



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

1 00551  
UNAM  
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS BIOQUIMICAS

IDENTIFICACION Y ESTUDIO DE LAS PROTEINAS DEL  
GLUTEN DE MAIZ INVOLUCRADAS EN LA ESTABILIZACION  
DE EMULSIONES ACEITE EN AGUA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)

P R E S E N T A :

VANESSA DEL CARMEN CABRA LEDESMA

ASESORA: DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ SARAVIA



MEXICO, D. F.

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## JURADO ASIGNADO

**Presidente:** Dr. Agustín López-Munguía Canales  
**Vocal:** Dr. Juan Luis Rendón Gómez  
**Secretario:** Dr. Eleazar Martínez Barajas  
**Suplente:** Dra. Marina Gavilanes Ruiz  
**Suplente:** Dra. Laura Patricia Martínez Padilla

Trabajo desarrollado en el Departamento de Alimentos y Biotecnología , Laboratorio 312

Conjunto "E" de la Facultad de Química de la

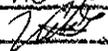
Universidad Nacional Autónoma de México

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional

NOMBRE: Venceso Del Carmen Cebra

Lectora

FECHA: 19/Nov/102

FIRMA: 

# *Agradecimientos*

Proyecto CONACYT- OMNILIFE #35948-B

“Desarrollo tecnológico para la elaboración de fórmulas para regímenes especiales a base de aislados de proteína de ajonjolí y gluten de maíz”

Beca CONACYT-DGAPA

# Registro159981

Beca DGEP

OF. DGEP/SAP/PBN/2179/2000

Arancia Corn Products S. A. de C. V. por la amable donación del gluten de maíz

*A mis padres, quienes son mi todo.  
Gracias por ser fuente inagotable de amor, ternura, comprensión y apoyo.  
Mi fuerza proviene del saberme parte de ustedes. Los amo.*

*A mis hermanos José y Alejandro, gracias por  
estar siempre conmigo, por recordarme a  
cada momento que me quieren, que cuento con  
ustedes, que formamos un gran trío.  
Están siempre en mi corazón.*

*A mis tíos y primos, gracias por hacerme  
sentir siempre el apoyo y cariño de una  
familia maravillosa.*

*A la Dra. Amelia Farrés, la admiro, respeto  
y quiero muchísimo. Gracias por compartir su  
gran sabiduría que es la luz que me guía en  
esta fantástica aventura.*

*A los Doctores Roberto Arreguín y  
Eleazar Martínez por los valiosos comentarios  
durante los exámenes tutorales que ayudaron  
a la culminación de la presente investigación.*

*A los doctores Agustín López-Munguía, Juan Luis  
Rendón, Eleazar Martínez, Marina Gavilanes y  
Laura Patricia Martínez por el tiempo dedicado a la  
revisión de este trabajo.*

*A mis amigas Carmen, Paty, Lilia, Alicia  
y Anel, su amistad es un tesoro de incalculable  
valor, las quiero mucho.*

*A las Dras. Amanda Gálvez y  
Maricarmen Quirasco por su apoyo y  
cariño incondicionales.*

*A la M. en C. Idalia Flores,  
gracias por iniciar un trabajo  
genial. Eres increíble.*

# ÍNDICE

	<u>Página</u>
<b>1.- Resumen</b> -----	7
<b>2.- Introducción</b> -----	8
<b>3.- Marco Teórico</b>	
3 1 Proteínas del maíz	
3.1.1 Descripción y composición del grano de maíz -----	9
3.1.2 Proteínas del maíz -----	9
3.1.3 Gluten de maíz -----	10
3 2 Desamidación de proteínas -----	14
3.2.1 Desamidación química -----	14
3 3 Propiedades funcionales de las proteínas -----	16
3.3.1 Propiedades de superficie -----	20
3 4 Propiedades emulsificantes de las proteínas -----	21
3.4.1 Definición de emulsión -----	21
3.4.2 Formación de emulsiones -----	21
3.4.3 Características de las proteínas que actúan en interfases -----	22
3.4.4 Estabilidad de emulsión -----	25
3.4.5 Métodos de medición de las propiedades emulsificantes de las proteínas -----	25
<b>4.- Antecedentes</b> -----	27
<b>5.- Hipótesis</b> -----	30
<b>6.- Objetivos</b> -----	30
<b>7.- Metodología</b> -----	1
7.1 Obtención y caracterización del gluten de maíz -----	2
7.1.1 Homogenización de la materia prima -----	2
7.1.2 Análisis proximal: proteína, carbohidratos, humedad, grasa, fibra, cenizas y pH -----	32
7.2 Desamidación química del gluten de maíz -----	34
7 3 Solubilidad de las proteínas del gluten de maíz en función del pH -----	34

	<u>Página</u>
7.4 Perfil electroforético de las proteínas solubles en función del pH -----	35
7.5 Determinación de la estabilidad de emulsión -----	35
7.6 Extracción de las proteínas de la emulsión -----	38
7.6.1 Solubilización de las proteínas participantes en la emulsión en diferentes disolventes -----	39
7.7 Extracción de zeínas bajo condiciones desnaturalizantes -----	40
7.8 Extracción de zeínas bajo condiciones nativas -----	41
7.9 Evaluación de la estabilidad de emulsión de las zeínas -----	42
7.9.1 Efecto del SDS -----	42
7.9.2 Efecto del pH -----	42
7.9.3 Efecto de la concentración de proteína -----	42
<b>8.- Análisis de resultados</b>	
8.1 Obtención y caracterización del gluten de maíz -----	43
8.1.1 Homogenización de la materia prima -----	43
8.1.2 Composición proximal del gluten de maíz -----	43
8.2 Desamidación del gluten de maíz -----	46
8.3 Solubilidad de las proteínas del gluten de maíz nativo y desamidado en función del pH -----	46
8.4 Perfil electroforético de las proteínas solubles del gluten de maíz nativo y desamidado en función del pH -----	50
8.5 Evaluación de la estabilidad de emulsión de las proteínas del gluten de maíz nativo y desanidado -----	55
8.6 Extracción de las proteínas participantes en la emulsión -----	58
8.6.1 Solubilización de las proteínas participantes en la emulsión en diferentes disolventes -----	60
8.7 Extracción de zeínas bajo condiciones desnaturalizantes -----	66
8.8 Extracción de zeínas bajo condiciones nativas -----	69
8.9 Evaluación de la estabilidad de emulsión de las zeínas -----	70
8.9.1 Efecto del SDS -----	71
8.9.2 Efecto del pH -----	72
8.9.3 Efecto de la concentración de proteína -----	73
<b>9.- Conclusiones</b> -----	75
<b>10.- Bibliografía</b> -----	77
<b>11.- Anexo I: Protocolos de técnicas experimentales</b> -----	85
<b>12.- Anexo II: Escala de hidropaticidad de Kyte &amp; Doolittle</b> -----	91

## **1.- RESUMEN**

El objetivo del presente estudio consistió en identificar y caracterizar a las proteínas del gluten de maíz que participan en la estabilización de emulsiones aceite en agua. Para ello, se determinó que el principal componente del gluten de maíz es la proteína ( $58.23 \pm 0.12$  %). La presencia de una elevada concentración de carbohidratos y de grasa ( $25.77 \pm 2.1$  y  $6.1$  %, respectivamente) no interfiere de manera importante en la estabilidad de emulsión de las proteínas del gluten de maíz, la cual se debe principalmente a las interacciones proteína-proteína. Las proteínas del gluten de maíz poseen muy baja solubilidad en agua, la cual es menor a pHs ácidos y aumenta a partir de pH 7. La desamidación de estas proteínas provocó un aumento total de cargas negativas que mejoró la solubilidad y la estabilidad de la propiedad emulsificante. Esta modificación química incrementa la concentración de las proteínas con las cargas negativas necesarias para actuar en la interfase, por lo que se requiere menor cantidad del gluten para lograr una mayor estabilidad de emulsión.

Se determinó que la estabilidad de las emulsiones elaboradas con proteínas de gluten de maíz no depende de una sola proteína, sino de la participación de un conjunto de ellas. En la emulsión se identificaron 11 proteínas participantes, de las cuales 7 pertenecen al grupo de las zeínas (prolaminas) y forman agregados de 44 y 66 kDa, 3 al de las globulinas y 1 glutelina, de pesos moleculares que van de los 10-50 kDa. Poseen la característica en común de ser proteínas de elevada hidrofobicidad e insolubles en agua a pH 7. El grupo de las zeínas fue el mayoritario, con bandas muy intensas de 19 y 22 kDa, correspondientes a  $\alpha$ -zeínas. Las zeínas son proteínas flexibles con un elevado contenido de aminoácidos hidrofóbicos y gran proporción de glutamina, que al ser desamidadas aumentan la carga total negativa y mejoran el carácter anfifílico de estas proteínas. Por su abundancia y características bioquímicas se evaluó la estabilidad de emulsión en función de la carga, el pH y la concentración de proteína. Se demostró que son buenos emulsificantes cuando están cargadas negativamente y que se requieren concentraciones bajas (0.5% p/v) para lograr una estabilidad de emulsión del 100%.

## 2.- INTRODUCCIÓN

Las proteínas vegetales son usadas en la tecnología de alimentos debido, entre otras causas, a sus características como agentes funcionales. Por esta razón, en los últimos años, el interés en ellas ha aumentado notablemente, principalmente por el uso de harinas, concentrados y aislados de soya. El predominio de los productos basados en soya es debido a varios factores, como lo son la abundancia y bajo costo de la materia prima, la textura agradable y relativamente buena calidad nutrimental, pero sobre todo se debe al intenso esfuerzo que se ha realizado en la investigación que promueve su utilización (Dixon, 1979; Aoki y col., 1980; Wagner y Guéguen, 1999).

Hoy en día, se procesan y comercializan proteínas de cacahuete, semilla de algodón, amaranto y ajonjolí con grado alimenticio. En contraste, ingredientes alimenticios con alto contenido proteico derivados de los cereales son menos comunes. El gluten de trigo es utilizado en sistemas alimentarios debido a sus singulares propiedades de textura

El gluten de maíz es un sub-producto de la molienda húmeda para la obtención de aceite y almidón, con un contenido proteico del 50-70%. La mayor parte del mismo se destina a alimentación animal. Debido al proceso de extracción que sufre el grano de maíz, la mayor parte de las fracciones de albúminas, globulinas y glutelinas se remueven, lo que da como resultado un gluten enriquecido en zeínas (prolaminas) (Watson, 1987).

A los pHs y fuerzas iónicas de los sistemas acuosos alimentarios, el gluten de maíz presenta baja funcionalidad (Kinsella, 1976). En lo concerniente a las propiedades emulsificantes, existen trabajos (Wu, 2001; Flores, 1997; Mannheim, 1992) que han mostrado una mejora en dicha actividad al hidrolizar, desamidar, disminuir el tamaño de partícula, y cambiar el pH y la fuerza iónica en el sistema.

Hasta el momento, no existen trabajos que relacionen la estructura con la funcionalidad que presentan las proteínas del gluten de maíz. La identificación y el estudio bioquímico de las proteínas responsables de la estabilización de emulsiones aceite en agua contribuirán a explicar su participación en el fenómeno, así como a dilucidar las características químicas y estructurales requeridas en las proteínas para lograr una buena actividad emulsificante.

### **3.- MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Proteínas del maíz**

##### **3.1.1 Descripción y composición del grano de maíz**

El maíz pertenece a la especie *Zea mays*. Es una planta gramínea de tallo erguido y macizo que se encuentra hueco. La altura de la planta es variable (de 60 cm a 6 m, 2.4 m en promedio). Posee hojas alternas, largas y estrechas. Sus inflorescencias masculinas, llamadas panículas, contienen a las espículas, cada una de ellas con tres anteras con polen. Las inflorescencias femeninas son las mazorcas, las cuales pueden contener hasta un millar de semillas alrededor de un núcleo duro (Watson y Ramnstad, 1987).

Como se observa en el cuadro 3.1, el grano de maíz posee bajo contenido proteico mientras que es alto en carbohidratos.

**Cuadro 3.1** Composición proximal del grano de maíz<sup>a</sup>

	% (g /100 g)
Carbohidratos	69.6
Humedad	13.8
Fibra	12.2
Proteína	8.3
Grasa	4.8

Fuente: Chávez *et al.*, 1992.

##### **3.1.2 Proteínas del maíz**

De acuerdo a la clasificación clásica basada en la solubilidad (Osborne y Mendel, 1914) las proteínas se dividen en:

- a) Albúminas: Proteínas solubles en agua
- b) Globulinas: Solubles en soluciones salinas
- c) Glutelinas: Solubles en soluciones alcalinas
- d) Prolaminas: Solubles en soluciones alcohólicas

El maíz posee los 4 grupos de proteínas, distribuidos como se muestra en el cuadro 3.2.

**Cuadro 3.2** Distribución de las fracciones proteicas en el grano completo, el endospermo y el germen (% del N total dentro de cada parte)<sup>a</sup>

Fracción Proteica	Grano Completo	Endospermo	Germen
Nitrógeno no proteico	6	3	20
Albúminas	7	3	35
Globulinas	5	3	18
Prolaminas (Zeínas)	52	60	5
Glutelinas	25	26	18
Residuo	5	5	4
g proteína/100 g de grano completo	100	70	18

<sup>a</sup> Wilson, 1983.

La mayor parte de las proteínas del maíz se encuentran en el endospermo. La fracción más abundante de proteínas en el grano es la de las prolaminas o zeínas. Las albúminas y globulinas en su mayoría son enzimas. Se encuentran principalmente en la aleurona, el salvado, el germen y en muy bajas concentraciones en el endospermo. Nutritionalmente son ricas en Lys, Trp y Met.

Las prolaminas y glutelinas son principalmente proteínas de reserva. Se encuentran en el endospermo. Las prolaminas son pobres en Lys, Trp y Met. Las glutelinas poseen composición variable, pero poseen más Lys que las prolaminas.

### 3.1.3 Gluten de maíz

El grano de maíz se separa en germen, fibra, proteína y almidón mediante la molienda húmeda (Figura 3.1). La separación se facilita sometiendo al grano a un remojo con bisulfito de sodio y ácido láctico, lo que suaviza al grano y ayuda a remover el germen y la fibra. Esto, además, rompe puentes disulfuro entre las proteínas para desbaratar la matriz proteica que se encuentra en el endospermo y facilita la separación del almidón y los componentes proteicos insolubles (Wall y Paulis, 1978). El gluten de maíz es un subproducto proteico muy valioso de este proceso de molienda húmeda.

El remojo modifica las proteínas del endospermo de su estado nativo mediante la reducción de los residuos de cistina para formar cisteínas y derivados sulfonados ( $R-S-SO_3^-$ ) de la cisteína (Wall y Paulis, 1978). Los puentes disulfuro que se encuentran en la matriz proteica del endospermo pueden convertirse en derivados sulfonados de cisteína. Los residuos de cisteína recién formados pueden ser oxidados por el aire para producir nuevos disulfuros (James *et al.*, 1969).

La mayor parte de la producción de gluten de maíz se destina a alimentación animal, principalmente a la avicultura debido a su alto contenido de xantofilas y proteína y su bajo contenido de fibra

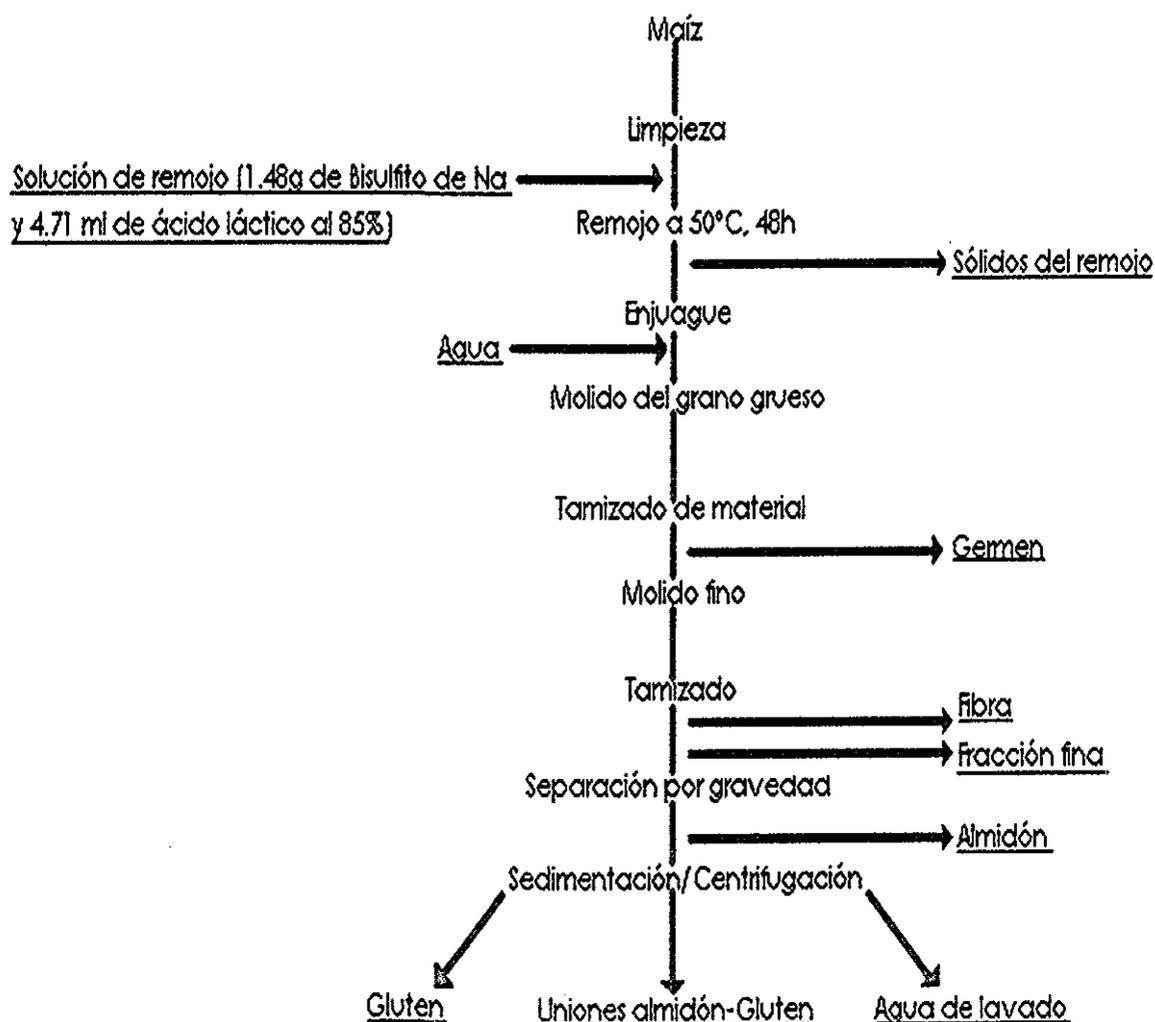


Figura 3.1 Obtención del gluten de maíz y de los demás componentes del grano, por el método de molienda húmeda (Gómez *et al.*, 1992)

El componente mayoritario del gluten de maíz es la proteína. (Cuadro 3.3) La fracción proteica consta principalmente de zeínas (68 g zeínas/100 g proteína de gluten de maíz) y de glutelinas solubles en soluciones alcalinas (27g glutelinas/100 g de proteína). El contenido de globulinas solubles en sal es bajo (5g globulinas/100 g de proteína) mientras que la cantidad de albúmina es prácticamente despreciable (Wu, 2001).

**Cuadro 3.3** Composición proximal del gluten de maíz<sup>a</sup>

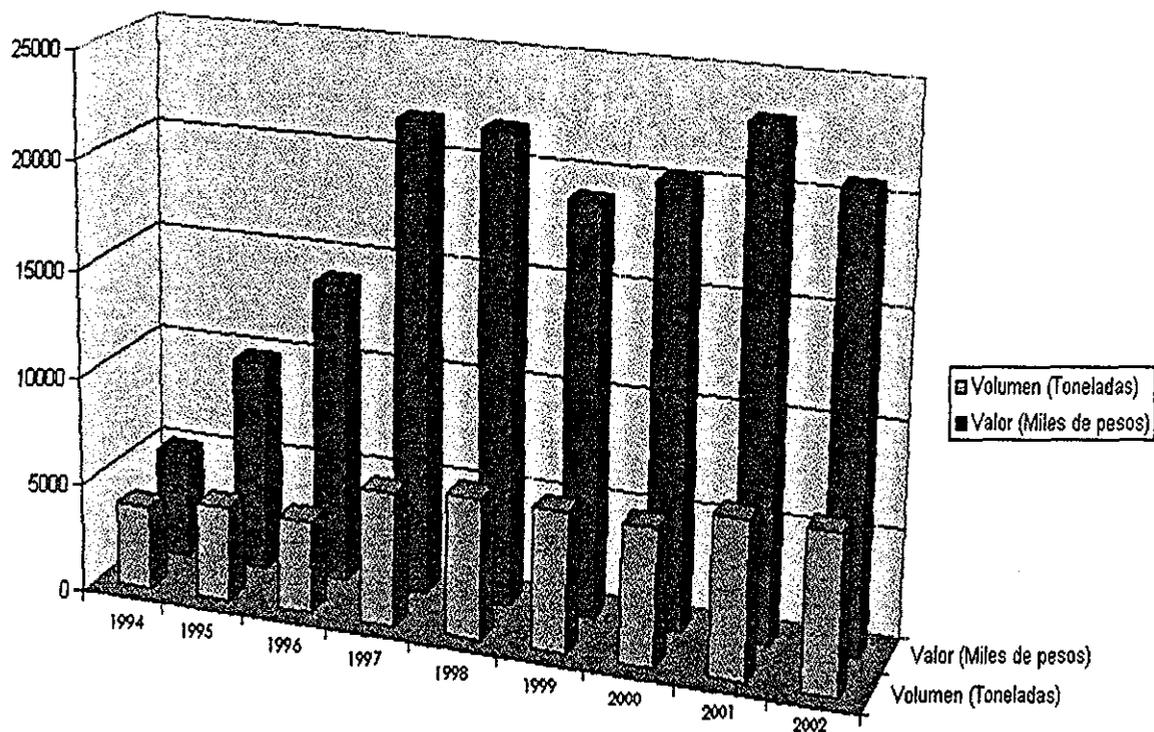
% Proteína	% CHOS	% Humedad	% Fibra	%Grasa	%Cenizas
58.32	25.77	10.44	2.23	1.80	1.42

<sup>a</sup> Flores, 1997.

En comparación con otras proteínas, como las de la soya y las de la leche, las proteínas del gluten de maíz poseen baja funcionalidad, lo cual se ha relacionado con su baja solubilidad en sistemas acuosos a los pHs y fuerzas iónicas que se utilizan en sistemas alimentarios, ya que como se mencionó anteriormente, las proteínas generalmente tienen que estar en solución o en una fina dispersión para poder presentar buenas propiedades funcionales.

El gluten comercial tiene un pH aproximado de 4 y no muestra actividad emulsificante (Neumann y Wall, 1984).

Como se puede observar en la figura 3.2, la producción de gluten de maíz en nuestro país ha aumentado a más del doble en 8 años. Su precio aproximado es de \$2.80 m.n. por kg lo que resulta una fuente proteica económicamente accesible. Sin embargo, esta fuente proteica carece prácticamente de dos aminoácidos indispensables que son la lisina y el triptofano, lo cual impide asociarle un elevado valor biológico (Wilson, 1983; Watson y Ramstad, 1987).



**Figura 3.2** Volumen y valor de producción de gluten de maíz en México (abril de 1994 a abril del 2002). Fuente: Banco de información económica de la Secretaría de Economía. Indicadores de la Encuesta Industrial Mensual por división y clase de actividad económica.

El gluten de maíz posee un elevado contenido de aminoácidos hidrofóbicos, lo que explica su baja solubilidad en sistemas acuosos. La glutamina es el aminoácido más abundante, seguida de la leucina y la prolina.

### **3.2 Desamidación de proteínas**

La modificación química y enzimática de las proteínas es una práctica recurrente cuya finalidad es mejorar su funcionalidad.

Se sabe que la desamidación de los residuos de asparagina y glutamina afecta la carga de las proteínas cerca de su punto isoeléctrico y por consiguiente sus propiedades (Vodjani, 1992).

El efecto de la desamidación en la actividad emulsificante y espumante de diversas proteínas ha sido investigado para diferentes proteínas (Wu *et al.*, 1976; Matsudomi *et al.*, 1986; Kato *et al.*, 1987; Hamada, 1991; Riha, 1996; Flores, 1997).

Las proteínas contienen residuos tanto de ácido aspártico como de ácido glutámico, así como de sus derivados amidados (Asn y Gln). En general, las proteínas provenientes de plantas tienen un alto contenido de estos residuos, como por ejemplo la soya (Shih, 1990) y el gluten de trigo (Matsudomi *et al.*, 1986).

Existen dos formas de desamidación: la química y la enzimática

#### **3.2.1 Desamidación química**

La desamidación de las proteínas ocurre a pHs por debajo de 3 (ácida) y por arriba de pH 8 (básica) a velocidades dependientes de la concentración de iones  $H^+$  y  $OH^-$ , de la temperatura y de los residuos de aminoácidos adyacentes. La reacción es compleja debido a que involucra reacciones competitivas, como las I y II (Figura 3.3). La reacción 1 involucra un ataque nucleofílico por parte del C amida  $\beta$  o  $\gamma$  al enlace peptídico del N, lo que lleva a un intermediario cíclico (II) y la liberación de  $NH_3$ . Esta reacción es más frecuente para la asparagina que para la glutamina, lo que explica porque la desamidación de la asparagina es más rápida que la de la glutamina (Robinson *et al.*, 1973). Alternativamente, la desamidación puede ocurrir mediante la protonación directa del O del grupo carbonilo o por el ataque nucleofílico del  $OH^-$  al C del grupo carbonílico, llevando esto a la expulsión del  $NH_3$  sin la formación del intermediario cíclico (III) (Paso 2). El paso 2 es el camino preferido para la desamidación de la glutamina. La hidrólisis del intermediario cíclico (II) catalizada por los iones  $H^+$  o  $OH^-$ , pueden llevar ya sea al común  $\alpha$ -carbonilo unido al

péptido (IV) o al  $\beta$ - o  $\gamma$ - carbonilo unido al péptido (V). El enlace peptídico del  $\alpha$ -carbonilo es también susceptible a la hidrólisis directa por  $H^+$  o  $OH^-$ , dependiendo del pH y la temperatura. El uso de ácidos alquilsulfúricos y alquilsulfónicos, iones fosfato y bicarbonato como catalizadores favorecen la desamidación vs hidrólisis del enlace peptídico (Shih, 1990). Aproximadamente un 40% de desamidación ocurre con un 1- 4% de hidrólisis del enlace peptídico. El producto tiene mejor solubilidad, absorción y retención de agua, capacidad de emulsificación, espumado y viscosidad, comparado con el producto no modificado (Vodjani, 1992, Flores, 1997).

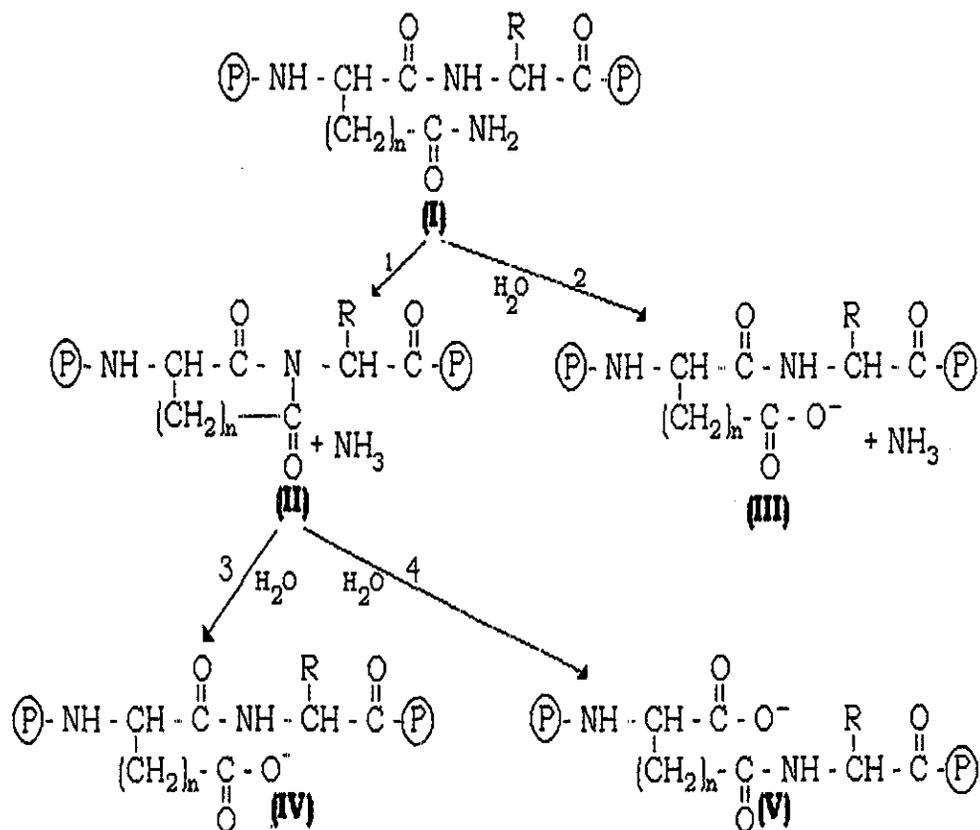


Figura 3.3 Desamidación no enzimática de las proteínas (Vodjani y Whitaker, 1992).

### **3.3 Propiedades funcionales de las proteínas**

Los ingredientes de muchos productos alimenticios poseen propiedades funcionales que afectan tanto las características como el desarrollo del producto. Las proteínas conforman uno de los grupos más grandes dentro de estos ingredientes. Las propiedades funcionales de las proteínas son aquellas propiedades fisicoquímicas de las proteínas comestibles que determinan su comportamiento durante el procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo de los alimentos y que afectan su calidad y aceptación (Matil, 1971; Kinsella, 1981). Las propiedades funcionales de las proteínas permiten contribuir a que los alimentos exhiban características deseables. En un solo alimento, suelen ser evidentes varias propiedades funcionales de una proteína (Fennema, 1993). De acuerdo a Nakai y Powrie (1981), las propiedades funcionales incluyen a:

1. Las propiedades sinestésicas y sensoriales, i e , color, olor, sabor y textura.
2. La hidratación, dispersabilidad, solubilidad e hinchamiento.
3. Las propiedades de superficie, i e , emulsificación, espumado y absorción, incluyendo la retención de aceite
4. Propiedades reológicas incluyendo la gelificación y texturización
5. Otras propiedades, i e , adhesividad, cohesividad, formación de masas, fibras y láminas.

De acuerdo a lo anterior, la funcionalidad de las proteínas en un sentido más amplio, es cualquier propiedad distinta de su valor nutrimental, que afecta su utilización

En el cuadro 3.4 se presentan los factores que influyen en la funcionalidad de las proteínas.

**Cuadro 3.4** Propiedades funcionales típicas de proteínas en Sistemas alimentarios<sup>a</sup>

Propiedad Funcional	Modo de acción	Sistema alimentario
Solubilidad	Solvatación de la proteína, dependiente del pH	Bebidas
Absorción y retención de agua	Formación de puentes de hidrógeno con el agua	Carnes, salchichas, panes, pasteles
Viscosidad	Espesado, fijación de agua	Sopas, salsas
Gelificación	Formación de una matriz proteica estable	Carnes, quesos
Cohesión-adhesión	La proteína actúa como un material adhesivo	Carnes, salchichas, pastas
Elasticidad	Formación de uniones hidrofóbicas en el gluten, formación de puentes disulfuro en los geles	Carnes, pastelería
Emulsificación	Formación y estabilización de emulsiones con grasa	Salchichas, sopas, pasteles, aderezos, salsas
Adsorción de grasa	Fijación de grasa libre	Carnes, salchichas, donas
Fijación de olor	Adsorción, retención y liberación	Productos de imitación de carnes, postres, etc
Espumado	Formación de láminas estables para retener al gas	Productos de repostería como merengues y espumas.

<sup>a</sup> Kinsella y Srinivasan, 1981.

Las proteínas que presentan una gran variedad de propiedades funcionales importantes pueden encontrarse tanto de manera natural en los alimentos (por ejemplo la ovoalbúmina en los huevos, las proteínas del suero y la caseína en la leche, la miosina en la carne) como

ser agregados durante el procesamiento o manufactura de los mismos (Dickinson y McClements, 1992).

Las propiedades físicas y químicas que influyen en el comportamiento funcional de las proteínas en los alimentos incluyen su forma, tamaño, composición de aminoácidos y secuencia, carga neta, distribución de la carga, hidrofobicidad, hidrofiliidad, estructura (secundaria, terciaria y cuaternaria), flexibilidad molecular y rigidez en respuesta a factores del ambiente externo (tales como pH, temperatura y concentración de sal), e interacción con otros de los constituyentes del alimento (Damodaran y Paraf, 1997). La gran reactividad de las proteínas les permite reaccionar con azúcares reductores, grasas y sus compuestos de oxidación, polifenoles y muchos otros componentes de los alimentos. Las cantidades y propiedades físicas de la mayoría de los componentes de los alimentos (grasas, carbohidratos, lípidos); así como los tratamientos mecánicos, térmicos, químicos y enzimáticos provocan diversas modificaciones en las proteínas. Debido a ello, las propiedades funcionales de las proteínas se ven afectadas por estos factores, que son tanto intrínsecos como ambientales y de proceso

Las propiedades funcionales de las proteínas se pueden agrupar en 3 grandes grupos, que se relacionan entre sí mediante diversos mecanismos como se muestra en la figura 3.4.

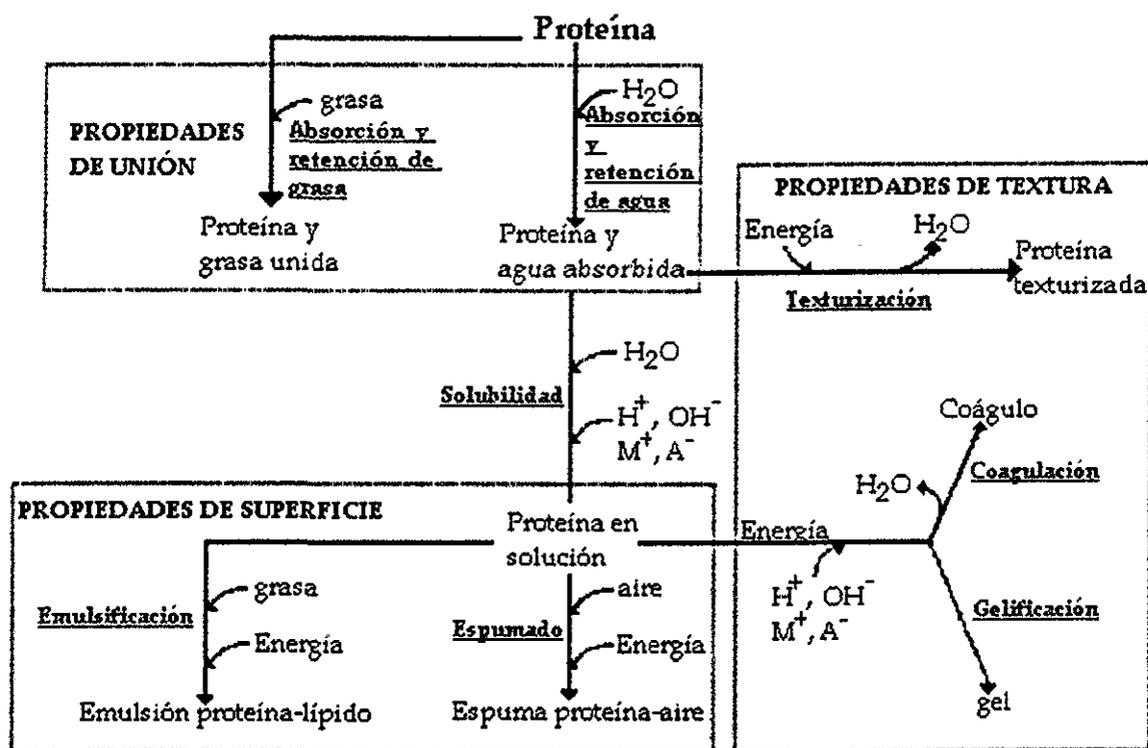


Figura 3.4 Aspectos de la funcionalidad de proteínas y sus interrelaciones (Phillips y Beuchat, 1981)

Cabe señalar que el supuesto de que las proteínas deben estar dotadas de una elevada solubilidad inicial como prerrequisito de otras propiedades funcionales como la emulsificación y el espumado por ejemplo, no siempre es correcto. Como se verá mas adelante, la absorción y retención de agua por un ingrediente proteico puede mejorarse, a veces, mediante una desnaturalización e insolubilización previas. Igualmente, la capacidad de formar geles puede no perderse durante la desnaturalización e insolubilización parciales. Todo esto está de acuerdo con el hecho de que la formación de emulsiones, geles y espumas implica diversos grados de desplegamiento, agregación o insolubilización de las proteínas (Fennema, 1993).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.3.1 Propiedades de Superficie:

Las propiedades de superficie de las proteínas son el resultado de la composición y distribución de los aminoácidos, de la flexibilidad molecular y, en menor grado, de la forma y tamaño de la molécula proteica (Morr y Ha, 1993).

**Emulsificación y Espumado:** Ambas propiedades requieren de la habilidad de las proteínas para actuar como surfactantes y estabilizar emulsiones y espumas gracias a su capacidad inherente de adsorberse en interfases, lo cual provoca una reducción considerable de la tensión interfacial y la formación de una película cohesiva. Ya que todas las proteínas son anfífilas, i. e., contienen tanto residuos hidrofílicos como hidrofóbicos, presentan una tendencia a adsorberse en interfases. Sin embargo, el grado de adsorción y la habilidad de reducir la tensión interfacial y formar películas cohesivas en la interfase difiere ampliamente entre las proteínas. Estas diferencias derivan primeramente de diferencias en conformación así como de diferencias en las propiedades fisicoquímicas de la superficie que interactúa con las fases dispersa y continua en emulsiones y espumas. Específicamente, los factores que afectan la adsorción y la formación de películas de las proteínas en las interfases son la estabilidad conformacional y adaptabilidad a las fronteras de las fases y la distribución simétrica o asimétrica de los grupos hidrofóbicos e hidrofílicos en la superficie de la proteína (Hettiarachy y Ziegler, 1994).

En un sistema quiescente, se piensa que la adsorción de proteínas en interfases aceite-agua y aire-agua es un proceso controlado por la difusión. Se asume que cuando una interfase está recién creada, las moléculas que están por debajo de la superficie se absorben instantáneamente en la interfase (MacRitchie y Saraga, 1984). Cuando la superficie se satura se detiene la migración de moléculas proteicas hacia ella, lo que crea un gradiente entre la sub-superficie y la superficie.

### **3.4 Propiedades emulsificantes de las proteínas**

#### **3.4.1 Definición de emulsión**

En general, una emulsión se define como una dispersión o suspensión de dos líquidos inmiscibles (Dickinson, 1992), en la cual uno de ellos se encuentra suspendido en forma de pequeñas gotas (fase dispersa) en el otro líquido (fase continua). Existen dos tipos de emulsiones alimentarias: las emulsiones agua en aceite (W/O) como lo son por ejemplo las margarinas y mantequillas, y las emulsiones aceite en agua (O/W) donde, por ejemplo, en la leche la fase continua es el agua (Hall, 1999).

#### **3.4.2 Formación de emulsiones**

El agua y el aceite son inmiscibles porque es desfavorable el incremento de energía libre que ocurre cuando la estructura del agua se perturba por el contacto de los grupos no polares. La energía de este sistema es mínima cuando el área de contacto entre dos líquidos inmiscibles se minimiza. Esto se manifiesta normalmente como la separación de las fases. Los dos líquidos pueden ser puestos en contacto íntimo mediante la aplicación de una cantidad significativa de energía. La energía aplicada debe ser mayor que la energía superficial de contacto resultante del mezclado. El área interfacial de la emulsión depende de la cantidad de trabajo hecho sobre el sistema. A menor tamaño de las gotas, mayor será el área superficial, y por lo tanto, se requerirá suministrar una mayor cantidad de trabajo. Al incrementarse el trabajo aplicado, el tamaño de las gotas se va haciendo más pequeño. La creación de una nueva área interfacial resulta en un estado de alta energía, por lo que el sistema tratará de llegar a un estado de menor energía mediante la coalescencia de los glóbulos de grasa. La velocidad de la colisión de las gotas de aceite y la presencia o ausencia de una barrera energética determinará la velocidad de coalescencia de los glóbulos grasos. Para glóbulos grasos que no están cubiertos, la barrera energética para la coalescencia es tan pequeña que puede considerarse despreciable.

El factor crítico en la tecnología de las emulsiones depende de la aplicación de agentes emulsificantes, cuya función es vencer la situación de energía desfavorable asociada con la dispersión de las pequeñas gotas de aceite en el agua (Mangino, 1984)

### 3.4.3 Características de las proteínas que actúan en interfases

De todos los surfactantes que se emplean en la industria alimentaria, las proteínas poseen características que resultan de gran interés. Para entender la importancia de las proteínas como surfactantes primero hay que hablar de su comportamiento aislado en un medio acuoso. Las proteínas poseen tanto aminoácidos polares como no polares. Una de las formas en que las proteínas minimizan su energía es mediante el plegamiento en estructuras de baja energía libre. Estas estructuras generalmente resultan cuando las interacciones de grupos polares con el agua se maximizan y las interacciones de los grupos no polares con el agua se minimizan. Las proteínas nativas existen en estructuras que representan el estado de energía libre más bajo (Anfinsen, 1973). Esto generalmente resulta en la remoción de los grupos hidrofóbicos del ambiente acuoso. Aunque las asociaciones hidrofóbicas individuales son débiles y su fuerza es muy dependiente de la naturaleza del solvente (Tanford, 1961), sin embargo, se encuentran presentes en gran número en las proteínas. La presencia de moléculas o condiciones que afectan la fuerza de las asociaciones hidrofóbicas pueden tener un gran efecto en la funcionalidad de las proteínas.

La conformación de energía libre más baja es fuertemente dependiente de la composición del solvente. Se presentan diferentes conformaciones bajo diferentes condiciones ambientales. Factores como el pH, la temperatura, la constante dieléctrica, la fuerza iónica y la presencia de otros componentes incluyendo gases, líquidos y otras proteínas pueden causar cambios en la conformación de la proteína (Mangino, 1984).

Las conformaciones nativas de las proteínas son estructuras dinámicas (Karplus y McCammon, 1983). Existe una libertad rotacional en muchos de los enlaces dentro de la molécula proteica, y la ganancia de entropía disminuye la energía libre total de la estructura nativa. Muchas porciones de la molécula son estabilizadas por interacciones secundarias relativamente débiles, y se requiere suministrar muy pocas cantidades de energía para que la molécula adquiera conformaciones ligeramente diferentes. Estos cambios conformacionales generalmente llevan a estructuras de mayor energía libre que no son estables por mucho tiempo. Si la diferencia en los cambios de energía libre es pequeña, podrán existir algunas conformaciones similares al mismo tiempo.

Una proteína debe ser visualizada como una entidad dinámica que constantemente está probando diferentes estructuras dentro de un cierto margen de cambios. Estas nuevas

estructuras generalmente no son muy diferentes de la estructura nativa y casi siempre llevan a situaciones donde la energía libre del sistema se incrementa. El incremento de la energía libre provoca que la proteína se repliegue espontáneamente a un estado de menor energía libre. De aquí que la estructura nativa de una proteína no es solamente la estructura que pueda asumir, sino que es la llave a la menor energía libre. Pequeños cambios en el medio ambiente pueden causar alternancia de estructuras para lograr la menor energía libre, dándose con esto, cambios conformacionales en la proteína (Mangino, 1984, Creighton, 1997).

Muchas proteínas pueden ser adicionadas para favorecer la formación e incremento en la estabilidad de emulsiones. Debido a su carácter anfifílico, las proteínas tratan de orientarse en la interfase polar-no polar. En comparación con otros agentes surfactantes como los fosfolípidos, las proteínas son moléculas más grandes con fuerzas más complejas involucradas en su repliegamiento. Como cualquier emulsificante, las proteínas deben alcanzar la interfase para presentar la funcionalidad. En las proteínas nativas, la mayoría de las cadenas laterales de los residuos no polares están localizadas en el interior de la moléculas. Se ha estimado que el remover una mol de grupos hidrofóbicos de la superficie representa una ganancia promedio de energía de 12 kJ, (Kinsella, 1982) dependiente del área de superficie que se remueve. Cualquier grupo hidrofóbico que permanezca en la superficie incrementa la energía total del sistema. De aquí que, en el caso típico, la superficie de proteínas solubles está representada por grupos cargados, los cuales se mantienen en contacto con el agua. La interacción favorable del agua con los grupos cargados disminuye la energía total de la molécula proteica, lo que se observa como una resistencia de estos grupos cargados de la superficie proteica a ser removidos de la fase acuosa. Si se trata de insertar a iones hidratados en el medio no polar, estos son repelidos de la interfase, ya que esta inserción es desfavorable energéticamente. Si los grupos cercanos a la interfase están en una región de la molécula proteica que es flexible, la molécula empezará a desplegarse exponiendo así sus grupos hidrofóbicos hacia la superficie. La exposición limitada de los grupos hidrofóbicos al ambiente acuoso es posible y resulta en un incremento de la energía total del sistema, proceso que resulta desfavorable, por lo que con el tiempo, las fluctuaciones al azar en la estructura de la proteína provocarán que la proteína se repliegue y que estos grupos regresen al interior de la molécula. Cuando el

replegamiento de la proteína sucede en una interfase agua-aceite, los grupos hidrofóbicos se insertan en la fase oleosa. La inserción de las cadenas laterales de los aminoácidos hidrofóbicos en la fase no polar tiene una baja energía de activación y procede espontáneamente (Tanford, 1970). Sin embargo, un residuo hidrofóbico solo puede entrar a la fase lipídica si no se encuentran grupos cargados cercanos. Se ha reportado que como mínimo, se requieren de seis a ocho aminoácidos hidrofóbicos adyacentes para la inserción de una región hidrofóbica en ambientes no polares (MacRitchie, 1987). La fuerza que dirige la interacción proteína-lípido debe ser un incremento en la entropía del sistema. Este incremento en la entropía consta de dos componentes: la entropía conformacional de la proteína y el cambio en la organización del agua cercana a los grupos hidrofóbicos. Existe un número mayor de formas en las que los grupos hidrofóbicos de las proteínas pueden acomodarse en un ambiente lipídico en comparación con el número posible de formas posibles para adquirir la estructura nativa. Esto lleva a un incremento de la entropía conformacional de la proteína. Las moléculas de solvente en la interfase se arreglan en estructuras altamente ordenadas. La proximidad de la proteína con la inserción de los grupos hidrofóbicos en la fase oleosa, esencialmente, cubre el material no polar y permite la liberación del solvente de la superficie. La liberación de estas moléculas de agua es la responsable de un incremento significativo de la entropía del sistema.

Se ha determinado que la energía de activación para la inserción de un área hidrofóbica en una fase lipídica es mínima. La reacción, sin embargo, no es fácilmente reversible. Las proteínas tienen un cierto número de grupos cargados en la superficie y, en determinado tiempo, otras secciones de la molécula proteica se acercarán a la superficie, y cuando estos grupos cargados se encuentren en zonas lo suficientemente flexibles para desplegarse, se insertarán regiones hidrofóbicas adicionales en la fase lipídica. Esto continúa de tal forma que la proteína se va desnaturalizando o desplegando en la interfase.

La remoción de los grupos hidrofóbicos de la fase lipídica los pondría en contacto con el agua, lo que resultaría en un aumento de la energía total. En la práctica, este estado de alta energía debería ser fácilmente acomodado con un sencillo re-arreglo de la molécula proteica. Para proteínas unidas en más de un sitio hidrofóbico, la desorción ocurre muy lentamente. Con múltiples puntos de unión, resulta difícil tener un replegamiento y desorción rápidos. Si un sitio hidrofóbico se separa y se repliega, existen otros que se

mantienen adsorbidos, y si un segundo sitio se separa es muy probable que el primero haya vuelto a adsorberse. De aquí se tiene que la probabilidad de reversibilidad está en función del número de puntos de adsorción y de la flexibilidad de la proteína (Mangino, 1997).

#### **3.4.4 Estabilidad de emulsión**

El término “estabilidad de emulsión” se refiere a la capacidad de una emulsión para resistir cambios en sus propiedades a través del tiempo: a mayor estabilidad de la emulsión, menor será la velocidad con la que cambien sus propiedades (McClements, 1999). Una emulsión puede llegar a ser inestable debido a un gran número de procesos fisicoquímicos diferentes. La inestabilidad física resulta de la alteración en la distribución espacial o en la organización estructural de las moléculas, mientras que la inestabilidad química resulta de la alteración en la estructura química de las moléculas. Ejemplos de inestabilidad física son el cremado, la floculación, la coalescencia y la maduración de Ostwald (Dickinson y Stainsby, 1982; Dickinson y McClements, 1992; Walstra, 1996), mientras que la oxidación y la hidrólisis son ejemplos comunes de la inestabilidad química (Fennema, 1993). En la práctica, dos o más de estos mecanismos operan al mismo tiempo.

#### **3.4.5 Métodos de medición de las propiedades emulsificantes de las proteínas**

Existe una gran variedad de pruebas que han sido aplicadas para indicar el poder emulsificante de una proteína.

Los parámetros más utilizados son los siguientes:

- a) Medición del tamaño de gota: Los tamaños de los glóbulos que forman la fase discontinua de la mayoría de las emulsiones tienen diámetros que van de los 0.1  $\mu\text{m}$  hasta 1 mm. Como ya se mencionó anteriormente, un menor tamaño del glóbulo repercute en una mayor estabilidad de la emulsión (Hall, 1999).
- b) Actividad Emulsificante (AE): Es el área de superficie total de la emulsión (McClements, 1999)
- c) Índice de Actividad Emulsificante: Es el área de interfase estabilizada por gramo de proteína (Fennema, 1993).

- d) Capacidad Emulsificante (CE): Es el volumen de aceite que puede ser emulsificado por cada gramo de proteína, antes de que se produzca la inversión de fases (Fennema, 1993).
- e) Estabilidad de Emulsión (EE): Es el porcentaje del volumen inicial de la emulsión que se mantiene tras someter a la emulsión al calentamiento, al reposo por varios días o la centrifugación (Fennema, 1993).
- f) Hidrofobicidad Superficial: Es la suma de las hidrofobicidades individuales de los residuos de los aminoácidos que se encuentran en la superficie de la proteína (Hall, 1999).

Además de estos parámetros, la medición de la proteína adsorbida en la interfase, la adsorción y retención de grasa, la viscosidad aparente, entre otros, son de gran utilidad para comprender mejor el comportamiento de la proteína

## **4.- ANTECEDENTES**

La aplicación del gluten de maíz en alimentos está limitada, por una parte, por su baja solubilidad en sistemas acuosos, y por otra, por su color amarillo intenso debido a la presencia de xantofilas y aroma y sabor fuertes generados por la utilización del bisulfito de sodio en el proceso de molienda húmeda.

Watson y Yahl (1967) reportaron que el gluten de maíz comercial contenía 1.2% de globulinas, 68% de zeínas y 28% de glutelinas mediante fraccionamiento secuencial con soluciones salinas, 70% de etanol y 0.1N de NaOH.

Dixon y Sternberg (1979), investigaron las propiedades funcionales y nutrimentales del gluten de maíz obtenido como subproducto de la obtención de dextrosa. Dicho concentrado proteico poseía baja solubilidad pero buena capacidad de retención de agua y aceite, además de buena digestibilidad.

En 1984, Neumann y Wall realizaron un estudio de las propiedades físicas y químicas de las proteínas del gluten de maíz para establecer sus posibles usos en alimentos; en él indicaron que el remojo al cual es sometido el grano de maíz en presencia de SO<sub>2</sub> provoca que cerca de la mitad del contenido de cisteína-cistina de la proteína del gluten de maíz se convierta en S-sulfocisteína y produzca más sulfhidrilos que están protegidos de la oxidación. Esto aumenta la solubilidad de la proteína del gluten de maíz. Concluyeron también que el tratamiento térmico mejora la capacidad de formación de masa.

En 1992, Mannheim y Cheryan utilizaron a una proteasa (alcalasa) para hidrolizar el gluten de maíz, y encontraron que al incrementar el grado de hidrólisis se incrementaba el volumen inicial de espuma pero disminuía su estabilidad. Sin embargo, el gluten hidrolizado presentaba mejores propiedades de absorción y retención de agua.

Wu *et al.* (1994) realizaron una investigación en la que evaluaron la extracción del gluten de maíz con dióxido de carbono supercrítico y con hexano-etanol, a varias temperaturas, presiones, reacciones sólido-solvente y tamaños de partícula. Dicha extracción redujo significativamente el sabor agrio/amargo, la característica predominante del gluten de maíz.

Debido a que el gluten de maíz posee un elevado contenido de zeínas y que estas proteínas se consideran como excelentes candidatos para usos alimentarios y no alimentarios por sus características únicas de hidrofobicidad y capacidad de formación de láminas y fibras, en 1997 Shaowen *et al.*, probaron distintos métodos de extracción de estas prolaminas evaluando, para cada uno de ellos, tanto rendimiento como pureza de las zeínas extraídas. Concluyeron que el mayor rendimiento y pureza se obtuvo con la extracción a 60°C con etanol al 70% en proporción 1:4 peso/volumen.

Flores (1997) corroboró la baja solubilidad de las proteínas del gluten de maíz a pH 7 y la baja estabilidad de emulsión (59.42%) en emulsiones preparadas al 5% de proteína. Determinó que la desamidación de las proteínas del gluten de maíz mejora tanto su solubilidad como sus propiedades emulsificantes. Estableció las condiciones óptimas de desamidación química (HCl 0.12N/6 h/60°C) con las cuales se obtienen los mejores valores de solubilidad ( $17.25 \pm 2.8\%$ ), estabilidad de emulsión ( $3.5 \pm 0.1$  ml de aceite caecido /100 ml de emulsión) e índice de actividad emulsificante ( $27.5 \pm 0.5$  m<sup>2</sup>/g) en emulsiones preparadas al 1% de las proteínas del gluten de maíz (Figura 4.1). Aún cuando la solubilidad de estas proteínas aumenta con la desamidación, es baja en comparación con la de otras proteínas, sin embargo, la mejora en las propiedades emulsificantes les permite ser consideradas como aditivos alimentarios en alimentos sólidos, resultados que representan una alternativa para dar más valor agregado a un subproducto de la industria del almidón de maíz.

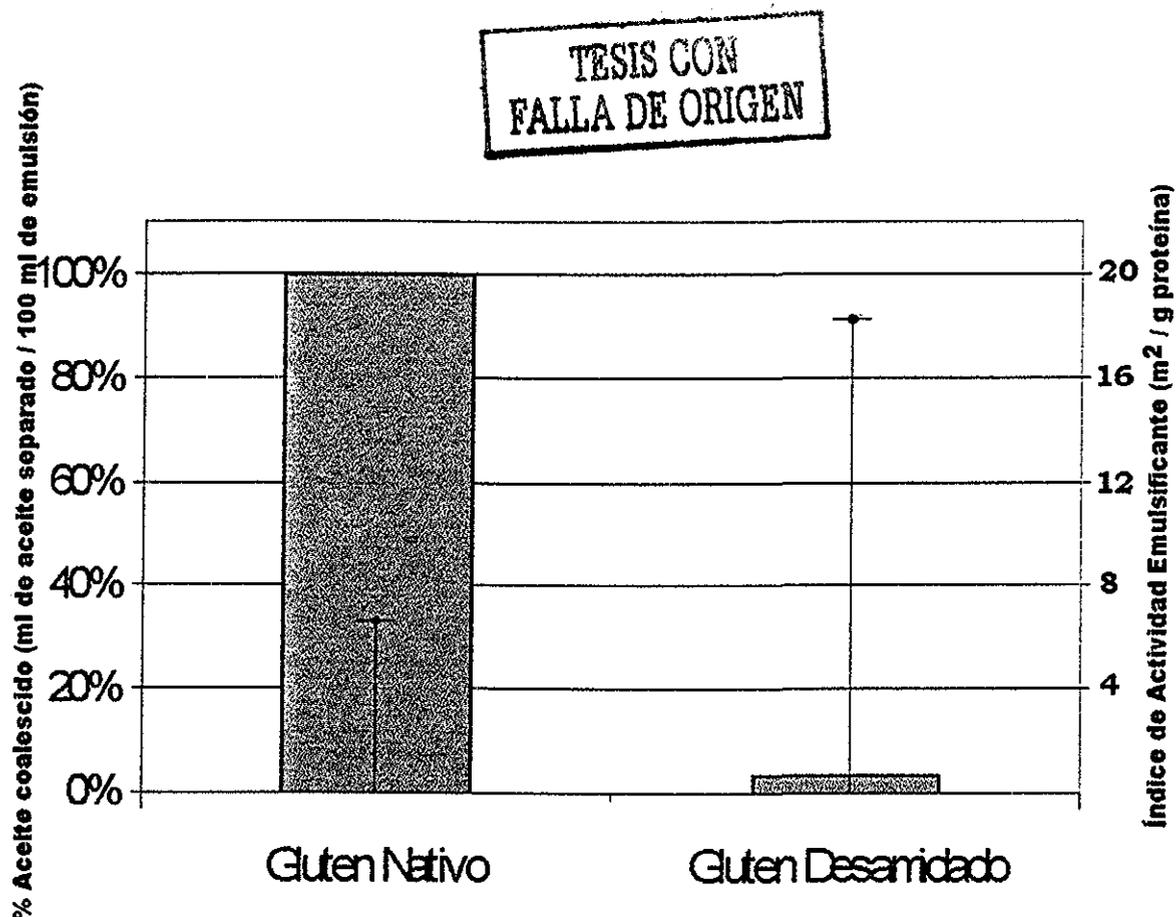


Figura 4.1. Estabilidad de emulsión (barras en azul) e Índice de Actividad Emulsificante (líneas en magenta) de proteínas de gluten de maíz antes (Gluten Nativo) y después (Gluten Desamidado) de la modificación química con HCl 0.12N/6h/60°C. Emulsiones elaboradas al 1% (p/v) de proteína en amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7. Datos obtenidos de Flores (1997).

Recientemente, Wu (2001), analizó las propiedades emulsificantes de diversas muestras comerciales de gluten de maíz. Determinó que estas propiedades mejoran al disminuir el tamaño de partícula por debajo de 44  $\mu\text{m}$  y aumentar el pH por arriba de 6.6. También determinó que si el pH se ajusta con LiOH y KOH a 7.8, la estabilidad de emulsión se incrementa.

## **5.- HIPÓTESIS**

“El grupo de proteínas más abundante en el gluten de maíz será el que mayor participación tendrá en la formación y estabilización de emulsiones aceite en agua”

## **6.- OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL:**

Identificar a las proteínas del gluten de maíz responsables de la estabilización de emulsiones aceite-agua.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Caracterizar al gluten de maíz en términos de análisis proximal, solubilidad y estabilidad de emulsión.
- Determinar el efecto de la desamidación química de las proteínas del gluten de maíz en su solubilidad, estabilidad de emulsión y participación de proteínas en la misma.
- Identificar y caracterizar a las proteínas participantes en la emulsión en términos de peso molecular, solubilidad e hidrofobicidad.
- Estudiar al grupo mayoritario de proteínas participantes en la emulsión para evaluar la estabilidad de emulsión en función de la carga, el pH y la concentración de proteína

## **5.- HIPÓTESIS**

“El grupo de proteínas más abundante en el gluten de maíz será el que mayor participación tendrá en la formación y estabilización de emulsiones aceite en agua”

## **6.- OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL:**

Identificar a las proteínas del gluten de maíz responsables de la estabilización de emulsiones aceite-agua.

### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Caracterizar al gluten de maíz en términos de análisis proximal, solubilidad y estabilidad de emulsión.
- Determinar el efecto de la desamidación química de las proteínas del gluten de maíz en su solubilidad, estabilidad de emulsión y participación de proteínas en la misma.
- Identificar y caracterizar a las proteínas participantes en la emulsión en términos de peso molecular, solubilidad e hidrofobicidad.
- Estudiar al grupo mayoritario de proteínas participantes en la emulsión para evaluar la estabilidad de emulsión en función de la carga, el pH y la concentración de proteína

## 7.- METODOLOGÍA

### **ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL**

---

**Caracterización del gluten de maíz  
(Análisis proximal)**



**Desamidación del gluten de maíz**



**Comparación del gluten de maíz modificado y no modificado en términos de:**

- Solubilidad de proteína en función del pH
- Estabilidad de emulsión
- Proteínas participantes en la emulsión



**Identificación de las proteínas participantes en la emulsión con base en su solubilidad en diferentes disolventes y en sus pesos moleculares**



**Extracción del grupo de proteínas mayoritario presente en la emulsión a partir del gluten de maíz para la comprobación de su propiedad emulsificante**

## **7.1 Obtención y caracterización de la materia prima**

La muestra de gluten de maíz se obtuvo por donación de la compañía Arancia Corn Products, S. A. de C. V., elaborado en su planta de Tlalnepantla, Edo de México.

El producto se almacenó a 5°C en recipientes plásticos con cierre hermético, no traslúcidos con capacidad de 10 Kg durante el transcurso del presente estudio.

### **7.1.1 Homogenización de la materia prima**

La muestra se trituró en un molino marca Weber Bros & White, Metal Works Inc. La muestra se pasó tres veces consecutivas por el molino.

La harina obtenida de la molienda de la muestra se tamizó por una malla no. 40. Se cuantificó el rendimiento del tamizado de la muestra antes y después de realizada la molienda. A partir de este momento, los estudios se realizaron con la muestra con tamaño de partícula no mayor a 40 µm.

### **7.1.2 Análisis proximal de la muestra**

- **Determinación de humedad:** Se utilizó una termobalanza (OHAUS). Se pesó 1 g de muestra y se sometió a 80°C/40 minutos. El porcentaje de humedad se calculó con base en la pérdida de peso. La determinación se hizo por quintuplicado.
- **Contenido de grasa, ceniza y fibra:** Se realizaron según los Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación de Químicos Analistas Oficiales AOAC (1995) número 920.39, 923.03 y 962.09 respectivamente en los laboratorios del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán.
- **Contenido de proteína total:** Se utilizó el método de microkjeldahl número 977.14 de la AOAC (1995) en un equipo Büchi 426 Digestion Unit de la siguiente forma: Se pesaron 0.5 g de muestra (por quintuplicado). Se colocaron los tubos kjeldahl en la gradilla introduciendo en cada uno de ellos la muestra pesada y envuelta en papel de celulosa de alta pureza. En el caso del blanco se colocó únicamente el papel. Se agregó a cada uno de los tubos (incluyendo al blanco) una pastilla digestora (Mallinkrot) y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se procedió a la digestión y destilación de la muestra.

durante aproximadamente 3 h. Se tituló el destilado con HCl 0.1 N y se calculó el contenido total de proteína mediante las siguientes fórmulas:

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

$$\% \text{ Proteína} = (\%N)(6.25)$$

Se utilizó el factor para proteínas de maíz

- Contenido de Carbohidratos totales: Se utilizó el método de Durbois *et al*, (1956). Se preparó una solución de la muestra al 10%. Se tomó 1 mL y se le adicionaron 1 mL de fenol al 5% y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se incubó durante 25 min. a 25°C y se leyó en celdas de vidrio a 490 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer. La concentración se interpoló de una curva patrón de glucosa de 0-100 µg/mL. El análisis se realizó por quintuplicado.
- Determinación del pH del gluten de maíz*

Se realizó según el método # 943.02 de la AOAC. Se pesaron 10 g de muestra y se homogenizaron con agua destilada pH 7 durante 2 min a 20000 rpm con un homogenizador ultraturax (Tekmar Tissumizer SIII-1810). Se llevaron a 100 mL y la suspensión se sometió a agitación magnética a temperatura ambiente por 30 minutos. Se registró el pH con un potenciómetro (Beckman Mod. 34 pH meter). La medición se realizó por sextuplicado.

### **7.2 Desamidación química del gluten de maíz (Flores, 1997)**

La desamidación del gluten de maíz se realizó de acuerdo a las condiciones experimentales establecidas por Flores (1997). Se preparó una suspensión al 5% (g proteína/100 mL) de gluten de maíz. Se adicionaron 90 ml de HCl 0.12 N a 60°C y se homogenizó la suspensión en un homogenizador ultraturax (Tekmar Tissumizer T25) a 8000 rpm/1 min. Se aforó a 100 mL la suspensión con HCl 0.12 N a 60°C y se colocó el matraz en agitación a 70°C/6 h (Incubadora New Brunswick Scientific Modelo R76). El matraz se colocó inmediatamente en baño de hielo y se neutralizó el pH con NaOH 1N (pH 7.0 –7.5). A la muestra desamidada se le determinó el grado de desamidación según Arntfield y Murray (1981, ver anexo). La suspensión de gluten de maíz desamidado se congeló, liofilizó y almacenó en recipientes plásticos, no translúcidos con cierre hermético, a 4°C.

NOTA: Para diferenciar las muestras de gluten desamidado y no desamidado, se llamará “nativo” al gluten que no ha sufrido desamidación, con la aclaración de que no se refiere al estado de desnaturalización de la proteína.

### **7.3 Solubilidad de las proteínas del gluten de maíz en función del pH (Popineau *et al.* 1988)**

Se prepararon suspensiones de gluten de maíz al 1% (p/v) nativo y desamidado en volúmenes de 50 mL de agua destilada cada una. Dichas suspensiones se ajustaron a valores de pH en un intervalo de 2 a 12 con NaOH 0.1 N y HCl 0.1 N. Para cada pH se prepararon dos suspensiones (duplicado). Los matraces se colocaron en una placa agitadora a 175 rpm/30°C/30 min. Después de este período de agitación se ajustaron los pHs de las suspensiones y se sometieron nuevamente a dos períodos de agitación bajo las mismas condiciones con el correspondiente ajuste del pH. Al terminar el proceso de solubilización, se refrigeraron las muestras a 4°C/12 h. Se separaron los sobrenadantes mediante la centrifugación de las suspensiones a 10000 rpm/30 min en centrífuga Beckman J2-MC y se determinó proteína soluble por la técnica de Lowry-modificada (Peterson, 1977; ver anexo)

#### **7.4 Perfil electroforético de las proteínas solubles en función del pH**

Los sobrenadantes obtenidos de la solubilización de proteínas en función del pH se trataron de la siguiente forma: para evitar la aparición de barridos en los geles de electroforesis debidos a la presencia de una cantidad elevada de almidón, los sobrenadantes se liofilizaron y se redisolviéron en amortiguador de citratos 0.1 M pH 4.4, se adicionó  $\alpha$ -amilasa (Enmex) al 0.1% (p/v) disuelta en un cóctel de inhibidor de proteasas (Complete®, Roche) para hidrolizar y solubilizar el almidón. Se incubaron a 30°C/6 horas y posteriormente las muestras se concentraron mediante la precipitación con TCA al 50% (v/v) y se dializaron en membranas de diálisis (Spectronic, MWCO 5000) contra agua desionizada durante 24 h/4°C.

Las muestras se analizaron en geles de electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes al 10% de acrilamida. Se cargaron 500  $\mu$ g de proteína en cada carril (Laemmli, 1970; ver anexo) en cámara de electroforesis (Hoefer SE600 Serie S Electrophoresis Unit) La tinción se realizó con azul de Coomasie.

#### **7.5 Determinación de la Estabilidad de Emulsión (Dagorn *et al.* 1987)**

Esta técnica mide la resistencia de una emulsión a la coalescencia ante una fuerza centrífuga mediante la medición del volumen de la fase de aceite que se separa en relación con el volumen que permanece de la crema. Se prepararon emulsiones con concentraciones de proteína de 0.5, 1, 5 y 7 % de la suspensión de gluten de maíz nativo y desamidado con amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7 por duplicado. Se ajustó el pH a 7 con HCl 0.1 N y NaOH 0.1 N. Los matraces se colocaron en una placa agitadora a 175 rpm/30°C/30 min. Después de este período de agitación se ajustaron los pHs de las suspensiones y se sometieron nuevamente a dos períodos de agitación bajo las mismas condiciones con el correspondiente ajuste del pH. Al terminar el proceso de solubilización, se mezclaron tres partes de suspensión de gluten con una parte de aceite de maíz, adicionándolo con bureta a velocidad constante. Las emulsiones se realizaron en un homogenizador ultraturrax (Tekmar Tissumizer T25) a 20000 rpm/2 min. Las emulsiones se vaciaron a tubos cónicos

graduados de 15 ml (Nalgene) y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min (centrífuga Sorvall RT 6000 D, Dupont). Dicha medición se realizó por cuadruplicado para cada matraz.

La determinación de la estabilidad de la emulsión se realizó midiendo los siguientes volúmenes (Figura 7.1):

$V_s$ = Volumen de aceite coalescido

$V_t$ = Volumen total

$V_{fpd}$ = Volumen de la fase polar dispersa = volumen parcial/volumen total=  $25/(75+25)$   
= 0.25

% aceite coalescido =  $(V_s/(V_t \times V_{fpd})) \times 100$

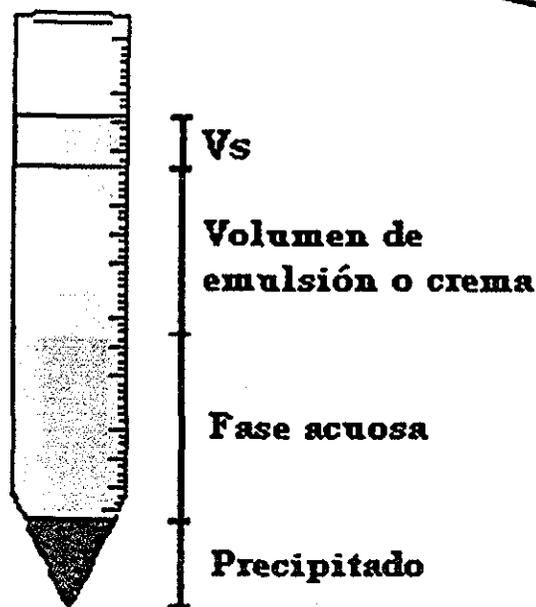


Figura 7.1 Medición de los volúmenes para determinación de la estabilidad de emulsión.

### *Extracción de lípidos de las muestras*

Para evaluar el efecto de los lípidos en la estabilidad de emulsión de las proteínas se procedió a extraerlos de la siguiente forma: como solvente de extracción se utilizó una mezcla cloroformo:metanol (2:1 v/v) en relación 1:10 (g proteína de gluten de maíz:mL de solvente). Se agitó en vortex durante 10 minutos a alta velocidad y se centrifugó a 12000 rpm/15min/4°C. Se desechó el sobrenadante y se repitió la extracción 3 veces más. La extracción de lípidos fue monitoreada mediante pruebas cromatográficas de capa fina con placas de gel de sílica. Cabe señalar que se utilizó dicha mezcla de solventes debido a que es la más adecuada para extraer mono, di y triacilglicéridos, flavonas y flavonoides en general, compuestos que están presentes en los granos de maíz (Pomeranz, 1987).

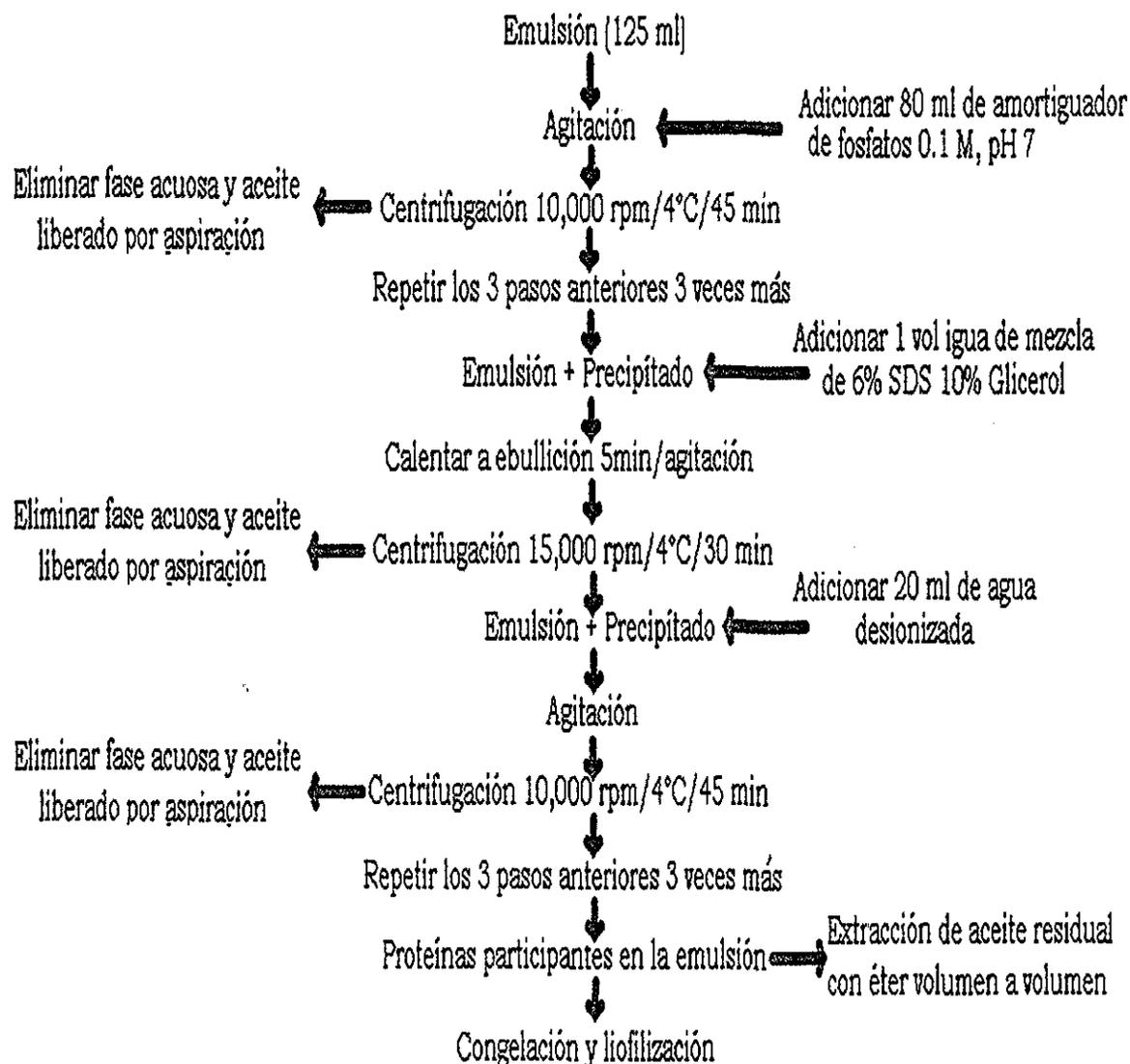
### *Hidrólisis de almidón*

Para evaluar el efecto del polímero en la formación y estabilización de emulsiones, se utilizó una mezcla de enzimas amilolíticas para hidrolizar el almidón. El procedimiento de hidrólisis fue el siguiente: Se preparó una suspensión de gluten de maíz al 30% (p/v) con amortiguador de citratos 0.1 M y se ajustó el pH a 4.4. Se adicionó una mezcla de enzimas amilolíticas (alfa y glucoamilasas, Glucozyme L-400, Enmex) en una relación de 5 µL por cada 10 g de muestra. Se adicionó además una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete®, Roche) en relación 1:100 (v/p). Se incubó con agitación suave a 60°C/24 h. Al término de la incubación se elevó la temperatura a 80°C/5 min, se dejó enfriar, se dializó contra agua desionizada en membranas de diálisis (Spectra) MWCO:3500 con agitación magnética a 4°C, se congeló y liofilizó. La hidrólisis del almidón se monitoreó mediante pruebas de tinción con lugol.

### 7.6 Extracción de proteínas de la emulsión (Saito *et al.*, 1993)

Se extrajeron las proteínas de emulsiones hechas, tanto con gluten nativo como con gluten desamidado, para posteriormente comparar la composición de proteína (microkjeldahl, método 977.14 de la AOAC), carbohidratos totales (Fenol Sulfúrico, Durbois *et al.*, 1956), grasa (método 920.39), humedad (termobalanza) y los perfiles electroforéticos de las proteínas participantes en cada una de las emulsiones, para lo cual se elaboraron geles desnaturalizantes al 10% de acrilamida (Laemmli, 1970) y se corrieron a 250 volts, y 60 miliampers durante 6 horas (Hofer SE600 Serie S Electrophoresis Unit)

El diagrama de extracción de las proteínas de la emulsión se muestra a continuación:



### 7.6.1 Solubilización de las proteínas participantes en la emulsión en diferentes disolventes (Shewry *et al.*, 1983)

De acuerdo a la clasificación de las proteínas de Osborne (1914), se realizó la solubilización de las proteínas que se extrajeron de la emulsión hecha con gluten desamidado, utilizando las condiciones de extracción reportadas por Shewry *et al.*, (1983) con la variante de que la solubilización no fue secuencial, sino que se tomaron muestras y se disolvieron en los diferentes solventes por separado para conocer cuánta proteína se disolvía en cada uno de ellos. El cuadro 7.1 muestra los solventes empleados para cada fracción proteica y el diagrama la técnica que se siguió.

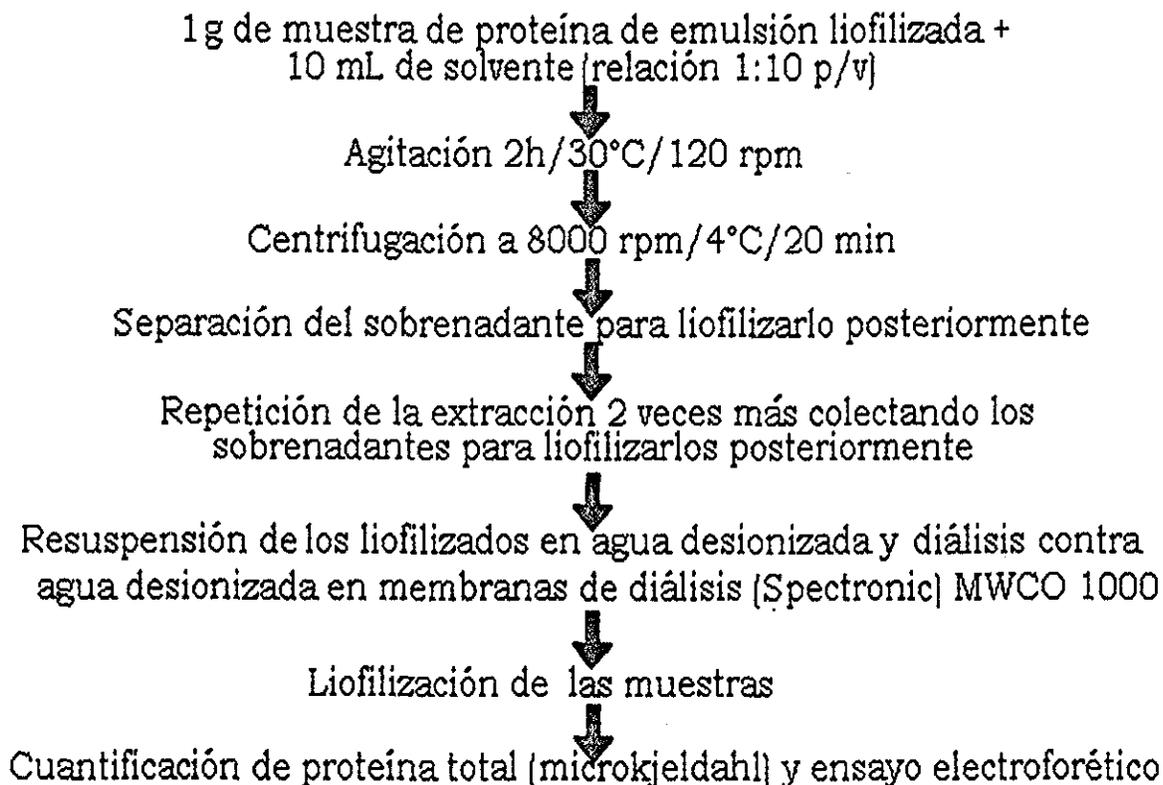
**Cuadro 7.1** Solventes empleados en la solubilización de proteínas

Fracción proteica	Solvente utilizado
Albúminas	Agua desionizada a pH 7
Globulinas	NaCl 0.5 M
Prolaminas	Mezcla propanol-BME-Ac. Acético*
Glutelinas	Amortiguador de boratos 0.05 M pH 10**

\* 50% propanol, 2% BME, 1% Ac. Acético.

\*\*30% Amortiguador de Boratos 0.05 M pH 10 + 1% de BME + 1% SDS

### **Diagrama de solubilización de proteínas en diferentes disolventes**

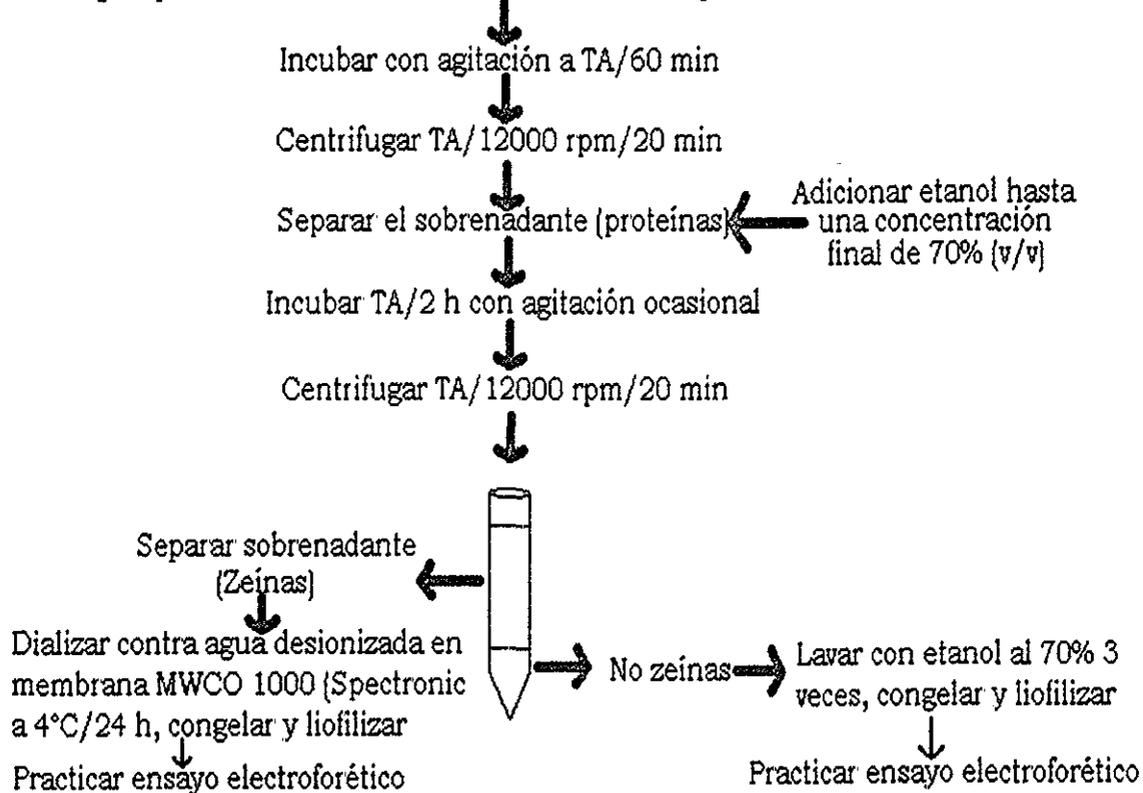


### **7.7 Extracción de zeínas bajo condiciones desnaturalizantes (Wallace y Lopes, 1990)**

Se extrajeron las zeínas del gluten nativo y del gluten desamidado, así como de las proteínas extraídas de las emulsiones de cada uno de ellos. El método se basa en la extracción de prácticamente todas las proteínas de maíz presentes utilizando amortiguador de boratos pH 10, SDS al 1% y BME como agente reductor. Esta extracción es seguida de la adición de etanol para tenerlo al 70% de volumen total. Este último paso precipita a las proteínas no zeínas, mientras que las zeínas permanecen en solución. Este método da una clara separación de las proteínas del maíz. El diagrama de extracción es el siguiente:

**Extracción de zeínas bajo condiciones desnaturalizantes**

200 mg de proteína + 2 mL de borato de Na 0.0125 M pH 10 con 1% SDS y 2% de BME



**7.8 Extracción de zeínas bajo condiciones nativas (Dickey y Dallmer , 1998)**

Con esta extracción se evita utilizar agentes desnaturalizantes y reductores, con la desventaja de que la manipulación de las zeínas extraídas resulta difícil por la insolubilidad y agregación que presentan en agua. Se extrajeron las zeínas de las muestras de gluten nativo y desamidado, así como de las proteínas extraídas de las emulsiones realizadas con cada uno de ellos. La extracción se realizó de la siguiente manera: se mezcló cada muestra con etanol al 70% en relación 1:4 (g proteína:vol de solvente) y se sometió a incubación (incubadora New Brunswick Scientific Modelo R76) a 60°C/150 rpm/2h. Posteriormente se centrifugó a 4°C/90 min/5000 rpm (Microcentrífuga Eppendorf), se separó el sobrenadante, fase en la que se encontraban las proteínas. Se realizaron 3 extracciones más al precipitado,

se juntaron los sobrenadantes de cada muestra y se concentraron en rotavapor, para posteriormente cuantificar proteína y realizar ensayo electroforético (Laemmli, 1970).

### **7.9 Evaluación de la estabilidad de emulsión de las zeínas.**

Se evaluó mediante la técnica de Dagorn *et al.* (1987) de la siguiente forma:

#### **7.9.1 Efecto del SDS**

Se prepararon emulsiones con las zeínas extraídas en bajo condiciones nativas, tanto del gluten nativo como del desamidado; para ello, se solubilizaron con SDS al 10% y se liofilizaron. Dicho liofilizado se utilizó para preparar soluciones al 0.1% de proteína (p/v) en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH7. y se evaluó la actividad emulsificante, tanto de las muestras nativas como de las solubilizadas en SDS. Se corrió un control libre de zeínas, que consistió en una solución al 0.1% de SDS (p/v) para verificar si el efecto emulsificante era debido a la acción de este detergente.

#### **7.9.2 Efecto del pH**

Se prepararon emulsiones al 1% de proteína (p/v) con pHs 4,6,7,8,9,10,11,12 (por duplicado) con las zeínas que se extrajeron bajo condiciones nativas del gluten nativo. Las soluciones amortiguadoras que se utilizaron fueron: amortiguador de citratos 0.1 M para los pHs 4 y 6, amortiguador de fosfatos 0.1M para el pH 7, amortiguador de Tris 0.1 M para los pHs 8 y 9, y finalmente, para los pHs 10-12 se utilizó un amortiguador de Glicina-NaOH 0.1 M.

#### **7.9.3 Efecto de la concentración de proteína**

Se prepararon emulsiones al 0.05, 0.1, 0.5, 0.7 y 1.0 % de proteína (p/v) a pH 10 con amortiguador de Glicina-NaOH 0.1M (por duplicado) con las zeínas que se extrajeron bajo condiciones nativas del gluten de maíz nativo.

## 8.- ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 8.1 Caracterización del gluten de maíz

#### 8.1.1 Homogenización de la materia prima

De acuerdo con Wu (2001), las propiedades emulsificantes del gluten de maíz mejoran si el tamaño de partícula es menor o igual a  $44 \mu\text{m}$ , por lo que se realizó el proceso de molienda. Antes del mismo, solo el  $48.95 \pm 0.13 \%$  de la muestra presentaba un tamaño de partícula menor a  $40 \mu\text{m}$  (Figura 8.1). El resultado de este procedimiento, fue que el tamaño de partícula del  $97.78 \pm 0.19 \%$  de la muestra fue menor o igual a  $40 \mu\text{m}$  (i. e., pasó a través del tamiz malla 40).

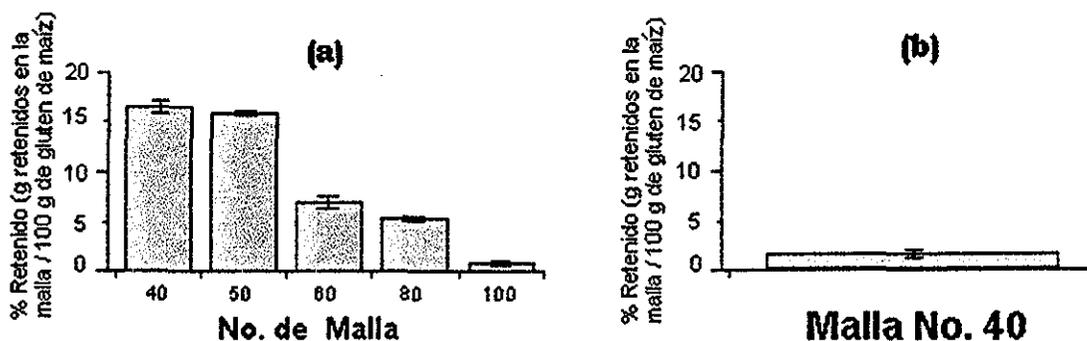


Figura 8.1 Granulometría del gluten de maíz a) antes de la molienda y b) después de la molienda.

#### 8.1.2 Composición proximal del gluten de maíz

En el cuadro 8.1 se muestra la composición proximal del gluten de maíz. El principal componente es la proteína, cuyo porcentaje se encuentra ligeramente por debajo del reportado por Neumann, (1984); Watson, (1987), Mannheim y Cheryan, (1992) y Wu, (2001) que varía entre 60 y 73%, sin embargo, concuerda con el reportado por Flores (1997).

Los carbohidratos constituyen la cuarta parte de la muestra, a pesar de que la misma proviene precisamente del proceso de extracción de almidón del maíz. El alto contenido de azúcares puede deberse a un remojo insuficiente del maíz con bisulfito de sodio y ácido láctico para liberar al almidón atrapado al romperse los gránulos de almidón durante el proceso de molienda. Si bien es cierto que muchos de los puentes disulfuro de la matriz proteica se rompen, este tratamiento no es suficiente para separar por completo las moléculas proteicas del polisacárido. Para liberar el remanente de almidón en la fracción proteica existen reportes (Guerrieri *et al*, 1997; Shih y Daigle, 1997) de utilización de enzimas amilolíticas como la  $\alpha$ -amilasa, la glucoamilasa y la glucosidasa para aumentar el rendimiento en la extracción de almidón y proteína, ya que el contenido del polímero en la fracción proteica resulta considerable.

**Cuadro 8.1.** Composición proximal del gluten de maíz

	% (g /100 g gluten de maíz)
Proteína	58.23±0.12
Carbohidratos	24.87±2.1
Humedad	8.20±0.2
Fibra	0.9*
Grasa	6.1*
Cenizas	1.7*

\*Análisis realizados por personal del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán.  
Los resultados presentados son el resultado del análisis por quintuplicado de las muestras.

El contenido de humedad confirmó lo especificado por el proveedor (Arancia Corn Products) en su certificado de análisis, el cual indica que la humedad no era mayor a 8.3%, por lo que se puede afirmar que tanto el almacenamiento como la manipulación que se hicieron del producto fueron adecuados. La humedad y pH ácido ( $3.9 \pm 0.01$ ) constituyeron

condiciones adecuadas para conservar los atributos de la muestra sin alteración alguna (Neumann, 1984). Cabe señalar que la determinación del pH del gluten de maíz resulta importante ya que este parámetro afecta los procesos de modificación de proteínas. El pH ácido es debido a que la molienda húmeda se realiza en condiciones ácidas.

En el cuadro 8.2 se presentan los datos de fibra, grasa y cenizas reportados por diversos autores. Tanto la fibra como las cenizas se encuentran dentro de los intervalos normales, sin embargo, el porcentaje de grasa es elevado. El alto contenido de grasa de la muestra pudo deberse a diferencias en el proceso de extracción de grasa en la molienda húmeda, ya que factores como la presión necesaria para lograr la extracción del aceite, los solventes utilizados como el hexano e incluso la maquinaria, son determinantes en la eficiencia de dicha extracción (Pomeranz, 1987)

**Cuadro 8.2** Contenido de fibra, grasa y cenizas de gluten de maíz<sup>abc</sup>(g/100 g de gluten )

Fibra	Grasa	Cenizas
* <sup>a</sup>	2-5.4 <sup>a</sup>	1.3-2.4 <sup>a</sup>
2.23 <sup>b</sup>	1.8 <sup>b</sup>	1.42 <sup>b</sup>
** <sup>c</sup>	6.7 <sup>b</sup>	1.3 <sup>c</sup>

a Wu, 2001

b Flores, 1997

c Neumann, 1984

\* No determinado

\*\* Por debajo del rango de detección

### **8.2.- Desamidación del gluten de maíz.**

El grado de amidación o nitrógeno amídico es una medida de los residuos de asparagina y glutamina de una proteína. Se ha demostrado que el grado de amidación de las proteínas tiene un efecto marcado sobre la solubilidad y las propiedades funcionales de las proteínas (Pearce y Kinsella, 1978).

El gluten de maíz nativo presentó  $24.98 \pm 0.04$  grados de amidación (gNitrógeno amídico / 100g proteína) que es elevado en comparación con el contenido de otras proteínas como las del frijol (1.52 grados de amidación), las del haba (1.29 grados de amidación) o la albúmina sérica bovina (0.80 grados de amidación) (Paredes y Guevara, 1988), y esto es debido al elevado contenido de glutamina (20.82 gGln/100g proteína) y de Asn (5.81 gAsn/100 g proteína) (Cuadro 3). El grado de amidación que se obtuvo después del proceso de desamidación fue de  $20.48 \pm 0.06$  (gN amídico / 100g proteína), esto quiere decir que desaparecieron 4.5 gN amídico / 100 g proteína, lo que correspondió a un grado de desamidación ( $^{\circ}$ GD) de  $18 \pm 0.9$ , valor que indica el porcentaje de nitrógeno amídico que fue removido por el tratamiento con HCl.

Los valores obtenidos mostraron que la mayor parte del nitrógeno amídico no se modificó. De acuerdo con Flores (1997), mayores  $^{\circ}$ GD de las proteínas del gluten de maíz traen como consecuencia porcentajes de hidrólisis proteica mayores al 4.5% con generación de sabores amargos e incrementos poco significativos en las propiedades emulsificantes.

### **8.3 Solubilidad de las proteínas del gluten nativo y del gluten desamidado en función del pH.**

El gluten de maíz es muy poco soluble en agua (Figura 8.2), lo cual es debido principalmente al elevado contenido de aminoácidos hidrofóbicos, quienes constituyen el 56.34% (cuadro 8.3). La mayor solubilidad se presenta en pHs alcalinos, mientras que a pHs ácidos es muy baja. El bajo contenido de aminoácidos básicos (4.79%) impide que la solubilidad en los pHs menores a 4-5 sea mayor. A partir de estos pHs la solubilidad empieza a incrementarse, ya que tanto la Hys, Lys y la Arg como el Glu y el Asp se encuentran cargados (protonados los primeros y desprotonados los segundos) lo cual les

permite interaccionar con el agua mediante interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno que llevan finalmente a la solubilización de las proteínas. La alta solubilidad a pHs alcalinos se debe a la presencia de un alto porcentaje de aminoácidos polares con carga negativa, principalmente de Ser y Thr (4.77 y 3.43%) y de los aminoácidos ácidos Glu y Asp (5.81 y 20.82%). La desprotonación de la Arg y la Hys (que sucede a los pHs de 12.5 y 6 respectivamente) no afecta visiblemente a la solubilidad, lo que implica que estos aminoácidos no juegan un papel significativo en la solubilización de las proteínas.

El perfil de solubilidad en función del pH de las proteínas del gluten de maíz coincide con el reportado por Flores (1997) para muestras de gluten de maíz nativo y desamidado y, en general, es muy similar al reportado para las zeínas, componentes mayoritarios del gluten de maíz, cuyos puntos isoeléctricos se encuentran entre 4 y 7 y cuya solubilidad aumenta a pHs mayores de 10 (Casella y Whitaker, 1990; Fu *et al.* 1999).

La desamidación facilita la solubilidad en agua debido al reemplazo de los grupos amida de la Gln y la Asn, que son poco polares, por los grupos ácidos del Glu y el Asp que son muy polares. Dicha modificación química duplicó, en promedio, la solubilidad de las proteínas del gluten de maíz. Esta conversión de grupos amida en ácidos es también la responsable del incremento en la habilidad de unir agua.

Los aminoácidos susceptibles a la desamidación constituyen una gran parte del total de aminoácidos y, como consecuencia de ello, la desamidación resulta una modificación adecuada para aumentar la carga negativa total de las proteínas y con esto aumentar su solubilidad, y como se puede ver en la gráfica, efectivamente dicha modificación duplicó en promedio la solubilidad de las proteínas del gluten de maíz.

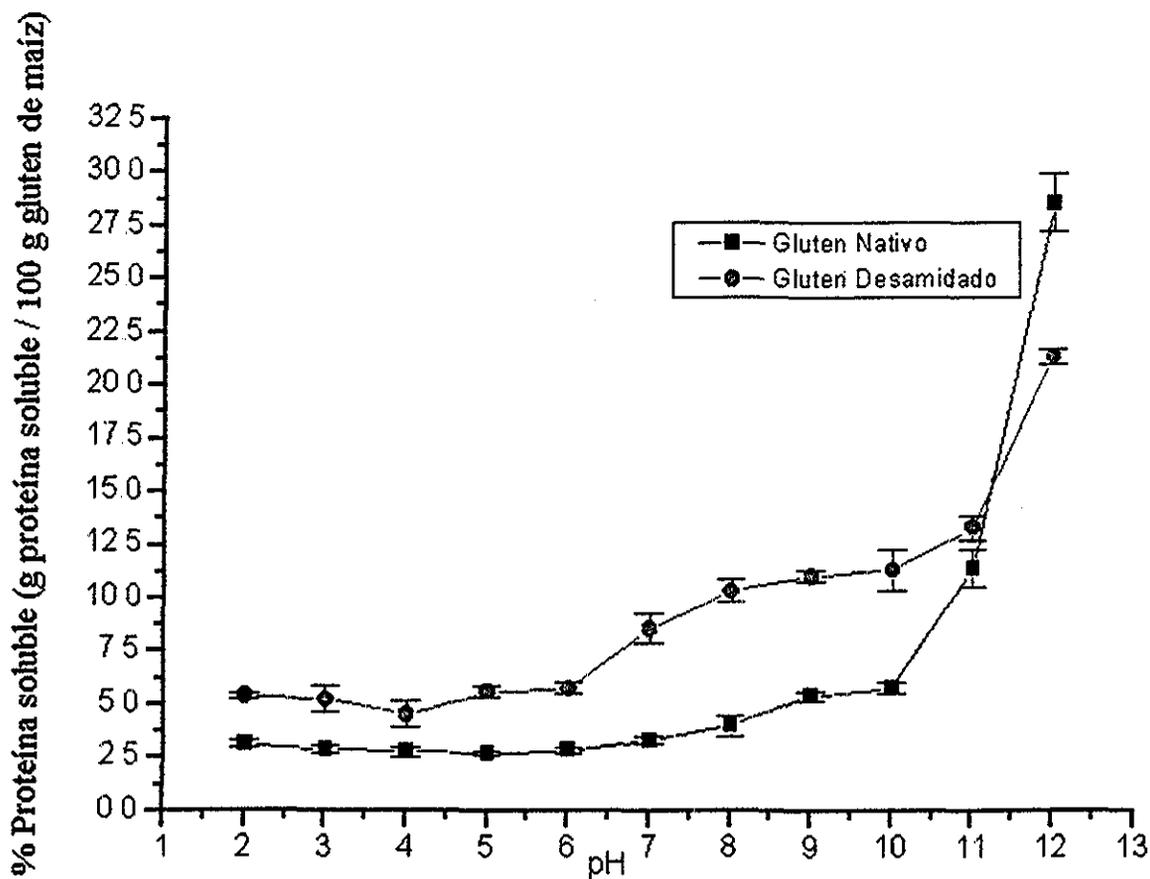


Figura 8.2. Solubilidad de las proteínas del gluten de maíz nativo y desamidado en función del pH. Suspensiones elaboradas al 1% de proteína. Determinación de la proteína soluble por el método de Lowry-SDS.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Cuadro 8.3.** Composición de aminoácidos del grano, endospermo y gluten de maíz <sup>abc</sup> (g aa /100 g proteína)

Aa	Grano de maíz	Endospermo	Gluten
Gly	4.23	3.20	3.36
Ala	8.62	8.10	8.36
Val	5.55	4.70	3.29
Leu	14.33	14.30	17.68
Ile	4.20	3.80	2.65
Pro	10.23	9.70	10.70
Phe	5.59	5.30	6.62
Trp	0.81	--	1.52
Met	2.19	2.80	2.06
Ser	5.70	5.20	4.77
Thr	4.12	3.50	3.43
Tyr	4.37	5.30	--
Cys	1.77	1.80	0.29
Asp	7.18	6.20	5.81
Glu	21.67	21.30	20.82
Lys	3.06	2.00	---
Arg	4.79	3.8	3.00
His	3.11	2.80	1.79

<sup>a</sup> FAO, 1970

<sup>b</sup> Mertz *et al.* 1996

<sup>c</sup> Laboratorio de análisis de aminoácidos del IBBM. Análisis realizado por HPLC de las derivatizaciones con OPA, 1997.

#### **8.4 Perfil electroforético de las proteínas solubles del gluten de maíz nativo y del desamidado en función del pH**

Se cargaron 500  $\mu\text{g}$  de proteína en cada carril (cámara de electroforesis Hoefer SE600 Serie S). En el cuadro 8.4 se pueden observar las concentraciones iniciales de proteína soluble, soluciones que fueron llevadas a una concentración final de 5000  $\mu\text{g/ml}$ . En general, para los pHs ácidos se requirió concentrar un mayor número de veces debido a que la concentración de proteína era muy baja

**Cuadro 8.4** Concentración inicial de las muestras de proteína soluble en función del pH que fueron utilizadas para determinación del perfil electroforético.

pH	[Proteína Inicial] ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Gluten Nativo	Gluten Desamidado
2	650	1100
3	600	1050
4	550	950
5	550	1150
6	600	1150
7	700	1800
8	800	2200
9	1100	2250
10	1200	2350
11	2300	2800
12	7800	4350

Se esperaba que las albúminas remanentes del proceso de extracción del almidón del maíz se solubilizaran durante la extracción con agua a diferentes pHs, sin embargo, ninguno de los pesos de las bandas que se obtuvieron en los perfiles electroforéticos del gluten de maíz corresponde a alguno de los reportados para albúminas de maíz (Figuras 8.3 y 8.4), lo cual

coincide con el hecho de que el gluten de maíz está prácticamente exento de albúminas (Wu, 2001).

Los pesos de las proteínas que se solubilizaron a los diferentes pHs coincidieron con los reportados para las siguientes proteínas:  $\alpha$ -zeínas de 19 y 22 kDa, que a su vez forman agregados de 66, 100-110 y 230 kDa (Watson, 1987; Fu *et al.* 1999),  $\beta$ -zeínas de 16 kDa,  $\gamma$ -zeínas de 14 kDa y  $\delta$ -zeínas de 10 kDa (Landry y Delhaye, 2001; Fu, 1999), glutelinas de 31 kDa (Landry y Moureaux, 1981; Romagnolo *et al.* 1994) y globulinas de 24 y 28 kDa (Dierks-Ventling, 1981; Romagnolo *et al.* 1994).

Las zeínas poseen un alto grado de hidrofobicidad, por lo que son prácticamente insolubles en agua. De acuerdo a su solubilidad y reductividad, se pueden dividir en cuatro clases:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  zeínas. Las más hidrofóbicas y abundantes son las  $\alpha$ -zeínas, las restantes tienen un mayor porcentaje de aminoácidos polares, lo que aumenta ligeramente su solubilidad en agua (Fu, 1999). En los perfiles de solubilidad obtenidos tanto para el gluten de maíz nativo como para el del desamidado, se observan bandas con pesos que coinciden con los de las diversas zeínas, pero dichas bandas son muy tenues a pesar del hecho de que las muestras se concentraron un gran número de veces, lo que indica su baja concentración en solución. Para ambas muestras de gluten, las bandas más intensas de este grupo de proteínas son las correspondientes a los agregados de 66, 110 y 230 kDa. Esta es una asociación característica de las unidades monoméricas mediante interacciones hidrofóbicas, que lleva a la formación de estructuras proteicas con núcleos hidrofóbicos y superficies cargadas que interactúan con el agua y permiten su solubilización, lo que las hace más estables al disminuir el área de superficie hidrofóbica que se encuentra expuesta al agua. Cabe mencionar que los agregados de zeínas se forman fácilmente en ambientes acuosos y son muy estables, por lo que se requieren condiciones drásticas de desnaturalización para romperlos (5-8 M de Urea, detergentes en altas concentraciones, agentes reductores etc.; Shukla *et al.* 2000). Las bandas de los agregados de 230 kDa son más intensas en los pHs de 2 a 7 en ambas muestras (nativa y desamidada); aunado esto al hecho de que la cantidad de agregados solubles es aproximadamente la misma en las dos muestras de gluten, se puede decir que la desamidación no afectó la solubilidad de los mismos, ya que posiblemente los aminoácidos que quedan expuestos hacia el solvente son básicos (Hys, Lys y Arg) y/o polares sin carga. A diferencia de estos agregados, los de 104 kDa aparecen en muy bajas concentraciones en

las soluciones de gluten nativo, principalmente en los pHs 7-9, y en bandas intensas y definidas en las soluciones de gluten desamidado desde los pHs 3-7, esto es, la desamidación incrementó su solubilidad, debido a un alto contenido de Gln y Asn en su superficie.

Los agregados de 66 kDa, al igual que los de 230 kDa, están solubles en ambas muestras, sin embargo, a diferencia de los segundos, los agregados de 66 kDa están presentes en todo el rango de pH, lo que indica un alto contenido de aminoácidos polares, con y sin carga en la superficie. En la superficie se encuentran pocas Gln y Asn, ya que la solubilidad del agregado no se incrementa con la desamidación. Este arreglo conformacional de las proteínas parecería ser el más estable de los tres que se presentan como agregados, ya que su solubilidad no se vería afectada por cambios drásticos de pH.

En cuanto a las unidades monoméricas de zeínas, las de 19 kDa se observan en los pHs ácidos y básicos mientras que las de 22 kDa sólo se encuentran solubles en los pHs básicos y en muy bajas concentraciones, lo que es congruente con el hecho de que son muy hidrofóbicas. Se observa un incremento de la solubilidad de estas proteínas después de la desamidación, lo que se debe a que estas proteínas son ricas en Gln y Asn que, al convertirse en Glu y Asp aumentan la carga negativa de la proteína, así como el número de interacciones con el agua, favoreciendo así la solubilización. Las bandas de 19 kDa aparecen en los pHs ácidos debido a que estas proteínas poseen un mayor contenido de aminoácidos básicos que las de 22 kDa, lo cual les permite estar cargadas en los pHs ácidos. Las  $\gamma$  y  $\delta$  de 16, 14 y 10 kDa presentan bandas muy tenues en prácticamente todo el rango de pH. La desamidación incrementó la solubilidad de ambas proteínas debido a su alto contenido de Gln.(16.9 y 13.4% respectivamente)

De acuerdo a los patrones reportados para globulinas, las bandas de 24 y 28 kDa corresponden a esta fracción (Landry y Moureaux, 1981; Dierks-Ventling, 1981; Romagnolo *et al.*, 1994) aunado a la posibilidad de que se hayan extraído debido a la utilización de agua destilada en presencia de sales. Ambas proteínas presentan el mismo comportamiento. Presentan mayor solubilidad en los pHs ácidos que en los básicos, debido a su alto contenido de Asp y Glu (8-15%; Wilson, 1983), lo que explica la mejora en solubilidad después de la desamidación. Su alto contenido de Lys (5.5%; Wilson, 1983)) les permite mantenerse solubles en pHs por arriba de 7.

Se observa una banda muy tenue, casi imperceptible, de 31 kDa en los pHs 3 y 4 del gluten nativo, correspondiente a una glutelina (Romagnolo *et al.*, 1994). A pesar de que las glutelinas conforman la segunda fracción más abundante del gluten de maíz, no aparecen de forma significativa en estos perfiles de solubilidad debido a que son altamente insolubles, pues forman una gran cantidad de puentes disulfuro intercatenarios e intracatenarios (Landry y Moureaux, 1981), y para ser extraídos requieren de la utilización de agentes reductores e incluso alquilantes (Wall y Paulis, 1978). La banda de 31 kDa corresponde a las glutelinas G1, que son las más abundantes. Tras la desamidación, esta proteína se insolubiliza, posiblemente debido a una desestabilización de la estructura causada por el aumento de la carga total de la proteína. De todo lo anterior se puede decir que en general, la solubilidad de las proteínas del gluten de maíz es muy baja. La desamidación mejora la solubilidad de las proteínas que previamente estaban solubles (esto es, aumenta su concentración en solución), mas no solubiliza las que se encontraban insolubles antes de la desamidación, es decir, no aparecen proteínas distintas a las que se encontraban en solución. En los pHs ácidos se encuentran solubles principalmente las globulinas, mientras que en los pHs alcalinos predominan las zeínas en solución.

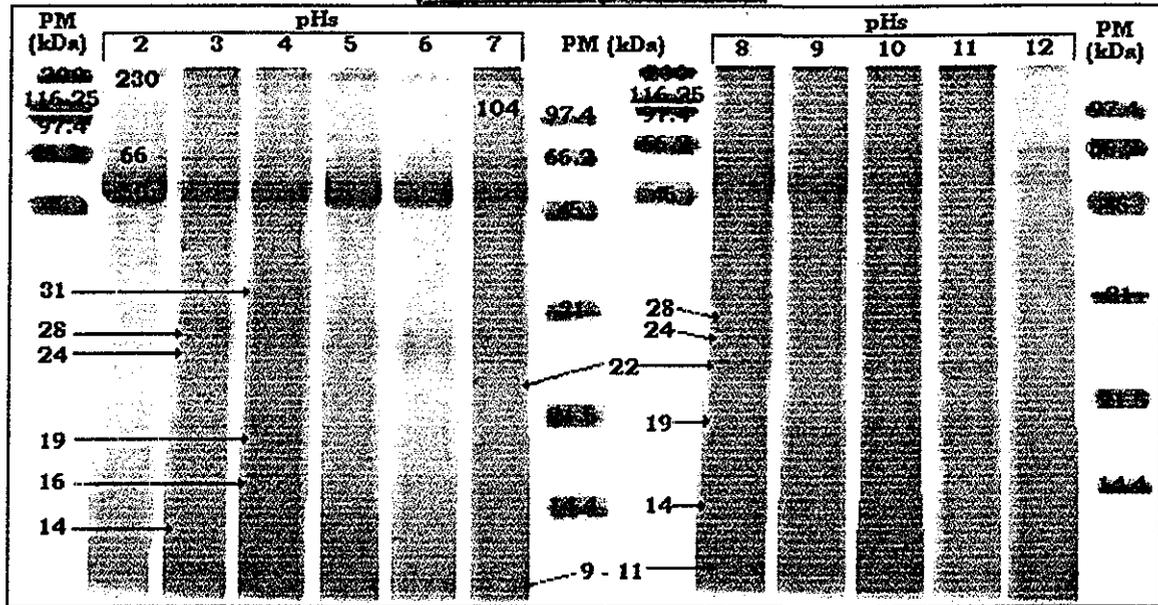


Figura 8.3. Perfil electroforético de las proteínas del gluten de maíz nativo solubles en función del pH. SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. La banda de 50kDa corresponde a la  $\alpha$ -amilasa utilizada para la hidrólisis del almidón. En los extremos de cada uno de los geles se encuentran los marcadores de peso molecular (Bio-Rad).

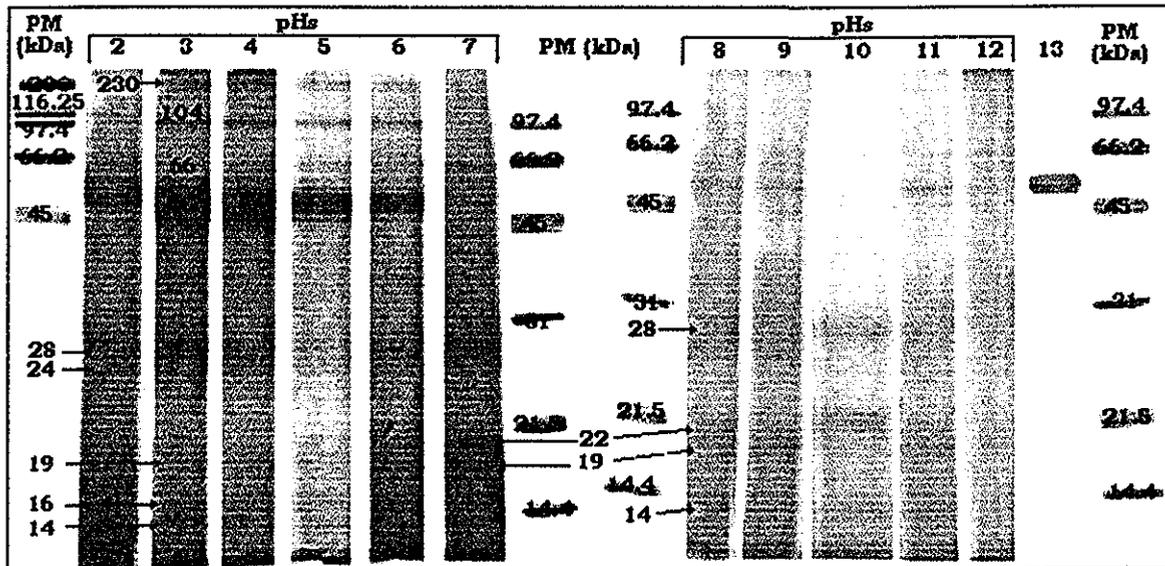


Figura 8.4. Perfil electroforético de las proteínas del gluten de maíz desamidado solubles en función del pH. SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie. El carril marcado con el número trece corresponde a la  $\alpha$ -amilasa de 50 kDa utilizada en la hidrólisis del almidón.

### **8.5 Evaluación de la Estabilidad de emulsión del gluten de maíz nativo y desamidado:**

Los resultados obtenidos del análisis proximal de la materia prima mostraron que los tres componentes principales del gluten de maíz (además del agua) son la proteína, los carbohidratos (almidón) y los lípidos. En el caso de los carbohidratos, lo cuales constituyen casi la cuarta parte de la muestra, fue importante conocer su efecto sobre la estabilidad de emulsión del gluten de maíz, para determinar si ésta era debida únicamente a la interacción proteína-proteína, o bien, a otras interacciones como lo son las proteína-polisacárido (carbohidrato). Además de estas interacciones, el almidón es un polímero que tiene la capacidad de gelatinizarse, lo que aumenta la viscosidad del medio y, de acuerdo a la ley de Stockes, se retardará la separación de las fases en una emulsión (Dickinson y McClements, 1995). Por esta razón, el almidón es utilizado como agente estabilizante en emulsiones alimenticias.

La grasa por su parte, al ser no polar, se unirá a las regiones hidrofóbicas de la proteína. Debido a que no se sabía si dicha interacción presente antes de la emulsificación interferiría en la estabilidad de emulsión de la proteína, se decidió evaluar su efecto.

Un aspecto que también se tomó en cuenta fue el efecto de la secuencia de procedimientos a realizar al gluten de maíz, por lo que se decidió probar la desamidación antes y después de hidrolizar el almidón y saber si la presencia del polímero interfería con la reacción. De acuerdo a esto se realizó la prueba de estabilidad de emulsión (Dagorn *et al.* 1987) a las muestras que fueron procesadas de acuerdo a las siguientes secuencias de procedimientos:

- 1.- Gluten Nativo sin ningún procedimiento posterior (N G+A+ )
- 2.- Gluten Nativo, extracción de aceite, sin hidrólisis del almidón (N G- A+)
- 3.- Gluten Nativo, extracción de aceite, hidrólisis del almidón (N G- A-)
- 4 - Desamidación sin extracción de aceite ni hidrólisis del almidón (D G+ A+)
- 5 - Desamidación, extracción de grasa, sin hidrólisis del almidón (D G- A+)
- 6.- Desamidación, extracción de grasa, hidrólisis del almidón (D G- A-)
- 7.- Extracción de grasa, hidrólisis del almidón, desamidación (G- A- D)

Se recomienda que un emulsificante sea adicionado en concentraciones menores al 10% (Egan *et al.* 1993). El mejor emulsificante es el que estabiliza emulsiones con la menor cantidad del mismo. De acuerdo a esto, el gluten de maíz puede considerarse como

emulsificante porque a una concentración de proteína del 7% (p/v) no se registró separación para la muestra nativa ni para la desamidada.

Para la muestra nativa, con el 5% (p/v) de proteína se logró emulsificar más del 90% del mismo y para la desamidada no se registró separación de aceite (Figura 8 5). La presencia de la grasa y el almidón no interfiere en la estabilidad de emulsión, por lo que se puede afirmar que la misma se debe principalmente a las interacciones proteína-proteína, que provocan los cambios estructurales necesarios para interactuar de manera adecuada con la fase oleosa en la interfase.

La desamidación mejoró notablemente la estabilidad de la emulsión de las proteínas del gluten de maíz, ya que se logró estabilizar a más del 90% de las emulsiones con solamente el 1% (p/v) de proteína.

Todas las muestras desamidadas presentaron grados de desamidación de 18, lo que indicó que los tratamientos realizados a las mismas no afectaron el proceso de desamidación. La muestra desamidada a la cual no se le extrajo la grasa ni se le hidrolizó el almidón fue la que presentó mejor estabilidad de emulsión. Lo mismo sucedió con la muestra de gluten nativo, sin embargo, como se puede ver en las tres muestras desamidadas restantes, el extraer la grasa y el almidón afecta un poco a dicha propiedad, lo que sugiere que el someter a la proteína del gluten de maíz a procesos de calentamiento, al contacto con solventes, etc., provoca cambios en las proteínas, que pueden ir desde cambios en la carga superficial de las proteínas hasta agregación y precipitación con formas multiméricas poco flexibles (Shukla *et al.* 2000), lo que trae como consecuencia que el balance superficial de cargas cambie y con ello sus propiedades emulsificantes.

De todo lo anterior se puede concluir que la estabilidad de emulsión del gluten de maíz se debe principalmente a las interacciones proteína-proteína, y que ésta mejora al someter dichas proteínas al proceso de desamidación debido a que aumenta la carga total de las proteínas y se dan interacciones como las electrostáticas y los puentes de hidrógeno con el agua que llevan a la formación de estructuras proteicas anfífilas capaces de actuar en la interfase aceite-agua.

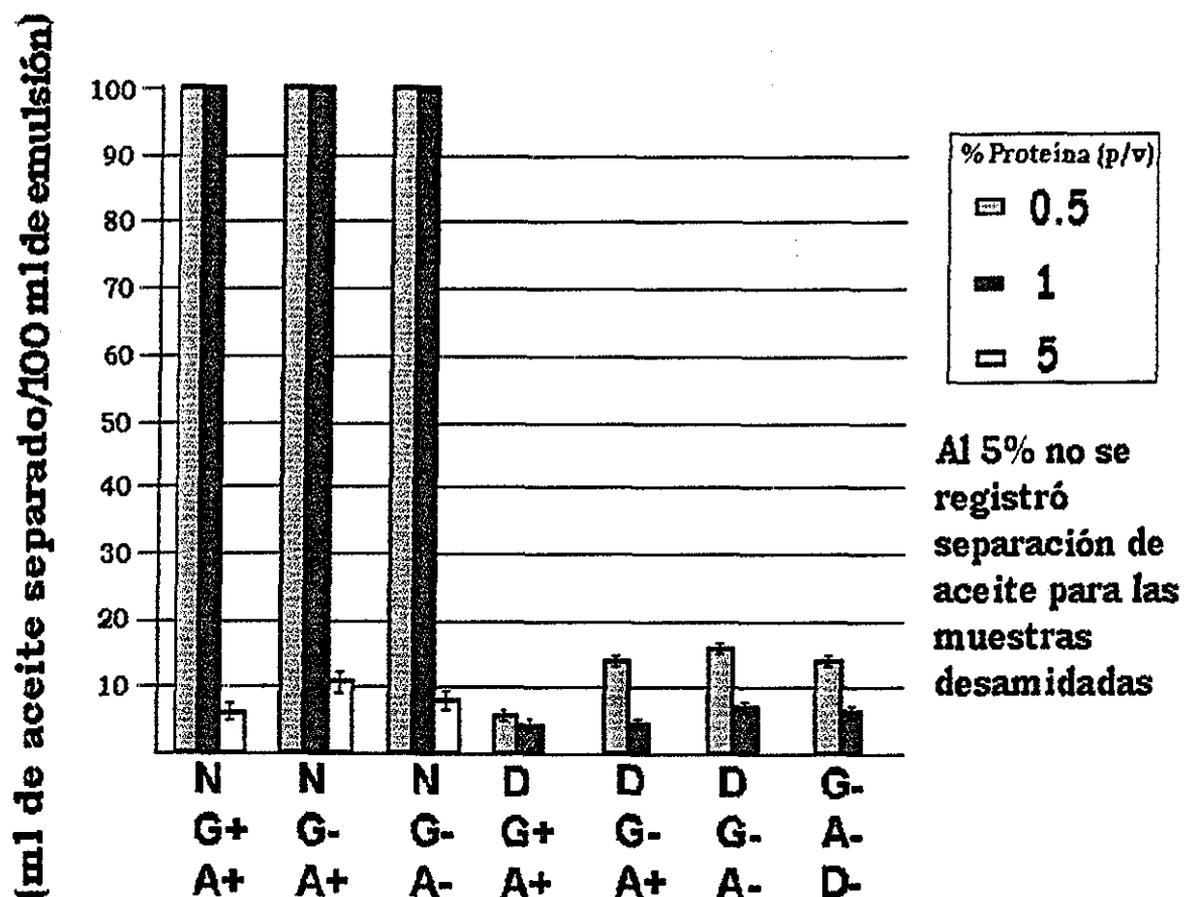


Figura 8.5. Estabilidad de emulsión de las muestras de gluten de maíz nativo y desamidado. N=Gluten de Maíz Nativo, D= Gluten de Maíz Desamidado, G+= Extracción de grasa, G-= Grasa no extraída, A+= Hidrólisis del almidón, A-= Almidón no hidrolizado. La secuencia de procedimientos se muestra en orden descendente. La emulsificación se realizó en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.

TESTIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **8.6 Extracción de las proteínas participantes en la emulsión:**

La extracción de las proteínas participante en las emulsiones elaboradas con gluten de maíz nativo y desamidado tuvo como finalidades principales:

- Identificar, de todo el conjunto de proteínas componentes del gluten de maíz, quienes son las principales participantes en emulsiones para posteriormente estudiar sus características y comprender su participación en las mismas
- Saber si la desamidación provoca la participación de proteínas distintas en la emulsión para con esto entender mejor la diferencia en poder emulsificante entre las dos muestras de gluten de maíz.

Se extrajeron las proteínas a partir de las emulsiones hechas con las muestras de gluten nativo y desamidado a las cuales no se les extrajo el aceite ni el almidón debido a que fueron las muestras que mejor estabilidad de emulsión presentaron. Se realizó la cuantificación de proteína total, carbohidratos, grasa y humedad (cuadro 8.5).

**Cuadro 8.5** Composición de los liofilizados obtenidos de la extracción de proteínas de la emulsión.

	% p/p (g / 100 g liofilizado)	
	Gluten Nativo	Gluten Desamidado
<b>Proteína Total (Método 977.09 AOAC)</b>	43.9 ± 0.2	44.27 ± 0.1
<b>Carbohidratos totales (Durbois <i>et al.</i> 1956)</b>	5.1 ± 0.1	4.54 ± 0.2
<b>Humedad (Termobalanza)</b>	25.7 ± 0.1	25.5 ± 0.1
<b>Grasa (Método 920.39 AOAC)</b>	1.4 ± 0.05	1.3 ± 0.07

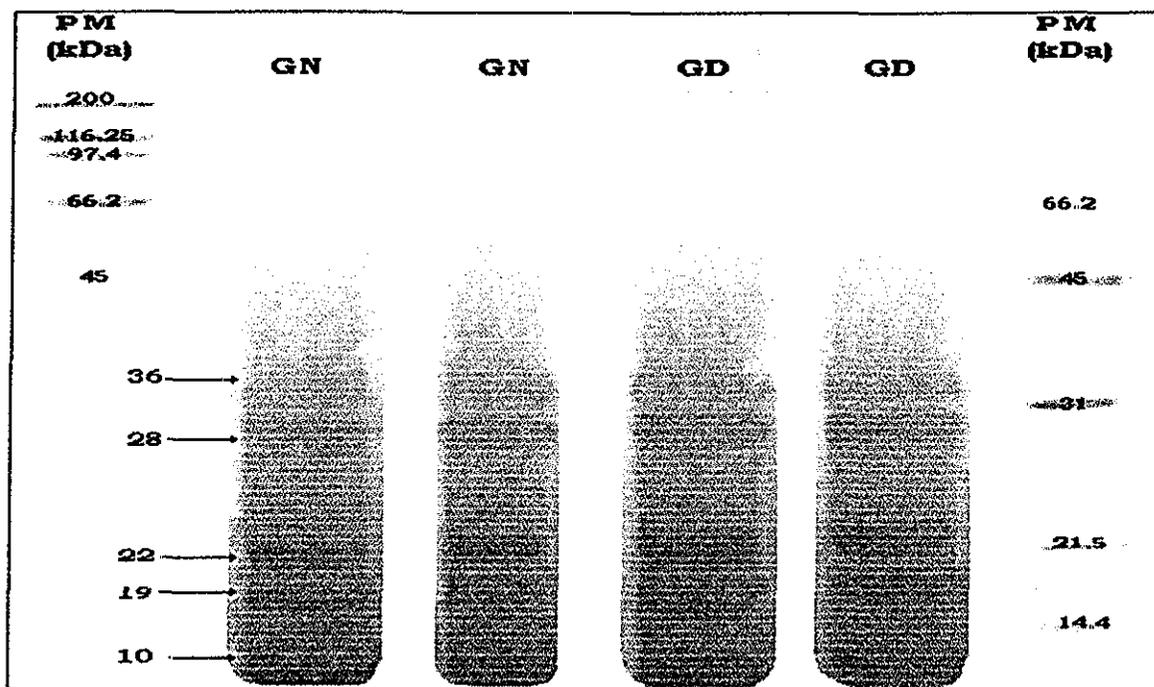
\*Los valores presentados son el resultado del análisis por quintuplicado de las muestras.

El perfil electroforético (Figura 8.6) no mostró diferencia en los patrones de las proteínas que se extrajeron de las dos emulsiones, lo que muestra que las proteínas participantes en las emulsiones elaboradas con el gluten nativo y el desamidado son las mismas. Esto sugiere que la diferencia en el poder emulsificante de las proteínas del gluten de maíz nativo y desamidado no radica en la participación de proteínas distintas, sino en diferencias entre las proteínas en ambas condiciones. Las responsables más probables son las

diferencias de carga, debido a que no cambia el peso molecular pero sí su comportamiento en la interfase de la emulsión.

La emulsificación es el resultado de la interacción de muchas proteínas, cada una de ellas con mayor o menor participación. La intensidad de las bandas se puede relacionar con la concentración en la que se encuentran en la emulsión. Existe la probabilidad de que la intensidad pueda correlacionarse con su grado de participación. Las bandas más intensas son las de 19 y 22 kDa, seguidas de las de 28,36 y 10 kDa. Para las dos primeras, los pesos corresponden a los de las  $\alpha$ -zeínas, la banda de 28 kDa puede corresponder a una globulina o a la  $\gamma$ -zeína de 27 kDa, pero no se pudo definir en este gel debido a que la banda no se definió adecuadamente; la banda de 36 kDa corresponde al peso reportado para una globulina (Dierks-Ventling, 1981) y la banda de 10 kDa puede corresponder al grupo de glutelinas de 9-11 kDa, a la  $\delta$ -zeína de 10 kDa, o bien, a productos de hidrólisis de proteínas.

No se obtuvieron bandas que correspondieran a pesos reportados para albúminas. Generalmente las proteínas solubles en agua poseen propiedades funcionales superiores para su aplicación en alimentos, sin embargo, existen reportes que muestran que las propiedades emulsificantes y la solubilidad no se relacionan tan directamente (Chove *et al.* 2001; Aoki *et al.* 1980; McWatters y Holmes, 1979). En este caso, tanto las zeínas como las globulinas y las glutelinas son proteínas insolubles en agua a pH 7 y sin embargo, los perfiles electroforéticos sugirieron que son las que participan en la emulsión.



**Figura 8.6.** Perfil electroforético de las proteínas extraídas de la emulsión. SDS-PAGE al 10%, teñido con azul de Coomasie. GN= Proteínas extraídas de la emulsión elaborada con gluten nativo; GD= Proteínas extraídas de la emulsión elaborada con gluten desamidado. 500 µg de proteína/carril En los carriles de los extremos se localizan los marcadores de peso molecular (Bio-Rad).

### 8.6.1 Solubilización en diferentes disolventes de las proteínas participantes en la emulsión (Shewry *et al.*, 1983)

Debido a que se determinó que las proteínas participantes en las emulsiones elaboradas con gluten nativo y gluten desamidado fueron las mismas, a continuación se trabajó con las proteínas extraídas de la emulsión del gluten desamidado debido a que se contaba con mayor cantidad de las mismas. Para identificar el grupo de pertenencia, la muestra de proteínas se solubilizó en los diferentes disolventes utilizados para caracterizar proteínas de acuerdo a su solubilidad (Shewry *et al.* 1983). Como se puede observar en el cuadro 8.6, en todas las condiciones de extracción se obtuvo más del 85% de solubilización. Esto, aunado al hecho de que no hay diferencias en el perfil electroforético (Figura 8.6) sugiere que la presencia del SDS remanente del proceso de extracción de las proteínas de la emulsión,

permitió que prácticamente todas se solubilizaran al encontrarse unido a ellas y favorecer las interacciones electrostáticas con los distintos disolventes como la formación de puentes de hidrógeno (Poon *et al.* 2001a; Sze-Tao, 2001).

**Cuadro 8.6.** Porcentaje de solubilización de las proteínas extraídas de la emulsión en las 4 condiciones de extracción.\*

Condiciones de extracción para:	% Solubilización (g de proteína soluble/100 g proteína de emulsión seca)
Albúminas	99.7 ±1.5
Globulinas	89.16±3.2
Prolaminas	86.42±3.5
Glutelinas	100±5.4

\*Los valores presentados son el resultado del análisis por triplicado.

\*\*Los solventes utilizados fueron agua desionizada pH 7, NaCl 0.5M, Propanol 50%-BME 2%-Ac.Acético 1% y amortiguador de boratos 0.05M pH 10 respectivamente.

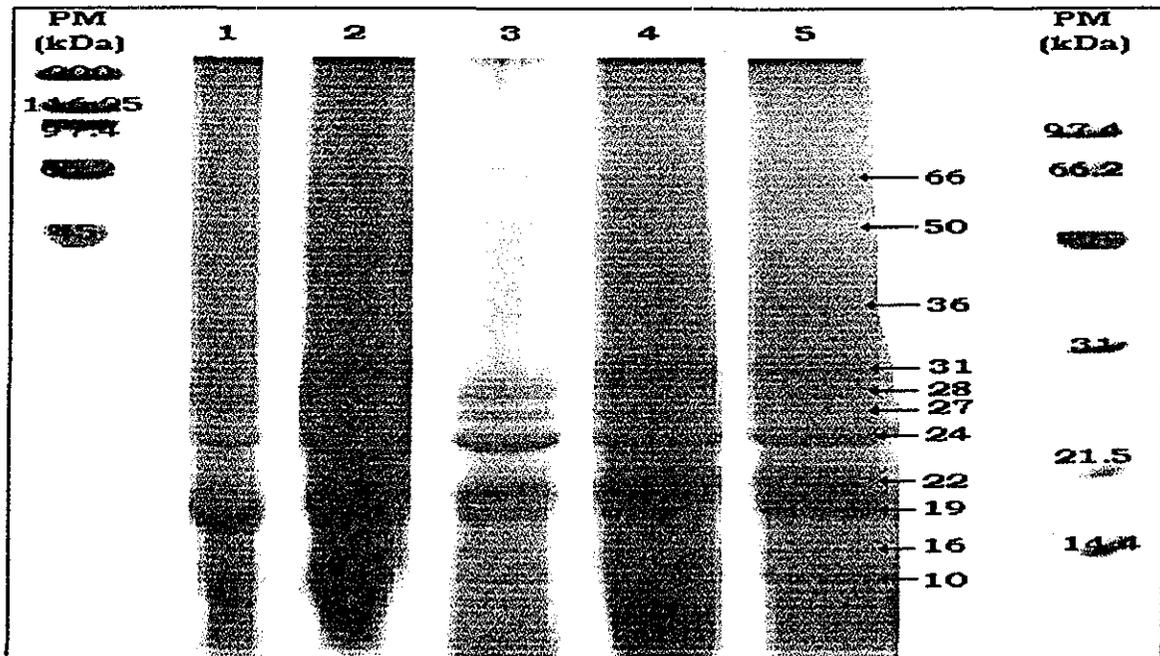


Figura 8.7. Perfil electroforético de las fracciones solubilizadas en diferentes disolventes a partir de las proteínas participantes en la emulsión elaborada con gluten desamidado. SDS-PAGE al 20% con 5M de urea teñido con azul de Comassie. 1.- Proteínas totales participantes en la emulsión; 2.- Solubilización bajo condiciones de Albúminas; 3.- Solubilización bajo condiciones de Globulinas; 4.- Solubilización bajo condiciones de Prolaminas; 5.- Solubilización bajo condiciones de Glutelinas. 500  $\mu$ g de proteína/carril En los carriles de los extremos se localizan los marcadores de peso molecular (Bio-Rad).

Esta caracterización no sirvió para ubicar en un grupo determinado a las proteínas participantes en la emulsión, sin embargo, permitió obtener un patrón de bandas mas definido. La muestra de proteínas de emulsión sin adición de ningún solvente continuó poco definida, con mucho barrido. La solubilización en agua tampoco mejoró la definición, pero si se logró una mejor definición con la utilización de sales, desnaturalizantes y agentes reductores Se definieron claramente 11 bandas, cuyos pesos corresponden a los reportados para:

- 66 kDa = Trímero de la  $\alpha$ -zeína de 22 kDa
- 50, 27 y 16 kDa =  $\gamma$  zeínas
- 36, 28 y 24 kDa = Globulinas

- 31 kDa = Glutelina
- 19 y 22 kDa =  $\alpha$ -zeínas
- 10 kDa =  $\delta$ -zeína

En total se definieron 11 bandas, de las cuales 7 presentaron pesos correspondientes a los de las zeínas, 3 a los de globulinas y 1 glutelina. En general, todos estos tipos de proteínas poseen características que posibilitarían su participación en emulsiones.

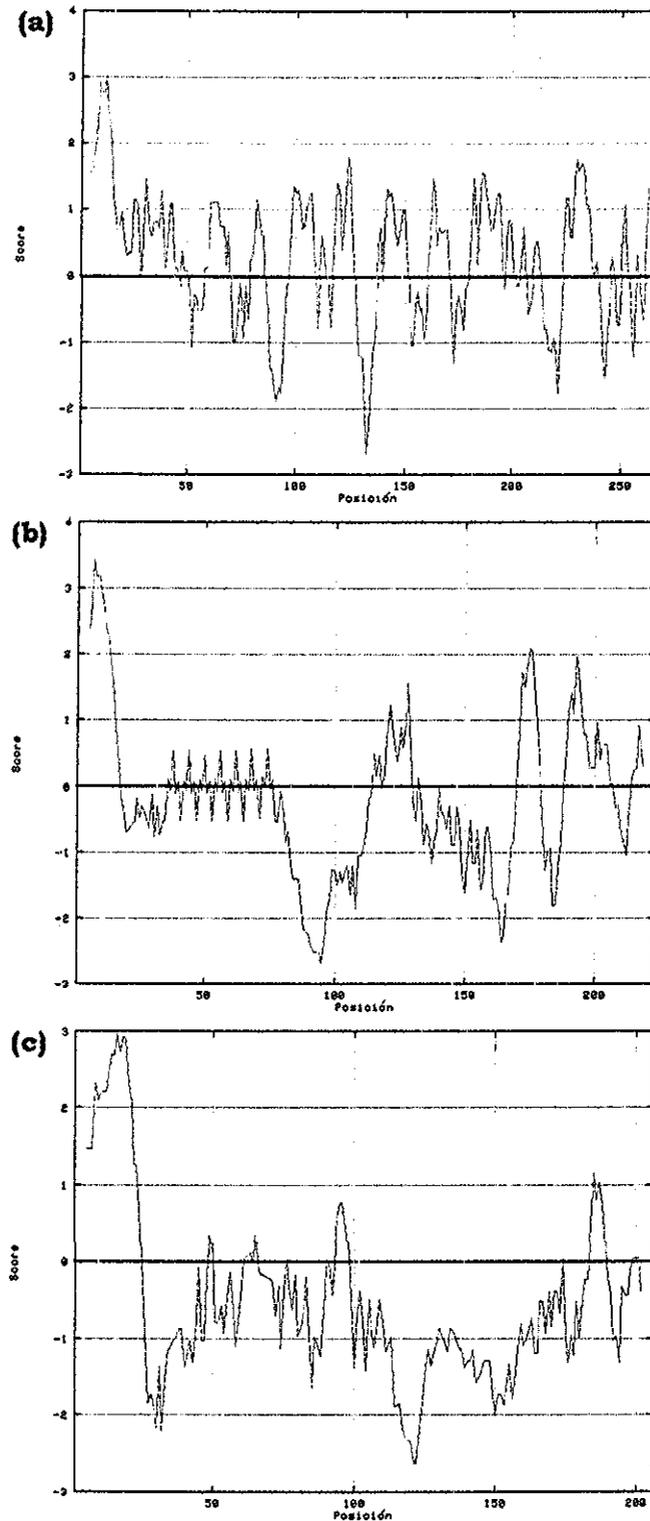
Las zeínas son ricas en aminoácidos hidrofóbicos, especialmente aminoácidos alifáticos como Lys, Ile y Ala. Poseen pocas cisteínas lo que les confiere gran flexibilidad al no formar puentes disulfuro tan fácilmente (Takahashi, 1995) y la desamidación mejora su solubilidad y capacidad emulsificante en los rangos de pH de 6-11. En general, todas las zeínas poseen grandes regiones hidrofóbicas, que pueden estar intercaladas con zonas hidrofílicas como sucede en las  $\alpha$ -zeínas (Figura 8.8 a), o estar claramente separadas entre sí, como sucede con las  $\beta$  y  $\gamma$ -zeínas. Las  $\alpha$ -zeínas poseen secuencias repetitivas de residuos en su estructura primaria que, posterior al estudio de su estructura secundaria mediante técnicas de dicroísmo, rotación óptica y dispersión óptica rotatoria (Gortner y MacDonald, 1944; Kretschmer, 1957; Danzer *et al.*, 1975; Wu *et al.*, 1983) se ha demostrado que forman  $\alpha$ -hélices consecutivas que constituyen el 50% del total de la estructura secundaria, con un 15% de láminas  $\beta$  (Fu, 1999). Esta característica es importante, ya que diversos estudios de proteínas con elevado contenido helicoidal (Krebs y Phillips, 1984; Chou *et al.*, 1997; Poon *et al.*, 2001b) coinciden en que esta característica es esencial en la emulsificación, por la naturaleza anfifílica de estas estructuras secundarias.

Las glutelinas por su parte, constituyen el segundo grupo de proteínas más abundante en el gluten de maíz. Para su extracción se requieren condiciones drásticas de solubilización como pHs muy alcalinos y detergentes. Poseen mucha Cys, por lo que forman una gran cantidad de puentes disulfuro, tanto intercatenarios como intracatenarios (Landry y Moureaux, 1981). Esta característica es desfavorable para un emulsificante, ya que disminuye su flexibilidad. Son ricas en prolina y aminoácidos alifáticos, pero pobres en Lys, Asp y Glu, lo que las hace demasiado hidrofóbicas. Debido a que poseen dominios repetitivos que forman hélices de poliprolinas (Rabanal, 1993) en el extremo N terminal (Figura 8.8 b), existe la posibilidad de que actúen como surfactantes si la carga del extremo

carboxilo logra crear un balance hidrofóbico-hidrofílico adecuado para participar en interfaces.

Es muy conocido el papel que tienen las globulinas de maíz como emulsificantes (Hung *et al.*, 1991; Wang y Zayas, 1992; Zayas, 1994). Estas se encuentran principalmente en el germen del grano, en contacto con los cuerpos lipídicos, poseen un elevado contenido de aminoácidos hidrofóbicos (Figura 8 8 c) y son ricas en Lys y Arg (Cross y Adams, 1983) lo que la hace muy buenos emulsificantes, a pesar de su alto grado de hidrofobicidad e insolubilidad en agua.

En general, el grupo de proteínas mayoritario participante en la emulsión es el de las zeínas, dentro del cual las proteínas de 19 y 22 kDa son las más intensas y por consiguiente, las más abundantes en la emulsión.



**Figura 8.8.** Perfiles de hidropaticidad de secuencias reportadas para proteínas de endospermo de maíz: (a)  $\alpha$ -zeína, (b) glutelina (c) globulina. Secuencias obtenidas del NCBI y analizadas por el programa ProtScale de acuerdo al método de Kyte y Doolittle (1982) (Ver escala de hidropaticidad en el Anexo II)

### **8.7 Extracción de zeínas bajo condiciones desnaturalizantes (Wallace y Lopes, 1990)**

Debido a que la mayoría de las proteínas identificadas por SDS-PAGE coincidió con los pesos reportados para zeínas, para confirmar su identidad se realizó la extracción de estas prolaminas según el método reportado por Wallace y Lopes (1990). Para comparar los patrones electroforéticos se extrajeron las zeínas tanto del gluten de maíz nativo como del desamidado, así como también de sus correspondientes proteínas de emulsión (Figura 8.9a). Nuevamente se extrajeron todas las proteínas presentes, a pesar de que el autor asegura que sí se logra una separación efectiva de las zeínas. Esto fue debido a que, como señalan Landry y Moureaux (1981), las glutelinas y algunas globulinas del maíz se extraen conjuntamente con las zeínas en presencia de SDS.

Nueve de las 11 bandas que se obtuvieron anteriormente volvieron a aparecer, pero con mayor definición. No se extrajo la proteína de 27 kDa, debido a que para solubilizarla se requiere utilizar soluciones alcohólicas salinas, comportamiento típico de la  $\gamma$ -zeína, lo que confirmó su identidad (Bean *et al.*, 2001).

Apareció además una banda de 44 kDa, que corresponde al dímero de la de 22 kDa y se definió la banda de 18 kDa correspondiente a una  $\beta$ -zeína que en el gel anterior se traslapó con la de 19 kDa. No se extrajo la globulina de 36 kDa, la cual requiere, según lo reportado por Romagnolo *et al.* (1994), una concentración de 0.1 M de NaCl para solubilizarse, lo que confirmó que la banda efectivamente correspondía a dicha globulina.

Las bandas de 31, 28 y 24 kDa se extrajeron junto con todas las zeínas. De acuerdo con Landry y Moureaux (1981), la glutelina de 31 kDa y algunas globulinas del maíz se extraen conjuntamente con las zeínas debido a que la composición de aminoácidos de muchos de sus segmentos es muy similar a la de las zeínas, por lo que para separarlas más eficientemente se requiere utilizar agentes alquilantes específicos. En la figura 8.9 b se presenta el gel con los remanentes de la extracción y se pueden distinguir las bandas de 36 y 27 kDa que no se solubilizaron, así como residuos de proteínas que sí se extrajeron, lo que indica que se debió hacer un mayor número de extracciones para la obtención completa de todas las proteínas.

Al comparar los perfiles de las proteínas que se extrajeron del gluten nativo y del gluten desamidado, no se observaron diferencias entre ellos, lo que apoya la hipótesis de la diferencia de carga y no de proteínas en el comportamiento como emulsificante. Tampoco

se observaron diferencias entre los patrones de las proteínas extraídas del gluten y de las participantes en la emulsión, por lo que, de acuerdo a esto, potencialmente todas las proteínas del gluten de maíz podrían participar en la emulsión. El que participen o no puede deberse a la diferencia en carga, las que tengan la carga necesaria para interactuar en la interfase podrán hacerlo, mientras que las que no la tengan, permanecerán en el precipitado.

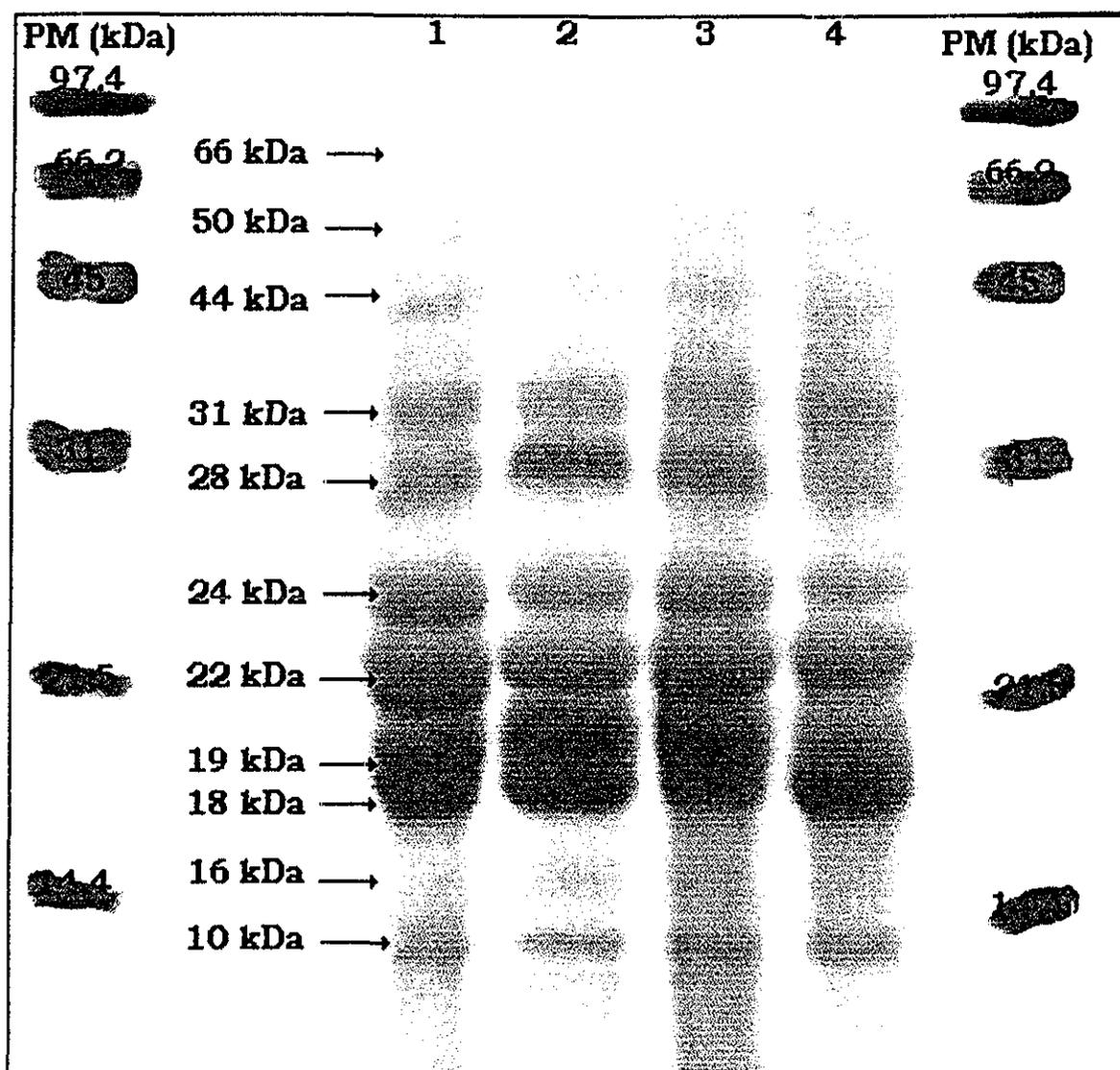
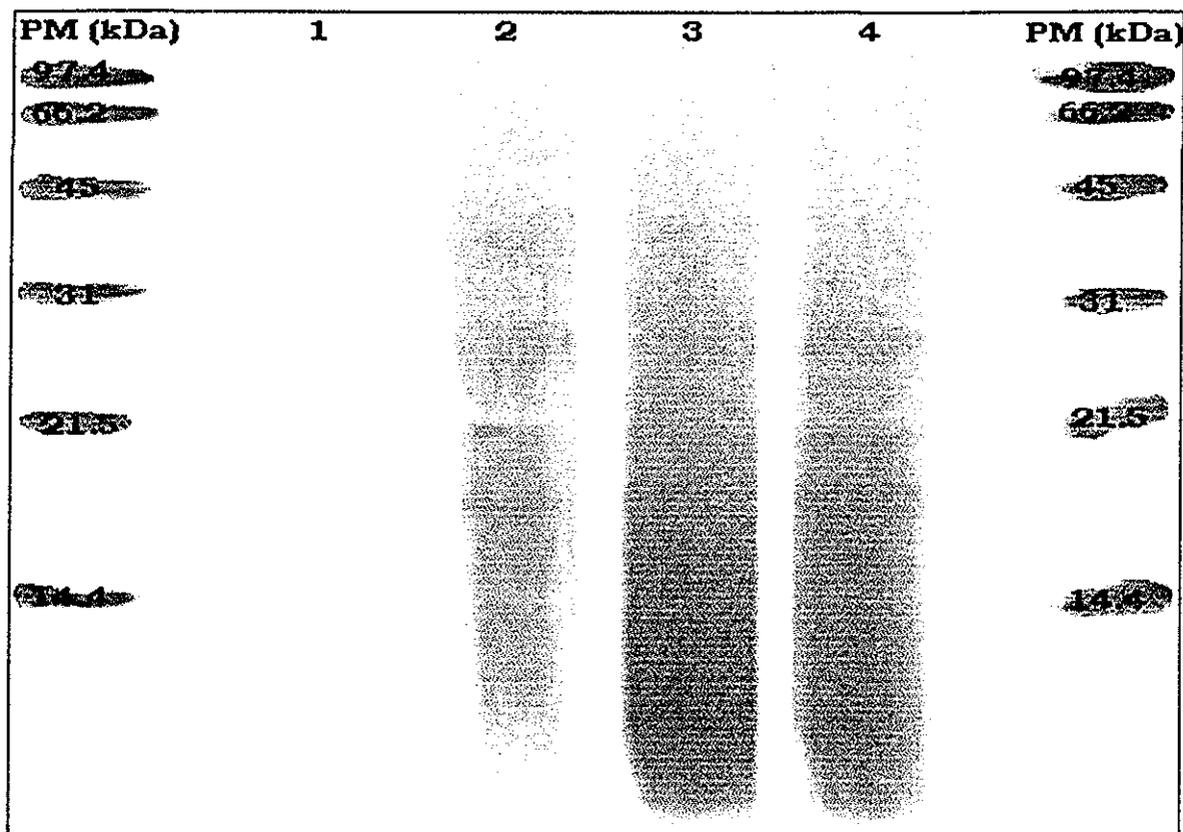


Figura 8.9a. Perfil electroforético de las proteínas extraídas según el método de extracción de zeínas bajo condiciones desnaturalizantes



**Figura 8.9b.** Corrimiento electroforético del remanente de la extracción de zeínas bajo condiciones desnaturalizantes

SDS-PAGE al 18% con 5 M de Urea teñido con azul de Comassie. R 250

**9a)** Extracciones y **9b)** Remanentes

1.-A partir de gluten nativo; 2.-A partir de las proteínas provenientes de la emulsión elaborada con gluten nativo; 3.- A partir de gluten desamidado; 4.- A partir de las proteínas provenientes de la emulsión elaborada con gluten desamidado. 500  $\mu\text{g}$ /carril. carril En los carriles de los extremos se localizan los marcadores de peso molecular (Bio-Rad).

### **8.8 Extracción de zeínas bajo condiciones nativas (Dickey y Dallmer , 1998)**

Para una identificación más específica de las zeínas, se realizó la extracción en ausencia de SDS, mediante el método reportado por Dickey y Dallmer (1998), tanto de la muestra de gluten nativo como de la del desamidado. Las zeínas extraídas en condiciones nativas son insolubles en agua debido a sus características termoplásticas e hidrofóbicas. Son altamente resistentes al aceite y al agua, en la cual forman películas, fibras (Takahashi, 1995) y agregados con textura chiclosa, por lo que su manipulación resulta difícil.

Debido a su insolubilidad en agua, las zeínas se disolvieron utilizando una mezcla de SDS al 10%, 2% de BME y Urea 5M, con calentamiento y agitación continuos, lo que permitió su análisis electroforético en geles al 20% de acrilamida con Urea 6M. Esta extracción resultó muy eficiente y específica para zeínas. Todas las zeínas reportadas están presentes en los perfiles electroforéticos obtenidos (Figura 8.10), excepto la  $\gamma$ -zeína de 27 kDa, la cual, como ya se mencionó anteriormente, requiere de NaCl para solubilizarse. No aparecieron las bandas de 36, 28 y 24 kDa correspondientes a las globulinas y la globulina de 31 kDa.

No se observó diferencia entre el patrón obtenido para el gluten nativo y el obtenido para el desamidado.

El análisis general de los datos obtenidos hasta este punto indica que en la emulsión participan tanto prolaminas, como globulinas y glutelinas, todas fracciones insolubles en agua a pH 7. Como ya se indicó anteriormente, la solubilidad es un factor determinante para que una proteína exhiba buenas propiedades emulsificantes, ya que al estar soluble, la proteína puede migrar más fácilmente a la interfase en la cual sus zonas hidrofóbicas e hidrofílicas se orientarán adecuadamente para estabilizar la emulsión. Sin embargo, en estudios realizados con diversas fracciones insolubles de emulsiones se ha visto que, efectivamente, dichas fracciones participan en la emulsión interaccionando con las fracciones solubles, ya que tienden a formar agregados que fortalecen la película interfacial y con esto, la emulsión incrementa su estabilidad (Linares *et al.*, 2000).

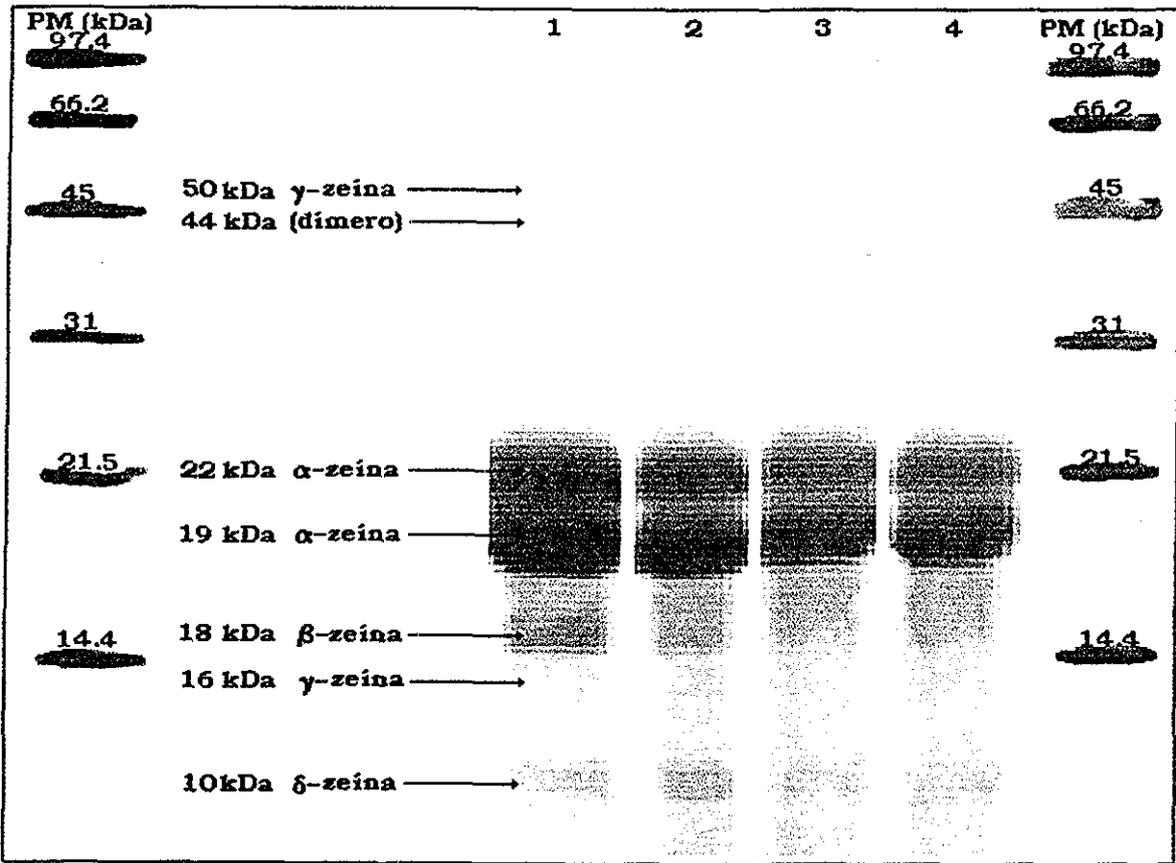


Figura 8.10. Perfil electroforético de las zeínas extraídas bajo condiciones nativas. SDS-PAGE al 20% con 5 M de Urea teñido con azul de Comassie. R 250. Extracción realizada a partir de: 1 y 2: gluten nativo3 y 4: gluten desamidado. 500 $\mu$ g/carril. En los carriles de los extremos se localizan los marcadores de peso molecular (Bio-Rad).

### 8.9 Evaluación de la estabilidad de emulsión de las zeínas

De acuerdo a los resultados obtenidos, el grupo de las zeínas es el que mayor participación tiene en la interfase, tanto en número como en concentración (intensidad de bandas) por lo que para saber si efectivamente estas prolaminas son las proteínas emulsificantes principales se evaluó su estabilidad de emulsión (Dagorn *et al.*, 1987).

### 8.9.1 Efecto del SDS

Estas proteínas adquieren una consistencia chiclosa a pH 7 en estado nativo, lo que evita la elaboración de emulsiones. Debido a esto, para evaluar la estabilidad de emulsión a este pH, así como para poder comparar con las emulsiones elaboradas con toda la muestra de gluten, las zeínas extraídas tanto del gluten nativo como del desamidado bajo condiciones nativas se solubilizaron con SDS al 10% y se liofilizaron. Dicho liofilizado se utilizó para preparar soluciones al 0.1% de proteína (p/v) en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7 y se evaluó la estabilidad de emulsión, tanto de las muestras nativas como de las solubilizadas en SDS. Los resultados se muestran en el cuadro 8.7.

**Cuadro 8.7.** Estabilidad de emulsión de zeínas extraídas de gluten nativo y desamidado en presencia y ausencia de SDS.

	% Aceite coalescido (ml aceite/100 mL de emulsión)	
	Sin SDS	Con SDS
Zeínas de Gluten Nativo*	100	11.58 ± 1.77
Zeínas de Gluten Desamidado*	100	14.93 ± 2.67
Solución de SDS**	-	0

\*Las soluciones se hicieron al 0.1% de proteína ( p/v ) en amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7

\*\*La solución de SDS se preparó con la cantidad promedio de SDS presente en la soluciones de zeínas, que fue del 1% (p/v).

En ausencia del detergente, las zeínas formaron un agregado chicloso que se adhirió al vástago del homogenizador o a las paredes y evitó la emulsificación. La asociación entre las mismas mediante interacciones hidrofóbicas está considerada como un factor limitante de su actividad emulsificante (Poon *et al.*, 2001a), en tanto que el tamaño relativamente grande de los dominios hidrofóbicos de estas proteínas parece ser el responsable de tales interacciones intermoleculares. Al solubilizar con SDS a estas prolaminas, se confirió una carga total negativa a las mismas. Éste es un detergente aniónico, que se pega a las mismas

y les confiere dicha carga. Este aumento de carga les permitió interactuar mejor con la fase acuosa, mejorar la flexibilidad de las proteínas y, con esto, mejorar su actividad emulsificante (Poon *et al.*, 2001a; Sze-Tao, 2001). Debido a que tanto a las zeínas provenientes del gluten nativo como a las del desamidado se les confirió una gran carga negativa, la diferencia en poder emulsificante entre ellas fue muy pequeña, lo que confirma la hipótesis anteriormente formulada de que la desamidación mejora la actividad emulsificante debido a que aumenta la carga negativa.

### 8.9.2 Efecto del pH

Para confirmar el efecto de la carga en la actividad emulsificante de la zeínas sin utilizar el detergente aniónico, se evaluó la estabilidad de emulsión en función del pH (Figura 8.11)

Para los pHs 4 a 7 la separación de aceite fue del 100%, a partir del pH 8 se empezó a tener actividad emulsificante, con un  $98.58 \pm 13.24\%$  de aceite separado, a pH 9 aumentó a un  $84.08 \pm 8.06\%$  de aceite separado y a partir de pH 10 se emulsificó el 100% del aceite en las emulsiones. A medida que las proteínas adquirieron una mayor carga negativa, su estabilidad de emulsión mejoró, al pH 12, toda la proteína participó en la emulsión, ya que no se observó precipitado alguno.

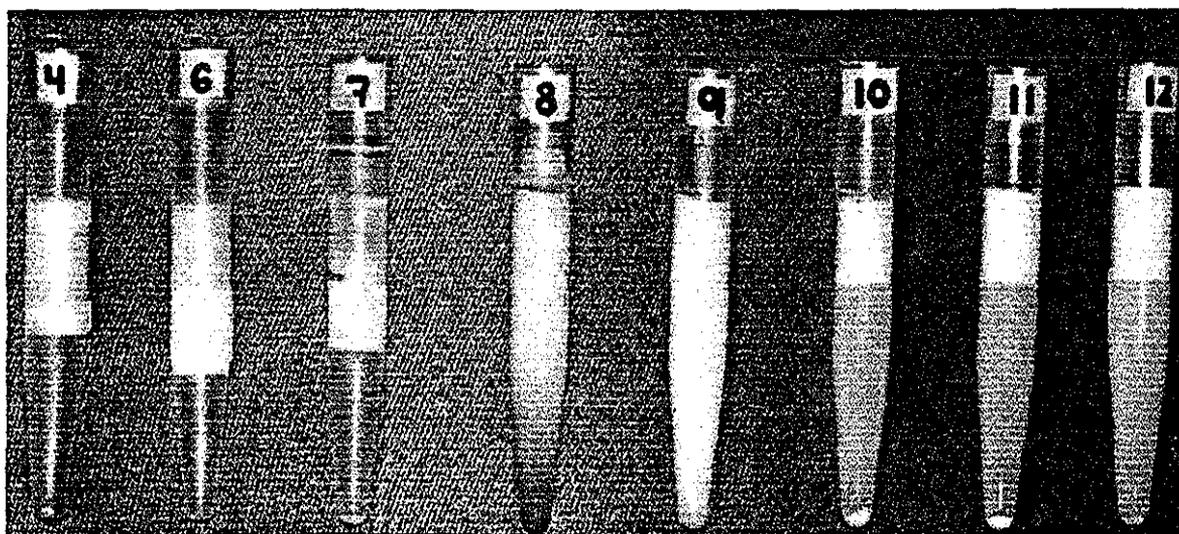


Figura 8.11. Estabilidad de emulsión de las zeínas en función del pH. Emulsiones elaboradas con soluciones de proteína al 1% (p/v) con los siguientes amortiguadores: pHs 4 y 6 con citratos 0.1M, pH 7 con fosfatos 0.1 M, pHs 8 y 9 con Tris 0.1 M y pHs 10-12 con NaOH-Glicina 0.1 M. Los números en la parte superior de los tubos indican los pHs de las emulsiones.

### 8.9.3 Efecto de la concentración de proteína

Lo anterior confirmó el poder emulsificante de las zeínas, pero, como se mencionó inicialmente, la cantidad que se utiliza de un emulsificante es un factor muy importante. Por ello se determinó la cantidad mínima necesaria de zeínas requerida para emulsificar el 100% del aceite de una emulsión; se evaluó la estabilidad de emulsión de estas proteínas en función de su concentración (% p/v) en un rango de 0.05-1%. Las emulsiones se realizaron a partir de soluciones con pH 10, que fue el pH a partir del cual se observó el 100% de emulsificación (Figura 8.12). Al 0.05% de proteína se separó todo el aceite, al duplicar la concentración, el aceite coalescido disminuyó hasta un 22.17%, y a partir del 0.5% de proteína, no se observó separación de fases. Los resultados indicaron que sólo una fracción del total de proteína que se puso, fue superficialmente activa, por lo que al incrementar la concentración, aumenta la cantidad de proteínas cargadas y mejora la estabilidad de emulsión. Las zeínas, al utilizarse al 0.5% de proteína (p/v) pueden considerarse como buenas emulsificantes.

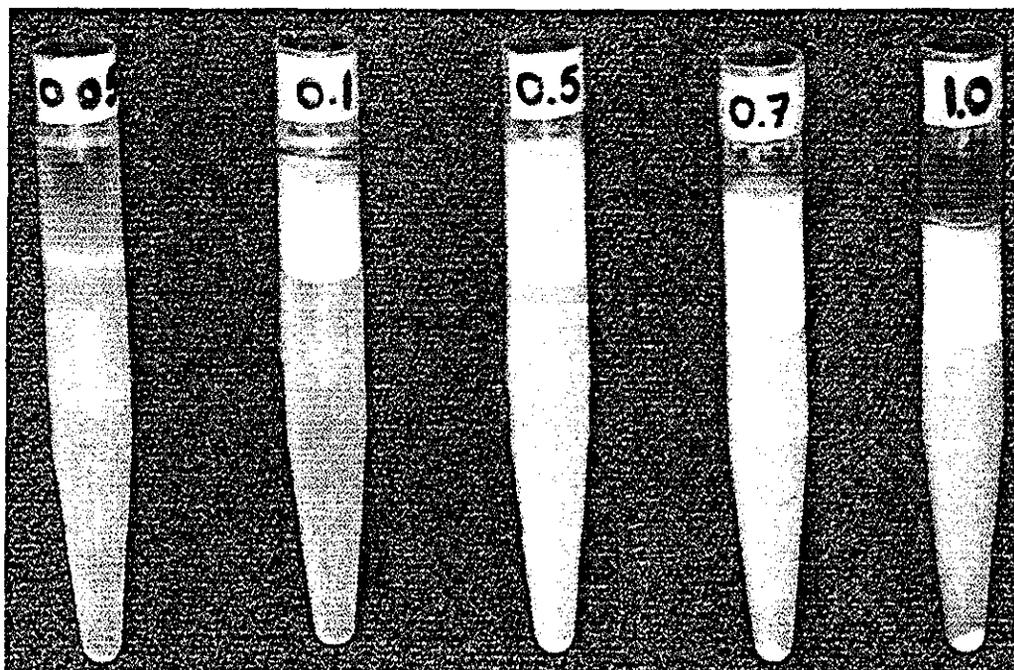


Figura 8.12. Estabilidad de emulsión de las zeínas en función de la concentración de proteína. Emulsiones elaboradas con soluciones de proteína del 0.05 al 1% (p/v) con amortiguador de NaOH-Glicina 0.1 M.0.1 M pH 10. Los números en la parte superior de los tubos indican las concentraciones de proteína (% p/v) de las emulsiones.

Con base en todo lo anterior, tanto el gluten de maíz como, en particular las zeínas, pueden ser considerados como alternativas de concentrados proteicos de origen vegetal. Se requiere profundizar en su investigación para lograr mejorar sus propiedades emulsificantes a un grado tal que puedan competir con aislados ampliamente utilizados en la actualidad en la industria alimentaria como lo son los de la soya, cuya solubilidad y características emulsificantes a pHs ácidos y neutros (Damodaran y Paraf, 1997) es mayor en comparación con la que presentan el gluten de maíz y las zeínas. Sin embargo, estos últimos presentan diversas ventajas como lo es, por ejemplo, en el aspecto toxicológico, la ausencia de factores alergénicos o tóxicos; en el aspecto económico, el bajo costo y la disponibilidad de la materia prima.

## 9.- CONCLUSIONES

➤ El componente mayoritario del gluten de maíz es la proteína ( $58.23 \pm 0.12\%$ ) lo que permite considerarlo como un concentrado proteico. El contenido de carbohidratos es alto ( $25.77 \pm 2.1\%$ ) debido a remanentes de almidón durante el proceso de extracción del polisacárido del grano. La baja humedad del producto ( $8.20 \pm 0.2\%$ ), aunada al pH ácido ( $3.9 \pm 0.01$ ) y un almacenamiento adecuado permiten que el gluten de maíz conserve sus atributos sin alteraciones. El contenido de cenizas (1.7%) y fibra (0.9%) es bajo debido a que durante el proceso de extracción se remueve casi por completo el pericarpio del grano. El contenido de grasa (6.1%) es alto si se considera que el proceso de extracción tiene como una de las finalidades primordiales la extracción del aceite.

➤ Las proteínas del gluten de maíz poseen baja solubilidad en agua a pHs menores a pH 7 ( $< 3.28 \pm 0.17$  g proteína soluble/100 g de gluten de maíz) en el cual estabilizan el  $94.08 \pm 2.16\%$  del aceite en emulsiones elaboradas al 5% de proteína.

➤ Las proteínas del gluten de maíz con 18 grados de desamidación aumentaron su solubilidad en un 100%, en promedio, todo el rango de pH evaluado, debido a que el aumento del carácter polar negativo permite mayor interacción con el agua. Esta desamidación también mejoró la estabilidad de emulsión a pH 7 ( $95.9 \pm 0.47\%$  de aceite emulsificado) en emulsiones elaboradas al 1% de proteína. Esta modificación no favoreció la participación de proteínas distintas en la emulsión, a las que se encontraron en la emulsión elaborada con el gluten no modificado, sino que aumentó su concentración mediante el aumento de la carga total negativa.

➤ Las proteínas que participan en la emulsión son 11, de las cuales el grupo mayoritario es el de las zeínas (prolaminas) con las  $\gamma$ -zeínas de 50, 27, 16 y 10 kDa, las  $\alpha$ -zeínas de 22 y 19 kDa y la  $\beta$ -zeína de 18 kDa. El grupo de las globulinas es el segundo en abundancia con las proteínas de 36, 28 y 24 kDa. La proteína de 31 kDa es la única glutelina participante en la emulsión. Todos los grupos de proteínas participantes son insolubles en agua a pH 7 y poseen amplias regiones con elevada hidrofobicidad.

➤ Las zeínas extraídas en condiciones nativas con pesos moleculares de 50, 22, 19, 18, 16 y 10 kDa son insolubles en agua en la cual adoptan un estado de agregación con características de “chicle” debido a su alto grado de hidrofobicidad. Cuando las zeínas son disueltas en Dodecil Sulfato de Sodio que las solubiliza y les confiere carga negativa, la estabilidad de emulsión a pH 7 es en promedio del 86.74% con 0.1% de zeínas. El aumento de carga negativa expresado como aumento de pH provoca en estas proteínas una mejora en sus propiedades emulsificantes, puesto que se logra un 100% de aceite emulsificado en emulsiones elaboradas al 1% de zeínas de pHs 10 a 12.

➤ Las zeínas pueden considerarse buenos emulsificantes, ya que se pueden utilizar en bajas concentraciones (0.5% de proteína) cuando están cargadas negativamente para estabilizar emulsiones al 100%.

## 10.- BIBLIOGRAFÍA:

- ♦ American Association of Cereal Chemists. (1995). Approved Methods of the AACC, 16<sup>th</sup> ed. Arlington, VA. Métodos 920.39, 923.03, 977.14, 926.09 y 943.02
- ♦ Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Sci.* **96**: 223-230.
- ♦ Aoki, E., Taneyama, O. e Inami, M. J (1980). Emulsifying properties of soy protein: characteristics of 7S and 11S proteins. *J. Food Sci.* **45**:534-538.
- ♦ Arntfield, A. y Murray, A. (1981). Determination of amide nitrogen in plant proteins using an ammonia electrode. *Can. Ins. Food Sci. Technol. J.* **14**(3):227-229.
- ♦ Bean, S. R., Hicks, C., Tuinstra, M. y Lookhart, G. L. (2001) Use of SDS to extract sorghum and maize proteins for free zone capillary electrophoresis (FZCE) analysis. *Cereal Chem.* **78**(1):84-87.
- ♦ Casella, M. L. A. y Whitaker, J. R. (1990). Enzymatically and chemically modified zein for improvement of functional properties. *J. Food Biochem.* **14**:453-475.
- ♦ Chávez, M. M., Hernández, M. y Roldán, J. M. (1992). "Tablas de uso práctico del valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en México". 2<sup>a</sup> Edición. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. México. pp 1A y 1B
- ♦ Chou, K., Zhang, C. y Maggiora, G. (1997). Disposition of amphiphilic helices in heteropolar environments. *PROT.:Struct., Func. Gen.* **28**:99-108.
- ♦ Chove, B. E., Grandison, A. S. y Lewis, M. J.(2001). Emulsifying properties of soy protein isolate fractions obtained by isoelectric precipitation. *J. Sci. Food Agric.* **81**:759-763.
- ♦ Creighton, I. E. (1997). "PROTEINS: Structures and Molecular Properties". 2a. Edición. W. H. Freeman and Company, Nueva York. pp 172-183.
- ♦ Cross, H. y Adams, W. (1983) Embryo-specific globulins from *Zea mays* L. and their subunit composition. *J. Agric. Food Chem.* **31**:534-538.
- ♦ Dagorn, S. C., Gueguen, J. y Lefebvre, J. (1987) Emulsifying properties of *Pea Globulins* as related to their adsorption behaviors. *J. Food Sci.* **52**(2):335-341

- ♦ Damodaran, S. y Paraf, A. (1997). Food proteins and their applications Marcel Dekker, Inc , Nueva York, USA; pp. 11-16, 373-374.
- ♦ Danzer, L. A., Ads, H. y Rees, E. D (1975) The helical content of zein, a water insoluble protein, in non-aqueous solvents. *Bioch. Biophys. Acta.* **386**:26-31.
- ♦ Dickey, L. C. y Dallmer M. (1998). Zein batch extraction from dry-milled corn: cereal desintegration by dissolving fluid shear. *Cereal Chem* **75**(4):443-448
- ♦ Dickinson, E. y Stainsby, G (1982) Colloids in Food, *Applied Science*, Londres.
- ♦ Dickinson, E. y Stainsby, G. (1985) Emulsion stability. *Advances in Food Emulsions and Foams*, Elsevier Applied Science, Nueva York. p 1.
- ♦ Dickinson E y McClements D J (1992). "Advances in Food Colloids". Ed. Blackie Academic & Professional, Gran Bretaña; pp 27-40
- ♦ Dickinson, E. y McClements D. J. (1995). "Advances in Food Colloids". Ed. Chapman & Hall, Londres, pp 50-64
- ♦ Dierks-Ventling, C. (1981) Storage proteins in *Zea mays* (L.): Interrelationship of albumins, globulins and zeins in the Opaque-2 mutation. *Eur. J. Biochem.* **120**:177-182.
- ♦ Dixon, R. P. y Sternberg, M (1979). Corn protein concentrate: functional and nutritional properties. *J. Food Sci.* **44**:1152-1155.
- ♦ Durbois, M, Giles, K, Hamilton, J. y Rebers, P. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
- ♦ Egan, H., Kirk, R. S. y Sawyer, R. (1993) "Análisis Químico de Alimentos de Pearson". Compañía Editorial Continental, Zaragoza, España; pp 527.
- ♦ FAO. (1970) Contenido de aminoácidos de los alimentos y datos biológicos sobre las proteínas. Servicio de Ciencia y Política de la Alimentación, Dirección de Nutrición. Roma.
- ♦ Fennema, O. R. (1993). Química de Alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, España; 1095 páginas.
- ♦ Flores, A. I. (1997). Modificación enzimática y química del gluten de maíz: Posibilidades de utilización en la industria alimentaria. Tesis de Maestría en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM. pp 48

- ♦ Fu, D., Curtis, L y Wehling L. R. (1999). Zein: Properties, Preparations and Applications. *Food Sci. Biotechnol.* **8**(1):1-10.
- ♦ Gomez, M. H., Serna-Saldívar, S. O., Corujo, J. Y., Bockholt, A. J., Rooney, L. W. (1992). "Wet milling properties of quality protein maize and regular corns. *Quality Protein Maize*", The American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, EUA. pp 239-260.
- ♦ Gortner, R. A. y MacDonald, R. I. (1990). Studies on the fractionation of zein. *Cereal Chem.* **21**:324-333.
- ♦ Guerrieri, N., Eynard, L., Lavelli, V y Cerletti, P. (1997). Interactions of protein and starch studied through amiloglucosidase actino. *Cereal Chem.* **74**(6):846-850.
- ♦ Hall G. M. (1999). "Methods of Testing Protein Functionality". Edit. Blackie Academic & Professional Norwich, Reino Unido. pp.150-169, 170-178, 206-210, 227.
- ♦ Hamada, J. S. (1991). Peptidoglutaminase deamidation of proteins for improved food use. *J. Am. Oil Chemist's Soc.* **68**:459-462.
- ♦ Hettiarachy N. S. y Ziegler G. R. (1994). "Protein Functionality in Food Systems" IFT basic symposium series. Edit. Marcel Dekker. Nueva York, pp 4-9
- ♦ Hung, S. C. y Zayas, F. (1991). Emulsifying capacity and emulsion stability of milk proteins and corn germ protein flour. *J. Food Sci.* **56**(5):1216-1223.
- ♦ James, C., Paulis J. W., Wall, J. S. y Anderson, R. A. (1969). Effect of sulfur dioxide steeping on structure of glutelin from normal and high-lysine corn. Abstr. 153. *Cereal Sci. Today.* **14**:108-111
- ♦ Karplus, M., y McCammon J. A. (1983). Dynamics of proteins: Elements and function. *Ann. Rev. Biochem.* **53**:263.
- ♦ Kato, A., Miyachi, N., Matsudomi, N. y Kobayashi, K. (1987). The role of sialic acid in the functional properties of ovomucin. *Agric. Biol. Chem.* **51**:641-645.
- ♦ Kinsella, J. E. (1976). Functional properties of proteins in foods: A survey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **7**:219-280.
- ♦ Kinsella, J. E. (1981). Functional properties of proteins: Possible relationships between structure and function in foams. *Food Chem.* **7**:273-288.

- ♦ Kinsella, J. E. y Srinivasan, D. (1981). Nutritional, chemical, and physical criteria effecting the use and acceptability of proteins in foods. "Criteria of Food Acceptance" Foster Verlag, Suiza
- ♦ Kinsella, J. E. (1982). Relationship between structure and functional properties of food proteins en *Food Proteins*, Fox, P. F. y Cowden, J. J., (Eds) Applied Science, Londres. p 51.
- ♦ Kretschmer, C. B. (1957). Infrared spectroscopy and optical rotatory dispersion of seín, wheat gluten and gliadin. *J. Phy. Chem.* 61:1627-1631.
- ♦ Krebs, K. E. y Phillips, M. C. (1984) The contribution of  $\alpha$ -helices to the surface activities of proteins. *FEBS.* 175(2):263-266
- ♦ Kyte J. y Doolittle R.F. (1982) A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein *J. Mol. Biol.* 157(1):105-132.
- ♦ Landry, J. y Delhaye, S. (2001). "Isolation and Quantitation of Zeins in Waxy and *Amylose-Extender* and Wild Flint and Dent Maize Endosperm Using a New Solvent Sequence for Protein Extraction". *J. Agric. Food Chem* 49:164-169.
- ♦ Landry, J. y Moureaux, I (1981) Physicochemical properties of maize glutelins as influenced by their isolation conditions. *J. Agric. Food Chem.* 29(6):1205-1212.
- ♦ Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 *Nature.* 227:680-685.
- ♦ Linares, E., Larré, C., Meneste, M. Y Popineau, Y. (2000). Emulsifying and foaming properties of gluten hydrolysates with an increasing degree of hydrolysis: role of soluble and insoluble fractions. *Cereal Chem.* 77(4): 414-420.
- ♦ MacRitchie F. y Saraga T. (1984) Concentrated protein monolayers: Desorption studies with radiolabeled bovine serum albumin. *Colloids Surf.* 44:774.
- ♦ MacRitchie F. (1987). "Consequences of protein adsorption at fluid interfaces. *Protein at Interfaces*", Brash, J. L. y Horbett, T. A. Eds. American Chem. Society, Washington, D. C. p. 165.
- ♦ Mangino, M. E. (1984). Physico-chemical basis of whey protein functionality *J. Dairy Sci.* 67:2711-2722.
- ♦ Mangino, M. E. (1997) Protein Interactions in Emulsions: Protein-Lipid Interactions. *Protein Interactions.* Columbus, Ohio Cap. 5.

- ♦ Mannheim, A y Cheryan, M. (1992). Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**:1163-1169.
- ♦ Matil, K.F. (1971). The functional requirements of proteins for foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **48**:477-480.
- ♦ Matsudomi, N., Tanaka, A., Kato, A. y Kobayashi, K. (1986). Functional properties of deamidated gluten by treating with chymotrypsin. *Agric. Biol. Chem.* **50**:1989-1994.
- ♦ McClements, D. J. (1999). "Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques". *CRC Press*. Nueva York, EUA. pp 185-220.
- ♦ McWatters, K. H y Holmes, M. R. (1979). Influence of moist heat on solubility and emulsification properties of soy and peanut flours. *J. Food Sci.* **44**:774-776.
- ♦ Mertz, E. T., Nelson, O. E., Bates, L. S. y Viron, O. H. (1996). Maize aminoacid composition. *Adv. Chem. Ser.* **57**:228.
- ♦ Morr, C. V. y Ha E. Y. W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **33**:431-476.
- ♦ Nakai, S., Powrie, W. D. (1981). Modification of proteins for functional and nutritional improvements. En "Cereals- A Renewable Resource, Theory and Practice" Y. Pomeranz y L. Munck, (Eds.). Capítulo 11. Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, Minnesota. pp 217-242.
- ♦ Neumann P. E. y Wall, J. S. (1984). Chemical and Physical Properties of Proteins in Wet-Milled Corn Gluten. *Cereal Chem.* **61**(4):353-356.
- ♦ Osborne, T. B. y Mendel, B. (1914). Nutritive properties of proteins of the maize kernel. *J. Biol. Chem.* **18**: 1-16.
- ♦ Paredes, L. O. y Guevara, L. F. (1988). Un método simple para medir el grado de amidación en proteínas de interés alimentario. *Tecnol. Aliment.* **20**(3):10-14.
- ♦ Pearce, K. W. y 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.
- ♦ Phillips, R. D. y Beuchat, L. R. (1981). Enzyme modification of proteins. *ACS Symp. Serv.* **147**:275-298.

- ♦ Pomeranz Y. (1984). "Functional Properties of Food Components Food Science and Technology; A series of monographs". Ed. Academic Press, Inc. EUA. Cap 5, pp. 155-187.
- ♦ Pomeranz, Y. (1987) "Modern Cereal Science and Technology" VCH Publishers. Nueva York, EUA. pp. 396.
- ♦ Poon, S., Clarke, A. E. y Shultz, C. J. (2001a). Effect of denaturants on the emulsifying activity of proteins. *J. Agric. Food Chem.* **49**:281-286.
- ♦ Poon, S., Clarke, A., Currie, G. y Shultz, C. (2001b) Influence of  $\alpha$ -helices on the emulsifying properties of proteins *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**(8):1713-1723
- ♦ Popineau, Y., Bollecker, S. y Thebaudin, J. Y. (1988). Caractérisation biochimique et fonctionnelle des protéines de gluten désamidées partiellement en conditions ménagées. *Sciences des aliments.* **8**(4):411-430.
- ♦ Riha, W.E., Izza, H. Y. Zhangu y C. T. Ho. (1996). Nonenzymatic deamidation of food proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **36**(3):225-255
- ♦ Robinson, A. B., Scotchler, J. W. y McKerrow, J. H. (1973) Rates of nonenzymatic deamidation of glutaminy and asparaginy residues in pentapeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **95**:8156-8159
- ♦ Romagnolo, D., Polan, C. E. y Barbeau, W. E. (1994). Electrophoretic analysis of ruminal degradability of corn proteins. *J. Dairy Sci.* **77**:1093-1099.
- ♦ Saito, M., Chikuni, K., Monma, M. y Shimizu, M. (1993). Emulsifying and Oil Binding Properties of Bovine Serum Albumin and its enzymatic hydrolyzate. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**(6):952-956.
- ♦ Shaowen, Wu, Myers, D. J. y Johnson, L. (1997). Factors affecting yield and composition of zein extracted from commercial corn gluten meal. *Cereal Chem.* **74**(3):258-263.
- ♦ Shewry, P. R., Franklin, J., Parmar, S., Smith, S. J. y Mifflin, B. J. (1983). The effects of sulphur starvation on the amino acid and protein compositions of barley grain. *J. Cereal Sci.* **1**:21-31.
- ♦ Shih, F. F. (1990). Deamidation during treatment of soybean with protease. *J. Food Sci.* **55**:127-129,132.

- ♦ Shih, F. F. y Daigle, K. (1997). Use of Enzymes for the separation of protein from rice flour. *Cereal Chem.* 74(4):437-441.
- ♦ Shukla, R., Cheryan, M. y DeVor, R. (2000). Solvent extraction of zein from dry-milled corn. *Cereal Chem.* 77(6):724-730
- ♦ Sze-Tao, K. W. C. y Sathe, S. K. (2001). Effects of sodium dodecyl sulfate, guanidine hydrochloride, urea, and heta on denaturation of sulfur rich protein in soybeans. *J. Food Biochem.* 25:483-492.
- ♦ Takahashi, H. (1995). Application of zein. *Food Dev.* 30:45-47.
- ♦ Tanford, C. (1961). "Physical Chemistry of Macromolecules". Wiley, Nueva York. pp 123
- ♦ Tanford, C. (1970). Protein denaturation, Part C. Theoretical models for de mechanism of denaturation. *Adv. Prot. Chem.* 24: 1
- ♦ Vodjani, F. y Whitaker, J. R. (1992). Chemical and Enzymatic modification of proteins. Academic Press. pp 261-299.
- ♦ Wagner, J. R. y Guéguen, J. (1999). Surface functional properties of native, acid-treated, and reduced soy glycinin. 2. Emulsifying properties. *J. Agric. Food Chem.* 47:2181-2187. (Vodjani y Whitaker, 1992).
- ♦ Wallace, J. C. y Lopes, M. (1990). New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of  $\gamma$ -zein in modified *opaque-2* maize. *Plant Physiol.* 92:191-196.
- ♦ Wall, J. S. y Paulis, C. (1978). Corn and sorghum grain proteins. Advances in Cereal Science and Technology, *Am. Assoc. Cereal Chem.* Vol. II. pp 135
- ♦ Walstra, P. (1996). Emulsion stability "Encyclopedia of Emulsion Technology". Vol 4, Becher, P., Ed., Marcel Decker, Nueva York, Cap. 1.
- ♦ Wang C. H. y Damodaran S. (1990). Thermal gelation of globular proteins: Weight average molecular weight dependence of gel strength. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1154.
- ♦ Wang, C. R. y Zayas, J. F. (1992). Emulsifying capacity and emulsion stability of soy proteins compared with corn germ protein flour. *J. Food Sci.* 57(3):726-731.
- ♦ Watson, A. y Ramstad, P. E. (1987). "Corn". *American Association of Cereal Chemists, Inc.* St. Paul Minnesota, EUA. pp 273-310.

- ♦ Watson, S. A y Yahl, K. R. (1967). Comparison of the wet milling properties of *opaque-2* high-lysine corn and normal corn. *Cereal Chem.* **44**:488.
- ♦ Wilson, C. M. (1983). "Seed protein fractions of maize, sorghum and related cereals. Seed Proteins: Biochemistry, Genetics, Nutritive Value". Edit. Hague. pp. 271-307.
- ♦ Wu, C. H., Nakai, S y Powrie, W. D. (1976). Preparation and properties of acid-solubilized gluten. *J. Agric. Food Chem.* **24**:504-510.
- ♦ Wu, V. Y. (2001). Emulsifying activity and emulsion stability of corn gluten meal. *J. Sci. Food Agricul.* **81**:1223-1227.
- ♦ Zayas, J. F. (1994). Corn germ proteins: Functional properties in a model system and in food products. *Biotech. Agric. Forestry.* **2**:513-535

## ANEXO I: Protocolos de Técnicas Experimentales

Cuantificación de proteína soluble por el método de Lowry modificado (Peterson, 1977)

### CURVA PATRÓN

- Pesar la cantidad en g de albúmina sérica bovina (ASB) para tener una concentración de 1 mg/mL.
- Para hacer la curva patrón, la solución estándar de proteína debe tener 0.01 mg/mL.
- Se debe realizar una dilución 1:10.
- Para una serie de 10 tubos se necesitan 6 ml de la solución de ASB con una concentración de 0.1 mg/mL.
- Se realiza por duplicado por lo tanto se necesitan 12 ml de la solución de ASB a una concentración de 0.1 mg/mL.
- Esta dilución se prepara antes de iniciar la técnica.

### Construcción de la curva patrón de proteína soluble

No. Tubo	Agua Destilada (ml)	Soluc. ASB [0.1 mg/ml] (ml)	Volumen Final en cada tubo (ml)	Concentración de proteína en cada tubo (µg/ml)
1	1.0	0.0	1	Blanco
2	0.9	0.1	1	10
3	0.8	0.2	1	20
4	0.7	0.3	1	30
5	0.6	0.4	1	40
6	0.5	0.5	1	50
7	0.4	0.6	1	60
8	0.3	0.7	1	70
9	0.2	0.8	1	80
10	0.1	0.9	1	90
11	0.0	1.0	1	100

### PREPARACIÓN DE REATIVOS:

- Solución de CTC (Carbonato de sodio, Tartrato de potasio, Sulfato de cobre•5H<sub>2</sub>O)  
Concentraciones finales: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10%, CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O 0.1%, Tartrato de K 0.2%
- Solución de NaOH 0.8 N
- Solución de SDS al 10%

**Solución B:** Reactivo de Folin-Ciocalteu-fenol (marca sigma), hacer una dilución 1:6. Se prepara antes de desarrollar la determinación.

**Solución A:** Se mezclan volúmenes iguales de las siguientes soluciones en el mismo orden: CTC, NaOH y SDS. Esta solución A se prepara momentos antes de empezar la técnica.

## DESARROLLO

- Se prepara una curva patrón con ASB, cada vez que se termine el reactivo CTC o bien ya este viejo (aproximadamente 3 meses)
- Las muestras problema, deberán tenerse en un volumen de 1 mL, en caso de que los valores de absorbancia sean muy elevados por tener alta concentración de proteína se deberán hacer diluciones hasta que se logre tener un valor dentro de la curva.
- Con agitación continua (vórtex) se le agrega a tubo por tubo 1 mL de la solución A y se deja reposar 10 minutos a TA
- Al término de los 10 minutos se le agrega a cada tubo 0.5 mL de la solución B con agitación continua y se deja desarrollar la reacción durante 30 minutos.
- Después de los 30 minutos se lee la absorbancia a 750 nm. La reacción es estable hasta los 120 minutos de iniciada esta.

## **Determinación del grado de desamidación mediante la técnica del electrodo de amoni (Arntfield y Murray, 1981)**

### **a) Hidrólisis total de las muestras:**

Se pesaron 10 mg de proteína (por triplicado) y se transfirieron a tubos de ensaye de 13 x 100 con tapa rosca calibrados a 5 mL, se agregó HCl 2N hasta la marca. Se cerraron bien los tubos y se hidrolizaron a 110°C/3h. Al término de la hidrólisis se adicionaron 1 ml de buffer de boratos 0.05 M pH 10.4 y 1 mL de NaOH 10 N para detener la hidrólisis.

### **b) Lectura de las muestras blanco:**

Se pesaron 10 g de proteína (por triplicado) y se transfirieron a tubos de ensaye de 13 x 100 con tapa rosca calibrados a 5 mL. Se agregaron 1 mL de buffer de boratos 0.05 M pH 10.4 y 1 mL de NaOH 10N. Se agitó el tubo y su contenido se transfirió a un vaso de precipitado que contenía a la solución A (99 mL de amortiguador de boratos 0.05 M pH 10.4 + 1 mL de NH<sub>4</sub>Cl 100 ppm), el remanente de muestra que quedó en el tubo de ensaye se transfirió con 3 ml de amortiguador de fosfatos y se colocó el electrodo para amoniaco (Orion Research, Modelo 95-10); se tomaron lecturas de  $\Delta E$  (rel mV) a los 3 y 6 minutos de agregada la muestra.

### **c) Lectura de las muestras hidrolizadas:**

El contenido de cada tubo se transfirió a vasos de precipitado con la solución A, el remanente de muestra se extrajo con 3 ml de amortiguador de fosfatos y se colocó el electrodo para amoniaco (Orion Research, Modelo 95-10); se tomaron lecturas de  $\Delta E$  (rel mV) a los 3 y 6 min de agregada la muestra. Es normal que las lecturas de  $\Delta E$  de estas muestras sean negativas y las de los blancos sean positivas.

Se obtuvo el valor de  $\Delta E_t$  para cada muestra restando el  $\Delta E$  del blanco del  $\Delta E$  observado para la muestra hidrolizada. Para cada valor de  $\Delta E_t$  hay un valor correspondiente Q que se puede obtener de una tabla que aparece en el manual de manejo del electrodo.

### **d) Calibración del electrodo**

El electrodo para amoniaco (Orion Research, Modelo 95-10) se conectó a un potenciómetro (Beckman, Mod. 34 pH meter) con una sensibilidad de 0.01mV. Para cada muestra se ajustó a 0 con agua desionizada y posteriormente se volvió a ajustar a 0 con la solución A. Para checar la respuesta del electrodo, se adicionó 1 mL de NaOH 10N + NH<sub>4</sub>Cl 100 ppm y la lectura de  $\Delta E$  a los 3 min dio -060 (rango aceptable= -054 a -060)

### **Cálculo del grado de desamidación:**

Para calcular el nitrógeno amídico en la muestra se utiliza la siguiente ecuación:

$$A = ((C_0 / Q)(10\text{mL}) / (1000 \mu\text{g/mg})(100)) / M$$

donde:

A = mgN amídico/mg muestra

C<sub>0</sub> = μgN/ml de solución de ajuste a cero = 1 μgN/ml

Q = valor obtenido de la tabla

M = mg de muestra

Para obtener el grado de amidación se utiliza la ecuación:

$$GA = (A_i / P)(100)$$

donde:

GA = Grado de amidación (gN amídico/100 g de proteína)

A<sub>i</sub> = N Amídico de la muestra (%)

P = Proteína en la muestra (%)

Finalmente se obtiene el grado de desamidación mediante la ecuación:

$$GD = ((G_{Amn} - G_{Amd})(100)) / G_{Amn}$$

donde:

GD = Grado de desamidación

G<sub>Amn</sub> = Grado de amidación de la muestra nativa

G<sub>Amd</sub> = Grado de amidación de la muestra desamidada

## **Concentración de proteína soluble mediante la precipitación con**

### **TCA**

- Tomar 1 mL de la solución de proteína que se quiera concentrar
- Agregar 0.5 mL de TCA al 50% con una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Mezclar manualmente, lentamente y dejar toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Centifugar a 10000 rpm/10 min/TA. Desechar el sobrenadante y agregar al precipitado 1.5 mL de acetona grado reactivo.
- Mezclar en el vórtex.
- Centrifugar a 10000 rpm/10 minutos/TA.
- Desechar la acetona y repetir el lavado con acetona 2 veces mas.
- Resuspender el precipitado en agua desionizada y dializar contra agua desionizada durante 3 horas con cambios de agua a  $4^{\circ}\text{C}$  en membrana de corte de 1000 kDa (Spectronic).

## Preparación de geles de electroforésis al 20% de acrilamida con

### 5 M de Urea

#### Preparación del gel separador

	10 mL
Urea	3 g
Soln. de Acrilamida (30%T,2.7% Bis)	6 mL
Amortiguador de corrida (4X) (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)	2.5 mL
SDS al 10%	0.1 mL
Agua desionizada	1.35 mL
Persulfato de amonio al 10% (p/v)	50 µL
TEMED	3.3 µL

#### Preparación del gel concentrador

	5 mL
Soln. de Acrilamida (30%T, 2.7%Bis)	0.655 mL
Amortiguador apilador (4X) (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)	1.25 mL
SDS al 10%	50 µL
Agua desionizada	3.05 mL
Persulfato de amonio al 10% (p/v)	25 µL
TEMED	2.5 µL

#### Soluciones:

- Amortiguador de Tanque: 0.025 M Tris, 0.192 M Glicina, 0.1% SDS, pH 8.3
- Solución Tefñidora: 0.025% Azul de Coomasie R-250, 40% Metanol, 7% Ácido Acético
- Solución Desteñidora: 7% Ácido Acético, 5% Metanol

**ANEXO II: Escala de hidropaticidad de Kyte y Doolittle**  
**(1982)**

**Escala de valores para los aminoácidos:**

Ala: 1.800

Arg: -4.500

Asn: -3.500

Asp: -3.500

Cys: 2.500

Gln: -3.500

Glu: -3.500

Gly: -0.400

His: -3.200

Ile: 4.500

Leu: 3.800

Lys: -3.900

Met: 1.900

Phe: 2.800

Pro: -1.600

Ser: -0.800

Thr: -0.700

Trp: -0.900

Tyr: -1.300

Val: 4.200