



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

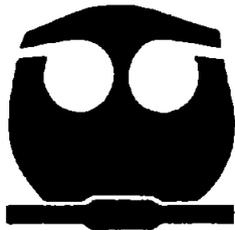
"OBTENCIÓN DE UN AISLADO PROTEÍNICAMENTE
A PARTIR DEL GLUTEN DE MAÍZ Y EVALUACIÓN
DE SUS PROPIEDADES EMULSIFICANTES"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

MIRIAM CARMONA PINEDA



EXÁMENES PROFESIONALES
MÉXICO, D. F. FACULTAD DE QUÍMICA

2005

m. 340735



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

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

NOMBRE: Camacho Pineda Alicia

FECHA: 03-Feb-05

FIRMA: [Firma manuscrita]

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Raúl Aguilar Caballero
Vocal	Prof. Ma. Amanda Gálvez Mariscal
Secretario	Prof. Amelia Ma. de Gpe. Farrés González Saaravia
1er. Suplente	Prof. Bertha Julieta Sandoval Guillén
2do. Suplente	Prof. Alfredo Salazar Zazueta

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología. Conjunto E. Facultad de Química. U.N.A.M.

Asesora del tema: Dra. Ma. Amanda Gálvez Mariscal

Supervisora técnica: M. en C. Vanessa Cabra Ledesma

Sustentante: Miriam Carmona Pineda

Three handwritten signatures are present, each written over a horizontal line. The first signature is a circular stamp with a signature inside. The second signature is a cursive signature. The third signature is a cursive signature.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios, por darme la dicha de vivir y de haber logrado cumplir esta gran meta y por darme ánimos para seguir siempre adelante.

Gracias a mis queridos y amados padres (Beatriz Pineda y Armando Carmona), por haberme apoyado siempre y brindarme su amor, su confianza, su sabiduría, y por darme las armas necesarias para enfrentar a la vida, no saben como se los agradezco. *Gracias* machis, por cuidarme y consentirme siempre. *Gracias* arbano, por apoyar y respetar todos mis ideales.

Gracias a mi hermanito (Noé Carmona) nuco, por el apoyo que siempre me brindó cuando lo necesite, en verdad te quiero mucho y sabes que siempre estaré ahí.

Gracias a mi asesora la Dra. Amanda Gálvez Mariscal, por el gran apoyo que me brindo siempre, y por ser una de mis mejores profesoras de la Universidad.

Gracias a mi asesora técnica Vanessa Cabra, por haber estado siempre pendiente de mi trabajo. *Gracias* Vane, por que con tu apoyo encontré una nueva forma de vida y te estaré siempre agradecida.

Gracias a la Dra. Amelia Farrés y al Dr. Raúl Aguilar por su apoyo en la corrección de la tesis. Y a los miembros de jurado los profesores: Julieta Sandoval y Alfredo Salazar.

Gracias a la Compañía Arancia Corn Products, por el apoyo en la donación de la muestra de Gluten de maíz.

Gracias a mis abuelitos que aunque no están presentes físicamente, en mi corazón y mi mente siempre seguirán vivos, en especial a mis queridas abuelita Mena y mi tía Mago, yo sé que en donde estén se sentirán orgullosas de este gran paso.

Gracias a todos mis demás familiares tíos (as), primos (as) y sobrinos (as), por todos los momentos tan maravillosos que pase con ustedes, en especial a las loquitas que quiero tanto (Faty, Betuchis, Nelly, Bibí, Jessy, Sandy, Yamina, etc.).

Gracias a mis grandes amigas Teresa y Verónica, por su confianza, apoyo y cariño que siempre recibí de ustedes, por que son unas personas increíbles a las que admiro y quiero muchísimo, por estar siempre que las necesité.

Gracias a mi gran amiga de la Facultad Iris Méndez, sabes que te quiero mucho y gracias por ayudarme en los momentos más difíciles de la carrera siempre contarás con migo.

Gracias "Mostro" (J. Donato), por los grandes momentos y enseñanzas que pasamos, deseo de corazón que la vida te ofrezca lo mejor.

Gracias a todos mis compañeros y amigos de la Universidad, por los momentos únicos que viví con ustedes. A mis amigas: Alex, la Patito, Chayo, Claus, Hebe, Adris, Andy, a mis amigos: el Kamesín, Salomón, Quique, el Chairo, Julio, Paco, Charly, y a una gran Amiga que aunque ya no estés te sigo queriendo Ana D. Romero †.

Gracias a todo el equipo del laboratorio 312 del departamento de Alimentos y Biotecnología, a Rulo y Vico por haberme brindado siempre el apoyo necesario para realizar mi tesis y al laboratorio 321 de Análisis de Alimentos por los experimentos realizados.

Y sobre todo *Gracias* a la Máxima Casa de Estudios la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma máter, por que tuve la dicha de estudiar en ella y más particularmente a la Gran Facultad de Química mi segundo hogar. Por que es aquí donde culmina una etapa muy importante de mi vida.

Gracias a la vida misma por ser tan sorprendente, por enseñarme a ser paciente, y a valorar y disfrutar cada evento que sucede.

***Solo con el corazón se puede ver bien...
Lo esencial es invisible para los ojos...***

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 GENERALIDADES DEL MAÍZ	3
2.2 COMPOSICIÓN DEL MAÍZ	5
2.3 GLUTEN DE MAÍZ	10
2.3.1 DEFINICIÓN	10
2.3.2 PRODUCCIÓN	10
2.3.3 OBTENCIÓN DEL GLUTEN DE MAÍZ	11
2.3.4 COMPOSICIÓN PROTEÍNICAS DEL GLUTEN DE MAÍZ	14
2.4 PROTEÍNAS DE ORIGEN VEGETAL Y ANIMAL	16
2.4.1 AISLADOS PROTEÍNICOS DE ORIGEN VEGETAL	16
2.4.2 MÉTODOS GENERALES DE EXTRACCIÓN	17
2.4.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE MAÍZ	18
2.5 FUNCIONALIDAD DE PROTEÍNAS	19
2.5.1 PROPIEDADES DE HIDRATACIÓN	20
2.5.2 PROPIEDADES RELACIONADAS CON LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA	22
2.5.3 PROPIEDADES DE SUPERFICIE	23
2.5.3.1 FACTORES QUE FAVORECEN LA ESTABILIDAD DE LAS EMULSIONES	24
2.5.3.2 FACTORES QUE AFECTAN LA EMULSIFICACIÓN	25
2.5.3.4 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES EMULSIFICANTES	26
CAPACIDAD (CE) Y ESTABILIDAD (EE) DE EMULSIFICACIÓN	26
ÍNDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE (IAE)	27
2.6 DESAMIDACIÓN DE PROTEÍNAS	28
2.6.1 DESCRIPCIÓN DE LA REACCIÓN DE DESAMIDACIÓN	28
2.6.2 TIPOS DE DESAMIDACIÓN	30
DESAMIDACIÓN QUÍMICA	30
DESAMIDACIÓN ENZIMÁTICA	31
3. ANTECEDENTES	33
4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	36
5. METODOLOGÍA	37
5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	39
5.1.1 DISMINUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA Y HOMOGENIZACIÓN	39
5.1.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	39
5.1.3 ANÁLISIS PROXIMAL DEL GLUTEN DE MAÍZ	40

5.2 OBTENCIÓN DEL AISLADO DE GLUTEN DE MAÍZ	42
PRE TRATAMIENTO DE LA MUESTRA GLUTEN DE MAÍZ	42
5.3 CARACTERIZACIÓN DEL AISLADO DEL GLUTEN DE MAÍZ	43
PERFIL ELECTROFORÉTICO DEL GLUTEN DE MAÍZ Y DE LOS AISLADOS	43
5.3.1 AMINOGRAMA DEL AISLADO DE GLUTEN DE MAÍZ	43
5.3.2 DESAMIDACIÓN DE LOS AISLADOS PROTEÍNICOS	44
5.4 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES EMULSIFICANTES DEL AISLADO PROTEÍNICO OBTENIDO A PARTIR DEL GLUTEN DE MAÍZ	45
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS	47
6.1 CARACTERIZACIÓN DEL GLUTEN DE MAÍZ	47
6.1.1 DISMINUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA Y HOMOGENIZACIÓN	47
6.1.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	48
6.1.3 ANÁLISIS PROXIMAL	49
6.2 EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AISLADO DE GLUTEN DE MAÍZ	52
6.2.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DEL AISLADO PROTEÍNICO	52
6.2.2 CARACTERIZACIÓN DEL AISLADO DEL GLUTEN DE MAÍZ	57
6.2.2.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PRESENTES EN EL AISLADO PROTEÍNICO	57
6.2.2.2 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS DEL AISLADO PROTEÍNICO	58
6.3 DESAMIDACIÓN DEL AISLADO PROTEÍNICO	60
6.4 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES EMULSIFICANTES DEL AISLADO PROTEÍNICO	62
6.4.1 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE EMULSIÓN DEL AISLADO PROTEÍNICO	62
6.4.2 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE EN EL AISLADO PROTEÍNICO	65
7. CONCLUSIONES	68
8. BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXO	77

1. RESUMEN

El gluten de maíz es un subproducto de la Industria almidonera que se genera en la molienda húmeda del maíz, durante la producción de almidón y aceite. El alto nivel de proteína del gluten (50-70%) y su disponibilidad en el mercado lo convierten en una interesante materia prima para la producción de aditivos alimentarios con una funcionalidad atractiva. Aplicado a los ingredientes de los alimentos, el término funcionalidad se define como cualquier propiedad distinta de las nutritivas, que condicione su utilidad en los mismos. La mayor parte de las propiedades funcionales afectan a las características sensoriales de los alimentos, especialmente a la textura, aunque también pueden desempeñar un papel muy importante en su comportamiento físico, o en el de sus ingredientes durante la preparación, procesado o almacenamiento (Acton, 1983; Fox, 1982; Graham, 1977; Kinsella, 1982). La modificación química y enzimática de las proteínas es una práctica recurrente cuya finalidad es mejorar las propiedades funcionales. Se sabe que la desamidación de los residuos de asparagina y glutamina aumenta la carga de las proteínas haciendo que se modifique su estructura y por consiguiente sus propiedades funcionales (Vodjani, 1992). En este trabajo se diseñaron las condiciones para la obtención de un aislado proteínico atractivo para la industria a partir del gluten de maíz. Se eligió una extracción etanólica a 45°C/90 min, para minimizar los gastos de tiempo y energía en comparación con el resto de las condiciones analizadas. Las proteínas encontradas en el aislado fueron: las α zeínas de 19 y 22 kDa, con sus correspondientes dímero (44kDa) y trímero (66 kDa), las γ zeínas de 50 y 26 kDa, la β zeína de 18 kDa y la globulina de 31 kDa. Las condiciones ensayadas en este trabajo permitieron extraer la mayor parte de las proteínas presentes en el gluten de maíz con un rendimiento de extracción del 80%, gracias a las características de las proteínas presentes en el aislado (zeínas), que son altamente hidrofóbicas, lo que se tradujo en una importante concentración. Con el tratamiento ácido se obtuvieron grados de desamidación mayores al elevar la

temperatura de 80 a 90°C. La utilización de un medio etanólico al 70% permitió obtener grados de desamidación muy elevados en comparación con los reportados, (Flores 1997) cuando el proceso se realiza en medio acuoso. Con el aislado proteínico desamidado por periodos de 1 a 3 horas a 80°C se logró una estabilidad de las emulsiones preparadas del 100%, utilizando en ellas concentraciones del 0.1% de proteína. Por otra parte se logró que al incrementar la temperatura de desamidación a 90°C, la proteína sufriera una mayor desnaturalización, lo que permitió estabilizar más fácilmente las fases de aceite y agua en la emulsión.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades del maíz

El Maíz:

Su nombre científico es *Zea mays*, que proviene del taíno "mahis". Posee numerosas variedades e híbridos; se cultiva intensamente en todos los continentes bajo diferentes condiciones climáticas (Serna S., 1996). Es una planta de la familia de las gramíneas, con el tallo grueso, de uno a tres metros de altura, según las especies; sus hojas son largas, planas y puntiagudas; las flores masculinas se encuentran en racimos terminales y las femeninas en espigas axilares resguardadas por una vaina (Fig.1). Es indígena de la América tropical, se cultiva en Europa, y produce unas mazorcas con granos gruesos y amarillos muy nutritivos.



Figura 1. Mazorcas de maíz (Eudeba, 2000)

Era el alimento básico de las culturas americanas muchos siglos antes de que los europeos llegaran al Nuevo Mundo, que es su centro de origen, por lo tanto se considera mesoamericano. Existen hallazgos arqueológicos y paleobotánicos de que, en el valle de Tehuacán, al sur de México, ya se cultivaba maíz hace aproximadamente 4,600 años. En tiempos precolombinos su extensión abarcaba desde Chile al Canadá oriental. Muchas de las variedades principales existían entonces, y merecían el respeto religioso de varios pueblos. Con el

descubrimiento de América fue introducido en los países mediterráneos, donde se difundió rápidamente.

El maíz que se utiliza preferentemente en la industria almidonera es el maíz amarillo, porque se trata de una variedad muy homogénea y que tiene una composición que ha sido seleccionada precisamente para cumplir con los requerimientos de la industria. En México se siembran y se utilizan más frecuentemente las variedades criollas y mejoradas del maíz blanco, y se produce maíz amarillo, pero son justamente las variedades amarillas las que constituyen las importaciones del TLCAN. Aproximadamente 65% del área cultivada a nivel global con cereales se destinó al maíz. Además, se calcula que más del 50% de la producción total global a nivel mundial es de maíz. En México se siembra como cultivo de subsistencia por campesinos y pequeños agricultores. Esto se ve reflejado en un rendimiento promedio de solamente 2.3 Ton/ha (FAO, 1994).

En el caso específico del maíz existen numerosos tipos con diferentes usos industriales: existen granos con textura más vítrea para las industrias molineras y fabricación de botanas, maíces con mejor calidad proteínica o nutricional y los maíces desarrollados para abastecer a la industria refinadora de almidón.

Actualmente se tienen registros que indican que el uso del maíz se ha extendido moderadamente por casi todo el mundo y ha adquirido una importancia fundamental en la economía agrícola de países de los cinco continentes, a raíz de la obtención de nuevos híbridos, de la selección de variedades de máximo rendimiento y de la apertura de zonas de terreno, que hasta entonces habían permanecido al margen de la explotación agrícola. Cerca del 66% de la cosecha global del maíz se usa para la alimentación de ganado, 20% es consumido directamente por humanos, 8% es usado en procesos industriales de alimentos y productos no alimenticios y el 6% se usa como semilla y desecho entre las naciones en vías de desarrollo (DGPA, 2001).

Los Estados Unidos, la República China y Brasil producen juntos el 73% del total global, 456.2 millones de toneladas. México, el cuarto productor a nivel mundial produce aproximadamente 19 millones de toneladas de grano anualmente en 6.5 millones de hectáreas (3% de la producción mundial, en un 5% de la tierra destinada a la producción de maíz a nivel mundial). Aproximadamente en México el 70% se utiliza para consumo humano y el resto para la industria. Actualmente se ha incrementado el consumo de maíz para forraje, teniendo un incremento en México del 4% anual (DGPA, 2001).

2.2 Composición del maíz.

El maíz es un cereal de alta importancia energética debido a su elevado contenido en hidratos de carbono, y también por su aporte de grasas y proteínas, así como vitaminas y minerales diversos.

Hidratos de carbono. Están constituidos por azúcares y almidón, fundamentalmente. Conforme el grano madura, aumenta su contenido en almidón. Se trata de hidratos de carbono fácilmente digeribles y asimilables. El almidón se encuentra presente en forma de gránulos intracelulares compactos y su tamaño varía de 5-25 μ m en el caso del maíz. El almidón está formado por dos fracciones: amilosa y amilopectina. La amilosa es una cadena lineal formada por monómeros de glucosa unidos entre sí por enlaces α ,1-4 glucosídicos. Su masa molecular alcanza los 20 000 kDa. El almidón de maíz generalmente contiene 25% de esta fracción. En la amilopectina, las unidades de glucosa están igualmente unidas por enlaces α ,1-4 glucosídicos, pero la molécula está ramificada y las cadenas laterales están unidas por enlaces α ,1-6 glucosídicos, la masa molecular de la amilopectina varía entre 200,000 kDa y un millón, el maíz contiene en promedio un 75% de esta fracción (Whistler, 1967 y Wurzburg, 1968).

Lípidos o Grasas. El maíz destaca por ser un cereal rico en grasas, sobre todo poliinsaturadas (ácido oleico y linoleico principalmente), así como triacilgliceroles, una mono capa de fosfolípidos que comúnmente se denominan oleosinas; el

grano de maíz también contiene ácidos grasos libres (Jasón, 1992). Contiene el doble de grasa que el trigo y la cebada, aunque no tanta como la avena.

Fibra. El maíz es una buena fuente de fibra de ambos tipos, soluble e insoluble por lo que se aconseja su consumo en caso de estreñimiento, cuando se tienen niveles elevados de colesterol y triglicéridos en sangre.

Vitaminas. El maíz es una buena fuente de vitaminas del grupo B, así como de beta caroteno, xantofilas y zeaxantina, precursores de la vitamina A, sobre todo en las variedades amarillas de donde se obtiene generalmente el gluten. El maíz es el único cereal que aporta beta caroteno. Además contiene cantidades moderadas de vitamina C y niacina (una vitamina del grupo B), pero ésta no puede ser asimilada como tal por el organismo y es necesario un tratamiento alcalino previo antes de que sea consumido.

Minerales. Aporta cantidades interesantes de potasio, fósforo, magnesio, manganeso y hierro, aunque es pobre en calcio.

Proteínas y Aminoácidos. El grano de maíz presenta los cuatro grupos de proteínas que normalmente se hallan en los cereales (Tabla 1). La fracción más abundante en el grano es la de las prolaminas o zeínas (Wilson, 1983).

Tabla 1. Fracción proteínica de maíz (g / 100 g de proteínas totales)

Albuminas	Globulinas	Prolaminas	Glutelinas
4.0	2.0	55.0	39.0

Fuente: Badui, 1996.

La mayor parte de las proteínas del maíz se encuentran en el endospermo en cuerpos proteínicos que rodean a los gránulos de almidón (Fig.2).

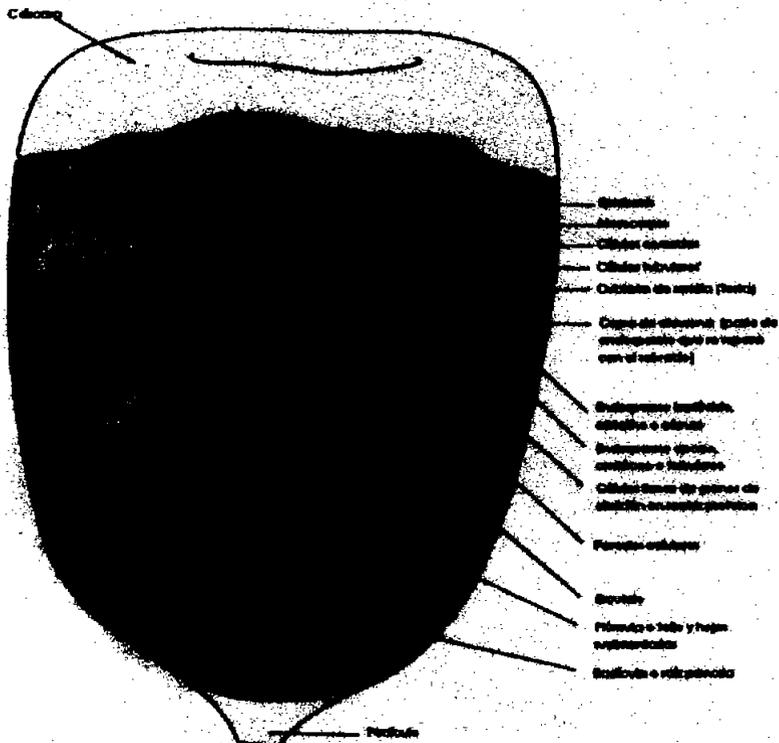


Figura 2. Corte longitudinal de un grano de maíz (Watson y Ramstad, 1987)

En cuanto a su composición de aminoácidos (Tabla 2), aunque contiene casi todos los aminoácidos indispensables, como todos los cereales, es deficiente en lisina y en triptofano, un aminoácido capaz de transformarse en niacina en el organismo. Contiene niveles bajos de arginina e histidina, indispensables para niños, lo que lleva a considerar a las proteínas del maíz como de baja calidad nutricional. Una de sus características es que presenta un elevado contenido de ácido glutámico y ácido aspártico, los cuales son sensibles a cambios en su estructura bajo condiciones ácidas o básicas, que resultan en cambios importantes de sus propiedades funcionales (Badui, 1996).

Tabla 2. Composición de aminoácidos de las proteínas del maíz

Ac. Aspártico	7.00
Alanina	7.90
Cistina	1.70
Glicina	3.20
Isoleucina	3.40
Lisina	2.60
Prolina	8.30
Serina	3.20
Tirosina	2.80
Treonina	2.90
Triptofano	2.20
Valina	4.60

Fuente: Badui, 1996

2.3 Gluten de maíz.

2.3.1 Definición.

El gluten de maíz es un subproducto importante de la Industria almidonera que se genera en la molienda húmeda del maíz, durante la producción de almidón y aceite y que se encuentra disponible en el mercado. El alto nivel de proteína del gluten (50-70%) lo convierte en una materia prima interesante para la producción de aditivos alimentarios.

2.3.2 Producción.

El valor (en miles de pesos) de la producción de gluten de maíz en nuestro país se ha incrementado nueve veces en un período de 10 años (Fig. 3), lo que permite considerarlo como una opción interesante para utilizarlo en otras formas atractivas para la industria alimentaria.

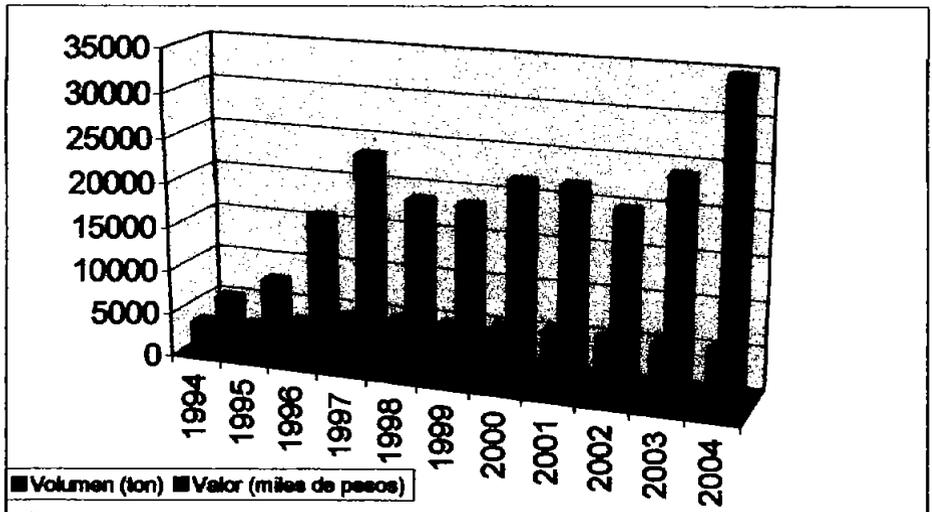


Figura 3. Producción de gluten de maíz en México (de 1994 a Junio del 2004).

Fuente: INEGI. Encuesta Industrial Mensual.

2.3.3 Obtención del gluten de maíz.

El grano de maíz se separa en germen, fibra, proteína y almidón mediante la molienda húmeda (Fig. 4). 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 disgregar la matriz proteínica que se encuentra en el endospermo y facilita la separación del almidón y los componentes proteínicos insolubles (Wall y Paulis, 1978).

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 proteínica 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 del gluten de maíz se destina a alimentación animal, principalmente a la avicultura debido a su alto contenido de xantofilas, proteína y su bajo contenido de fibra.

Las proteínas del gluten de maíz no poseen una funcionalidad considerable si se comparan con otras proteínas comerciales como las de soya o las de la leche; esto se relaciona con su baja solubilidad en sistemas acuosos y a las condiciones de pH y fuerza iónica que prevalecen en los sistemas alimentarios.

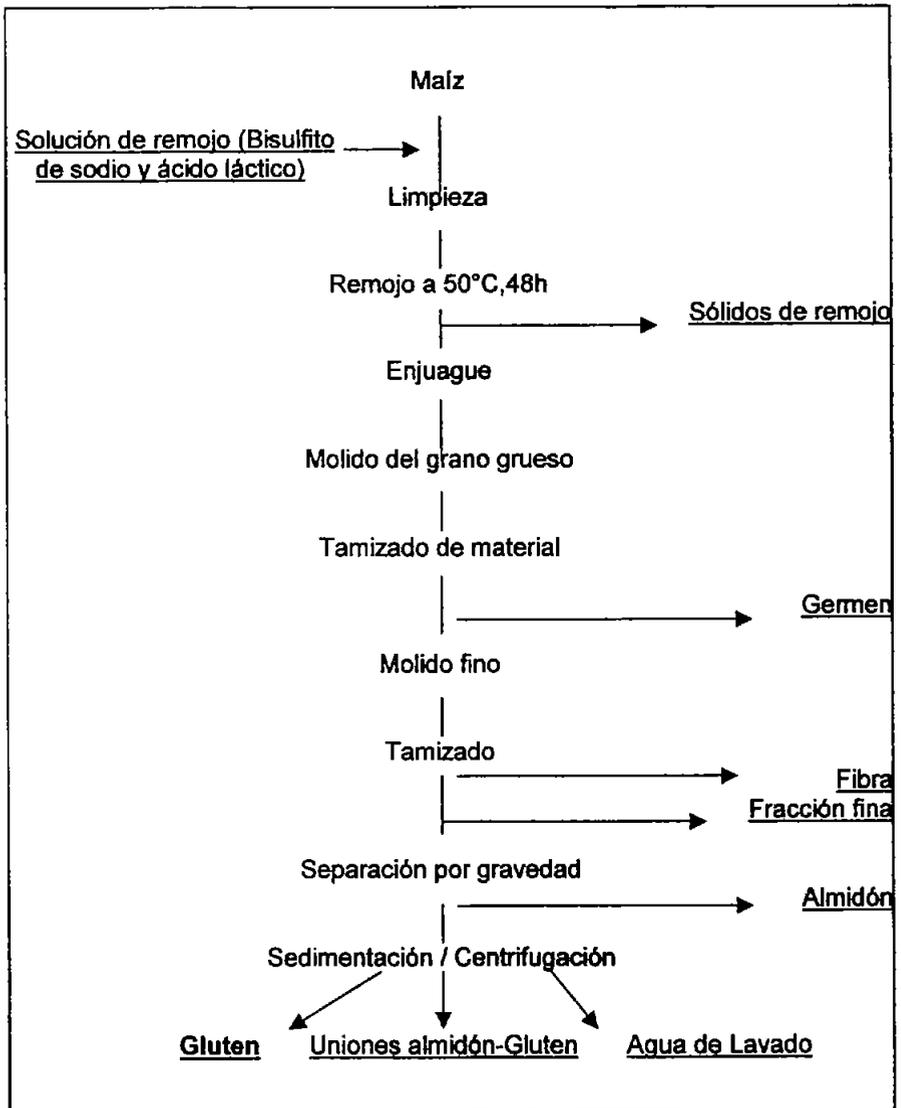


Figura 4. Obtención del gluten de maíz y de los demás componentes del grano por el método de molienda húmeda (Gómez et al., 1992).

En el grupo de trabajo del Laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, se trabaja en el estudio de las proteínas del maíz. (Flores, 1997) demostró que las proteínas del gluten de maíz poseen baja funcionalidad y solubilidad y que la desamidación puede mejorar estas propiedades, los resultados de los estudios previos de gluten indican que el componente mayoritario es la proteína ($58.23 \pm 0.12\%$) lo que permite considerarlo como una buena fuente de este componente. El contenido de hidratos de carbono es relativamente 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 ± 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 en el proceso de extracción se remueve casi por completo el pericarpio del grano. El contenido de grasa remanente (6.1%) es alto si se considera que el proceso de extracción ya se llevó a cabo (Cabra, V., 2002).

Al gluten de maíz se le considera como un concentrado proteínico, ya que se entiende por concentrado el producto cuya cantidad de proteína sea del 60% al 80%; mientras que un aislado proteínico se define como la porción principalmente proteínica, obtenida de granos limpios, sanos y de alta calidad por medio de la remoción de los componentes no proteínicos, y que debe contener aproximadamente un 90% de proteína ($\%N \times 6.25$) (Chefftel, 1989).

2.3.4 Composición proteínica del Gluten de Maíz.

Las zeínas son proteínas muy hidrofóbicas y se distinguen cuatro tipos dependiendo de su solubilidad. Son insolubles en agua, pero solubles en agua a valores de pH mayores de 11, así como en presencia de detergentes como el SDS, y altas concentraciones de urea. Son solubles en etanol acuoso y solventes orgánicos polares. La composición óptima para extraer las zeínas tiene que ver con la relación de C/O (carbono/oxígeno), en una proporción de

0.7-1.3 para solventes polares alifáticos con un número de carbonos de 2 a 4. (Dejing Fu, Curtis L. Weller and Randy L. Whehling, 1999).

El nombre de gluten se debe a que la fracción proteínica de otro importante cereal, el trigo, se denomina así también. Sin embargo, este último está conformado en su mayoría por proteínas pertenecientes al grupo de las glutelinas, cuando en el gluten de maíz el grupo mayoritario lo conforman las prolaminas y más específicamente, las zeínas. Debido a su origen, el gluten de maíz no es alergénico, y la diferencia (con el trigo) radica en la constitución de sus proteínas (Tabla 3).

Tabla 3. Composición Proteínica del Gluten de Maíz (Wu, 2001).

Zeínas	68
Globulinas	12
Albúminas	

El poder alergénico del trigo está ligado a la permanencia prolongada del alérgeno en el intestino; el gluten de trigo es poco soluble y su proteólisis por la pepsina o la tripsina es lenta. Las gliadinas y prolaminas del trigo tienen un peso molecular de unos 50 kDa, son ricas en ácido glutámico y en prolina, y están vinculadas a una hipersensibilidad alimenticia (Moneret-Vautrin, 1983). Este trastorno, conocido como enfermedad celíaca, se manifiesta en los niños desde el destete. Se caracteriza por diarrea crónica que motiva un adelgazamiento, seguido de un retraso en el crecimiento y en los huesos, con problemas psíquicos; y si no se aplica un régimen alimenticio sin gluten surge rápidamente la muerte. A nivel de la mucosa intestinal se observa una atrofia, además de una desaparición de las vellosidades intestinales. Se sabe que la enfermedad celíaca

es una intolerancia al gluten y más específicamente a su fracción proteica, la gliadina (Marsh M. N. (1992).

La ventaja del gluten de maíz sobre el de trigo es que no provoca los trastornos causados por esta enfermedad.

2.4 Proteínas de origen Vegetal y Animal.

Los cereales representan el principal aporte energético y proveen también de una parte importante del aporte proteínico para la nutrición humana y animal. La selección genética y la mejora de las prácticas agrícolas han aumentado los rendimientos de cereales y los contenidos en proteína y lisina de los granos de trigo, maíz, y arroz.

Por otra parte la producción de proteínas animales (leche, carne, huevo) se ha beneficiado con la selección de nuevas razas, con la inseminación artificial, el control de enfermedades y mejores prácticas de alimentación. El desarrollo de la acuicultura, nuevas técnicas de pesca, aumentan la disponibilidad de proteínas animales más baratas. Sin embargo el rendimiento por hectárea en proteínas animales es bajo, porque se utilizan de 3 a 20 Kg de proteína vegetal para producir 1 Kg de proteína animal, que varía según la especie animal. Actualmente en las dietas de tipo occidental el consumo de fuentes proteínicas de origen animal es mayor si se compara con las de origen vegetal.

2.4.1 Aislados proteínicos de Origen Vegetal

Las técnicas modernas que han contribuido a aumentar la disponibilidad de proteínas para la alimentación humana y animal permiten aprovechar las leguminosas y otras plantas ricas en proteína. Las semillas de leguminosas constituyen un importante complemento proteínico de los cereales. La soya es la leguminosa más utilizada en este aspecto y marca de alguna manera la tendencia general para el aislamiento de proteínas. En este proceso las semillas

de soya se trituran y se tratan con un disolvente orgánico para extraer el aceite, lo que se realiza a temperaturas moderadas con el fin de conservar las propiedades funcionales de las proteínas; la harina resultante contiene un 45% de proteína y para obtener un producto más rico en proteína existen los métodos siguientes:

2.4.2 Métodos Generales de Extracción

1. Los oligosacáridos y las sales minerales se extraen con agua acidificada, con una mezcla agua-etanol, resultando un concentrado proteínico con un 65-75% de proteína.

2. Las proteínas de harina de soya desgrasada pueden solubilizarse en agua en medio alcalino y, posteriormente, centrifugar para eliminar los polisacáridos insolubles. Se hace una precipitación (pH= 4.5) seguida de una centrifugación y lavado, eliminando glucósidos solubles y sales. Se seca y se obtiene un aislado proteínico con 90% de proteína. Los aislados proteínicos son más caros que los concentrados proteínicos, tomando como base la materia proteínica, debido a los tratamientos y productos químicos suplementarios y porque raramente se recupera más del 75% de las proteínas iniciales (Carpenter, K.J., 1973).

Pueden realizarse extracciones y purificaciones de los constituyentes proteínicos a partir de harinas desgrasadas de otras semillas oleaginosas como el cacahuate, el algodón, girasol, ajonjolí, colza, etc. Por ejemplo en la preparación de concentrados proteínicos de girasol, es necesario impedir la oxidación de los polifenoles en pigmentos, que se fijarán sobre la proteína. Es técnicamente posible preparar harinas, concentrados y aislados proteínicos a partir de distintos granos como por ejemplo granos pobres en aceites como las habas, los guisantes, garbanzos y algunas otras leguminosas pero en la actualidad, y por razones económicas, la semilla de soya es industrialmente la fuente principal para estos fines.

2.4.3 Extracción de proteínas de maíz.

Se han realizado estudios (Shukla et al., 2000) en los cuales se reporta el etanol al 70% como excelente medio para llevar a cabo la extracción de proteínas con características hidrofóbicas, como son en el caso de las prolaminas del maíz, que de acuerdo a la clasificación de Osborne (1914) se solubilizan en soluciones alcohólicas, además de que si se combinan con temperaturas que varíen alrededor de los 60°C será aún mejor. De acuerdo a lo anterior Mossé (1961) realizó estudios cuantitativos con etanol acuoso para obtener la máxima solubilidad, y encontró altos valores a concentraciones de etanol acuoso del 70% (w/w). Con los métodos utilizados por Shukla (2000), se experimentó el extraer la fracción proteínica del maíz (zeínas) usando etanol al 68% y 70% a una temperatura de 50°C por tiempos de 30 a 40min, logrando extraer el 50% de la fracción total de zeínas. Por otra parte Mila P. Hojilla-Evangelista y Lawrence A. Jonson (2003), establecen condiciones de extracción para las zeínas del maíz, usando etanol al 70% y temperaturas de 55°C y 60°C con agitación en baños de agua a 125 rpm por periodos de 90 min extrayendo hasta un 65% de la fracción de zeínas.

Los métodos reportados anteriormente se basan en el hecho de que la mayor fracción proteínica presente en el maíz corresponde a las zeínas, para las cuales se han encontrado múltiples usos como películas y formas plásticas, para su producción a nivel industrial, pero se menciona poco sobre usos alimentarios. Se debe tener presente que las zeínas están en un porcentaje del 55% en el maíz, las glutelinas constituyen el 39%, las albúminas el 4% y las globulinas solo el 2% (Badui, 1996).

2.5 Funcionalidad de Proteínas.

Aplicado a los ingredientes de los alimentos, el término funcionalidad, se define como cualquier propiedad, distinta de las nutritivas, que condicione su utilidad en los mismos. La mayor parte de las propiedades funcionales afectan a las características sensoriales de los alimentos, especialmente a la textura, aunque también pueden jugar un papel muy importante en su comportamiento físico, o en el de sus ingredientes durante la preparación, procesado o almacenamiento Mossé (1961).

Las propiedades funcionales de las proteínas son aquellas propiedades fisicoquímicas que les permiten contribuir a que los alimentos exhiban características deseables. Las propiedades funcionales de las proteínas se pueden clasificar en tres grandes grupos (Osborne, 1914):

- (a) propiedades de hidratación (dependientes de las interacciones proteína-agua), tales como absorción y retención de agua, humectabilidad, hinchamiento, adhesión, solubilidad y viscosidad. Con frecuencia se les hace referencia con el término de propiedades hidrodinámicas.

- (b) propiedades relacionadas con las interacciones proteína-proteína como son precipitación y formación de geles.

- (c) propiedades de superficie, tales como tensión superficial, emulsificación y características de espumado.

Como la predicción de las propiedades funcionales de las proteínas a partir de sus características estructurales resulta con frecuencia errónea, se hace necesaria su determinación experimental.

Todas estas propiedades son aprovechadas en la elaboración de los alimentos (Tabla 4).

Tabla 4. Propiedades funcionales de las proteínas necesarias en alimentos.

Alimento	Propiedad funcional
Bebidas	Solubilidad a diferentes valores de pH, estabilidad al calentamiento, viscosidad.
Productos de panadería	Formación de una matriz y una película con propiedades viscoelásticas, formación de geles, absorción de agua, emulsificación, espumado y oscurecimiento.
Sucedáneos de huevo	Formación de espuma, formación de gel.
Recubrimientos	Cohesión, adhesión

Fuente: Badui, 1996

2.5.1 Propiedades de Hidratación

La conformación de una proteína en solución depende fundamentalmente de sus interacciones con el agua. La mayoría de los alimentos son sistemas sólidos hidratados y el comportamiento fisicoquímico y reológico de las proteínas y los demás constituyentes del alimento esta influenciado también, por su actividad acuosa (Hutton, C.W. et A.M. Campbell, 1981).

Además diversos factores ambientales tales como la concentración, pH, temperatura, tiempo, fuerza iónica y presencia de otros constituyentes afectan a las fuerzas que intervienen entre las interacciones proteína- proteína, y proteína-agua (Chou, D.H. et C.V. Morr, 1979; y Kinsella, J.E., 1976). La mayoría de las propiedades funcionales vienen determinadas por el equilibrio entre estas fuerzas.

Absorción de agua

La absorción y retención de agua por los ingredientes proteínicos tienen un papel fundamental en la calidad y textura de diversos alimentos. La imbibición del agua sin disolución de la proteína conduce a una hinchazón (expansión), y le confiere propiedades tales como consistencia, espesamiento, viscosidad y adherencia.

Solubilidad

Las características de solubilidad son muy útiles para poder determinar las condiciones de extracción y purificación de las proteínas a partir de las fuerzas naturales que originalmente las estabilizan en el grano, así como para la separación de fracciones proteínicas. La solubilidad también da una buena referencia para la aplicación potencial de las proteínas (Kinsella, J.E., 1976). La solubilidad facilita la difusión de la proteína en las interfases aire/agua y aceite/agua, mejorando así su actividad superficial. La solubilidad de la mayoría de las proteínas generalmente se reduce de forma irreversible durante el calentamiento. Aún los tratamientos más suaves, como los utilizados para la extracción y purificación de proteínas pueden provocar cierto grado de desnaturalización y de insolubilidad.

Viscosidad

La viscosidad y la consistencia son propiedades funcionales importantes en los sistemas proteínicos de los alimentos líquidos y cremas, así como de

importancia práctica para conocer las propiedades de viscosidad de las dispersiones proteínicas.

La viscosidad refleja la resistencia de un material a fluir, viene expresada por el coeficiente de viscosidad (μ) que es la relación entre la fuerza de corte o cizallamiento y la velocidad relativa de corte o cizallamiento.

Las variaciones de pH, temperatura, fuerza iónica, así como la adición de iones calcio, agentes oxidantes o reactivos que presuponen la ruptura de enlaces hidrógeno o disulfuro, pueden modificar profundamente la viscosidad de las soluciones o dispersiones proteínicas. Estas modificaciones dependen del tipo de proteína. En medio alcalino la viscosidad de la mayoría de las proteínas aumenta.

2.5.2 Propiedades relacionadas con las interacciones proteína-proteína

Gelificación

Se denomina gelificación al fenómeno que ocurre cuando las moléculas desnaturalizadas se agregan para formar una red proteínica ordenada (Hermansson, 1979; Schmidt, 1979). La gelificación es un proceso complejo que lleva consigo, en primer lugar un desdoblamiento o desnaturalización de las proteínas, para después favorecer la interacción proteína-proteína que da origen a la estructura tridimensional más ordenada en la que quedan retenidos el agua, los glóbulos de grasa, las sales y otras sustancias de bajo peso molecular (Schmidt, 1981). Por estas razones, la dureza del gel depende de la intensidad de las fuerzas que constituyen dicha estructura y está en función del pH, de la concentración del polímero, de la temperatura, de la fuerza iónica, del grado de desnaturalización, etc. (Gosset, 1984; Hickson, 1980; Hillier, 1980).

La gelificación es una propiedad funcional muy importante de algunas proteínas, ya que juega un papel fundamental en la preparación de numerosos alimentos.

La gelificación de las proteínas se utiliza no sólo para formar geles viscoelásticos, sino también para mejorar la absorción de agua, los efectos espesantes, la fijación de partículas (adhesión) y para estabilizar emulsiones y espumas (Fennema, 1993).

2.5.3 Propiedades de superficie

Las emulsiones son dispersiones de dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales se encuentra bajo la forma de pequeñas gotitas dispersas en el otro líquido que constituye la fase continua (Cheftel 1989). Dado que muchos alimentos son emulsiones, las proteínas juegan un papel fundamental en la estabilización de estos sistemas. Las emulsiones de los alimentos son del tipo aceite en agua (o/w) o bien agua en aceite (w/o); el término agua se refiere a un líquido polar, y el término aceite se refiere a un líquido hidrófobo. Algunas emulsiones también pueden tener burbujas de gas y/o sólidos dispersos. La formación de pequeñas gotas emulsionadas va correlacionada con la creación de una superficie interfacial importante entre las dos fases líquidas no miscibles. Esta superficie entre fases aumenta exponencialmente cuando el diámetro de las gotitas disminuye (para una misma masa de la fase dispersa), y puede alcanzar $1\text{m}^2/\text{ml}$ de emulsión.

Considerando que todo líquido, tomándolo separadamente, tiende a reducir al máximo su superficie en contacto con el aire o con otro líquido no miscible, la creación de una superficie interfacial importante exige un aporte de energía. Para suministrar dicha energía se utilizan mezcladoras rápidas, homogenizadores, o sistemas de ultrasonido. Para formar una emulsión estable las proteínas se adsorben en la interfase de las pequeñas gotas de aceite que constituyen la fase dispersa. La disolución acuosa es entonces la fase continua y las proteínas contribuyen a las propiedades físicas y reológicas que determinan la resistencia a la coalescencia (Cante, 1979). De acuerdo con el valor de pH del medio acuoso, puede tener lugar la ionización de las cadenas laterales de los

aminoácidos, lo que proporciona fuerzas electrostáticas repulsivas que favorecen la estabilidad de la emulsión.

2.5.3.1 Factores que favorecen la estabilidad de las emulsiones

De acuerdo a los estudios realizados por Halling en 1981 existen diversos fenómenos que tienden a estabilizar las emulsiones como son:

Una débil tensión interfacial entre las dos fases, debido a la naturaleza de esas fases o por la adición de agentes tensoactivos.

La presencia de una capa interfacial resistente, constituida por ejemplo por una película de proteínas adsorbidas que se opone mecánicamente a la coalescencia de las gotitas.

La presencia de cargas electrostáticas del mismo signo, en la superficie de las gotitas dispersas, a causa de fenómenos de ionización o de adsorciones de iones. Las gotitas cargadas están rodeadas de una doble capa difusa de contraiones que ejercen fuerzas de Van der Waals que permiten repelerse entre ellas.

Un diámetro pequeño de las gotitas, como el que se puede obtener con una agitación intensa y una concentración adecuada de un agente tensoactivo específico, resultando así una formación de crema o de sedimentación de acuerdo con la ley de Stokes. (Ley Stokes, 1851 se refiere a la fuerza de fricción experimentada por objetos esféricos moviéndose en el seno de un fluido viscoso en un régimen laminar).

Una fuerte viscosidad de la fase continua, que también origina una lenta formación de crema según la ecuación de Stokes. (Es válida en el movimiento de partículas esféricas pequeñas moviéndose a velocidades bajas).

2.5.3.2 Factores que afectan la emulsificación

Existen diversos factores que afectan las características de las emulsiones y con ello los resultados de los ensayos, como son: tipo y diseño del equipo, intensidad del aporte de energía, velocidad de adición del aceite, volumen de la fase lipídica, temperatura, pH, fuerza iónica, presencia de azúcares, presencia de surfactantes de bajo peso molecular, exposición al oxígeno, características del aceite (punto de fusión), concentración en proteína soluble y propiedades emulsificantes de la proteína. Frecuentemente existe una correlación positiva entre solubilidad de la proteína y capacidad emulsionante o estabilidad de emulsión (Halling, 1981).

El pH influye de diversas formas sobre las propiedades emulsificantes de las proteínas. Algunas proteínas en su pl, son poco solubles, y con ello se disminuye su aptitud para formar emulsiones (Cheftel, 1989). Por otra parte, las proteínas en este estado no pueden contribuir a la carga de las gotitas, lo que evita la estabilización de la emulsión por repulsiones electrostáticas. Además del pl, o con ciertas fuerzas iónicas, las proteínas adoptan estructuras compactas con una fuerte viscoelasticidad.

El calentamiento de las proteínas es otro factor que daña la estabilidad de una emulsión ya que, al calentarlas, bajan su viscosidad y se disminuye la de la película proteínica adsorbida en la interfase.

Los surfactantes de bajo peso molecular, por lo general, no favorecen la estabilidad de emulsiones estabilizadas por proteínas, por que rebajan la firmeza de las películas proteínicas y disminuyen las fuerzas que mantienen las proteínas en la interfase. Todos estos factores explican por qué al no existir una normalización de métodos, una emulsión determinada no produzca los mismos resultados cuando es estudiada por distintos investigadores, y por qué el

comportamiento emulsificante de las diversas proteínas varía según el experimentador (Cheftel, 1989).

2.5.3.3 Métodos de evaluación de las propiedades emulsificantes

Capacidad (CE) y estabilidad (EE) de emulsificación

La capacidad de emulsificación se define como el volumen de aceite (mL) que puede ser emulsificado por cada gramo de proteína, antes de que se produzca la inversión de fases (Fennema, 1993), o bien por su ruptura cuando hay un exceso de aceite. Los valores de CE disminuyen al aumentar la concentración proteínica, porque se expresan en términos de <<por gramo de proteína>>.

La estabilidad de emulsión suele expresarse como el mantenimiento homogéneo de la emulsión o como la capacidad de la emulsión para resistir cambios en sus propiedades a través de tiempo (Mc Clements, 1999). La ruptura de la emulsión puede resultar, aunque no siempre, en una separación de la fase acuosa y/o de la fase lipídica.

Las dos medidas, CE y EE reflejan las dos funciones que las proteínas desempeñan en las emulsiones: facilitar su formación, principalmente por bajar la tensión interfacial, y contribuir a estabilizar la emulsión formando una barrera física en la interfase.

Las características de una emulsión y los resultados obtenidos en los dos tipos de ensayos mencionados se ven influidos por múltiples factores: tipo y geometría del equipo utilizado, intensidad de energía, velocidad de adición de aceite, volumen de la fase grasa, temperatura, pH, fuerza iónica, presencia de azúcares y agentes surfactantes de bajo peso molecular, exposición al oxígeno, tipo de grasa, concentración de las proteínas solubles y propiedades emulsificantes de las proteínas. La influencia de todos estos factores explica las razones para estandarizar metodologías, con el fin de poder comparar

resultados entre diferentes investigadores, como se mencionó anteriormente (Cheftel, 1989).

Índice de Actividad Emulsificante (IAE)

Es el área de superficie total de la emulsión y se puede medir como los m² de interfase estabilizada por gramo de proteína utilizada en la prueba (Fennema, 1993). Se han establecido valores del Índice de actividad emulsificante para diversas proteínas (Tabla 5).

Tabla 5. Índice de Actividad Emulsificante de diversas proteínas.

Proteínas succiniladas de levadura	322
Concentrado proteínico de Lactosuero	119
Proteínas de levadura	8

Fuente: Kinsella; 1978.

2.6 Desamidación de Proteínas.

Las estructuras primarias de las proteínas se pueden modificar químicamente para mejorar sus propiedades funcionales. Este método se ha utilizado con éxito para estudiar las relaciones entre estructura y función de las proteínas.

Es necesario tener en cuenta que dichas modificaciones químicas en piensos y alimentos pueden tener inconvenientes, como una disminución en sus propiedades nutritivas.

2.6.1 Descripción de la reacción de desamidación.

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

Existen diversos métodos de modificación de proteínas como la hidrólisis enzimática, la desamidación química, la acilación y la fosforilación que se han utilizado para modificar las proteínas y así mejorar sus propiedades funcionales (Chan & Ma, 1999, Franzen & Kinsella, 1976).

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).

Calentando a pHs ácidos o alcalinos, se pueden modificar las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos. El calentamiento de las proteínas en un ambiente ácido lleva consigo la desamidación de un 30% de los residuos de glutamina y asparagina, lo que mejora la solubilidad y las propiedades de superficie (especialmente emulsificantes) de la proteína. Estos efectos parecen ser debidos a los cambios conformacionales producidos por la disminución del número de puentes de hidrógeno y el incremento de las repulsiones electrostáticas.

1976; Matsudomi et al., 1986; Kato et al., 1987; Hamada, 1991; Riha, 1996; Flores, 1997).

2.6.2 Tipos de Desamidación

Desamidación Química

La desamidación ácida de las proteínas ocurre a pHs por debajo de 3 y la desamidación básica por arriba de pH 8 a velocidades dependientes de la concentración de iones H^+ o OH^- , de la temperatura, de los residuos de aminoácidos adyacentes. La reacción es compleja debido a que involucra reacciones competitivas, como la I y II (fig. 6). La reacción I involucra un ataque nucleofílico al enlace peptídico del N unido al C del grupo carbonílico en los grupos amida β y γ 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 por qué 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 con H^+ 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 3 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 α -carbonilo unido al péptido (IV) o al β -o γ -carbonilo unido al péptido (V). El enlace peptídico del α -carbonilo es también susceptible a la hidrólisis directa por H^+ o OH^- dependiendo del pH y la temperatura. El uso de ácidos alquil sulfúricos y alquil sulfónicos, iones fosfatos y bicarbonato como catalizadores favorecen la desamidación contra la 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 de agua, capacidad de emulsificación, espumado y viscosidad comparado, con el producto no modificado (Vodjani, 1992, Flores, 1997).

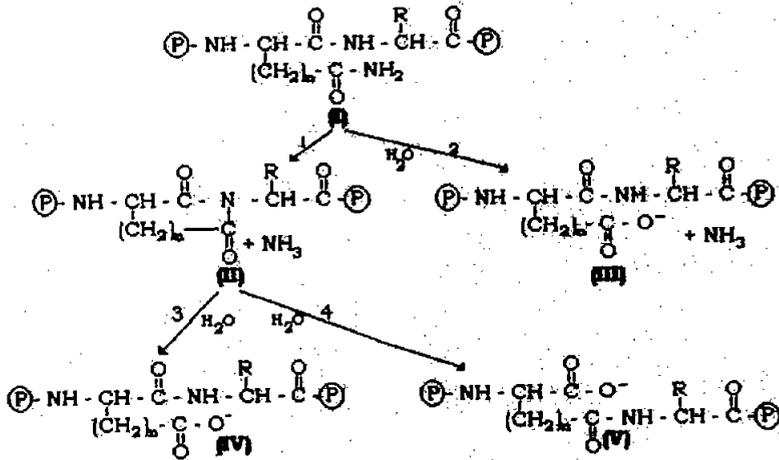


Fig. 6 Desamidación química de las proteínas (Vodjani y Whitaker, 1992)

Desamidación enzimática

Se ha reportado que proteasas como la papaína, la pronasa E y la quimiotripsina que pueden utilizarse para desamidar proteínas con aproximadamente un 20% de desamidación y un 8% de proteólisis (Kato, 1989). La desamidación de la glutamina es catalizada por una enzima no proteolítica: la transglutaminasa (Fig.7). La enzima reconoce específicamente los residuos de L-glutamina de las proteínas (I) y utiliza otros compuestos amidados (el grupo ϵ -amino del residuo de lisina de la misma proteína o de otras proteínas) como nucleófilos para atacar al γ -C del carbonilo y desplazar el NH_2 como NH_3 (III).

La desamidación enzimática es muy específica, sin embargo, el hecho de trabajar con enzimas resulta más costoso, si se habla de que se pretende llevarlo a un proceso industrial.

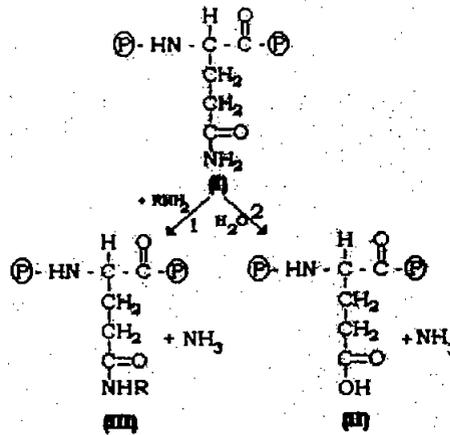


Fig. 7 Desamidación enzimática (residuos de glutamina), catalizando la transglutaminasa (Vodjani y Whitaker, 1992).

3. ANTECEDENTES

Las proteínas utilizadas como ingredientes o aditivos alimenticios sufren cambios durante su extracción y purificación; generalmente se trata de no dañar sus propiedades estructurales y funcionales. Sin embargo las proteínas aisladas pueden modificarse para mejorar así sus propiedades o conferirles otras.

En el área de alimentos constantemente se están buscando materias primas de origen vegetal que posean propiedades satisfactorias (funcionalidad) en los alimentos. El gluten de maíz ofrece una buena opción para este fin ya que posee una alta concentración de proteína (del 50 a 60%), es un subproducto de la industria almidonera del maíz, por lo cual es de bajo costo y es de origen vegetal.

En un estudio biológico en ratas, llevado a cabo en el laboratorio 312 de la Facultad de Química, se evaluó y determinó la calidad de la proteína proveniente del gluten de maíz para evaluar su utilidad como ingrediente o si sólo sería recomendable como aditivo alimentario (Valdéz, S, 2004), encontrándose que debido a la deficiencia de lisina del gluten es más recomendable como aditivo alimentario, ya que presentó una baja calidad proteínica. El elevado grado de hidrofobicidad presente en las proteínas del gluten de maíz provoca una mayor interacción con el aceite al momento de hacer pruebas emulsificantes, con lo cual puede considerarse como un buen emulsificante potencial en la industria de los aditivos alimentarios, teniendo la ventaja sobre los aislados provenientes del trigo de no ser alergénico.

Gorham en 1821, fue el primero en describir las zeínas, después de obtener un aislado de las proteínas del maíz, y fue quien las nombró "zeínas".

Mossé en 1961, propone que las moléculas de las zeínas tienen dos regiones: una porción hidrofóbica y una parte hidrofílica, la parte final de la molécula

contiene grupos hidroxilo lo cual explica la afinidad de las zeínas con los solventes de la misma naturaleza, como el etanol, lo que puede ser aprovechado para llevar a cabo la extracción etanólica. Es importante disminuir y homogenizar la muestra a un tamaño de partícula $<425\mu\text{m}$, ya que Wu en el 2001, encontró que con ésta medida se logra que las partículas tengan un tamaño apropiado para que puedan interactuar mejor con el solvente y con ello la superficie de contacto sea mayor lográndose una extracción más eficiente en los procesos a los que sea sometida la muestra.

Desde 1938 hasta 1943, Swallen y colaboradores patentaron numerosos métodos para extraer las proteínas del gluten de maíz (zeínas), siendo más eficaz la extracción cuando se controlaba la temperatura de $55\text{--}65^\circ\text{C}$ y ajustando el pH a valores de 6 ó 7. Además comenzó a utilizar hexano para remover la fracción lipídica y pigmentos del gluten, ya que una de las desventajas es su intenso color amarillo, que podría limitar su uso para ciertas aplicaciones. En la actualidad existen métodos que eliminan estos componentes; entre los distintos métodos que existen para separar y obtener esos pigmentos se encuentra el de cromatografía, que es una técnica que permite la separación de las sustancias de una mezcla y que tienen una afinidad diferente por el disolvente en el que se encuentran, de tal manera que el disolvente arrastra a los pigmentos según su solubilidad y los separa (Tato, 2002). Con la eliminación de las fracciones de carbohidratos y de grasa en el gluten es posible disminuir las interferencias de estos componentes con las propiedades fisicoquímicas para una buena funcionalidad (Cabra, 2002).

Las proteínas que se encuentran presentes en el gluten de maíz son solubles en etanol al 70%. Shukla *et al.* en el 2000 encontraron que cuando el tamaño de partícula estaba entre los $200\text{--}800\mu\text{m}$ a una temperatura de 50°C se obtenían rendimientos del 60% de la fracción proteínica (zeínas), además de que se obtenía la ventaja de que este solvente se podría recuperar y seguir utilizando.

Osborne (1897;1908, 1924) además de clasificar a las proteínas y agrupar a las zeínas como prolaminas, realizó experimentos en los que extrajo de un 30-40% las zeínas provenientes del maíz, utilizando etanol acuoso al 95%, dicho método no fue considerado apropiado para su industrialización porque es considerado caro ya que el rendimiento obtenido era bajo.

Forbath (1957) determinó que en el proceso de extracción de la fracción proteínica del gluten se incrementaba su rendimiento en un 20% cuando no se hacían las extracciones de manera continua sino haciendo recambios del alcohol (isopropanol) y definió temperaturas de extracción de 60-80°C, reduciéndose además tiempos de extracción.

Hojilla-Evangelista *et al.* en 1990 estudiaron diferentes condiciones de extracción de la fracción proteínica del gluten de maíz (zeínas), reportando que temperaturas de 55°C a 65°C fueron óptimas para la extracción de las fracciones proteínicas. Posteriormente, se evaluaron diferentes concentraciones de etanol y mezclas para extraer las proteínas del gluten de maíz. Estos mismos investigadores en 1992 extrajeron las proteínas del gluten con etanol al 45% e hidróxido de sodio 0.1M. Además la extracción se mejoraba cuando se eliminaban la grasa y pigmentos del gluten.

Así mismo en los experimentos de desamidación química realizados por Popineau y colaboradores en 1988 llevados a cabo a temperaturas de 70-80°C por 60 minutos, se mejoró la solubilidad. Se ha demostrado que la desamidación produce un aumento en la densidad de carga de la proteína, causando cambios en su conformación debidos principalmente a la repulsión electrostática; dicho cambio conformacional trae como consecuencia la exposición de una mayor proporción de residuos hidrofóbicos en la superficie de la proteína (Mirouni *et al.* 1994; Vodjani, 1994). Nuevamente se demostró que las proteínas del gluten de maíz poseen baja funcionalidad y solubilidad y que la desamidación puede mejorar estas propiedades (Flores, 1997).

4. OBJETIVOS E HIPOTESIS

OBJETIVOS

Objetivo General:

- ◆ Obtener un aislado de proteína con buenas propiedades emulsificantes a partir del gluten de maíz.

Objetivos Específicos:

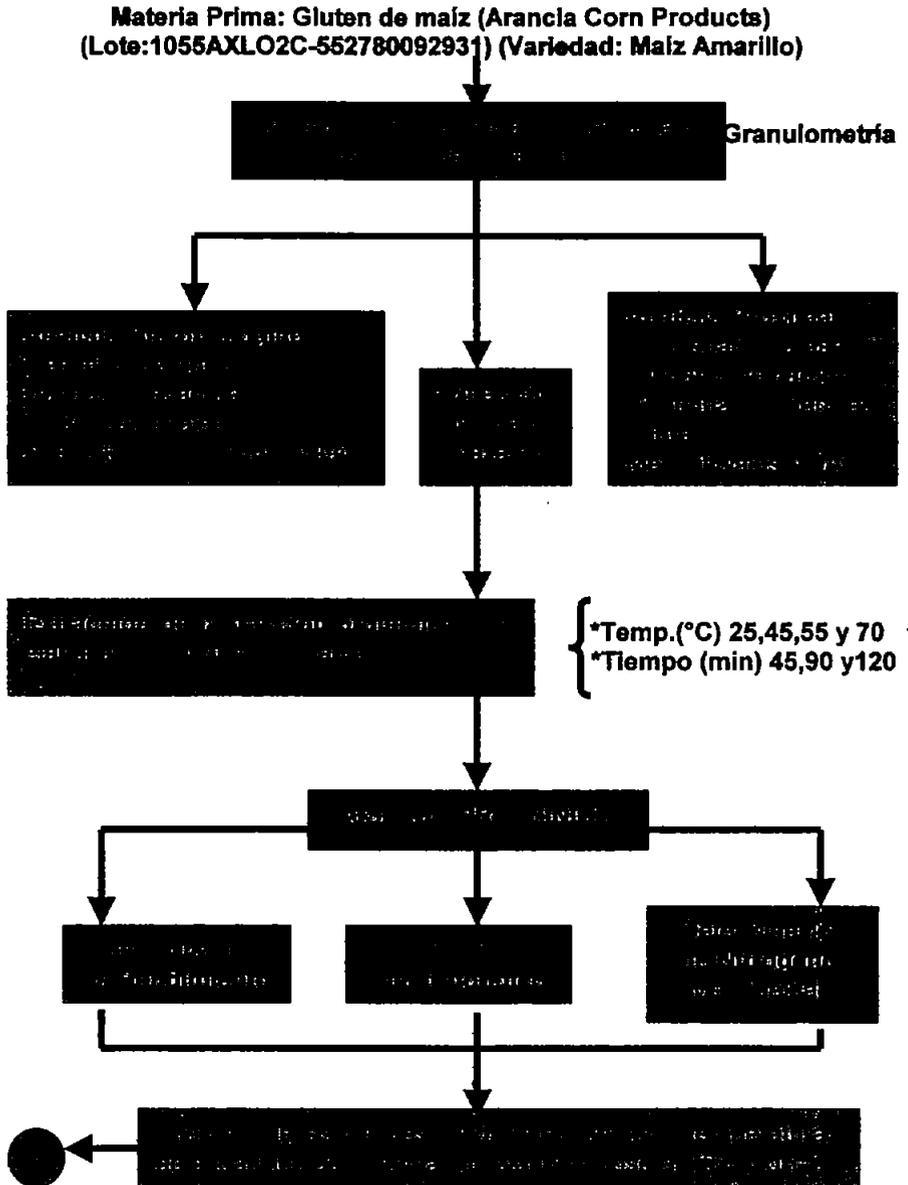
- ◆ Establecer las condiciones de extracción para obtener el mayor rendimiento de la fracción proteínica a partir del gluten de maíz.
- ◆ Establecer las condiciones de desamidación del aislado proteínico que propicien la mejora de las propiedades emulsificantes.
- ◆ Evaluar las propiedades emulsificantes: Estabilidad de Emulsión (EE), e Índice de Actividad Emulsificante (IAE).

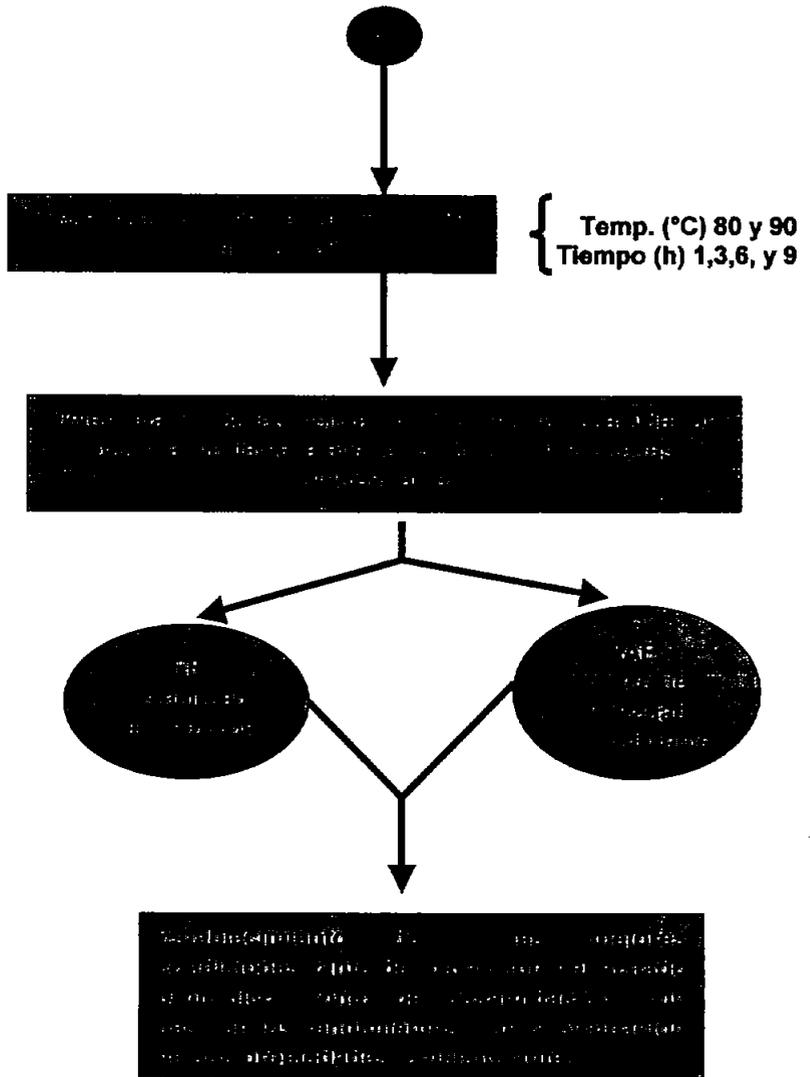
HIPÓTESIS:

“ El aislado de Gluten de maíz desamidado mejorará sus propiedades emulsificantes comparado con el gluten nativo para su posible aplicación en sistemas alimentarios “.

5. METODOLOGÍA.

Se presenta el diagrama de flujo que describe la estrategia metodológica aplicada en este estudio.





5.1 Caracterización de la materia prima.

El gluten de maíz fue donado por la Compañía Glutimex Arancia Corn Products Lote: 1055AXLO2C-552780092931. Que provenía de la variedad de maíz amarillo. Al momento de recibirlo se almacenó en botes de plástico no traslúcidos de 25Kg y con cierre hermético, se mantuvieron en una cámara a 4°C.

5.1.1 Disminución del tamaño de partícula y homogeneización.

La muestra se trituró en un molino de cono con la apertura más estrecha, pasándolo tres veces consecutivas. 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.

5.1.2 Análisis Microbiológico.

Determinación de Mesófilos Aerobios. Se realizó según la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-147-SSA1-1996, Bienes y Servicios. Cereales y sus productos, Harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de cereales, de semillas comestibles, harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

Determinación de Hongos y Levaduras. Se realizó según la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-147-SSA1-1996, Bienes y Servicios. Cereales y sus productos, Harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de cereales, de semillas comestibles, harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Hongos y Levaduras en Alimentos.

Determinación de Coliformes Totales. Se realizó según la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-147-SSA1-1996, Bienes y Servicios. Cereales y sus productos, Harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de cereales, de semillas comestibles, harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales Bienes y Servicios. Determinación de Bacterias Coliformes.

5.1.3 Análisis Proximal del gluten de maíz.

Determinación de Humedad. Se utilizó una termobalanza OHAUS MB200 (EUA); se pesaron aproximadamente 3g de muestra bajo las condiciones de 80°C y 30 minutos, el equipo reporta directamente el porcentaje de humedad, y esta basado en la pérdida de peso. Se hizo por cuadruplicado.

Determinación de Proteína Total. Se realizó mediante el método de la AOAC (1995) No. 960.52 por Micro Kjeldhal. Para la digestión de la proteína se utilizó un equipo Büchi 426 Digestion Unit (EUA), y para la destilación se usó el Büchi 316 Distillation Unit. Se colocó en cada tubo aproximadamente 0.2g de muestra, envuelta en papel, se colocó una pastilla digestora (Mallinkrodt) y 10ml de ácido sulfúrico concentrado, Se realizó por cuadruplicado. Se tituló el amoniaco producido con HCl 1.0N y se calculó el porcentaje de nitrógeno y de proteína presente, mediante las fórmulas:

$$\%N = \frac{(\text{ml problema} - \text{ml blanco}) \times N_{\text{HCl}} \times 0.014 \times 100}{\text{peso muestra en gramos}}$$

$$\% \text{ Proteína} = \%N \times F$$

Donde F es el factor para proteínas del maíz = 6.25

La determinación se hizo por cuadruplicado.

Determinación de Grasa Cruda o Extracto Etéreo. Se realizó según el método de Goldfisch de AOAC (1995) No. 920.39. Se colocaron 4g de muestra en un cartucho poroso de celulosa, y se colocó en el equipo digestor Goldfisch (LABCONCO, EUA), se adicionaron 40ml éter etílico a cada muestra. Se calentó hasta completar la extracción de la grasa. Se secó el extracto a 100°C por 30 minutos, y se calculó el porcentaje de grasa por diferencia de peso. La determinación se realizó por quintuplicado.

Determinación de cenizas. Se realizó según el método de la AOAC (1995) No.923.03, mediante la calcinación de la muestra. Se pesaron 3g de muestra y se calcinaron con mechero en la campana por 1 hora. Se terminaron de calcinar en una mufla (Termolyne 1400 Manufacturada por Bamstead International EUA) a 400°C por 6 horas. Se cuantificó el porcentaje de cenizas por diferencia de peso. La determinación se realizó por cuadruplicado.

Determinación de Fibra Cruda. Se realizó según el método de la AOAC (1995) No. 962.09. Se utilizaron 200ml de H₂SO₄ al 1.25% y NaOH al 1.25% en vasos Berzelius y se colocaron en el equipo de Fibra, Equipo de Digestión Labconco (EUA); se agregó 1g de muestra y se llevó a acabo la digestión. Se secaron los residuos en estufa a 100°C por 2 horas y se calculó el porcentaje de fibra por diferencia de peso. Se realizó por triplicado.

Determinación de Hidratos de Carbono. Los carbohidratos fueron cuantificados por diferencia al tener los valores de proteína, humedad, cenizas, grasa y fibra. En el caso del análisis proximal de la muestra. Sin embargo en los aislados se determinaron por el método de Fenol-Sulfúrico (Carbohidratos totales), ver anexo.

Determinación del pH. Se realizó según el método de la AOAC (1995) No.943.02 se midió con un potenciómetro Marca Corning, Mod.340 (EUA). La determinación se hizo por triplicado.

Características Organolépticas. Esta evaluación se hizo empleando los sentidos del olfato, la vista, y el gusto.

5.2 Obtención del aislado de gluten de maíz.

Pre-tratamiento de la muestra gluten de maíz.

El pretratamiento de la muestra se realizó mediante el desgrasado, por lotes utilizando hexano, con agitación constante con propela y a temperatura ambiente. Se evaporó el hexano y se cuantificó la grasa extraída por diferencia de peso. Se hicieron tres recambios del hexano por periodos de una hora. La muestra se almacenó en recipientes de plástico a 4°C.

5.2 Obtención del aislado de gluten de maíz (Extracción Etanólica)

Se colocaron 50g de gluten desengrasado en tubos para centrifuga Beckman, y 200ml de EtOH 70% a pH=11, se agitaron durante diferentes periodos de tiempo (45, 90 y 120 minutos) a 250rpm, y a temperaturas de 25°C, 45°C, 55°C y 70°C; posteriormente se centrifugaron en una centrifuga Beckman J2-MC (EUA) a 10,000 rpm a 4°C por 30 minutos. Se hicieron dos extracciones más a cada una de las muestras. Se colectaron los sobrenadantes a los cuales posteriormente se les evaporó el etanol utilizando un rotavapor (Rotavapor Büchi No. 66RO323, Suiza) y un baño de agua (Baño recirculador, Marca Grant, Modelo Type Ka(L), Inglaterra) a una temperatura de 70-80°C. Las muestras se secaron en un secador de charolas Oven Series 9000 Thermolyne (EUA) a 50°C por 23h. Se utilizó una trituradora (Marca Osterizer Mod. 07IV, (EUA)) para disminuir y homogenizar el tamaño de partícula de los aislados proteínicos obtenidos.

Para cada condición se realizó la obtención del aislado por triplicado.

5.3 Caracterización del aislado de gluten de maíz.

Perfil electroforético de las proteínas del gluten de maíz y de la de los aislados.

Las muestras se solubilizaron con una solución de urea 8M, SDS 10% y β -mercaptoetanol 0.01M de la siguiente manera: se colocaron 10mg de muestra en tubos eppendorf y 1mL de esta solución. Posteriormente se agitaron en un agitador para tubos eppendorf (Marca Termomix Eppendorf) a 70°C y 14000rpm hasta su total disolución.

Se determinó el contenido de proteína soluble por el método de Lowry (Técnica en el anexo). Las muestras se analizaron en geles de electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes al 20% de acrilamida de acuerdo a la técnica de Laemmli (1970). Se cargaron 30 μ g de proteína en cada carril. Se corrieron en una cámara de electroforesis (Marca Bio-Rad Mod. Mini Protean II, (EUA)). La tinción se realizó con azul de coomassie. Se utilizaron marcadores de bajo peso molecular (Marca: Bio-Rad).

Determinación del contenido total de Proteína en los aislados.

Se realizó para cada aislado obtenido, la determinación de proteína por Micro Kjeldhal mediante el método de la AOAC (1995) No. 960.52.

5.3.1 Aminograma del aislado del gluten de maíz.

El aminograma se llevó a cabo utilizando un autoanalizador de aminoácidos de alta resolución (System 6300 High Performance Amino Acid Analyzer, Beckman Instruments Inc. EUA), en el laboratorio de Química y Análisis de Alimentos del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM. Se calculó para cada aminoácido indispensable la relación con respecto a la cantidad presente del mismo en la proteína de referencia, usando el patrón general sugerido por la FAO/WHO/UNU.

5.3.2 Desamidación de los aislados proteínicos.

El proceso de desamidación de las muestras se llevó a cabo mediante la técnica desarrollada en el grupo de investigación del laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM por Flores, I. en 1997 utilizando HCl 0.12N. Así mismo siguiendo las recomendaciones de Suárez, P. (2004) también del mismo grupo de investigación se determinó para el gluten de maíz, que las mejores condiciones de desamidación fueron de 80°C durante 1, 6, 9 y 11 horas de reacción, por lo que se eligieron estas condiciones para desamidar los aislados. Además se trabajó a 90°C, lo que supone mayores grados de desnaturalización de la proteína y mayor exposición de los residuos de aminoácidos, tanto polares como hidrofóbicos. Se prepararon suspensiones de proteína en 70% de etanol, al 0.5, 1.25 y 2.5% de proteína (w/v) a las cuales se les adicionó HCl hasta una concentración final de 0.12N. Se llevó a cabo la reacción de desamidación en matraces Erlenmeyer de 300ml para los tiempos de 1, 3, 6 y 9 h y para las temperaturas de 80 y 90°C. Las incubaciones se llevaron a cabo a 150 rpm (Marca: New Brunswick. Modelo: Controlled Environment, (EUA)). Al término de la reacción de desamidación, las suspensiones se enfriaron a 4°C y neutralizaron con NaOH 0.8N hasta un pH final de 7-7.5.

El grado de desamidación se determinó según el método de Amtfield y Murria (1981), utilizando un Kit de cuantificación de amonio (Marca Roche Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Ammonia UV-method) (ver anexo).

5.4 Evaluación de las propiedades emulsificantes del aislado proteínico obtenido a partir del gluten de maíz.

Formación de la emulsión

Las suspensiones de las muestras desamidadas se llevaron a un volumen de 75 ml con buffer de fosfatos 0.1M y pH=7 (por duplicado), a cada matraz se le adicionaron 25mL de aceite de maíz con bureta de forma constante y se homogenizaron (Marca IKA Mod. T25 BASIC, Inglaterra-Laboratorios Wolf) a 20500rpm/2min.

Estabilidad de Emulsión (Dagorn y col., 1987) .

Se vertieron volúmenes suficientes de emulsión en tubos para centrifuga con capacidad de 15mL (Nalgene) por cuadruplicado y se centrifugaron a 3000rpm/10min (Centrífuga Termo IEC Mod. CENTRA CL12, EUA). La determinación de la estabilidad de emulsión se hizo midiendo el porcentaje de aceite que sale de la emulsión y se informa como aceite coalescido:

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

donde: V_s = Volumen de aceite coalescido

V_t = Volumen total

V_{fpd} = Volumen de la fase polar dispersa

= volumen parcial / volumen total = $25 / (75 + 25) = 0.25$

Índice de Actividad Emulsificante.

Se tomaron 200 μ L de cada emulsión y se depositaron en frascos de vidrio que contenían 50mL de una solución de SDS 0.1% y NaCl 0.1M (pH=7). Se agitaron vigorosamente y se leyeron las absorbancias en celdas de vidrio a 500nm (Espectro Milton Roy Mod. petconic 21 D. EUA). La determinación se realizó por sextuplicado.

Las valores de IAE se calcularon de la siguiente forma:

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

donde: T= Turbidez $2.303 \cdot (\text{Densidad óptica}/0.01\text{m})$

0.01m = longitud de la celda

Q = Fracción volumétrica de la fase dispersa, en este caso 0.25

C = Concentración de la solución proteínica (g/m^3)

D = Dilución 1/250 o 0.004.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización del gluten de maíz

6.1.1 Disminución del tamaño de partícula y homogenización

Como se puede apreciar en la figura 8A, antes del proceso de molienda sólo el 35.8% del gluten mostró un tamaño de partícula menor o igual a $420\mu\text{m}$, que es el tamaño sugerido por Wu (2001) para la verificación de las mejores propiedades emulsificantes. Tras este procedimiento (Fig. 8B) el 98.13% del gluten presentó un tamaño de partícula igual o menor a $420\mu\text{m}$.

La disminución del tamaño de partícula mejora tanto el rendimiento de la extracción de la fracción proteínica del gluten como el de grasa, ya que a menor tamaño de partícula, mayor superficie de contacto con el solvente y con ello una mejor remoción de la parte de interés, por ello se llevó a cabo la molienda.

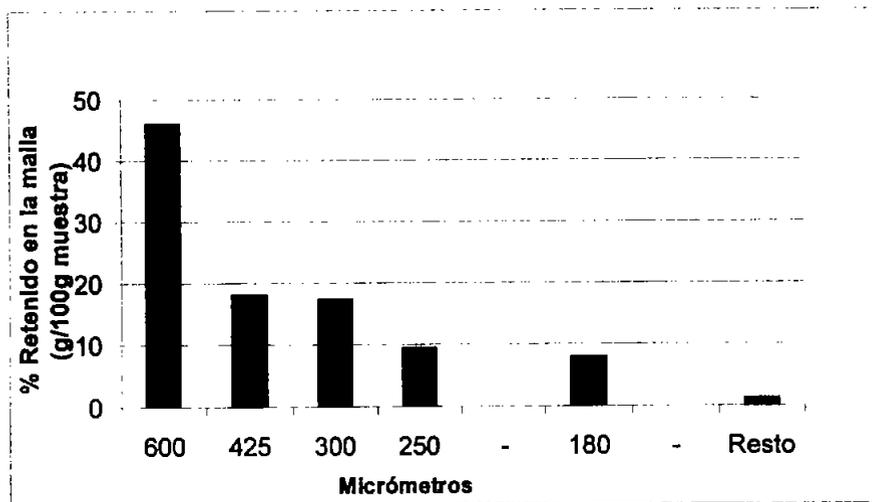


Fig. 8A. Granulometría del gluten antes de ser sometido a molienda.

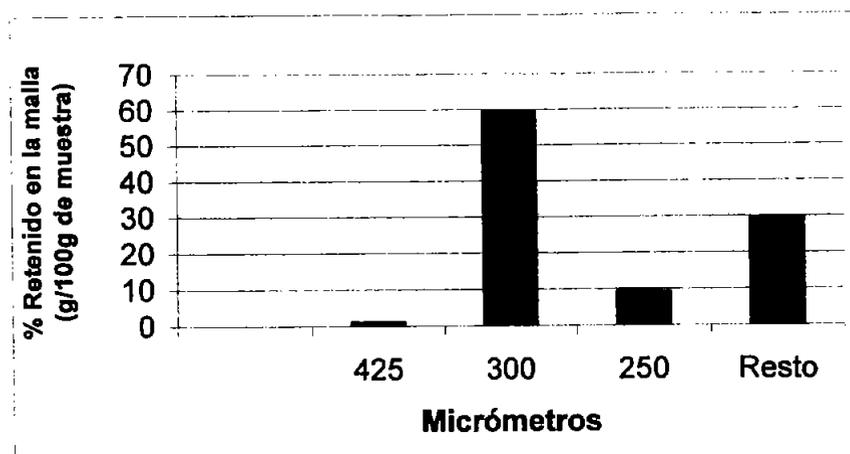


Fig. 8B. Granulometría del gluten posterior al proceso de molienda.

6.1.2 Análisis Microbiológico.

Se realizó el análisis microbiológico de la muestra debido a que es importante conocer si el proceso y el almacenamiento del gluten fueron adecuados. Debido a que no existe una norma específica para el análisis microbiológico del gluten de maíz se tomó como referencia la de harina de maíz.

La presencia de coliformes ha sido utilizada como indicador de contaminación fecal (Jay, 1992), en el caso de materias primas como el gluten, la cuenta de mohos habla del estado de las máquinas, como indicador de limpieza de la planta industrial o del grado de contaminación del equipo (Fraizer, 1993), su principal aplicación incluye determinar la inocuidad de los alimentos como en el HACCP (Jay, 1992). Por otra parte la determinación de mesófilos es importante, ya que son el grupo más abundante que crece en un intervalo de temperatura muy amplio bajo condiciones ambientales de 18-37°C, también indican si el almacenamiento fue apropiado, o bien si existe la posible presencia de microorganismos patógenos (Bourgeors, 1999).

Para todos los casos anteriores se obtuvieron valores inferiores a los límites máximos establecidos por la norma (Tabla 6), razón por la cual se puede deducir que el gluten de maíz con el que se trabajó provino de un proceso en el cual se tuvieron los cuidados necesarios para que la materia prima cumpliera satisfactoriamente con la Norma Oficial Mexicana de Bienes y Servicios, lo cual confirmó que el almacenamiento del gluten fue adecuado y permitió trabajar con él de una manera confiable.

Tabla 6. Resultados del análisis microbiológico del gluten de maíz

Mesófilos aerobios	4 UFC/g	10 000 UFC/g
Hongos y Levaduras	Ausencia	100 UFC/g

6.1.3 Análisis Proximal.

Determinación de Humedad. El contenido de humedad (Tabla 8) estuvo por debajo de lo establecido para la norma de harinas de maíz, que debe ser menor al 10%, y cumplió con lo establecido por el certificado de el proveedor (Arancia Corn Products), el cual indicaba una humedad no mayor a 8.3%, por lo que se puede asegurar que el almacenamiento y manipulación posteriores a la adquisición de la materia prima fueron apropiadas para conservar las características del gluten de maíz. El pH presentado por este lote de gluten fue 4.53 ± 0.02 (Tabla 7), y se encuentra en el intervalo de pH ácido debido a que en el proceso de la molienda húmeda se utiliza ácido láctico (Gómez *et al.*, 1992). Fue mayor en comparación con los reportados por Cabra (2002) y Flores (1997) para otros lotes, sin embargo resultó adecuado para su manejo y conservación. Estas diferencias pudieron deberse a cambios en el proceso de obtención y a la procedencia de las muestras.

Determinación de Proteína Total. La proteína fue el componente principal del gluten (Tabla 8), lo cual concuerda con lo que se ha reportado por Neumann (1984), Watson (1987), Wu (2001), así como lo reportado en los trabajos desarrollados en este laboratorio por Flores (1997) y Cabra (2000). El alto contenido de proteína presentado por el gluten de maíz permite considerarlo como una buena fuente de proteína.

Determinación de Grasa Cruda o Extracto Etéreo. El contenido de grasa determinado resultó elevado (Tabla 8) si se parte del hecho de que provino de un proceso en el cual se llevó a cabo la extracción del aceite de maíz, sin embargo aquí existen diversos factores que influyen en dicho resultado como el equipo utilizado para este fin (la eficiencia de la molienda del grano) o los tiempos de extracción del solvente (hexano) utilizado en la determinación de grasa. En este proceso también se extrajeron los pigmentos del gluten, ya que su intenso color amarillo es debido a la presencia de carotenos (beta-caroteno y zeaxantina) que son liposolubles y por ello se extraen con solventes como el éter (Cuantificación de grasa Método de Goldfish). Sin embargo este valor estuvo por debajo de lo reportado por Cabra (2002) y Wu(2001) para gluten de maíz.

Determinación de cenizas. El contenido de cenizas estuvo dentro de los intervalos indicados para gluten de maíz reportados por Wu (2001) y Cabra (2002) (Tabla 8), lo que indica que la presencia de minerales en el gluten como son el potasio, fósforo, magnesio, manganeso, hierro y calcio se mantiene en concentraciones más o menos similares al final del proceso de la molienda húmeda.

Determinación de Fibra Cruda. El contenido de fibra fue alto comparado con lo reportado por Flores(1997) y Cabra(2002) para otros lotes de materia prima (Tabla 8), lo cual pudo haberse debido a una ineficiente remoción durante el proceso de la molienda húmeda.

Determinación de Hidratos de Carbono. Los hidratos de carbono constituyeron aproximadamente el 25% del gluten. Este valor puede considerarse elevado, si se considera que el gluten proviene de un proceso cuya finalidad es la extracción de almidón del maíz. Esto se debió posiblemente a que la separación del almidón y la proteína en el proceso de extracción no se llevó a cabo en su totalidad, a factores como la temperatura y el tiempo de remojo, que modifican 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), pudieron contribuir para evitar separar completamente al almidón.

Tabla 7. Determinación del pH

Gluten	Gluten 100%	Gluten 200%
4.53±0.02	3.5±0.03	3.9±0.01

Tabla 8. Composición proximal del Gluten de maíz % (g/100g gluten de maíz).

Componente	Gluten 100%	Gluten 200%	Gluten 300%	Gluten 400%
Proteína	60.86±0.59	58.32	58.23	60-73
Carbohidratos*	19.58	25.77	25.77	-
Cenizas	2.4±0.31	1.42	1.7	1.3-2.4

* Datos obtenidos en el presente trabajo

*La cuantificación de carbohidratos se determinó por diferencia

En cuanto a las características sensoriales (Tabla 9), la muestra evaluada cumplió satisfactoriamente con las características sensoriales correspondientes al gluten de maíz.

Tabla 9. Características sensoriales

Color	Amarillo canario
-------	------------------

6.2 Extracción y caracterización del aislado de gluten de maíz.

6.2.1 Establecimiento de las condiciones de extracción del aislado proteínico

El proceso de extracción o remoción de la grasa del gluten de maíz se consideró como un pretratamiento necesario para remover la grasa remanente del proceso de la molienda húmeda (Tabla 10). Se utilizó hexano porque es el solvente permitido y utilizado en la industria de alimentos y porque permite extraer ácidos grasos de cadena larga que son los que se encuentran en los triglicéridos del grano de maíz. La remoción de la fracción lipídica es importante porque existen interacciones de las proteínas con los lípidos que afectan las propiedades emulsificantes, por lo que se aconseja la eliminación de los componentes que interfieren en la formación de las emulsiones Cabra(2002). Debido a la disminución del contenido lipídico se analizó nuevamente el contenido de proteína en el gluten de maíz, encontrándose en valores ligeramente superiores que se reportan en la tabla 10.

Tabla 10. Tabla comparativa del efecto del proceso de desgrasado del gluten de maíz en la concentración total de proteína

Grasa	4.8	1.5

Como se presentó ya en los antecedentes, el elegir una extracción de la fracción proteínica del gluten, utilizando etanol al 70%, se basa en que el gluten está compuesto mayoritariamente de prolaminas, proteínas solubles en soluciones alcohólicas e insolubles en agua y que poseen un alto porcentaje de aminoácidos hidrófobicos (Mossé, 1961; Shukla y col. 2000).

En el diseño experimental del proceso de extracción se aplicaron diferentes temperaturas: se utilizaron 25°C (temperatura ambiente), y temperaturas de 45°C y 55°C, de acuerdo con lo reportado en estudios previos (Hojilla-Evangelista y col., 1990) en los que a temperaturas alrededor de 50°C se extraen la mayor parte de las zeínas. Por encima de 40-50°C el movimiento de las moléculas es suficiente para romper los enlaces implicados en la estabilización de las estructuras secundaria y terciaria de la proteína (Cheftel, 1989). Por otra parte se propuso una temperatura más elevada (70°C), con la finalidad de analizar si en estas condiciones se logran mayores niveles de desnaturalización de las proteínas y se lograba con ello un mayor rendimiento de extracción. Los contenidos proteínicos de los aislados obtenidos se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Contenido proteínico de los aislados obtenidos bajo las diferentes condiciones de extracción (g proteína/100 g de muestra seca)

45 min	92.15±1.03	88.86±0.27	92.73±0.60	91.27±1.77
120 min	87.55±0.85	90.74±0.77	90.37±1.51	90.92±0.64

El contenido de proteína en todos los productos resultantes fue mayor al 90%, lo que permitió considerar a los materiales resultantes como aislados proteínicos, si se comparan con los aislados proteínicos comerciales de soya que contienen un 90% proteína, o con un concentrado de girasol que contiene un 67% de proteína, (Cheftel, 1989)

Mediante el procedimiento de desgrasado y la extracción etanólica se concentró la fracción proteínica. Se determinó también el contenido de hidratos de carbono totales en los aislados obtenidos observándose una disminución en su contenido, y se cuantificaron por el método de fenol-sulfúrico (Ver Anexo). Este método permite cuantificar los carbohidratos totales, ya que el ácido sulfúrico hidroliza todos los enlaces glucosídicos, permitiendo su cuantificación (Tabla 12). Esto convierte al aislado en un material más atractivo para utilizarlo como aditivo en los alimentos, ya que el desgrasado y la eliminación de carbohidratos eleva el contenido de proteína, debido a que se concentra.

Tabla 12. Contenido de hidratos de carbono de los aislados obtenidos bajo las diferentes condiciones de extracción (g carbohidratos/100 g de muestra seca)

45 min	2.93±0.80	2.84±0.33	2.49±0.73	3.05±1.35
120 min	2.76±1.05	2.82±0.94	2.65±0.20	3.59±0.78

No se observa una gran diferencia entre los valores reportados en el contenido de carbohidratos totales en los aislados.

Se calcularon los rendimientos de la extracción: la mayoría de las condiciones probadas produjeron rendimientos mayores al 60% (Fig. 8), aceptables por la industria, sin embargo, los rendimientos cercanos al 80% se obtuvieron con 45°C/90 min, 45°C/120 min y 70°C/45 min. Para la aplicación industrial es indispensable considerar los gastos de tiempo y energía de los procesos, razón por la cual se eligieron como condiciones de extracción más adecuadas para la aplicación industrial 45°C/90 min, ya que se obtuvo un elevado rendimiento, con una operación que requeriría menores gastos.

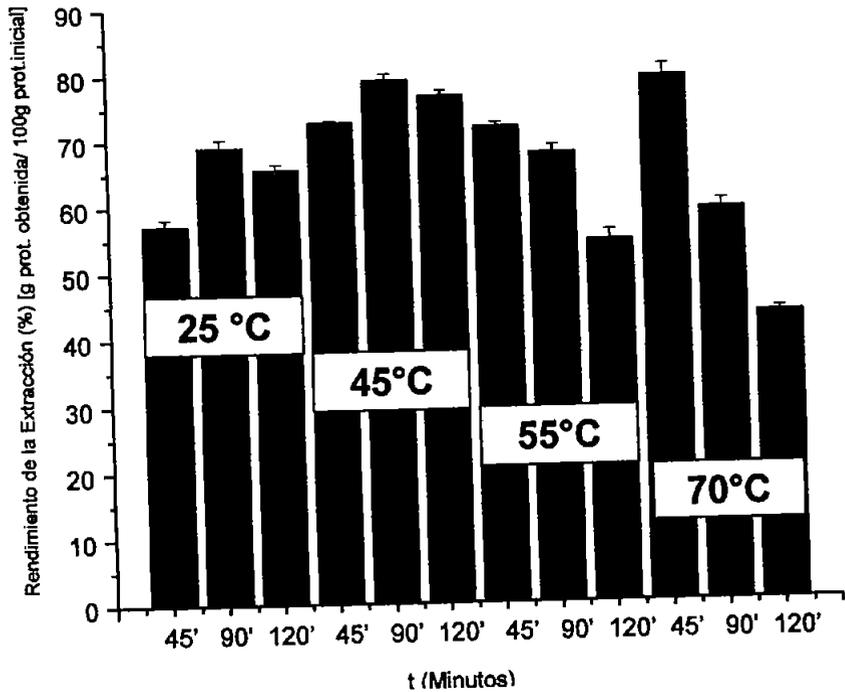


Figura 8. Rendimiento obtenido bajo diferentes condiciones de extracción
% (g de proteína en el aislado/ 100 g de proteína iniciales)

6.2.2 Caracterización del aislado de gluten de maíz

6.2.2.1 Identificación de las proteínas presentes en el aislado proteínico

Las condiciones de extracción utilizadas permitieron extraer la mayor parte de las proteínas presentes en el gluten de maíz. En la Fig. 9 aparecen las bandas correspondientes a las proteínas encontradas que se obtuvieron de las muestras de gluten, así como del aislado obtenido en el laboratorio: las α zeínas de 19 y 22 kDa, con sus correspondientes dímero de 44kDa (se llama dímero cuando se encuentran unidas entre sí dos proteínas con el mismo peso molecular, en este caso están unidas dos proteínas de 22 kDa) y trímero de 66 kDa (cuando se unen tres proteínas del mismo peso molecular), las γ zeínas de 50 y 26 kDa y la β zeína de 18 kDa, la globulina de 31 kDa. La forma en que se encuentran unidas (dos o tres proteínas) es normal debido a sus características hidrofóbicas ya que tienden a agregarse, lo cual concuerda con los hallazgos realizados por Cabra (2002), quien también observó este patrón de bandas y sus asociaciones.

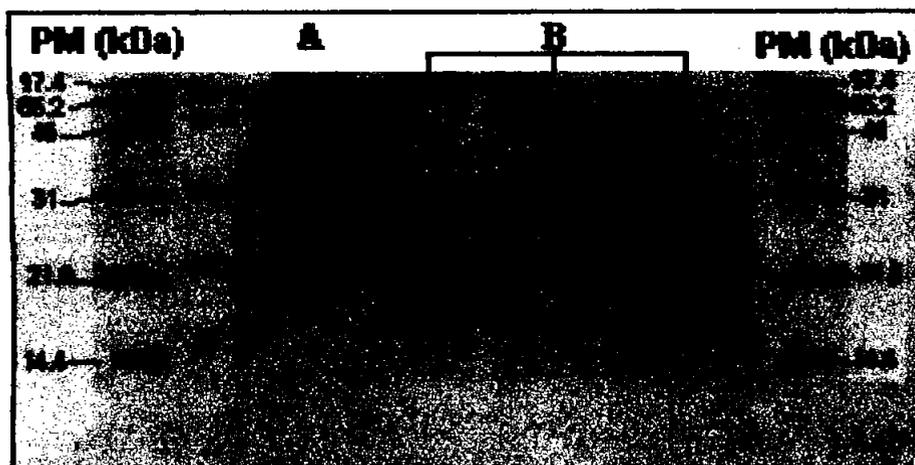


Figura 9. Perfil electroforético de las proteínas de: (A) Gluten de maíz, (B) Aislado proteínico obtenido del gluten de maíz.

Las proteínas más abundantes tanto en el gluten de maíz como en su aislado fueron las α zeínas, encontrándose en un 41.8%, se sabe por los estudios previos del grupo de investigación del laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología son las principales responsables de la capacidad de emulsificación (Cabra., 2002), seguidas en abundancia por las γ zeínas con un 32.5%, la β zeína con 14.9% y la globulina en un 10.7%.

6.2.2.2 Determinación de la composición de aminoácidos del aislado proteínico

El ácido glutámico y la glutamina constituyen casi la quinta parte del total de los aminoácidos (Tabla 13); este elevado porcentaje sugiere cambios importantes en la estructura y propiedades de las proteínas presentes al someterlas a una reacción de desamidación. La leucina y la prolina también son de los residuos más abundantes, que al sumarse con el resto de los residuos hidrofóbicos, constituyen el 47.7% del total de residuos, lo que confiere un elevado grado de hidrofobicidad al aislado proteínico. El contenido en residuos aromáticos es bajo, pero los menos abundantes de todos son la lisina, la metionina y la histidina, residuos que comúnmente se encuentran en bajas concentraciones en los cereales y que son aminoácidos indispensables, por lo que deben ser aportados por los alimentos, ya que si se tienen regímenes deficientes en uno o varios aminoácidos indispensables (Fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano y valina) se impide un crecimiento normal en niños, y puede provocar enfermedades o daños precoces en el cerebro que afectan la capacidad de aprendizaje (FAO, 1973).

Aunque el aislado de gluten de maíz tiene un bajo valor nutricional puede complementarse eficazmente con pequeñas cantidades de proteínas de leche o soya, si fuera a emplearse como alimento humano, sin embargo, se pretende usar como aditivo.

Tabla 13. Composición de residuos de aminoácidos (g/100 g de proteína)

Aminoácido	Gluten desgrasado (g / 100g de proteína)
Aspártico	6.48 ^{cd}
Treonina	4.30 ^c
Serina	5.16 ^c
Glutámico	18.84 ^{cd}
Prolina	9.01 ^a
Glicina	4.04 ^c
Alanina	8.27 ^a
Cisteina	NR ^c
Valina	6.29 ^a
Metionina	2.02 ^b
Isoleucina	5.13 ^b
Leucina	9.20 ^a
Tirosina	3.95 ^c
Fenilalanina	7.76 ^{ab}
Histidina	2.56 ^{bc}
Lisina	2.18 ^{bc}
amoniaco	1.16
Arginina	3.67 ^{bc}
Aa limitante	Lisina

^aGrupos no polares.

^bGrupos aromáticos.

^cGrupos polares.

^dGrupos cargados negativamente.

^eGrupos cargados positivamente.

6.3 Desamidación del aislado proteínico.

Debido a la naturaleza hidrofóbica de las proteínas presentes en el aislado obtenido, en experimentos preliminares con una desamidación química llevada a cabo en medio acuoso, no se obtuvo la solubilización e interacción adecuada de las proteínas con el ácido clorhídrico. Esta es la razón por la cual la reacción se prefirió llevar a cabo en etanol al 70%, un medio etanólico permite la solubilización de las proteínas, pero con la presencia de cantidades de agua necesarias para llevar a cabo la reacción de desamidación.

En la Fig. 10 se presenta la desamidación lograda a diferentes condiciones de reacción, y se observa una mínima diferencia a las dos temperaturas evaluadas, teniendo en promedio un mayor grado de desamidación a 90°C, comparado con los grados de desmidación a 80°C, lo que puede deberse a efectos de apertura de la estructura proteica y la consecuente exposición de los residuos al ácido clorhídrico. El grado de desamidación aumentó en función del tiempo de reacción, es decir, se presentaron mayores grados de desamidación cuando la reacción se llevó a cabo por un periodo de nueve horas que a una hora.

Al aumentar la concentración de proteína y dada su naturaleza hidrofóbica, sobrevienen efectos de agregación. Esto ocasiona que una fracción de los residuos susceptibles de desamidación, no sean accesibles por estar ocultos en los agregados, dificultándose su interacción con el ácido clorhídrico. Esto causó un efecto negativo de la concentración de proteína en el grado de desamidación (Fig. 10). Por ejemplo, a una concentración de proteína del 2.5% se obtuvieron 3.52°D (grados de desamidación) mientras que con una concentración de 0.5% de proteína se obtuvieron hasta 27.90°D.

Los niveles de desamidación de este trabajo fueron significativamente mayores a los obtenidos en los estudios previos del grupo. Se lograron valores de 28°D a 80°C con la utilización de etanol al 70% con concentraciones de proteína de

0.5%, en comparación con los reportados en agua 18°D (Cabra.,2002), lo que implica que el grado de solubilización de la proteína juega un papel fundamental en el proceso de desamidación, al facilitarse la exposición de la glutamina y la asparagina.

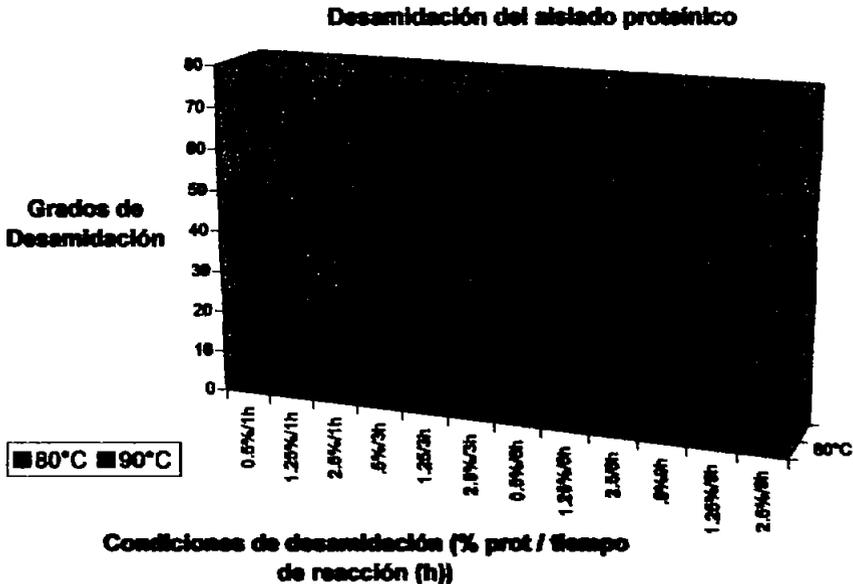


Figura 10. Condiciones de desamidación evaluadas a diferentes tiempos de reacción, temperaturas y concentración proteínica.

El nivel de amidación de los residuos de ácido aspártico y glutámico de una proteína, se utiliza para estimar su capacidad de asociación y por lo tanto su comportamiento funcional cuando forma parte de un alimento (Paredes, 1988). Se ha demostrado que el grado de amidación de una proteína es un indicador de las propiedades funcionales de importancia en los sistemas alimentarios, por lo que resulta importante su cuantificación. Se ha demostrado (Paredes-López y Guevara, 1988), que un mayor grado de amidación es debido a un punto

isoelectrico mayor, debido a la reducción del número de grupos carboxilos que suministran cargas negativas, y que por ende se tendrá una capacidad diferente de asociación e interacción. Una proteína con valores de pH superiores al punto isoelectrico, tiene carga negativa, y las moléculas de agua reaccionan con estas cargas contribuyendo así a su solubilización; la cual es superior en pH alcalinos (por ello se eligió un pH=11) que a valores de pH ácidos; además de que en estas proteínas el número de residuos cargados negativamente a $pH > pI$ (ácido aspártico y glutámico) es superior al número de residuos cargados positivamente para $pH < pI$.

6.4 Evaluación de propiedades emulsificantes del aislado

6.4.1 Determinación de la estabilidad de emulsión del aislado proteínico.

La estabilidad de una emulsión se define como el porcentaje de mantenimiento de la emulsión tras ser sometida a una fuerza centrífuga. Por otro lado se sabe que un emulsificante debe ser agregado en concentraciones menores al 10% (Egan y col. 1993) lo que lleva a concluir que el mejor emulsificante es aquél que se adiciona en la menor cantidad posible. La característica más importante responsable de las propiedades emulsificantes de una proteína es su capacidad para difundirse hacia la interfase aceite/agua y adsorberse. Cuando una parte de la molécula entra en contacto con la interfase, los residuos de aminoácidos no polares se orientan hacia la fase no acuosa y la proteína restante se adsorbe espontáneamente. Además autores como Kato y Nakai (1980), aseguran que cuanto más hidrófoba sea la proteína, más elevada será la concentración proteínica en la interfase que hará más estable a la emulsión. En este trabajo la determinación de la estabilidad de emulsión es crucial, ya que los efectos hasta ahora obtenidos de desnaturalización y aumento de carga, aunados a una posible hidrólisis por efecto del tratamiento térmico ácido podrían tener efectos contrarios sobre la estabilidad.

Teniendo en cuenta los experimentos previos realizados con gluten de maíz modificado por Flores en 1997 y Cabra en el 2002, en los que se prepararon emulsiones al 5 y 1% de proteína, se deseaba conocer el efecto de la concentración de la proteína o el límite en el cual se lograba la estabilidad de emulsión del 100%, por ello se eligieron concentraciones mucho menores al 1%.

Con los aislados proteínicos desamidados por periodos de 1 a 3 horas a 80°C (17.9°D y 55.04°D respectivamente) se obtuvo una estabilidad de emulsión del 100% (Tabla 14), es decir que no se separa el aceite de la emulsión formada y que ésta se mantiene, al utilizar concentraciones tan bajas como el 0.1% de proteína. El efecto del aumento de carga, debido a que el ácido logra desagregar las moléculas de proteína, aunado al calentamiento produce que la molécula anfifílica sea más eficiente para colocarse en la interfase aceite agua impidiendo la desestabilización de la emulsión. El aislado obtenido en estas condiciones logró funcionar en cantidades muy bajas, en comparación con las que se necesitarían si se utilizara el gluten entero desamidado, ya que se requeriría de un 5% de proteína para emulsificar el 100% del aceite (Flores, 1997; Cabra, 2002).

Tabla 14. Evaluación de la Estabilidad de Emulsión (%) del aislado proteínico, a diferentes concentraciones de proteína

Concentración de proteína (%)	Concentración de aceite (%)	Estabilidad de emulsión (%)
0.5/1	100	99.52
0.1/1	100	99.70
0.25/3	100	100
0.5/6	100	0
0.1/6	100	0
0.25/9	100	0

El incrementar la temperatura de desamidación de 80 a 90°C (Tabla 14), permitió una mayor desnaturalización proteínica y con ello, que su estructura fuera más abierta, permitiendo un mayor contacto del ácido clorhídrico con los residuos de aparagina y glutamina. Esto permitió que la superficie expuesta de la proteína se cargara y mediante interacciones del tipo de Van der Waals, así como puentes de hidrógeno, se lograra la estabilización de las fases aceite y agua en su interfase. Esto se logró incluso para los aislados tratados por periodos de tiempo más largos: desde 1 a 6 horas de desamidación a 90°C, obteniéndose un 100% de estabilidad de emulsión.

Sin embargo al comparar los resultados de desamidación con la estabilidad de emulsión del aislado se observó que no existe una correlación clara entre los grados de desamidación y las propiedades emulsificantes. Esto puede explicarse si se considera que el proceso completo de desnaturalización térmica y aumento de carga es más importante, en conjunto, que el simple proceso de desamidación, sobre las propiedades emulsificantes. Es importante hacer énfasis también en que para una emulsión preparada con la misma concentración de proteína (2.5%), tratada a 80°C pero en distintos tiempos: 1 y 6 horas, se obtuvieron grados de desamidación de 3.52°D y 7.82°D respectivamente, pero no se logra sostener la estabilidad de emulsión que cae de 99.52% (prácticamente estable) a 0% de estabilidad de emulsión, cuando un alto grado de desamidación (7.82°D) es alcanzado con un tratamiento a 80°C.

Cabe resaltar que, en general, el obtener grados de desamidación elevados (70°D) no implicó una mejoría en las propiedades emulsificantes, por el contrario, cuando la proteína se expuso por periodos largos (9 horas) al HCl (Ver Fig. 11) a las mismas concentraciones (0.12N), se provocaron cambios estructurales que llevaron a la pérdida de la funcionalidad, probablemente causados por una hidrólisis. Así también para el aislado sin desamidar se obtuvieron valores de 0% de estabilidad de emulsión.

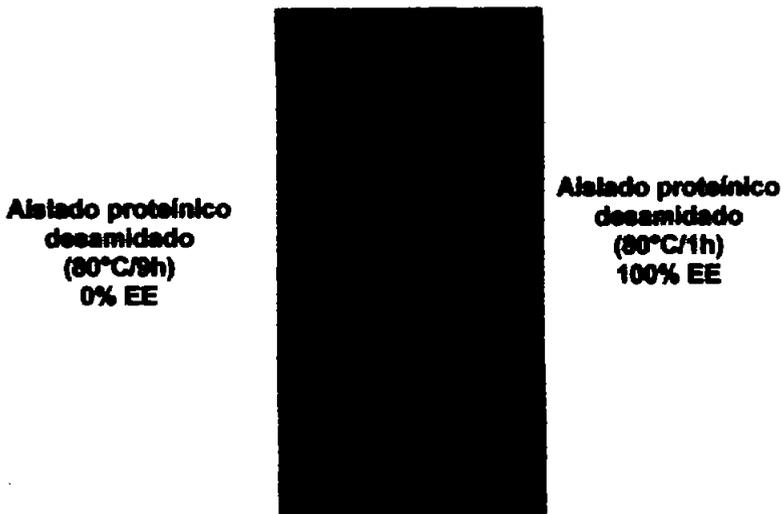


Figura 11. Comparación de una emulsión con 0% EE y una con una EE del 100%.

6.4.2 Determinación del índice de actividad emulsificante (IAE) en el aislado proteínico.

El índice de actividad emulsificante está definido como el área de superficie total de la emulsión estabilizada por gramo de proteína, lo que da una buena idea del área de interfase. Para dicha determinación fue necesario hacer la emulsión como cuando se determinó la EE, al colocar la muestra en un medio con SDS, le confiere carga a la superficie de la molécula de la proteína, lo que hace posible que se aprecien las pequeñas gotitas de aceite que son estabilizadas por la proteína. Entre más pequeño sea su diámetro, mayor será el área de superficie de la emulsión.

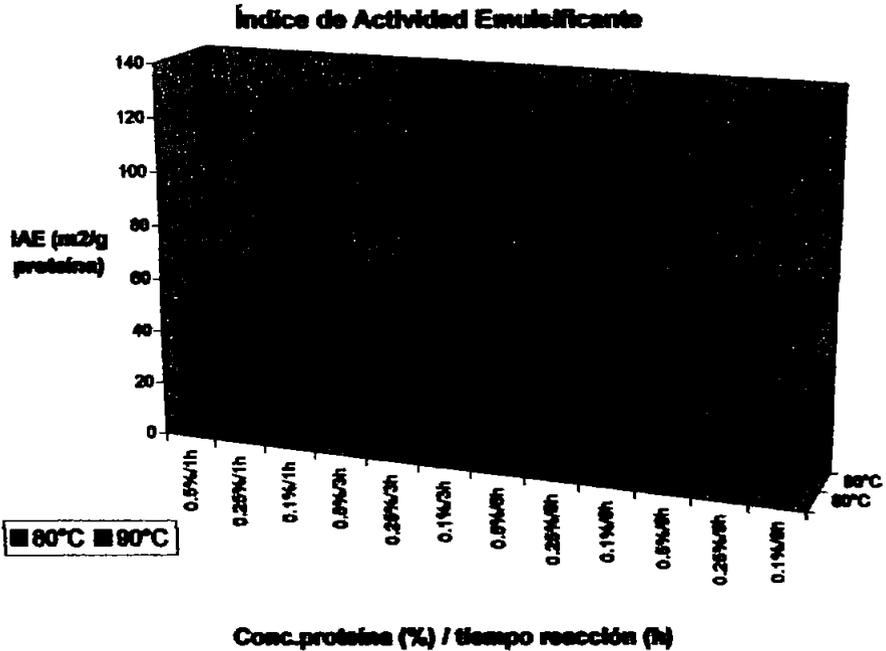


Figura 12. Evaluación del índice de actividad emulsificante del aislado proteínico a diferentes concentraciones de proteína y desamidación.

Utilizando concentraciones menores de proteína (0.1%) al parecer el índice de actividad emulsificante se incrementa. Esto puede ser explicado por que una vez cubierta la totalidad de la superficie de las partículas de la emulsión, la proteína restante se agrega sobre las capas ya colocadas en la interfase, y en ese sentido, la proteína excedente no se aprovecha en la emulsión, y se refleja en las cifras de la ecuación del IAE.

Los valores del Índice de actividad emulsificante de la Fig. 12 son altos si se comparan con los valores de otras proteínas comerciales como un aislado proteínico de soya o la proteína de levadura (41 y 8 m²/g de proteína, respectivamente) reportados previamente por Pearce y Kinsella, en 1978.

Los resultados hasta este punto indican que el aislado proteínico de gluten de maíz obtenido en este estudio se logró desamidar en condiciones controladas, para obtener propiedades emulsificantes muy eficientes.

7. CONCLUSIONES

- ✦ Tras el proceso de molienda, el 98.13% del gluten presentó el tamaño de partícula adecuado (igual o menor a $420\mu\text{m}$) para la verificación de las mejores propiedades emulsificantes, así como una buena eficiencia en los procesos de la extracción etanólica.
- ✦ El principal componente del gluten de maíz fue la proteína ($60.86\%\pm 0.59$). Los carbohidratos (19.58%) y la grasa ($4.6\pm 0.55\%$) constituyeron las fracciones más abundantes después de la proteína.
- ✦ Con el proceso de extracción de proteína realizado con etanol al 70% a $\text{pH}=11$ permitió obtener aislados proteínicos con contenidos de proteína mayores al 90%, con bajos porcentajes de carbohidratos ($2.17\pm 0.18\%$) y grasa (1.5%), que son características atractivas para su posible uso como aditivo alimentario.
- ✦ Para la obtención de un aislado proteínico atractivo para la industria se sugiere realizar la extracción etanólica a $45^\circ\text{C}/90$ min, con lo que se obtiene un rendimiento de extracción del 80% con los gastos de tiempo y energía bajos en comparación con el resto de las condiciones analizadas.
- ✦ Las condiciones de extracción de proteína permitieron extraer a la mayor parte de las proteínas presentes en el gluten de maíz. Las proteínas encontradas en el aislado fueron: las α zeínas de 19 y 22 kDa, con sus correspondientes dímero (44kDa) y trímero (66 kDa), las γ zeínas de 50 y 26 kDa y la β zeína de 18 kDa, la globulina de 31 kDa.

- ♣ Las proteínas más abundantes tanto en el gluten de maíz como en su aislado fueron las α zeínas encontrándose en un 41.8%, seguidas en abundancia por las γ zeínas con un 32.5%, la β zeína con 14.9% y la globulina en un 10.7%.

- ♣ El ácido glutámico y la glutamina constituyen casi la quinta parte del total de los aminoácidos, lo que sugiere cambios importantes en la estructura y propiedades de las proteínas presentes en el aislado al someterlas a una reacción de desamidación.

- ♣ Se obtuvieron grados mayores de desamidación al elevar la temperatura de 80 a 90°C en aproximadamente 2.3°D.

- ♣ El grado de desamidación aumentó en función del tiempo de reacción cuatro veces más a una concentración de 0.5%, el doble a 1.25% y 0.2% a una concentración de 2.5% de proteína.

- ♣ Se presentó un efecto negativo de la concentración de proteína en el grado de desamidación de cuatro veces más. Por ejemplo a una concentración de 0.5% se obtuvieron 28°D y a 2.5% de proteína se obtuvieron 6.62°D a 90°C.

- ♣ Al aumentar la concentración de proteína se obtuvieron menores grados de desamidación. Por ejemplo a 80°C disminuyeron los grados de desamidación de 27.90°D a 3.52°D a la misma concentración 0.5%.

- ♣ La utilización de etanol al 70% permitió obtener grados de desamidación muy elevados, en comparación con los reportados en medio acuoso.

- ♣ Cuando el aislado proteínico se desamida por periodos de 1 a 3 horas a 80°C se obtiene una estabilidad de emulsión del 100% utilizando concentraciones del 0.1% de proteína.
- ♣ Por otra parte se logró observar que al incrementar la temperatura de desamidación a 90°C, la proteína se desnatura más y con ello se hace mucho más abierta su estructura, lo que permite una estabilización de las fases aceite y agua en su interfase. Esto se logra inclusive por periodos de tiempo más largos desde 1 a 6 horas de desamidación lográndose un 100% de estabilidad de emulsión.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ **Acton, J.C., Ziegler, G.R., and Burge, D.L., Jr. (1983).** "Functionality of muscle constituents in the processing of comminuted meat products. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 18: 99-121.
- ❖ **Arntfield, A. y Murray, A. (1981).** Determination of amide nitrogen in plant proteins using an ammonia electrode. *Can. Ins. Fod. Sci. Technol. J.* 14(3):227-229.
- ❖ **Badul , D.S.,** "Química de los Alimentos", 3a. Edición, Editorial Alambra Mexicana; México. 1996. pp.130-202.
- ❖ **Bourgeois, C.M. J.F.Mescle, J. Zucca.** "Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria". *Microbiología alimentaria.* Ed. Acribia S.A. Volumen I. Zaragoza (España). 1999.
- ❖ **Cabra Ledesma, V.C.,(2002)** Tesis: "Identificación y estudio de las Propiedades Funcionales del gluten de maíz involucradas en la estabilización de emulsiones aceite en agua", México, D.F
- ❖ **Cante., C.J.,R.W. Franzen, and F.Z. Saleeb (1979).** "Proteins as emulsifiers: Methods for assessing the role" , *J.Am. Oil Chem. Soc.* 56: 71A-77A.
- ❖ **Carpernter, K.J., (1973)** Damage to lisien in food processing: its mesasurement and its signigicance. *Nutr. Abst.* 43: 423-451
- ❖ **Chan, W.M., Ma, C.Y., (1999)** "Acid modificatioin of proteins from soymilk residue" (okara), *Food Research International* 32: 119-127.
- ❖ **Cheftel, (1989).** Propiedades funcionales de la proteínas. En *Fennema Food Chem.* Marcel Dekker, 1996.
- ❖ **Chou,D.H. et C.V. Morr, (1979).** Protein water interactions and functional properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.,* 56: 53A-62A.
- ❖ **Dargon, S. C. Gueguen, J. y Lefebvre, J. (1987).** Emulsifyng properties of Pea Globulins as related to their adsortion behaviors. *J. Food. Sci.* 52(2):335-341.

- ❖ **Dejing Fu, Curtis L. Weller and Randy L. Wehling.** Zein: Properties, Preparations, and Applications. Food Sci. Biotechnology. Vol.8, No.1, pp1-10 (1999).
- ❖ **DGPA.** Dirección General de Promoción Agraria. Cadena productiva: de maíz. Análisis de la Oferta a nivel Mundial. (2001). (http://www.minag.gob.pe/dgpa_maiz_mundial.shtml).
- ❖ **Dubois, M.** (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. pp 527.
- ❖ **FAO.** (1994). Producción de maíz en México.
- ❖ **Fennema, O.R.**(1993) " Química de los Alimentos " 3ª. Edición, Editorial ACRIBIA; S.A. Zaragoza España. pp 315-407.
- ❖ **Flores Arguello, I.M.A.**(1997) Tesis: "Modificación enzimática y química del gluten de maíz : Posibilidad de utilización en la industria Alimentaria. México.
- ❖ **Fraizer, W. C.** (1993) Microbiología de los Alimentos. Ed. Acribia. S. A. 4ª. Edición. Zaragoza, España. pp. 72-74.
- ❖ **Forbath, T.** (1957) Revamped flowsheet wins improved zein. Chem. Eng. 64:226-229.
- ❖ **Fox, P.** (ed) (1982). "Developments in Dairy Chemistry" , vol. 1., Proteins, Applied Sci. Pub., London.
- ❖ **Gómez, M.H., Serna-Saldivar, S.O., Corujo, J.Y., Bockholt, A.J., Rooney L.W.,** (1992). "Wet milling properties of quality protein maize and regular corns", in : Quality Protein Maize, (Purdue University, West Lafayette, Indiana). The American Association of Cereal Chemists, Minnesota. Pp 239-260.
- ❖ **Gorham, J.** (1821). Analysis of Indian Corn. Quart. J, Sci. Lit. Art. 2:206-208.
- ❖ **Gosset, P.W., Rizvi, S.S.H. y Backer, R.C.** 1984. "Quantitative analysis of gelation in egg protein system" , Food Tachn., 38(5): 67.

-
- ❖ **Graham, H.D. (ed) (1977).** "Food Colloids" , AVI Publishing Co., Westport, Conn.
 - ❖ **Halling, P.J., C.R.C. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 1981, 15, 155.**
 - ❖ **Hamada, J. S. (1991).** Peptidoglutaminase deamidation of proteins for improved food use. *J. Am. Oil. Chemist Soc.* 68:459-462.
 - ❖ **Hermansson, A.M. (1979) .** "Aggregation and denaturation involved in gel formation in Functionality and Protein Structure" A. Pour-Ei (ed.), *Am. Chem. Soc., Washinton, D.C., pp. 81-103.*
 - ❖ **Hickson, D.W., Dill, C.W., Morgan, R.N. Suter, D.A. y Carpenter, Z.L. (1980).** "A comparason of heat-induced gel strengths of bovine plasma and egg albumen proteins" , *J. Animal Sci.,*51: 69.
 - ❖ **Hiller, R.M., Lyster, R.L.J. y Cheeseman, G.C. (1980).** "Gelation of reconstituted whey powders" , *J.Sci. Food Agric.,* 31: 1152.
 - ❖ **Hojilla, Evangelista., Mila p. Y Lawrence A. (1990).** Optimizing Extraction and Glutelin-Rich Fraction during sequential Extraction processing of corn. *Cereal. Chem.* 80(4):481-484.
 - ❖ **Hutton, C.W. et A.M. Campbell, 1981 _** Water and fat absorption. Pages 177-200. In *J.P. Cherry, ed. Protein functionality in foods. Am. Chem. Soc., Washington, D.C.*
 - ❖ **INEGI. Producción de gluten de maíz en México (de 1994 a Junio del 2004).** Encuesta Industrial Mensual. (Página web).
 - ❖ **James, C., Paulis J., Wail, J. y Anderson, R. (1969).** Effect of sulfur dioxide steeping on structure of glutelin from normal and high-lysine corn. *Abstr. 153. Cereal Sci. Today.* 14:108.
 - ❖ **Jason T., (1992).** Characterization of the charged components and their topology on the surface of plant seed oil bodies. *J. Biol. Chem. Vol.267, No. 22 15626: 15634.*
 - ❖ **Jay, J. M. Microbiología moderna de los alimentos. Ed. Acribia. S. A. 3a. Edición. Zaragoza España. 1992. pp. 490-497.**

-
- ❖ **Kato, A. Miyachi, N.** (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. *C.R.C. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 10: 147-207.
 - ❖ **Kinsella, J.E.** (1982). "Relationships between structure and functional properties of food proteins", in *Food Proteins* (P.F. Fox and J.J. Condon, eds.), Applied Science Publishing, London, pp. 51-103.
 - ❖ **Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage. *Nature.* 227:680-685.
 - ❖ **Marsh, M. N.** (1992). Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ("Celiac Sprue"). *Gastroenterology*, 102:330-354.
 - ❖ **McClements, D. J.** (1999). *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques.* CRC Press. New York, USA. pp. 185-220.
 - ❖ **Mila P. Hojilla-Evangelista y Lawrence A. Jonson.** (2003). Optimizing Extraction of zein and Glutelin-Rich fraction during sequential extraction processing of corn. *Cereal Chemistry.* 80(4): 481-484
 - ❖ **Mimouni, B. Raymond, A. Merle-Desnoyers.** (1994). Combined acid deamidation and enzymatic hydrolysis for improvement of the functional properties of wheat gluten. *J. of Cereal Sci.* 21 :153-165
 - ❖ **Moneret-Vautrin, A., et Andre, C.** (1983) *Immunopathologie de l'allergie alimentaire et fausses allergies alimentaires.* Edition Masson, Paris. En *Fennema Food Chem.* Marcel Dekker, 1996.
 - ❖ **Mossé, J.** (1961). Proteínas de maíz : la zeína. *Ann. Phyiol.* 3:105-139.
 - ❖ **Nakai, S., Powrie W.** (1981). Modification of proteins for functional and nutritional improvements. *Capítulo II*, pp. 217-142. *Am. Assoc. Cereal Chem.* St. Paul, Minnesota.
 - ❖ **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., y Kinsella, J. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of turbidimetric technique. *J. Agric. Food. Chem.* 26:716-723.
- ❖ Peterson, G. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 63:346-350.
- ❖ Popineau, Y., (2002) "foaming and emulsifying properties of fractions of gluten peptides obtained by limited enzymatic hydrolysis and ultrafiltration", *J. Cereal Sci.*, 35: 327-335.
- ❖ Reubsæet, J.L.E. (1998) "Analytical techniques used to study the degradation of proteins and peptides: chemical instability", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 17: 955-978.
- ❖ Riha, W. E. Izza, H. Y. Zhangu. Y C.T. Ho. (1996). Nonenzymatic desamidation of food proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36(3):225-255.
- ❖ Rishi Shukla, Munir Cheryan, y Richard E. De Vor. Solvent extraction of zein from dry-miller corn. *Cereal Chemistry* 77 (6): 724-730 (2000).
- ❖ Robinson, A. B. Scotchler, J. W. Y WcKerrow, J. H. (1973). Rates of nonenzymatic desamidation of glutaminyland asparaginyl residues in pentapeptides. *J. Am. Chem. Soc.* 95:8156-8156.
- ❖ Schmidt, R.H. (1979). "Gelation and coagulation in Functionality and Protein Structure (A. Pour-Ei, ed.), *Am. Chem. Soc.*, Washington D.C., pp. 131-147.
- ❖ Shih, F. F. (1990). Desamidation during treatment of soybean white protease. *J. Food Sci.* 55:27-129,132.
- ❖ Serna Saldívar, S.R.O, "Química, almacenamiento e industrialización de los cereales, AGT Editor, S.A., México 1996, pp.207-239.

-
- ❖ **Shimada, K., and S. Matsushita (1981)**, "Effects of salts and denaturants on thermocoagulation of proteins" , J. Agr. Food Chem. 29: 15-20.
 - ❖ **Stokes, G. G. (1851)**. Wikipedia, la enciclopedia libre. Ley de Stokes.
 - ❖ **Suárez, P. (2004)** Tesis en proceso.
 - ❖ **Swallen, L. C. (1946)**. Zein, colloid. Chem.6:1140-1148.
 - ❖ **Tato, M. L. IES, Victoria Kent, Torrejón de Ardoz. (2002)**. Extracción y separación de pigmentos fotosintéticos. El rincón de la ciencia. No. 19
 - ❖ **Valdéz, Schwartz.(2004)**. Ensayo Biológico en ratas con Gluten de maíz.
 - ❖ **Vegania@ivu.org**
 - ❖ **Vodjni, F. Whitaker, J. R. (1992)**. Chemical and Enzymatic modification of proteins. Academic Press. Pp. 261-299.
 - ❖ **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.
 - ❖ **Watson, A. Ramstad, P. (1987)**. Corn. Am. Assoc. of cereal Chem. Inc. St. Paul Minnesota, USA. pp.273-310.
 - ❖ **Whistler, R.L., E.F. Paschall, eds., Starch: Chemistry and Technology**, volume 1 "Fundamental Aspects", 1965; volume 2 "Industrial Aspects", 1967; Academic Press, New York.
 - ❖ **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, V. Y. (2001)**. Emulsifying activity and emulsion stability of corn gluten meal. J. Sci. Food Agric. 81:1223-1227.
 - ❖ **Wurzburg, O.B., Starch in the food Industry in "Handbook of Food Additives"**, T.E. Furia, ed., p. 377-411, Chemical Rubber Co., Cleveland (Ohio), 1968.
 - ❖ **Zayas, J.F., " Functionality of proteins in food" , Springer-Verlag. Berlín Heidelberg, Germ.**

ANEXO

Protocolos de Técnicas Experimentales

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

CURVA PATRÓN

- Pesarse 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

Tubo	Concentración (mg/mL)	Cantidad ASB (mg)	Volumen (mL)	Concentración final (mg/mL)
1	1.0	0.0	1	Blanco
3	0.8	0.2	1	20
5	0.6	0.4	1	40
7	0.4	0.6	1	60
9	0.2	0.8	1	80
11	0.0	1.0	1	100

PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

a) Solución de CTC (Carbonato de sodio, Tartrato de potasio, Sulfato de cobre•5H₂O)

Concentraciones finales: Na₂CO₃ 10%, CuSO₄•5H₂O 0.1%, Tartrato de K 0.2%

b) Solución de NaOH 0.8 N

c) 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 temperatura ambiente.
- 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 min.
- Después de los 30 minutos se lee la absorbancia a 750 nm. La reacción es estable hasta los 120 minutos de iniciada esta.

Técnica para determinar Carbohidratos totales por el método de Fenol-Sulfúrico (Dubois et.al. 1956)

Preparar una curva patrón de glucosa:

- Preparar 100 mL de una solución de fenol al 5% (pesar 5g de fenol y llevar al aforo con agua destilada).
- Preparar un stock de glucosa de concentración de 100µg/mL.

Curva patrón de glucosa:

1	0	0	1000
3	20	200	800
5	40	40	600
7	60	600	400
9	80	800	200
11	100	1000	0

- Se debe tener la solución de glucosa en un volumen de 1mL
- Adicionar con agitación 1mL de fenol al5% (en campana)
- Adicionar con agitación constante y lentamente 5mL de H₂SO₄ concentrado (en campana). Leer a 490nm (sensibilidad alta).

Nota: Tanto la curva como la medición de las muestras se hace por triplicado.

TÉCNICA PARA DETERMINAR EL GRADO DE DESAMIDACIÓN.

Para determinar el grado de desamidación se utilizó un kit enzimático para la detección de amoníaco (Ammonia UV-Method, R-Biopharm-Roche). Se fundamenta en que el amoníaco, en presencia de glutamato deshidrogenasa y Nicotina adenina dinucleótido reducido (NADH), reacciona con 2-oxoglutarato a L-glutamato, y el NADH se oxida.



Donde GIDH es la enzima glutamato deshidrogenasa

Durante la reacción, la cantidad de NADH oxidada es estequiométricamente equivalente a la cantidad de amoníaco. El NADH se mide por absorbancia a 340 nm, es una determinación indirecta de la cantidad de amonio liberado durante la reacción de desamidación.

Una vez desamidada y neutralizada la muestra se centrifugó a 10000rpm/30minutos/4°C.

- Adicionar 1 tableta NADH y 1mL de buffer oxoglutarato, Vortexear.
- Esperar 5 minutos y leer a 340nm)
- Determinar la cantidad liberada de amonio mediante la fórmula:

$$C \text{ NH}_4^+ = \frac{V \cdot MV \cdot \Delta A \text{ (g/L)}}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000}$$

V = volumen final = 0.32 mL

v= volumen muestra = 0.1mL

MV= peso molecular de la sustancia de ensayo = 17.03 g/mol

d= light path (cm)= 1

ϵ = coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm = 6.3 (mmol⁻¹ * cm⁻¹)

Por consiguiente el contenido de NH_4^+ :

$$\text{Contenido de amonio} = \frac{\text{C NH}_4^+ (\text{g amonio} / \text{L muestra})}{\text{Peso de muestra (g/L muestra)}} * 100 (\text{g}/100\text{g})$$

Una vez determinado el contenido de amonio, se cuantifican el contenido de asparagina y glutamina de la muestra para determinar el grado de desamidación, ya que se parte del hecho de que el amino liberado en la desamidación proviene de estos aminoácidos, y más específicamente del grupo amida.