Principales cambios en proteínas por varias modificaciones químicas. (Choi y col. 1983, J. Food Sci. 48, 1275-1278)

La succinilación de una proteína convierte los grupos catiónicos amino a residuos aniónicos, el incremento en la carga neta negativa producida por el anión succinato altera el carácter fisicoquímico de la proteína, lo que implica un mejoramiento de la solubilidad en soluciones acuosas y consecuentemente en cambios de la capacidad de emulsificación y espumado. En su trabajo, Córdoba Salgado (1995) explica en teoría el incremento de la solubilidad acuosa observada que tiene la succinilación y acetilación de la proteína de soya. La presencia de cargas negativas adicionales motiva la repulsión electrostática, el desdoblamiento y la disociación. Estas cargas negativas suplementarias, mejoran la solubilidad y/o la dispersibilidad, incluso a un pH isoeléctrico.

Aunque la succinilación de todos los grupos nucleofílicos es posible, los grupos amino e hidróxilo de una proteína son rápidamente acilados en comparación con otros residuos aminoácidos disponibles para la reacción. Los grupos fenólicos de

la tirosina, sin embargo, tienen generalmente un pK más alto y están usualmente mejor protegidos de la reacción que los grupos amino. Los grupos hidroxilo de la serina y la treonina son nucleófilos débiles y no son fácilmente acilados en solución acuosa. La mayoría de los agentes acilantes reaccionan más rápidamente con los grupos amino, los grupos ϵ -amino de la lisina son más susceptibles a ser acilados debido a su relativamente bajo pK y su disponibilidad estérica para la reacción (Córdoba Salgado, 1995).

Aunque se han estudiado diferentes modificaciones de varios grupos aminoácidos, poco se ha reportado en relación a la extensión y naturaleza eléctrica del grupo acilante sobre el efecto de este en las propiedades funcionales ya citadas. Choi y col. (1982) al modificar harina de algodón con diferentes agentes, encontraron una amplia gama de resultados, las modificaciones efectuadas, maleilación, succinilación y dimetilglutarilación incrementaron la extracción de proteínas, lo que se reflejó en una alta solubilidad de los materiales obtenidos, en tanto que con la acetilación del material, estas características se vieron parcialmente afectadas. No obstante que la acetilación reduce las cargas positivas de la proteína, al añadir grupos hidrofóbicos cargados neutralmente, a los grupos ϵ -amino cargados positivamente, los restantes grupos acilantes incrementan los grupos acilos hidrofílicos cargados negativamente en la proteína (Córdoba Salgado, 1995).

La estructura de las proteínas succiniladas resulta de su alta carga neta y el reemplazo de las fuerzas atractivas de corto alcance o longitud por fuerzas repulsivas del mismo alcance o longitud que provocan un subsecuente desdoblamiento de las cadenas polipeptídicas. De esta manera en aislados de soya las interacciones electrostáticas entre los grupos amonio (NH_3^+) y carboxilo mejora la interacción proteína-proteína, lo cual abate la solubilidad, en una succinilación a valores neutros, sin embargo los cationes amonio de la lisina son reemplazados por aniones succinato (Cheftel y col., 1989).

2.8) MODIFICACION ENZIMATICA

Para conseguir un mejor conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas alimenticias, se utilizan algunas modificaciones enzimáticas en las cadenas polipeptídicas. Las reacciones que comúnmente catalizan las enzimas son descritas en la Tabla 14.

Tabla 14.- Clasificación de las enzimas y subclasificación de enzimas proteolíticas

Clases	Grupo que afecta	Ejemplos
Oxidoreductasas	CHOH	Lactato deshidrogenasa
	CH-CH	Acil-CoA deshidrogenasa
	CH-CH ₂	Aminoácido oxidasa
Transferasas	Metilo	Guanidinacetato metiltransferasa
	Hidroximetilo	Serina hidroximetiltransferasa
	Acil	Colina acetiltransferasa
	Amino	Transaminasa
Hidrolasas	Ester carboxílico	Esterasa, lipasa
	Monóester fosfórico	Fosfatasa
	Diéster fosfórico	Ribonucleasa
	Enlace glucosídico	Amilasa
	Enlace Peptídico	Específico de la enzima utilizada
Liasas	C-C	Aldolasa
	C-O	Fumarato hidratasa
Isomerasas	Aldosa-Ketosa	Fosfoglucoisomerasa
Ligasas	Forma enlaces C-O	Enzima en específico
	Forma enlaces C-N	Glutamina sintetasa
	Forma enlaces C-C	Acetil CoA carboxilasa

Franks, 1988. Characterization of proteins. The Humana Press. p1-24

De estas, la hidrólisis es la reacción más simple; involucra solamente la división de los enlaces covalentes por agua. Las hidrolasas son enzimas sencillas y fáciles de inmovilizar, usualmente contienen una cadena peptídica (ej. lisozenzima, ribonucleasa) de relativo peso molecular bajo (Franks, 1988).

Las enzimas se unen específicamente a un sustrato a través de interacciones geométricas físicas complementarias. Esto permite a las enzimas ser absolutamente específicas, tanto en la unión al sustrato, como a la catálisis de la reacción. El sustrato proteínico experimenta una hidrólisis parcial sobre los enlaces peptídicos para alterar la funcionalidad de la proteína. Hay también otras dos formas de acción de las enzimas hidrolíticas, una es la producción de enlaces intra o inter cruzados moleculares, este entrecruzamiento puede ser utilizado para inducir a coagulación, la gelación, la alteración en textura y el incremento de la viscosidad de la proteína en solución. La otra es el ataque a grupos químicos específicos de la proteína como son los aminoácidos esenciales que incrementan la calidad nutritiva o bien incorporan hidrofobicidad o hidrofiliidad a aminoácidos que proporciona a la proteína un carácter anfifílico. Las ventajas que pueden ser reconocidas con el uso de las enzimas son su especificidad, condiciones sencillas de manipulación y baja concentración requerida para realizar la reacción (Jiménez-Flores, Richardson, 1986; Franks, 1988 ; Whitaker, 1977)

Una enzima conocida por su elevada especificidad es la tripsina (Tabla 15), la cual es una enzima digestiva secretada por el páncreas al intestino delgado, solo cataliza la hidrólisis de aquellos enlaces peptídicos en que la función carbonilo es aportada por lisina o por arginina, con independencia de la longitud, la tripsina no cataliza el rompimiento si el residuo del lado del C es prolina.

La α -quimotripsina es menos específica que la tripsina, ésta hidroliza enlaces peptídicos donde el grupo carboxilo (-COOH) es aportado por los aminoácidos aromáticos, tales como el triptófano, la tirosina y fenilalanina o por un grupo R voluminoso no polar como la metionina, asparagina, entre otros. La renina hidroliza a pH 5-7 en específico al enlace peptídico fenilalanina-metionina de la κ -caseína. La fuerza de ese enlace peptídico en específico es suficiente para destruir la habilidad de la κ -caseína de estabilidad de las micelas de la caseína, ocasionando la formación de un coágulo de paracaseína (Toporek, 1985; Whitaker, 1977).

Tabla 15.- Enzimas proteolíticas

Fuente	Enzimas	Especificidad
Mamífero	Tripsina	R ₁ arg, his
	Quimotripsina	R ₁ fen, tir, trp, met
	Pepsina	R ₂ fen, tir, trp
	Probdasa	R ₁ o R ₂ - glicina
	Carboxipeptidasa A	R ₂ - Cualquier aminoácido excepto arg, his, pro
	Carboxipeptidasa B	R ₂ - arg, his
	Iminopeptidasa	desprende prolina
Vegetal	Leucina aminopeptidasa	R ₁ - Cualquier aminoácido excepto pro, gl
	Aminopeptidasa M	No específica ^a
	Papaina	No específica ^a
	Ficina	No específica ^a
Bacteriano	Carboxipeptidasa C	Se desconoce
	Subtilisina*	No específica ^a
	Nagarasa*	No específica ^a
	Uronasa	No específica ^a

* se usan nombres comunes comercial. ^a La mayor parte de las enzimas son inactivas hacia el eslabón de imida de prolina y el ataque a péptido de glicina es muy bajo
 Franks, 1988. Characterization of proteins. The Humana Press p1-24

La aplicación de enzimas hidrolíticas es un atractivo medio de obtener el mejoramiento de las propiedades funcionales de las proteínas sin deteriorar el valor nutritivo (Chellel, 1989). La degradación de la proteína a péptidos generalmente rinde un producto más soluble. Las propiedades funcionales tales como el sabor, la viscosidad, la emulsificación y el espumado se ven afectados (Márquez-Moreno, Fernández-Cuadrado, 1993; Kinsella, 1985). La modificación enzimática es representada a través de proteólisis limitadas. Puski (1975) investigó la funcionalidad de aislados proteínicos de soja hidrolizados con proteasas del *Aspergillus oryzae*, variando las velocidades de enzima-sustrato. Algunos de los efectos de la modificación enzimática por proteólisis a algunas proteínas de origen vegetal se presentan en la **Tabla 16**. Diversas son las modificaciones a las proteínas de soja que han sido estudiadas. Esas proteínas son de gran importancia por su bajo costo y su alto valor nutritivo

Tabla 16.- Hidrólisis enzimática de proteínas vegetales y su efecto sobre su funcionalidad.

Sustrato	Enzima	Propiedad Funcional
Concentrado de soya	Tripsina	Buena solubilización, incremento en la viscosidad y estabilidad de emulsión, en el volumen y estabilidad de espuma, pero cuando se utiliza para salchichas decrece la firmeza y estabilidad en la cocción.
Grano de soya y 11s glubulina	Bromelina	Se induce la gelación térmica con la reacción de la bromelina por 15 min. Algunas de las polimerizaciones via enlace disulfuro son observadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.
Concentrado de avena	Tripsina	Incremento en la capacidad y estabilidad de emulsificación, capacidad de hidratación, y espumado; disminución en la capacidad de absorción de aceite.
Grano de colza	Pepsina, Tripsina, ó Pápaina	Hidrólisis de la harina seguida de una ultrafiltración secando el material con nitrógeno, se tiene un radio neto de proteína y un coeficiente de digestibilidad aparente similar al de la caseína.
Haba	Termitasa proteasa <i>Thermocardinomyces vulgaris.</i>	Dependiendo del grado de hidrólisis, se incrementa la solubilidad, la coagulación por calor, la capacidad de espumado y la absorción de agua; así mismo, la capacidad de emulsificación y la estabilidad de espumado no se ven afectados.

Jiménez-Flores, Richardson, (1986). Deptment. Food Sci & Technol, University California, USA.

III.- MATERIALES Y METODOS

A continuación se presenta el diagrama metodológico (Figura 7) seguido en este estudio y posteriormente se explica a detalle la metodología de cada bloque:

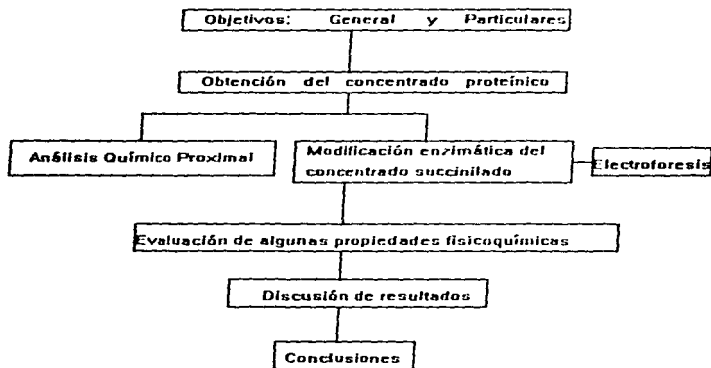


Figura 7: Diagrama metodológico general

3.1) CONCENTRADO PROTEINICO DE AMARANTO.

La semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) utilizada en este estudio fue procesada por San Miguel de Proyectos Agropecuarios S.P.R. de R.S. para obtener una harina rica en proteína. Esta harina (HPA) se desengrasó por el método recomendado por Soriano-Santos y col. (1992), obteniendo harina protéinica de amaranto desengrasada cuyo contenido protéinico fue del 29% (HPAD-29). Posteriormente se procedió a la solubilización de las proteínas contenidas en esta harina para la obtención de un concentrado protéinico de amaranto.

3.2) PREPARACION DE EL CONCENTRADO PROTEINICO POR EL METODO DE SUCCINILACION (CPM).

Para la preparación del concentrado protéinico se siguió el método utilizado por Soriano-Santos y Córdoba-Salgado (1995).

Se preparó una solución al 10% (p/v) de HPAD-29 en agua destilada, se ajustó a pH de 8.5 con NaOH al 40%. Una vez alcanzado el pH deseado, se adicionó anhídrido succínico en una relación del 50% del contenido de proteína cruda del HPAD-29. Una vez adicionado el anhídrido se mantuvo en agitación por 1 hr. Se centrifugó a 5000 rpm durante 20 min. Se recuperó el sobrenadante y se ajustó el pH a 4.0, utilizando HCl al 10%; la agitación se mantuvo hasta el final de la operación. Se centrifugó nuevamente a 5000 rpm durante 20 min. Finalmente se recuperaron los precipitados y se secaron en la estufa a 40 °C por 12 hr., se pulverizaron y se guardaron en frasco color ambar manteniéndolo en un desecador, hasta su análisis.

3.3) ANALISIS QUIMICO PROXIMAL. Una vez obtenido el concentrado proteínico por succinilación se procedió a efectuar el análisis químico proximal (AQP) de acuerdo a los métodos estándares aprobados por la AOAC (1980). En la **Tabla 17** se resumen las técnicas utilizadas para cada prueba del AQP.

Tabla 17.- Análisis Químico Proximal (AQP)

Análisis	Método	Condiciones
Humedad	Estufa	T ^o 65°C, t 6 hr.
Cenizas	Calcinación	T ^o 550°C, t 6 hr.
Proteína	Kjeldahl	f _e = 5.85
Grasa	Sohxlet	t _{extracción} = 5 hr. residuo T ^o 80°C, t 0.5 hr.
Fibra Cruda	Kennedy	residuo T ^o 550°C, t 1 hr.
Carbohidratos	Por diferencia	

T^o=temperatura; t= tiempo

3.4) MODIFICACION ENZIMATICA PROTEOLITICA.

La modificación enzimática se realizó según Sook y col. (1990). Se prepararon diversas soluciones de CPM a la concentración deseada en peso/volumen. Aparte se disolvió la enzima en agua a temperatura ambiente para obtener una solución de concentración conocida.

La metodología usada para realizar la modificación enzimática al CPM se representa esquemáticamente en la **Fig. 8**.

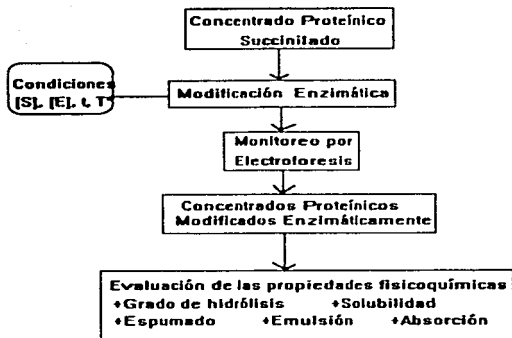


Figura 8.- Metodología seguida para la modificación enzimática del CPM con α -quimotripsina o tripsina.

Las concentraciones ensayadas para la tripsina estuvo comprendida en un intervalo de 0.25 a 2.0 % peso/peso (p/p); en tanto que para la α -quimotripsina fue de un intervalo de 0.25 a 0.5 % p/p. La concentración ensayada de sustrato para la tripsina estuvo comprendida en un intervalo de 5 a 20% p/p, con un total de 10 niveles ensayados; mientras que para α -quimotripsina sólo se ensayaron las concentraciones de 5 y 7% p/p, con un total de 4 niveles (Tabla 18).

Tabla 18.- Concentración de enzima-sustrato ensayadas para la modificación del CPM.

	Sustrato (CPM)	Enzima
	% peso-peso	
Tripsina	20	2.0
	15	2.0
	10	2.0
	10	1.5
	10	1.0
	10	0.8
	7	0.5
	5	0.25
	5	0.5
	5	0.25
	5	0.5
α-quimotripsina	7	0.5
	5	0.37
	5	0.5
	5	0.25

Posteriormente se establecieron las condiciones de T° y pH (Tabla 19), las cuales son las necesarias para la activación a la proteólisis de la enzima en específico; tiempo (5, 10 y 15 min.), concentración de enzima y sustrato.

Tabla 19.- Condiciones ensayadas para la activación e inactivación de las enzimas usadas para la modificación del CPM.

Enzima	Reacción		Inactivación	
	pH	T° (°C)	T° (°C)	t (min.)
Tripsina	8.0	37	87	5
α-quimotripsina	8.0	37	87	5

Sook y col., (1990). J. Agric. Food Chem. 38, 651-656.

El ajuste de pH se hizo con NaOH al 40%, mientras que para la temperatura se utilizó un baño maría. Se adicionó la enzima a la suspensión de CPM en proporción de una concentración en % peso enzima peso de proteína contenida en el CPM. Se incubó a baño maría a la temperatura de reacción según la enzima a utilizar, a tres diferentes tiempos de exposición a la hidrólisis los cuales fueron de 5, 10 y 30 minutos. Después de transcurrido el tiempo señalado de incubación se procedió a la inactivación por temperatura de la enzima respectivamente. Se enfrió la muestra y se neutralizó con peróxido de hidrógeno grado analítico. Finalmente se guardó a 0° C hasta su análisis. Para la evaluación de los diferentes tratamientos enzimáticos sobre las proteínas del CPM, se tomaron alícuotas de cada tratamiento y se aplicaron a geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio. Donde una vez que se obtuvo la modificación enzimática deseada, las muestras se secaron por completo en una estufa de vacío a la temperatura de 60 °C, se guardaron en recipientes herméticamente sellados y etiquetados en refrigeración hasta su uso. Todas las enzimas fueron proporcionadas por Sigma Chemical Co (St Louis Mo).

3.5) ELECTROFORESIS (PAGE-SDS)

La alteración o modificación de las proteínas que ocurrió durante la proteólisis por tratamiento enzimático se determinó por electroforesis (Sistema Laemmli, 1970); en geles de poliacrilamida (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.), elaborados con un gradiente lineal de 10-20% de acrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.).

Las concentraciones y los volúmenes empleados para la elaboración de los geles se describen en el Anexo 1. El equipo de electroforesis utilizado es de marca Hoefer Sn Feo. Cal..

La técnica usada para la elaboración de los geles se realizó de acuerdo al manual de . Las soluciones de acrilamida y entrecruzador junto con el buffer

correspondiente se mezclan en las cantidades indicadas en el anexo 1 : la mezcla se hizo lentamente, para evitar la formación de burbujas, inmediatamente se agregó la solución de persulfato de amonio y TEMED. Para la elaboración de los geles (0.75 mm. de espesor) se utilizó un sistema de drenado especial que incorporó a las soluciones del 10 y 20% (para formar el gradiente lineal) con un flujo de 5ml/min. Se dejó gelificar (1.5 hr) y antes de que la polimerización hubiese terminado se roció una película de agua sobre la superficie del gel para evitar la formación de un menisco, ya formado el gel se drenó el agua de la superficie, posteriormente se preparó el gel de separación y se vació con una jeringa, se colocaron los peines y se dejó polimerizar.

Preparación de la muestra : La muestra se disolvió en una solución compuesta con SDS, glicerol, mercaptoctanol y azul de bromofenol; de tal manera que la concentración de la proteína esté entre 50 y 100 microgramos por 50 microlitros y para desnaturalizar la proteína muestra se pone a baño maria en ebullición por 2.5 min. Se depositó la muestra de acuerdo al mapeo planeado, se aplicaron 100 μ l de cada una de las muestras seleccionadas. Para la determinación del peso molecular de los diferentes polipéptidos se aplicaron muestras de 30 μ l de una mezcla conocida como Dalton Mark (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.) (Tabla 20).

Tabla 20.- Composición Dalton Mark de aplicación en electroforesis .

Polipéptido	Peso Molecular (Dalton)
α -lactoalbúmina	14,200
Tripsina inhibidor	20,100
Tripsinógeno	24,000
Anhidrasa carbónica	29,000
Glicerol-3-p-deshidrogenasa	36,000
Albúmina de huevo	45,000
Albúmina bovina	66,000

El sistema se trabajó a corriente constante de 30 mAmpere por gel. Cada corrida duró entre 4.0- 5.5 hrs. Posteriormente los geles se colocaron en una solución

teñidora de azul brillante de Commasie R-250 (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.), en una concentración de 0.125% p/v en una mezcla de etanol al 50%, ácido acético glacial (10 : 1 v/v), por espacio de 12 hrs. Después se lavaron los geles con agua y finalmente se depositaron en una solución decolorante de ácido acético glacial, etanol y agua (1.5 : 1 : 7.5 v/v/v).

a) Determinación de los pesos moleculares:

Para determinar los pesos moleculares (P.M.) de los diferentes polipeptidos en los geles de poliacrilamida, se recurrió a la movilidad relativa de la proteína (Rf) Hoefer Scientific Instruments (1990). El estándar de proteínas de peso molecular conocido se coloca para la electroforesis en el carril 1, y una grafica de logaritmo de peso molecular de las proteínas conocidas contra la movilidad o migración relativa (que es la relación que hay entre la distancia recorrida por la muestra y la distancia recorrida por cada marcador de proteína de peso molecular conocido) durante la electroforesis, permite hallar el peso molecular de la proteína desconocida (Lehninger, 1990).

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la banda seleccionada}}{\text{Distancia total recorrida por la muestra}}$$

La distancia que se mide comprende donde se inicia el gel de separación hasta el avance final de la curva que formó el azul bromofenol. Con los Rf obtenidos de los polipéptidos de peso molecular conocido (tabla 20), se elaboró una curva patrón en la cual por interpolación de los Rf de los polipéptidos problema se conoció el peso molecular relativo de estos, mediante la ecuación:

$$\log P.M. = m(Rf) + b.$$

3.6) GRADO DE HIDROLISIS (G.H.)

El nivel del rompimiento de los enlaces peptídicos de una proteína por tratamiento enzimático proteolítico se puede determinar por mediciones del contenido de nitrógeno soluble en una solución de ácido tricloroacético (TCA) al

10%. A esta medición se denomina grado de hidrólisis y en este trabajo se realizó según Yamashita (1970) y Edwards & Shipe (1978), con la modificación en el tiempo de agitación (5 hr.) . Se preparó una suspensión al 1% (p/v) de CPM, se tomó una alícuota de 1 ml y se ensayó para determinar el contenido de nitrógeno por el método de Kjeldahl, siendo éste el nitrógeno total (NT) contenido en la muestra original CPM. Posteriormente 10 ml. de una suspensión acuosa de CPM modificado por la enzima al 1% p/v, se mezclaron con 10 ml. de TCA al 20% y se puso en agitación por 3 hrs. a temperatura ambiente (20°C), se sometió a centrifugación a 3000 rpm durante 15 min. (Centrifuga Sorvall RC-5) y el sobrenadante se ensayó por el método de kjeldahl, siendo este el nitrógeno soluble en TCA del CPM modificado enzimáticamente. Por lo que el % de grado de hidrólisis se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\%GH = \frac{\text{Nitrógeno soluble en TCA al 10\%}}{NT} \times (100)$$

El %GH del tratamiento se calculó de la diferencia del %GH del CPM sin modificar y el % GH del concentrado modificado enzimáticamente, como se ilustra en la siguiente expresión:

$$\%GH_{\text{trat}} = (\%GH \text{ del CPM}) - (\%GH \text{ modificados con enzima})$$

3.7) EVALUACION DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES

Se evaluaron diferentes propiedades funcionales del CPM y de los concentrados proteínicos modificados enzimáticamente a los diferentes tiempos de hidrólisis 5, 10 y 30 min. Las propiedades funcionales que se evaluaron fueron:

a) Solubilidad de Nitrógeno

Se preparó una suspensión al 1% (p/v) de concentrado en agua destilada y se ajustó en una serie de pII de 2, 4, 6, 8, y 10 con NaOH o HCl (0.1). La

suspensión en el pII deseado se mantuvo en agitación por 30 min. a temperatura ambiente (20°C). Las suspensiones se centrifugaron a 5000 x g durante 15 min. (Centrifuga Sorvall RC-5). El contenido de proteína solubilizada se evaluó por el método del colorante ligado a la proteína (Bradford, 1976), previa elaboración de una curva patrón con albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.). Todas las pruebas se hicieron por triplicado

b) Capacidad de absorción de agua o aceite

La metodología utilizada (Wang & Kinsella, 1976) para ambas evaluaciones fue similar, excepto la cantidad de aceite (3 ml) o agua (5 ml.) utilizadas. A 0.5 gr. de concentrado se le añadió la cantidad de agua destilada o aceite de girasol comestible comercial (1,2,3) respectiva ya antes mencionada y se sometió a máxima homogenización por dos min. y posteriormente a 30 min. de reposo, enseguida se centrifugaron a 1660 x g durante 25 min. posteriormente se midió la cantidad de agua o aceite no absorbida por el material y por diferencia de volumen con el original se obtuvo la cantidad de agua o aceite absorbido, la cual se expresó como ml. de agua o aceite absorbido por gramo de material.

c) Actividad y Estabilidad de Emulsificación

Formación de emulsión: Esta se realizó según Córdoba-Salgado (1995). Se preparó una suspensión 2.5% (p/v) de concentrado de agua destilada. Previo a la formación de la emulsión, la suspensión se ajustó a una serie de pII de 2, 4, 6, 8 y 10, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min. y se tomaron volúmenes iguales del sobrenadante la suspensión y de aceite de girasol comercial (1,2,3), y se homogeneizaron a máxima velocidad 20000 rpm con un homogenizador Ultra Turrax Junke Ika-werk durante 1 min.

Actividad de Emulsificación: Una vez formada la emulsión, está se sometió a centrifugación a 1300 x g durante 5 min. La actividad de emulsificación se

obtuvo midiendo la altura (a la que se denominó H) de la emulsión y la altura (H₁) de la capa emulsificada que permanece después de la centrifugación (Wang y Kinsella, 1976). Ambos términos se relacionaron de la siguiente manera:

$$\% \text{Actividad de Emulsificación} = \frac{H_1 \text{ de emulsión después de centrifugar}}{H \text{ inicial de la emulsión}} \times (100)$$

Estabilidad de emulsificación: Una vez formada la emulsión, se sometió a baño maría por 30 min. a 80°C, posteriormente se enfrió a chorro de agua hasta 15°C, se centrifugó a 1300 x g durante 5 min. Para la evaluación de la estabilidad se midió la altura (H) de la emulsión antes del tratamiento térmico y la altura (H₂) remanente de la centrifugación, ambos términos se relacionaron en la expresión:

$$\% \text{Estabilidad de Emulsificación} = \frac{H_2 \text{ de la capa remanente de emulsión}}{H \text{ Altura inicial de la emulsión}} \times (100)$$

e) Actividad y Estabilidad de Espumado

Estas propiedades se midieron según Paredes-López (1988) con algunas modificaciones (en la velocidad: 12000rpm y en el tiempo: 60 seg.). Se partió de una suspensión al 1% (p/v) de concentrado. La suspensión se ajustó a una serie de pH de 2, 4, 6, 8 y 10. 50 ml. de suspensión a pH deseado se sometieron a homogenización en un Ultra Turrax (T25 Janke & Kunkel) a una velocidad de 13500 rpm durante 90 segundos, posteriormente se midió el volumen de la espuma desarrollada, la capacidad de espumado se expresó de la siguiente manera.

$$\% \text{Capacidad de Espumado} = \frac{\text{Vol. desp. mezclar} - \text{Vol. antes mezclar}}{\text{Vol. antes mezclar}} \times (100)$$

Una vez que se formó la espuma y se evaluó la actividad de espumado, la misma muestra sirvió para evaluar la estabilidad, la cual se midió dejando

reposar por 30 min. la muestra con la espuma desarrollada, luego de este lapso se midió el volumen de la espuma remanente. La estabilidad de espumado se expresó de la siguiente manera.

$$\% \text{Estabilidad de Espumado} = \frac{(\text{Vol. desp. reposo} - \text{Vol. inicial})}{(\text{Vol desp. mezclado} - \text{Vol. inicial})} \times (100)$$

3.8) ANALISIS ESTADISTICO

El número de repeticiones por tratamiento fue de un mínimo de tres y en algunos casos se evaluaron un máximo de 5 repeticiones como es el caso de la solubilidad de nitrógeno y la absorción de agua y aceite. Los resultados de cada prueba se analizaron por ANOVA de una vía, según el tipo de prueba, además del análisis de Duncan, también se realizó análisis de regresión lineal simple, por medio del paquete computacional SAS (Statistical Analytical System).

El análisis de Duncan se realizó para cada pH, de acuerdo al tipo de prueba estudiada. Por lo que para una mejor comprensión de las tablas de resultados de los diferentes tratamientos, estos se analizan por columna o a un mismo pH.

IV RESULTADOS Y DISCUSION

4.7) CARACTERISTICAS QUIMICAS DEL CONCENTRADO PROTEINICO OBTENIDO POR SUCCINILACION

El rendimiento obtenido del concentrado proteínico por succinilación fue del **29.38% ± 2.53**. El resultado del AOP realizado al CPM se presenta en la siguiente Tabla, donde se compara con la harina de semilla de amaranto obtenida por clasificación neumática (HPA) y del HPA desengrasado (HPAD)

Tabla 21.- Analisis quimico proximal de la harina de semilla de amaranto obtenida por clasificación neumática (HPA), del HPA desengrasado (HPAD) y del concentrado proteínico obtenido por succinilación (CPM).

COMPONENTE	HPA ²		HPAD ²		CPM	
	B.H. ¹	B.S. ¹	B.H.	B.S.	B.H.	B.S.
HUMEDAD	2.0 ± 0.0 ¹		8.2 ± 0.0		4.67 ± 0.01	
PROTEINA	24.3 ± 0.7	26.76	26.3 ± 0.4	28.60	52.46 ± 1.52	55.02
GRASA	9.8 ± 0.0	10.79	0.8 ± 0.0	0.87	2.45 ± 0.20	2.59
CENIZAS	7.5 ± 0.0	8.26	8.2 ± 0.0	8.93	3.02 ± 0.03	3.17
FIBRA CRUDA	9.8 ± 0.0	10.79	10.3 ± 0.0	11.20	3.01 ± 0.54	3.15
CARBOHIDRATOS	39.4	43.39	46.2	50.30	34.39	36.07

(1) Los resultados son la media ± la desviación estándar de tres réplicas.

(2) Soriano-Santos y col. (1993).

(3) BH y BS corresponden a base húmeda y base seca respectivamente.

Como se puede observar existen diferencias importantes en las composición del HPAD y el CPM. El CPM presentó bajo contenido de humedad (4.67 %). La cantidad de agua presente depende del método de secado realizado durante la succinilación. El contenido proteínico obtenido en el CPM aumenta en un 199.5% con respecto al HPAD, la razón de proponer la obtención de un concentrado de harina de semilla de amaranto, a partir de una harina obtenida por clasificación neumática se debe a la complejidad que existe para concentrar las proteínas de la semilla de amaranto, a consecuencia de su bajo contenido de

proteína. Hasta el momento no existen valores de referencia del contenido proteínico de concentrados y aislados obtenidos de diferentes fuentes vegetales. Se sabe que para el cártamo y la soya se considera que una harina de alto contenido proteínico oscila entre el 50-60%, un concentrado entre 60-80% y un aislado más del 80% de proteína cruda. Debido a que los concentrados comerciales de soya contienen aproximadamente el 70% de proteína cruda o Nitrogeno total (NT), evaluada por el método de kjeldahl (Whitaker y Tannenbaum; 1977), los concentrados de semilla de amaranto deberan presentar aproximadamente el mismo contenido. Originalmente, el frijol de soya contiene alrededor del 30 % de proteína cruda o NT, en comparación al 16% que contiene la semilla de amaranto. Comparativamente, el HPA aporta tan solo el 81% de la proteína que contiene el frijol de soya, lo cual representaría una desventaja para la comercialización del HPA. De igual forma, un aislado comercial de soya contiene alrededor del 90% de proteína cruda , por lo que se esperaba que un aislado comercial de semilla de amaranto tuviese un contenido similar. Con el propósito de dar mayor eficiencia al proceso de aislamiento del nitrógeno de la semilla de amaranto, un paso intermedio de la concentración de nitrógeno es el de obtener un material con un mayor contenido de proteína cruda comparable al frijol de soya, lo cual se ha logrado mediante el sistema de clasificación neumática, donde no hay modificación significativa de las proteínas nativas (Soriano-Santos y Córdoba-Salgado, 1995).

Aunque el contenido de proteína obtenido con la succinilación es menor al compararlo con un concentrado de soya, se puede considerar como concentrado; otorgado por el incremento de 16% a 26.3 %, hasta el 52.46 % de proteína obtenida del grano, HPAD y CPM respectivamente. Se sabe que la importancia de las proteínas de amaranto reside en su contenido de lisina, en un estudio de Delahaye y Gómez (1987), reportaron que modificando con 0.3 g. de anhídrido succínico/ g. de proteína de harina de amaranto lograron modificar en un 42% al grupo ϵ - amino terminal de la lisina. Este antecedente puede indicar una posible pérdida de la calidad nutritiva original que presentan las proteínas del grano de amaranto.

Con lo que respecta a los componentes restantes: cenizas, grasa, fibra cruda y carbohidratos, se observó que en el CPM disminuyeron fibra cruda y cenizas, mientras que los carbohidratos se mantuvieron en un porcentaje similar, con respecto al HPAD, además de un aumento en grasa, esto hace suponer que durante la succinilación se perdieron materiales tales como azúcares simples, carbohidratos no asimilables, que puede ser fibra cruda, almidón y minerales que posiblemente quedaron en el precipitado a pH de 8.5 ó bien solubilizados en el sobrenadante durante la precipitación isoelectrica a pH de 4.

4.2) MODIFICACION ENZIMATICA PROTEOLITICA

a) EVALUACION CUALITATIVA DE LA MODIFICACION ENZIMATICA

La alteración o modificación de las proteínas a polipeptidos más pequeños que ocurre durante una proteólisis por tratamiento enzimático se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS; por lo que las mejores condiciones para la modificación enzimática del CPM se establecieron por propio criterio, al observar la mínima modificación del patron original evaluado por electroforesis; fueron 10 los niveles de ensayo para la tripsina y 4 para la α -quimotripsina, los patrones de electroforesis que se observaron en los primeros niveles de prueba mostraron grandes bandas de polipeptidos aglomeradas en el fondo, señal de que la proteólisis de la proteína fue severa dado que el tamaño de estos no pasaba el 14,200Kd de la α -lactoalbumina, por lo que en posteriores ensayos se buscó llegar al menor cambio sobre el CPM.

En la **Tabla 22**, se presentan las condiciones de concentración de enzima-sustrato para modificar mínimamente el concentrado succinilado de amaranto. Las condiciones para modificar el CPM con tripsina fueron de 0.25%/7% (enzima/sustrato), con respecto a α -quimotripsina fue de 0.37%/5% (enzima/sustrato). Así mismo, en la **Tabla 22** se resumen las condiciones de T°

y pH necesarias para la reacción e inactivación utilizadas para la modificación del CPM.

Tabla 22.- Condiciones de concentración enzima-sustrato para modificar al CPM.

Enzima	Reacción		Inactivación		Concentración (%p/p)	
	pH	T° (°C)	T° (°C)	t (min.)	Enzima	Sustrato (CPM)
Tripsina	8.0	37	87	5	0.25	7
α -quimotripsina	8.0	37	87	5	0.37	5

En la Fig. 9 se muestra el perfil de electroforesis en condiciones de desnaturalización para los diferentes concentrados (α -quimotripsina, tripsina, respectivamente a los 3 diferentes tiempos de exposición de hidrólisis). Así mismo, al observar la distancia que recorrieron las bandas de proteína en el gel, se procedió a calcular el Rf's de cada banda del Dalton Mark, posteriormente elaboró una gráfica de Rf's vs log P.M. de los polipéptidos conocidos (curva standard: con valores promedio de tres réplicas). El peso molecular de los diferentes polipéptidos presentes de cada muestra se calculó a partir de la ecuación:

$$\log P.M. = -1.216 (Rf) + 2.18.$$

Los pesos moleculares de los diferentes polipéptidos detectados se encuentran en la Tabla 23. En la Fig. 9, se puede observar que para el concentrado succinilado sin modificador (M), se apreciaron muy tenuemente 9 bandas; de las cuales, 5 son las bandas principales (IV, VI, VII, VIII, IX) que corresponden a polipéptidos de P.M. aparente de 34.36, 23.88, 17.78, 15.13, 12.88 KDa respectivamente. En las

líneas A,B,C se presentan los perfiles de los concentrados modificados con α -quimotripsina a los tiempos de exposición de 5,10 y 30 min. respectivamente; en los tres casos se reduce el número de bandas a tres que corresponden al VII, VIII y XI, los cuales corresponden a un P.M. aparente de 17,78, 15,13 y 12,88 KDa respectivamente.

Tabla 23.- Peso Molecular aparente calculado para los diferentes polipeptidos presentes en los perfiles de electroforesis de los concentrados proteínicos de amaranto.

Subunidades	P.M. Calculado. (KDa)
I	66,2
II	56,23
III	40,74
IV	34,36
V	29
VI	23,88
VII	17,78
VIII	15,13
IX	12,88

Con respecto a la tripsina, las líneas A,B,C presentan los perfiles electroforéticos de los concentrados modificados con esta enzima a los tiempos de exposición de 5, 10 y 30 min. respectivamente; se encontraron las bandas VIII y IX de P.M. aparente de 15,13 y 12,88 KDa. Los pesos moleculares aparentes reportados por Córdoba-Salgado (1995), quien en un estudio de perfiles de solubilización de las proteínas de amaranto reportó el perfil de electroforesis de un concentrado de amaranto obtenido por succinilación, bien pueden compararse con las encontradas en este estudio, las tres bandas encontradas por Córdoba-Salgado (1995), corresponden a las bandas I, IV, IX.

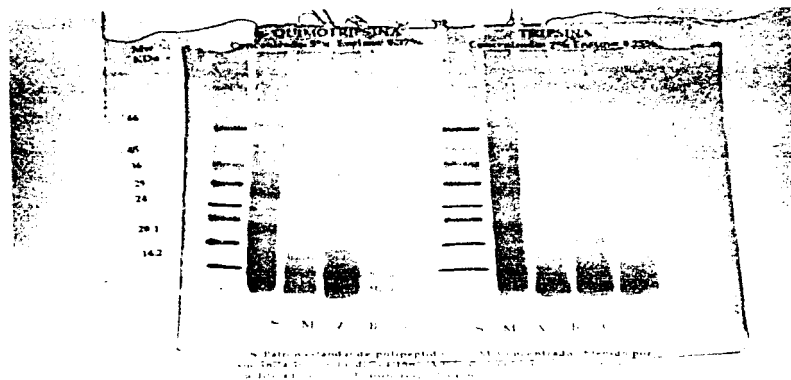


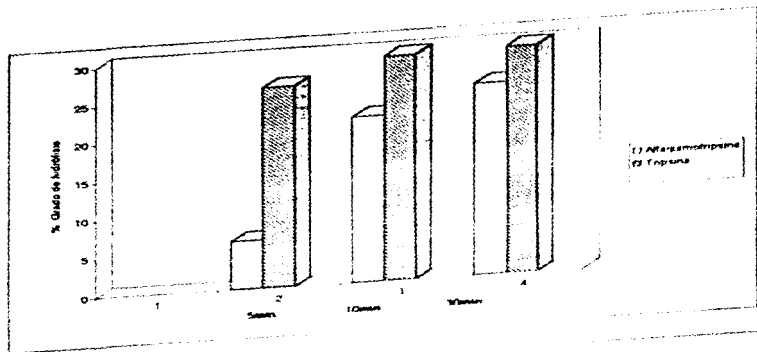
Fig. 9.-Perfil de electroforesis de los concentrados proteínicos de la semilla de amaranto, modificados enzimáticamente con tripsina o α -quimotripsina.

S: Patrón estándar de polipeptidos -Albumina sérica bovina, albumina de huevo, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina y α -lactoalbumina, 66, 45, 36, 29, 20, 14.2 kDa respectivamente M: Concentrado obtenido por succinilación. A; B; C: Concentrado succinilado modificado enzimáticamente a diferentes tiempos de exposición 5, 10 y 30 minutos respectivamente con tripsina o α -quimotripsina.

**b) EVALUACION CUANTITATIVA DE LA MODIFICACION ENZIMATICA
(GRADO DE HIDROLISIS)**

En la Fig. 10 se muestra el % de grado de hidrólisis, evaluación cuantitativa de la modificación que sufrió el CPM por el tratamiento enzimático. En donde se observó que las modificaciones realizadas con tripsina presentaron los rangos de hidrólisis aparentes más altos, continuando los tratados con α -quimotripsina. El CPM muestra un 8.65% de hidrólisis, este valor es alto al que se esperaría de una muestra que no ha sido tratada enzimáticamente. Kim y col. (1990) reportaron un valor inicial de 1.35% en un trabajo realizado con un arado de soya. Se observa por los valores promedio que presentaron los tratamientos con tripsina, su alta especificidad, presentando una mayor acción hidrolítica en comparación con la α -quimotripsina a los 5 min., aunque posteriormente a los 10 y 30 min. esa diferencia de proteólisis entre ambas enzimas disminuye.

Los valores de %GH de las enzimas tripsina y α -quimotripsina proporcionan una idea de la composición de las cadenas polipeptídicas, se puede suponer que existen un mayor número de los sitios de acción de rompimiento para la tripsina que para la α -quimotripsina o también se explica a que la tripsina es una enzima más específica que la α -quimotripsina (Márquez-Moreno, Fernández-Cuadrado, 1993).



Los valores numéricos corresponden a la escala de tres columnas.

Figura 10 - Grado de hidrólisis de un concentrado succinilado modificado enzimáticamente

4.4) PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS CONCENTRADOS PROTEINICOS DE AMARANTO MODIFICADOS ENZIMATICAMENTE

a) SOLUBILIDAD DE NITROGENO

La solubilidad de la proteína es una de las propiedades funcionales más importantes, dado que se considera que la funcionalidad de las proteínas depende en gran medida de su capacidad de solubilidad inicial. Las curvas de solubilidad en función del pH del CPM y los seis concentrados obtenidos enzimáticamente, se muestran en la Fig. 11. Analizando el perfil de solubilidad se observó que a pH ácido se presentaron valores de menor solubilidad con respecto al CPM; a pH neutro la solubilidad de los concentrados tripsina 5 min. y α -quimotripsina 5 min. mejoró, en tanto a pH básico los concentrados anteriormente mencionados se mantuvieron ligeramente por debajo de los valores más altos que son los que le corresponden al patrón.

En la Tabla 24 se presentan los valores del perfil de solubilidad a diferente pH de los concentrados obtenidos, los datos estudiados indicaron que a pH 2 el CPM y el modificado con α -quimotripsina a los 5 min. se presentó el valor promedio más alto a $p < 0.05$. A pH 4, el concentrado tripsina a 5 min. presentó el valor promedio más alto. A pH 6 el concentrado tripsina 5 min. y α -quimotripsina 5 min. presentaron los valores promedio más altos ($p < 0.05$). A pH 8 y 10, el comportamiento es similar, el CPM presentó el valor promedio más alto, seguido muy de cerca por los concentrados tripsina 5 min. y α -quimotripsina 5 min..

Para los concentrados modificados enzimáticamente se encontró que la mayor solubilidad se tiene en el rango de pH neutro (6 y 7), este comportamiento es similar al encontrado en proteínas miofibrilares succiniladas de pescado, en aislados modificados de avena, en gluten succinilado de trigo, en aislados succinilados de girasol (Córdoba-Salgado, 1995).

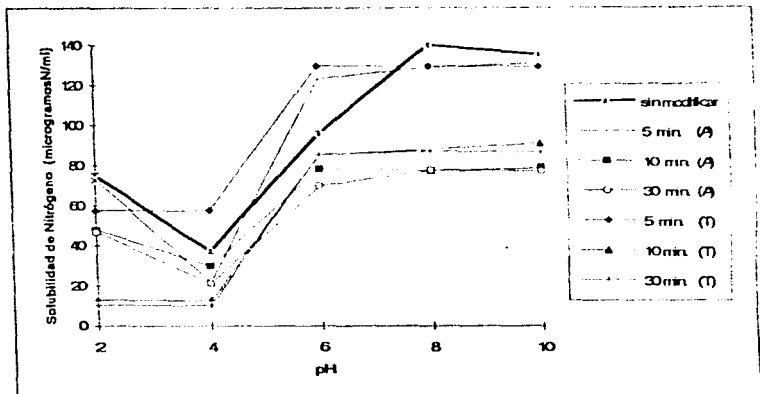


Figura 11.- Solubilidad de Nitrógeno de concentrados proteínicos de amaranto modificados enzimáticamente (A= α -quimotripsina; T = Tripsina) en función del pH.

Tabla 24.-Solubilidad de nitrógeno de concentrados proteínicos de amaranto modificados enzimáticamente en función del pH.

Concentrado		pH [(µg de N/ml)]				
		2	4	6	8	10
Sin Modificar		74 96 _a	37 01 _b	95 83 _c	139 95 _a	134 98 _a
α-qui- motrip- sina	5 min	72 81 _a	21 63 _d	123 07 _b	128 83 _b	130 77 _b
	10 min	47 74 _c	29 68 _c	78 19 _d	77 32 _d	78 38 _b
	30 min	47 01 _c	21 11 _d	69 53 _b	77 40 _d	76 92 _b
Trip- sina	5 min	57 47 _b	57 36 _a	129 55 _a	125 80 _c	129 04 _b
	10 min	12 81 _d	12 54 _b	85 27 _d	87 72 _c	90 75 _c
	30 min	10 30 _d	9 98 _b	85 30 _d	86 90 _c	86 51 _d

Todos los valores dados son la media de tres repeticiones.
La desviación estándar es menor al 5% del valor promedio.

a, b Letras iguales indican que las medias no son significativamente diferentes. Duncan (p<0.05)

Se encontró que en general la solubilidad presentó los valores más altos al pH de 8 y 10, continuando con el de 6; lo cual contrasta con el comportamiento de una alta solubilidad a pH alcalino de concentrados preparados de amaranto obtenidos por distintos métodos de solubilización y de concentrados de ocrá y ajonjolí (Córdoba-Salgado, 1995).

Estos resultados son diferentes a los esperados, si se toma en cuenta que en base a la bibliografía se sabe que en general el perfil de solubilidad de una proteína parcialmente hidrolizada mejora en toda su escala de pH, porque no forma agregados voluminosos aún a pH isoelectrico. El aumento de solubilidad obtenido por proteólisis limitada se atribuye a la formación de unidades más pequeñas, más hidrófilas y más solvatadas. Chettle y col. (1989), Choi y col. (1982) han informado, que la succinilación de las proteínas es una forma eficaz de incrementar la solubilidad de un material proteínico, sin embargo los resultados obtenidos en el presente estudio indica que la hidrólisis moderada a las cadenas polipeptídicas, sometidas a una reacción de acilación repercute en la disminución de la solubilidad. Se sugiere que este fenómeno se debe a la liberación de

residuos hidrófobos, durante la acción hidrolítica, se sabe que la solubilidad de las proteínas es susceptible a cambios profundos, cuando se altera alguno de los principales factores que la determinan, como el grado de hidratación, su densidad y distribución de cargas a lo largo de la cadena, por la presencia de compuestos no proteínicos que proporcionan un efecto estabilizante. Puskki (1975) indicó que en las proteínas de soya tratadas enzimáticamente presentaron dano por calor, lo cual se reflejó en la disminución del Índice de Solubilidad de Nitrogeno medido.

No obstante, aunque la solubilidad se considera un factor importante en la funcionalidad de las proteínas, no es suficiente para explicar el comportamiento de ciertas propiedades de superficie, ya que la hidrofobicidad juega un papel importante. Así mismo la solubilidad de las proteínas es el resultado de la influencia conjunta de los distintos factores que intervienen en ella y no se puede aislar fácilmente uno del otro (Huidrobo y Tejada, 1992).

b) CAPACIDAD DE ABSORCION DE AGUA O ACEITE

En lo que respecta a la absorción de agua, se observó que los concentrados modificados enzimáticamente con α -quimotripsina o tripsina, no presentaron absorción como tal, se encontró una dispersión de los concentrados en el agua. Esta dispersión es total, dado que al someter las muestras a una centrifugación, no hay separación del material. Esta propiedad es interesante si se piensa en la utilización de este material en la preparación de bebidas, cuya función sea la de proporcionar turbidez.

En la **Tabla 25** se presentan los resultados de absorción de agua y de la absorción de aceite de los concentrados obtenidos. Los valores promedio de dispersibilidad en agua para todos los concentrados modificados por la tripsina son más altos a $p < 0.05$, siguiendo los valores de dispersibilidad de los concentrados de α -quimotripsina, en comparación a los que presentó el CPM. Así mismo, se observó que los concentrados obtenidos con α -quimotripsina no presentan diferencias significativas a los tres diferentes tiempos de hidrólisis, para los concentrados obtenidos con tripsina el comportamiento fue el mismo. Esta

elevada capacidad de dispersibilidad puede explicarse debido a la alteración de la estructura de la proteína, al sufrir hidrólisis las cadenas polipeptídicas, forman unidades polipeptídicas más pequeñas, más hidrófilas y mejor solvatadas (Chetfel y col., 1989).

Tabla 25.-Absorción de agua o aceite de concentrados proteínicos de amaranto por succinilación modificados enzimáticamente.

Concentrado	Absorción de agua (ml/gr. concentrado)	Absorción de aceite (ml/gr. concentrado)
Sin modificar	2.15 ± 0.01 ^{ab}	1.7 ± 0.13 ^b
α -quimotripsina		
a 5 min	4.63 ± 0.15 ^b	1.7 ± 0.12 ^b
a 10 min	4.53 ± 0.05 ^{bc}	1.8 ± 0.2 ^a
a 30 min	4.43 ± 0.05 ^{bc}	1.83 ± 0.02 ^a
Tripsina		
a 5 min	4.9 ± 0.06 ^a	1.7 ± 0.2 ^b
a 10 min	5.0 ± 0.05 ^a	1.76 ± 0.12 ^{ab}
a 30 min.	5.0 ± 0.05 ^a	1.83 ± 0.12 ^{ab}

1. representa media y desviación estándar de tres replicas
 ab, indican que letras iguales no son significativamente diferentes Duricario (p < 0.05)

Con lo que respecta a la absorción de aceite, se encontró que los valores promedio de absorción más alto a $p < 0.05$, lo presentaron los concentrados obtenidos con α -quimotripsina a los 10 y 30 min. y los concentrados con tripsina a los 10 y 30 min., mientras que el resto de los concentrados modificados enzimáticamente presentaron valores de absorción de aceite similares al CPM. Puskí (1975) trabajó la hidrólisis enzimática de proteínas de soya, reportando que en teoría, la digestión enzimática de las proteínas incrementa el número de polipéptidos con afinidad a la interfase agua-aceite, que se manifiesta en el aumento de la capacidad de absorción de aceite, y esto también se refleja en la capacidad de emulsificación que presentaron concentrados modificados enzimáticamente en los trabajos de Sook y col. (1990) y Vodjani y Whitaker (1994).

Los valores de absorción de aceite y agua del concentrado por succinilación de amaranto, se asemejan a los observados por Delahaye (1987) en concentrados de amaranto, mientras que con Córdoba-Salgado (1995) solo se asemeja el valor de la absorción de aceite en un concentrado similar. Das y Kinsella (1990) indicaron que para una misma proteína los valores de absorción de agua o aceite obtenidos pueden variar según el método de extracción empleado, así como el equipo y condiciones de medición usado para su evaluación.

c) ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE EMULSIFICACION

En la Fig. 12 se muestra el perfil de la actividad de emulsión de los concentrados de amaranto modificados enzimáticamente en función del pH. Al analizar por rangos de pH, se tuvo que a pH ácido, todos los concentrados presentaron el mismo comportamiento, a excepción del concentrado tripsina 10 min. el cual se encontró por debajo del CPM a los pH 2 y 3. A pH neutro, todos los concentrados obtienen valores similares al CPM, mientras que a pH básico disminuyeron su actividad de emulsión con respecto al patrón.

En la Tabla 26 se muestran los valores en porcentaje de la actividad de emulsificación en función del pH, que presentaron los concentrados proteimicos de amaranto modificados enzimáticamente; a pH 2 los concentrados obtenidos en los tratamientos de tripsina a 30 min. y α -quimotripsina 5, 10 y 30 min. presentaron los valores promedio más altos ($p < 0.05$), siendo los concentrados con α -quimotripsina los que tuvieron una actividad de emulsificación por encima del CPM. A pH 4, todos los concentrados tratados enzimáticamente mostraron valores promedio más altos ($p < 0.05$) de actividad de emulsión con respecto al CPM. A pH 6 el concentrado que supera la actividad del CPM es el obtenido con tripsina a 30 min., mientras que el resto de los concentrados obtenidos presentaron valores promedio ($p < 0.05$) por debajo al del patrón, cuyos valores promedio no son significativamente diferentes. A pH 8 el concentrado obtenido con α -quimotripsina a 5 min. presentó el valor promedio más alto ($p < 0.05$) de actividad de emulsión en comparación al CPM, mientras que el resto de los concentrados obtenidos los valores promedio ($p < 0.05$) son menores a los que presentó el patrón.

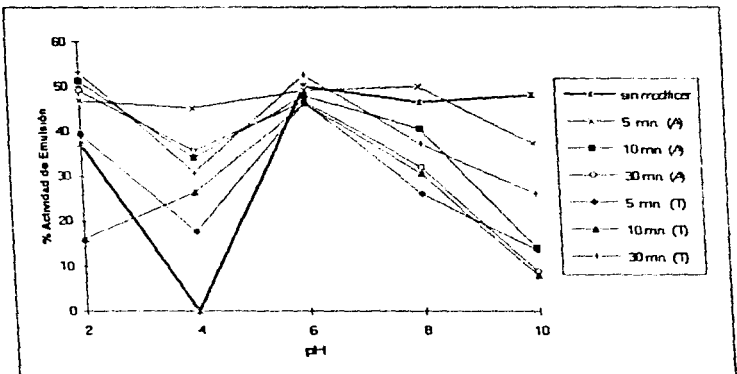


Figura 12.- % Actividad de emulsificación de concentrados proteínicos de amaranto modificados enzimáticamente (A= α -quimotripsina; T = Tripsina) en función de pH.

A pH 10 todos los concentrados obtenidos enzimáticamente mostraron valores promedio ($p < 0.05$) de actividad de emulsión por abajo del CPM.

Tabla 26.- % Actividad y Estabilidad de emulsificación de concentrados proteínicos de amaranto modificados enzimáticamente en función del pH.

Concentrado	pH									
	2		4		6		8		10	
	A1	E1	A	E	A	E	A	E	A	E
Sin modificar	37 2 ^c	50 3 ^a	0 ^d	0 ^d	50 2 ^{ab}	46 5 ^{c,d}	46 6 ^b	47 3 ^a	48 1 ^a	50 5 ^a
α -Qui- 5 min	46 8 ^{bc}	48 3 ^{ab}	45 2 ^a	0 ^d	49 2 ^{ab}	48 9 ^c	50 0 ^a	43 2 ^{bc}	37 3 ^b	42 2 ^{ab}
motnp-10 min	51 2 ^a	23 8 ^d	34 1 ^{ab}	7 6 ^{c,d}	48 1 ^{ab}	57 9 ^a	40 6 ^{bc}	36 1 ^{bc}	14 1 ^d	29 7 ^c
sina 30 min.	49 2 ^{ab}	47 3 ^{ab}	35 6 ^{ab}	33 1 ^a	46 8 ^b	45 5 ^d	32 1 ^d	34 6 ^c	8 8 ^d	10 6 ^d
Trp- 5 min	39 3 ^c	23 0 ^d	17 6 ^c	7 4 ^{c,d}	46 6 ^b	45 6 ^d	26 1 ^a	40 9 ^{bc}	13 7 ^d	35 4 ^{bc}
sina 10 min	16 1 ^d	25 0 ^{c,d}	26 4 ^{bc}	22 4 ^{ab}	46 3 ^b	50 2 ^b	30 6 ^{c,d}	34 9 ^{bc}	8 0 ^d	29 4 ^c
30 min	53 2 ^a	36 6 ^{bc}	30 8 ^b	16 4 ^c	52 7 ^a	47 7 ^{cd}	37 3 ^c	45 4 ^{ab}	26 2 ^c	37 9 ^{bc}

Todos los valores dados son la media y la desviación estándar de tres repeticiones.

a, a1, a2, ..., a; - Letras iguales indican que las medias no son significativamente diferentes, Duncan ($p < 0.05$)

A1 = Actividad; E1 = Estabilidad

En general, se observó que a pH 4 la actividad de emulsión es mejorada por todos los concentrados obtenidos con respecto al CPM; y a pH 6 la actividad de emulsión presentó valores promedio cercanos entre sí (46.3% a 52.7%), independientemente del tipo de enzima y tiempo de hidrólisis empleados. También se observó que la actividad emulsificante que presentaron todos los concentrados se encuentran por debajo del 52% (ver tabla 26), que es la mayor desarrollada por este tipo de concentrados.

Vojdani y Whitaker (1994) reportaron que la proteólisis limitada y específica de la β -lactoglobulina con diferentes proteasas pueden mejorar sus propiedades emulsificantes en relación a su proteína intacta en especial en su punto isoeléctrico (pI). Por los resultados obtenidos en el presente estudio se coincide en

que la hidrólisis enzimática puede proveer a una proteína de propiedades emulsificantes, especialmente cerca del pI.

En la Fig. 13 se muestra el perfil de la estabilidad de emulsión de los concentrados de amaranto modificados enzimáticamente en función del pH; a pH ácido todos los concentrados obtenidos presentan una estabilidad de emulsión menor que el CPM pero que va en aumento al subir el pH. A pH neutro, la estabilidad de emulsión de los concentrados obtenidos es mejorada en comparación a la del CPM, mientras que a pH básico esta propiedad se ve disminuida por todos los concentrados con respecto al patrón.

Así mismo, en la Tabla 26 se presentan los resultados obtenidos en la estabilidad de emulsión que formó cada concentrado, donde hay una mayor estabilidad en la zona de el pH de 6-10, sin embargo estos valores promedio ($p < 0.05$) se encuentran por debajo del 50%, esto significa que la formación de las emulsiones por los concentrados es posible pero su estabilidad disminuye. Puski (1975) encontró que la capacidad de emulsión se incrementa con el tratamiento enzimático mientras que la estabilidad de emulsión decrece y explica que en teoría la digestión enzimática de las proteínas incrementa el número de moléculas peptídicas disponibles a la interfase aceite-agua y así un área extensa puede ser cubierta dando por resultado la emulsificación de más aceite, sin embargo estos péptidos más pequeños y menos globulares forman capas superdelgadas alrededor de las gotas de aceite lo que da por resultado una emulsión con baja estabilidad.

Todos los concentrados evaluados en general, presentaron buena actividad y estabilidad de emulsión a pH 4 y 6. A pH 2 y 4 se encontró que el concentrado que presenta los valores promedio más altos ($p < 0.05$) de actividad+estabilidad es el obtenido con α -quimotripsina 30 min., a pH 6 es el concentrado α -quimotripsina 10 min., mientras que a pH 8 y 10 es el CPM.

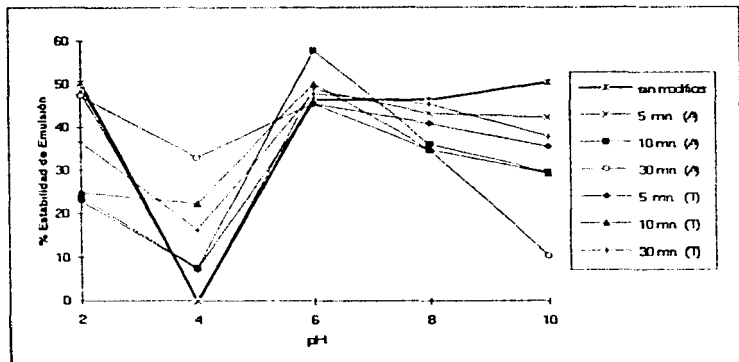


Figura 13.- % Estabilidad de emulsificación de concentrados proteínicos modificados enzimáticamente (A= α -quimotripsina; T = Tripsina) en función del pH.

Una proteólisis parcial puede mejorar las propiedades emulsionantes de las proteínas desnaturalizadas por el calor, como en el aislado proteico de soya (Puski, 1975); estos efectos, provienen probablemente del aumento en la solubilidad del hidrolizado que facilita la difusión y extensión en las interfases aceite/agua y aire/agua. Sin embargo, cuando el grado de hidrólisis excede del 3-5%, la viscosidad y espesor de las películas proteicas, resultan aparentemente insuficiente para estabilizar las emulsiones y espumas (Cheftel y col., 1989); lo anterior se hace evidente para los concentrados modificados a los 5, 10 y 30 min., donde existe una disminución en la estabilidad, dado que el grado de hidrólisis que presentaron los concentrados se encuentran en un rango de 6.27 a 29% (fig. 9), y aunque se encontró que en algunos concentrados la estabilidad de emulsificación disminuye conforme a los tiempos de exposición son mayores, también se encontró que a pH 4 hay estabilidad de emulsión.

Es posible que al pH en el que se encuentran valores de buena emulsificación los polipéptidos presentes en el concentrado estén ionizados, permitiendo una apertura de estos, a lo largo de la interfase agua-aceite, abatiendo la tensión superficial y propiciando la formación de emulsión. Datos en la literatura indican que la estabilidad de emulsión es mala cerca del pI de una proteína y mejora a pH distantes al pI, en teoría esto sucede como resultado del balance de las fuerzas repulsivas (cargas sobre las moléculas de las proteínas, que se ven afectadas por iones en solución) y fuerzas de atracción (fuerzas hidrofóbicas y de van der Waals). Por lo que la predicción del comportamiento de una emulsión a pH puede no ser muy confiable, dado que la carga neta sobre la proteína es cero (Vojdani y Whitaker, 1994).

Los concentrados obtenidos pueden ser usados como sustituto parcial de algún material emulsificante, en la preparación de un determinado alimento ácido (tal como la mayonesa, por ejemplo), principalmente a pH de 4 y 6 por las características de buena emulsión y estabilidad que presentaron estos concentrados a ese pH.

FALTA PAGINA

No. 84

d) ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE ESPUMADO

En la Fig. 14 se muestra el perfil de la actividad de espumado de los concentrados de amaranto modificados enzimáticamente en función del pH, al analizar las curvas se encontró que a pH ácido y a pH neutro, los concentrados obtenidos con tripsina 5, 10 y 30 min. superaron la actividad de espumado que presentó el CPM. Mientras que a ese mismo intervalo de pH los concentrados α -quimotripsina 5, 10 y 30 min. disminuyeron su actividad de espumado con respecto al patrón. A pH básico es el concentrado tripsina 30 min. el que presentó una actividad más alta que el CPM.

En la Tabla 27 se muestran los valores en porcentaje de la actividad de espumado en función del pH, que presentaron los concentrados proteínicos de amaranto modificados enzimáticamente, a pH 2 y a pH 6 los concentrados obtenidos en los tratamientos de tripsina a 5, 10 y 30 min. presentaron los valores promedio más altos ($p < 0.05$) en comparación al CPM, mientras que a este mismo pH los concentrados obtenidos con α -quimotripsina a 5, 10 y 30 min. tuvieron una actividad de espumado por debajo del patrón. A pH 4, los concentrados que presentan valores promedio más altos ($p < 0.05$) de actividad de espumado son los obtenidos tripsina a 5, 10 y 30 min., mientras que los concentrados α -quimotripsina mantienen valores promedio ($p < 0.05$) con medias que no son significativamente diferentes a las del patrón. A pH 8 el concentrado tripsina 30 min. muestra valores promedio ($p < 0.05$) más altos de actividad de espumado con respecto al CPM. A pH 10, los concentrados modificados con tripsina a 10 y 30 min. presentaron los valores promedio ($p > 0.05$) más altos que los que presentó el patrón.

Se puede observar que esta propiedad funcional es mejorada por los concentrados modificados con tripsina a los tres diferentes tiempos de hidrólisis con respecto al sin modificar, mientras que con los concentrados modificados con la α -quimotripsina, presentaron una menor actividad en comparación con el CPM.

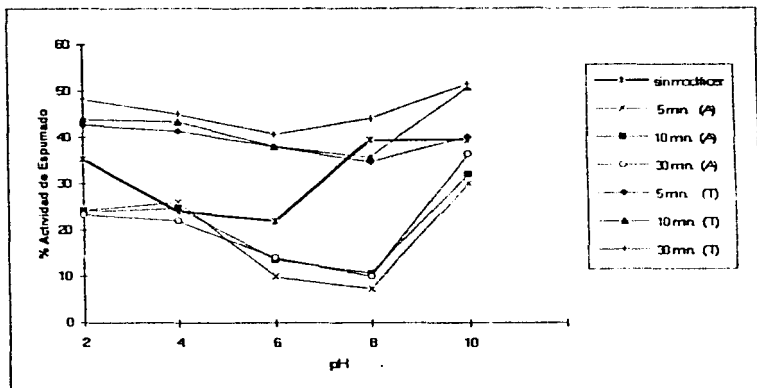


Figura 14.- % Actividad de espumado de un concentrado proteínico de amaranto modificado enzimáticamente (A= α -quimotripsina; T = Tripsina) en función del pH.

Tabla 27.- % Actividad y % estabilidad de espumado de concentrados proteínicos de amaranto modificados enzimáticamente en función del pH.

Concentrado		pH											
		2		4		6		8		10			
		A1	E1	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E
Sin modificar		35 3 ^c	33 7 ^a	24 0 ^c	72 0 ^c	22 0 ^b	91 1 ^a	39 3 ^a	38 2 ^a	39 4 ^b	32 2 ^d		
α-qui- motrip- sina	5 min	24 3 ^d	78 8 ^a	26 0 ^c	37 8 ^a	10 0 ^d	72 7 ^b	7 33 ^a	0 00 ^c	30 0 ^d	90 1 ^a		
	10 min	24 0 ^c	58 9 ^b	24 7 ^c	27 1 ^a	13 7 ^c	56 3 ^c	10 7 ^d	0 00 ^c	32 0 ^d	32 0 ^c		
	30 min	23 3 ^d	51 4 ^b	22 0 ^c	46 1 ^d	14 0 ^c	71 4 ^b	10 7 ^d	0 00 ^c	36 7 ^c	71 1 ^c		
Tnp- sina	5 min	42 7 ^b	46 0 ^c	41 3 ^{ab}	96 0 ^a	38 0 ^a	30 7 ^a	34 7 ^c	28 6 ^b	40 0 ^b	68 5 ^c		
	10 min	44 0 ^b	41 0 ^d	43 3 ^{ab}	93 1 ^b	39 3 ^a	59 8 ^c	35 7 ^{bc}	36 5 ^a	50 7 ^a	75 5 ^b		
	30 min	48 3 ^a	36 2 ^c	45 0 ^a	84 5 ^c	40 7 ^a	65 6 ^c	44 0 ^a	31 6 ^b	51 3 ^a	77 7 ^b		

Todos los valores dados son la media y la desviación estándar de tres repeticiones.

a, b, c Letras iguales indican que las medias no son significativamente diferentes. Duncan ($p < 0.05$)

A1 = Actividad E1 = Estabilidad

En la Fig. 15 se muestra el perfil de la estabilidad de espuma de los concentrados de amaranto modificados enzimáticamente en función del pH, al analizar las curvas se encontró, que a pH ácido los concentrados obtenidos tripsina 5, 10 y 30 min. presentaron una estabilidad de espuma más alta que la del CPM. A pH neutro esta función se ve disminuida por todos los concentrados obtenidos con respecto a la estabilidad de espuma del patrón. A pH básico, la estabilidad de espuma que presentaron los concentrados se ve diferenciada por la zona de pH a la que se encuentre, a pH 8 todos los concentrados obtenidos se encuentran por debajo del CPM, mientras que a pH 10 esta propiedad se ve mejorada por todos los concentrados con respecto al patrón.

Así mismo, en la **Tabla 27** se presentan los resultados obtenidos en la estabilidad de espuma que formó cada concentrado. A pH 2, el valor promedio ($p < 0.05$) más alto de la actividad + estabilidad de espuma fue para el concentrado tripsina 5 min., a pH 4 los concentrados que presentaron los valores promedio más altos son los obtenidos con tripsina 5, 10 y 30 min. en comparación con el

CPM. A pH 6 al igual que a pH 8, todos los concentrados obtenidos presentan valores promedio por debajo del patrón. A pH 10, los concentrados α -quimotripsina 30 min., tripsina 5, 10 y 30 min., presentaron los valores promedio más altos que el CPM.

Se puede relacionar la menor actividad de espumado que presentó el CPM con la mínima solubilidad a pH 4-6, este comportamiento es similar al observado por Córdoba-Salgado (1995), con un concentrado también succinilado.

Aunque son numerosos los estudios que señalan la importancia de una alta solubilidad de las proteínas para que se manifieste una buena actividad y estabilidad espumante, se acepta que partículas proteínicas insolubles puedan tener un papel de estabilización en las espumas, debido al incremento de alguno de los factores que intervienen en la formación de tal propiedad, como es el caso del aumento de la viscosidad superficial, así como la posibilidad que dan la presencia de cargas eléctricas, provocadas por el agente acilante durante la succinilación, así como por las que aparecen por los aminoácidos que han sido hidrolizados de las cadenas polipeptídicas y que presentan carga, en donde la aparición de atracciones electrostáticas intermoleculares que se producen en el perfil de pH, aumentan el espesor y la rigidez de las proteínas adsorbidas en la interfase aire/agua (Chefel y col., 1989). Lo que explica el comportamiento de los concentrados obtenidos en este trabajo con la modificación enzimática. Para los concentrados obtenidos con tripsina se observa un aumento de la actividad y estabilidad de la espuma, incluso a valores extremos de pH, se puede deber a la presencia de cargas electrostáticas, originadas por el rompimiento de las cadenas polipeptídicas de las proteínas originales, que ya habían tenido modificación al ser succiniladas. El comportamiento que presentan los concentrados modificados, en base a los resultados obtenidos, del efecto del pH sobre las propiedades de espumado, es extremadamente compleja, y solo podría especularse una explicación de lo que está pasando en el entorno, considerando la posible existencia de determinadas cargas eléctricas proporcionadas por el rompimiento de la enzima a los enlaces peptídicos ya conocidos, tales como lisina, arginina o tirosina que permiten enlaces hidrofílicos; triptófano, tirosina, fenilalanina o metionina que son hidrófobos.

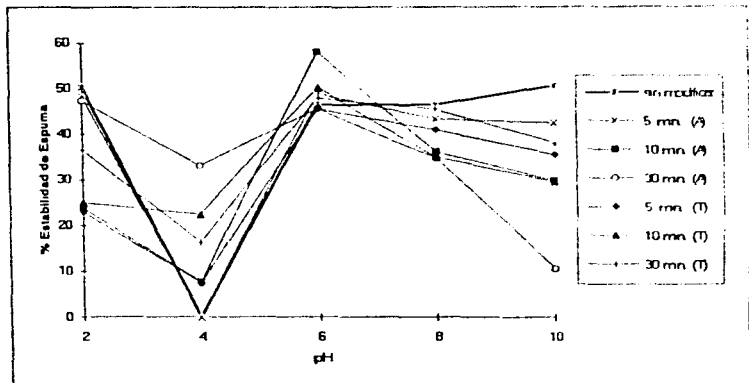


Figura 15.- % Estabilidad de espumado de concentrados proteínicos de amaranto modificados enzimáticamente (A= α -quimotripsina; T = Tripsina) en función del pH.

Vojdani y Whitaker (1994), mencionan que la estabilidad de espuma es mejor a pI de la proteína y se explica por la ausencia de fuerzas repulsivas las cuales tienden a debilitar la fuerza y el espesor de las películas de la interfase entre el gas de la burbuja y el agua, permitiendo interacciones por enlaces hidrofóbicos.

CONCLUSIONES

Entre las estrategias de mejoramiento de las propiedades funcionales en las proteínas se ha estudiado la modificación química, con agentes acilantes como anhídrido succínico, anhídrido acético, etc., (Choi y col., 1982). Donde el grupo nucleófilo por excelencia para estas reacciones, es el grupo α -amino de la lisina. Este hecho resulta controversial, en el caso del amaranto y de otros granos, ya que es precisamente el contenido de lisina en el grano de amaranto lo que otorga la elevada calidad nutricional de este grano. No obstante otra estrategia para mejorar las propiedades funcionales de la proteína es la modificación enzimática (Sook; Park ; 1990).

La aplicación de enzimas proteolíticas es un atractivo medio de obtener el mejoramiento de las propiedades funcionales de los alimentos sin deteriorar el valor nutritivo (Jimenez-Flores y Richardson, 1986). La degradación de la proteína a péptidos generalmente proporciona un producto más soluble; se sabe además, que las propiedades funcionales tales como el sabor, la viscosidad, el batido y emulsificación y la capacidad de espumado son también afectadas (Márquez-Moreno; Fernández-Cuadrado, 1993), tal como se demostró en este estudio.

Al analizar las diferentes propiedades funcionales estudiadas de los concentrados modificados enzimáticamente, se observó que la hidrólisis de enzimas provocan alteraciones en las propiedades originales de las proteínas. La acilación de las proteínas con el anhídrido succínico resulta en una alta actividad emulsionante; autores como Franzen y Kinsella, 1976; Choi y col., 1981; Shuhn-Sheen, 1988; atribuyen este comportamiento al aumento de las propiedades superficiales (tensión superficial en las interfases agua/aire o aceite/agua) debido al cambio de la carga neta de la proteína provocado por el agente acilante, sin embargo esta propiedad fue superada por los concentrados modificados enzimáticamente a pH 4 en general. En este caso la hidrólisis de las cadenas polipeptídicas pueden liberar aminoácidos y con ello cargas eléctricas afines; las inserciones por tanto de estas cargas resultan en el aumento de la repulsión entre

las cadenas polipeptídicas generando el desdoblamiento de la molécula, de esta manera los polipéptidos resultantes que son de naturaleza lineal y de diferentes tamaños pueden acomodarse en las interfase agua/aceite, actuando como estabilizadores de emulsión, al orientar sus fragmentos polares en el componente no polar de la emulsión y simultáneamente ocurre un fenómeno similar con los fragmentos no polares con la parte polar del sistema.

En la Tabla 28, se presentan las propiedades funcionales obtenidas por los concentrados modificados enzimáticamente con respecto al CPM. Al modificarse las propiedades funcionales que originalmente presentaba el CPM por la hidrólisis enzimática, se hace evidente la alteración de la proteína nativa, y por los resultados obtenidos en esta estudio, la hidrólisis enzimática del CPM cambia las propiedades funcionales iniciales. La amplia gama de funcionalidad presente en los concentrados puede deberse al tipo de proteínas presentes.

Tabla 28.- Principales propiedades fisicoquímicas de los concentrados modificados con proteasas con respecto al CPM.

Concentrado	Grado de Hidrólisis	Solubilidad de nitrógeno	Disperibilidad en agua	Absorción de aceite	Actividad de emulsión	Actividad de espumado
<i>α</i>-quimotripsina						
5 min.	6.27	pH: 2-10	Alta	buenas	pH: 2-8	—
10 min.	21.69	—	Alta	buenas	pH: 4-6	—
30 min.	25	—	Alta	buenas	pH: 2-6	pH: 10
Tripsina:						
5 min.	26.2	pH: 4-10	Alta	buenas	pH: 4-6	pH: 2-10
10 min.	29.3	—	Alta	buenas	pH: 4-6	pH: 2-10
30 min.	29.37	—	Alta	buenas	pH: 2-6	pH: 2-10

CONCLUSIONES FINALES

1.) Las condiciones de concentración de enzima-sustrato para la modificación del concentrado obtenidas en este trabajo son: α -quimotripsina [0.37%, 5%], tripsina [0.25%, 7%].

2.) El % de grado de hidrólisis de los concentrados tratados enzimáticamente es aparentemente proporcional al tiempo de exposición a la proteólisis, así mismo se manifiesta en la alta especificidad de la tripsina, al mostrar un valor elevado de %GH a los 5 min. y mantener en los valores de 10 y 30 min. una leve diferencia entre sí.

3.) La solubilidad de nitrógeno que presentaron los concentrados modificados α -quimotripsina o tripsina fue mayor solubilidad en el rango de pH de 5-7. Destacando los concentrados modificados a los 5 min. de hidrólisis, independientemente del tipo de enzima utilizada.

4.) Los concentrados modificados presentaron dispersibilidad en agua, así mismo la absorción de aceite se mejoró por los concentrados modificados con α -quimotripsina a 10 y 30 min. y con la tripsina a 10 y 30 min.

5.) Los concentrados modificados con tripsina, son los que presentaron la mayor actividad de espumado, aunada a una buena estabilidad que en general presenta.

6.) Los concentrados modificados en general presentaron una buena actividad y alta estabilidad de emulsión a pH de 6, 2 y 8.

7.) Los concentrados modificados enzimáticamente a los 5 min. son los que presentan las mejores propiedades funcionales con respecto al CPM y el resto de concentrados modificados.

ANEXO 1

A continuación se presenta la lista de las soluciones empleadas durante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de amonio en gradiente lineal de 10 y 20%.

Solución #1 (30%T, 2.7% Bis.)

Acrilamida 58.4 g
Bis 1.6 g
Agua a 200 ml.
Guardar en oscuridad
a 4°C.

Solución #2 Solución monómero en glicerol al 75% (30%T, 2.7% Bis)

Acrilamida 58.4 g
Bis 1.6 g
Glicerol 76% a 200 ml.
Guardar en oscuridad
a 4°C.

Solución #3 Running gel buffer (1.5M tris-cl pH 8.8)

Tris 36.6 g
Agua a 200 ml
ajustar a pH 8.8 con
HCl
Guardar en oscuridad
a 4°C.

Solución #4 SDS al 10%

SDS 50 g
H₂O a 5 ml.
T° ambiente

Solución #5 Persulfato de amonio al 10%

Persulfato de NH₄ 0.5 g.
H₂O a 5 ml.
preparar continuamente

Solución #6 Buffer para empaquetamiento

Tris-base 6 gr.
H₂O a 100 ml.
pH de 6.8

Solución #7 Solución tefldora

Metanol al 50% 908 ml.
Ac. acético glacial 92 ml.
Azul coomasie R-250 1.25 g.

Solución #8 Solución decolorante

Ac. acético glacial 225 ml.
Etanol 180 ml.
H₂O 2625 ml.
mezclar:
[H₂O + Ac. acético glacial] + Etanol

Solución #9
Buffer de Tanque
 (0.025 M tris base, pH=8.3
 0.192 M Glicina, 0.1 % SDS)

Tris base 18 g
 Glicina 86.4 g
 Solución #4 60 ml.
 H₂O a 6 lt.
 pH de 8.6

Solución #11

Bromofenol 100 mg.
 H₂O a 10 ml.

Solución #10
Tratamiento de desnaturalización
 (0.125 M tris-cl, pH=6.8
 20% Glicerol, 4% SDS,
 1% 2-mercaptoetanol)

Solución #6 2.5 ml.
 Solución #4 4 ml.
 Glicerol 2 ml.
 2-mercaptoetanol 1 ml.
 Solución #11 0.25 ml.
 H₂O a 10 ml.

Para la formación de los geles en gradiente lineal se utilizaron las siguientes soluciones en el orden de adición en el que aparecen y sus respectivas cantidades:

Solución	10 %	20%
# 1	5.67 ml	
# 2	-----	11.34 ml
# 3	4.25 ml	2.25 ml
# 4	0.17 ml	0.17 ml
H ₂ O	6.83 ml	1.16 ml
# 5	37 µl	37 µl
TEMED	6 µl	6 µl

Composición del gel de concentración / empaquetamiento.

Solución	ml.
#1	2.66
#6	5.0
#4	0.2
H ₂ O	12.2
#5	100 µl
TEMED	10 µl

BIBLIOGRAFIA

AOAC (1980). Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemistry. Published: the association of the Analytical Chemistry. Washington, D.C.

Badui-Dergal, S. (1990) Química de los Alimentos. Editorial Alhambra Mexicana. México, D.F. 201, 492, 555.

Barba de la Rosa, A., Gueguen, J., Paredes-López, O. (1992) Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 931-936.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.

Bressani, R., García-Vela, A. (1990) Protein fractions in Amaranth grain and their chemical characterization. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1205-1209.

Cheftel J; Cuq, J; Lorient. (1989). *Proteínas Alimentarias*. España, Editorial Acribia S.A. 25-35, 49-96, 325-330.

Choi, Y.R., Lusas, E.W. y Rhee, K:C: (1981). Effect of succinylation of cottonseed flour during protein extraction on the yield and some of the properties of isolates. *J.A.O.C.S.* 1044-1049.

Choi, Y.R., Lusas, E.W. y Rhee, K.C: (1983). Molecular structure and functionalities of protein isolates prepared from deffated cottonseed flour succinylated at varius levels. *J. Food Sci.*, **48**, 1275-1278.

Córdoba-Salgado, Marco Aurelio. (1995). Perfiles de solubilidad y caracterización fisicoquímica de concentrados proteínicos de la semilla de amaranto. Tesis de Maestria. Depto. de Biotecnología, U'AM Unidad Iztapalapa.

Das K.P., Kinsella J.E. (1990). Stability of food emulsions: physicochemical role of protein and nonprotein emulsifiers. *Advances in food and nutrition reseach*, **34**, 81-199. Academic Press Inc. London.

Delahaye, E. y Gómez, V. (1987). Preparation processes of protein isolates from whole amaranth seed- Alkaline extraction and succinylation of proteins. *Funtional properties of protein isolates. Amaranth Newsletters*, **4**, 6-8.

Edwards J.H.; Shipe W.F. (1978) Characterization of plastein reaction products formed by pepsin, alfachymotrypsin, and papain treatment of egg albumin hydrolysates. *J. Food Sci.* **43**, 1215-1218.

Egan, H.,Kirk, R. S. (1988). *Análisis Químico de Alimentos de Pearson*. México, Editorial CECSA. 5-16.

Franks F., (1988). *Characterization of Proteins*. The Humana Press Inc., Clifton, New Jersey. USA. 1-24.

Franzen K. L., Kinsella J.E. (1976). Functional properties of succinylated and acetylated soy protein. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, **4**, 788-795.

Hart, L., Fisher, H.J. (1984). *Análisis Moderno de los alimentos*. España. Editorial Acribia S.A. 4-15.

Hermansson A. M. (1979). Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins. *J.A.O.C.S.* **56**, 272-279.

Huidobro A, Tejada M. (1993). Propiedades de hidratación del músculo de pescado. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* **33**, 4, 365-381.

Irwing-Wood, Betschart A., Saunders M., (1981) Morphological studies on *Amaranthus cruentus*. *J. Food Sci.* **46**, 1170- 1174.

Jaimes B. (1986). El perfil del amaranto. Boletín SARH, Agosto 1986.

Jiménez Flores, R.; Richardson, T., (1986) Effects of chemical, genetic and enzymatic modifications on protein functionality. Department of Food Science and Technology. University of California, Davis, California, USA. 87-133.

Kakade, L. M. (1974) Biochemical basis for the differences in plant protein utilization. *J. Agric. Food Chem.*, **22**, 550-550.

Kinsella J. (1979). Functional properties of soy protein. *J.A.O.C.S.* **56**, 242-258.

Kinsella J.E. (1985) Criterio funcional para incrementar la utilización de proteínas de soya en los alimentos. *Asociación Americana de Soya/Méx./ No.36*.

Lenhinger A.L. (1990) *Bioquímica : Las bases moleculares de la estructura y su función celular*. Ed. Omega, Barcelona. Cap. 5, 6 y 7.

Márquez Moreno; Fernández Cuadrado. (1993) Enzymatic hydrolysis of vegetable proteins: Mechanism and kinetics. *Process Biochemistry* 0032-9592/93. Elsevier Science Publishers England. 481-490.

Paredes-López O. Ordorica Falomir. (1986). Functional properties of soflower protein isolates: water-absortion, whipping and emulsifying characteristics. *J. Sci. Food Agric.*, **37**, 1104-1108.

Paredes-López O. Ordorica Falomir. (1991). Chickpea protein isolates: physico-chemical, funtional and nutritional characterization. *J. Food Sci.*, **56**, 726-729.

Puski G. (1975). Modification of functional properties of soy proteins by proteolytic enzyme treatment. *Cereal Chem.* **52**, 655-664.

Sánchez Marroquín, A. (1980). Potencial agroindustrial del amaranto. Centro de Estudios Económicos y Sociales del Tercer Mundo. México, D.F.

Sánchez Marroquín, A. (1983). Dos cultivos olvidados. de importancia agroindustrial: El Amaranto y La Quinoa. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **33**, 11-32.

Sánchez-Marroquín, Domingo M., Maya S., (1983). Amaranth flour blends and fractions for baking applications. *J. Food Sci.*, **50**, 789-794.

SARH, (1992) Anuario estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. 335.

Shun-Sheen, Sheen J.T. (1988). Efect of chemical and enzymatic degradation on the functional properties of fraction 1-protein. *J.Agric. Food Chem.* **36**, 445-450.

Sigma Chemical Company (1986) Nondenatured protein molecular weight marker kit. Technical Bulletin N°MRK - 137. October 1986.

Singhal, R. S. y Kulkarni, P.R. (1988) Review: Amaranth an underutilized resource. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **23**, 125-139.

Sook, Kim; Park, Peter; (1990) Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 651-656.

Soriano-Santos J. (1987), Lisina-reactiva y valor biológico de semillas procesadas de *A. hypochondriacus*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.

Soriano-Santos, J., Guerrero-Legarreta I., (1992) Caracterización parcial de las proteínas solubles en sulfato de sodio de un concentrado proteínico del grano de amaranto. *Tecnol. Aliment.* **27**, 30-36.

Soriano-Santos J. , (1993). Características de solubilidad del nitrógeno de un concentrado proteínico de amaranto. *Ciencia*, **44**, 505-517.

Soriano-Santos J. (1993). Caracterización parcial de un concentrado proteínico del grano de amaranto. *Ciencia*, **44**, 517-525.

Soriano-Santos, J. y Córdoba-Salgado, M. (1994) Influencia de parámetros físico-químicos en la solubilidad del nitrógeno de semilla de amaranto. *Tecnol. Aliment. (Méx.)*, **29** (3-4), 17-27.

Soriano-Santos, J. y Córdoba-Salgado, M. (1995) Evaluación de diferentes métodos de solubilización de nitrógeno, para la obtención de concentrados proteínicos de semilla de amaranto. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* **36** (2), 161-177.

Teutonico R., Dietrich Knorr. (1985). Amaranth: Composition, properties, and applications of a rediscovered food crop. *Food Technology*, **39-4**, 49-58.

Toporek, Milton, (1985). Bioquímica. Editorial Interamericana S.A. de C.V., México.

Wang J. C., Kinsella J. E. (1976). Functional properties of novel proteins: Alfalfa leaf protein. J. Food Sci., 41, 286-292.

Whitaker John, Tannenbun S. (1977). Food Proteins. Avi Publishing Co. Inc. Westport, Connecticut. 291-314.

Wood Irwing D., Betschart A. A. (1981). Morphological studies on *Amaranthus cruentus*. J. Food Sci., 46, 1170-1174.

Wright D. J. (1972) The seed globulins In; Hudson, B. J. (Ed.) Development in Food proteins. (Vol. I) (1987) Applied Science Publishers, London, 18-187.