



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES QUE PERMITEN
LA UNIÓN DE PROTEÍNAS A LOS GRÁNULOS
DE ALMIDÓN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

PRESENTA

PAOLA CORREA GALINDO



MÉXICO, D.F.

2012



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	Francisca Aida Iturbe Chiñas
Vocal	Jesús Fernando Montiel Aguirre
Secretario	J. Eleazar Martínez Barajas
1er. Suplente	Bertha Julieta Sandoval Guillen
2º Suplente	Laura Carmona Salazar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Departamento de Bioquímica
Laboratorio 102, Facultad de Química "E" – UNAM

ASESOR DEL TEMA

Dr. Eleazar Martínez Barajas

SUPERVISOR TÉCNICO

Dra. Lilia Bernal

SUSTENTANTE

Paola Correa Galindo

CRÉDITOS

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento otorgado por DGAPA al proyecto ***Análisis de los efectos del desarrollo y de la deficiencia de fosfato sobre la actividad del complejo SnRK1 en semillas de frijol*** (IN217811).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eleazar Martínez Barajas, responsable del Laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química "E" y Director de esta tesis de licenciatura, quiero expresarle mi gratitud por haberme aceptado en su grupo de investigación, por dirigir esta tesis de manera excelente y con gran rigor científico, por su interés, sus consejos y apoyo constante a lo largo de mi estancia en su laboratorio para lograr avanzar un peldaño más en mi carrera profesional y sobre todo por enseñarme el valor de la disciplina, ya que su dedicación y fortaleza son un ejemplo a seguir en el diario acontecer.

A la Dra. Lilia Bernal que durante mi estancia fungió como Supervisor Técnico, gracias por las observaciones a este trabajo, por todos los momentos brindados para resolver las dudas, por sus comentarios tan certeros y por el apoyo otorgado durante este trabajo.

A mis maestros, por sus consejos y por compartir desinteresadamente sus amplios conocimientos y experiencia.

A la UNAM por la formación académica que me dio a través de sus profesores.

DEDICATORIA

Agradezco a mi entorno que me dio las facultades para pensar en mi futuro y sobre todo a mis padres Pablo Héctor Correa Moreno y Mirna Yicel Picazo Luna, que si no fuera por su sacrificio no estaría en estos momentos y quienes durante estos años confiaron en mí, comprendiendo mis ideales y el tiempo que no estuve con ellos.

Gracias a la vida que tengo, a mis hermanos y a mis amigos que quiero, no tengo letras para seguir diciendo el gran regocijo que me da poder terminar esta carrera en donde profesores y compañeros dejan parte de su vida, para dar vida ilusiones que hoy en día se hacen realidad.

Muchas gracias!

ABREVIATURAS

°C	grado centígrado
nm	nanómetro
g	gramo
mg	miligramo
mM	milimolar
mL	mililitro
μL	microlitro
μm	micrómetro
λ	longitud de onda
μg	microgramo
pH	potencial de hidrógeno
<i>x g</i>	campo centrífugo relativo
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
REDOX	Reducción-oxidación
DTT	Ditiotreitol
GSSG	Disulfuro de glutatión
GSH	γ-glutamilcisteinilglicina (glutatión)
PO ₃ Cl ₂	Cloruro de fosforilo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
Tris- HCl	Tris (hidroximetil) aminometano clorhidrato

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Página
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Generalidades del almidón	3
2.1.1 Estructura del almidón	6
2.1.2 Amilosa	6
2.1.3 Amilopectina	7
2.2 El gránulo de almidón	9
2.3 Propiedades funcionales del almidón	12
2.4 Almidones modificados	12
2.5 Gelatinización	13
2.6 Métodos más frecuentemente usados para modificar almidón	14
2.6.1 Entrecruzamiento	14
2.6.2 Degradación	15
2.6.2.1 Hidrólisis	15
2.6.2.2 Dextrinización	15
2.6.2.3 Oxidación	16
2.6.3 Pregelatinización	16
2.6.4 Derivatización	16
2.7 Asociación de proteínas a la superficie de los gránulos de almidón	17
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18

3.1 Hipótesis	18
3.2 Objetivos	18
3.2.1 General	18
3.2.2 Específicos	18
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.	19
4.1 Purificación de almidón a partir de tubérculos de papa	19
4.2 Extracción de proteínas de semillas de frijol	19
4.3 Cuantificación de proteína por método Bradford	20
4.4 Interacción entre almidón y proteínas	20
4.5 Efecto del DTT sobre el GSSG	21
4.6 Capacidad de absorción de agua	22
4.6.1 De almidón seco	22
4.6.2 De almidón gelatinizado	22
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
5.1 Interacción proteínas – almidón	23
5.2 Funciones del Glutati6n	23
5.3 Análisis de la uni6n de proteínas de semilla de frijol a los gránulos de almid6n de papa, por efecto de GSSG y DTT	24
5.4 Efecto de GSSG sobre el proceso de panificaci6n	26
5.5 Determinaci6n del tiempo de interacci6n proteínas – almid6n	27
5.6 Análisis del efecto de diferentes concentraciones de GSSG sobre la interacci6n proteínas – almid6n	28
5.7 Azúcares utilizados para liberar proteínas que se unieron a los gránulos de almid6n en presencia de GSSG	29
5.8 Efecto del DTT en la liberaci6n de proteínas en presencia de	31

GSSG	
5.9 Efecto del DTT en la no unión de proteínas a los gránulos de almidón	32
5.10 Efecto que provocan las proteínas sobre las propiedades funcionales del almidón	33
VI. CONCLUSIONES	36
VII. PERSPECTIVAS	37
VIII. BIBLIOGRAFÍA	38

LISTA DE CUADROS

	Página
1 Fuentes más importantes de almidón.	3
2 Características y propiedades de algunos almidones.	5
3 Características fisicoquímicas de los componentes del almidón.	9
4 Características de gránulos de almidón de diferentes fuentes botánicas.	11
5 Contenido de proteínas y lípidos en algunos almidones comúnmente usados.	12

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Segmento de la estructura de la amilosa.	7
2 Segmento de la estructura de la amilopectina.	8
3 Representación esquemática de la estructura granular del almidón.	10
4 Representación esquemática de los cambios en el almidón durante el calentamiento en exceso de agua.	14
5 Perfil de proteínas separadas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12.5% y teñidas con azul de Coomassie.	25
6 Efecto del DTT y GSSG (1mM) en la asociación de proteínas de semilla de frijol a los gránulos de almidón de papa.	26
7 Efecto del tiempo sobre la interacción que GSSG promueve entre las proteínas de un extracto de semillas de frijol y gránulos de almidón de papa.	27
8 Efecto de la concentración de GSSG sobre la asociación de proteínas de semilla de frijol a los gránulos de almidón.	28
9 Efecto de la concentración de glucosa para liberar proteínas que se unen a los gránulos de almidón en presencia de GSSG (10mM).	29
10 Capacidad de diferentes azúcares para liberar proteínas que se unieron a los gránulos de almidón en presencia de GSSG (1mM).	30

11 Capacidad de DTT para liberar proteínas que se unieron a gránulos de almidón en presencia de GSSG (10mM) y que permanecieron unidas después de lavarlos con una solución de glucosa al 20%.	31
12 Capacidad de DTT para no permitir la unión de proteínas a los gránulos de almidón promovida por GSSG (1 y10mM).	33
13 Capacidad de retención de agua de almidón de papa.	34
14 Capacidad de retención de agua de almidón gelatinizado.	35

RESUMEN.

Además de ser el componente principal de muchos alimentos, el almidón es ampliamente utilizado en la industria. La lista de sus aplicaciones es larga (incluye el ser adhesivo, ligante, enturbiante, formador de películas, estabilizante de espumas, gelificante, glaseante, humectante, texturizante, espesante y plastificante de muchos productos) y podrá incrementarse si se desarrollan nuevos métodos para modificar sus características. Dado que algunas de las propiedades funcionales del almidón dependen de las proteínas que se encuentran asociadas a la superficie de los gránulos, en este trabajo se investigó si el ambiente REDOX puede favorecer la unión de proteínas presentes en una fuente barata y fácilmente accesible (extracto de semillas de frijol) a gránulos de almidón que casi no tienen proteínas en su superficie (purificados de tubérculos de papa). Observamos que el glutatión oxidado (GSSG) a concentraciones entre 1 y 10 mM promueve una interacción estable entre proteínas del extracto de semillas de frijol y el almidón de papa. Concentraciones elevadas (20%) de glucosa, fructosa, manosa y manitol no desestabilizaron la interacción de las proteínas unidas y tampoco lo hizo la reducción con 50 mM de ditioneitol (DTT). El almidón modificado por la unión de proteínas incrementó de manera significativa su capacidad de retención de agua.

I. INTRODUCCIÓN

Las propiedades del almidón nativo pueden ser mejoradas si se le somete a diferentes tratamientos (Rincón *et al.*, 2007). De esta manera se obtienen muchos de los almidones utilizados en la industria de alimentos y farmacéutica. Sin embargo, es necesario desarrollar nuevos métodos de modificación, pues ello permitiría que a partir de almidón pudieran elaborarse productos novedosos. Se ha reportado que las proteínas que se encuentran asociadas a la superficie de los gránulos de almidón pueden alterar sus propiedades funcionales, tales como la solubilidad, textura, poder de hinchamiento, viscosidad, cristalinidad, color, resistencia mecánica, color, etc. (Beynum y Roels, 1985). En comparación con otros métodos, esta es una práctica relativamente poco estudiada y con el fin de explorar sus posibilidades de aplicación, sería interesante estudiar si a partir de una fuente barata de proteínas como lo es el extracto de semillas de frijol es posible modificar las características del almidón de papa mediante el uso de diferentes agentes oxidantes.

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del almidón.

El almidón es un polímero formado por moléculas de glucosa que las plantas utilizan como sustancia de reserva y que en forma de gránulos se acumulan en grandes cantidades en semillas, raíces y tubérculos. Los excedentes de la actividad fotosintética también se almacenan como almidón en las hojas. Este tipo de almidón no se aprovecha comercialmente pero cumple una función fisiológica muy importante, pues al degradarse por la noche, garantiza un suministro constante de carbono reducido. El almidón que se almacena en semillas, raíces y tubérculos proporciona el 70-80% de las calorías consumidas por los humanos (Fennema, 2003) y es materia prima básica en las industrias alimenticia, textil y de papel. En el Cuadro 1 se observan diferentes fuentes como cereales, raíces, tubérculos y leguminosas que son ampliamente utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica, ya que representan un insumo vital para la industria de alimentos, siendo sus propiedades funcionales determinantes en la calidad del producto final.

Cuadro 1. Fuentes más importantes de almidón (Fennema, 2003).

Tubérculos y raíces	Cereales (semillas)	Leguminosas (semillas)
Papa	Maíz	Frijoles
Camote	Trigo	Lentejas
Tapioca	Arroz	Guisantes
Yuca	Sorgo	

Desde el punto de vista comercial, después de la celulosa, el almidón es el polisacárido más empleado. Por otro lado, las posibilidades de uso industrial (adhesivo, ligante, enturbiante, formador de películas, estabilizante de espumas, agente antienviejecimiento de pan, gelificante, glaseante, humectante, estabilizante, texturizante y espesante, entre otras), así como las propiedades fisicoquímicas de los productos elaborados con almidón, en gran medida están determinadas tanto por las características de éste (tamaño del gránulo, contenido relativo de amilosa y amilopectina, etc.) como por las que resultan de su asociación con proteínas y lípidos (Tester *et al.*, 2004). Aunque estos atributos están ampliamente influidos por el origen botánico del almidón (Cuadro 2), la variabilidad disponible no siempre es suficiente para satisfacer los requerimientos de la industria, por lo que se han desarrollado procedimientos químicos, mecánicos y enzimáticos que al modificar las características del almidón (De Pater *et al.*, 2006), han ampliado de manera notable su gama de aplicaciones (Fennema, 2003).

En el Cuadro 2 se observa que el contenido de humedad varía, esto es importante ya que un contenido superior de humedad puede ocasionar daño microbiano y por tanto, el deterioro en la calidad del polímero. Además todos los almidones contienen pequeñas cantidades de proteínas, lípidos, fósforo y trazas de materiales inorgánicos. El contenido de fósforo en la mayoría de los almidones es mínimo, con excepción del almidón de papa, que hasta ahora es el único almidón comercial que contiene una cantidad apreciable de fósforo, en forma de monoéster de fosfatos. El fósforo presente en el almidón, proporciona un efecto significativo en el alimento que lo contiene.

Ocasiona una mayor estabilidad al descongelamiento, así como un incremento en la claridad de las pastas (Tester *et al.*, 2004). Adicionalmente, provoca un rápido hinchamiento de los gránulos de almidón a temperaturas relativamente bajas, lo que indica un débil enlazamiento interno como consecuencia de los grupos fosfato que se encuentran esterificados y ionizados que contribuyen al hinchamiento del gránulo debido a una repulsión eléctrica mutua al forzar la expansión de la molécula.

Cuadro 2. Características y propiedades de algunos almidones (Tomado de Mundo Láctico y Cárnico)

Propiedad	Fécula de papa	Almidón de maíz	Almidón de trigo	Fécula de Tapioca
Tamaño de partícula (µm)	5-100	2-30	1-46	4-35
Humedad (%)	18-20	11-13	11-13	13-15
Fósforo (%)	0.08	0.02	0.06	0.01
Proteína (%)	0.1	0.45	0.4	0.1
Grasa (%)	0.05	0.8	0.9	0.1
Transparencia	Muy claro	Claro	Opaco	Claro
Retrogradación	Media	Alta	Alta	Baja
Resistencia mecánica	Media- baja	Media	Media	Baja
Textura	Larga	Corta	Corta	Larga
Temperatura de Gelatinización (°C)	58-65	75-80	80-85	60-65
Color	Blanco	Amarillento	Amarillento	Blanco

En los últimos años, ha sido posible relacionar la actividad de las enzimas que participan en la biosíntesis con las características del almidón (Tetlow y Emes, 2004) y las herramientas de biología molecular e ingeniería genética se han usado con éxito para la obtención de almidones con propiedades novedosas (Tetlow y Emes, 2004). Sin embargo, hay sectores que se oponen fuertemente al uso de plantas transgénicas, por lo que la búsqueda de métodos alternativos para modificar las propiedades del almidón sigue siendo válida.

2.1.1 Estructura del almidón.

En los gránulos del almidón se pueden distinguir dos tipos de α -glucanos: amilosa y amilopectina. Estas macromoléculas se caracterizan por su grado de polimerización y ramificación. La proporción relativa de amilosa:amilopectina define muchas de las propiedades físicas, químicas y funcionales del almidón (Aristizabal y Sánchez, 2007; Aristizabal *et al.*, 2007; Smith, 2001) e influye de manera directa en las características sensoriales y reológicas (principalmente en la capacidad de hidratación y gelatinización) de los productos elaborados (Fennema, 2003; Herrera *et al.*, 2003). El contenido de amilosa en la mayoría de los almidones de uso industrial oscila entre 20-35%, sin embargo, los almidones cerosos contienen menos del 15%, mientras que otros pueden alcanzar el 40% (Tester *et al.*, 2004).

2.1.2 Amilosa.

Es un polímero relativamente lineal (Figura 1), donde la mayor parte de las unidades de α -D-glucosa están unidas por enlaces α -D-(1 \rightarrow 4).

Dependiendo del origen botánico, por cada 180-320 residuos de glucosa se forma un enlace α -D-(1 \rightarrow 6) que da origen a ramificaciones (Fennema, 2003).

La amilosa tiende a adoptar una conformación helicoidal, con vueltas formadas por seis moléculas de glucosa (Badui, 2006). Posee un extremo donde el grupo hidroxilo del carbono anomérico está libre (por lo cual se le llama extremo reductor), mientras que en el extremo opuesto, el grupo en cuestión forma parte del enlace glucosídico. La abundancia de grupos hidroxilo otorga propiedades hidrofílicas al polímero, sin embargo, la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares reduce la afinidad de la amilosa por el agua (Aristizabal y Sánchez, 2007).

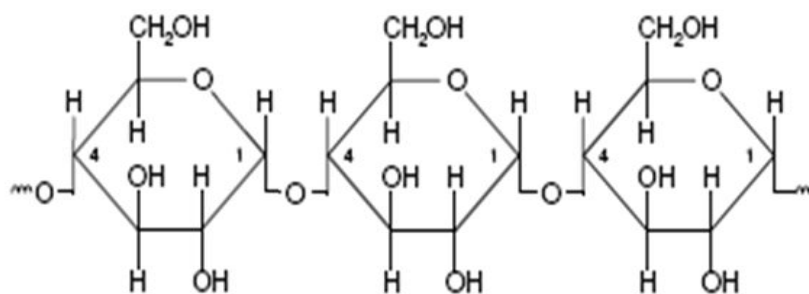


Figura 1. Segmento de la estructura de la amilosa (Peñaranda *et al.*, 2008).

2.1.3 Amilopectina.

La amilopectina es una molécula más grande y ramificada (Figura 2) (Bernal y Martínez-Barajas, 2006), aproximadamente cada 18-30 moléculas de glucosa unidas por enlaces α -D-(1 \rightarrow 4), aparece un enlace α -D-(1 \rightarrow 6) que forma un punto de ramificación.

El resultado es una molécula compleja en donde existe una cadena principal (denominada cadena C) que contiene el único extremo reductor, a la que se unen numerosas ramas (llamadas cadenas B), a las que a su vez se unen otras cadenas (cadenas A) que ya no se ramifican (Fennema, 2003). Al igual que la amilosa, las características de la amilopectina (tamaño molecular, forma y estructura) también varían de acuerdo al origen botánico. (Tester *et al.*, 2004; Bernal y Martínez-Barajas, 2006). Con frecuencia las moléculas de amilopectina están modificadas con grupos éster fosfato (aproximadamente uno cada 215-560 unidades α -D-glucosa), la mayoría de los cuales (alrededor del 90%) están en cadenas B. La presencia de estos grupos confiere una carga ligeramente negativa, que resulta en una cierta repulsión y facilita el hinchamiento de los gránulos de almidón en agua caliente (Fennema, 2003). El gran número de ramificaciones en las moléculas de amilopectina disminuye las interacciones entre cadenas y facilita la solvatación.

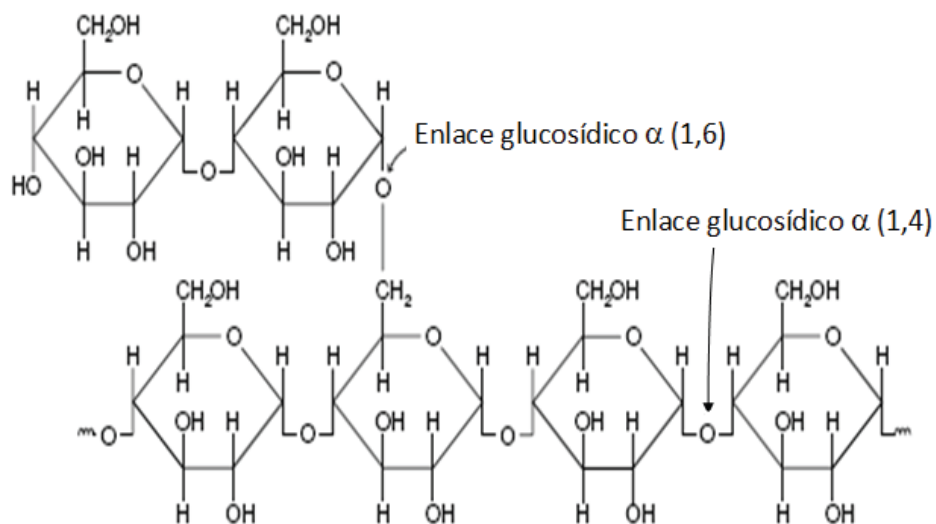


Figura 2. Segmento de la estructura de la amilopectina (Peñaranda *et al.*, 2008).

La amilosa y la amilopectina tienen características fisicoquímicas muy diferentes (Cuadro 3), por lo que su abundancia relativa tiene un profundo efecto en las propiedades de los productos que se elaboran con almidón.

Cuadro 3. Características fisicoquímicas de los componentes del almidón (Biliaderis, 2011).

Propiedad	Amilosa	Amilopectina
Estructura molecular	Esencialmente lineal α (1,4)	Ramificada α (1,4), α (1,6)
Grado de polimerización	$\sim 10^3$	$\sim 10^4$ y 10^5
Peso Molecular	10^5 - 10^6 Daltons	10^7 - 10^9 Daltons
λ máx del complejo con Yodo. (color)	640-600nm Azul	530-550nm Violeta
Estabilidad a soluciones acuosas diluidas	Inestable (retrógrada)	Estable
Textura de gel	Rígido, irreversible ($T_m > 100^\circ\text{C}$)	Suave, térmicamente reversible a $< 100^\circ\text{C}$
Patrón de rayos x	Cristalino	Amorfo

2.2 El gránulo de almidón.

El gránulo de almidón es una estructura esferoidal formada por capas o anillos concéntricos (Figura 3), donde las moléculas de amilosa y amilopectina se encuentran entremezcladas y dispuestas de manera radial (Fennema, 2003). Las moléculas de amilosa y las cadenas laterales externas de amilopectina se unen a través de puentes de hidrógeno y forman zonas cristalinas que se alternan con regiones amorfas (Sandoval *et al.*, 2005; Bernal y Martínez-Barajas, 2006).

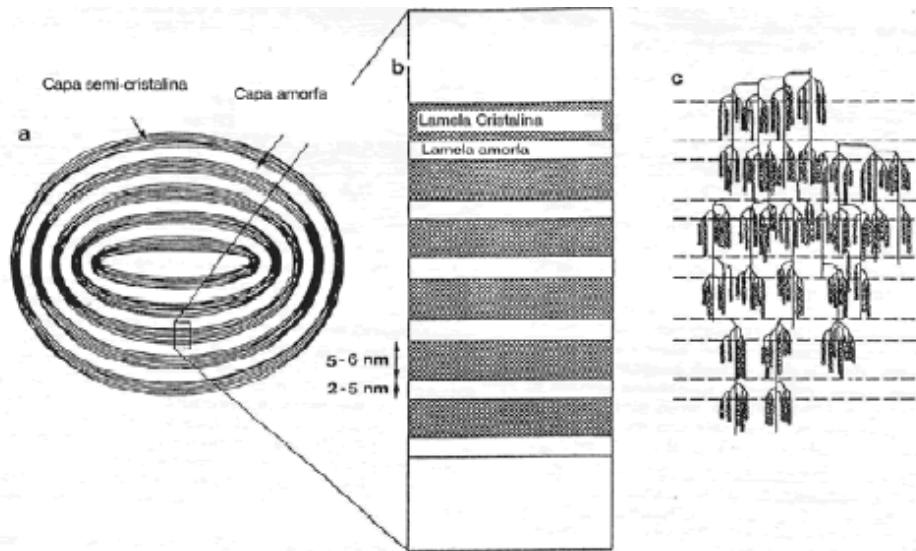


Figura 3. Representación esquemática de la estructura granular del almidón: (a) un gránulo con capas amorfas y semicristalinas, (b) vista expandida de la capa semicristalina de un anillo creciente, (c) estructura de la amilopectina dentro de la capa semicristalina (Sandoval *et al.*, 2005).

El análisis de su estructura permite clasificar a los gránulos en los tipos A y B. Los primeros son característicos de cereales y se distinguen por el denso empaquetamiento de las dobles hélices así como por la presencia de canales amorfos o poros que podrían facilitar su degradación. En los de tipo B, el arreglo es mas relajado y entre las dobles hélices quedan incluidas algunas moléculas de agua (Bernal y Martínez-Barajas, 2006; Ann *et al.*, 2006).

Los gránulos de almidón presentan variaciones en tamaño (1–100 μ de diámetro), forma (redondo, lenticular, poligonal), distribución dimensional (uni o bimodal), asociación (gránulos individuales o en forma de racimos compuestos, (Cuadro 4)), contenido de lípidos y de proteínas (Cuadro 5) así como de minerales

y humedad que reflejan su origen botánico (Ann *et al.*, 2006). Estas variables se combinan y en conjunto determinan el uso más apropiado del almidón.

Cuadro 4. Características de gránulos de almidón de diferentes fuentes botánicas (Tester *et al.*, 2004).

Almidón	Tipo	Forma	Distribución	Tamaño (µm)
Cebada	Cereal	Lenticular (tipo-A), esférico (tipo-B)	Bimodal	15-25, 2-5
Maíz (ceroso y normal)	Cereal	Esférico/poliedro	Unimodal	2-30
Amilomaíz	Cereal	Irregular	Unimodal	2-30
	Cereal	Poliedro	Unimodal	4-12
Avena	Cereal	Poliedro	Unimodal	3-10
Chícharo	Legumbre	Rentiforme	Unimodal	5-10
Papa	Tubérculo	Lenticular	Unimodal	5-100
Arroz	Cereal	Poliedro	Unimodal	3-8
Centeno	Cereal	Lenticular (tipo-A), Esférico (tipo-B)	Bimodal	10-40 5-10
Sorgo	Cereal	Esférico	Unimodal	5-20
Tapioca	Raíz	Esférico/lenticular	Unimodal	5-45
Sago	Cereal	Oval	Unimodal	20-40

Cuadro 5. Contenido de proteína y lípidos en algunos almidones comúnmente usados (Ellis *et al.*, 1998).

Almidón	Proteína (g/100g)	Lípidos (g/100g)
Trigo	0,4	0,9
Papa	0,1	0,1
Yuca	0,1	0,1
Maíz	0,35	0,8

2.3 Propiedades funcionales del almidón.

Estas se refieren a propiedades del almidón que tienen un fuerte impacto en las características de los productos que se elaboran con él, algunas de las más comunes son: solubilidad, capacidad de retención de agua, transparencia, tendencia a retrogradar, propiedades de flujo, etc, y como se puede observar en el Cuadro 2 son altamente dependientes del origen botánico del almidón. A manera de ejemplo podemos mencionar que la gran capacidad de hinchamiento del almidón de papa, facilita la elaboración de pastas muy viscosas (Fennema, 2003), las cuales son muy usadas en la preparación de cereales extruídos y mezclas para sopas y postres, entre otros productos.

2.4 Almidones modificados.

El almidón es ampliamente usado en la elaboración de gran cantidad de productos, muchos de los cuales desafortunadamente se caracterizan por tener baja resistencia a esfuerzos, fácil descomposición térmica, así como altos niveles

de retrogradación y sinéresis, entre otras. Afortunadamente la aplicación de diversos tratamientos químicos, físicos y bioquímicos puede modificar las propiedades del almidón nativo que dan origen a esas características indeseables (Rutenberg, 1984). De esta manera se han obtenido mejores materias primas (consistencia, poder aglutinante, estabilidad a cambios en el pH y temperatura, gelificación, dispersión y fluidez) con las que se han elaborado productos novedosos (Fennema, 2003).

2.5 Gelatinización.

Los gránulos de almidón son insolubles en agua fría (Badui, 2006), pero al aumentar la temperatura se facilita su hidratación. Las zonas amorfas por tener menos puentes de hidrógeno se hidratan primero (Badui, 2006). En temperaturas de 65°C se produce un primer hinchamiento (esta temperatura puede variar dependiendo de las características del almidón) y el gránulo alcanza su volumen máximo. La amilosa y/o amilopectina solubilizadas constituyen una fase continua mientras que los restos de los gránulos forman otra discontinua y la solución alcanza su máximo de viscosidad (Badui, 2006; Fennema, 2003).

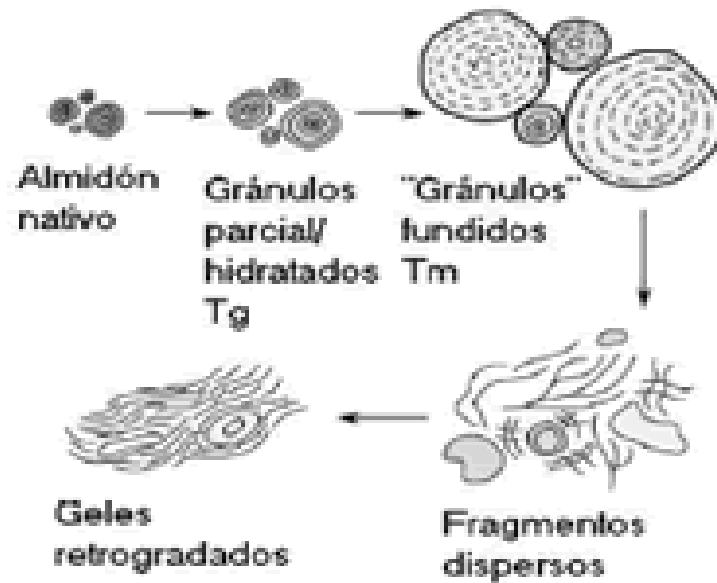


Figura 4. Representación esquemática de los cambios en el almidón durante el calentamiento en exceso de agua (Sandoval, *et al.*, 2005).

2.6 Métodos más frecuentemente usados para modificar almidón.

2.6.1 Entrecruzamiento.

El entrecruzamiento se produce cuando los gránulos de almidón se tratan con agentes bifuncionales, los cuales reaccionan con dos grupos hidroxilo de distintas moléculas del mismo gránulo. La forma más frecuente de entrecruzamiento es la producción de ésteres fosfato de almidón. Por ejemplo el almidón se puede hacer reaccionar con cloruro de fosforilo (PO_3Cl_2) o bien con trimetafosfato sódico en medio alcalino, y posteriormente se seca. De esta forma se obtienen productos estables y resistentes, algunos de los cuales son muy usados en panificación (Peñaranda *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2010).

2.6.2 Degradación.

Estos son procesos que involucran la despolimerización parcial del almidón. Generalmente tienen como propósito reducir la viscosidad de los productos para que soluciones concentradas tengan buenas propiedades de flujo (Singh *et al.*, 2010).

2.6.2.1 Hidrólisis.

El tratamiento con ácido clorhídrico puede hidrolizar muchos de los enlaces glucosídicos de las regiones amorfas de los gránulos (las regiones cristalinas pueden permanecer relativamente intactas). Este método es ampliamente usado para obtener soluciones de baja viscosidad con propiedades adhesivas y/o formadoras de películas (Palma *et al.*, 2010).

2.6.2.2 Dextrinización.

Las dextrinas son productos de degradación del almidón obtenidas por calentamiento, el mecanismo de su elaboración involucra procesos de ruptura hidrolítica, reorganización de moléculas y repolimerización. El calor rompe las uniones α -D-(1 \rightarrow 4) e incrementa las α -D-(1 \rightarrow 6). Al disminuir la longitud de las cadenas e incrementar el grado de ramificación, se favorece la solubilidad en agua fría y se incrementa la resistencia al ataque enzimático (Aristizabal y Sánchez, 2007; Singh *et al.*, 2010).

2.6.2.3 Oxidación.

Cuando el almidón se hace reaccionar con hipoclorito de sodio a pH y temperatura controlados, los grupos hidroxilo (OH^-) son oxidados primero a grupos carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) y luego a grupos carboxilo (COOH), lo cual provoca la hidrólisis de algunos de los enlaces glucosídicos (Wang y Wang, 2003). Los almidones oxidados son ampliamente usados en la elaboración de salsas, mayonesa, gelatinas, en la industria textil, farmacéutica, etc. (Wang y Wang, 2003; Singh *et al.*, 2010; Rivas *et al.*, 2008).

2.6.3 Pregelatinización.

El tratamiento hidrotérmico a temperaturas bajas (de transición vítrea del polímero) durante tiempos cortos propicia la fusión parcial de los cristales de amilosa. Esto debilita las fuerzas intermoleculares y permite que las cadenas pequeñas de amilosa se solubilizan y difundan hacia el exterior, mientras que la mayor parte de la amilopectina permanece dentro de los gránulos. El almidón modificado de esta manera se usa para la elaboración de alimentos de preparación rápida, flanes y rellenos, etc. (Garzón, 2006; Singh *et al.*, 2010).

2.6.4 Derivatización.

Esta modificación involucra la introducción de diversos grupos sustituyentes que se unen al almidón por enlaces éster y éter. El resultado es un debilitamiento de los gránulos de almidón que estabiliza las dispersiones y previene la retrogradación de las moléculas (Peñaranda *et al.*, 2008).

2.7 Asociación de proteínas a la superficie de los gránulos de almidón.

Las proteínas que se localizan en la superficie de los gránulos o insertadas en su matriz, pueden alterar las propiedades del almidón (Tester *et al.*, 2004). Generalmente en almidones comerciales el contenido de proteína es bajo y no influye en la gelatinización. Sin embargo, al aumentar su presencia, las proteínas pueden formar complejos con el almidón (Tester *et al.*, 2004). Se ha reportado que la atracción de las cargas positivas de la proteína por las cargas negativas del almidón facilita la formación de los complejos proteína-almidón (Takeuchi, 1969). Las proteínas también pueden asociarse a almidón gelatinizado, en este caso la capacidad de incorporación es altamente dependiente del pH y de la temperatura, encontrando que la máxima interacción en un sistema de proteína-almidón ocurre a un pH de 6.5 y que temperaturas menores a 60°C favorecen el proceso (Dahle *et al.*, 1975). La unión de proteínas al almidón es un procedimiento que puede ser utilizado para modificar las propiedades del almidón. Sin embargo, su aplicación depende en gran medida de que se caracterice mejor el efecto de los factores que pueden influirla.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

- Las condiciones de óxido-reducción son importantes para la unión de proteínas presentes en un extracto de semillas de frijol a almidón de papa.

3.2 Objetivos

3.2.1 General

- Evaluar las condiciones necesarias para que se lleve a cabo la interacción de las proteínas de semilla de frijol y almidón de papa, con el fin de que ocurran cambios en las propiedades del almidón.

3.2.2 Específicos

- Establecer las condiciones de óxido-reducción que favorezcan la unión de proteínas de semilla de frijol a los gránulos de almidón de papa.
- Conocer el tiempo necesario para que ocurra la interacción, mediante la cuantificación de proteína.
- Analizar si este procedimiento puede ser usado para modificar las propiedades funcionales del almidón de papa.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Purificación de almidón a partir de tubérculos de papa.

Los tubérculos se lavaron con agua, se pelaron y cortaron en cubos, de los cuales 400 g se pusieron en 400 mL de agua y se licuaron durante 45 segundos. La mezcla se dejó reposar 20 minutos y el líquido se decantó. El sedimento se suspendió en agua y se hizo pasar a través de un tamiz No. 20. El material retenido se licuó y tamizó nuevamente. La solución tamizada se dejó reposar 30 minutos y el líquido se desechó. El almidón fue suspendido en agua y se pasó por el tamiz No. 60. La solución filtrada se dejó reposar 30 minutos, después de decantar el líquido, la fracción que contiene el almidón se secó en un horno de convección durante 24 horas a 50°C. Finalmente, el almidón seco se molió en un mortero y se tamizó con una criba del No. 60.

4.2 Extracción de proteínas de semillas de frijol.

Semillas de frijol de la variedad Flor de Mayo, se molieron en un mortero y la harina obtenida se pasó por un tamiz de malla No. 200. La harina (2 g) se resuspendió en 3 mL de amortiguador de extracción (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) y se mezclaron durante una hora en un agitador rotatorio a 4°C. Posteriormente, se centrifugó 20 minutos a 10,000 x g y la concentración de proteína en el sobrenadante se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

4.3 Cuantificación de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Para la cuantificación de la proteína se hizo una curva patrón de 0 a 25 μg con albúmina bovina. El volumen de las muestras se ajustó con agua a 100 μL , se agregaron 1.5 mL de reactivo de Bradford y después de incubar 10 minutos a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia a 595 nm. Se obtuvo la ecuación de la regresión lineal y la cantidad de proteína presente en las muestras se calculó por interpolación de las lecturas respectivas.

4.4 Interacción entre almidón y proteínas.

El almidón (50 mg) se lavó 3 veces con amortiguador de extracción y se mezcló con 3 mg de proteínas del extracto de semilla de frijol y en presencia de GSSG o DTT 100 mM en un volumen final de 1 mL. Después de una hora de incubación en un agitador rotatorio a 4°C, las mezclas se centrifugaron 20 minutos a 10,000 x g. Se recuperó el sobrenadante y por el método de Bradford se cuantificó la proteína presente (fracción no unida). La pastilla se suspendió en amortiguador de extracción y se centrifugó a 10,000 x g por 5 minutos. Este lavado se repitió 2 veces más. Las pastillas se resuspendieron en 200 μl de diferentes soluciones (glucosa 20%, fructosa 20%, manosa 20%, manitol 20 % y DTT 5 mM) y se mezclaron durante 20 minutos en el vórtex. Posteriormente se centrifugaron 20 minutos a 10,000 x g, se recuperó el sobrenadante y la concentración de proteína despegada con este tratamiento se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Finalmente, la pastilla de almidón se suspendió en 200 μl de amortiguador de muestra SDS-PAGE, se mezcló en un

vórtex durante 20 minutos y nuevamente se centrifugó 20 minutos a 10,000 x *g*. Esta fracción corresponde a proteínas unidas a la superficie de los gránulos que no se despegaron con el lavado con azúcares y DTT. Las diferentes fracciones (proteína total, no unida, eluida con azúcares o DTT y la recuperada de la superficie del gránulo mediante el lavado con amortiguador de muestra) se desnaturalizaron y se analizaron en SDS-PAGE.

4.5 Efecto del DTT sobre el GSSG.

El almidón (50 mg) se lavó 3 veces con amortiguador de extracción, se resuspendió en el mismo y se añadió GSSG hasta alcanzar 1 ó 10 mM. Se mezcló durante una hora en un agitador rotatorio a 4°C y se centrifugó 20 minutos a 10,000 x *g*. La pastilla se suspendió en amortiguador de extracción y se lavó tres veces. Posteriormente se resuspendió en 500 µL de amortiguador de extracción con DTT (50 mM) y se mezcló una hora en un agitador rotatorio a 4°C. Al término de ese tiempo, se centrifugó 20 minutos a 10,000 x *g* y se lavó tres veces con amortiguador de extracción. La pastilla se resuspendió en 1 ml de amortiguador de extracción con 3 mg de proteínas del extracto de semilla de frijol y se mezcló durante una hora en un agitador rotatorio a 4°C. Al término de ese tiempo se centrifugó 20 minutos a 10,000 x *g*. Se recuperó el sobrenadante (fracción no unida); la pastilla se suspendió en amortiguador de extracción y se lavó tres veces. Posteriormente se resuspendió en 200 µL de una solución de glucosa al 20 %, se agitó durante 20 minutos en un vórtex y se centrifugó 20 minutos a 10,000 x *g*.

Se recuperó el sobrenadante (fracción eluída con glucosa) y la cantidad de proteína en las fracciones no unida y eluida con glucosa se cuantificó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

4.6 Capacidad de absorción de agua.

4.6.1 De almidón seco.

Se pesaron 50 mg de almidón y se lavó 3 veces con amortiguador de extracción. Después de centrifugar 20 minutos a 10,000 x *g*, la pastilla de almidón se resuspendió en 1 ml de amortiguador de extracción solo o complementado con GSSG (1 y 10 mM) solo o en presencia de 3 mg de proteína. Se mezcló durante una hora en un agitador rotatorio a 4°C y se centrifugó 5 minutos a 10,000 x *g*. La pastilla se lavó tres veces con agua desionizada y se centrifugó 5 minutos a 10,000 x *g*. Se eliminó por completo el sobrenadante, se pesaron los tubos y por diferencia se estimó la cantidad de agua absorbida.

4.6.2 De almidón gelatinizado.

Después de tratar el almidón como se indica en el punto anterior, la pastillas se resuspendieron en 1 mL de agua desionizada, se agitaron en el vortex 5 minutos y se colocaron en baño maría (90°C) durante 10 minutos. Se enfriaron y se centrifugaron a 10,000 x *g* durante 5 minutos. Se eliminó por completo el agua y por diferencia se calculó la cantidad de agua retenida.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se escogió este almidón por la facilidad con la que se le puede purificar y porque tiene pocas proteínas en la superficie de sus gránulos. En la sección a de la Figura 5, se aprecia que mientras que en el extracto de las semillas de frijol hay una gran cantidad de proteínas (carril 1), son muy pocas las recuperadas de los gránulos de almidón lavados con amortiguador de muestra (carril 2).

5.1 Interacción proteínas – almidón.

Se ha reportado que la asociación de proteínas a gránulos de almidón depende de la atracción entre cargas positivas de las proteínas y negativas del almidón (Takeuchi, 1969) y que el pH también tiene un efecto muy importante (Dahle *et al.*, 1975), por lo que en este estudio se analizó el efecto de las condiciones de óxido-reducción, las cuales al modificar las características tanto del almidón como de las proteínas pueden también afectar las interacciones que pudieran darse entre ellos (Chakravarthi *et al.*, 2006).

5.2 Funciones del Glutati6n.

El glutati6n es un tripeptido (L- γ -glutamil- L- cisteinil- glicina) que puede existir en forma reducida (GSH) u oxidada (GSSG), lo que lo convierte en un elemento muy importante del sistema que tienen animales, plantas y microorganismos para regular su estado de 6xido-reducci6n (Kosower y Kosower, 1978).

El grupo sulfhidrilo (-SH) del residuo de cisteína le da a la molécula reducida su capacidad electro donadora.

En condiciones normales dentro de las células predomina la forma reducida. Sin embargo, el GSSG que raramente excede el 10% del glutatión total (Anderson, 1997) puede ser muy importante para proporcionar equivalentes oxidantes necesarios para la formación de puentes disulfuro (Chakravarthi *et al.*, 2006). El glutatión es abundante en las semillas, se ha sugerido que mucho del que se acumula en las semillas llega a estas en forma de el GSH (Awazuhara *et al.*, 2002). Por su parte, el DTT es un agente reductor ampliamente utilizado para modificar el ambiente redox.

5.3 Análisis de la unión de proteínas de semilla de frijol a los gránulos de almidón de papa, por efecto de GSSG y DTT.

En un experimento inicial se observó que sin modificación alguna, aproximadamente el 30 % de las proteínas del extracto de semillas de frijol se unen al almidón (Figuras 5). Como puede observarse, la presencia de 1 mM de DTT o GSSG si bien no inducen cambios muy importantes en la cantidad total de proteínas que se unen, sin embargo, una pequeña fracción de las proteínas que se unieron en presencia de GSSG se recuperaron al lavar los gránulos con una solución de glucosa al 5%. En los paneles **b**, **c** y **d** de la Figura 5 se muestran esos resultados.

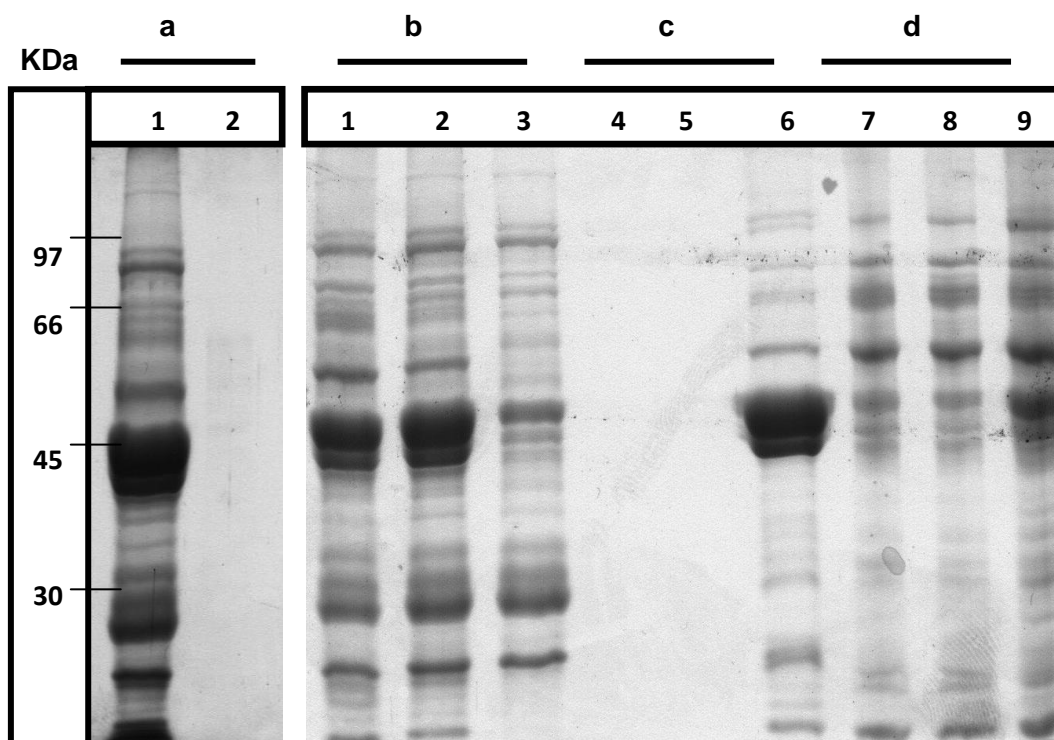


Figura 5. Perfil de proteínas separadas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) al 12.5% y teñidas con azul de Coomassie. En la sección **a** se muestran las proteínas presentes en el extracto de semilla de frijol (carril 1) y las recuperadas de la superficie del gránulo de almidón de papa (carril 2). Análisis de la interacción entre el almidón de papa y proteínas de un extracto de semillas de frijol en condiciones estándar (carriles 1, 4 y 7), en presencia de DTT 1 mM (carriles 2, 5 y 8) y GSSG 1 mM (carriles 3, 6 y 9). La sección **b** corresponde a las proteínas no unidas, **c** a las despegadas con una solución de glucosa al 5 % y **d** a las recuperadas al lavar los gránulos con el amortiguador de muestra para geles desnaturizantes.

La Figura 6 presenta una visión cuantitativa de este fenómeno.

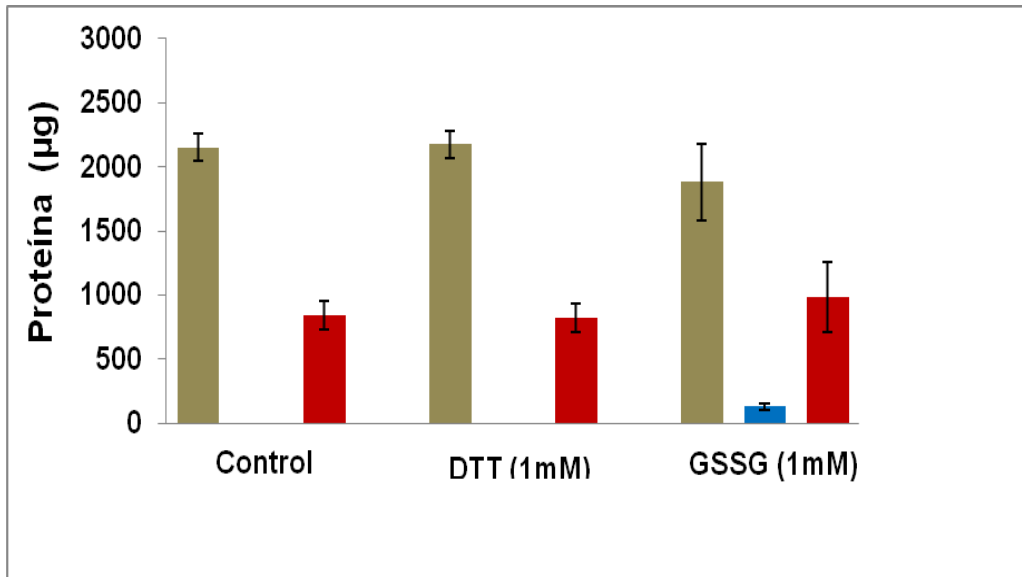


Figura 6. Efecto del DTT y GSSG en la asociación de proteínas de semilla de frijol a los gránulos de almidón de papa.

La fracción de proteína no unida (■), recuperada por el lavado con glucosa 5% (■) y proteínas que permanecen asociadas a los gránulos de almidón (■).

5.4 Efecto de GSSG sobre el proceso de panificación.

Se ha reportado la existencia de una relación inversa entre las propiedades para panificación de la harina de trigo y los contenidos de GSH y GSSG (Chen y Schofield, 1995), los cuales pueden sufrir cambios importantes durante el proceso, de hecho, en las etapas iniciales del amasado el nivel de GSH desciende rápidamente, al mismo tiempo que se incrementa la cantidad de GSSG, lo cual puede acentuarse por la presencia de aditivos oxidantes frecuentemente usados como bromato de potasio y ácido ascórbico (Sarwin *et al.*, 1993). Ante la posibilidad de que los efectos de GSSG sobre el proceso de panificación pudieran deberse a su papel como promotor de interacciones entre

proteínas y los gránulos de almidón, se investigó con más detalle este fenómeno para el caso de las proteínas de semilla de frijol.

5.5 Determinación del tiempo de interacción proteínas – almidón.

Se observó que la interacción proteínas-almidón promovida por GSSG es muy rápida y que la cantidad de proteínas que se unen al almidón no sufre cambios importantes después de 15 min, por lo que en lo sucesivo se utilizó un tiempo de interacción de 30 min (Figura 7).

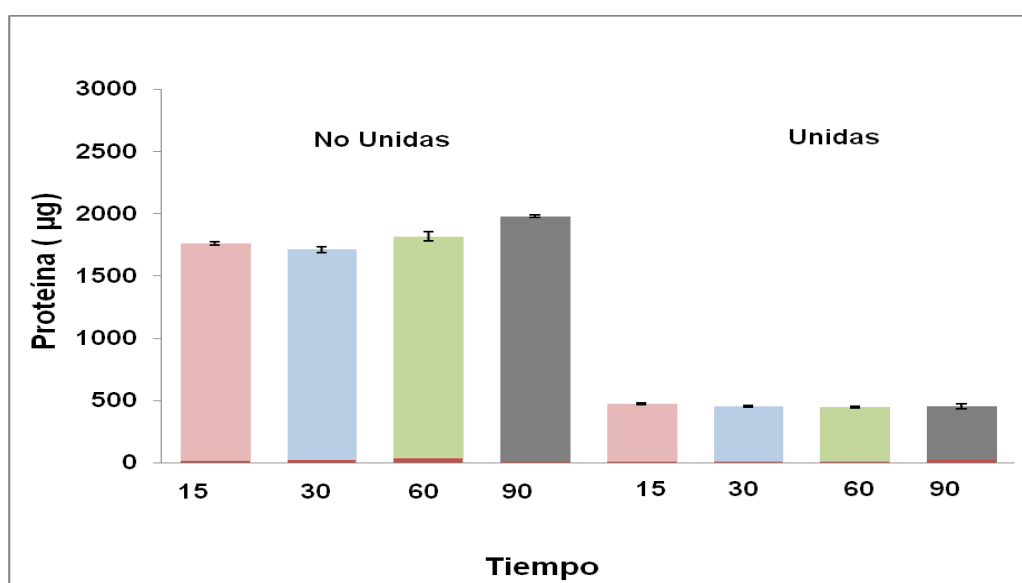


Figura 7. Efecto del tiempo sobre la interacción que GSSG promueve entre las proteínas de un extracto de semillas de frijol y gránulos de almidón de papa. (■ , ■ , ■ , ■) Corresponden a 15, 30, 60 y 90 min de interacción entre las proteínas y los gránulos de almidón en presencia de 1 mM GSSG.

5.6 Análisis del efecto de diferentes concentraciones de GSSG sobre la interacción proteínas- almidón.

Posteriormente se observó que cantidades crecientes de GSSG (1, 5 y 10 mM) incrementan la cantidad de proteínas que se unen al almidón (Figura 8). Con 10 mM se une poco más del 50% de las proteínas presentes en la mezcla. Así mismo se puede apreciar que la cantidad de proteínas liberadas con glucosa (5%) se reduce en la medida en que aumenta la concentración de GSSG. Esto sugiere que la presencia de GSSG además de favorecer, también estabiliza las interacciones que ocurren entre las proteínas y el almidón.

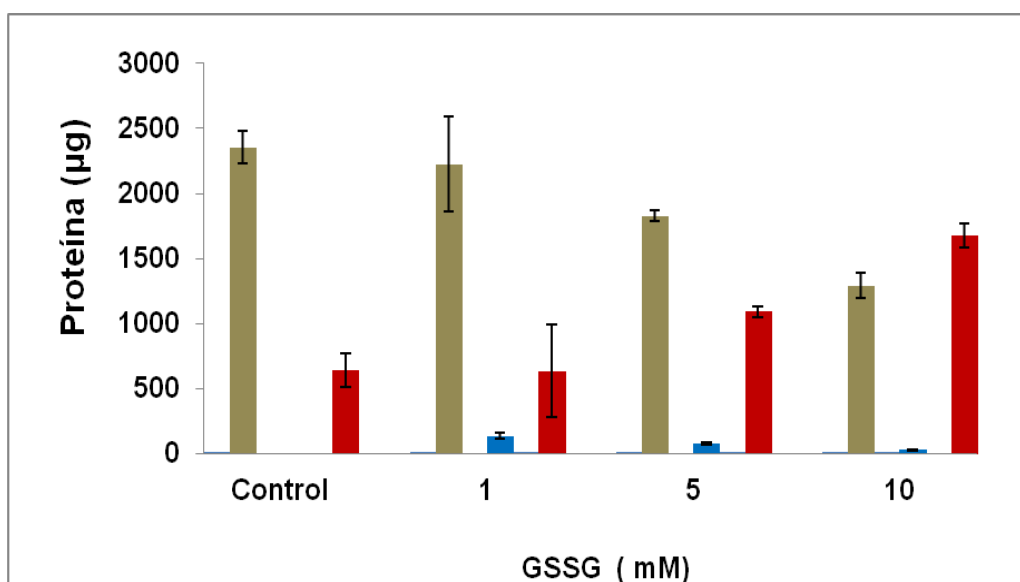


Figura 8. Efecto de la concentración de GSSG sobre la asociación de proteínas de semilla de frijol a los gránulos de almidón.

La fracción de proteína no unida (■), recuperada por el lavado con glucosa 5% (■) y proteínas que permanecen unidas a los gránulos de almidón (■).

5.7 Azúcares utilizados para liberar proteínas que se unieron a los gránulos de almidón en presencia de GSSG.

El uso de concentraciones elevadas de glucosa (hasta 20%) no incrementó la cantidad de proteínas liberadas (Figura 9).

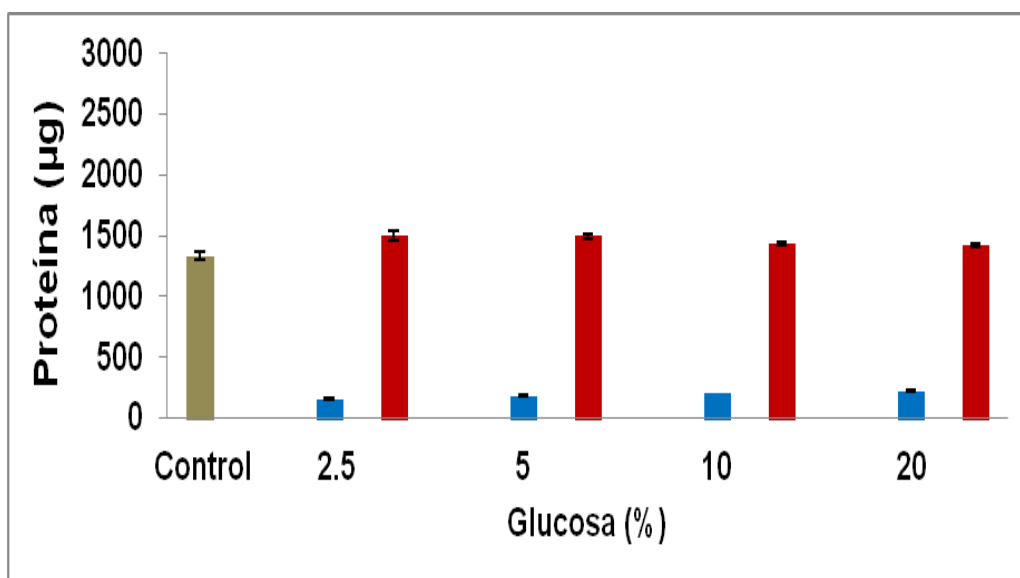


Figura 9. Efecto de la concentración de glucosa para liberar proteínas que se unen a los gránulos de almidón en presencia de GSSG (10 mM). (■, ■ y ■), corresponden a la fracción de proteína no unida al almidón, liberada con la concentración de glucosa indicada y la no despegada del almidón, respectivamente.

Otros azúcares (fructosa, manosa y manitol) fueron igualmente inefectivos aún cuando la concentración de GSSG presente durante la interacción se redujo a 1 mM (Figura 10).

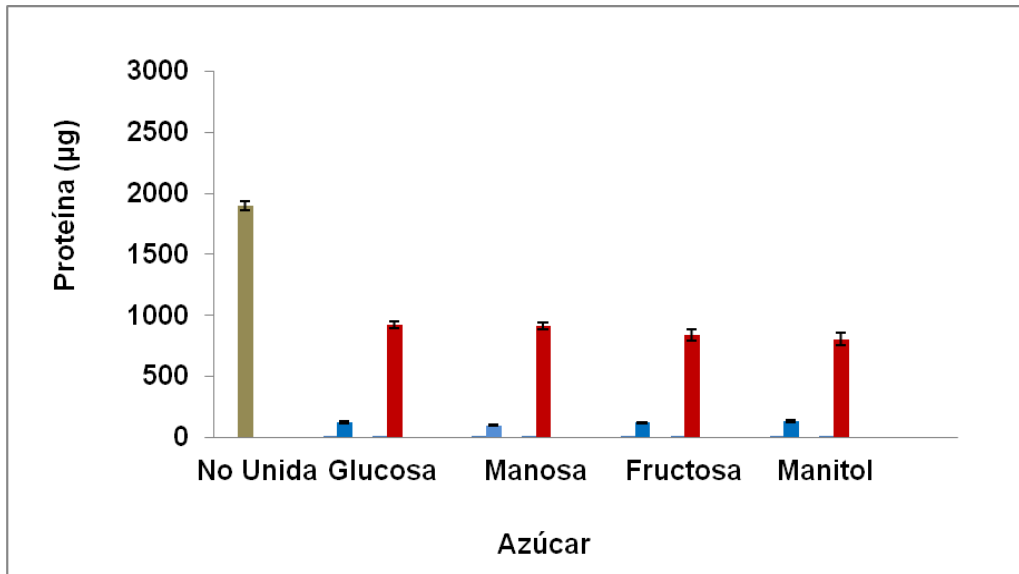


Figura 10. Capacidad de diferentes azúcares para liberar proteínas que se unieron a los gránulos de almidón en presencia de GSSG (1mM). (■, ■ y ■), corresponden a la fracción de proteína no unida al almidón, recuperada al lavar los gránulos con una solución al 20 % del azúcar indicado y la que permaneció unida, respectivamente.

Es probable que la estabilidad de la asociación se deba a cambios que GSSG provocó tanto en las proteínas como en los gránulos de almidón. Los residuos de cisteína de las proteínas son susceptibles a la oxidación, mientras que la oxidación del almidón puede crear nuevos grupos funcionales capaces de interactuar con las proteínas (Aberoumand, 2011). Generalmente se usa hipoclorito o permanganato de potasio para oxidar el almidón, proceso que involucra la conversión de grupos hidroxilo primarios a grupos carboxilo. Sería muy interesante investigar que tipo de cambios causa el GSSG en el almidón de papa.

5.8 Efecto del DTT en la liberación de proteínas en presencia de GSSG

Posteriormente se investigó si las proteínas cuya unión a los gránulos de almidón fue promovida por un agente oxidante como GSSG y que no se liberan con los azúcares podían hacerlo en presencia de un reductor como DTT (5, 20, 50 mM). En la Figura 11 se observa que las interacciones proteína-almidón promovidas por GSSG también son estables a concentraciones elevadas de DTT (50 mM).

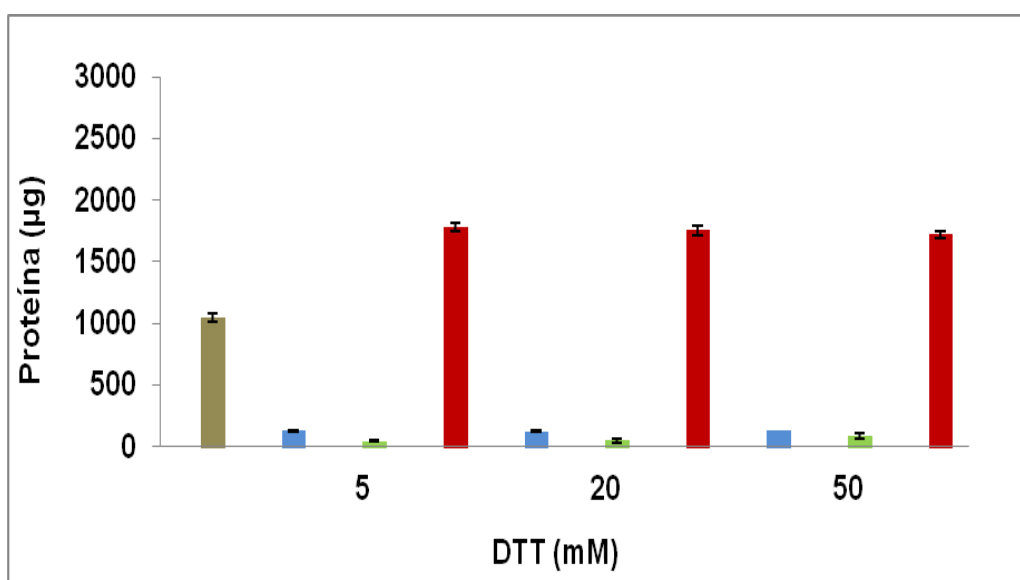


Figura 11. Capacidad de DTT para liberar proteínas que se unieron a gránulos de almidón en presencia de GSSG (10 mM) y que permanecieron unidas después de lavarlos con una solución de glucosa al 20%. (■, ■, ■ y ■), corresponden a la fracción no unida, la fracción recuperada por el lavado de almidón con glucosa 20%, fracción recuperada por el lavado de almidón con 5, 20 y 50mM de DTT y la que permaneció unida después de los lavados, respectivamente.

5.9 Efecto del DTT en la no unión de proteínas a los gránulos de almidón.

Si bien el DTT resulto incapaz para liberar proteínas cuya unión a los gránulos de almidón fue promovida por GSSG, en un experimento adicional se investigó si el DTT podía bloquear la capacidad del GSSG para promover la unión de las proteínas presentes en el extracto de semillas de frijol al almidón de papa. Para ello el almidón se trató por 30 min con GSSG (1 y 10 mM). Al término de ese tiempo, se lavó y se incubó por otros 30 min con DTT 50 mM. Finalmente, el almidón se lavó y se mezcló con el extracto proteico. Si bien el DTT es incapaz de liberar a las proteínas que se unen en presencia de GSSG , si se aplica antes que las proteínas pero después del GSSG resulta muy efectivo para bloquear e impedir la asociación y las interacciones nuevamente se vuelven inestables (Figura 12). Esto nos permite sugerir que el GSSG provoca la formación de complejos cuyos sitios críticos no son accesibles a DTT. Sería muy interesante investigar la naturaleza de los mismos.

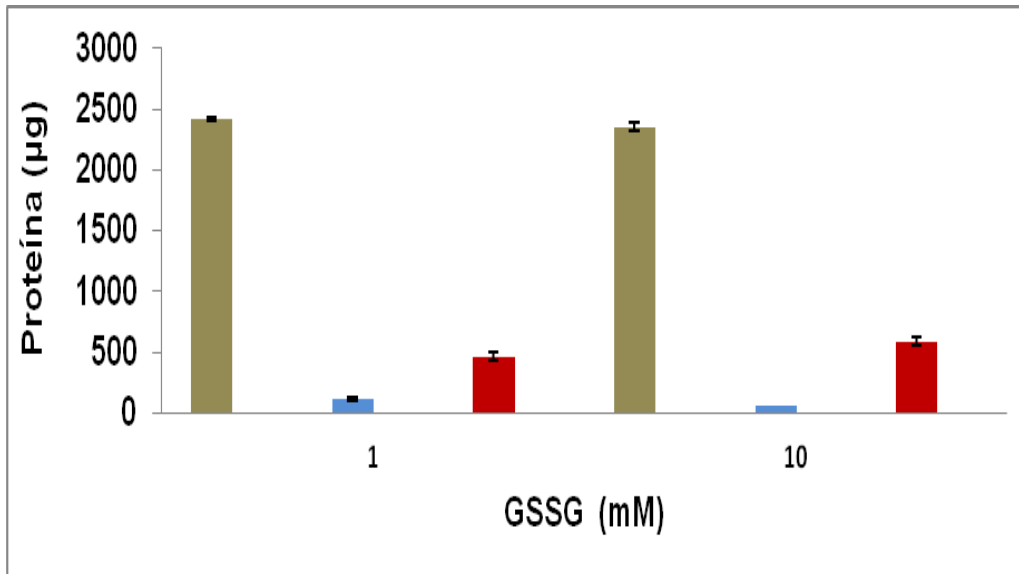


Figura 12. Capacidad de DTT para no permitir la unión de proteínas a los gránulos de almidón promovida por GSSG (1 y 10mM). Después del tratamiento con GSSG, los gránulos se incubaron en una solución con DTT (50mM) , el cuál también se lavó antes de ponerlos en contacto con el extracto protéico. La fracción de proteína no unida (■), recuperada por el lavado de almidón con glucosa 5% (■) y la que permaneció asociada a los gránulos (■).

5.10 Efecto que provocan las proteínas sobre las propiedades funcionales del almidón.

En una etapa posterior al evaluar el efecto de la unión de proteínas sobre las propiedades del almidón, se observó que este tratamiento incrementa de manera notable la capacidad de los gránulos para retener de agua. La figura 13 muestra que el efecto es dependiente de la cantidad de GSSG presente y con 10 mM obtuvimos un incremento del 100% con respecto al control.

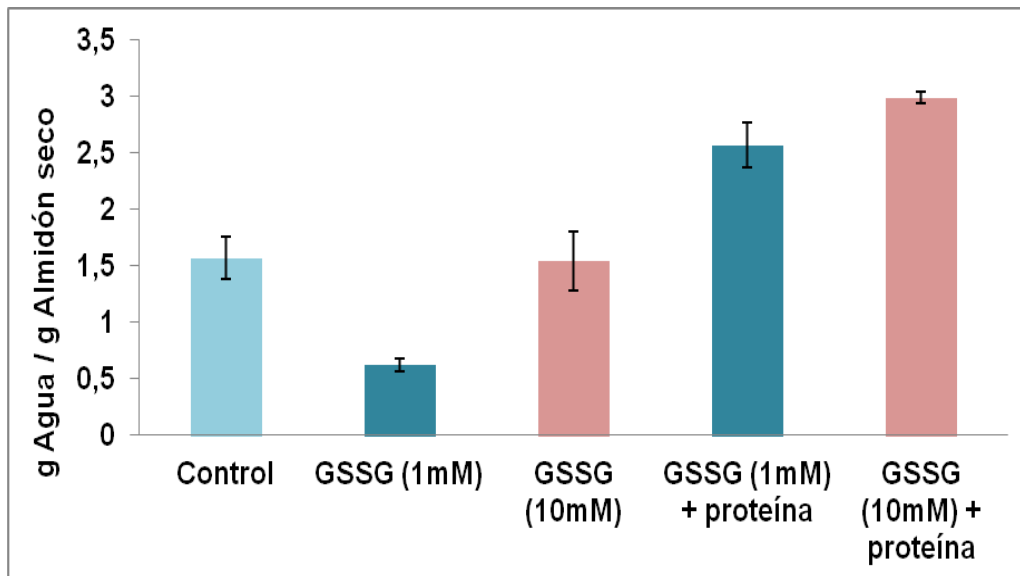


Figura 13. Capacidad de retención de agua de almidón de papa.
 La capacidad de retención de agua del almidón control o tratado con GSSG (1 y 10 mM) solo y en presencia de proteínas de un extracto de semillas de frijol fue evaluada.

El mismo análisis se hizo con el almidón que después de la interacción con las proteínas fue gelatinizado y como se puede apreciar en la figura 14, las diferencias con respecto al control no fueron significativas. Esto tal vez sea una consecuencia de que si bien la cantidad de proteínas que se unen a los gránulos son suficientes para modificar esta propiedad, resultan claramente insuficientes cuando el almidón se gelatiniza. Sin embargo, es probable que al unir una mayor cantidad de proteínas al almidón gelatinizado también pudieran modificarse sus propiedades.

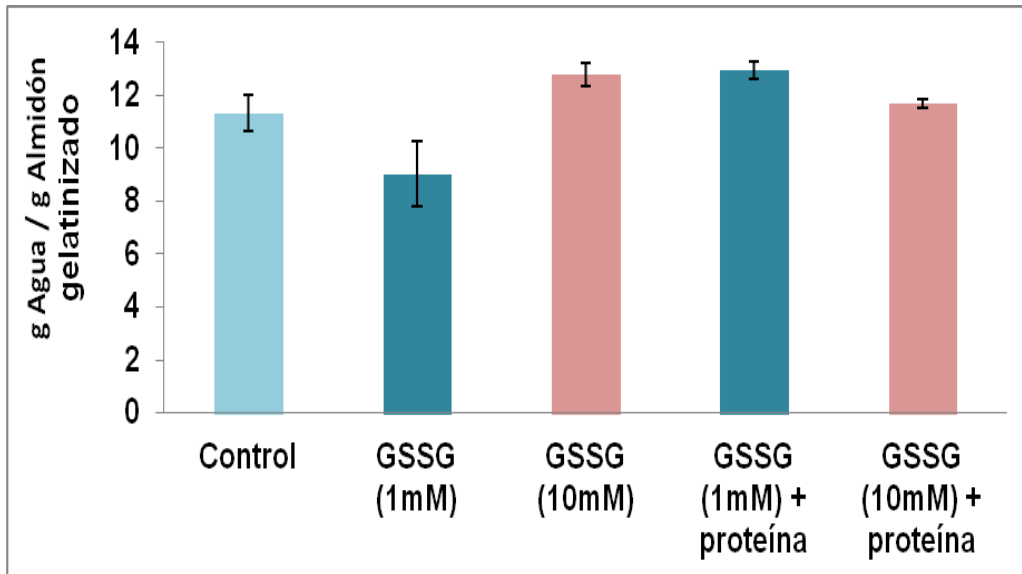


Figura 14. Capacidad de retención de agua de almidón gelatinizado. La capacidad de retención de agua de almidón de papa gelatinizado previamente tratado con GSSG (1 y 10 mM) solo y en presencia de las proteínas de un extracto de semillas de frijol fue evaluada.

Por último se investigó la generalidad del fenómeno observado. Para ello el almidón de papa se incubó con una solución de albúmina bovina. Los resultados obtenidos mostraron que el GSSG fue incapaz de promover su asociación al almidón. Esto significa que la capacidad del GSSG para promover la unión de proteínas a los gránulos de almidón no es universal y que muy probablemente las condiciones que favorecen el proceso sean particulares y dependientes de las características particulares del almidón y de las proteínas.

VI. CONCLUSIONES

- Se estableció que el GSSG promueve una asociación muy estable entre proteínas de un extracto de semillas de frijol y almidón purificado de tubérculos de papa.
- La asociación proteínas-almidón se vuelve más estable en la medida en que se incrementa la concentración de GSSG.
- La asociación de proteínas a almidón es un método adecuado para incrementar de manera notable la capacidad de retención de agua del almidón de papa.
- Es necesario un estudio detallado de la interacción proteínas-almidón para evaluar sus posibilidades de uso.
- La importancia del almidón en la industria de alimentos consiste en que constituye una excelente materia prima para modificar la textura y consistencia de los alimentos.

VII. PERSPECTIVAS

- Investigar la naturaleza y características de las interacciones que promueve el GSSG entre las proteínas y el almidón.

- Investigar detalladamente que propiedades funcionales del almidón se ven afectadas por la unión de proteínas.

- Probar si proteínas de semilla de frijol, son capaces de unirse a almidón de otras fuentes botánicas y si al almidón de papa se le pueden unir proteínas de otras fuentes.

- Analizar si el tratamiento con oxidantes más baratos (permanganato, persulfato de amonio, hipoclorito de sodio, bromo, peróxido de hidrógeno, etc.) también favorece la unión de proteínas al almidón y que efectos provocan.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aberoumand, A. 2011. Studies on Methods of Starch Modification and its Uses in Food and Non- Food Industries Products. World Journal of Dairy & Food Sciences 6(2):115-124.
2. Anderson, M.E. 1997. Glutathione and glutathione delivery compounds. ADV.Pharmacol. 38: 65-78.
3. Ann, C.E., 2006. Carbohydrates in Food. Taylor and Francis, pp. 362-371
4. Aristizabal, J., Leonardo, M.F., Basto, O.G. 2007. Estudio de una nueva técnica e implementación de una línea piloto de proceso para la obtención de dextrinas a partir de almidón de yuca. Ingeniería e Investigación. 27 (002): 26-33.
5. Aristizabal, J. y Sánchez, T. 2007. Guía técnica para producción y análisis de almidón de Yuca. FAO.
6. Awazuhara, M., Kim, H., Hayashi, H., Chino, M., Kim, S.G., Fujiwara, T. 2002. Composition of seed storage proteins changed by glutathione treatment of soybeans. Biosci. Biotechnol Biochem 66:1751-1754.
7. Badui, D. 2006. Química de los alimentos. Ed. Pearson Educación de México, 4ª edición: 81-92.
8. Bernal, L. y Martínez-Barajas, E. 2006. Una nueva visión de la degradación del almidón. Revista del Centro de Investigación. La Salle. 7 (025):77-90.

9. Beynum, G.M.A., Roels, J.A. 1985. Starch conversion technology. Ed. Marcel Dekker. Estados Unidos, pp.360.
10. Biliaderis, C.G. 2011. The structure and interactions of starch with food constituents. *Canadian Journal of Physiological and Pharmacological*. 69: 60-78.
11. Bradford, M. 1976. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
12. Chakravarthi, S., Jessop, C.E., Bulleid, N. 2006. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic- reticulum- generated oxidative stress. *European Molecular Biology Organization*. 7 (3): 271-275.
13. Chen, X. and Schofield, J.D. 1995. Changes in the glutathione content and breadmaking performance of white wheat flour during short-term storage. *Cereal Chem*. 73 (1):1- 4.
14. Dahle, L.K., Montgomery, E.P., Brusco, V.W. 1975. Wheat protein-starch interaction II comparative abilities of wheat and soy proteins to bind starch. *Cereal Chemistry*. 52: 212-225.
15. De Pater, S., Caspers, M., Kottenhagen, M., Meima, H., De Vetten, N. 2006. Manipulation of starch granule size distribution in potato tubers by modulation of plastid division. *Plant Biotechnology Journal* 4: 123-134.

16. Ellis, R.P., Cochrane, M.P., Dale, M.F.B., Duffus, C.M., Lynn, A., Morrison, I.M., Prentice, R.D.M., Swanston, J.S. and Tiller, S.A. 1998. Starch production and industrial use. *J. Sci. Food Agric.* 77: 289-311.
17. Fennema, R. 2003. *Química de los alimentos*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza España.
18. Garzón, S.M de L. 2006. Almidón retrogradado para uso en compresión directa. I. Caracterización y pregelatinización del almidón de chayote. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 37(001):18-28.
19. Herrera, G. A., Canónico, F. M., Ramos, G. 2003. Mecanismo de desagregación en gránulos de almidón, *Superficies y vacío.* 16(1):10-16.
20. Kosower, N.S. and Kosower, E.M. 1978. The glutathione status of cell. *Int/Rev/Cytol.* 54:109-157.
21. Anónimo.2005. Mundo Lácteo y Cárnico. Noviembre/Diciembre. URL: http://www.alimentariaonline.com/media/MLC009_FABPSA.pdf
22. Palma, R. H.P., Agama, A.E., González, S.R., Bello-Pérez, L.A. 2010. Efecto del tamaño del gránulo en la modificación química del almidón. UANL
23. Peñaranda, C.O.I., Perilla, P.J.E., Algecira, E.N. 2008. Revisión de la modificación química del almidón con ácidos orgánicos. *Ingeniería e Investigación.* 28(3):47-52.

24. Rincón, A.M., Rached, Lizet., Aragoza, E.L., Padilla, Fany. 2007. Efecto de la acetilación y oxidación sobre algunas propiedades del almidón de semillas de Fruto de pan (*Artocarpus altilis*). Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Vol. 57, No. 3: 287-294.
25. Rivas, G.M., Méndez, M.G., Sánchez, R.M., Núñez, S.C., Bello, P.L. 2008. Caracterización morfológica, molecular y fisicoquímica del almidón de plátano oxidado y lintnerizado. Agrocienca. 42(5):487-492.
26. Rutenberg, M.S. 1984. Starches derivatives: production and uses. Starch. New York: Academic Press. pp.311-366.
27. Sandoval, A. A., Rodriguez, S. E., Fernandez, Q. A. 2005. Aplicación del análisis por calorimetría diferencial de barrido para la caracterización de las modificaciones del almidón. Dyna 72(146):45-53.
28. Sarwin R., Laskawy G., Grosh W. 1993. Changes in the levels of glutathione and cysteine during the mixing of doughs with L-threo L-erythro- ascorbic acid. Cereal Chem. 70:553-557.
29. Singh, A., Nath, L.K., Singh, A. 2010. Pharmaceutical food and non-food applications of modified starches: a critical review. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. 9(7):1214-1221.
30. Smith, A. 2001. The Biosynthesis of starch granules. The Biomacromolecules. 2:335-341.
31. Takeuchi, I. 1969. Interaction between protein and starch. 46:570-579.

32. Tester, F. R., Karkalas, J., Qi, X. 2004. Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science* 39:151-165.
33. Tetlow, M.M. and Emes, J. 2004. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot.* 55:2135-2145.
34. Wang, Y.J. and Wang, L. 2003. Physicochemical properties of common and waxy corn starches oxidized by different levels of sodium hypochlorite. *Carbohydr/Polym.* 53: 207-217.