

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EFECTO DE LAS CONDICIONES DE DESAMIDACIÓN EN
PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y FUNCIONALES DE GLUTEN DE
MAÍZ”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

PAMELA SUÁREZ BRITO



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.

Jurado asignado:

Presidente Profra. Amanda Gálvez Mariscal

Vocal Profr. Javier Plasencia de la Parra

Secretario Profra. Gloria Díaz Ruiz

1er. Suplente Profr. Alfredo Salazar Zazueta

2º. Suplente Profra. Perla Deyanira Maldonado

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Departamento de Alimentos y Biotecnología, Laboratorio 312, Edificio E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

ASESORA DEL TEMA: Dra. Amanda Gálvez Mariscal

SUSTENTANTE: Pamela Suárez Brito

GRACIAS

A DIOS por haberme dado la gran oportunidad de tener este sueño y verlo hecho realidad. Gracias Señor por enviar a mi vida a tantos de tus ángeles.

A mi Ma, porque sin ti simplemente no podría haber llegado hasta aquí. Gracias por cuidarme y empezar a construir este camino para mí. Son las mejores manos a las que Dios me pudo enviar...

A mi Pa, por haber visto siempre lo bueno que hay en mi...sigues y seguirás conmigo hasta que nos volvamos a encontrar...le doy gracias a Dios por el tiempo que permitió que estuviéramos juntos...

A Paloma y a Triana, por hacerme saber lo grande que es tener una hermana. Porque juntas somos simplemente lo mejor... just the Power of Three...

A mi tía Oli, a mi tío Chuy y a todos los que forman la familia Brito García, por ser un ejemplo de esfuerzo y cariño. Gracias por sus cuidados y por permanecer cerca de mí de alguna u otra forma....

A la familia Suárez, gracias por permitirme ser parte de esta familia, es un orgullo llevar este apellido...

A Gabriel, gracias bb por compartir conmigo el final de este camino y el principio de uno nuevo lleno de nuevos sueños e ilusiones. Te amo...

A Kro, gracias amiba por estar conmigo en un acontecimiento más...sabes que eres más que mi amiga otra hermana para mí...

A todos los amigos y compañeros que compartieron alguna parte de mi aventura en la Facultad de Química y de mi vida: FRR, Grupo Beta, Químicos de Alimentos, Octágono, a todos los miembros del Laboratorio 312 y a ti, gracias por construir conmigo momentos increíbles de mi vida...

A la Dra. Amanda Gálvez Mariscal, por la asesoría en el desarrollo de este trabajo. Gracias Amanda por compartir tu carrera de éxito conmigo y por dejarme conocer a la gran mujer que eres...

A la Maestra Idalia Flores Argüello, por la asesoría técnica en el desarrollo de este trabajo. Gracias Idalia por permitirme saber que hay siempre una manera positiva de ver la vida. Tu apoyo y ayuda fueron invaluableles.

A las Dras. Amelia Farrés y Maricarmen Quirasco por permitirme formar parte de este gran equipo de trabajo. Gracias por su apoyo y por su gran ejemplo.

A los Doctores, Gloria Díaz y Javier Plasencia, por sus comentarios y por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Al Proyecto CONACYT-OMNILIFE No. 35948-B “Desarrollo tecnológico para la elaboración de fórmulas para regímenes especiales a base de aislados de proteína de ajonjolí y gluten de maíz”.

A la Facultad de Química por haber sido mi casa durante muchos años, mi vida se divide antes y después de haber estado aquí.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, no hay suficientes palabras, sólo decir: “POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”.

Este espacio no alcanza para expresar lo que siento en mi corazón por todos y cada uno de ustedes. Sólo puedo dar gracias a Dios por haberlos puesto en mi camino y permitirme decirles de nuevo:

GRACIAS

“Porque yo sé los pensamientos que tengo acerca de vosotros, pensamientos de paz y no de mal, para daros el fin que esperáis” Jeremías 29:11

INDICE

	Página
I. Introducción.....	7
II. Antecedentes.....	9
1. Proteínas en sistemas alimentarios. Propiedades funcionales.....	9
a. Solubilidad.....	12
b. Propiedades emulsificantes.....	17
c. Propiedades espumantes.....	23
2. Modificación de proteínas.....	32
a. Desamidación química.....	32
b. Hidrólisis.....	33
3. Proteínas vegetales. El maíz.....	35
a. Composición del grano de maíz.....	35
i) Proteínas del maíz.....	35
b. Gluten de maíz.....	36
i) Obtención del gluten de maíz. Molienda húmeda.....	36
ii) Composición del gluten de maíz.....	39
iii) Usos actuales y posibilidades en la industria alimentaria.....	40
III. Hipótesis.....	41
IV. Objetivos.....	41
V. Metodología.....	42
1. Caracterización del gluten de maíz.....	42
1.1 Homogeneización.....	42
1.2 Análisis proximal.....	42
1.3 Análisis microbiológico.....	43
1.4 Características organolépticas y pH.....	43
2. Desamidación Química.....	44
3. Caracterización fisicoquímica.....	45
3.1 Determinación del Grado de Desamidación (GD).....	45
3.2 Determinación del Grado de Hidrólisis (GH).....	46
4. Evaluación de propiedades funcionales.....	46
4.1 Solubilidad.....	46

4.2	Propiedades Emulsificantes.....	47
4.2.1	Índice de Actividad Emulsificante (IAE).....	47
4.2.2	Estabilidad de Emulsión (EE).....	47
4.2.3	Capacidad Emulsificante (CE).....	48
4.3	Propiedades Espumantes.....	48
4.3.1	Capacidad de espumado.....	48
4.3.2	Estabilidad de la espuma.....	48
VI.	Resultados y discusión.....	49
1.	Caracterización del gluten de maíz.....	49
1.1	Homogeneización.....	49
1.2	Análisis proximal.....	50
1.3	Análisis microbiológico.....	51
1.4	Características organolépticas y pH.....	51
2.	Desamidación Química.....	52
3.	Caracterización fisicoquímica.....	52
3.1	Determinación del Grado de Desamidación (GD).....	52
3.2	Determinación del Grado de Hidrólisis (GH).....	54
4.	Evaluación de propiedades funcionales.....	55
4.1	Solubilidad.....	55
4.2	Propiedades Emulsificantes.....	57
4.2.1	Índice de Actividad Emulsificante (IAE).....	57
4.2.2	Estabilidad de Emulsión (EE).....	59
4.2.3	Capacidad Emulsificante (CE).....	62
4.3	Propiedades Espumantes.....	63
4.3.1	Capacidad de espumado.....	63
4.3.2	Estabilidad de la espuma.....	65
5.	Resumen de resultados.....	67
VII.	Conclusiones.....	69
VIII.	Bibliografía.....	70
ANEXO 1.	Tablas de resultados.....	74
ANEXO 2.	Análisis estadístico.....	76

I. INTRODUCCIÓN

El gluten de maíz es un sub-producto de la molienda húmeda, de alto contenido proteínico (alrededor del 60 %) y gran disponibilidad que representa una importante fuente potencial de proteína vegetal para la industria de alimentos. Sin embargo, dadas las características de las proteínas que lo componen, como son su baja funcionalidad en las condiciones predominantes de los sistemas alimentarios, no se ha logrado su aplicación, por lo que es actualmente utilizado principalmente en la industria de alimentos para animales en donde es apreciado tanto como fuente de proteína, como por sus características sensoriales.

En investigaciones previas se ha demostrado que ciertas propiedades funcionales de las proteínas del gluten de maíz, así como de otras proteínas vegetales como las de soya, trigo, chícharo, girasol, etc., pueden ser mejoradas aplicando tratamientos enzimáticos y/o químico-térmicos como la desamidación (Casella *et al*, 1990; Flores, 1997; Cabra, 2002; Chan *et al*, 1999; Mimouni *et al*, 1994; Dagorn-Scaviner *et al*, 1987; Lin & Humbert, 1974). Este último es un tratamiento de bajo costo que implica el cambio en la carga neta de la proteína al transformar el grupo amida de los aminoácidos asparagina y glutamina en grupos ácidos con carga negativa (ácido aspártico y ácido glutámico) (Vojdani & Whitaker, 1994).

En el caso de las proteínas del gluten de maíz se han logrado mejoras en solubilidad y propiedades emulsificantes (Índice de Actividad Emulsificante (IAE) y Estabilidad de Emulsión (EE)) utilizando la desamidación química en condiciones ácidas (HCl 0.12 N- 70 °C 6 horas) (Flores, 1997). Estas condiciones sin embargo representan un gasto de tiempo considerable y es por esto que se considera de gran importancia ampliar el estudio explorando otras condiciones de tiempo y temperatura de este tratamiento con el fin de optimizarlo y determinar si es útil para mejorar también otras propiedades de interés como son Capacidad Emulsificante y propiedades espumantes (Capacidad de Espumado y Estabilidad de Espuma).

Considerando lo anterior, se plantea en este estudio la modificación en el grado de desamidación e hidrólisis en función del tiempo y la temperatura de tratamiento, con el fin de encontrar la relación que guardan estas propiedades fisicoquímicas con la mejora en las propiedades funcionales.

Los resultados obtenidos en esta investigación, permitirán ampliar el conocimiento acerca de las características de dichas proteínas en la práctica y definir su potencial como aditivos o

ingredientes alternativos disponibles y de bajo costo, en una variedad de alimentos que requieren de estas propiedades, permitiendo un mejor aprovechamiento de este sub-producto de la industria procesadora del maíz.

II. ANTECEDENTES

1. Proteínas en sistemas alimentarios. Propiedades funcionales.

Las proteínas son macromoléculas complejas de gran importancia en diversos sistemas (sistemas biológicos, alimentarios, etc.). En alimentos son consideradas uno de los componentes fundamentales junto con los carbohidratos y los lípidos tanto por su aporte nutrimental como por sus propiedades funcionales. Las propiedades funcionales se definen como propiedades fisicoquímicas no nutrimentales, que contribuyen a otorgar a los alimentos los atributos sensoriales específicos deseables que los caracterizan. La funcionalidad requerida varía con el tipo de alimento del que se trate y su aplicación (Tabla 1) (Vojdani & Whitaker, 1994).

TABLA 1. PROPIEDADES FUNCIONALES DESEABLES EN SISTEMAS ALIMENTARIOS *		
Propiedad funcional	Modo de acción	Ejemplo de uso
Solubilidad	Solvatación de proteína en función del pH	Bebidas
Absorción de agua y retención de agua	Puentes de hidrógeno	Salchichas, pan y pasteles
Viscosidad	Aumento en viscosidad, enlaces con agua	Sopas, salsas
Gelificación	Formación de matriz proteínica	Queso
Cohesión-adhesión	Proteína actúa como material adhesivo	Salchichas, pastas
Elasticidad	Enlaces hidrofóbicos en gluten, puentes disulfuro en geles	Productos de repostería
Emulsificación	Formación y estabilización de emulsiones grasas	Salsas
Absorción de grasa	Enlaza grasa libre	Salchichas
Fijación de sabor	Adsorción, retención y liberación	Productos de imitación de carnes y pastelería
Espumado	Forma películas estables para atrapar gas	Productos de repostería (merengues y espumas)

* Fuente: Vojdani & Whitaker, 1994

La mayoría de las propiedades funcionales de las proteínas alimentarias, afectan las características sensoriales, especialmente atributos de textura y sabor, pero pueden interferir a su vez en el comportamiento físico de los alimentos o sus ingredientes durante su preparación, procesamiento y/o almacenamiento (Cheftel & col, 1985). En otras palabras, las diversas propiedades funcionales de las proteínas son el resultado de la modificación de

sus propiedades fisicoquímicas en alguna o todas estas etapas, ya sea que se encuentren en forma nativa o modificada (Vojdani & Whitaker, 1994).

En general se pueden definir tres grupos de factores que intervienen directamente en las propiedades funcionales de una proteína. Estos son:

A) Factores intrínsecos. Son aquellas características inherentes a la proteína como son su peso molecular, estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. Estos aspectos involucran entre otras cosas la proporción, naturaleza (polar o no polar) y conformación ó exposición de los aminoácidos presentes en la proteína así como su homogeneidad o heterogeneidad (glucoproteínas, lipoproteínas, etc.). Estos factores determinarán las posibles interacciones que la proteína pueda tener con el medio y con otras moléculas presentes en la matriz del alimento.

B) Condiciones de procesamiento. En muchas ocasiones las proteínas no se aplican a los alimentos en la forma en que se encuentran en la naturaleza sino después de un proceso de extracción y separación a partir de una fuente vegetal o animal (en forma de aislados o concentrados proteicos). Estos procesos se llevan a cabo en condiciones que pueden afectar las características estructurales originales de la proteína. Por ejemplo la adición de solventes para extracción de grasa, los cambios de pH y temperatura para lograr la precipitación de las proteínas, el secado, la molienda o las modificaciones enzimáticas o químicas, afectan directamente a los diferentes niveles estructurales de las proteínas (conformación y polaridad de aminoácidos) y por lo tanto a las interacciones que puedan tener con el medio o con otros componentes de los alimentos.

C) Condiciones de aplicación. Se refieren a aquellas que se utilizan en el proceso de elaboración de los productos en los que se aplica la proteína. Las de mayor relevancia son la fuerza iónica, el pH, la concentración de proteína, la temperatura y los métodos de mezcla (Hall, 1996).

Por consiguiente la determinación de las propiedades funcionales y los factores que las afectan son uno de los criterios principales para definir el uso potencial que puedan tener en alimentos específicos.

Debido a su heterogeneidad y a la interacción que tienen con otros componentes de los alimentos, las proteínas poseen un amplio espectro de propiedades funcionales. Existe una clasificación en donde se las divide en tres grupos principales: a) propiedades de hidratación (dependientes de interacciones proteína-agua), b) propiedades relacionadas con interacciones proteína-proteína y c) propiedades de superficie. En el primer grupo se

engloban propiedades como absorción y retención de agua, solubilidad y viscosidad. En el segundo grupo se encuentran propiedades como precipitación, gelificación, y formación de fibras o películas. Por último, ejemplos de propiedades de superficie son las propiedades emulsificantes y espumantes. Sin embargo, esta clasificación no es definitiva ya que muchas veces las propiedades no son independientes. Por ejemplo en la gelificación, viscosidad y solubilidad, intervienen tanto interacciones proteína-agua como interacciones proteína-proteína (Cheftel & col, 1985). En la figura 1 se esquematizan las interrelaciones que pueden existir entre los diferentes aspectos de la funcionalidad de una proteína (Pomeranz, 1991).

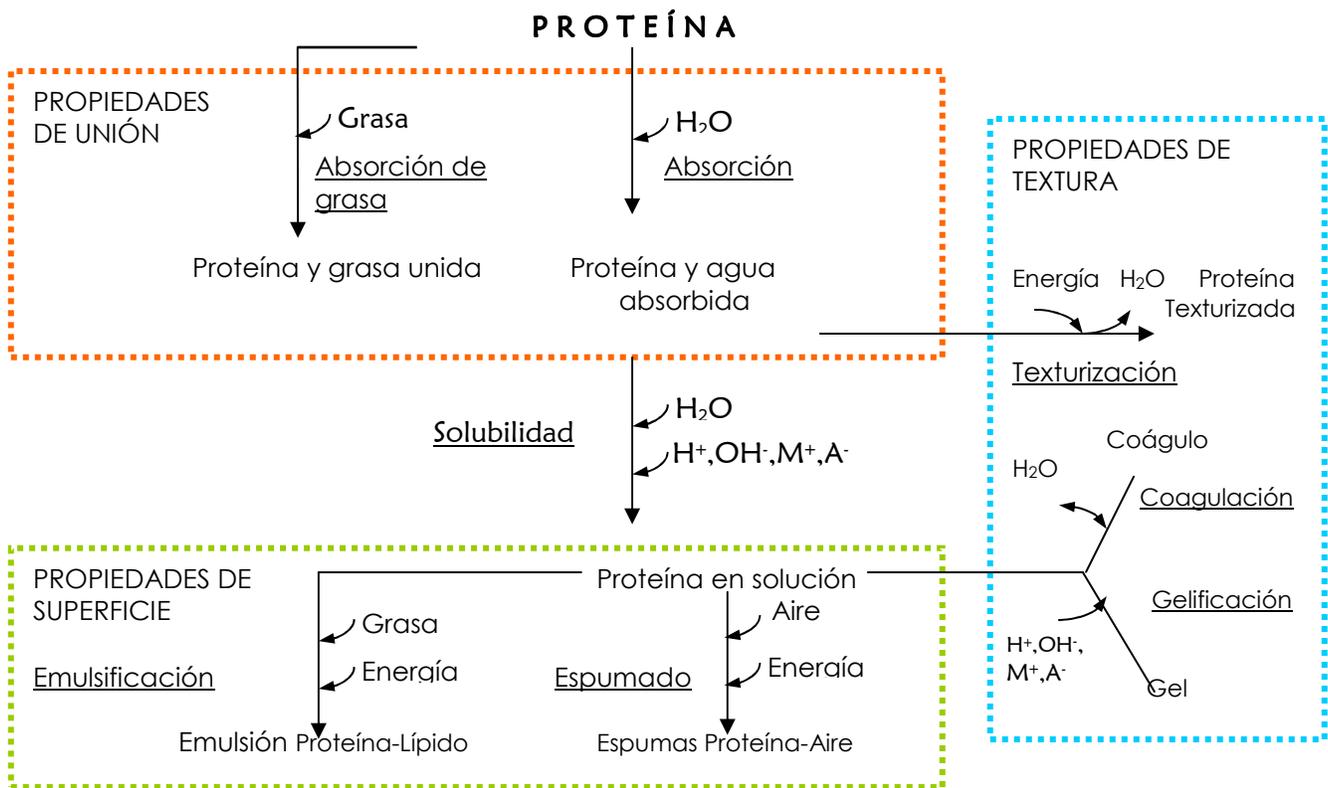


Figura 1. Funcionalidad de proteínas y sus interrelaciones (Pomeranz, 1991).

a. Solubilidad

La solubilidad es una de las propiedades fisicoquímicas más importantes de una proteína debido a la influencia directa que tiene en otras propiedades funcionales. Se define termodinámicamente como la concentración de proteína en un disolvente en el punto de equilibrio, ya sea en un sistema monofásico o bifásico (solución de proteína en un sistema líquido-líquido o líquido-sólido) (Vojdani, 1996).

La solubilidad está determinada principalmente por la actividad superficial de una proteína, la cual está relacionada con el número y tipo de interacciones que puede tener con el medio, con ella misma o con otros componentes de la matriz. Esto va a depender, entre otras cosas, de factores intrínsecos como son la composición y distribución de aminoácidos en la proteína, cobrando gran importancia la proporción de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos y su distribución. Dado que el medio es generalmente acuoso los residuos hidrofílicos estarán orientados al exterior (Interacciones proteína-solvente) mientras que los residuos hidrofóbicos se acomodarán al interior de la molécula (interacciones proteína-proteína). De ahí que para expresar la solubilidad de una proteína en el equilibrio bajo ciertas condiciones de disolución se puede utilizar la siguiente ecuación (Damodaran, 1989):



FACTORES EXTRÍNSECOS QUE AFECTAN LA SOLUBILIDAD.

Las características superficiales de la proteína y por consiguiente, su capacidad de permanecer en solución, se ven afectadas a su vez por los otros factores mencionados como son condiciones ambientales y condiciones de proceso. La influencia de algunos de estos factores se describe a continuación:

A) pH. El pH es uno de los factores que más inciden en el comportamiento de una proteína en solución. Este comportamiento está dado por los cambios en la carga neta al aumentar o disminuir la concentración de iones H⁺ en el medio. El punto isoeléctrico es el valor de pH en el cual una proteína posee carga neta igual a cero. Por arriba de éste valor aumenta el número de cargas negativas y por abajo el número de cargas positivas. Si la carga neta disminuye disminuirán entonces las repulsiones electrostáticas en la molécula y por lo tanto aumentarán el número de interacciones hidrofóbicas (proteína-proteína)

disminuyendo las interacciones con el medio y la solubilidad provocando la agregación de las moléculas y su posterior precipitación. Si por el contrario aumenta la carga neta, la proteína será capaz de interactuar con el medio acuoso (proteína-solvente) aumentando así su solubilidad.

La proporción de proteína soluble en el punto isoeléctrico dependerá de las características de la proteína. Algunas proteínas son completamente insolubles en su punto isoeléctrico, mientras que otras permanecen en solución casi en su totalidad. La curva típica de solubilidad de proteínas en función del pH tiene forma de U, observándose en general la menor solubilidad en el pH isoeléctrico. Esto tiene sus excepciones por ejemplo en el caso de proteínas complejas o mezclas de proteínas (Vojdani, 1996) Figuras 2 y 3.

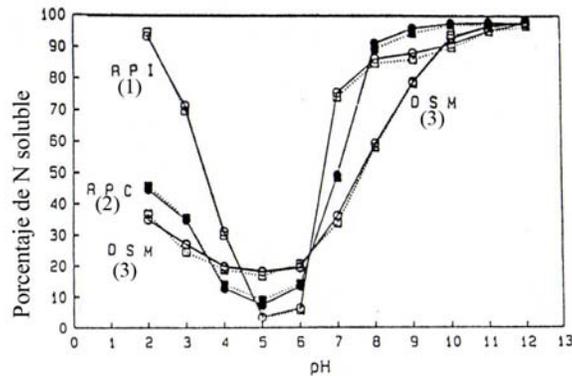


Figura 2. a) Solubilidad de proteína en función del pH. (1) Aislado de proteína reducido en fitatos (RPI), (2) Concentrado de proteína reducido en fitatos (RPC) y (3) Producto de girasol desengrasado (Zayas, 1997).

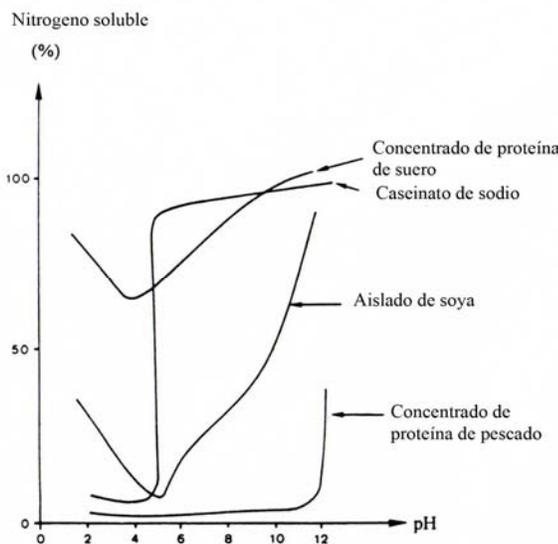


Figura 3. Curvas de solubilidad de diferentes proteínas en función del pH (Cheftel & col.,1985)

B) Temperatura. En general la solubilidad de una proteína aumenta al aumentar la temperatura en un intervalo de 0 a 40-50 °C. Esto ocurre debido a que al aumentar la temperatura se rompen los enlaces que estabilizan las estructuras secundaria y terciaria. Esto provoca el desdoblamiento de la proteína (cambio conformacional) y por consiguiente la posibilidad de mayores interacciones hidrofóbicas lo que da lugar a la agregación, coagulación y por último precipitación. Cuando la temperatura de la solución aumenta lo suficiente en un tiempo determinado se puede lograr la desnaturalización completa de la proteína la cual puede ser irreversible. Una vez más se requieren diferentes condiciones de tiempo-temperatura para desnaturalizar una determinada proteína. Así mismo estas condiciones dependen del pH y la fuerza iónica utilizada (Vojdani, 1996).

C) Fuerza iónica. En los sistemas biológicos las proteínas no se encuentran solubles en agua pura, sino en soluciones salinas de baja concentración ($\text{NaCl} \sim 0.15 \text{ M}$). En general la solubilidad de las proteínas aumenta (salting-in), al aumentar la concentración de sales neutras, sin embargo como sucede con la temperatura, la solubilidad alcanza un máximo después del cual al seguir aumentando la concentración de sales, la solubilidad disminuye (salting out). Esto se debe a que en este punto se presenta la competencia de los iones de la sal con la proteína por los sitios de unión con el agua. El incremento en la solubilidad se da en concentraciones de sal de 0.1 - 1 M. El efecto positivo en la solubilidad o salting-in depende de la naturaleza de los iones y sigue la serie de Hofmeister, que para aniones es la siguiente: $\text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_3^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$ y para cationes $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}_2^+ > \text{Ca}_2^+ > \text{Ba}_2^+$ (Vojdani, 1996).

D) Concentración de proteína. La solubilidad está influida también por la concentración de proteína presente. En determinadas condiciones una proteína puede ser soluble en agua. Al aumentar su concentración por arriba de la constante del producto de solubilidad, una parte de esa proteína puede insolubilizarse y sedimentar por centrifugación. Termodinámicamente existe un equilibrio entre fases, en donde la proteína en estado sólido está en equilibrio con la que está en solución.

Se puede describir en general una secuencia de pasos que involucran las interacciones progresivas proteína-agua, a partir de la proteína seca hasta llegar a la proteína en solución (Cheftel & col., 1985) (Figura 4).

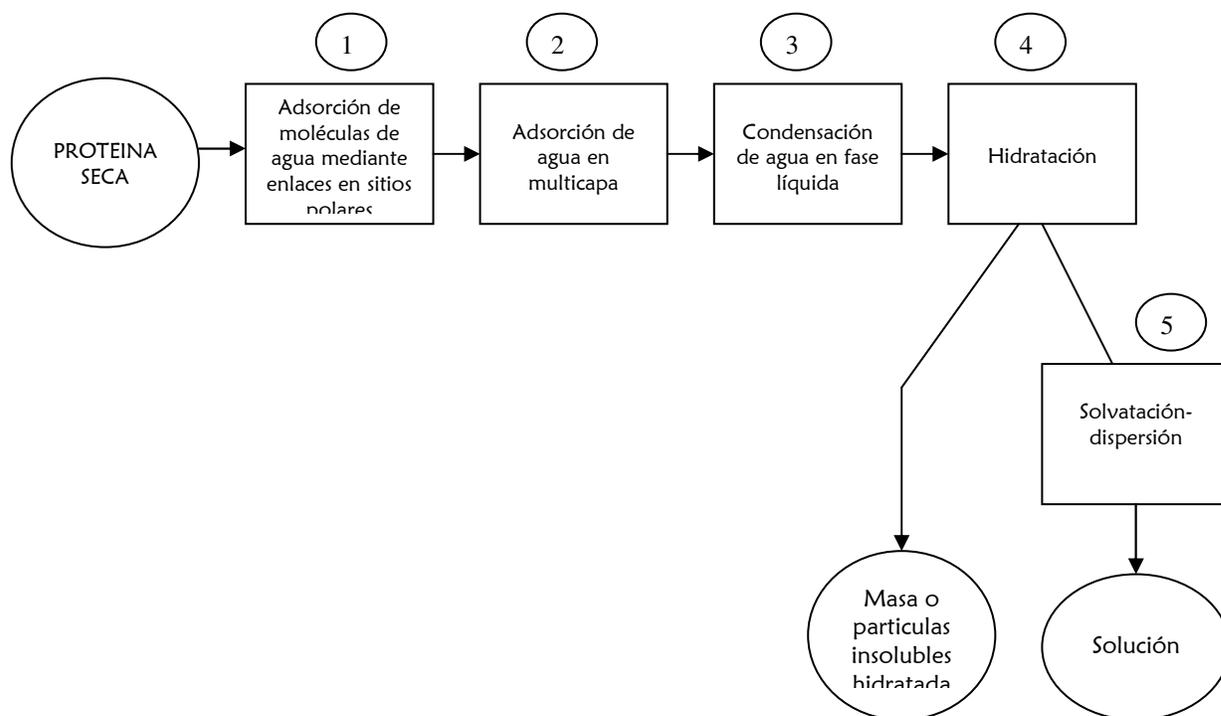


Figura 4. Secuencia de interacciones proteína-agua partiendo de proteína seca (Cheftel & col., 1985). Las expresiones de solubilidad de la proteína se pueden dar en función de estas etapas y/o del fundamento en el que se basa su determinación. Algunos de estos términos se presentan en la Tabla 2 (Vojdani, 1996).

TABLA 2. TÉRMINOS COMUNES PARA EXPRESAR LOS VALORES DE SOLUBILIDAD DE UNA PROTEÍNA *	
Términos	Siglas en inglés
Índice de dispersabilidad de una proteína (Protein dispersibility index)	PDI
Dispersabilidad en agua de una proteína (Water dispersible protein)	WDP
Grado de Turbidez (Degree of turbidity)	-
Porcentaje de insolubilidad (Percent insolubility)	-
Dispersabilidad (Dispersibility)	-
Solubilidad máxima de una proteína (Maximum protein solubility)	-
Índice de solubilidad de nitrógeno (Nitrogen solubility index)	NSI
Índice de solubilidad (Solubility index)	SI
Nitrógeno soluble en agua (Water soluble nitrogen)	WSN
Proteína soluble en agua (Water soluble protein)	WSP
Porcentaje de solubilidad de una proteína (Percent protein solubility)	%PS
Porcentaje de solubilidad de nitrógeno (Percent nitrogen solubility)	%NS

*Fuente: Vojdani, 1996

De acuerdo a esta tabla existen términos que están relacionados con la dispersabilidad, turbidez, insolubilidad, solubilidad de nitrógeno y solubilidad de una proteína. La dispersabilidad es un criterio de la solubilidad, ya que inicialmente la proteína debe dispersarse antes de estar en solución. Por otra parte las mediciones de turbidez y porcentaje de insolubilidad son una medida indirecta de la solubilidad, en donde lo que se expresa es qué tan deficiente o no es la proteína en esta propiedad.

Por último, existen distintos parámetros que expresan una medida de solubilidad, ya sea como nitrógeno o su correspondiente expresión como proteína. Los diferentes índices se crean tomando en cuenta diversas relaciones como puede ser la cantidad de proteína y la cantidad de proteínas totales presentes (proteína soluble en agua (WSP por sus siglas en inglés). También se pueden relacionar los valores obtenidos antes y después de un cierto tratamiento (%PS-Porcentaje de solubilidad de proteína), o en una cierta condición (Solubilidad máxima de una proteína).

La cuantificación de la proteína se puede hacer por diferentes procedimientos, normalmente se utilizan concentraciones de proteína de 1-20 mg/ml. y la selección del método dependerá de algunos factores como pueden ser:

1. Cantidad de proteína disponible para la prueba
2. Concentración de proteína presente en la muestra
3. Presencia de compuestos que causen interferencia en la prueba
4. Especificidad de la prueba
5. Exactitud y precisión requerida

Los métodos generalmente utilizados varían en su fundamento y serán seleccionados de acuerdo al objetivo que se plantee en cada estudio. Los métodos más comúnmente utilizados son:

- a. Método Kjeldahl para cuantificación de nitrógeno proteínico
- b. Métodos espectrofotométricos con reactivos específicos (Métodos de Lowry, Bradford) entre otros

b. Propiedades emulsificantes

La emulsificación es uno de los procesos principales en la formulación de alimentos. Existen una gran cantidad de productos que son o involucran la formación de una emulsión. Algunos ejemplos son: mantequilla, crema, helado, leche, mayonesa, aderezos, etc.

DEFINICIÓN DE EMULSIÓN

Las emulsiones se definen como un sistema formado por dos fases líquidas inmiscibles dispersas una en otra (Cortés, 1998). Dado que las dos fases son inmiscibles generalmente una es hidrofóbica y una hidrofílica. Las emulsiones que se pueden formar son de dos tipos principalmente: 1) Emulsión aceite en agua (o/w) siendo la fase dispersa el aceite y la fase continua el agua, y 2) Emulsión tipo agua en aceite (w/o) cuando el agua es dispersada sobre una fase continua oleosa. En la mayoría de los casos, en alimentos la situación es más compleja ya que también se encuentran presentes otros componentes como partículas sólidas o incluso una espuma.

MECANISMO DE FORMACIÓN DE UNA EMULSIÓN

El aceite y el agua son inmiscibles por el aumento desfavorable de energía que ocurre cuando la estructura del agua pura se perturba al estar en contacto con sustancias no polares y se ordena alrededor de ellas. La mínima energía en el sistema se logra cuando el área de contacto entre los dos líquidos inmiscibles se minimiza, lo que se logra al mantener las fases separadas. Para formar entonces una emulsión, se requiere dispersar una fase en la otra, y el proceso requiere de una cantidad significativa de energía. El área interfacial depende de la cantidad de energía aplicada al sistema. A mayor energía aplicada se obtienen gotas de menor diámetro y una mayor área de interfase (Mangino, 1994).

El factor crítico en la tecnología de las emulsiones depende de la aplicación de agentes emulsificantes, los cuales permiten contrarrestar la situación desfavorable de energía asociada con la dispersión de las gotas de aceite en el agua (Mangino, 1994). Dada la inmiscibilidad ya mencionada de los componentes, los agentes emulsificantes deben poseer tanto regiones de carácter polar como no polar, es decir ser anfifílicas (Wilde, 2000).

Las dos clases de moléculas anfifílicas más importantes utilizadas en alimentos son las proteínas y los emulsificantes o surfactantes (de bajo peso molecular). En una emulsión, los

agentes emulsificantes tienen dos funciones principales: 1) ayudar a la formación de la emulsión, disminuyendo la tensión interfacial lo que disminuye la energía libre del sistema y 2) ayudar a la estabilización de la emulsión por la formación de una barrera física en la interfase aceite/agua. Otra característica importante es que el emulsificante se adsorba rápidamente (Hill, 1996).

Tanto los surfactantes como las proteínas forman capas interfaciales y son capaces de estabilizar emulsiones y espumas pero utilizan diferentes mecanismos (Figura 5).

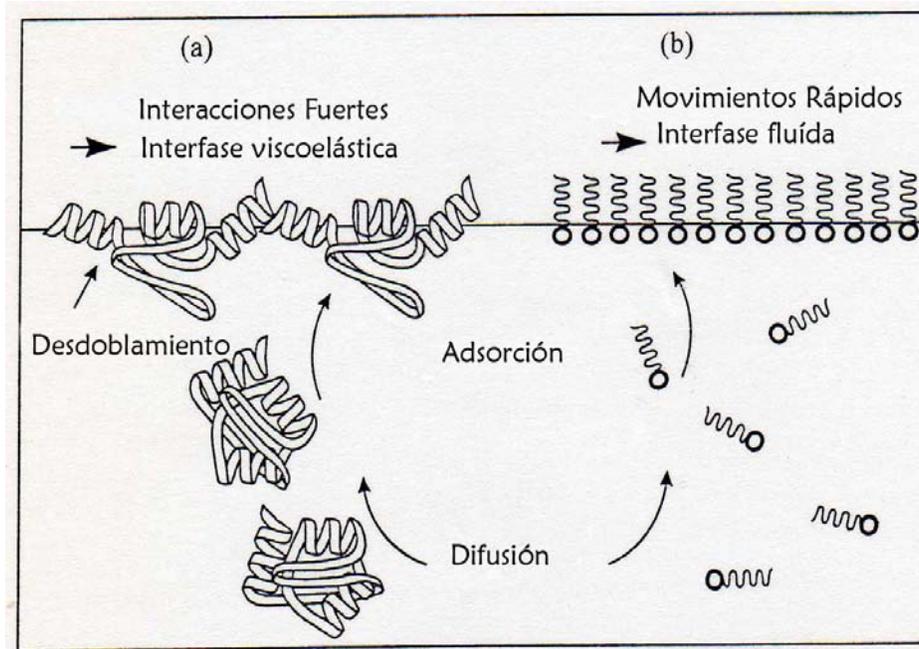


Figura 5. Comparación entre la adsorción de proteínas y surfactantes. Ambos siguen procesos de difusión y adsorción, pero sólo las proteínas siguen un proceso de desdoblamiento, dando como resultado una capa viscoelástica estabilizada por interacciones intermoleculares (Wilde, 2000)

Los emulsificantes o surfactantes al igual que las proteínas se adsorben y forman una capa, reduciendo la tensión interfacial entre las dos fases. Debido a su tamaño las moléculas de emulsificante requieren de un tiempo menor para difundirse en la interfase, adsorberse en ella y orientar los grupos de acuerdo a la polaridad. Las proteínas por el contrario al ser moléculas mucho más grandes y complejas requieren de un paso extra de desdoblamiento conocido como desnaturalización superficial, por lo que su difusión y absorción no es tan rápida. Una vez en la región interfacial es necesario que la proteína sufra cambios conformacionales para lograr disminuir lo más posible las interacciones de los grupos hidrofóbicos con el medio acuoso y de los grupos hidrofílicos con la fase oleosa. Estas

interacciones provocan el aumento en la energía del sistema lo cual lo vuelve inestable. Para llegar al estado de mínima energía o estado más estable, la proteína requiere orientar las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos de acuerdo a la polaridad del medio, como ocurre cuando se encuentra en su estado nativo, en donde la orientación de los grupos hidrofóbicos es al interior de la molécula, quedando los residuos de aminoácidos hidrofílicos expuestos al medio, en la medida de las posibilidades cinéticas y de impedimento estérico. Esta orientación y estabilización en la interfase no es tan sencilla ya que depende tanto de la flexibilidad de la proteína, como de la distribución de aminoácidos, pues se requiere tener una cadena con regiones hidrofóbicas suficientemente grandes para poder insertarse en el ambiente no polar. Lo mismo se requiere para las regiones hidrofílicas. Mientras más regiones se encuentren inmersas en la fase oleosa, más difícil será que la proteína se vuelva a doblar en su estructura original y por lo tanto más difícil será que se inestabilice la emulsión (Mangino, 1994).

A pesar de que algunas proteínas son excelentes emulsificantes, no todas pueden adsorberse fuertemente en una interfase o/w, ya sea porque sus cadenas laterales son altamente hidrofílicas o porque poseen estructuras rígidas que no permiten a la proteína adaptarse a la interfase. La adsorción de las proteínas ocurre vía las cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos por lo que la medición de la hidrofobicidad de la proteína puede predecir su poder emulsificante (Dalgleish, 2001). Sin embargo, éste no es el único factor ya que la capacidad de cambiar su conformación al adsorberse puede aumentar su poder emulsificante.

Las proteínas que estabilizan emulsiones forman películas interfaciales gruesas y con carga neta. El grosor, la viscosidad, cohesividad y la carga de la capa está determinada por la naturaleza de la proteína y las condiciones de emulsificación (Zayas, 1997).

FACTORES EXTRÍNSECOS QUE AFECTAN LAS PROPIEDADES EMULSIFICANTES DE LAS PROTEÍNAS.

i) Concentración de proteína. El comportamiento de las propiedades emulsificantes en función de la concentración de proteína sigue diferentes tendencias. A menor cantidad de proteína disminuye la capacidad emulsificante pues el área interfacial en la que se puede adsorber es menor. Así mismo, la tendencia a la desestabilización es alta ya que es posible

que las gotas compartan las moléculas de proteína y esto puede hacer que floculen. Aunado a esto con bajas concentraciones de proteína se forma una capa delgada menos fuerte.

ii) Fuerza iónica y pH. Tanto el pH como la fuerza iónica influyen indirectamente en las propiedades emulsificantes de la proteína al afectar su solubilidad y conformación. Al modificarse la carga de la proteína cambia su actividad superficial y con esto la posibilidad de interactuar con el medio acuoso y consigo misma. Al aumentar la repulsión electrostática se favorece la estabilidad pues disminuye la posibilidad de agregación o coalescencia de las gotas de grasa. En el pH isoelectrico y en ciertos valores de fuerza iónica, las proteínas presentan la menor solubilidad y pueden adoptar estructuras compactas y viscoelásticas. Esto puede evitar el desdoblamiento y adsorción en la interfase necesarias para lograr la emulsificación.

iii) Tratamiento térmico y otros factores. Un incremento moderado de la temperatura causa un aumento en la adsorción del estabilizante en la interfase debido a la fusión de la grasa por lo tanto la disminución en su viscosidad. Así mismo a T más altas ocurre la desnaturalización de la proteína ocasionando el aumento en la actividad superficial por la exposición de residuos hidrofóbicos y se aumenta su capacidad de interacción con la fase oleosa (Zayas, 1997).

iv) Tipo de equipo utilizado y cantidad de energía. Una de las principales limitantes para la comparación de resultados de propiedades emulsificantes de proteínas es la variación que ocurre debido al equipo utilizado para formar las emulsiones. Dependiendo de los parámetros del método utilizado (potencia, energía, velocidad del homogeneizador, velocidad de adición de aceite, condiciones ambientales) se obtendrán diferentes tamaños de gota, y por lo tanto, emulsiones de diferentes características. La distribución del tamaño de partícula es por lo tanto una medida de la eficiencia del proceso de emulsificación y estabilidad del sistema (Dalglish, 2001).

v) Volúmenes de fases. La proporción de fases oleosa y acuosa es uno de los factores más importantes que definen las características de una emulsión. Al aumentar la proporción de la fase oleosa se favorece la estabilidad por el aumento de viscosidad hasta un máximo a partir del cual la proteína no es capaz de mantener la emulsión y ésta se rompe.

ESTABILIDAD DE LA EMULSIÓN.

La estabilidad de una emulsión se define como la capacidad de las gotas que la conforman, de permanecer dispersas, estables y sin cambios (Cortés, 1998). Ésta depende del balance de las fuerzas asociadas con la interfase entre el aceite y el agua (Hill, 1996). Es uno de los requerimientos principales de una emulsión en alimentos ya que frecuentemente se requieren prolongadas vidas de anaquel.

Las principales fuerzas involucradas son: a) Fuerzas de atracción (fuerzas de Van der Waals); b) Fuerzas de repulsión (fuerzas electrostáticas); c) Fuerzas estéricas (proteína en la interfase) y d) Fuerzas de depleción (Influenciadas por polímeros fuera de la interfase).

Debido a la gran cantidad de energía libre en la interfase, las emulsiones son termodinámicamente inestables y se desestabilizan mediante tres mecanismos (Figura 6):

- a) Formación de nata/crema o sedimentación
- b) Coalescencia
- c) Agregación o floculación

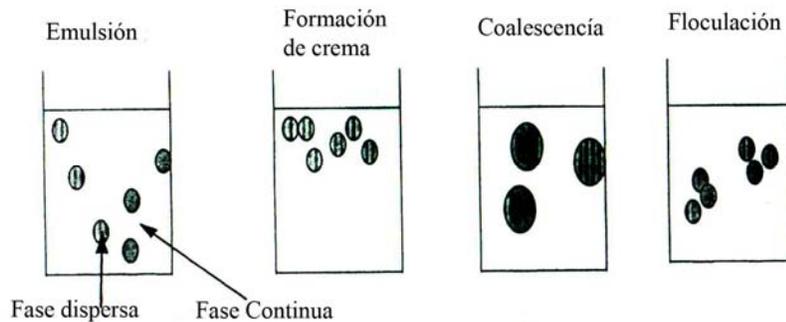


Figura 6. Esquematización de estados de desestabilización de una emulsión (Hill, 1996).

a) Formación de nata/crema o sedimentación. Es ocasionada por el movimiento de la fase dispersa por la diferencia de densidades entre las dos fases, normalmente la fase oleosa es menos densa que la acuosa. Cuando hay menor volumen de la fase dispersa a este proceso se le llama cremado, pero a volúmenes mayores se le conoce como drenado.

La expresión para determinar la velocidad de formación de crema se puede obtener a partir de la Ley de Stokes, en donde:

$$\text{Velocidad} = \frac{g\Delta\rho d^2}{18\eta_0}$$

En donde g es la fuerza de gravedad, $\Delta\rho$ es la diferencia de densidades entre las fases, d es el diámetro de la gota y η_0 es la viscosidad de la fase continua.

Si la formación de crema se puede explicar mediante esta Ley, la cual se aplica estrictamente a esferas rígidas moviéndose a velocidades bajas, las acciones para reducir el proceso serían:

1. Igualar las densidades de la fase continua y dispersa.
2. Aumentar la viscosidad del medio de dispersión.
3. Reducir el tamaño de gota.

Dado que es un proceso reversible y por la dificultad que representa en emulsiones alimenticias igualar las densidades de las fases, se recurre muchas veces a desviar la atención del consumidor mediante la utilización de envases que oculten el producto.

b) Coalescencia. Ocurre cuando las fuerzas de atracción son lo suficientemente grandes para vencer la barrera energética y juntar las gotas lo suficiente para romper la capa estabilizante y formar gotas más grandes. Como se dijo anteriormente esto se debe a la necesidad del sistema de permanecer en el estado de mínima energía disminuyendo el área de contacto para llegar al equilibrio.

c) Agregación o floculación. La floculación se define como la agregación irreversible de las gotas de grasa, unidas entre sí por fuerzas débiles. En una emulsión estable se previene la floculación mediante fuerzas electrostáticas o estéricas. El nivel de floculación dependerá como se dijo anteriormente del volumen de la fase oleosa, la magnitud de las fuerzas entre las gotas, así como de la concentración de proteína. Así mismo es importante la concentración de proteína ya que, si es baja, es posible que dos o más gotas compartan las moléculas de proteína y esto puede hacer que floculen más fácilmente (Hill,1996).

MEDICIÓN DE PROPIEDADES EMULSIFICANTES

La emulsificación es un proceso complejo que involucra la participación de diversas áreas del estudio de las proteínas. Los mecanismos que forman, estabilizan o desestabilizan las emulsiones han sido estudiados exhaustivamente, pero su medición no se ha logrado estandarizar y por lo tanto no resulta fácil comparar entre las diversas técnicas. Además, el estudio de estos mecanismos se basa en modelos que la mayoría de las veces no concuerdan con lo que ocurre en sistemas reales. Por lo tanto se han desarrollado pruebas más prácticas

llamadas también pruebas *ad hoc* que, aunque carecen de estandarización, permiten una mejor aproximación del comportamiento real del sistema (Hill, 1996). Tres de las determinaciones más utilizadas para cuantificar las propiedades emulsificantes de una proteína son: 1) Índice de Actividad Emulsificante (IAE), 2) Estabilidad de Emulsión (EE) y Capacidad Emulsificante (CE).

i) Índice de Actividad Emulsificante (IAE). Se define como la máxima área interfacial que puede formar una determinada cantidad de proteína en una emulsión. Se calcula en m^2 o cm^2 y normalmente se expresa por gramo de proteína. Es una medida indirecta del tamaño de gota obtenido en la emulsión.

ii) Estabilidad de Emulsión (EE). La estabilidad de emulsión ya definida anteriormente (pág 17), se expresa en función del tipo de fenómeno que se desee medir. En general se mide la estabilidad al medir el volumen de emulsión después de transcurrido un tiempo determinado o la resistencia a la coalescencia al aplicar una fuerza centrífuga.

iii) Capacidad Emulsificante (CE). Se define como la máxima cantidad de aceite que es capaz de emulsificar una cierta cantidad de proteína antes de la inversión, bajo condiciones específicas. Se expresa generalmente como ml de aceite por gramo de proteína. La mayoría de los aceites vegetales se pueden utilizar de manera satisfactoria. Existen tres indicadores de la inversión de una emulsión: i) el cambio en la apariencia, ii) la caída repentina de viscosidad y iii) el aumento en la resistencia eléctrica (Hill, 1996).

c. Propiedades espumantes

La propiedad de las proteínas de formar espumas estables es importante en la producción de diversos alimentos. Una espuma se puede definir como un sistema bifásico que consiste de celdas de aire o CO_2 dispersas en una fase continua líquida o semisólida (Cheftel *et al*, 1985). La capa líquida que las separa es conocida como fase lamelar o lamela. Las espumas alimentarias son generalmente, al igual que las emulsiones, sistemas muy complejos que incluyen mezclas de gases, líquidos, sólidos y surfactantes. La mayor diferencia entre las espumas y las emulsiones es que en las espumas la fracción de volumen ocupada por la fase dispersa (gas) varía en un intervalo mucho más amplio que en las emulsiones. La

distribución de las burbujas de aire por tamaño en la espuma influye en la apariencia y propiedades de textura del producto (Wilde, 1996).

Los agentes espumantes más utilizados en alimentos son: clara de huevo, gnetina, caseínas y otras proteínas de leche, proteínas de soya y gluten. Las proteínas varían significativamente en sus propiedades espumantes. En general un buen agente espumante debe poseer las siguientes características:

- 1) Debe estabilizar la espuma rápida y efectivamente a bajas concentraciones
- 2) Ser buen agente espumante en el intervalo de pH que prevalece en diversos alimentos
- 3) Permanecer como buen agente espumante en el medio con inhibidores de espuma tales como grasa, alcoholes y sustancias saborizantes (Zayas, 1997).

MECANISMO DE FORMACIÓN DE UNA ESPUMA

El mecanismo de formación de una espuma es muy similar al de formación de emulsiones y se compone de tres pasos fundamentales:

- I. Difusión de proteínas globulares solubles a la interfase aire-agua, reduciendo la tensión superficial.
- II. Desdoblamiento de las proteínas en la interfase con la orientación de los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos a las fases acuosa y no acuosa.
- III. Interacción de polipéptidos para formar una película con desnaturalización parcial y coagulación. Las proteínas se adsorben rápidamente en la interfase y forman una película estable alrededor de las burbujas de aire lo que promueve la formación de la espuma.

Para la generación de espumas (Figura 7), se pueden utilizar diversos métodos. Entre los más importantes se encuentran:

- a) Burbujeado (Sparging). Este método consiste en introducir gas en un líquido, vía una abertura que crea burbujas y posteriormente una espuma. Es fundamentalmente una técnica para investigación ya que permite la liberación de volúmenes controlados y velocidades específicas de flujo de un gas determinado. Es el método más lento pero se obtiene un tamaño inicial de burbuja constante.
- b) Batido (Whipping). Involucra el movimiento a alta velocidad de espas en un líquido, introduciendo aire atmosférico. Es el método más popular en la industria. Produce las espumas más estables y disminuye progresivamente el tamaño de burbuja. Se monitorean

diferentes parámetros como la capacidad de espumado y la estabilidad de la espuma. El tipo y velocidad de batidoras, así como el tamaño y forma del recipiente provocarán variación en los resultados.

c) Agitación (Shaking). La agitación es un método simple que tiene poca relevancia industrial. Comúnmente se asocia a la generación de espuma no deseada. Es necesario en ciertos productos como aerosoles, para la distribución de aire previo a la generación de la espuma final.

d) Vaciado (Pouring). Consiste únicamente en vaciar el contenido de un producto en otro recipiente. Método de interés comercial en ciertas industrias como la cervecera. Se ha intentado estandarizar para permitir la comparación de resultados (Wilde, 1996).

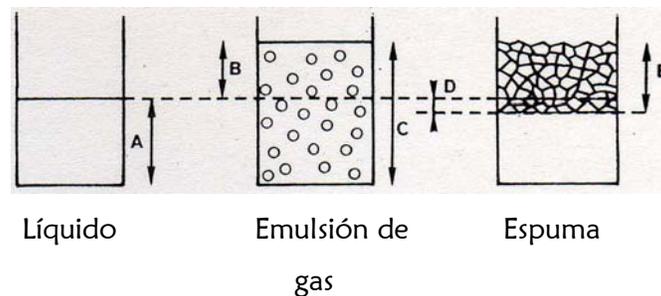


Figura 7. Representación esquemática de la formación de una espuma. A= Volumen de líquido, B= Volumen de gas incorporado; C= Volumen total de dispersión; D= Volumen de líquido en espuma y E= Volumen de espuma. (Cheftel & col, 1985)

FACTORES QUE AFECTAN LA FORMACIÓN Y ESTABILIDAD DE UNA ESPUMA

A) Solubilidad de proteína. Numerosos estudios resaltan la importancia de este parámetro como un requisito para obtener buena capacidad espumante y estabilidad de espuma, sin embargo se ha descubierto que la fracción insoluble es a su vez benéfica para la estabilización de espumas al incrementar la viscosidad, lo que a su vez disminuye la velocidad de coalescencia. Por esto aún cuando en el punto isoeléctrico el incremento de volumen o sobrerendimiento no sea bueno, la estabilidad de espuma sí lo es. Esto se explica porque en el punto isoeléctrico aumenta el grosor y rigidez de las películas de proteína adsorbidas en la interfase aire-agua por la generación de atracciones electrostáticas intermoleculares.

B) Concentración de sales. La presencia de sales puede afectar las propiedades espumantes de una proteína al afectar su solubilidad, viscosidad, desdoblamiento y agregación. El aumento en la concentración de NaCl disminuye la viscosidad reduciendo con esto la

estabilidad de la espuma pero aumentando el sobrerendimiento. Por otra parte la presencia de iones calcio podría mejorar la estabilidad por la formación de puentes con los grupos carboxilo de la proteína, lo que permite reforzar la red formada por las proteínas.

C) Concentración de azúcares. La presencia de azúcares ocasiona el aumento de la estabilidad de espuma por el incremento de la viscosidad del medio. Los azúcares previenen la desnaturalización térmica y bajan la capacidad de espumado por inhibición de incorporación de burbujas de aire.

D) Concentración de lípidos. La presencia de lípidos interfiere desfavorablemente en el proceso de formación de una espuma. Estas moléculas con actividad superficial afectan la conformación de las películas adsorbidas de proteínas al situarse en la interfase aire-agua, impidiendo la interacción proteína-proteína. Ejemplos de esto son las proteínas de soya, huevo o suero de leche, las cuales presentan mejores capacidades espumantes cuando están aisladas comparadas a cuando están acompañadas de la parte lipídica.

E) Concentración de proteína. El incremento en la concentración de proteína (hasta un 10%), permite elevar la estabilidad de la espuma en mayor grado que el sobrerendimiento. Un máximo sobrerendimiento se alcanza cuando la concentración de proteína en la fase líquida inicial está en el intervalo de 2-8 % p/v. Esto permite una viscosidad favorable de la fase líquida y un grosor apropiado de la película adsorbida.

F) Condiciones de batido. Para formar una espuma adecuada, la duración e intensidad del batido deben ser tales que permitan un adecuado desdoblamiento y adsorción de la proteína en la interfase. Una agitación intensa puede provocar una disminución en el sobrerendimiento y en la estabilidad de la espuma. Algunas proteínas como la del huevo pueden agregarse y coagularse en la interfase aire-agua. Estas proteínas ahora insolubles no se adsorben apropiadamente en la interfase ocasionando que la viscosidad del líquido lamelar sea insuficiente para lograr una buena estabilidad de espuma.

G) Tratamiento térmico. Los tratamientos térmicos moderados previos a la formación de la espuma pueden mejorar ciertas propiedades espumantes de proteínas como soya, suero y huevo. Estos tratamientos pueden mejorar el sobrerendimiento pero disminuyen la estabilidad. Los tratamientos más severos provocan la pérdida de la capacidad espumante. El calentamiento de las espumas ocasiona la expansión del aire, la disminución de la viscosidad, ruptura de burbujas y colapso de la espuma, a menos que la gelificación de la proteína contribuya a obtener la rigidez suficiente para que la película adsorbida estabilice la espuma (Zayas, 1997).

ESTABILIDAD DE ESPUMA

Los tres atributos más importantes que sirven para estabilizar espumas son: 1) disminución de la tensión interfacial, 2) alta viscosidad de la fase líquida y 3) formación de películas fuertes y elásticas de proteínas adsorbidas. Para lograr esto, las proteínas se adsorben en la interfase e interactúan una con otra mediante la formación de enlaces hidrofóbicos, de hidrógeno y covalentes, para formar así la capa viscoelástica rígida necesaria (Wilde, 1996). La estabilidad es afectada por el pH del medio. La estabilidad aumenta en valores cercanos al punto isoeléctrico ya que en éste disminuye el número de repulsiones electrostáticas, que impiden la unión de las proteínas.

Las espumas pueden sufrir tres mecanismos de desestabilización:

- a) Drenado del líquido lamelar. Esto puede ser ocasionado por la gravedad, diferencias de presión y/o evaporación. En espumas de baja densidad, las burbujas tienden a permanecer muy juntas y esto favorece el drenado del líquido de la lamela. El drenado disminuye cuando la fase líquida es viscosa. La viscosidad superficial depende de la fuerza entre interacciones proteína-proteína y proteína-agua.
- b) Difusión de gas de burbujas pequeñas a burbujas grandes. Esta desproporción es resultado del grado de solubilización del gas en la fase acuosa.
- c) Ruptura de la fase lamelar que separa a las burbujas de aire. Resulta en el aumento del tamaño de burbuja hasta llegar a la coalescencia, y por último se desencadena el colapso de la espuma. Hay una interdependencia entre el drenado y la ruptura ya que la ruptura incrementa el drenado y el drenado disminuye el grosor y la fuerza de la lamela (Cheftel, 1985).

MÉTODOS DE MEDICIÓN DE ESPUMAS PROTEÍNICAS. PROPIEDADES ESPUMANTES.

Las espumas son sistemas de difícil estudio, ya que son dinámicos y de estabilidad transitoria.

Existen varios métodos para determinar las propiedades espumantes de las proteínas la selección dependerá entre otras cosas, de qué método se use para formarlas: burbujeado, batido o agitado. Se cuenta con métodos en diferentes niveles, desde la medición directa o descripción física (volumen de espuma, tamaño de burbuja y estabilidad), o estudios más detallados de mayor resolución, microscópicos y moleculares.

Los métodos se pueden clasificar en métodos directos o indirectos dependiendo del parámetro a medir.

Los métodos directos pueden ser divididos en tres áreas:

- 1) Determinación del volumen de espuma o del líquido drenado. Es el parámetro más común para definir una espuma. La capacidad de espumado generalmente se expresa en función del volumen de espuma que se genera en ciertas condiciones de trabajo (tiempo de espumado, volumen de gas, etc.) o del volumen de líquido drenado en las mismas condiciones. La medición se realiza generalmente a simple vista en contenedores con volúmenes marcados, o mediante el análisis de imagen.
- 2) Propiedades fisicomecánicas de la espuma. Las propiedades físicas de la espuma se determinan midiendo la estabilidad o la capacidad de espumado. De los parámetros más importantes se encuentran la medición de la densidad y la viscosidad de la espuma.
- 3) Propiedades de las burbujas. Las burbujas como componentes fundamentales de las espumas se han estudiado por separado principalmente para la identificación de los mecanismos de estabilización de proteínas. La medida más común es la distribución del tamaño de burbuja, lo que provee de información de ruptura y desproporción del tamaño de burbuja en un tiempo determinado (Wilde, 1996).

En cuanto a los métodos indirectos, son aquéllos que se hacen en un sistema modelo en lugar de en la espuma directamente. Se pueden destacar tres:

- 1) Técnicas de análisis de superficie en interfases planas microscópicas. Involucran el estudio de tensión superficial, viscosidad superficial y elasticidad superficial.
- 2) Estudios de capas delgadas. Se refiere al estudio de películas líquidas delgadas suspendidas en aire. Son un buen modelo de la lamela de las espumas.
- 3) Medición de propiedades intrínsecas de las proteínas. Se refiere a propiedades como la estructura, hidrofobicidad superficial, carga, pI y flexibilidad de la proteína que contribuyen a las propiedades de espumas estabilizadas por éstas.

Una vez seleccionado el método de medición de acuerdo a los objetivos del estudio, se debe tomar en cuenta la manera en que se expresará cada una de las propiedades medidas. Existen diversas expresiones para las propiedades espumantes que relacionan diferentes parámetros del objeto de estudio. A continuación se describen las más comunes:

i) Capacidad de espumado. Se pueden utilizar varias expresiones para describir la capacidad espumante, las tres principales son:

a) Volumen de espuma en estado estacionario o “steady state”. La expresión más simple y popular es el volumen de espuma generado en un tiempo definido, V_f . Este valor depende de un número de parámetros principalmente el volumen inicial, V_i . La expansión de la espuma (expansión de volumen) FE% es V_f expresada como un porcentaje del V_i y se calcula normalmente con la siguiente fórmula:

$$FE\% = (V_f/V_i) * 100$$

b) Sobrerendimiento u “Overrun”. Para sistemas batidos es más difícil medir el volumen de espuma con precisión, por lo que se utiliza el peso. Para dichos sistemas una muestra de líquido se pesa, W_i y después se pesa el mismo volumen de espuma, W_f , la expansión de la espuma se calcula como % de sobrerendimiento:

$$\% \text{ Sobrerendimiento} = (W_i - W_f)/W_i * 100$$

Ambos FE% y el porcentaje de sobrerendimiento se usan en sistemas donde el volumen de la espuma es lo más importante.

No obstante el porcentaje de sobrerendimiento no provee información del volumen de espuma, que se infiere porque se usa en sistemas batidos en donde normalmente toda la muestra se incorpora en la espuma. Este valor es entonces engañoso en un sistema en donde no todo el líquido se incorpora en la espuma.

Para corregir esto el porcentaje de sobrerendimiento debe ser normalizado al porcentaje de V_i en la espuma después del espumado. Entonces el porcentaje de sobrerendimiento se convierte en:

$$\% \text{ Sobrerendimiento} = (W_i - W_f)/W_i * (V_{ii} - V_{io})/V_{ii} * 100$$

Donde el V_{io} es el volumen del líquido que queda después del espumado.

c) Poder espumante. Se define como la relación entre el volumen de gas en espuma y el volumen de líquido en espuma por 100.

ii) Estabilidad de la espuma. Como en el caso de las emulsiones las expresiones de estabilidad de una espuma estarán dadas en función del mecanismo de desestabilización que se quiera monitorear. En general la determinación se basa en el cambio en el volumen de espuma a través del tiempo. Las expresiones varían de la misma manera que las expresiones para la capacidad de espumado y destacan las siguientes:

a) La estabilidad expresada en la forma más simple es el volumen de espuma después de un cierto tiempo V_{ft} . Este valor por sí sólo no tiene valor comparativo, es por esto que la estabilidad se expresa más comúnmente como la estabilidad del volumen de espuma FVS%, por sus siglas en inglés, a un tiempo t:

$$FVS\%_t = (V_{ft}/V_{fo}) * 100\%$$

El problema en este caso es que la consideración del tiempo se hace arbitrariamente. Es por esto que para homologar criterios se utiliza el tiempo de vida media, es decir el tiempo que se colapsa la mitad de la espuma. También se puede tomar el tiempo total del colapso pero sólo para espumas de vida corta.

b) Otra de las medidas más importantes de la estabilidad es el volumen de líquido drenado, sólo el volumen de líquido V_{lt} no es un valor útil pero se expresa normalmente como una proporción del volumen de muestra inicial V_{li} y el volumen de líquido inmediatamente después del espumado ($t=0$), V_{lo} . Esto se refiere como la estabilidad del líquido de la espuma:

$$FLS\% = (V_{li}-V_{lt})/(V_{li}-V_{lo}) * 100$$

También se puede tomar el tiempo de vida media (Wilde, 1996).

En resumen el análisis de las propiedades espumantes es generalmente sencillo. Sin embargo se debe ser cuidadoso para definir cuáles son los valores de importancia (volumen, drenado o densidad).

Además de los factores ya descritos, la elaboración de un protocolo de estudio de las propiedades funcionales de las proteínas, requiere del establecimiento de dos factores principales:

- a) Los objetivos del trabajo o aplicación
- b) El sistema de proteína en estudio

Los sistemas de proteína que se han estudiado se pueden dividir en tres grupos generales:

- a) Proteínas puras. Son modelos de un componente o multicomponentes que contienen proteínas purificadas.
- b) Extractos de proteína. Extraídas de una variedad de fuentes se usan comúnmente en espumas comerciales y pueden tomarse como sistemas reales.
- c) Sistemas reales. Se refiere al estudio de productos finales comerciales. Los principales sistemas estudiados son la clara de huevo y la cerveza.

Cada uno requiere de consideraciones particulares para obtener datos de utilidad para el estudio realizado.

2. Modificación de proteínas

Aunque existen una gran cantidad de proteínas con excelentes propiedades funcionales en un amplio intervalo de condiciones (proteínas de leche, soya, huevo, etc.), también se encuentran otras cuya funcionalidad es baja en las condiciones predominantes de los alimentos. Para mejorar la funcionalidad de dichas proteínas, entre las que destacan un sinnúmero de proteínas vegetales, se han desarrollado diversos métodos encaminados a la modificación de sus características y propiedades fisicoquímicas iniciales.

Métodos como la hidrólisis enzimática, la desamidación química, la acilación y la fosforilación han demostrado ser útiles para mejorar las propiedades funcionales de diversas proteínas (Chan & Ma, 1999; Franzen & Kinsella, 1976; Matsudomi, Sasaki, Kato & Kobayashi, 1985, van Boekel, 1999). Dentro de éstos la desamidación química ha sido utilizada en proteínas vegetales como las provenientes de soya, trigo, avena y maíz (Matsudomi et al, 1985; Matsudomi et al 1982; Ma & Khanzada, 1987; Flores, 1997 (Tesis Maestría), Cabra, 2002 (Tesis Maestría) demostrándose la mejora en propiedades como solubilidad y propiedades emulsificantes de estas proteínas.

a. Desamidación química

Las proteínas contienen residuos tanto de ácido aspártico como de ácido glutámico así como sus derivados amidados (residuos de asparagina y glutamina). En particular, las proteínas vegetales contienen una alta proporción de estos últimos. Por ejemplo la proteína de soya contiene 1.617 g de N amidico/100 g de proteína, lo que equivale a 14.8 g de residuos de glutamina o 13.2 g de residuos de asparagina por cada 100 g de proteína. En el caso de gluten de trigo se encuentran 0.98 g de N amídico por 100 g de proteína, equivalente a 8.97 g de residuos de glutamina o 7.99 gramos de residuos de asparagina por cada 100 g de proteína (Vojdani & Whitaker, 1994).

Se ha demostrado que la desamidación de los residuos de asparagina y glutamina produce un aumento en la densidad de carga de la proteína, causando cambios en su conformación debidos principalmente a la repulsión electrostática, exponiéndose a su vez una mayor proporción de residuos hidrofóbicos en la superficie de la proteína (Mimouni et al, 1994; Vojdani, 1994). Debido a su estructura los residuos de asparagina tienen una mayor susceptibilidad a la reacción de desamidación que los de glutamina (Reubsaet *et al*, 1998).

La desamidación de una proteína puede ser catalizada en condiciones ácidas (pH menor a 3) o en condiciones básicas (pH arriba de 8) a velocidades que dependen de: la concentración de H⁺ y OH⁻, la temperatura del tratamiento, los residuos adyacentes y el mecanismo predominante. Esta reacción involucra dos reacciones que son competitivas (Figura 8). La reacción 1 involucra el ataque del N del enlace peptídico al C del carbonilo del grupo amida produciendo un intermediario cíclico (II) y NH₃. La otra vía ocurre por una protonación del O del carbonilo o por un ataque nucleofílico del OH⁻ en el C del carbonilo expulsando NH₃, sin producir el intermediario cíclico (III) (Vojdani, 1994).

Los cambios en la hidrofobicidad y polaridad al ser modificada la amida a un ácido carboxílico, la masa, la carga (introducción de una cadena lateral ácida en lugar de neutra) así como la formación de amoniaco, se pueden usar como parámetros para monitorear la reacción de desamidación (Reubsæet *et al*, 1998).

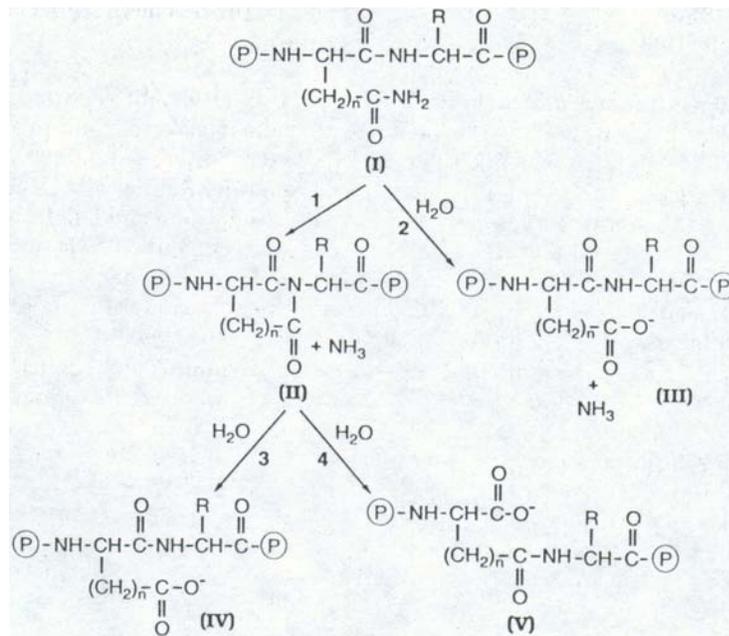


Figura 8. Mecanismo de desamidación de proteínas (Vojdani, 1994)

b. Hidrólisis

La funcionalidad de las proteínas alimentarias se puede mejorar por medio de su hidrólisis parcial utilizando tratamientos ácidos, alcalinos o enzimáticos. La hidrólisis ácida es un

tratamiento rápido y poco costoso, y aunque pueden contener altas concentraciones de sal, ésta se puede remover por ultrafiltración. Los hidrolizados se pueden separar en fracciones que tienen diferentes propiedades y composición, sin embargo, la hidrólisis ácida, ocasiona isomerización y destrucción de algunos aminoácidos, principalmente triptofano, serina, treonina y aminoácidos azufrados, especialmente cisteína (Pomeranz, 1991).

La hidrólisis enzimática es un tratamiento más específico que la hidrólisis química y ha resultado conveniente para mejorar algunas propiedades funcionales de proteínas vegetales. La reacción de hidrólisis se controla midiendo el grado de hidrólisis (GH), que se define como el porcentaje de enlaces peptídicos que se rompen. En condiciones neutras o ligeramente alcalinas, el grado de hidrólisis se puede monitorear por medio del pH, debido a que la cantidad de base necesaria para mantener un pH constante es proporcional al grado de hidrólisis. La reacción se termina a un valor de grado de hidrólisis dado en el cual se obtengan las propiedades deseadas.

Los tratamientos alcalinos facilitan la extracción de proteínas de diversos alimentos. Este método se utiliza comúnmente para mejorar la solubilidad, aumentar el poder emulsificante y espumante, inactivar enzimas y destruir toxinas, inhibidores enzimáticos y alergenicos. Dependiendo de la concentración, temperatura y duración del tratamiento, la alcalinidad puede ocasionar la pérdida, desagregación, despolimerización o hidrólisis de las proteínas. El grado de hidrólisis va desde la formación limitada de polipéptidos hasta el desprendimiento de grandes cantidades de aminoácidos. Los tratamientos alcalinos ocasionan la formación de dehidroalanina a partir de cisteína y serina por reacciones del tipo β -eliminación. La dehidroalanina reacciona con el grupo ϵ -amino de la lisina y forma lisinoalanina. Esto puede resultar en entrecruzamiento de los polipéptidos, dando como resultado proteínas resistentes a la proteólisis y causando la reducción de su valor nutricional. Además de lisinoalanina se pueden formar lantionina y ornitioalanina durante la reacción de dehidroalanina con cisteína y ornitina, respectivamente. Por esta razón el tratamiento alcalino puede reducir el valor nutricional de las proteínas por causa de la racemización, entrecruzamiento o destrucción de ciertos aminoácidos (lisina, serina, treonina, arginina, isoleucina y metionina) (Pomeranz, 1991).

3. Proteínas vegetales. El maíz.

El maíz (*Zea mays L.*) es junto con el arroz (*Oryza sativa L.*) y el trigo (*Triticum aestivum L.*), uno de los tres cultivos más importantes a nivel mundial. De acuerdo con la FAO (Food and Agricultural Organization), en el año 2006 alrededor del 50 % de la producción total mundial de maíz (Total mundial = 695.23 millones de toneladas) se realizó sólo en el continente americano. En México, centro de origen y diversificación del maíz, constituye la base de su economía, con una producción en ese año de 21.8 millones de toneladas al año, lo que constituyó el 3.2 % de la producción mundial (Farnham, 2003). Además del consumo directo, el maíz es materia prima para diversos procesos industriales como la obtención de almidón y aceite.

a. Composición del grano de maíz.

El maíz es un producto generalmente considerado como fuente de calorías por su alto contenido de almidón (Tabla 3), sin embargo su contenido de proteína y el volumen de producción, lo hacen una fuente importante de este componente a partir de productos vegetales, superado únicamente por la proteína de soya (Lawton, 2003).

TABLA 3. COMPOSICIÓN PROXIMAL DEL GRANO DE MAÍZ*		
% base seca	INTERVALO	PROMEDIO
Almidón	61-78	71.7
Proteína	6-12	9.5
Grasa	3.1-5.7	4.3
Cenizas	1.1-3.9	1.4
Pentosanos (xilosa)	5.8-6.6	6.2
Fibra (residuo de detergente neutro)	8.3-11.9	9.5
Celulosa+lignina (residuo de detergente ácido)	3.3-4.3	3.3
Azúcares (glucosa)	1.0-3.0	2.6

*Fuente: Watson, 2003

i) Proteínas del maíz

El contenido de proteína en el grano de maíz difiere dependiendo del tipo, variedad, condiciones agronómicas y otros factores. Varía de 6-18%.

En el caso de las proteínas de semillas, sus propiedades químicas se definen de acuerdo al método de clasificación de Osborne (Abe, 1989), el cual las divide en cuatro grupos de acuerdo a su solubilidad:

1. Albúminas (solubles en agua)
2. Globulinas (insolubles en agua pero solubles en soluciones salinas)
3. Prolaminas (solubles en soluciones alcohol-agua)
4. Glutelinas (insolubles en alcohol-agua pero solubles en soluciones alcalinas)

También se usan otras clasificaciones por morfología, función biológica o composición química.

Aproximadamente el 80% del total de proteína del grano del maíz se encuentra en el endospermo. La función fisiológica del endospermo es el almacenamiento de materiales que serán consumidos en las etapas tempranas de la germinación de la semilla. Es por esto que las fracciones proteínicas más importantes en el endospermo son las prolaminas y las glutelinas. La prolamina del maíz, llamada zeína, es una proteína de reserva que es hidrolizada por las proteasas durante la germinación, aportando los aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas. Esta proteína se encuentra en los llamados cuerpos proteicos. Por otro lado las glutelinas, que no son consideradas como proteínas de reserva se encuentran en la matriz proteica. La distribución del nitrógeno en el grano de maíz se presenta en la Tabla 4 (Abe, 1989).

FRACCIÓN	Endospermo	Germen	Total
Nitrógeno no-proteico	4.7	22.8	8.0
Albúminas	2.7	40.2	8.3
Globulinas	3.1	12.7	4.6
Prolaminas (zeína)	51.6	2.5	41.8
Glutelinas	33.5	18.0	29.8
Insoluble	4.4	3.8	7.5

* Fuente: Abe,1989

b. Gluten de maíz

i) Obtención del gluten de maíz. Molienda húmeda.

La molienda húmeda es un proceso diseñado para separar el maíz en sus componentes (almidón, aceite, proteína y fibra) y purificarlos haciéndolos adecuados para su uso como ingredientes en alimentos, piensos y productos industriales, o como materia prima para convertirlos en otros productos con valor agregado. El gluten de maíz es un sub-producto de la molienda húmeda del maíz. El proceso de la molienda húmeda se describe en el siguiente diagrama (Figura 9):

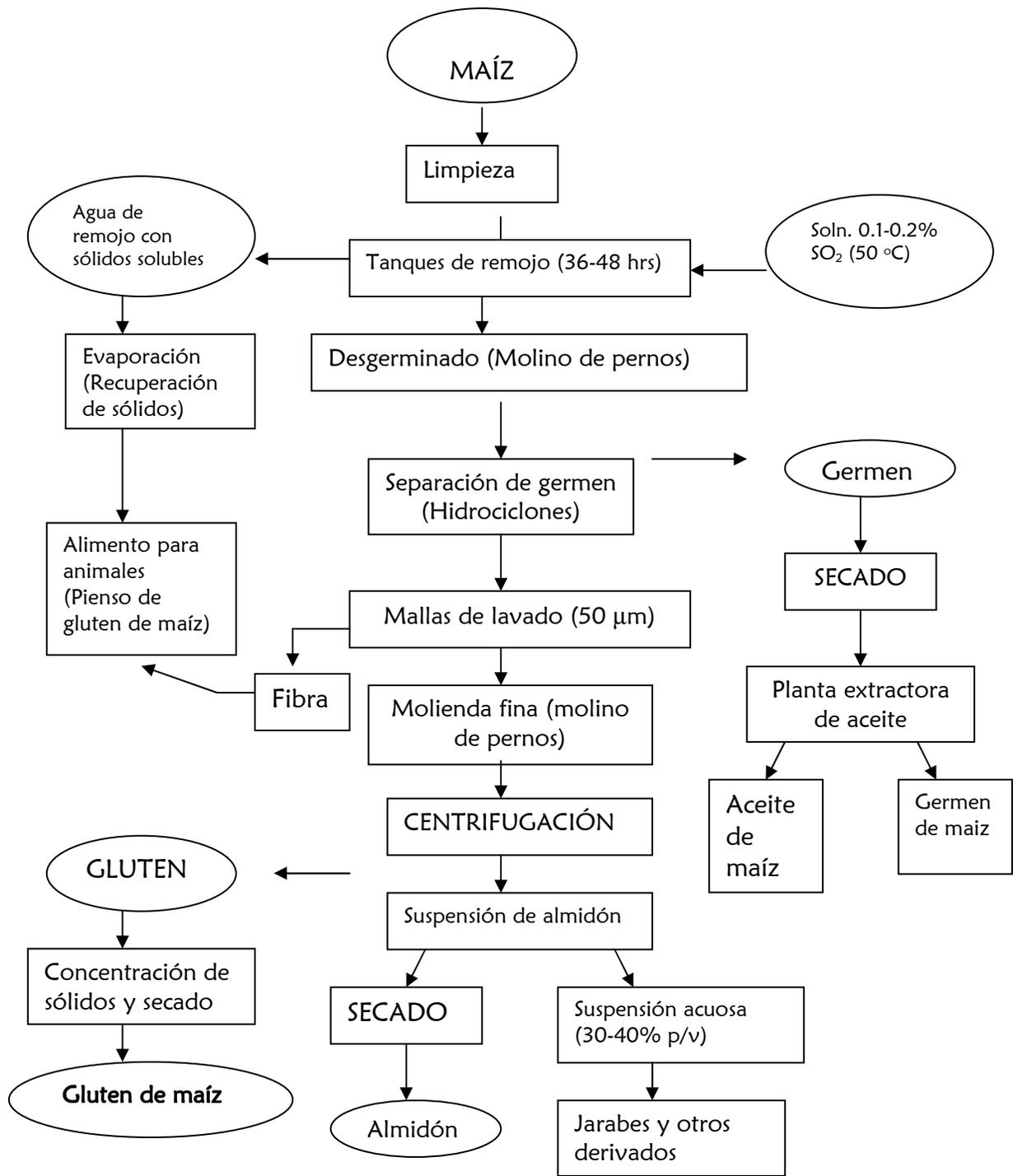


Figura 9. Proceso de molienda húmeda del maíz (Serna, 1996)

La molienda húmeda del maíz se ha convertido en una industria que busca el máximo aprovechamiento de cada componente del grano de maíz. Además de la obtención de almidón y de aceite, la industria se ha convertido en una importante fuente de productos secundarios utilizados como ingredientes en otros procesos.

El proceso comienza con la llegada del maíz. Este se muestrea y se hacen pruebas para verificar su calidad. Posteriormente pasa por un sistema de limpieza para ser transportado después a tanques en donde se remoja por 30-50 horas a 50 °C en una solución diluida de dióxido de azufre. Este proceso tiene como objetivo suavizar al grano. Durante el remojo, se separan del grano algunos componentes solubles. El agua se evapora en un proceso posterior y se obtiene lo que se conoce como extracto condensado de maíz. Continuando con la molienda, el germen es removido del grano que ha sido remojado. Este se procesa posteriormente para recuperar el aceite. La fracción residual, germen de maíz (húmedo o seco) se utiliza para piensos. Después de removido el germen, el resto del grano se procesa para remover la fibra, dejando el almidón y el gluten (proteína). La fibra se combina con otras fracciones obtenidas en el proceso (como el extracto condensado) para producir lo que se conoce como pienso de gluten de maíz. La fracción de almidón y proteína remanente se envía a centrifugas que provocan que la proteína del gluten, que es más ligera, permanezca en la superficie y que el almidón precipite. La proteína del gluten pasa por un proceso de concentración y secado para formar el gluten de maíz, que contiene una concentración de proteína de alrededor del 60%. Una parte del almidón se lava y se seca, o se modifica y se comercializa en la industria de alimentos, papel y textiles. El almidón remanente se puede procesar para obtener edulcorantes o etanol. Los subproductos obtenidos de este proceso: condensados, fibra, germen y gluten representan el 25-30% del maíz procesado (Serna, 1996; Abe, 1989; Johnson, 2003).

Los rendimientos típicos de la industria de la molienda húmeda del maíz se muestran en la siguiente tabla:

TABLA 5. RENDIMIENTOS TÍPICOS DE LA MOLIENDA HÚMEDA*	
PRODUCTO	RENDIMIENTO (%)
Almidón	67.5
Germen	7.5
Gluten	5.0
Fibra	11.5
Sólidos solubles en agua de remojo	7.6

*Fuente: Johnson, 2003

ii) Composición del gluten de maíz.

Por las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso, la fracción conocida como gluten de maíz es de alto contenido proteínico. El gluten que se obtiene comercialmente tiene un contenido de aproximadamente 60% de proteína, proteína que consiste debido a su proceso de obtención en una mayor proporción de zeína (68%) y glutelina (27%) con pequeñas cantidades de globulinas (1.2%) (Abe, 1989; Wu, 2001). El porcentaje restante está compuesto por residuos de almidón, aceite y fibra.

Debido a que las prolaminas son las proteínas más abundantes del endospermo, específicamente la zeína, se han realizado numerosos estudios con el fin de lograr su identificación, clasificación, caracterización y separación de sus componentes (Cabra et al, 2005). La clasificación se da en función tanto de las diferencias de solubilidad, como de las diferencias estructurales y tamaño.

La zeína, que como ya se describió es la proteína más abundante en el endospermo (44-79%) y por lo tanto es componente principal del gluten de maíz, ha sido estudiada y se han identificado diferentes fracciones que difieren en solubilidad y características estructurales. En general se han identificado cuatro grupos de zeínas (Lawton, 2003), que son:

1) α -zeína. Es soluble en 2-propanol al 90%. Es la prolamina más abundante ya que constituye el 70 % del total. Se identifican dos: una de 19 y una de 22 kDa. Su composición de aminoácidos es bien conocida, destacando su bajo contenido en lisina y aminoácidos básicos y altos niveles de residuos hidrofóbicos como alanina y leucina. Muchos de los genes que codifican para la α -zeína han sido clonados y secuenciados. Confirman que tiene un alto contenido de Asparagina y Glutamina, y carecen de lisina.

2) γ -zeína. Soluble en 2-propanol con acetato de sodio 30 mM El contenido de aminoácidos es muy diferente al de la α -zeína y se caracteriza por ser rica en prolina.

3) β -zeína. Insoluble en ambas soluciones (2-propanol al 90% y 2-propanol y acetato de sodio 30 mM).

4) δ -zeína. Representa menos del 5% de la zeína total del endospermo. Es rica en metionina y tiene características de solubilidad similares a las α -zeínas.

Las proteínas del gluten de maíz no poseen una funcionalidad considerable si se comparan con otras proteínas comerciales como pueden ser las de soya o las proteínas de la leche (caseína).

Esto se relaciona con su baja solubilidad en sistemas acuosos y a las condiciones de pH y fuerza iónica que prevalecen en los sistemas alimentarios. Sin embargo se ha demostrado que por medio de modificaciones químicas como la desamidación, estas propiedades funcionales pueden mejorar, resultando en un producto con posibilidades de aplicarlo en sistemas alimentarios como ingrediente o como aditivo (Flores, 1997).

iii) Usos actuales y posibilidades en la industria alimentaria.

El gluten de maíz es actualmente utilizado en la industria pecuaria en donde es apreciado como fuente de proteína para alimentación de cabras y aves, por sus características nutrimentales, así como por su contenido de carotenos y xantofilas, necesario en el caso de las aves, ya que dan color a la piel y a la yema del huevo. Sin embargo en ocasiones esta característica impide que se utilice para otros animales como el pescado en donde el aporte de color es indeseable. Por lo anterior se han desarrollado procesos para la decoloración del gluten como la extracción con solventes con el fin de eliminar el pigmento y poder utilizarlo en salmón y pescados de carne blanca (Park *et al*, 1997). Actualmente se sabe que la luteína, que es valiosa por su actividad biológica, es uno de los carotenos que están protegidos por la α -zeína (Momany, 2006).

Además de la utilización como alimento animal, el gluten ha sido ampliamente utilizado por sus características como herbicida, por sus propiedades como inhibidor del desarrollo de raíces, y la zeína, única proteína comercial aislada del maíz, ha sido utilizada en recubrimientos en la industria confitera (Lawton, 2003). Otra de sus aplicaciones de importancia industrial es su utilización como polímero biodegradable debido a su comportamiento termoplástico (Aithani & Moharthy, 2006).

Además del pigmento otra de las características que lo hacen poco atractivo para su utilización en la industria de alimentos para humanos, es la baja funcionalidad de sus proteínas. Sin embargo, gracias a los tratamientos disponibles para la mejora en las propiedades funcionales de las proteínas del gluten de maíz, este subproducto puede convertirse en una materia prima atractiva para el desarrollo de diversos productos, en donde sus propiedades mejoradas sean de utilidad, así como una fuente de proteína de bajo costo y gran disponibilidad.

III. HIPÓTESIS

El tratamiento químico-térmico al que será sometido el gluten de maíz provocará una modificación en las características fisicoquímicas de sus proteínas, la cual se verá favorecida al aumentar tanto la temperatura como el tiempo de tratamiento, ocasionando que los productos con mejores propiedades funcionales sean aquellos cuyas proteínas se sometieron a los tratamientos mas extremos. Así mismo el aumento de la temperatura permitirá obtener productos con propiedades similares utilizando un menor tiempo.

IV. OBJETIVOS

- Determinar si diferentes condiciones de tiempo y temperatura permiten mejorar el grado de desamidación y propiedades emulsificantes (Índice de Actividad Emulsificante y Estabilidad de Emulsión) de las proteínas de gluten de maíz sometidas a desamidación química, en función de resultados previos obtenidos en el grupo de trabajo.
- Evaluar si el tratamiento de desamidación química es útil para mejorar también otras propiedades funcionales como son capacidad emulsificante y propiedades espumantes, así como coagulación de proteínas.
- Con los resultados anteriores determinar las condiciones de tiempo y temperatura del tratamiento de desamidación química en donde se obtienen los productos con las mejores propiedades funcionales.

V. METODOLOGÍA

1. CARACTERIZACIÓN DEL GLUTEN DE MAÍZ

La muestra de gluten de maíz utilizada en este proyecto se obtuvo por donación de la compañía Arancia Corn Products, S.A. de C.V. ubicada en Tlalnepantla, Estado de México. La materia prima se almacenó en refrigeración a 4 °C en recipientes plásticos no traslúcidos con cierre hermético antes y durante el transcurso del procedimiento experimental.

1.1. Homogeneización de la materia prima (Molienda y tamizado del gluten de maíz).

Se obtuvo la granulometría de la muestra de gluten de maíz haciéndolo pasar por cinco mallas diferentes (No. 40, 50, 60, 80 y 100). Posteriormente se molió la muestra en un molino marca Braun KSM2 por intervalos de 20 segundos hasta alcanzar un tiempo total de 3 minutos y se obtuvo nuevamente la granulometría. La molienda se realizó con el fin de obtener un tamaño de partícula homogéneo, menor o igual a 420 µm (Malla No. 40).

1.2 Análisis proximal del gluten de maíz

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Determinación de humedad (AOAC Método 925.10, 1995). Se realizó por medio de una termobalanza OHAUS Modelo MB200 a 90°C por 40 min en donde el porcentaje de humedad se obtuvo con base a la pérdida de peso.

Determinación de proteína (AOAC método No. 960.52, 1995). Se realizó con el método de determinación de proteína por Microkjeldahl y se realizó en un equipo Büchi Digestion Unit 426/Distillation Unit 316. Se determinó el amoníaco producido mediante titulación ácido base con HCl 0.1 N y se calculó el porcentaje de nitrógeno (%N) y el porcentaje de proteína (% Proteína) por medio de las siguientes relaciones:

$$\%N = \frac{(\text{ml gastados en muestra} - \text{ml gastados en blanco})(0.1 \text{ meq/ml})(0.014 \text{ g/meq}) \times 100}{\text{g de muestra}}$$

$$\% \text{ Proteína} = (\%N) (6.25)$$

$$6.25 = \text{Factor para proteínas de maíz}$$

Determinación de grasa, ceniza y fibra. Se realizaron de acuerdo a los métodos de la AOAC, número 920.39, 923.03 y 962.09 respectivamente.

Determinación de carbohidratos totales. Se realizó por diferencia después de determinar grasa, proteínas, cenizas, fibra y humedad.

1.3 Análisis microbiológico

Se realizaron las determinaciones de los tres grupos de microorganismos indicadores principales para verificar la calidad microbiológica de la materia prima.

Determinación de mesófilos totales. Se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

Determinación de hongos y levaduras. Se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

Determinación de coliformes totales. Se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Determinación de Bacterias Coliformes. Técnica del número más probable.

Los resultados obtenidos se compararon contra las especificaciones de la NOM-147-SSA1-1996. Bienes y Servicios. Cereales y sus productos. Harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de cereales, de semillas comestibles, harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales, tomando como referencia las especificaciones para harina de maíz.

1.4 Características organolépticas y pH

Se determinó el color, olor, así como la distribución del tamaño de partícula antes y después de la molienda, la cual se llevó a cabo con el fin de contar con una muestra homogénea, con un tamaño de partícula menor o igual a 420 μm .

Determinación de pH. Se realizó según el método No. 943.02 de la AOAC por medio de un potenciómetro Marca Corning modelo 340. La determinación se hizo por quintuplicado.

2. DESAMIDACIÓN QUÍMICA DEL GLUTEN DE MAÍZ

La desamidación química del gluten de maíz se realizó con base en el protocolo seguido por Flores, 1997 teniendo como variables la temperatura y el tiempo de desamidación.

DESAMIDACIÓN QUÍMICA

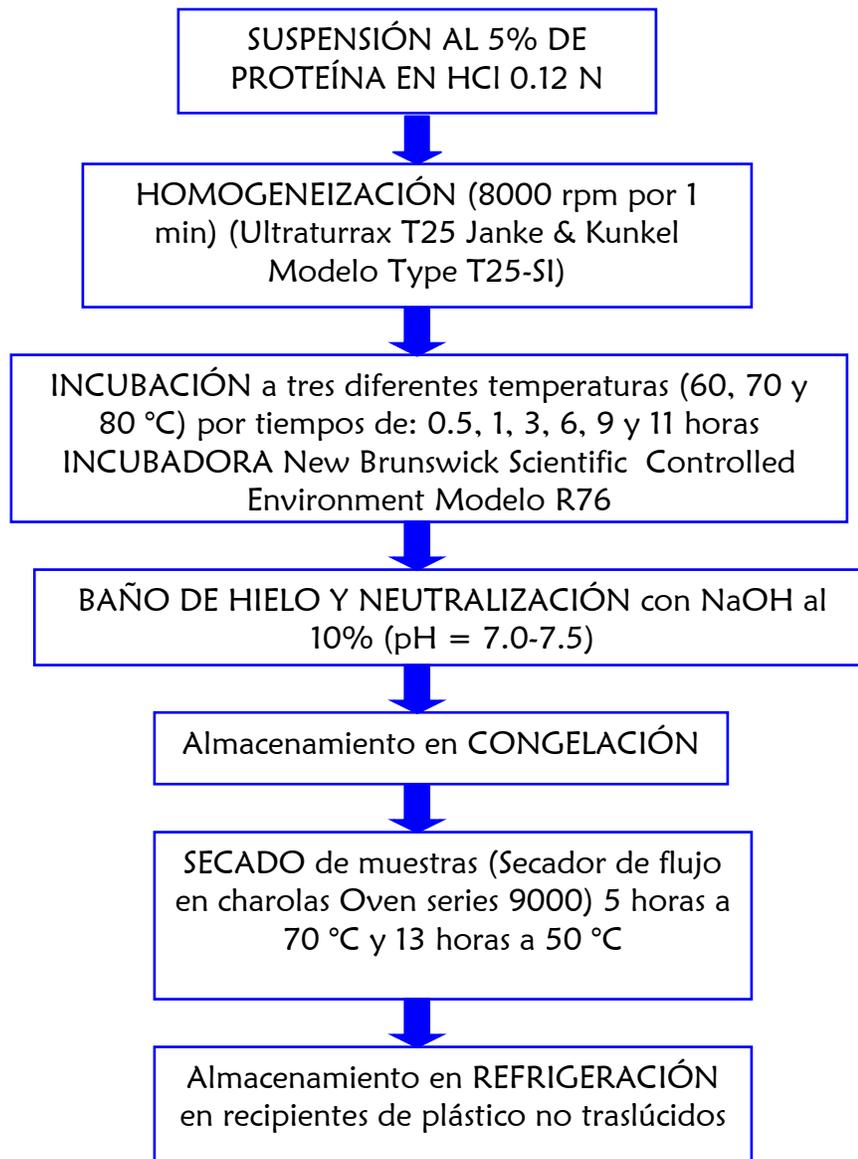


Figura 10. Diagrama de flujo de la desamidación química.

Se prepararon suspensiones de gluten de maíz en HCl 0.12 N, pesando de acuerdo al contenido de proteína encontrado, la cantidad necesaria para obtener una concentración de proteína del 5% (5 g de proteína en 100 ml). Se prepararon 300 ml de cada suspensión. Posteriormente se homogeneizaron a 8000 rpm por 1 minuto en un homogeneizador Ultraturrax T25 Janke & Kunkel Modelo Type T25-SI y una vez homogeneizados se colocaron los matraces en incubación a la temperatura establecida (60/70/80 °C) en una incubadora New Brunswick Scientific Controlled Environment Modelo R76. Se detuvo la reacción a cinco diferentes tiempos (0.5/1/3/6/9/11 horas), colocando los matraces en baño de hielo y agregando NaOH al 10 % y ajustando a un pH de 7.0-7.5 con NaOH 1N, midiéndolo con un potenciómetro Marca Corning modelo 340. Así mismo se obtuvieron muestras correspondientes al tiempo cero, en cada uno de los tratamientos. Una vez neutralizadas las suspensiones se tomaron muestras para la posterior determinación del grado de desamidación y grado de hidrólisis. Todas las muestras fueron almacenadas en congelación y descongeladas paulatinamente para su secado en un secador de charolas Oven series 9000 a 70 °C por 5 horas siguiendo el secado por 13 horas más a 50 °C). Las muestras secas fueron almacenadas en refrigeración (4 °C) en recipientes de plástico no traslúcidos.

3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL GLUTEN DE MAÍZ SIN DESAMIDAR Y DESAMIDADO

3.1 Determinación del grado de desamidación (Bergmeyer y col. 1985)

El grado de desamidación se determinó por cuantificación de la concentración de amoníaco presente en el sobrenadante de las muestras problema y comparando con el que se obtendría con un 100% de desamidación obtenida al someter la muestra en HCl 2N a 110 °C por 2 horas referidos a 100 g de gluten. Esta cuantificación se realizó por medio de un kit enzimático para determinación de amoníaco por espectrofotometría UV/VIS (Boehringer Mannheim/R-Biopharm Cat.No. 1112732). Se basa en la reacción del amoníaco con 2-oxoglutarato en presencia de glutamato deshidrogenasa y NADH, el cual se oxida y es estequiométricamente igual al amoníaco. Se calculó la concentración de amoníaco con la siguiente relación:

$$C_{\text{amoniacó}} = \frac{\text{Volumen final (ml)} * \text{PM amoniaco (g/mol)} * \Delta A \text{ (g/L)}}{(\epsilon \text{ Coef. abs a 340 nm}) * d \text{ (paso luz cm)} * \text{vol muestra} * 1000}$$

$$\epsilon = 6.3 \text{ (L*mmol}^{-1} * \text{cm}^{-1}\text{)}$$

3.2 Determinación del grado de hidrólisis (Adler-Nissen, 1986)

El grado de hidrólisis se determinó de acuerdo al protocolo de Adler-Nissen (1986). Se calculó como una relación entre la proteína soluble obtenida en cada condición y la que se obtendría con un 100% de hidrólisis (valor teórico). La proteína soluble se determinó por medio del método de Lowry-modificado (Peterson, 1977) posterior a la precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 5%.

$$\% \text{ Hidrólisis} = \frac{\mu\text{g/ml dilución (interpolación curva)} * F \text{ dilución} * 100}{\mu\text{g /ml proteína hidrolizada totales (teórico)}}$$

4. EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FUNCIONALES DEL GLUTEN DE MAÍZ SIN DESAMIDAR Y DESAMIDADO

4.1 Solubilidad de proteínas (Popineau et al., 1988)

La determinación de solubilidad se realizó de acuerdo al protocolo desarrollado por Popineau et al, (1988), en suspensiones al 1% de proteína, determinando la proteína soluble por medio del método de Lowry modificado (Peterson, 1977), espectrofotométricamente a 750 nm. El porcentaje de proteína soluble se calculó considerando como 100% el contenido de proteína del gluten agregado a cada suspensión.

$$\% \text{ Proteína soluble} = \frac{\mu\text{g/ml dilución (interpolación curva)} * F \text{ dilución} * 100}{\mu\text{g /ml proteína soluble total (teórico)}}$$

4.2 Propiedades emulsificantes

Para la determinación de las propiedades emulsificantes se utilizaron emulsiones preparadas con 75 ml de suspensión de proteína al 1% y 25 ml de aceite, homogeneizadas en un homogeneizador Janke & Kunkel Ultraturrax T25 S1 por 2 min a 20,500 rpm.

4.2.1 Índice de Actividad Emulsificante (IAE) (Pearce & Kinsella, 1978)

Se mide la turbidez de una emulsión diluida con SDS leyendo espectrofotométricamente a 500 nm.

$$IAE = \frac{2 * T * D}{\phi * C} \text{ (m}^2\text{/g)}$$

donde:

$$T = \frac{2.303 * \text{densidad óptica}}{m \text{ (longcelda)}}$$

ϕ = fracción volumétrica de la fase dispersa (0.25 en este caso)

C = concentración de la solución proteica (g/m³)

D = dilución (250)

4.2.2 Estabilidad de Emulsión (EE) (Dagorn-Scaviner, C. *et al*, 1987)

Esta determinación se basa en la resistencia de una emulsión a la coalescencia por una fuerza centrífuga midiendo el volumen de aceite separado en función del volumen total.

$$\% \text{ aceite no coalescido} = \frac{\text{volumen de aceite coalescido}}{\text{volumen total tubo} * \phi} * 100$$

ϕ = fracción volumétrica de la fase dispersa (0.25 en este caso)

4.2.3 Capacidad Emulsificante (CE) (Swift et al, 1961)

Para determinar la capacidad emulsificante de la proteína se utilizaron los productos que presentaron las mejores propiedades de estabilidad de emulsión y se siguió el protocolo de Swift *et al.* modificado el cual se basa en la adición de aceite a una velocidad conocida a una solución de proteína mientras se homogeneiza hasta observar la inversión de la emulsión con la disminución de viscosidad. Se reporta como ml de aceite emulsificado/g de proteína.

4.3 Propiedades Espumantes

4.3.1 Capacidad Espumante (Lawhon y col, 1972)

Se determina mediante la homogeneización a 20,500 rpm por un tiempo definido de una solución de proteína al 1% y posteriormente vaciando inmediatamente la solución batida en una probeta para medir el volumen de espuma generado. Se calcula como:

$$\% \text{ volumen de incremento} = \frac{(\text{volumen final} - \text{volumen inicial})}{\text{volumen inicial}} * 100$$

4.3.2 Estabilidad de Espuma (Lin & Humbert, 1974)

La estabilidad de la espuma se determina siguiendo el procedimiento anterior de generación de espuma y midiendo su volumen de ésta en una probeta, en diferentes intervalos de tiempo (1 min, 10 min, 30 min, 1 hora y 2 horas).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN DEL GLUTEN DE MAÍZ

1.1 Homogeneización de la materia prima (Molienda y tamizado del gluten de maíz).

El proceso de molienda se llevó a cabo con el fin de homogeneizar la muestra y obtener un tamaño de partícula menor o igual a 420 μm . Antes de la molienda sólo el $38.05 \pm 0.06\%$ lograba pasar por el tamiz con malla No. 40. Después de ésta, el $96.27 \pm 0.49\%$ pasó a través de esta malla (Figura 11), lo que da un porcentaje de pérdida del 3.73 %.

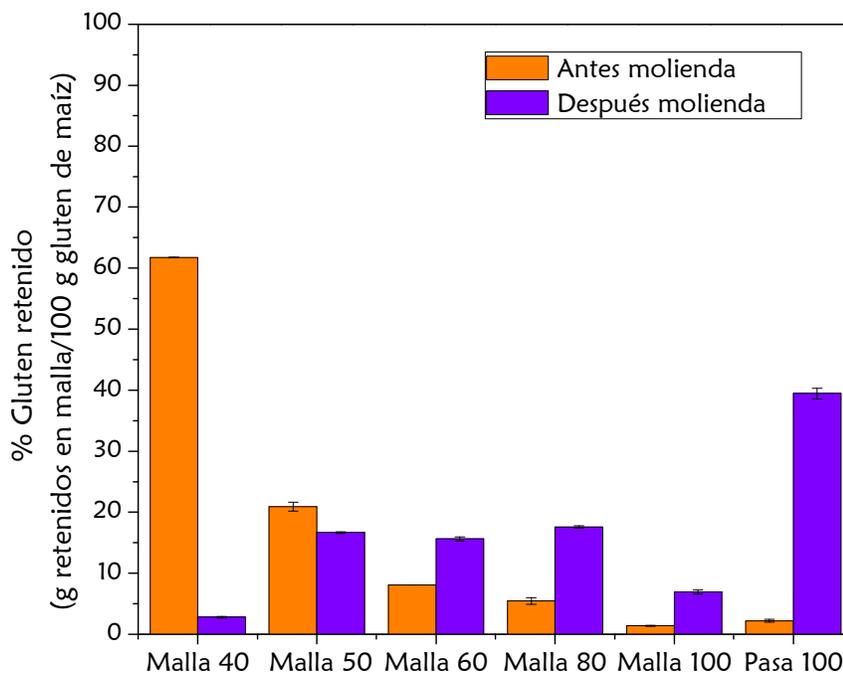


Figura 11 . Granulometría gluten de maíz antes y después de la molienda.

1.2 Análisis proximal del gluten de maíz

Una vez que se realizó la molienda y el tamizado del gluten de maíz se determinó su composición proximal (Tabla 6).

Tabla 6. Composición proximal del gluten de maíz	
Componente	(g/100 g de gluten de maíz)
Proteína	62.88 ± 0.12
Humedad	5.4 ± 0.14
Grasa	6.1
Ceniza	1.7
Fibra	0.9
Hidratos de carbono	23.02
TOTAL	100

El análisis proximal realizado a la muestra indica en primer lugar, que el contenido de proteína determinado se encuentra dentro del intervalo reportado en la literatura ya que el gluten de maíz debe contener como mínimo un 60% de proteína (Wu, 2001; Abe, 1989), aunque este porcentaje puede llegar hasta un 70% (Wu, 2001), dependiendo de las condiciones de proceso de la molienda húmeda y del genotipo de maíz. De esto depende también el contenido de grasa e hidratos de carbono, pues el propósito principal de este proceso es la obtención de almidón y aceite. De acuerdo a esto se puede ver que el contenido de grasa de 6.1% es ligeramente elevado si se compara con otros valores reportados que van de 1.9 a un 5.6 % de grasa lo cual es indicativo de las diferencias en la eficiencia del proceso de extracción del aceite. Así mismo el contenido de carbohidratos de 23% es elevado pues se esperarían valores en un intervalo del 10 al 19%. Sin embargo se espera que la presencia de estos componentes en una concentración ligeramente mas elevada a la esperada no interfiera con las proteínas en la respuesta a las propiedades funcionales, lo que verificaremos al comparar los resultados obtenidos en este estudio con aquellos obtenidos en estudios previos del grupo de trabajo.

1.3 Análisis microbiológico

Las pruebas microbiológicas realizadas al gluten de maíz indican que se partió de una materia prima de buena calidad, ya que los valores reportados son los valores mínimos aceptables, de acuerdo a la norma NOM-147-SSA-1996 Cereales y sus productos. Disposiciones y especificaciones sanitarias, ya que se utilizaron como referencia los valores para harina de maíz pues no se encuentran en las normas oficiales mexicanas valores específicos para el gluten de maíz. Los valores obtenidos se encuentran muy por debajo de lo establecido en dicha norma.

Tabla 7. Caracterización microbiológica del gluten de maíz.		
DETERMINACIÓN	VALOR OBTENIDO	ESPECIFICACIÓN DE ACUERDO A LA NOM-147-SSA1-1996 (REFERENCIA Harina de maíz)
Mesófilos aerobios	155 UFC /g (Valor estimado)	100,000 UFC/g
Hongos y levaduras	< 10 UFC/g	1000 UFC/g
Coliformes totales	< 3 Número más probable (NMP) de coliformes por gramo de muestra	100 UFC/g

1.4 Características organolépticas y pH

En cuanto a las características organolépticas y fisicoquímicas del gluten, se encontró que éstas son aceptables pues no presenta ni olor ni aspecto alterado, lo que indica que se mantuvo en buenas condiciones de almacenamiento. La heterogeneidad observada en el tamaño de partícula justifica la realización de la molienda. El pH ácido de 3.97 se explica como resultado de las condiciones del proceso de molienda húmeda del maíz.

Tabla 8. Características organolépticas y fisicoquímicas del gluten de maíz.	
Característica	Observaciones
Aspecto (Color)	El gluten es de un color amarillo fuerte (dorado) y se observa con un tamaño de partícula heterogéneo pues se observa tanto polvo fino como partículas grandes.
Olor	El olor es característico a maíz intenso.
pH	3.97 ± 0.004

2. DESAMIDACIÓN QUÍMICA DEL GLUTEN DE MAÍZ

Como resultado del tratamiento aplicado al gluten de maíz, se obtuvieron lotes con diferentes características dependiendo del tiempo y temperatura de tratamiento. Para diferenciar las muestras de gluten desamidado y no desamidado, se llamó gluten nativo a aquel que no se sometió al proceso de desamidación, con la aclaración de que este término no se refiere al estado de desnaturalización de la proteína.

3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL GLUTEN DE MAÍZ SIN DESAMIDAR Y DESAMIDADO

3.1 Determinación del grado de desamidación

De acuerdo a los resultados obtenidos con la desamidación completa del gluten de maíz, se obtiene un valor de 2.92 ± 0.02 g de NH_3 totales por 100 g de muestra lo cual representa el 100 % de NH_3 que se puede liberar por cada 100 g de gluten y que por lo tanto es indicativo de la proporción de Asn y Gln presente en la proteína. El gluten nativo tiene un grado de desamidación de 0.57 ± 0.01 % lo cual puede deberse a las condiciones ácidas del proceso de molienda húmeda, las cuales pueden provocar la modificación de algunos grupos amida. La cantidad de amoníaco liberado en cada condición indicó el porcentaje de desamidación de la muestra, el cual llegó hasta un máximo de 15.18 ± 0.93 %, porcentaje que se alcanza en la condición de 9 horas de tratamiento a 80 °C.

Se observa en la figura que la desamidación tiende a aumentar a una mayor velocidad en las primeras horas del tratamiento, sobre todo a temperatura alta, y posteriormente el incremento es menor, siendo los tres últimos valores de 6, 9 y 11 horas muy cercanos entre sí (Figura 12).

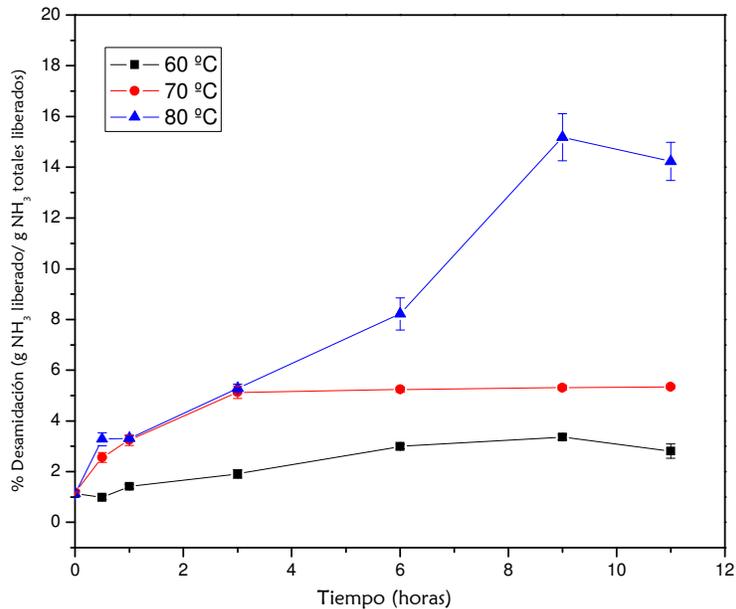


FIGURA 12. Grado de desamidación de proteínas del gluten de maíz en función del tiempo y temperatura de tratamiento. Suspensiones de proteína(5%) pH=7.

De acuerdo al análisis estadístico realizado, se encontró que si existió diferencia significativa entre grupos y diferencia en la homogeneidad de varianzas, lo que significa que la dispersión es distinta en cada punto. Por lo anterior se llevó a cabo la prueba de Tamhane para verificar entre que condiciones se presentaban las principales diferencias. Lo que se pudo observar es que el grado de desamidación obtenido para el gluten nativo es significativamente diferente de aproximadamente el 70% de las condiciones probadas, es decir que prácticamente cualquiera de las condiciones empleadas ocasiona un cambio significativo en el grado de desamidación del gluten (excepto en las condiciones que utilizan el menor tiempo como es al tiempo cero y 30 minutos de tratamiento). Por otra parte con relación a los grados de desamidación más altos obtenidos, en las condiciones de 9 y 11 horas de tratamiento a 80 °C, los valores obtenidos son significativamente diferentes al resto de las condiciones, corroborando lo que se observa gráficamente. En el caso de la condición de referencia correspondiente a 6 horas a 70 °C, se observa que existen cinco condiciones con las cuales no hay diferencia significativa, y que por lo tanto podrían ser utilizadas de igual forma si se quisiera obtener un grado de desamidación similar (3, 9, 11 hrs a 70 °C, 3 y 6 hrs a 80 °C), de las cuales las de interés son aquellas que representan un ahorro de tiempo o energía como las que se llevan a cabo en un tiempo de 3 horas a 70 y 80 °C.

3.2 Determinación del grado de hidrólisis

Como consecuencia del tratamiento térmico y ácido, además de la desamidación, puede ocurrir hidrólisis de las proteínas del gluten. Este parámetro es importante pues un cierto grado de hidrólisis puede influir directamente en las características funcionales de las proteínas, al obtenerse péptidos de menor tamaño. Este efecto puede ser positivo o negativo dependiendo de la propiedad funcional, por lo que la medición del porcentaje de hidrólisis es un aspecto importante dentro de la caracterización del gluten desamidado.

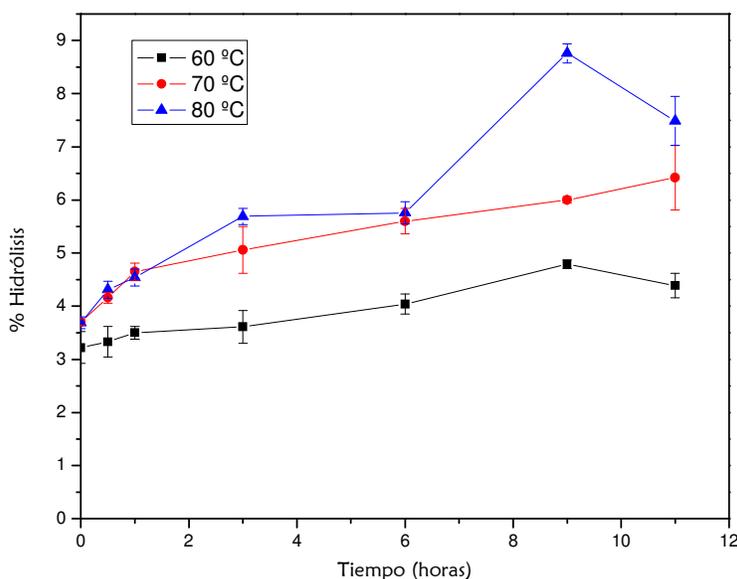


FIGURA 13. Grado de hidrólisis de proteínas del gluten de maíz en función del tiempo y temperatura de tratamiento. Suspensiones de proteína (5%), pH=7.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que el grado de hidrólisis se vió afectado tanto por el tiempo de tratamiento como por la temperatura (Figura 13). En el caso de las temperaturas de 60 y 70 °C, el comportamiento fue muy similar ya que se presentó un incremento gradual en el porcentaje de hidrólisis (Figura 12). Por otra parte se observó que a una temperatura mayor como es la de 80 °C, el comportamiento fue diferente al llegar al tiempo de 6 horas, ya que después de este tiempo el incremento fue mayor hasta alcanzar una hidrólisis del 8.76 ± 0.18 % a las 9 horas. El gluten nativo presentó un valor del 2.86 ± 0.21 de porcentaje de Hidrólisis.

De acuerdo al análisis estadístico el grado de hidrólisis del gluten nativo se distinguió de las demás condiciones de tratamiento, 30 minutos y 3 horas a 60 °C, comportamiento similar a lo ocurrido para el grado de desamidación. En el caso del valor máximo obtenido se

observó que es significativamente diferente a todas las condiciones excepto a la de 11 horas a 80 °C. Una vez más, tomando como referencia las condiciones empleadas en otros estudios las cuales empleaban un tratamiento de 6 horas a 70 °C, se observó prácticamente el mismo comportamiento que el que se presenta en el grado de desamidación, ya que no se encontró diferencia significativa con las mismas condiciones además de con la condición de 9 hrs a 60 °C.

4. EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FUNCIONALES DEL GLUTEN DE MAÍZ SIN DESAMIDAR Y DESAMIDADO

4.1 Solubilidad de proteínas

Como se vió anteriormente la solubilidad de las proteínas es una de las propiedades determinantes que influyen en la funcionalidad de éstas. Al someterse a condiciones que modifican las características fisicoquímicas de estas moléculas, cambia su capacidad para interactuar tanto con el medio como consigo misma.

En este caso se puede observar que el aumento en la temperatura del tratamiento químico aplicado al gluten de maíz así como del tiempo que se mantiene, ocasionó el aumento esperado en la solubilidad, al ocurrir el fenómeno de desnaturalización, permitiendo la exposición de sitios afines al solvente (Figura 14). Estas interacciones ocasionan que una mayor cantidad de moléculas permanezcan en solución encontrando los máximos niveles en los productos sometidos a los tratamientos más drásticos. El porcentaje de proteína solubilizada en el gluten nativo es de $3.33 \pm 0.29\%$.

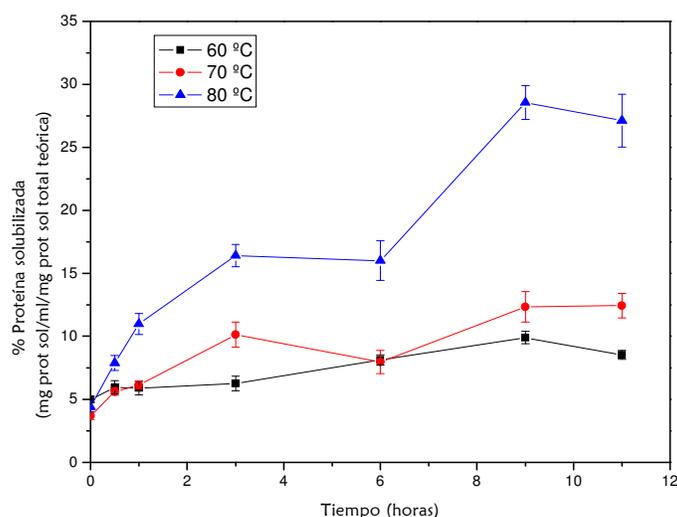
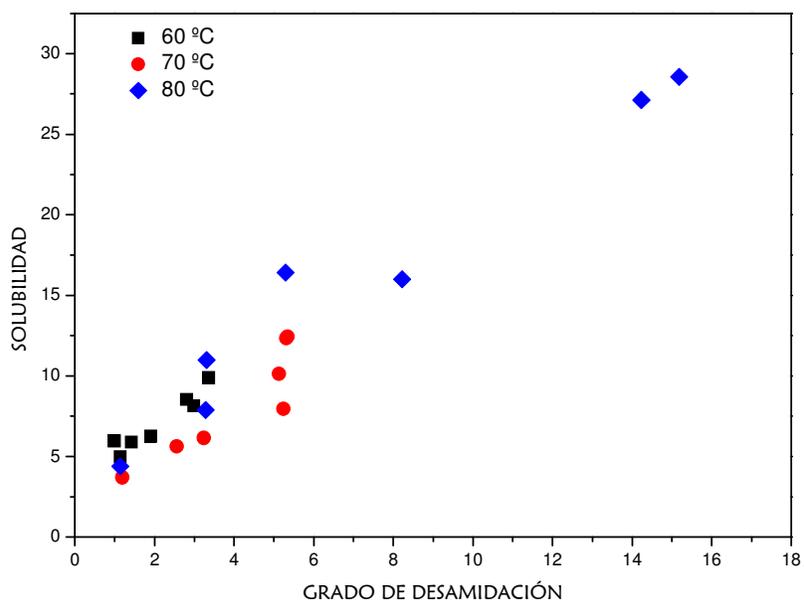


FIGURA 14. Solubilidad de proteínas del gluten de maíz desamidado en función del tiempo y temperatura de tratamiento. Suspensiones al 1% de proteína, pH=7.

a)



b)

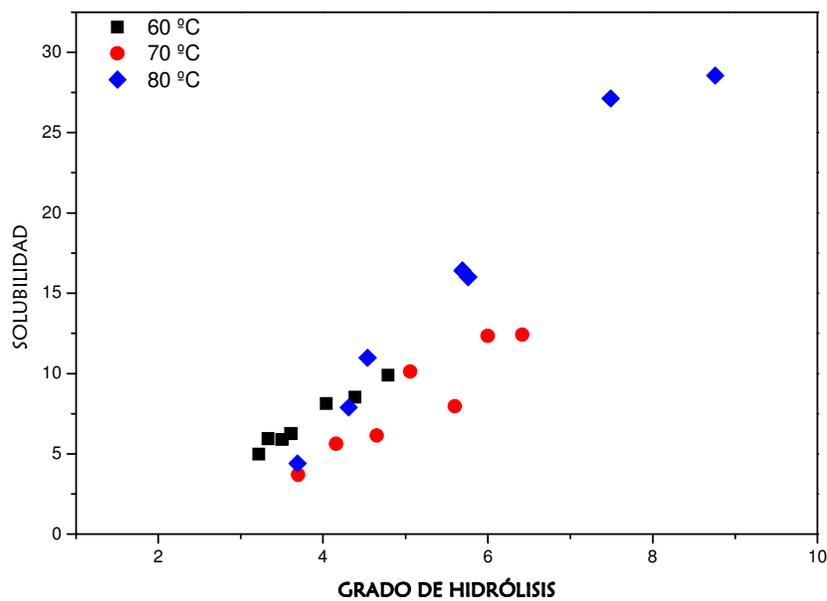


FIGURA 15. **a)** Solubilidad de proteínas del gluten de maíz en función de su grado de desamidación. **b)** Solubilidad de proteínas del gluten de maíz en función de su grado de hidrólisis.

En el caso de la solubilidad como en los parámetros anteriores medidos, se observó una diferencia en los tratamientos que utilizan una temperatura de 80 °C comparados con los de

60 y 70 °C, incluso en los tiempos más cortos de tratamiento. Por otra parte como se comentó anteriormente la solubilidad se relaciona tanto con el grado de desamidación como con el grado de hidrólisis de la proteína por lo que el comportamiento fue el esperado. La figura 15 muestra la relación entre estos parámetros, en donde se observa un aumento directamente proporcional ya que al aumentar los grados de desamidación e hidrólisis aumenta la solubilidad.

En cuanto a si las diferencias son estadísticamente significativas se puede decir que en el caso del gluten nativo sucede algo similar a lo ocurrido en los parámetros anteriores en donde existe una diferencia significativa con todos los tratamientos. En el caso de la condición de 6 horas a 70 °C, se encuentran un mayor número de condiciones en las cuales se puede obtener un porcentaje de proteína solubilizada similar, alrededor de un 8 %, en donde no hay diferencia significativa (3, 6, 9 y 11 horas a 60 °C, 1 y 3 horas a 70 °C y 30 minutos a 80 °C). En este caso la mejora de las condiciones es muy notoria ya que se puede sustituir el tratamiento de 6 horas a 70 °C incluso hasta por uno de 30 minutos a 80 °C, lo que implicó una disminución sustantiva del tiempo requerido. Una vez más las condiciones más extremas se separan del resto y son significativamente diferentes estadísticamente.

4.2 Propiedades emulsificantes

4.2.1 Índice de Actividad Emulsificante (IAE)

Una vez caracterizados los lotes de gluten desamidado en cuanto a su grado de desamidación y al grado de hidrólisis, se determinaron sus propiedades emulsificantes. En primer lugar se determinó el Índice de Actividad Emulsificante (IAE), que indica la cantidad de área interfacial que se forma en la emulsión por cada gramo de proteína que se agregue.

El Índice de Actividad Emulsificante es mayor mientras mayor es el tiempo del tratamiento y el grado de desamidación de las muestras. Esto indica que las proteínas del gluten son capaces tanto de formar la emulsión como de mantenerla estable. El máximo IAE se alcanzó en la condición de 11 horas (14.23 ± 0.75 de desamidación), al lograr formar 26.04 ± 2.83 m²/g en comparación con los 2.26 ± 0.12 m²/g que puede formar el gluten nativo, lo que implica un aumento de cerca de 10 veces el valor inicial (Figura 16). Cabe mencionar que tanto la concentración de proteína como el pH son factores que afectan directamente a

las propiedades emulsificantes de las proteínas por lo que es posible que este comportamiento se modifique al cambiar las condiciones de elaboración de la emulsión. Sin embargo es importante resaltar que en estas condiciones de pH neutro en la que se encuentran una gran cantidad de sistemas alimentarios y por la concentración de proteína utilizada, es posible utilizar al gluten de maíz como un aditivo en alimentos tipo emulsión.

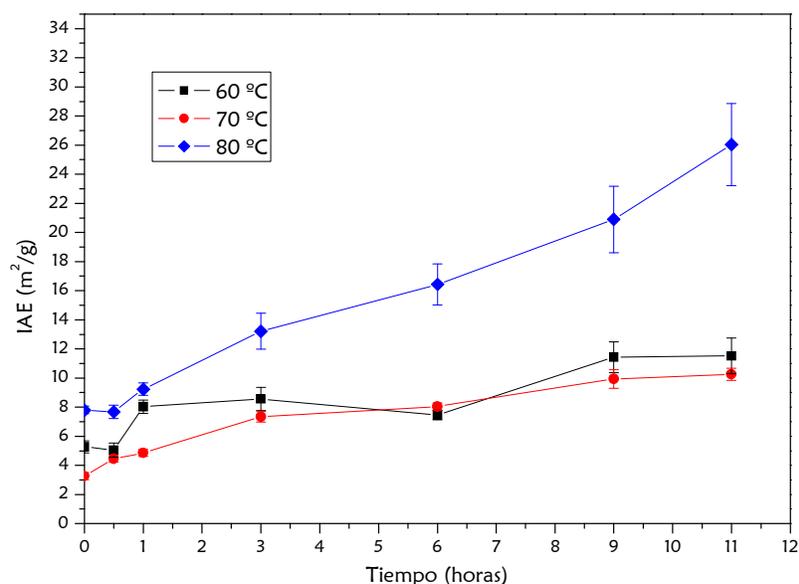


FIGURA 16. Índice de actividad emulsificante de gluten de maíz en función del tiempo y temperatura de tratamiento. Suspensiones al 1% de proteína, pH=7.

Estadísticamente observamos que en este caso el gluten nativo es significativamente diferente a todos los tratamientos, por lo que cualquier modificación en la proteína ocasiona un aumento importante en su Índice de Actividad Emulsificante. En el caso del tratamiento de referencia a 70 °C por 6 horas, el valor obtenido fue similar a los que se obtuvieron en las siguientes condiciones: 1 y 3 horas a 60 °C y al tiempo cero y 30 minutos a 80 °C, el cual fue de alrededor de 8 m²/g, por lo que también se puede hablar de una mejora en las condiciones que se pueden utilizar ya que incluso el calentar a 80 °C sería suficiente para alcanzar el mismo índice. Por otra parte los valores obtenidos en las condiciones de 6, 9 y 11 horas a 80 °C fueron significativamente diferentes al resto e incluso fueron diferentes entre ellos mismos.

4.2.2 Estabilidad de Emulsión (EE)

La otra propiedad emulsificante que se determinó fue la Estabilidad de Emulsión en emulsiones preparadas con una concentración de proteína del 1% a pH 7. Como se dijo anteriormente la Estabilidad de Emulsión es un parámetro que indica qué tan capaces son las proteínas de formar una película gruesa en la interfase con las gotas de grasa para prevenir su coalescencia ante la aplicación de una fuerza.

Como se observa en la figura 17, se presentó un aumento muy claro en la estabilidad de emulsión al incrementarse el tiempo de tratamiento.

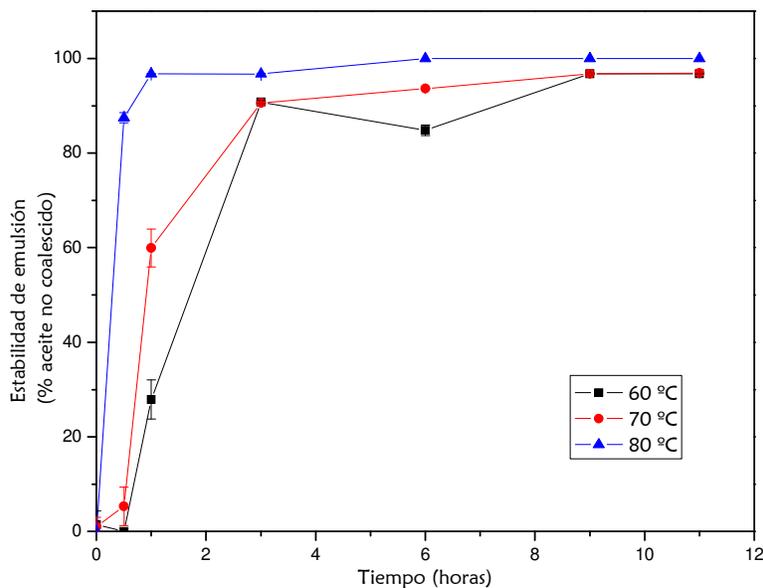
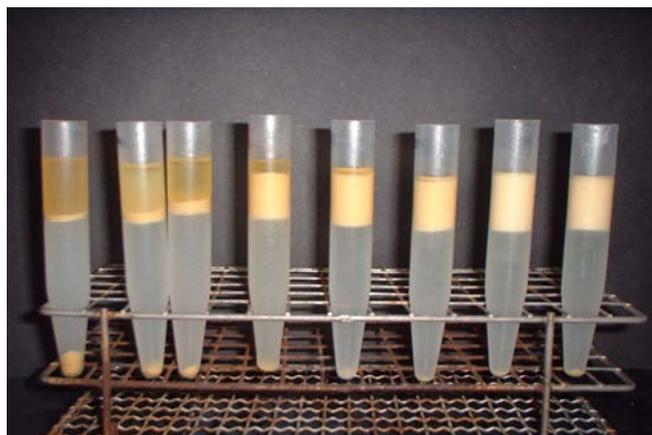


FIGURA 17. Estabilidad de emulsión de gluten de maíz en función del tiempo y temperatura de tratamiento. Suspensiones al 1% de proteína, pH=7.

Por otra parte se observó el efecto que tiene el tratamiento, al comparar el gluten desamidado con el gluten nativo. En el caso del gluten nativo el 100 % del aceite agregado coalesció, lo que indica que las proteínas no lograron estabilizar la emulsión. La mayor estabilidad de emulsión se logró a las 6, 9 y 11 horas de tratamiento alcanzando un 100% de estabilidad en las emulsiones obtenidas utilizando el gluten sometido a las tres condiciones. En la figura 18 se pueden observar un ejemplo de las emulsiones obtenidas con los productos sometidos al tratamiento de 70 °C.



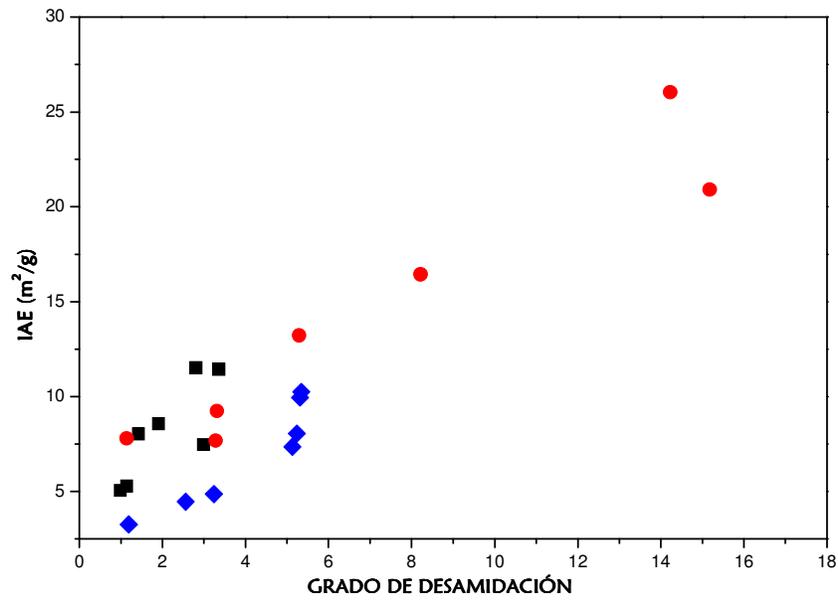
Gluten nativo t=0 30 min 1h 3h 6h 9h 11h
Gluten desamidado

Figura 18. Estabilidad de emulsión de productos obtenidos a diferentes tiempos a 70 °C.

En este caso el análisis estadístico mostró que el gluten nativo tuvo un comportamiento similar a las condiciones de tiempo cero a 60, 70 y 80 °C y 30 minutos a 60 y 70 °C en donde coalesció la mayor parte del aceite. Los tratamientos más drásticos por el contrario provocaron la obtención de emulsiones muy estables significativamente diferentes a las obtenidas con el resto de los tratamientos, por lo que en este caso si sería necesario utilizar estas condiciones si se quieren obtener productos que tengan esta propiedad.

Dado que el objetivo principal es determinar el impacto que tiene la modificación en el grado de desamidación de las proteínas del gluten en las propiedades funcionales se graficaron tanto el Índice de Actividad Emulsificante (IAE), como la Estabilidad de Emulsión, en función de este parámetro. Como se observa en la Figura 19, el comportamiento general del IAE, fue similar a lo ocurrido con la solubilidad en donde se observó un aumento en la propiedad al aumentar el grado de desamidación. En el caso de la estabilidad el comportamiento fue más drástico ya que el aumento ocurrió desde las modificaciones más pequeñas.

a)



b)

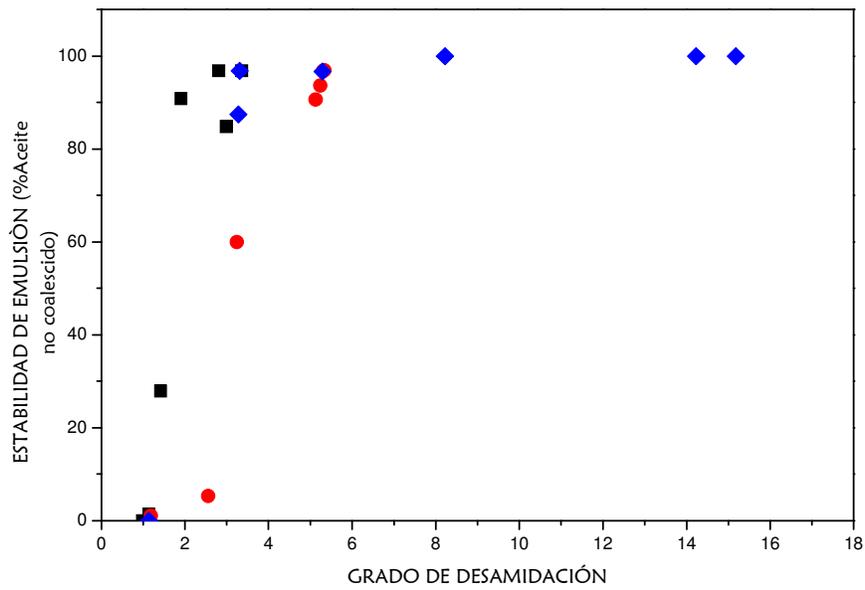


FIGURA 19. a) Índice de actividad emulsificante de gluten de maíz en función del grado de desamidación. b) Estabilidad de emulsión de gluten de maíz en función del grado de desamidación

4.2.3 Capacidad Emulsificante (CE)

Una de las propiedades emulsificantes de interés para la industria de alimentos que no había sido explorada en experimentos previos es la capacidad emulsificante. La determinación de esta propiedad en soluciones de proteína exige la presencia de ciertas condiciones que faciliten y permitan la correcta identificación del punto de inversión de la emulsión, como lo es un cierto grado de viscosidad, lo que se logra al tener una mayor cantidad de proteína en solución. Es por esto que para el desarrollo de este experimento se monitorearon únicamente los productos en donde se podían alcanzar los niveles más altos de proteína soluble, obteniendo por consiguiente una mayor viscosidad en la solución.

La determinación del punto de inversión se facilitó en los productos sometidos a los tratamientos más prolongados (9 y 11 hrs), dificultándose en el producto sometido a 6 horas en donde no se logró la viscosidad necesaria para detectar con precisión el punto de inversión.

La máxima capacidad emulsificante, 225.4 ± 17.6 ml de aceite emulsificado, se encontró en el producto sometido a 9 horas de tratamiento a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ver Anexo 1). En las emulsiones formadas de los productos de los tratamientos más drásticos, incluso se observa un aumento en la estabilidad de la emulsión en cuanto al fenómeno de formación de crema, incorporándose la fase acuosa separada, al aumentar el volumen de aceite agregado, con la posterior formación de una emulsión de mejores características (Figuras 20 y 21).



Fig. 20 Emulsión al 1% prot.
(75 ml sol.prot./25 ml aceite)
GLUTEN DESAMIDADO $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 11 h



Fig. 21 Emulsión al 1% prot.
(75 ml sol.prot./100 ml aceite)
GLUTEN DESAMIDADO $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 11 h

4.3 Propiedades espumantes

Otro grupo de propiedades de interés en alimentos son las propiedades espumantes. En esta investigación se monitoreó el cambio en la capacidad espumante y en la estabilidad de la espuma en función del tiempo, para cada uno de los productos de la modificación química.

4.3.1 Capacidad Espumante

En la medición de la capacidad espumante se encontró que esta propiedad, al igual que las propiedades emulsificantes, aumenta en función de la temperatura y el tiempo de tratamiento de desamidación, registrándose el mayor incremento en las primeras etapas y con un aumento menos significativo en las horas posteriores. De la misma manera los mejores valores se encontraron en las muestras sometidas a la temperatura de 80 °C, encontrándose en esta temperatura la máxima capacidad emulsificante a las 9 horas de tratamiento con 198.67 ± 15.24 % Vol de incremento, comparada con el gluten nativo en donde se registró un porcentaje de 33.33 ± 0.0 % Vol de incremento.

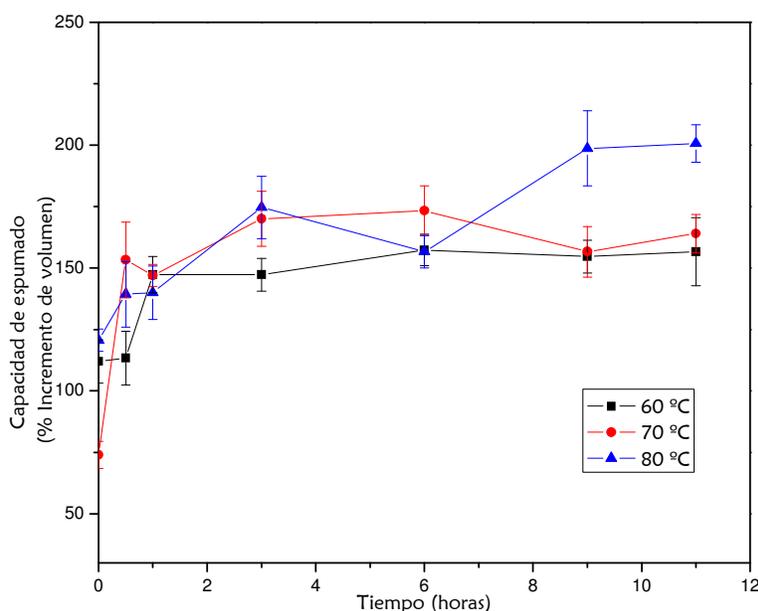


FIGURA 22. Capacidad de espumado de gluten de maíz en función del tiempo y temperatura de tratamiento. Suspensiones al 1% de proteína, pH=7.

El comportamiento de la capacidad de espumado en función del grado de desamidación se observa en la siguiente figura:

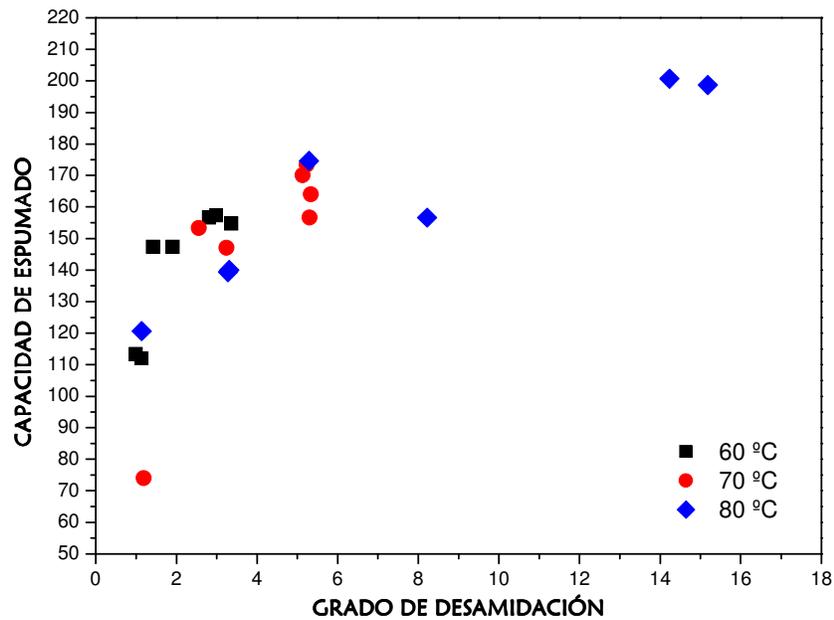


FIGURA 23. Capacidad de espumado de gluten de maíz en función del grado de desamidación.

De acuerdo al análisis estadístico lo obtenido con el gluten nativo es similar a otras seis condiciones. Lo mismo sucede con el tratamiento de referencia a 70 °C por seis horas. En este caso las condiciones más drásticas no presentaron una diferencia tan marcada con el resto.

4.3.2 Estabilidad de Espuma

En cuanto a la estabilidad de la espuma generada en cada tratamiento, no se observó diferencia significativa entre tratamientos, registrándose la misma tendencia en todas las muestras. Al aumentar la temperatura se observó una mayor diferencia sobre todo en los productos sometidos a 80 °C, Sin embargo aunque mejora no se encontró un aumento de importancia en la estabilidad de la espuma (Figuras 24, 25 y 26).

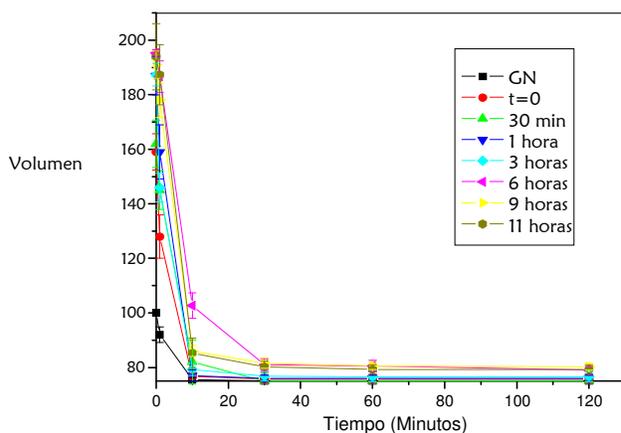


FIGURA 24. Estabilidad de espuma de gluten de maíz modificado a 60 °C en función del tiempo de tratamiento. Suspensiones al 1% de proteína, pH=7.

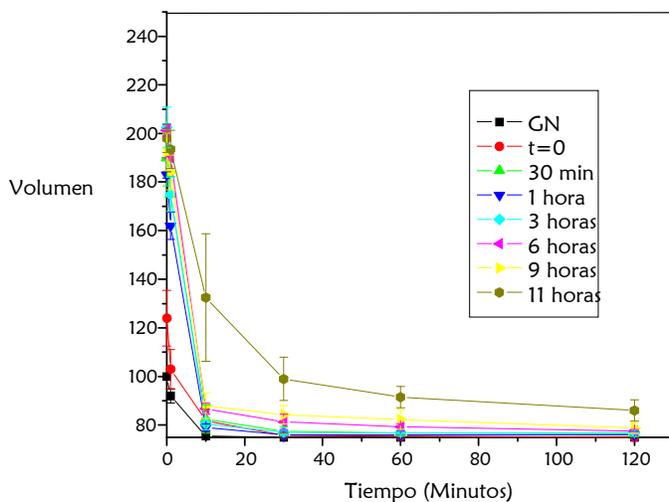


FIGURA 25. Estabilidad de espuma de gluten de maíz modificado a 70 °C en función del tiempo de tratamiento. Suspensiones al 1% de proteína, pH=7.

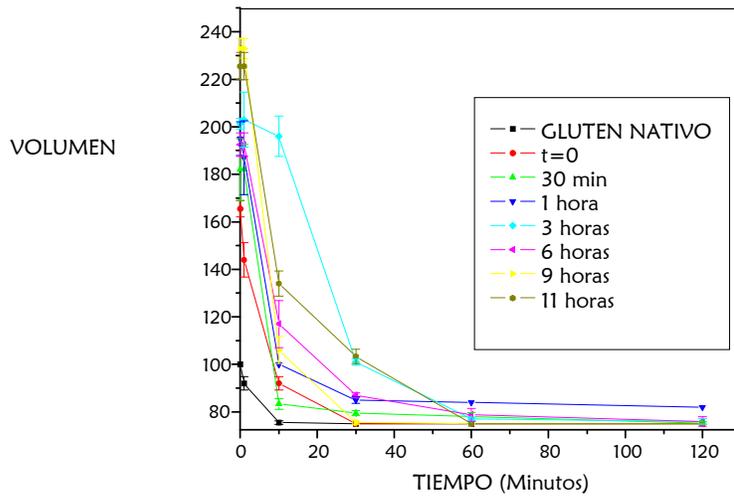


FIGURA 26. Estabilidad de espuma de gluten de maíz modificado a 80 °C en función del tiempo de tratamiento. Suspensiones al 1% de proteína, pH=7.

5. RESUMEN DE RESULTADOS

A manera de resumen podemos decir que los productos obtenidos mediante la aplicación de los tratamientos más extremos fueron los que mostraron las mejores propiedades funcionales, resaltando la condición de 9 horas a 80 °C como la condición en la que se obtuvieron los valores más altos en la mayoría de las propiedades medidas (TABLA 9).

TABLA 9. PRODUCTOS DE DESAMIDACIÓN DE GLUTEN DE MAÍZ QUE PRESENTARON LAS MEJORES PROPIEDADES FUNCIONALES			
PROPIEDAD	GLUTEN NATIVO	MÁXIMO OBTENIDO	PRODUCTO
Grado de desamidación (GD)	0,57 ± 0,01	15,18 ± 0,93	9 h 80 °C
Grado de hidrólisis (GH)	2,86 ± 0,210	8,76 ± 0,18	9 h 80 °C
Solubilidad (% Proteína solubilizada)	3,33 ± 0,29	28,56 ± 1,35	9 h 80 °C
IAE (m2/g)	2,26 ± 0,12	26,04 ± 2,83	11 h 80 °C
EE (% Aceite no coalescido)	0 ± 0	100 ± 0	6/9/11 h 80 °C
CE (Volumen máximo de aceite emulsificado)	No determinado	225,4 ± 17,56	9 h 80 °C
Capacidad de espumado (%Vol incremento)	33,33 ± 0,0	200,7 ± 7,7	11 h 80 °C

En la siguiente tabla (Tabla 10) se muestran los valores obtenidos para cinco de los tratamientos de mayor interés aplicados a las proteínas del gluten. En primer lugar se muestra la condición de referencia, 6 horas a 70 °C, la cual fue seleccionada en estudios previos como en la que se obtenían buenas propiedades emulsificantes y solubilidad. Posteriormente se observan los valores obtenidos con dos de las condiciones, que dado el tiempo de tratamiento resultaron de interés pues, fue donde se obtuvieron grados de desamidación e hidrólisis similares a los del tratamiento de referencia en un menor tiempo. Por último se muestran los datos obtenidos en las condiciones más extremas en donde como se observó anteriormente, la diferencia en los resultados obtenidos es significativa.

TABLA 10. COMPARACIÓN DE CONDICIONES EN DONDE SE OBTUVIERON PRODUCTOS CON BUENAS PROPIEDADES FUNCIONALES.

CONDICION	Grado de desamidación (GD)	Grado de hidrólisis (GH)	Solubilidad (% Proteína solubilizada)	IAE (m ² /g)	EE (% Aceite no coalescido)	CE (Volumen máximo de aceite emulsificado)	Capacidad de espumado (%Vol incremento)
6 h 70 °C	5,24 ± 0,10	5,6 ± 0,24	7,95 ± 0,93	8,05 ± 0,25	6,36 ± 0,07	-	173,3 ± 10,1
0.5 h 80 °C	3,28 ± 0,26	4,31 ± 0,16	7,89 ± 0,61	7,68 ± 0,45	12,55 ± 1,06	-	139,33 ± 13,31
1 h 80 °C	3,31 ± 0,09	4,54 ± 0,16	10,98 ± 0,84	9,25 ± 0,42	3,22 ± 0,06	-	140 ± 10,89
9 h 80 °C	15,18 ± 0,93	8,76 ± 0,18	28,56 ± 4,72	20,90 ± 2,28	0 ± 0	225,4 ± 17.6	198,7 ± 15,2
11 h 80 °C	14,23 ± 0,75	7,49 ± 0,46	27,13 ± 2,10	26,04 ± 2,83	0 ± 0	223,7 ± 4.3	200,7 ± 7,7

VII. CONCLUSIONES

- 1 Se realizó el estudio de diferentes propiedades funcionales de interés en alimentos a muestras de gluten de maíz, sometidas a un tratamiento de desamidación química en diferentes condiciones de tiempo y temperatura. Se evaluó el comportamiento de cada una de las propiedades en función de estas variables con el fin de encontrar las condiciones óptimas del tratamiento, en donde se encontrarán las mejores propiedades funcionales.
- 2 De acuerdo a los resultados, se encontró que las mejores propiedades se encuentran en las muestras de gluten de maíz sometidas a un tratamiento a 80 °C por tiempos prolongados, las cuales presentan diferencias significativas con las propiedades encontradas en el 90% de los productos de los tratamientos aplicados inclusive mejorando lo encontrado en experimentos previos en donde únicamente se monitoreó la temperatura de 70 °C.
- 3 En función del objetivo planteado se puede decir que se alcanzó el resultado esperado al alcanzar las mismas propiedades funcionales obtenidas en el tratamiento a 70 °C por 6 horas (condiciones óptimas de experimentos previos), en un menor tiempo al incrementar la temperatura a 80 °C.
- 4 El tratamiento aplicado dependerá de la propiedad que se desea obtener, sin embargo se encontraron tratamientos que en general presentan valores aceptables en todas las propiedades y que por el gasto de tiempo y energía pueden ser recomendables para sustituir las condiciones planteadas en estudios previos.
- 5 Dado que los valores obtenidos en las condiciones más drásticas son significativamente diferentes, incluso a simple vista, se recomienda ampliar el estudio para probar condiciones de temperatura más elevada como puede ser 90 °C, que pudieran permitir la disminución del tiempo de tratamiento alcanzando los mismos valores en propiedades como solubilidad y propiedades emulsificantes.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ABE, M, (1989) Corn proteins, en Food emulsifiers, Chemistry, Technology, Functional Properties and applications, edited by George Charalambous & George Doxastakis, Developments in Food Science 19, Elsevier Science Publishers, B.V., Netherlands, , p.p. 93-112.
- ADLER-NISSEN, J. (1986) Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers LTD. New York, 427 págs.
- AOAC (1995), Método 925.10 y 960.52.
- BERGMAYER, Hans Ulrich, & BEUTLER, Hans-Otto (1985), Methods of Enzymatic Analysis, 3th edition, edited by Hans Ulrich Bergmeyer, Vol. VIII, Metabolites 3: Lipids, amino acids and related compounds. Germany.
- CABRA, V. (2002), Identificación y estudio de las proteínas del gluten de maíz involucradas en la estabilización de emulsiones aceite en agua, Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM. México, D.F. 91 págs.
- CABRA, V. et al., (2005) Characterization of a 19 kDa a-zein of high purity. J. Agric. Food Chem. (53), 725-729.
- CASELLA, Massimo L.A. & WHITAKER, John R. (1990) Enzymatically and Chemically Modified Zein for Improvement of Functional Properties, Journal of Food Biochemistry, 14, 453-475.
- CHAN, W.M.; MA, C.Y., (1999) Acid modification of proteins from soymilk residue (okara), Food Research International 32, 119-127.
- CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L. & LORIENT, D. (1985) Amino acids, Peptides and Proteins, en Food Chemistry, 2nd edition, Revised and Expanded, edited by Owen R. Fennema, Marcel Dekker, Inc. USA.
- CORTÉS QUEZADA, Verónica, (1998), Emulsificantes y su aplicación en la industria de alimentos, Tesis licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- DAGORN-SCAVINER, C.; GUEGUEN, J. & LEFEBVRE, J. (1987), Emulsifying Properties of Pea Globulins as related to their Adsorption Behaviors, Journal of Food Science, 52, No.2, 335-341.
- DALGLEISH, D.G. Food emulsions, de Encyclopedic Handbook of Emulsion Technology, edited by Johan Sjoblom, Marcel Dekker, Inc. USA, 2001.
- FARNHAM, D.E. et al. (2003), Corn: Perspective and Culture, en: Corn: Chemistry & Technology 2nd. Edition, Edited by Pamela J. White and Lawrence A. Johnson.

- FLORES, A. I., (1997) Modificación enzimática y química del gluten de maíz: posibilidades de utilización en la industria alimentaria. Tesis de Maestría en Ciencia de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, México, D.F. 127 págs.
- HALL, G.M., (1996), Basic concepts, en *Methods of Testing Protein Functionality*, Edited by G.M. Hall, Blackie Academic & Professional, Great Britain. p.p. 1-10
- HILL, S.E. (1996), Emulsions, en: *Methods of Testing Protein Functionality*, Edited by G.M. Hall, Blackie Academic & Professional, Great Britain.
- JOHNSON, L. & MAY, J. (2003), Wet milling: The Basis for Corn Biorefineries, en *Corn: Chemistry & Technology 2nd. Edition*, Edited by Pamela J. White and Lawrence A. Johnson.
- LAWHON, J.T.; CATER, C.M. & MATTIL, K.F., (1972), A whippable extract from glandless cottonseed flour, *Journal of Food Science*, 37, 317-321.
- LAWTON, J.W. Proteins of the kernel, en: *Corn: Chemistry & Technology 2nd. Edition*, Edited by Pamela J. White and Lawrence A. Johnson.
- LIN, M.J.Y. & HUMBERT, E.S. (1974), Certain functional properties of sunflower meal products, *Journal of Food Science*, 39, 368-370.
- MA, C. & KHANZADA, G. (1987), Functional properties of deamidated oat protein isolates. *J. Food Sci.* (52), 1583-1587.
- MANGINO, M.E., (1994) Protein Interactions in Emulsions: Protein-Lipid Interactions, en *Protein functionality in Food Systems* edited by Navam S. Hettiarachchy, Gregory R. Ziegler, Marcel Dekker, Inc, USA, Basic Symposium Series, p.p. 147-179
- MARTINUS A.J.S VAN BOEKEL, (1999) Heat induced deamidation, dephosphorylation and breakdown of caseinate, *International Dairy Journal* 2 237-241,
- MATSUDOMI, N. et al. (1982), Conformation and surface properties of deamidated gluten. *Agric. Biol. Chem.* (46), 1583-1586.
- MATSUDOMI, N. et al. (1985), Conformational changes and functional properties of acid-modified soy protein. *Agric. Biol. Chem.* (49), 1251-1256.
- MIMOUNI, B. et al, (1994) Combined acid deamidation and enzymic hydrolysis for improvement of functional properties of wheat gluten, *Journal of Cereal Science* 21, 153-165.
- MOMANY, F. A. et al. (2006), Structural characterization of alpha-zein. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2), 543-547.
- MYERS, Deland J.; HOJILLA-EVANGELISTA, Milagros P. & JOHNSON, Lawrence A. (1994) Functional Properties of Protein Extracted from Flaked, Defatted, Whole Corn by Ethanol/Álcali During Sequential Extraction Processing, *JACOS*, 71, No.11, 1201-1204.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-111-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-112-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.
- PARK, H. *et al.* (1997), Preparation of Fish Feed Ingredients: Reduction of Carotenoids in Corn Gluten Meal. *J. Agric. Food Chem.* 45 (6), 2088-2092.
- PEARCE, K.W. & KINSELLA, J.E. (1978), Emulsifying properties of proteins: evaluation of turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.* 26, 716-723
- PETERSON, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83, 346-350.
- POMERANZ, Y., (1985) Functional properties of food components, *Food Science and Technology A series of monographs*, Academic Press, Inc, USA, p.p. 207-233.
- POMERANZ, Y. (1991), *Functional Properties of Food Components*, 2nd edition, Academic Press, Inc. USA. P.p. 147-192.
- POPINEAU, Y. et al, (2002) Foaming and emulsifying properties of fractions of gluten peptides obtained by limited enzymatic hydrolysis and ultrafiltration, *J. Cereal Sci.* 35 327-335,
- REUBSAET, J.L. E. Et al, (1998) Analytical techniques used to study the degradation of proteins and peptides: chemical instability. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 17, 955-978.
- SEELEY, R.D., (1958) MILLING FEEDS, en *Processed plant protein foodstuffs* edited by Aaron Altschul, Academic Press USA.
- SERNA SALDIVAR, S.R.O, (1996), *Química, almacenamiento e industrialización de los cereales*, AGT Editor, S.A., México, 207-216
- SWIFT, C.E., LOCKETT, C. & FRYER, A.J. (1961), Comminuted meat emulsions: the capacity of meat for emulsifying fat. *Food Technol.*, 15, 468-472.
- VOJDANI, F. (1996), Solubility, en: *Methods of Testing Protein Functionality*, Edited by G.M. Hall, Blackie Academic & Professional, Great Britain.
- VOJDANI, F.; WHITAKER, J.R., (1994) Chemical and Enzymatic Modification of Proteins for Improved Functionality, en *Protein Functionality in Food Systems* edited by Navam S. Hettiarachy, Gregory R. Ziegler, Marcel Dekker, Inc., USA, Basic Symposium Series, 261-309.
- WATSON, S. (2003), Description, Development, Structure and Composition of the Corn Kernel, en *Corn: Chemistry & Technology* 2nd. Edition, Edited by Pamela J. White and Lawrence A. Johnson.
- WILDE, P.J. (1996), Foam formation & stability, en: *Methods of Testing Protein Functionality*, Edited by G.M. Hall, Blackie Academic & Professional, Great Britain.

- WILDE, P.J., (2000) Physically Modified Proteins, en Novel Macromolecules in Food Systems edited by G. Doxastakis & V. Kiosseoglou, Elsevier Science B.V., p.p. 161-165.
- WU, Y.V. (2001) Emulsifying activity and emulsion stability of corn gluten meal, J. Sci food Agric 81: 1223-1227,
- WU, Y.V., (2001) Protein enriched spaghetti fortified with corn gluten meal, J. Agric. Food Chem, 49 3906-3910.
- ZAYAS, J.F., (1997) Functionality of Proteins in Food, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germ

ANEXO 1 TABLAS DE RESULTADOS

3.1 Determinación del grado de desamidación (Bergmeyer y col. 1985)

GRADO DE DESAMIDACIÓN (%)						
TIEMPO	60		70		80	
(HORAS)	x	ds	x	ds	x	ds
0	1.14	0.10	1.30	0.16	1.24	0.08
0.5	1.30	0.10	2.56	0.19	3.28	0.27
1	1.42	0.08	3.24	0.21	3.31	0.09
3	1.91	0.17	4.67	0.37	5.29	0.15
6	2.99	0.09	5.24	0.10	8.17	0.77
9	3.36	0.11	5.31	0.10	15.73	1.55
11	2.89	0.18	5.34	0.07	14.21	0.75

1.3 Determinación del grado de hidrólisis (Adler-Nissen, 1986)

GRADO DE HIDRÓLISIS (%)						
TIEMPO	60		70		80	
(HORAS)	x	ds	x	ds	x	ds
0	3.22	0.30	3.70	0.06	3.69	0.11
0.5	3.33	0.29	4.16	0.10	4.31	0.16
1	3.50	0.12	4.65	0.16	4.54	0.16
3	3.61	0.31	5.06	0.44	5.69	0.15
6	4.04	0.19	5.60	0.24	5.76	0.21
9	4.79	0.08	6.00	0.06	8.76	0.18
11	4.39	0.23	6.42	0.61	7.49	0.46

4.1 Solubilidad de proteínas (Popineau *et al*, 1988)

SOLUBILIDAD (% DE PROTEÍNA SOLUBILIZADA)						
TIEMPO	60		70		80	
(HORAS)	x	ds	x	ds	x	ds
0	4.88	0.27	3.37	0.26	4.19	0.26
0.5	5.39	0.13	5.74	0.35	7.61	0.44
1	6.20	0.60	6.00	0.35	10.88	0.82
3	7.45	0.54	8.55	0.27	16.08	0.49
6	7.89	0.25	9.65	0.99	15.57	1.48
9	9.55	0.39	11.33	0.56	29.65	0.78
11	8.65	0.18	11.66	0.53	28.68	0.99

Índice de Actividad Emulsificante (IAE) (Pearce & Kinsella, 1978)

INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE (m ² /g)						
TIEMPO (HORAS)	60		70		80	
	x	ds	x	ds	x	ds
0	5.28	0.41	3.27	0.23	7.80	0.26
0.5	5.05	0.48	4.46	0.24	7.68	0.45
1	8.03	0.46	4.86	0.23	9.24	0.42
3	8.57	0.80	7.35	0.37	13.22	1.23
6	7.46	0.33	8.05	0.25	16.44	1.41
9	11.43	1.07	9.94	0.64	20.90	2.28
11	11.52	1.23	10.26	0.42	26.04	2.83

Estabilidad de Emulsión (EE) (Dagorn-Scaviner, C. *et al*, 1987)

ESTABILIDAD DE EMULSIÓN (% Aceite no coalescido)						
TIEMPO (HORAS)	60		70		80	
	x	ds	x	ds	x	ds
0	98.57	2.93	98.97	1.92	100.00	0.00
0.5	100.00	0.00	94.68	4.07	12.55	1.06
1	72.10	4.12	40.06	4.01	3.22	0.06
3	9.20	0.32	9.40	0.17	3.29	0.10
6	15.18	1.14	6.36	0.07	0.00	0.00
9	3.22	0.10	3.23	0.05	0.00	0.00
11	3.22	0.08	3.09	0.15	0.00	0.00

4.2.3 Capacidad Emulsificante (CE) (Swift *et al*, 1961)

CAPACIDAD EMULSIFICANTE (Volumen aceite emulsificado)		
TIEMPO (HORAS)	80	
	x	ds
6	110.00	11.55
9	225.40	17.56
11	223.73	4.28

4.3.1 Capacidad Espumante (Lawhon y col, 1972)

CAPACIDAD DE ESPUMADO (% Sobrendimiento)						
TIEMPO (HORAS)	60		70		80	
	x	ds	x	ds	x	ds
0	112.00	8.84	74.00	5.50	120.67	4.55
0.5	113.33	10.89	153.33	15.40	139.33	13.31
1	147.33	7.34	147.00	4.54	140.00	10.89
3	147.33	6.67	170.00	11.18	174.67	12.70
6	157.33	6.35	173.33	10.10	156.67	6.67
9	154.67	6.71	156.67	10.30	198.67	15.24
11	156.67	13.84	164.00	7.85	200.67	7.66

ANEXO 2
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS (SPSS 14.0)

Grado de desamidación

Descriptives

GD									
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
1	4	.5728	.01008	.00504	.5567	.5888	.56	.59	
2	4	1.1350	.09469	.04735	.9843	1.2857	1.05	1.24	
3	4	.9875	.09215	.04608	.8409	1.1341	.86	1.08	
4	4	1.4200	.07746	.03873	1.2967	1.5433	1.31	1.49	
5	4	1.9150	.16902	.08451	1.6461	2.1839	1.75	2.08	
6	4	2.9900	.08485	.04243	2.8550	3.1250	2.91	3.11	
7	4	3.3550	.11030	.05515	3.1795	3.5305	3.25	3.46	
8	4	2.8025	.28336	.14168	2.3516	3.2534	2.46	3.05	
9	4	1.1900	.02449	.01225	1.1510	1.2290	1.16	1.22	
10	4	2.5575	.18554	.09277	2.2623	2.8527	2.34	2.74	
11	4	3.2425	.20678	.10339	2.9135	3.5715	3.05	3.45	
12	4	5.1300	.24454	.12227	4.7409	5.5191	4.79	5.34	
13	4	5.2400	.10863	.05431	5.0671	5.4129	5.16	5.40	
14	4	5.3050	.10083	.05041	5.1446	5.4654	5.16	5.39	
15	4	5.3375	.07274	.03637	5.2217	5.4533	5.27	5.43	
16	4	1.1400	.11045	.05523	.9642	1.3158	1.03	1.24	
17	4	3.2825	.26424	.13212	2.8620	3.7030	3.02	3.51	
18	4	3.3125	.09215	.04608	3.1659	3.4591	3.20	3.41	
19	4	5.2950	.15546	.07773	5.0476	5.5424	5.16	5.49	
20	4	8.2175	.62925	.31463	7.2162	9.2188	7.60	8.89	
21	4	15.1800	.93063	.46531	13.6992	16.6608	14.03	15.99	
22	4	14.2300	.75406	.37703	13.0301	15.4299	13.31	15.10	
Total	88	4.2654	3.82481	.40773	3.4550	5.0758	.56	15.99	
Model									
Fixed Effects			.32065	.03418	4.1971	4.3336			
Random Effects				.82767	2.5441	5.9866			15.04515

Test of Homogeneity of Variances

GD			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
9.993	21	66	.000

ANOVA

GD					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1265.952	21	60.283	586.328	.000
Within Groups	6.786	66	.103		
Total	1272.738	87			

Homogeneous Subsets

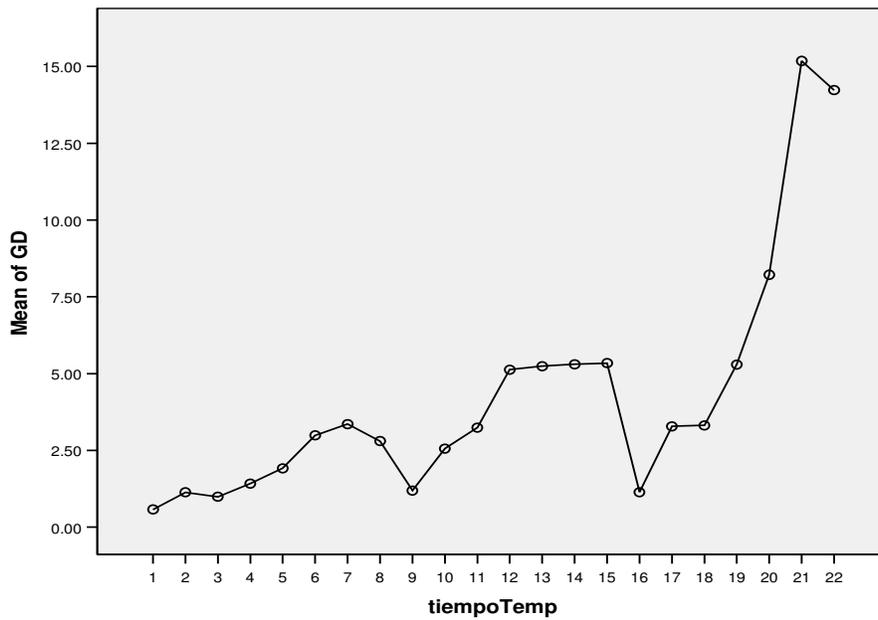
GD

tiempoTemp	N	Subset for alpha = .05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Tukey HSD										
1	4	.5728								
3	4	.9875								
2	4	1.1350	1.1350							
16	4	1.1400	1.1400							
9	4	1.1900	1.1900							
4	4	1.4200	1.4200							
5	4		1.9150	1.9150						
10	4			2.5575	2.5575					
8	4				2.8025					
6	4				2.9900					
11	4				3.2425					
17	4				3.2825					
18	4				3.3125					
7	4				3.3550					
12	4					5.1300				
13	4					5.2400				
19	4					5.2950				
14	4					5.3050				
15	4					5.3375				
20	4						8.2175			
22	4							14.2300		
21	4								15.1800	
Sig.		.051	.112	.396	.092	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Means Plots



Grado de Hidrólisis

Descriptives

GH		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
						Lower Bound	Upper Bound			
1		6	2.8550	.20452	.08350	2.6404	3.0696	2.58	3.21	
2		6	3.2167	.30421	.12420	2.8974	3.5359	2.76	3.60	
3		6	3.3283	.29212	.11926	3.0218	3.6349	3.03	3.62	
4		6	3.5017	.11703	.04778	3.3788	3.6245	3.29	3.62	
5		6	3.6083	.30708	.12536	3.2861	3.9306	3.29	3.94	
6		6	4.0383	.19405	.07922	3.8347	4.2420	3.84	4.25	
7		6	4.7867	.07659	.03127	4.7063	4.8670	4.70	4.90	
8		6	4.3950	.23296	.09511	4.1505	4.6395	4.09	4.72	
9		6	3.7000	.06197	.02530	3.6350	3.7650	3.64	3.78	
10		6	4.1600	.09529	.03890	4.0600	4.2600	4.05	4.33	
11		6	4.6500	.15937	.06506	4.4827	4.8173	4.48	4.82	
12		6	5.0617	.43783	.17874	4.6022	5.5211	4.58	5.48	
13		6	5.5967	.24320	.09929	5.3414	5.8519	5.25	5.86	
14		6	5.9983	.06524	.02664	5.9299	6.0668	5.92	6.11	
15		6	6.4183	.61411	.25071	5.7739	7.0628	5.74	7.17	
16		6	3.6900	.10789	.04405	3.5768	3.8032	3.56	3.82	
17		6	4.3100	.16456	.06718	4.1373	4.4827	4.15	4.52	
18		6	4.5433	.16133	.06586	4.3740	4.7126	4.33	4.74	
19		6	5.6900	.14629	.05972	5.5365	5.8435	5.56	5.88	
20		6	5.7583	.20537	.08384	5.5428	5.9739	5.46	6.01	
21		6	8.7633	.17851	.07288	8.5760	8.9507	8.60	8.99	
22		6	7.4900	.45861	.18723	7.0087	7.9713	6.72	8.09	
Total		132	4.7982	1.45341	.12650	4.5479	5.0484	2.58	8.99	
Model	Fixed Effects			.25819	.02247	4.7536	4.8427			
	Random Effects				.31174	4.1499	5.4465			2.12692

Test of Homogeneity of Variances

GH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8.175	21	110	.000

ANOVA

GH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	269.392	21	12.828	192.436	.000
Within Groups	7.333	110	.067		
Total	276.725	131			

Solubilidad

Descriptives

SOL

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
1	4	3.3250	.28758	.14379	2.8674	3.7826	3.12	3.73	
2	8	4.9800	.24963	.08826	4.7713	5.1887	4.52	5.34	
3	8	5.9475	.51724	.18287	5.5151	6.3799	5.23	6.66	
4	8	5.8850	.53200	.18809	5.4402	6.3298	5.44	6.77	
5	8	6.2575	.58592	.20716	5.7677	6.7473	5.44	7.28	
6	8	8.1300	.38984	.13783	7.8041	8.4559	7.58	8.91	
7	8	9.8888	.48804	.17255	9.4807	10.2968	9.21	10.64	
8	8	8.5238	.36174	.12789	8.2213	8.8262	7.68	8.91	
9	8	3.6913	.28428	.10051	3.4536	3.9289	3.30	4.11	
10	8	5.6163	.30425	.10757	5.3619	5.8706	5.23	6.26	
11	8	6.1400	.31113	.11000	5.8799	6.4001	5.64	6.56	
12	8	10.1338	.99205	.35074	9.3044	10.9631	9.21	11.56	
13	8	7.9513	.92334	.32645	7.1793	8.7232	6.87	9.01	
14	8	12.3388	1.22189	.43200	11.3172	13.3603	11.05	14.01	
15	8	12.4313	.97116	.34336	11.6193	13.2432	11.05	13.81	
16	8	4.3975	.39034	.13801	4.0712	4.7238	3.94	4.96	
17	8	7.8925	.60700	.21461	7.3850	8.4000	7.20	8.84	
18	8	10.9800	.84395	.29838	10.2744	11.6856	10.27	12.51	
19	8	16.4150	.88230	.31194	15.6774	17.1526	15.78	18.43	
20	8	16.0063	1.56778	.55429	14.6956	17.3169	13.94	17.82	
21	8	28.5550	1.34973	.47720	27.4266	29.6834	27.00	30.67	
22	8	27.1263	2.09310	.74002	25.3764	28.8761	23.53	29.24	
Total	172	10.2767	6.68295	.50957	9.2709	11.2826	3.12	30.67	
Model	Fixed Effects		.88354	.06737	10.1436	10.4099			
	Random Effects			1.45145	7.2583	13.2952			45.72822

Test of Homogeneity of Variances

SOL

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6.423	21	150	.000

ANOVA

SOL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7520.075	21	358.099	458.724	.000
Within Groups	117.096	150	.781		
Total	7637.171	171			

Índice de Actividad Emulsificante

Descriptives

IAE

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
1	6	2.2517	.13348	.05449	2.1116	2.3917	2.06	2.38	
2	12	5.2850	.40370	.11654	5.0285	5.5415	4.58	5.79	
3	12	5.0517	.48277	.13936	4.7449	5.3584	4.35	5.77	
4	12	8.0325	.45452	.13121	7.7437	8.3213	7.59	8.86	
5	12	8.5750	.80003	.23095	8.0667	9.0833	6.22	9.26	
6	12	7.4617	.32588	.09407	7.2546	7.6687	7.04	8.11	
7	12	11.4333	1.06979	.30882	10.7536	12.1130	9.27	12.60	
8	12	11.5217	1.23054	.35523	10.7398	12.3035	8.81	12.99	
9	12	3.2700	.23136	.06679	3.1230	3.4170	2.82	3.57	
10	12	4.4558	.24269	.07006	4.3016	4.6100	4.10	4.78	
11	12	4.8592	.22685	.06549	4.7150	5.0033	4.53	5.17	
12	12	7.3492	.37142	.10722	7.1132	7.5852	6.78	7.94	
13	12	8.0517	.25161	.07263	7.8918	8.2115	7.62	8.37	
14	12	9.9350	.64181	.18527	9.5272	10.3428	8.98	10.75	
15	12	10.2592	.41483	.11975	9.9956	10.5227	9.70	10.92	
16	12	7.8017	.25771	.07439	7.6379	7.9654	7.47	8.17	
17	12	7.6783	.45343	.13089	7.3902	7.9664	6.97	8.21	
18	12	9.2458	.41873	.12088	8.9798	9.5119	8.72	9.85	
19	12	13.2225	1.22995	.35505	12.4410	14.0040	11.66	14.89	
20	12	16.4375	1.40781	.40640	15.5430	17.3320	14.89	18.08	
21	12	20.9042	2.27746	.65745	19.4571	22.3512	19.24	25.46	
22	12	26.0417	2.83438	.81821	24.2408	27.8425	22.10	29.81	
Total	258	9.6743	5.56669	.34657	8.9919	10.3568	2.06	29.81	
Model									
Fixed Effects			1.01556	.06323	9.5498	9.7989			
Random Effects				1.20079	7.1772	12.1715			31.27844

Test of Homogeneity of Variances

IAE

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
17.299	21	236	.000

ANOVA

IAE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7720.520	21	367.644	356.464	.000
Within Groups	243.401	236	1.031		
Total	7963.922	257			

Estabilidad de Emulsión

Descriptives

EE

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
1	8	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00	
2	8	98.5625	2.92669	1.03474	96.1157	101.0093	91.60	100.00	
3	8	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00	
4	8	72.0875	4.11007	1.45313	68.6514	75.5236	63.20	76.20	
5	8	9.1875	.31820	.11250	8.9215	9.4535	8.60	9.50	
6	8	15.1750	1.14111	.40344	14.2210	16.1290	12.50	16.00	
7	8	3.2250	.10351	.03660	3.1385	3.3115	3.10	3.40	
8	8	3.2250	.11650	.04119	3.1276	3.3224	3.10	3.40	
9	8	98.9625	1.93016	.68242	97.3488	100.5762	95.50	100.00	
10	8	94.6750	4.07562	1.44095	91.2677	98.0823	88.50	100.00	
11	8	40.0500	4.00143	1.41472	36.7047	43.3953	33.60	46.50	
12	8	9.3875	.17269	.06105	9.2431	9.5319	9.20	9.60	
13	8	6.3625	.07440	.02631	6.3003	6.4247	6.30	6.50	
14	8	3.2250	.04629	.01637	3.1863	3.2637	3.20	3.30	
15	8	3.1000	.16903	.05976	2.9587	3.2413	2.90	3.30	
16	8	100.0000	.00000	.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00	
17	8	12.5375	1.05822	.37414	11.6528	13.4222	10.00	13.10	
18	8	3.2000	.05345	.01890	3.1553	3.2447	3.10	3.30	
19	8	3.2875	.11260	.03981	3.1934	3.3816	3.10	3.40	
20	8	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00	
21	8	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00	
22	8	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00	
Total	176	35.2841	42.00765	3.16645	29.0348	41.5334	.00	100.00	
Model	Fixed Effects		1.71139	.12900	35.0293	35.5389			
	Random Effects			9.13406	16.2888	54.2794			1835.11860

Test of Homogeneity of Variances

EE

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
9.119	21	154	.000

ANOVA

EE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	308361.4	21	14683.878	5013.507	.000
Within Groups	451.045	154	2.929		
Total	308812.5	175			

Capacidad de espumado

Descriptives

CAPESP

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
					Lower Bound	Upper Bound			
1	2	33.3000	.00000	.00000	33.3000	33.3000	33.30	33.30	
2	4	111.9750	8.82926	4.41463	97.9257	126.0243	100.00	121.30	
3	4	113.3250	10.87578	5.43789	96.0192	130.6308	102.70	124.00	
4	4	147.3500	7.34143	3.67072	135.6681	159.0319	140.00	156.00	
5	4	147.3250	6.67002	3.33501	136.7115	157.9385	140.00	156.00	
6	4	157.3250	6.33634	3.16817	147.2425	167.4075	148.00	161.30	
7	4	154.6500	6.71541	3.35770	143.9643	165.3357	145.30	161.30	
8	4	156.6750	13.80878	6.90439	134.7021	178.6479	148.00	177.30	
9	4	73.9750	5.48536	2.74268	65.2466	82.7034	68.00	81.30	
10	4	153.3500	15.41525	7.70763	128.8209	177.8791	140.00	166.70	
11	4	147.0000	4.51516	2.25758	139.8154	154.1846	142.70	153.30	
12	4	170.0000	11.20060	5.60030	152.1774	187.8226	153.30	177.30	
13	4	173.3500	10.08117	5.04059	157.3086	189.3914	166.70	188.00	
14	4	156.6750	10.28992	5.14496	140.3014	173.0486	150.70	172.00	
15	4	164.0000	7.86935	3.93467	151.4781	176.5219	153.30	172.00	
16	4	120.6750	4.56244	2.28122	113.4151	127.9349	116.00	126.70	
17	4	139.3250	13.29721	6.64861	118.1662	160.4838	126.70	153.30	
18	4	140.0000	10.85940	5.42970	122.7203	157.2797	126.70	153.30	
19	4	174.6750	12.66554	6.33277	154.5213	194.8287	166.70	193.30	
20	4	156.6500	6.70000	3.35000	145.9888	167.3112	153.30	166.70	
21	4	198.6750	15.26267	7.63134	174.3887	222.9613	180.00	214.70	
22	4	200.7000	7.65942	3.82971	188.5122	212.8878	190.70	206.70	
Total	86	147.6430	34.17397	3.68507	140.3161	154.9699	33.30	214.70	
Model									
Fixed Effects			9.84100	1.06118	145.5231	149.7630			
Random Effects				7.22038	132.6274	162.6586			1109.56928

Test of Homogeneity of Variances

CAPESP

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.827	21	64	.034

ANOVA

CAPESP

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	93070.038	21	4431.907	45.763	.000
Within Groups	6198.093	64	96.845		
Total	99268.131	85			