



**UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA**

CBS

✓ **PERFILES DE SOLUBILIDAD Y
CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE
CONCENTRADOS PROTEINICOS DE
AMARANTO**

Asesor: Jorge Sorianos Santos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

✓ **MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

P R E S E N T A :

✓ **BIOL. MARCO AURELIO CORDOBA SALGADO**

✓ **JULIO, 1995** ✓

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ BAJO LA DIRECCION DEL DR. JORGE SORIANO SANTOS. PROFESOR TITULAR "C" DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado parcialmente por la Fundación Internacional para la Ciencia. (No. de trabajo E/2185).

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

El autor agradece la participación del CONACYT por el apoyo recibido a través de la beca (83017) otorgada durante el desarrollo de este trabajo.

Asimismo, agradezco al Dr. Benito Manrique, Director General de *San Miguel de Proyectos Agropecuarios S.A.* haberme proporcionado la harina de amaranto utilizada en este trabajo.

DEDICATORIAS:

A LA MEMORIA DE MI ABUELA MATERNA, Ma. de la Paz Santana vda de Salgado.

EJEMPLO VIVIFICANTE DE COMO LUCHAR EN ESTA VIDA

A MI ADORADA XHUNAXHI:

QUIEN VIVE ETERNAMENTE EN MI CORAZON.

A MI MADRE:

FUENTE ETERNA DE REDENCION Y CARIÑO.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES:

Al Doctor Jorge Soriano Santos:

Por el apoyo incondicional recibido durante esta maravillosa travesía de trabajo, de contemplaciones y reflexiones.

Gracias por su amistad.

AGRADEZCO EN TODO LO QUE VALE LA PARTICIPACION DEL COMITE TUTORIAL ASIGNADO PARA LA REVISION DE ESTE TRABAJO.

Dr. Jorge Soriano Santos

Dr. Gustavo Viniegra González

Dra Isabel Guerrero Legarreta

Dra Gabriela Rodríguez Serrano

	página
INDICE GENERAL	
RESUMEN	... 2
JUSTIFICACION	... 4
GENERALIDADES	... 6
I. Descripción botánica de <i>Amaranthus spp.</i>	... 6
II. Proteínas de las semillas de consumo humano.	... 7
III. Composición de las proteínas de la semilla de amaranto.	... 8
1. Composición de aminoácidos de las diferentes fracciones proteínicas de la semilla de <i>Amaranthus spp.</i>	... 9
IV: Factores que afectan la solubilidad de las proteínas.	... 12
V. Propiedades Funcionales.	... 17
1. Emulsiones	... 18
2. Propiedades Espumantes.	... 22
3. Propiedades de absorción	... 26
VI. Modificación Química de proteínas.	... 30
VII. Concentrados proteínicos. Fuentes vegetales, usos, perspectivas.	... 33
OBJETIVOS	... 37
METAS	... 38
HIPOTESIS	... 39
MATERIAL Y METODOS	... 40
I. Naturaleza del concentrado proteínico.	... 40
II: Obtención de los concentrados proteínicos.	... 40
1. Solubilización salina	... 40
1.2 Solubilización alcalina	... 42
1.3 Modificación química (succinilación).	... 42
1.4 Extracción acuosa.	... 42

2. Análisis del nitrógeno por los diferentes métodos de solubilización.	... 42
III. Evaluación de las propiedades funcionales de los concentrados proteínicos de la semilla de amaranto.	... 43
1. Solubilidad	... 43
2. Absorción de aceite ó agua.	... 46
3. Formación de emulsión	... 46
3.1 Actividad de emulsificación.	... 47
3.2 Estabilidad de emulsificación.	... 47
4. Espumado.	... 48
4.1 Capacidad y Estabilidad de Espumado.	... 48
IV. Caracterización fisicoquímica parcial de las proteínas presentes en los concentrados proteínicos de la semilla de amaranto.	... 49
1. Cromatografía de filtración en gel.	... 49
2. Electrofóresis.	... 51
2.1 Cromatografía de Intercambio Iónico	... 51
V. Análisis estadístico.	... 52
RESULTADOS Y DISCUSION	... 54
I. Perfiles de solubilidad del nitrógeno de la semilla de amaranto.	... 54
1. Contenido de nitrógeno de la harina proteínica de la semilla de amaranto.	... 54
2. Solubilidad del nitrógeno del concentrado proteínico de la semilla de amaranto.	... 56
2.1 Solubilidad en disoluciones salinas.	... 56
2.2 Solubilidad en disoluciones alcalinas.	... 61
2.3 Modificación química (succinilación).	... 63
3. Comparación de los métodos de solubilización de las proteínas de HPAD-29.	... 65
II. Evaluación de las propiedades funcionales de los concentrados proteínicos de la semilla de amaranto.	... 70

1. Solubilidad de los concentrados proteínicos de amaranto en función del pH.	... 70
2. Capacidad de absorción de aceite ó agua.	... 72
3. Actividad y Estabilidad de emulsificación de los concentrados proteínicos en función del pH.	... 75
4. Regresión lineal de la Actividad de emulsificación en función del pH o la solubilidad.	... 79
5. Capacidad y Estabilidad de Espumado en función del pH.	... 81
6. Regresión lineal de la Capacidad de Espumado en función del pH ó la solubilidad.	... 85
III. Caracterización Parcial de los concentrados proteínicos de la semilla de amaranto.	... 88
1. Análisis de los perfiles de elución de las proteínas contenidas en los concentrados proteínicos de amaranto por filtración en gel y monitoreo por electrofóresis.	... 88
a) Perfiles de elución de los concentrados obtenidos en disoluciones de NaCl 1M, Na ₂ SO ₄ 0,4M y en agua en disolución amortiguadora de fosfatos de pH 7,5.	... 88
b) Perfiles de elución de los concentrados NaOH (pH-10) y NaOH (pH-11) y succinilado en disolución amortiguadora de fosfatos de pH 7,5.	... 99
c) Perfil de elución de los concentrados NaOH (pH-10) y NaOH (pH-11) y succinilado en disolución amortiguadora de Tris y glicina de pH 8,9.	... 101
2. Análisis de los perfiles de elución de las proteínas contenidas en los concentrados proteínicos de amaranto por cromatografía de intercambio iónico.	... 107
a) Perfiles de elución de la fracción-I(NaCl), fracción-I(Na ₂ SO ₄), fracción-I(H ₂ O), en disolución amortiguadora de fosfatos de pH 7,5.	... 107
b) Perfiles de elución de la fracción-II(NaCl), fracción-II(Na ₂ SO ₄), fracción-II(H ₂ O), en disolución amortiguadora de fosfatos de pH 7,5.	... 109
c) Perfiles de elución de la fracción-I(NaOH-10), fracción-I(NaOH-11), fracción-I(SUCC50%), en disolución amortiguadora de Tris y glicina de pH 8,9.	... 111
d) Perfiles de elución de la fracción-II(NaOH-10), fracción-II(NaOH-11), fracción-II(SUCC50%), en disolución amortiguadora de Tris y glicina de pH 8,9.	... 112

IV Relación de los métodos de extracción de las proteínas, las propiedades funcionales y la caracterización fisicoquímica de los concentrados proteínicos de la semilla de amaranto.	... 116
CONCLUSIONES	... 125
BIBLIOGRAFIA	... 127
EPILOGO	... 128

	página
Tabla 1. Composición de proteínas de diferentes cereales y semilla de amaranto.	... 8
Tabla 2. Composición de aminoácidos esenciales de la semilla de amaranto y otras semillas.	... 9
Tabla 3. Composición de aminoácidos de las fracciones proteínicas de la semilla de amaranto.	... 11
Tabla 4. Composición de aminoácidos de distintas globulinas.	... 12
Tabla 5. Propiedades funcionales de las proteínas de granos de importancia en aplicaciones en alimentos.	... 18
Tabla 6. Factores que afectan las propiedades espumantes de las proteínas.	... 26
Tabla 7. Disoluciones empleadas en la extracción del NTS de la harina proteínica desengrasada (HPAD-29) a diferentes concentraciones molares y fuerzas iónicas.	... 41
Tabla 8. Análisis bromatológico de la semilla de amaranto y sus harinas proteínicas.	... 55
Tabla 9. Rendimientos de extracción del N de la harina proteínica de amaranto desengrasada (HPAD-29) en álcali a diferentes pH.	... 62
Tabla 10. Rendimientos de extracción del N de la harina proteínica de amaranto desengrasada (HPAD-29) a las condiciones óptimas de extracción de cada uno de los métodos empleados.	... 66
Tabla 11. Peso molecular calculado para los diferentes polipéptidos presentes en los perfiles electroforéticos de los concentrados proteínicos de amaranto.	... 67
Tabla 12. Absorción de agua o aceite de concentrados proteínicos de amaranto.	... 73

Tabla 13. Prueba Duncan para la Actividad y Estabilidad de emulsificación de los concentrados proteínicos de amaranto y soya, en función del pH.	... 78
Tabla 14. Análisis de regresión lineal para la capacidad de emulsificación de concentrados proteínicos de amaranto y soya, en función del pH o la solubilidad.	... 80
Tabla 15. Prueba Duncan para la Actividad y Estabilidad de espumado de los concentrados proteínicos de amaranto y soya, en función del pH.	... 84
Tabla 16. Análisis de regresión lineal para la Actividad de espumado de los concentrados proteínicos de amaranto y soya, en función del pH o la solubilidad.	... 86
Tabla 17. Pesos Moleculares calculados para las diferentes fracciones proteínicas obtenidas de la filtración en gel de los concentrados proteínicos de amaranto en Bufer A.	... 94
Tabla 18. Pesos Moleculares calculados para las diferentes fracciones proteínicas obtenidas de la filtración en gel de los concentrados proteínicos de amaranto en Bufer B.	... 105
Tabla 19. Principales propiedades funcionales de los concentrados proteínicos de amaranto.	... 117
Tabla 20. Relación de la caracterización funcional y la caracterización fisicoquímica de las proteínas contenidas en los diferentes concentrados proteínicos de amaranto.	... 122

Figura 12. Perfil de espumado de concentrados proteínicos de amaranto y soya en función del pH.	... 82
Figura 13. Curva patrón de marcadores de peso molecular para filtración en gel	... 89
Figura 14a. Perfil de elución de la filtración en gel en bufer A de las proteínas contenidas en el concentrado obtenido por solubilización en NaCl.	... 89-a
Figura 14b. Perfil de elución de la filtración en gel en bufer A de las proteínas contenidas en el concentrado obtenido por solubilización en Na ₂ SO ₄ 89-a
Figura 14c. Perfil de elución de la filtración en gel en bufer A de las proteínas contenidas en el concentrado obtenido por solubilización en agua (pH 7).	... 89-a
Figura 15a. Perfil electroforético de la fracción II-(NaCl), provenientes de la filtración en gel en bufer A del concentrado obtenido por solubilización en NaCl (1M).	... 91
Figura 15b. Perfil electroforético de la fracción II-(Na ₂ SO ₄), provenientes de filtración en gel en bufer A del concentrado obtenido por solubilización en Na ₂ SO ₄ (0.4M).	... 92
Figura 15c. Perfil electroforético de la fracción II-(H ₂ O), proveniente de filtración en gel en bufer A del concentrado obtenido por solubilización en agua (pH 7).	... 93
Figura 16a. Perfil de elución de la filtración en gel en bufer A de las proteínas contenidas en el concentrado NaOH (pH-10).	... 97
Figura 16b. Perfil de elución de la filtración en gel en bufer A de las proteínas contenidas en el concentrado NaOH (pH-11).	... 97
Figura 16c. Perfil de elución de la filtración en gel en bufer A de las proteínas contenidas en el concentrado succinilado-50%.	... 97

Figura 17a. Perfil de elución de la filtración en gel en bufer B de las proteínas contenidas en el concentrado NaOH (pH-10).	... 99
Figura 17b. Perfil de elución de la filtración en gel en bufer B de las proteínas contenidas en el concentrado NaOH (pH-11).	... 99
Figura 17c. Perfil de elución de la filtración en gel en bufer B de las proteínas contenidas en el concentrado succinilado-50%.	... 99
Figura 18a. Perfil electroforético de la fracción FI-NaOH (pH-10) proveniente de la filtración en gel en bufer B.	... 101
Figura 18b. Perfil electroforético de la fracción FI-NaOH (pH-11) proveniente de la filtración en gel en bufer B.	... 102
Figura 18c. Perfil electroforético de la fracción FI-succ50% proveniente de la filtración en gel en bufer B.	... 104
Figura 19a. Perfil de elución en intercambio iónico (DEAE.Sepharose 6B-CL) en bufer A de la fracción I-(NaCl).	... 108
Figura 19b. Perfil de elución en intercambio iónico (DEAE.Sepharose 6B-CL) en bufer A de la fracción I-(Na ₂ SO ₄).	... 108
Figura 19c. Perfil de elución en intercambio iónico (DEAE.Sepharose 6B-CL) en bufer A de la fracción I-(H ₂ O).	... 108
Figura 20a. Perfil de elución en intercambio iónico (DEAE.Sepharose 6B-CL) en bufer A de la fracción II-(NaCl).	... 110
Figura 20b. Perfil de elución en intercambio iónico (DEAE.Sepharose 6B-CL) en bufer A de la fracción II-(Na ₂ SO ₄).	... 110
Figura 20c. Perfil de elución en intercambio iónico (DEAE.Sepharose 6B-CL) en bufer A de la fracción II-(H ₂ O).	... 110
Figura 21a. Perfil de elución en intercambio iónico (DEAE.Sepharose 6B-CL) en bufer B de la fracción I-(NaOH-pH10).	... 111-a

Figura 21b. Perfil de elución en intercambio iónico (DEAE.Sepharose 6B-CL) en bufer B de la fracción I-(NaOH-pH11).	... 111-a
Figura 21c. Perfil de elución en intercambio iónico (DEAE.Sepharose 6B-CL) en bufer B de la fracción I-(Succ-50%).	... 111-a
Figura 22a. Perfil de elución en intercambio iónico (DEAE.Sepharose 6B-CL) en bufer B de la fracción II-(NaOH-pH10)	... 113
Figura 22b. Perfil de elución en intercambio iónico (DEAE.Sepharose 6B-CL) en bufer B de la fracción II-(NaOH-pH11).	... 113
Figura 22c. Perfil de elución en intercambio iónico (DEAE.Sepharose 6B-CL) en bufer B de la fracción II-(Succ-50%).	... 113

INDICE DE FIGURAS.	página
Figura 1. Principales cambios en proteínas por varias modificaciones químicas.	... 32
Figura 2. Solubilización del Nitrógeno de la semilla de amaranto en disoluciones salinas, alcalinas, en agua y por succinilación.	... 44
Figura 3. Obtención de los concentrados proteínicos de la semilla de amaranto.	... 45
Figura 4. Diagrama de trabajo para la caracterización fisicoquímica de las proteínas contenidas en los diferentes concentrados proteínicos de amaranto.	... 53
Figura 5a. Perfil de solubilidad del Nitrógeno de la semilla de amaranto en disoluciones de NaCl a diferentes fuerzas iónicas.	... 58
Figura 5b. Perfil de solubilidad del Nitrógeno de la semilla de amaranto en disoluciones de Na ₂ SO ₄ a diferentes fuerzas iónicas.	... 58
Figura 6a. Perfil de solubilidad del Nitrógeno de la semilla de amaranto en disoluciones de NaCl a diferentes concentraciones molares.	... 59
Figura 6b. Perfil de solubilidad del Nitrógeno de la semilla de amaranto en disoluciones de Na ₂ SO ₄ a diferentes concentraciones molares.	... 59
Figura 7. Perfil de solubilidad del Nitrógeno de HPAD-29 por efecto de la succinilación.	... 63-a
Figura 8. Perfil electroforético de diferentes tratamientos de succinilación.	... 63-b
Figura 9. Perfil electroforético de los concentrados proteínicos de amaranto	... 67-a
Figura 10. Perfil de solubilidad de los concentrados proteínicos de amaranto y soya en función del pH.	... 71
Figura 11. Perfil de la Actividad de emulsificación de concentrados proteínicos de amaranto y soya en función del pH.	... 76

RESUMEN

La semilla de amaranto se ha considerado como una fuente proteínica, que posee un gran potencial de aplicación en diversos alimentos. En este estudio se obtuvieron diferentes concentrados proteínicos. Se utilizaron métodos que preservan la estructura nativa de las proteínas, como la disolución acuosa y disoluciones diluidas de Na₂SO₄ o NaCl; así como aquellos que modifican la estructura, como la disolución en NaOH en un rango de pH de 9 a 11; también se utilizó la modificación química, en este caso succinilación de las proteínas. Las mejores condiciones para obtener los concentrados proteínicos, se establecieron cuando se solubilizó la mayor cantidad de nitrógeno proteínico y la menor cantidad de nitrógeno no proteínico. Estas condiciones óptimas para la preparación de los concentrados proteínicos fueron: disoluciones en NaCl 1M; Na₂SO₄ 0,4M; en agua a pH 7; en NaOH a pH de 10 y 11, y acilación con anhídrido succínico al 50%. Una vez preparados los diferentes concentrados proteínicos, se evaluaron las siguientes propiedades funcionales: solubilidad; absorción de agua y de aceite; actividad y estabilidad de emulsificación; capacidad y estabilidad de espumado. Estas propiedades fisicoquímicas se evaluaron en función del pH. Se observó que cada uno de los concentrados proteínicos presentaron propiedades funcionales características. Los concentrados proteínicos obtenidos por solubilización en álcali, en un rango de pH de 8 a 10 presentaron las mejores propiedades funcionales; en tanto que el concentrado succinilado, presentó una mayor actividad emulsionante y mayor capacidad espumante, así como mejor solubilidad en un intervalo de pH de 6 a 8, en comparación al resto de los concentrados proteínicos. El concentrado obtenido por solubilización en agua, tuvo la mayor capacidad espumante en todo el rango de pH estudiado.

Se realizaron estudios de caracterización fisicoquímica parcial de las proteínas de los concentrados, por los métodos de filtración en gel y electrofóresis. Los concentrados obtenidos por solubilización en agua y disoluciones de NaCl y Na₂SO₄, presentaron perfiles de elución en cromatografía en gel muy similares, en los que se identificaron dos fracciones proteínicas con peso molecular de 381 kD y 6,71 kD respectivamente. Mientras que las fracciones I y II obtenidas de las proteínas solubilizadas en álcali y succinilación resultaron con pesos moleculares de 466 kD y de 7,61 kD respectivamente. Mientras que las fracciones I y II obtenidas de las proteínas solubilizadas en álcali y succinilación resultaron con pesos moleculares de 466 kD y de 7,61 kD respectivamente. Por otra parte, la elución de las proteínas de los diferentes concentrados en intercambio iónico, éstas lo hicieron a bajas fuerzas iónicas entre 0.1-0.4 M de NaCl, revelando su débil naturaleza eléctrica.

La posibilidad de una aplicación de las propiedades funcionales de las proteínas del amaranto como ingredientes en la formulación de diversos alimentos se puede inferir por la amplia gama de propiedades funcionales de los distintos concentrados proteínicos estudiados. La caracterización fisicoquímica parcial de estos concentrados proteínicos pueden servir como el antecedente de estudios posteriores de la relación estructura proteínica-funcionalidad.

JUSTIFICACION

A nivel mundial la fuente de proteína para la dietas de los seres humanos, se satisface principalmente por cereales o por otras fuentes de origen vegetal *v. gr.* el trigo y la papa en Europa, el arroz en Asia y el maíz y frijol en América. Aunque ha sido preocupación constante la incorporación de especies vegetales que son consumidas a nivel local, tales como la Maduca (*Madhuca butyraceae*), que se consume en algunas regiones de la India; frijoles saltarines (*Psophocarpus tetragonolobus*); la oca (*Abelmoschus esculentus*); (Shanmugasundaram y col., 1989; Okezie y Bello, 1988; Bryant y col., 1988). También se ha contemplado la utilización de subproductos de la extracción de aceites a partir de oleaginosas y otras semillas como el girasol, el algodón, la copra, la soya, el ajonjolí entre otras, para la obtención de concentrados y aislados proteínicos (Sosulki, 1988).

Ha sido una preocupación constante, que los diferentes granos utilizados en la alimentación mejoren tanto en contenido como en calidad de nutrimentos, como las proteínas. Entre las estrategias más utilizadas han sido el manejo empírico del fitomejoramiento y la manipulación genética. Por su parte, la aplicación de técnicas de DNA recombinante abre las puertas para el mejoramiento de características agronómicas, así como de la calidad alimenticia de los productos vegetales (Lumen De, 1990).

El amaranto representa un caso especial, dado que no se puede considerar una especie de reciente incorporación, ya que su consumo data de épocas prehispánicas. El consumo de amaranto por los pueblos mesoamericanos estuvo fuertemente ligado a prácticas religiosas, lo que ocasionó que posterior a la llegada de los europeos, su cultivo, comercialización y consumo estuvieran severamente castigado, lo que provocó que su cultivo fuera parcialmente abandonado. Sin embargo, a partir de la década de los 70's, se han evaluado los atributos que hacían a este grano gozar de preferencia entre las culturas Mesoamericanas.

Cuando se identifica una nueva fuente proteínica de origen vegetal, su incorporación como fuente alimenticia contempla la siguiente estrategia: a) realizar estudios sobre los parámetros fisicoquímicos que influyen en la extracción de las proteínas; b) analizar la funcionalidad de las proteínas de esa nueva fuente vegetal, esto podría dar la pauta para evaluar el potencial de aplicación en diversos alimentos, y finalmente c) tratar de conocer una posible estructura de las proteínas, esto es, conocer los factores intrínsecos que determinan tal funcionalidad.

GENERALIDADES

I. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *Amaranthus spp.*

Amaranthaceae.

Hierbas anuales o perennes, o arbustos con las hojas opuestas alternas, enteras y sin estípulas. Flores actinomorfas, hermafroditas o unisexuales, pequeñas, agrupadas en espigas, cabezuelas o glomérulos axilares. Perigonio calicoide, formado de 3-5 tepalos libres o soldados, opuestos a los tépalos, anteras dorsiforjas e introrsas, con 1-2 tecas, que abren longitudinalmente. Ovario súpero, unilocular, uniovulado, con el estilo corto y el estigma decapitado o bri-tripartido. Fruto utricular, envuelto en el perigonio más o menos persistente. Esta familia está formada de unos 70 géneros y alrededor de 700 especies.

Amaranthus spp.

Flores unisexuales, protegidas por una bráctea y dos bractéolas, perigonio de 5 divisiones erguidas. Estambres 5, libres, con los filamentos delgados y las anteras con 2 tecas. Ovario uniovulado con el estilo muy corto o nulo y el estigma con 3-4 ramas filiformes. Fruto seco, piriforme, indehiscente o dehiscente transversalmente; semillas lenticulares, brillantes. Hierbas tendidas o erectas, con las hojas alternas y las flores en cimas reunidas en espigas, panojas o glomérulos axilares o terminales.

Amaranthus paniculatus var. *leucocarpus* saff. "Alegria"

Planta herbácea robusta que mide 1-1,50 m. tallos erectos, estriados, rojizos o blanco-verdoso. Hojas alternas, largamente pecioladas, con el limbo ovoidal, de unos 8-9 cm de largo. Inflorescencias a veces mayor de 40-50 cm.

Se cultiva mucho por la zona de Xochimilco y Mixquic, florece por el mes de septiembre (Sánchez, 1979).

II. PROTEÍNAS DE LAS SEMILLAS DE CONSUMO HUMANO.

Las proteínas de los granos pueden clasificarse en dos categorías muy amplias de acuerdo a su función en el grano: a) proteínas de reserva, sin actividad catalítica; b) proteínas con gran actividad enzimática sobre las reservas de carbohidratos, los productos de la hidrólisis son indispensables para los procesos de germinación de la semilla. Las proteínas de almacenamiento actúan como reserva de material crudo que puede ser rápida y eficientemente movilizado para ayudar al crecimiento inicial de la germinación. (Wright, 1987). Así mismo, estas proteínas se caracterizan por estar abundantemente presentes en las semillas en forma de cuerpos proteínicos; no exhibir una intensa actividad enzimática y por tener como función, ser fuente de nitrógeno y carbono durante la germinación (Utsumi, 1992).

Las principales proteínas de almacenamiento de los cereales son las prolaminas (solubles en alcohol); en el trigo, la cebada y el centeno se encuentran presentes en 40-50%, en tanto que las glutelinas comprenden alrededor del 35-40%. Las prolaminas de

estos cereales se subdividen en gliadinas, jordainas y escaloidinas. En el maíz (*Zea mais*), sorgo (*Sorghum bicolor*) y mijo (*Pennisetum americanum*), las prolaminas se cuentan 50-60%, en tanto que las glutelinas son 35-40% de las proteínas totales. La avena y el arroz presentan globulinas y glutelinas respectivamente, como principales proteínas, aunque también presentan bajas cantidades de prolaminas (Gorinstein y col. 1991).

III. COMPOSICIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA SEMILLA DE AMARANTO.

La composición de las proteínas de la semilla de *Amaranthus spp* está dada por globulinas y albúminas principalmente. Las glutelinas conforman aproximadamente 30% de los cuerpos proteínicos, en tanto las prolaminas a diferencia de los cereales (Tabla 1) solo se presentan en pequeñas cantidades (Konishi y col. 1985; Bressani y García-Vela, 1990; Paredes-López y col. 1988; Barba de la Rosa y col. 1992).

Tabla 1. Composición de proteínas de diferentes cereales y semilla de amaranto.

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

Bressani y García-Vela (1990).

Sin embargo, estas proporciones pueden cambiar según la variedad, p.e. en el caso del maíz, la variedad 2-opaco obtenida por fitomejoramiento presenta 49 % de

albúmina + globulina (dato no mostrado), en tanto que en el amaranto las variaciones son menores y están comprendidas según la especie de *Amaranthus* que se analice.

1. Composición de aminoácidos de las diferentes fracciones proteínicas de la semilla de *Amaranthus* spp.

El cultivo del amaranto ha sido identificado como un cultivo de gran futuro debido a los excepcionales valores nutricionales que presenta la semilla. Numerosos reportes (Singhal y Kulkarni, 1985; Sánchez Marroquín y col. 1986; Lorenz y Hwang, 1985; Becker y col. 1989; Prakash y Pal, 1992) indican que la semilla de amaranto contiene 13-17% de proteína cruda, así como una más recomendable composición de aminoácidos esenciales y en particular de lisina, que otros granos (Tabla 2) como el maíz, que es deficiente en lisina y triptófano; el arroz en lisina y treonina, el trigo en lisina (Konishi y col. 1985; Bressani y García-Vela, 1990).

Tabla 2. Composición de aminoácidos esenciales de la semilla de amaranto y otras semillas.

grano	g/100 g prot							
	trp	met	thr	ile	val	lys	leu	phe/tyr
amaranto	-	4.1	3.4	3.6	4.2	5.1	5.1	6.0
trigo	0.9	4.3	3.1	3.5	4.7	3.1	7.1	8.0
avena	1.3	4.7	3.5	4.0	5.5	4.0	7.8	8.9
soya	0.7	3.0	4.5	4.0	4.4	6.4	8.4	8.4
maíz	0.6	3.2	4.0	4.6	5.1	1.9	13.0	10.6
arroz	1.0	3.0	3.7	4.5	6.7	3.8	8.2	9.1
fao/who	1.0	3.5	4.0	4.0	5.0	5.4	7.0	6.0

singhal y kulkarni (1988)

En forma genérica se puede decir que las proteínas vegetales son deficientes principalmente en lisina, mientras que las proteínas de legumbres y hojas o follaje son deficientes en metionina. Esta deficiencia primaria de aminoácidos principalmente de lisina o metionina, es intensificada en muchos casos por deficiencias secundarias, p.ej. treonina o triptófano.

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

Las distintas fracciones proteínicas de la semilla de *Amaranthus spp.* presentan distintos patrones de distribución de aminoácidos; las albúminas y globulinas contienen altas proporciones de ácido glutámico y aspártico, así como de lisina y valina, en tanto que las glutelinas son ricas en leucina, treonina e histidina (Tabla 3).

Tabla 3. Composición de aminoácidos de las fracciones proteínicas de la semilla de amaranto.

aminoácido	g de a.a./100 g prot.			
	albumina	globulina	prolamina	glutelina
ile	3.2	3.5	6.2	5.8
leu	4.6	5.4	5.7	10.5
lys	6.6	4.7	4.2	4.6
met	2.1	3.4	7.4	3.1
phe	3.0	4.5	9.0	6.8
tyr	2.5	2.4	4.0	3.8
thr	4.3	3.2	3.2	8.6
val	4.6	4.4	2.7	3.8
his	1.5	2.2	1.1	4.7
ala	6.1	5.0	4.7	3.6
arg	7.5	7.5	9.4	2.7
asp	7.2	7.2	6.2	6.1
glu	20.1	20.0	13.4	13.2
gly	13.1	9.6	4.4	4.9
pro	4.3	5.9	4.7	4.6
ser	5.6	5.8	5.1	5.3

Barba de la rosa y col. (1992), Sequera-Nieto y col. (1992), Soriano Santos (1992).

Cuando se realizó la comparación de la composición de aminoácidos de varias globulinas, provenientes de distintos granos de uso frecuente en alimentos, (Tabla 4) se encontró que existía un patrón de distribución similar para las globulinas de la soya y el amaranto. Así mismo, se ha realizado la secuenciación de aminoácidos para tratar de encontrar una homología entre varias globulinas. Ha sido claro que existen un considerable grado de homología entre éstas, y que las diferencias encontradas están restringidas a un número de regiones variables o inserciones de secuencias, hay al menos tres de tales regiones, las cuales están localizadas en el polipéptido α , en

contraste con el polipéptido β que se conserva, con sólo un mínima cantidad de variación presente cerca del carbono terminal de la cadena (Wright, 1987).

Tabla 4. Composición de aminoácidos de distintas globulinas

aminoácido	g a.a./100g proteína		
	amaranto	soya	cebada
asx	10.1	11.8	9.2
thr	4.1	4.2	7.0
ser	8.6	6.6	19.1
glx	16.6	18.8	19.1
pro	5.4	6.3	4.9
gly	9.2	7.8	7.5
ala	6.2	6.7	6.0
cys	0.9	1.1	1.1
val	6.1	5.6	6.4
met	1.2	1.0	0.9
ile	5.2	4.6	6.4
leu	7.5	7.2	7.4
tyr	2.7	2.5	3.5
phe	5.3	3.9	5.2
his	2.8	1.8	2.2
lys	3.7	4.1	2.9
arg	7.9	5.9	6.6

Konishi y col. (1985)

IV. FACTORES QUE AFECTAN LA SOLUBILIDAD DE LAS PROTEÍNAS.

Las proteínas de reserva de las semillas son predominantes sobre algún otro tipo y tienen gran influencia en la composición de aminoácidos que inciden en la calidad nutricional de la misma. Actualmente se han desarrollado técnicas de

mutación que permiten obtener de fuentes vegetales, proteínas de reserva ricas en lisina.

Al investigar la naturaleza de las proteínas de reserva de origen vegetal p. ej. para modificar sus proporciones originales en la semilla, no es suficiente la información que se obtiene de su aislamiento y caracterización química. También es necesario el estudio de su función en la semilla, para identificar cómo, cuándo y dónde se sintetizan; para reconocer su destino durante el desarrollo de la semilla, maduración y germinación, para determinar su genética y para definir otros factores que regulen su abundancia dentro de la semilla (Shewry y Mifflin, 1983).

El paso inicial para la caracterización química de las proteínas comienza en su aislamiento. Estas tradicionalmente se han aislado y fraccionado por extracciones secuenciales utilizando diferentes disolventes. El agua y las soluciones salinas de fuerza iónica baja, extraen la fracción definida como albúminas, las soluciones salinas las globulinas, el etanol las prolaminas y los ácidos y álcalis extraen las glutelinas (Myers, 1988; Shewry y Mifflin, 1983). De acuerdo a la clasificación mencionada anteriormente, las albúminas y globulinas pueden tratarse como un sólo grupo de proteínas solubles en soluciones salinas (Myers, 1988). Se han reportado análisis de aminoácidos de fracciones de albúmina y globulina preparadas por diálisis de la fracción de las semillas soluble en solución salina, separando la globulina por centrifugación y la albúmina por coagulación con calor. La razón de realizar este

procedimiento en lugar de una extracción secuencial con agua seguida por NaCl, es porque la presencia de sales en todos los materiales vegetales, hace imposible la extracción acuosa de una fracción de albúmina verdadera. Otros autores han utilizado las sales divalentes en lugar del NaCl p.ej. extracciones múltiples de proteínas en K_2SO_4 ó Na_2SO_4 , obteniendo extracciones reproducibles (Myers, 1988).

La solubilidad de las proteínas en el agua depende desde el punto de vista termodinámico, de una disociación simultánea de las moléculas del disolvente y de las moléculas de proteínas, previa a una dispersión de estas últimas en el disolvente, con una superficie interfacial de máximo contacto entre las proteínas y el disolvente con el que reaccionan enlaces hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo e iónicas. La solubilidad depende fundamentalmente del pH, fuerza iónica, tipo de disolvente y temperatura. Una proteína con valores de pH superiores o inferiores al punto isoeléctrico, tiene carga negativa o positiva y las moléculas de agua reaccionan con estas cargas contribuyendo a su solubilización. Además, las cadenas proteínicas que llevan cargas eléctricas del mismo signo, tienden a repelerse y por tanto a disociarse y desdoblarse. Este comportamiento se ha utilizado para solubilizar las proteínas de reserva de las semillas. La solubilidad es mayor con pH alcalinos que a pH ácidos; en efecto, en estas proteínas el número de residuos cargados negativamente a $pH > pI$ (ácido aspártico y glutámico) es superior al número de residuos cargados positivamente $pH < pI$ (lisina, p.ej.). La solubilidad y extractibilidad (rendimiento de un aislado proteínico) a pH

neutro o alcalino pueden mejorarse por aumento de la carga eléctrica neta de las proteínas. Esto puede realizarse, p. ej., por succinilación o maleilación de los radicales lisil, que resultan así portadores de grupos carboxílicos ionizables. También es posible hacer reaccionar las proteínas con moléculas anfipolares que posean zonas hidrófobas e ionizadas diferentes (dodecil sulfato de sodio, p. ej.). En este caso, los residuos hidrófobos se convierten en asociación con estos compuestos, en portadores de cargas negativas (Choi y col. 1982; Cheftel y Lorient, 1989). Compuestos como el 2-mercaptoetanol y el ditiotreitól a bajas concentraciones, inhibe la formación de puentes disulfuro entre proteínas con grupos sulfhidrilo libres reduciendo la polimerización y la insolubilización, así que una adición de estos compuestos en los medios de extracción incrementa la extracción de proteínas (Derbyshire y col. 1976). Los iones de las sales neutras, en un rango de 0.5 a 1 M, pueden aumentar la solubilidad de proteínas (efecto "salting-in"). Los iones reaccionan con las cargas de las proteínas y rebajan la atracción electrostática entre las cargas opuestas de grupos próximos. Por otro lado la solvatación, debido a estos iones, permite aumentar la solvatación de las proteínas y por lo tanto su solubilidad. Si la concentración de las sales neutras es superior a 1 M, la solubilidad de las proteínas decrece y puede conducir a una precipitación. Este efecto "salting-out" resulta de la competencia entre la proteína y los iones salinos por las moléculas de agua necesarias para su solvatación respectiva. Con una fuerte concentración salina, no hay bastantes moléculas de agua

disponibles para la solvatación de la proteína, porque la mayor parte de agua está fuertemente ligada a las sales. En estas condiciones, las interacciones proteína-proteína resultan más importantes que las interacciones proteína-agua y esto puede conducir a una agregación seguida de la precipitación de moléculas proteínicas (Voet y Voet, 1990).

A la fecha la información de la influencia de la fuerza iónica, pH y la modificación química en la solubilidad de las proteínas del amaranto sigue siendo escasa (Paredes-López y col. 1988 y Soriano-Santos y col. 1992). Se ha informado que la solubilidad de las proteínas solubles en NaCl y Na₂SO₄, se incrementa a pH alcalino, presentando su máxima solubilidad a pH 11, mientras que las proteínas solubles en NaCl (albúminas y globulinas) presentaron un mayor rendimiento en el rango de 0.8 a 1.0 M de la sal.

El procedimiento empleado más ampliamente en la preparación de aislados proteínicos de leguminosas y oleaginosas es por precipitación isoelectrica (Paredes-López y col. 1988), después de una solubilización alcalina (pH 8-10) de las proteínas y remoción de material insoluble por centrifugación, las proteínas se precipitan por la adición de ácido hasta que se alcance el punto isoelectrico. Otro proceso denominado "micelización" para el aislamiento de proteínas de semillas involucra la precipitación de un extracto en sales neutras por dilución en agua fría. La proteína producida de

esta manera posee una estructura micelar antes de secarse; las interacciones hidrofóbicas pueden jugar un papel en la estabilización de los aislados.

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

V. PROPIEDADES FUNCIONALES.

Las propiedades funcionales reflejan los atributos físicos intrínsecos de la proteína *per se*, composición, secuencia de aminoácidos, conformación, estructura, (Tabla 5) así como posibles interacciones con otros componentes de los alimentos como agua, carbohidratos, iones, otras proteínas, lípidos, compuestos que imparten sabores, olores, etc, así como también variables que conforman su entorno fisicoquímico, p.e. temperatura, pH, fuerza iónica, la distribución de cargas en la proteína, aunque también influyen la extensión de los enlaces, inter e intramoleculares.

Tabla 5. propiedades funcionales de las proteínas de granos de importancia en aplicaciones en alimentos.

propiedades	atributos funcionales
sensorial	color, sabor, olor
químico	textura, turbidez, suavidad
hidratación	humedad, absorción de agua, capacidad de retener agua, solubilidad
surfactante	emulsificación, espumado, formación de película lipídica, incorporación de lípidos y de sabores
estructurales y reológicas	viscosidad, elasticidad, adherencia, coherencia, formación de masa, agregación y gelación, formación de redes y fibras, texturización
otras	compatibilidad con aditivos, antioxidantes enzimáticos

Kinsella (1979).

También se sabe que la conformación de la proteína afecta la funcionalidad, p.e. en las proteínas globulares los aminoácidos polares más cargados, están orientados hacia la superficie, esta disposición facilita la hidratación y solubilidad de la molécula. Por otra parte, las proteínas que se desenrollan más fácilmente en la interfase agua/aceite muestran buenas propiedades emulsificantes; las proteínas compuestas de polipéptidos largos y lineales que se relajan y desenrollan por calor forman buenos geles (Hermansson, 1979; Kinsella, 1979).

1. Emulsiones.

Agua y aceite son dos ingredientes básicos de los alimentos, junto con proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales. El agua y el aceite son mutuamente

insolubles debido a su incompatibilidad física; sin embargo, aceite y agua pueden ser dispersados como emulsiones. Las emulsiones de alimentos comprenden una amplia variedad de productos, en los cuales tanto el aceite como el agua están dispersos en un estado de homogeneidad microscópica. Las emulsiones se pueden encontrar en forma natural en la leche, en la yema de huevo, en agua de coco, así como en productos elaborados como mayonesa, aderezos para ensalada, helados, pasteles, chocolates, etc. (Franzen y Kinsella, 1976).

Las emulsiones pueden ser definidas como mezclas de al menos dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales se dispersa en el otro en forma de pequeñas gotas. La leche es un ejemplo de emulsión, donde las partículas de aceite o grasa están dispersas en la solución acuosa, el líquido que está disperso en forma de gotas, es la fase interna o discontinua, en tanto que el líquido circundante es denominada fase externa o continua. Si el aceite es la fase discontinua, y el agua la fase continua, la emulsión se denomina emulsión aceite en agua y se representa aceite/agua, en caso contrario, cuando el agua es la fase discontinua y el aceite la continua, la emulsión es agua en aceite, agua/aceite (Das y Kinsella, 1990).

Las emulsiones para su uso en alimentos deben de ser estables en su conformación por periodos razonablemente largos de tiempo, esta estabilidad se puede proporcionar utilizando emulsificadores o estabilizadores, los cuales pueden ser divididos en dos categorías:

a) moléculas pequeñas

b) macromoléculas

El término estabilizador se usa para denotar a aquellos compuestos que no son surfactantes activos, pero imparten estabilidad a las emulsiones por la restricción de las interacciones interfaciales, por lo tanto las proteínas, debido a que forman películas interfaciales, deberán clasificarse como emulsificadores, mientras que los polisacáridos, son estabilizadores, aunque algunas proteínas pueden desarrollar ambas funciones.

Las proteínas actúan como surfactantes en muchas emulsiones de alimentos. En la formación de la emulsión, las moléculas de la proteína se difunden y son adsorbidas en la interfase aceite/agua. La migración de las proteínas de la solución a la interfase es termodinámicamente favorable, debido a que una parte de la energía conformacional e hidratación de la proteína es perdida en la interfase. Una vez en la interfase, la mayoría de las proteínas se desenrollan en diferente grado, se reorientan y reacomodan para formar una película continua adhesiva, donde los segmentos hidrofóbicos se orientan en la fase apolar (aceite), mientras los segmentos polares, lo hacen en la fase acuosa, además de que la mayor parte de la proteína ocupa la interfase, interactúa con moléculas vecinas, impartiendo firmeza y viscosidad a la película. Las propiedades reológicas y mecánicas de tales películas son importantes en la formación y estabilización de las emulsiones en alimentos y varían con el tipo de proteína, concentración, pH, fuerza iónica, temperatura, por lo que, la información

concerniente a las propiedades de formación de estas películas es útil para entender las propiedades emulsificantes de las proteínas en alimentos. Además de la estabilización, las proteínas también sirven para modificar textura, sensación en la boca, retención de sabor y sobre todo influyen determinadamente en la aceptabilidad de las emulsiones en los alimentos (Franzen y Kinsella, 1976; Das y Kinsella, 1990).

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

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

- a) Cremado: En el cual por diferencia de densidades de los componentes aceite/agua, se presenta la tendencia a la formación de un gradiente de densidad. La velocidad del cremado dependerá de la forma de la gota, la diferencia de densidades entre las fases de aceite y agua y la viscosidad del medio (Stainsby, 1986).
- b) Floculación: Es un proceso en el cual dos o más gotas se agregan sin perder su identidad. Si bien este proceso modifica las propiedades físicas de la emulsión y

especialmente las propiedades reológicas, la distribución del tamaño de la partícula permanece sin cambios. El flóculo se dispersa rápidamente, si las interacciones son débiles, aunque éstas pueden ser fuertes. La floculación de las emulsiones depende de la naturaleza de la proteína estabilizante y de las condiciones de solución, tales como pH y fuerza iónica (Stainsby, 1986; Das y Kinsella, 1990).

c) Coalescencia: Proceso en el cual la colisión de dos o más gotas resulta en la formación de una gota más grande. El aumento del tamaño produce la separación de las fases aceite/agua ("oiling off") (Stainsby, 1986). La coalescencia es la principal causa de inestabilidad de emulsiones, ya que implica el rompimiento de la película interfacial y es irreversible. Varios factores tales como la solubilidad del emulsificador, pH, sales, concentración de emulsificador, relación fase/volumen, temperatura y propiedades de la película, afectan la estabilidad a la coalescencia de las emulsiones (Das y Kinsella, 1990).

2. Propiedades Espumantes.

El espumado puede ser definido como la capacidad de las proteínas para formar espumas estables, debida a la formación de una película impenetrable conformada por proteínas, que mantiene atrapadas moléculas de gas. Esta propiedad es muy importante en alimentos como pasteles, helados, chocolates, entre otros. La espuma formada por proteínas consiste en gas encapsulado por una película líquida que contiene como surfactante la proteína. Esta baja la tensión superficial entre el aire y el

agua, facilitando la deformación y expansión del líquido contra su tensión superficial. Las proteínas aptas para desarrollar espumado deberán ser solubles en la fase acuosa; deberán concentrarse en la interfase, desenrollarse para formar capas cohesivas de proteína y circundar las burbujas de aire; asimismo deberán poseer la suficiente viscosidad y fuerza mecánica para prevenir la ruptura y la coalescencia de las burbujas. Estas películas proteínicas deberán exhibir un balance entre su habilidad para actuar entre la cohesión intermolecular requerida para formar la membrana y la tendencia para compactarse, cuando lo último ocurre excesivamente, se puede presentar la inestabilidad de la espuma. Algunos tratamientos térmicos (70-80°C) o una parcial proteólisis pueden mejorar las propiedades espumantes de las proteínas. Estos tratamientos pueden incrementar la tendencia de los polipéptidos a desenrollarse en la interfase y facilitar las asociaciones hidrofóbicas, así de ese modo, se incrementa la viscosidad y disminuye el grosor de la capa, reduciendo la pérdida de aire o gas y mejorando la estabilidad (Kinsella, 1979).

Algunas espumas o batidos alimenticios son sistemas coloidales muy complejos; por ejemplo, los helados son una emulsión (suspensión) de glóbulos grasos (especialmente sólidos y reunidos en pequeños grupos), con una suspensión de cristales de hielo dispersos, un gel de polisacárido, una solución concentrada de azúcares y proteínas y burbujas de aire.

Las burbujas de gas de una espuma pueden variar mucho de tamaño, oscilando de un diámetro de $1 \mu\text{m}$ a varios centímetros, a causa de numerosos factores tales como la tensión superficial y viscosidad de la fase líquida, el aporte de energía, etc. Habitualmente, una distribución uniforme de burbujas pequeñas, da al alimento suavidad y ligereza, así como un aumento de la dispersión y perceptibilidad de aromas.

Una diferencia significativa entre las emulsiones y las espumas, está en el hecho que en éstas, la fracción de volumen ocupada por la fase dispersa (gas) varía en una escala mucho mayor que con las emulsiones. Frecuentemente las espumas son inestables, porque tiene una mayor superficie en la interfase. Existen básicamente tres mecanismos de desestabilización :

i) Drenado o pérdida del líquido de la lámina líquida por gravedad. Por la diferencia de presión y/o evaporación. En las espumas de baja densidad, las burbujas tienden a presionarse estrechamente las unas contra las otras, lo que aumenta la pérdida de líquido de las laminillas. Tensiones interfaciales bajas y diámetros de burbujas grandes disminuyen la presión interna y pérdida del líquido. Esto se produce durante la formación de la espuma, continuando la salida de los líquidos, lo que aumenta todavía más el valor del nivel de expansión y reduce el espesor y resistencia en las laminillas líquidas.

La pérdida de líquido se reduce cuando la fase líquida es viscosa (lo que se puede conseguir con la adición de azúcar) y ocurre también cuando es alta la viscosidad de la película de proteínas absorbidas. Esta viscosidad depende de la intensidad de las interacciones proteína/proteína y proteína/agua.

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

iii) Ruptura de la laminilla líquida que separa las burbujas de gas; esta ruptura provoca un aumento del tamaño de las burbujas por coalescencia y conduce, en definitiva a un derrumbe de la espuma. Existe una interdependencia entre pérdida de líquidos y la ruptura, porque ésta última aumenta la salida de líquidos y esto puede reducir el espesor y la resistencia de las laminillas. También surge la ruptura cuando las dos películas proteicas absorbidas se aproximan la una a la otra a una distancia de unos 50-150 Å, como resultado de la pérdida de líquidos o por un debilitamiento producto de las colisiones. No se sabe si a estas distancias son importantes las repulsiones electrostáticas y/o las atracciones moleculares entre las dos películas proteicas absorbidas. Finalmente se sabe que cuando las películas absorbidas son espesas y elásticas, éstas presentan una mayor resistencia a la ruptura (Cheftel y Lorient, 1989).

Por otra parte también hay factores que contribuyen a estabilizar las espumas de las proteínas (Tabla 6).

Tabla 6. Factores que afectan las propiedades espumantes de las proteínas

factores estabilizantes	
viscosidad superficial	desnaturalización y asociación de proteínas
concentración	solubilidad, velocidad de difusión, concentración en fase dispersa
doble capa eléctrica	la repulsión afecta los iones afines en solución
pH	teóricamente óptimo cerca de pH isoelectrico
surfactantes complementarios	otras proteínas, polisacáridos (no lípidos)
desnaturalizantes	una desnaturalización limitada puede ayudar a la formación de la película

Kinsella (1979).

3. Propiedades de Absorción .

3.1 Capacidad de retención o absorción de Agua.

La capacidad de retención o absorción de agua es la propiedad funcional que indica la capacidad de la proteína para retener su contenido en agua, así como su capacidad para embeber agua adicional a elevadas concentraciones de sales durante su tratamiento. Existen distintos fenómenos relacionados con la capacidad de retención de agua y diferentes procedimientos de medida (Huidobro y Tejada, 1993).

Diversos factores tales como la concentración, pH, temperatura, tiempo, fuerza iónica y presencia de otros constituyentes afectan la absorción de agua. La absorción total de agua aumenta con la concentración proteínica. Las variaciones de pH al modificar la ionización y carga neta de la molécula proteínica, alteran las fuerzas atractivas y repulsivas entre proteínas y la capacidad de estas últimas para asociarse

con el agua. En el punto isoelectrico las interacciones proteína-proteína, son máximas y las proteínas asociadas y replegadas sobre ellas mismas, manifiestan el mínimo de hidratación e hinchamiento (Cheftel y Lorient, 1989).

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

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

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

iii) El agua "no congelable", que puede determinarse por calorimetría diferencial. Sus fuertes interacciones con la proteína impiden que cristalice durante el descenso de la temperatura. El agua no congelable incluye el agua de estructura y la de la capa monomolecular. La mayor parte de esta agua se encuentra bajo forma de "capas" sucesivas, en torno a la proteína. Estas capas están ligadas las unas a las otras por

intermedio de enlaces hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo. La cantidad de agua no congelable está en relación directa con el contenido en aminoácidos de cadena lateral polar.

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

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

3.2 Solubilidad.

La solubilidad, bajo distintas condiciones, da una buena indicación de las aplicaciones potenciales de las proteínas. Esto se debe al hecho de que el grado de insolubilidad es, probablemente, la medida más práctica de la desnaturalización-agregación de las proteínas. Y porque las proteínas que existen al comienzo en un estado desnaturalizado, parcialmente agregado, muestran frecuentemente un descenso de capacidad de gelificación, emulsión o formación de espuma. De esta manera, la solubilidad también es una característica importante a tener en cuenta con las proteínas utilizadas en las bebidas.

Frecuentemente la solubilidad proteínica a pH neutro o a pH isoeléctrico, son las primeras propiedades funcionales que se miden en cada etapa de preparación o de transformación de un ingrediente proteínico. Corrientemente, las pruebas más utilizadas son el índice de solubilidad del nitrógeno (NSI) y el perfil de solubilidad en función del pH, de la fuerza iónica o de un tratamiento térmico.

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

emulsiones, espumas y geles, presupone diversos grados de desdoblamiento, agregación e insolubilización de la proteína (Cheftel y Lorient, 1989).

VI. MODIFICACION QUIMICA DE PROTEINAS.

Aunque la succinilación de todos los grupos nucleofílicos es posible (Gounuris y Pearlman, 1967), los grupos ϵ amino de la lisina son más rápidamente acilados debido a su relativamente bajo pK y su disponibilidad estérica para la reacción. Una insignificante cantidad de acilación del grupo sulfhídrico puede ocurrir cuando se trata de proteínas de soya (Franzen y Kinsella, 1976).

La velocidad de la reacción depende sobre todo de la velocidad del ataque nucleofílico, y la velocidad de la acilación para nucleófilos homólogos están inversamente relacionada a sus valores de pK 's. Una alta reactividad de cualquier grupo de una proteína es usualmente el resultado de un bajo pK . Los grupos amino e hidroxilo de una proteína son rápidamente acilados en comparación con otros residuos aminoácidos disponibles para la reacción. Los grupos fenólicos de la tirosina, sin embargo, tienen generalmente un pK más alto y están usualmente mejor protegidos de la reacción que los grupos amino. Los grupos hidroxilo de la serina y la treonina son nucleófilos débiles y no son fácilmente acilados en solución acuosa. La mayoría de los agentes acilantes reaccionan más rápidamente con los grupos amino (Means y Feeney, 1971), el grupo ϵ amino de la lisina es el más comúnmente acilado.

La succinilación de una proteína convierte los grupos catiónicos amino a residuos aniónicos, el incremento en la carga neta negativa producida por el anión succinato altera el carácter fisicoquímico de la proteína, lo que implica un mejoramiento de la solubilidad en soluciones acuosas y consecuentemente en cambios de la capacidad de emulsificación y espumado. Hubeed y col. (1958) explicaba el incremento de la solubilidad acuosa observada siguiendo la succinilación y acetilación de la proteína de soya.

Aunque se han estudiado diferentes modificaciones de varios grupos aminoácidos, poco se ha reportado en relación a la extensión y naturaleza eléctrica del grupo acilante (Fig. 1) sobre el efecto de tal en las propiedades funcionales ya citadas. Choi y col. (1982) al modificar la harina de algodón con diferentes agentes, encontró una amplia gama de resultados, las modificaciones efectuadas, maleilación, succinilación y dimetilglutarilación incrementaron la extracción de las proteínas, lo que se reflejó en una alta solubilidad de los materiales obtenidos; en tanto que con la acetilación del material, estas características se vieron parcialmente afectadas. No obstante que la acetilación reduce las cargas positivas de la proteína, al añadir grupos hidrofóbicos cargados neutralmente, a los grupos ϵ amino cargados positivamente, los restantes grupos acilantes incrementan los grupos acilos hidrofílicos cargados negativamente en la proteína.

La estructura de las proteínas succiniladas resulta de su alta carga neta y el remplazo de fuerzas atractivas de corto alcance o longitud por fuerzas repulsivas del mismo alcance o longitud, que provocan un subsecuente desdoblamiento de las cadenas polipeptídicas. De esta manera, en aislados de soya las interacciones electrostáticas entre los grupos amonio (NH_4^+) y carboxilo mejora la interacción proteína-proteína, lo cual abate la solubilidad, en una succinilación a valores neutros, sin embargo los cationes amonio de la lisina son reemplazados por aniones succinato (Franzen y Kinsella, 1976).

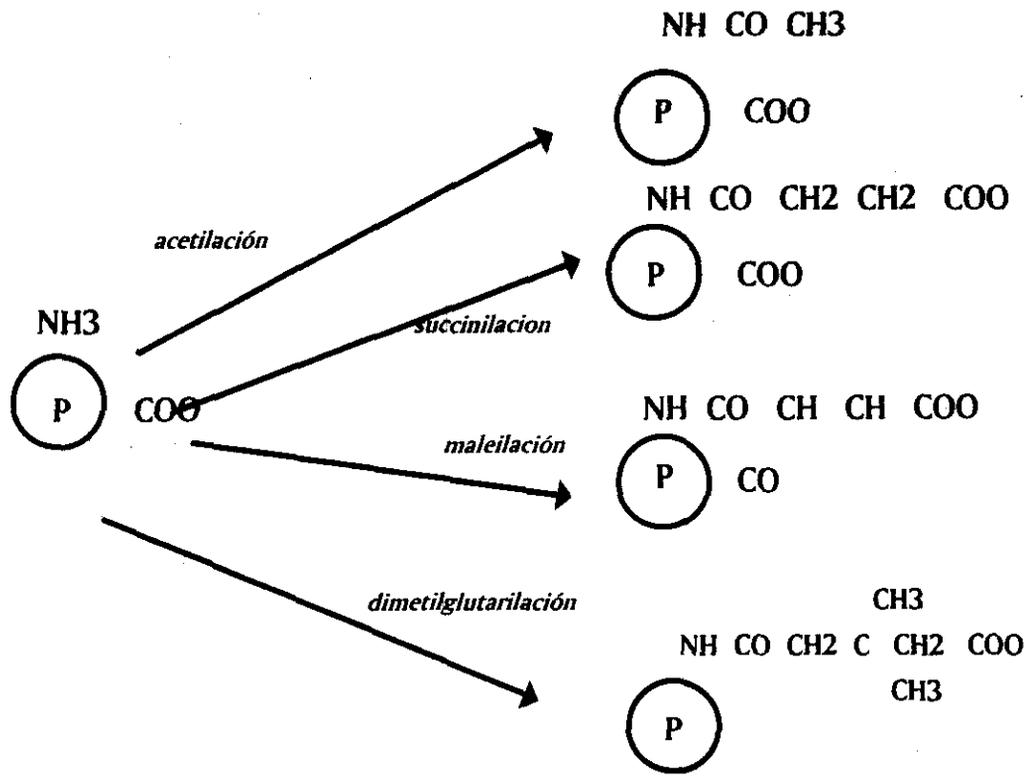


Fig 1. Principales cambios en proteínas por varias modificaciones químicas. (Choi y col. 1982)

Las repulsiones electrostáticas ocurren entre los grupos carboxilos agregados o añadidos y los grupos carboxilos nativos contiguos produciendo algunas interacciones proteína-proteína y principalmente interacciones proteína-agua, lo que provoca un mejoramiento de la solubilidad en soluciones acuosas. Dado que la carga neta es proporcional a la extensión de la amino-succinilación, el mejoramiento en la solubilización acuosa se ha relacionado positivamente a la extensión de la derivación. Significativamente, las solubilidades acuosas de aislados succinilados de soya derivatizados con 0,5 y 2,0 g de anhídrido succínico fue similar. De lo anterior se desprende que, una exhaustiva succinilación no es requerida para producir un incremento sustancial en la solubilidad. En la acetilación, los cationes amonio (NH_4^+) son reemplazados por grupos acetyl neutros produciendo algunas repulsiones electrostáticas, y la solubilidad acuosa del aislado acetilado de soya fue intermedio en magnitud entre el aislado succinilado y el de soya sin modificar.

VII. CONCENTRADOS PROTEINICOS. FUENTES VEGETALES, USOS, PERSPECTIVAS.

La producción mundial de oleaginosas como el girasol, el cartamo, o algunas otras especies, como la copra, el algodón, el sésamo y la soya, que contienen una gran cantidad de ácidos grasos en sus granos, hace en primera instancia que estos cultivos sean producidos para aprovechar su calidad de productoras de aceite. Sin embargo, el procesamiento para la obtención de los aceites supone la producción de subproductos

constituidos principalmente por carbohidratos y proteínas, en diferentes proporciones. Como lo ejemplifica Rivas y col. (1981), quienes indicaron que la harina proveniente del proceso de obtención de aceite contiene aproximadamente 50% de proteína. Y es precisamente la fracción proteínica de estos subproductos, lo que han llamado la atención como una alternativa de suministro de proteína en dietas humanas o animales.

Un ejemplo es el caso del girasol, cultivado por su uso en la obtención de aceites comestible de buena calidad. Se ha investigado ampliamente la aplicación potencial de la harina desengrasada, que se genera como subproducto del procedimiento de extracción del aceite, sin embargo, se ha encontrado que presenta niveles significativamente altos de compuestos polifenólicos, como el ácido clorogénico, ácido cafeínico, que en primera instancia no representan problema de color, pero bajo condiciones alcalinas producen coloraciones verde oscura, café, que puede constituirse en un problema de aceptación (Sosulki, 1987).

Aunque también se ha reportado para la producción de harinas proteínicas, que la clasificación neumática de la semilla de amaranto (Sanchez-Marroquín y col. 1986) permite la concentración al 100% de material proteínico, estas harinas actualmente se están utilizando para balancear dietas de regímenes especiales, en la elaboración de atoles, tamales, tortillas, entre otros usos. También este sistema ha sido utilizado para la elaboración de harinas proteínicas de cártamo, según la patente de Kopas y

Kneeland, del año de 1966; se procura en este procedimiento la remoción de fibra, para elaborar alimento balanceado para animales (Paredes-López, 1988).

Sin embargo, la semilla que ha rendido las mayores expectativas de uso ha sido el frijol de soya, grano que cuenta entre sus peculiaridades contener grandes cantidades de aceites y proteína. A nivel comercial son numerosos los productos que se ofrecen en forma de concentrados o aislados, como complementos nutricionales para fisicoculturistas, principalmente; también son abundantes los productos similares a carnes, complementados con concentrados o aislados de soya que se ofrecen. Las aplicaciones que han alcanzado las proteínas de la soya, en sus diferentes presentaciones, significa al menos, las primeras perspectivas por alcanzar de algún otro grano, considerando los atributos intrínsecos que presente el grano en particular.

Actualmente no existen valores estandarizados del contenido proteínico de concentrados y aislados de diferentes fuentes proteínicas. Sin embargo, en el caso de granos como el cártamo y la soya, entre otros, se considera que una harina de alto contenido proteínico debe de contener entre 50-60%; un concentrado entre 60-80% y un aislado más del 80%. Los concentrados comerciales de soya contienen aproximadamente 70% de proteína cruda o NT, evaluada por el método de Kjeldahl (Wolf, 1977) lo que representa una concentración del NT del 233%; esto es porque originalmente, el frijol de soya contiene alrededor del 30% de proteína cruda o NT, en comparación al 16% que contiene originalmente la semilla de amaranto. De la misma

manera, un aislado comercial de soya contiene alrededor del 90% de proteína cruda o NT y se esperaría que un aislado comercial de la semilla de amaranto tuviese un contenido similar.

OBJETIVOS

S

Objetivo General

ne

Evaluar el efecto de diferentes métodos de extracción de proteínas de la semilla de amaranto, para su concentración, así como para dilucidar la influencia que estas ejercen sobre las características químicas y fisicoquímicas de los concentrados proteínicos así obtenidos.

Objetivos Específicos.

spc

a) Evaluar la eficiencia de los diferentes métodos de solubilidad, para la extracción de las proteínas de la semilla de amaranto.

b) Establecer las condiciones óptimas de extracción de las proteínas de la semilla de amaranto, para la obtención de concentrados proteínicos.

c) Evaluación de las propiedades funcionales de los concentrados proteínicos obtenidos en las condiciones óptimas encontradas.

d) Caracterización parcial de las proteínas de los diferentes concentrados proteínicos obtenidos en las condiciones óptimas encontradas.

METAS.

- a) Analizar los perfiles de solubilidad obtenidos por la aplicación de los siguientes métodos de extracción de proteínas:
 - a.i) Disolución en NaCl, en un intervalo de concentraciones de 0,05 a 2 M, correspondientes a μ de 0,05-2.
 - a.ii) Disolución en Na₂SO₄, en un intervalo de concentraciones de 0,05 a 1M, correspondientes a μ de 0,15-3.
 - a.iii) Disolución en NaOH a pH de 9, 10 y 11.
 - a.iv) Modificación química. Disolución acuosa a pH de 8,5 con posterior succinilación con anhídrido succínico de 10 a 110%.
 - a.v) Disolución acuosa a pH de 7.

- b) Analizar los perfiles de solubilidad para determinar las condiciones óptimas, para la obtención de diferentes concentrados proteínicos.
 - b.i) Evaluación del rendimiento de los diferentes concentrados, en cada caso.
 - b.ii) Evaluación del contenido de nitrógeno proteínico y nitrógeno no proteínico del material concentrado.
 - b.iii) Análisis Estadístico. Se realizará un análisis de varianza (ANOVA), de 1 vía así como un análisis Duncan. Se utilizará el paquete computacional SAS (Statistical Analytical System)

- d) Evaluación en los concentrados proteínicos de las siguientes propiedades funcionales: absorción de agua, absorción de aceite, actividad y estabilidad de emulsificación, capacidad y estabilidad de espumado y solubilidad.

- c) Purificación y caracterización parcial de las proteínas de los diferentes concentrados, por los siguientes métodos:
 - c.i) Filtración en gel.
 - c.ii) Electroforesis en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecil sulfato de sodio

HIPOTESIS

Los diferentes métodos de extracción de proteínas de la semilla de amaranto pueden modificar la estructura nativa de las mismas, dependiendo de las condiciones y los agentes químicos utilizados para la extracción; algunas de estas modificaciones tendrán consecuencias en el mejoramiento o disminución de las propiedades fisicoquímicas iniciales.

MATERIAL Y METODOS

I. NATURALEZA DEL CONCENTRADO PROTEINICO.

La semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*, tipo mercado) fue cultivada en la estación experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Chapingo, México y de este grano por el sistema de clasificación neumática (Sánchez-Marroquín, 1986) se obtuvo una harina proteínica con un contenido de 28% de proteína cruda (HPA-28). Posteriormente la harina fue desengrasada por el método de Soriano-Santos y col.. (1992), obteniendo la harina proteínica (HPAD-29) que se usó a lo largo del experimento. El análisis bromatológico de ambos materiales se efectuó por los métodos aprobados por la A.O.A.C. (1984) y se utilizó el factor 5.85 (NRC, 1984) para la conversión del nitrógeno (N) a proteína o se consideró que 100g de proteína contenían 17.0 g de N. Todos los reactivos utilizados en este experimento fueron grado analítico.

II. OBTENCION DE LOS CONCENTRADOS PROTEINICOS.

En las Figs. 2 y 3 se muestra el proceso de solubilización del Nitrógeno para la obtención de los diferentes concentrados proteínicos por los métodos de:

1. Solubilización salina. En la Tabla 7 se muestran las concentraciones y fuerzas iónicas de cada una de las disoluciones de NaCl y Na₂SO₄ que se utilizaron para la extracción del N de HPAD-29. El N soluble en las disoluciones salinas (Fig. 2), fue obtenido con

extracciones sucesivas por el método modificado de Landry y Moureaux (1970). En cada caso, se preparó una suspensión al 4% (p/v) de HPAD-29 en las distintas disoluciones, que se sometió a agitación magnética durante 60 min a 4°C. Posteriormente se centrifugó durante 10 min a 42000 g en una centrifuga refrigerada Sorva11 RC-2B y el sobrenadante (SA) se guardó para un análisis posterior de N soluble (NTS). El residuo fue sometido a nuevas extracciones de N soluble en las diferentes disoluciones salinas, bajo las condiciones descrita arriba (tantas como fuera necesario) combinándose los sobrenadantes, hasta que no se solubilizara más N. En esta medición cualitativa se analizó la presencia de proteína solubilizada por el método de Bradford (1976). La extracción se detuvo cuando el valor de absorbancia fue inferior al valor de la ordenada al origen, de una curva patrón de albúmina sérica bovina ($\mu\text{g proteína} = 0.0080 \text{ Abs.}595\text{nm} + 0.072$) evaluada por este método. Sin embargo, la cuantificación del N extraído se realizó por el método de Kjeldahl como se explicará posteriormente.

Tabla 7. Disoluciones empleadas en la extracción del NTS de la harina proteínica de amaranto desengrasada (HPAD-29) a diferentes concentraciones y fuerzas iónicas.

NaCl o Na ₂ SO ₄ (M)	Fuerza Iónica (M)	
	NaCl	Na ₂ SO ₄
0.05	0.05	0.15
0.15	0.15	0.45
0.25	0.25	0.75
0.40	0.40	1.20
0.60	0.60	1.80
0.80	0.80	2.40
1.00	1.00	3.00
1.50	1.50
2.00	2.00

1.1 Solubilización alcalina. La solubilización del N en álcali (Fig. 2) se realizó similarmente al método propuesto por Paredes-López y col., (1988) con la siguiente modificación: una suspensión de HPAD-29 al 10% en agua se ajustó con NaOH 0.4 M a pH de 9, 10 y 11. Cada una de las suspensiones se sometieron a tres extracciones sucesivas de 60 min cada una a 4°C, con agitación magnética a cada valor de pH. Después de cada extracción, se centrifugó a 42000g por 20 min. El N soluble fue medido en el sobrenadante (AA), mientras que el N insoluble en el álcali, se midió en el residuo.

1.2. Modificación química (succinilación). La succinilación de las proteínas (Fig. 2) se efectuó de acuerdo al método original de Choi y col., (1981), en suspensiones al 10% (p/v) de HPAD-29 en agua, manteniendo una relación de anhídrido succínico-proteína cruda de 10 al 110%; el pH fue ajustado a pH 8,5 con NaOH 0,4 M; el sobrenadante rico en proteína se denominó SAS.

1.3. Extracción acuosa. Esta extracción (Fig. 2) se realizó para comparar la eficacia de la extracción del N por los otros métodos de solubilización. La extracción acuosa de las proteínas se preparó de acuerdo a la modificación del método original de Landry y Moureaux (1970), similar a la solubilización de N en las disoluciones salinas (sobrenadante SAW). En todos los casos, el concentrado proteínico (Fig. 3) se obtuvo por precipitación isoeléctrica de las proteínas, con ácido tricloroacético (TCA) al 10% a los pH de 4 y 5 (Paredes-López y col. 1988; Soriano-Santos y col. 1992). En este rango de pH precipitaron mezclas proteínicas que se denominaron A, AA, AS y AW, que corresponden a los métodos

de solubilización en disoluciones salinas, alcalinas, succinilación y en agua, respectivamente. El precipitado resultante en cada caso, se separó por centrifugación y se secó a 40°C en una estufa de temperatura controlada. Finalmente, cada uno de los materiales recuperados se pulverizaron a un tamaño de malla núm. 60. Los concentrados así obtenidos se conservaron a 0°C en desecador hasta su análisis.

2. Análisis del nitrógeno obtenido por los diferentes métodos de solubilización.- El N contenido en el material original HPAD-29 se consideró como N total (NT) y el N soluble obtenido en las diferentes disoluciones salinas, alcalinas por succinilación y en agua (Fig. 2 y 3), se distinguieron de la siguiente manera: el nitrógeno solubilizado por cada uno de los métodos se le denominó nitrógeno total soluble (NTS) y se midió directamente en los sobrenadantes SA, SAA, SAS y SAW por el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984). El NTS incluye el N proteínico y el N no proteínico (NP + NNP). Los sobrenadantes SA, SAA ó SAS y SAW fueron tratados con TCA al 10%, obteniéndose un precipitado que fue separado por centrifugación. En los precipitados resultantes BA, BAA, BAS y BAW, se midió el NNP soluble en TCA al 10%. Ambas mediciones se realizaron por el método de Kjendhal.

IV. EVALUACION DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS CONCENTRADOS PROTEINICOS DE LA SEMILLA DE AMARANTO.

1. Solubilidad.

Se preparó una suspensión al 1% (p/v) de concentrado proteínico de amaranto en agua destilada y se ajustó en una serie de pH de 2 a 10 con NaOH 0.1 N ó HCl 0.1N. La

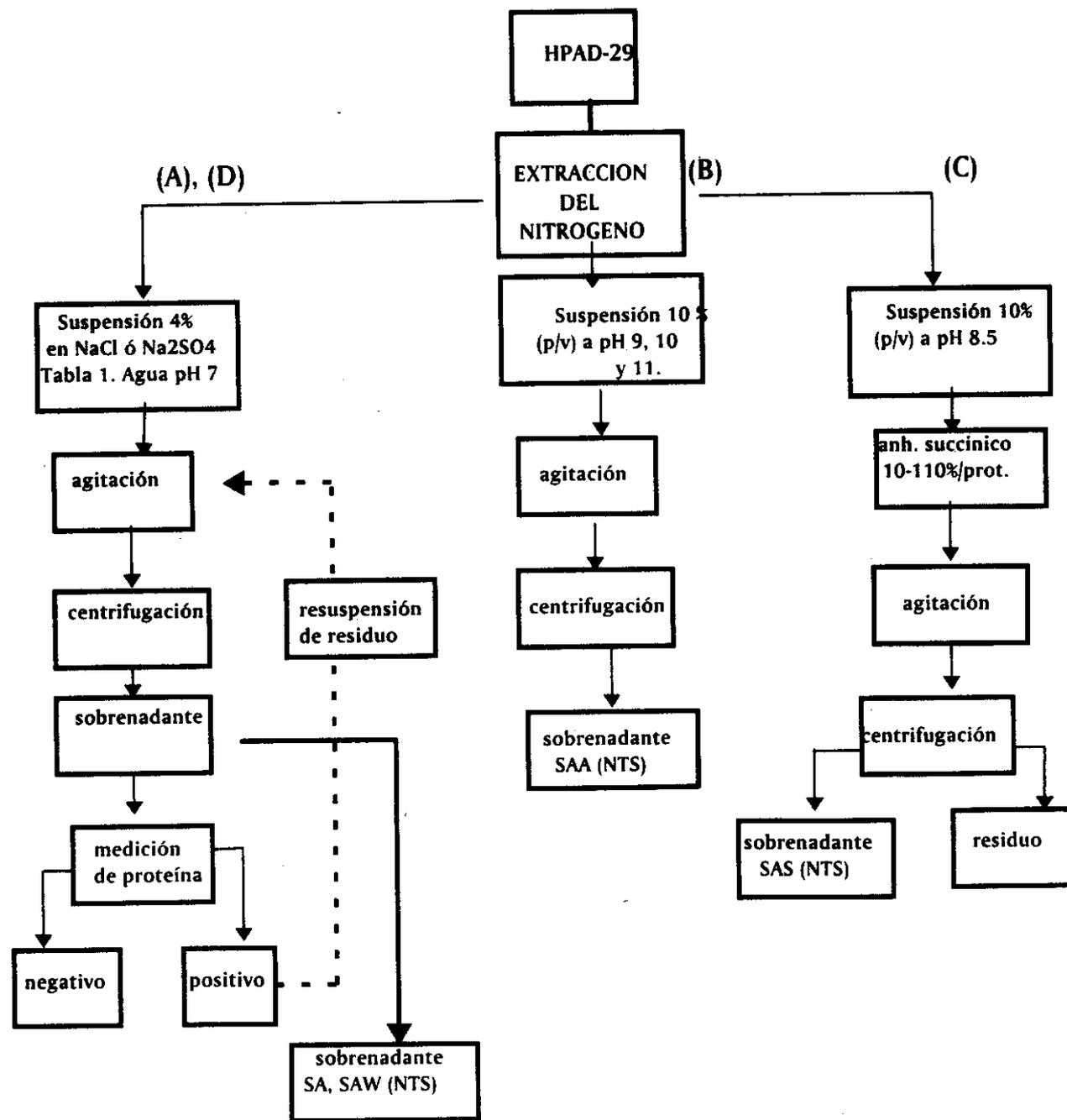


Figura 2. Solubilización del Nitrógeno de la semilla de amaranto en disoluciones salinas, alcalinas, en agua y por succinilación.

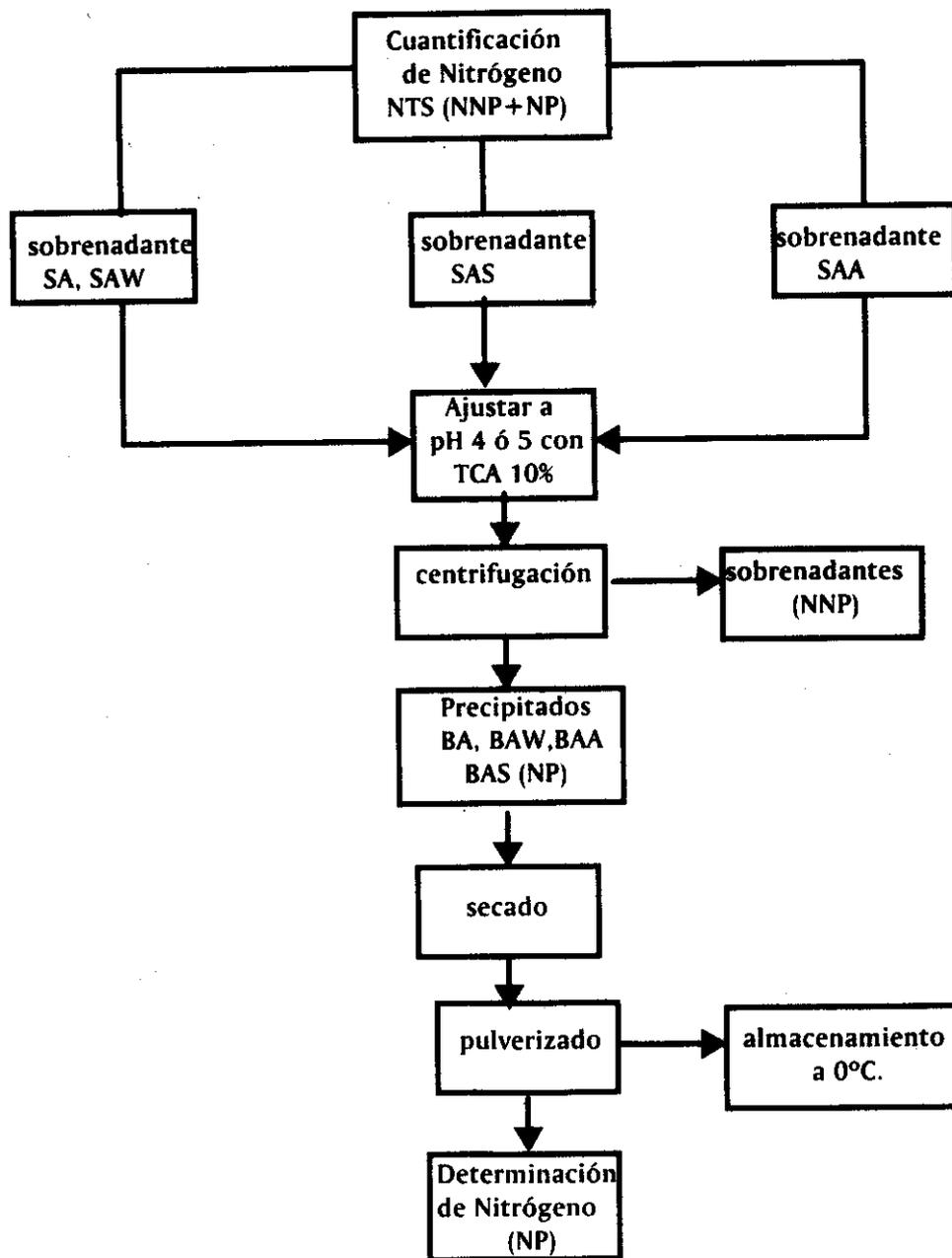


Figura 3. Obtención de concentrados proteínicos de la semilla de amaranto.

suspensión en el pH deseado se mantuvo en agitación por 30 min a temperatura ambiente. Las suspensiones se centrifugaron a 5000 x g durante 15 min en una centrifuga Sorvall RC-5. En el sobrenadante se midió el contenido de proteína solubilizada por el método del colorante ligado a la proteína (Bradford, 1976), previa elaboración de una curva patrón de albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co., St. Louis MO).

2. Absorción de aceite o agua.

A 0.5 g de concentrado proteínico se le añadieron 5 ml de agua destilada o 3 ml de aceite de girasol comercial (1,2,3) y se homogenizaron a máxima velocidad por 2 min. Posteriormente se dejaron reposar por 30 min y se centrifugaron a 3500 rpm durante 25 min, en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-2B. Finalmente se midió la cantidad de agua o aceite no absorbida por el material y por diferencia con el volumen original agregado, se obtuvo la cantidad de agua o aceite absorbido, la cual se expresó como ml de agua o aceite absorbido por g de concentrado proteínico (Wang y Kinsella, 1976).

3. Emulsificación

3.1 Formación de emulsión.

Se utilizó el método de Wang y Kinsella (1976) con las siguientes modificaciones: se preparó una suspensión 2.5% (p/v) de concentrado en agua destilada y se mantuvo en agitación magnética durante 10 min. Cada una de las suspensiones se ajustaron a una

serie de pH de 2 a 10 con NaOH 0,1 N ó HCl 0,1 N. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. El sobrenadante, que contenía la proteína solubilizada, se utilizó para la formación de la emulsión. Para la elaboración de ésta, se tomaron volúmenes iguales del sobrenadante de la suspensión y de aceite de girasol comercial (1,2,3) y se homogeneizaron a una velocidad de 20000 rpm, en un homogenizador Ultra Turrax Junke Ika-werk durante 1 min.

3.2 Actividad de emulsificación.

Una vez formada la emulsión, ésta se sometió a centrifugación a 1300 x g durante 5 minutos. La actividad de emulsificación se obtuvo midiendo la altura total de la emulsión y la altura de la capa emulsificada que permanece después de la centrifugación (Wang y Kinsella, 1976).

$$\% \text{ Actividad de emulsificación} = \frac{\text{altura emulsión después de centrifugación}}{\text{altura emulsión total formada}} \times 100$$

3.3. Estabilidad de emulsificación.

Se midió la estabilidad de emulsificación en presencia de calor, manteniendo la emulsión formada en baño maría durante 30 min. a 80 °C; pasado este tiempo, se enfrió a chorro de agua hasta 15°C. Posteriormente la emulsión se centrifugó a 1300 x g durante 5 min. Para la evaluación de la estabilidad se midieron la altura de la emulsión antes del

tratamiento térmico y la altura remanente de la emulsión después de la centrifugación (Wang y Kinsella, 1976).

$$\% \text{ Estabilidad de emulsificación} = \frac{\text{Altura de la capa remanente de emulsión}}{\text{Altura inicial de la emulsión}} \times 100$$

4. Espumado.

4.1. Capacidad y estabilidad de espumado.

Estas propiedades se midieron según Kabirullah y Wills (1982) con algunas modificaciones. Para cada concentrado obtenido previamente, se preparó una suspensión al 1% (p/v) de concentrado en agua destilada y se ajustó a una serie de pH de 2 a 10. Para la formación de la espuma, se tomaron 50 ml de la suspensión en el pH deseado, y se sometieron a homogenización en un Ultraturrax T25 Janke & Kunkel a velocidad de 13500 rpm durante 90 segundos, posteriormente se midió el volumen de la espuma obtenida. La capacidad de espumado se expresó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Capacidad de espumado} = \frac{\text{Vol. desp/mezclado} - \text{Vol. antes mezclado}}{\text{Vol. antes mezclado}} \times 100$$

Una vez que se formó la espuma y se midió la actividad de espumado, la misma muestra sirvió para evaluar la estabilidad; ésta se realizó dejando reposar por 30 min. la muestra

con la espuma obtenida. Posteriormente se midió el volumen de la espuma remanente. La estabilidad de espumado se expresó de la siguiente manera:

$$\% \text{ estabilidad de espumado} = \frac{\text{Vol. desp. reposo} - \text{Vol. inicial}}{\text{Vol. desp. mezclado} - \text{Vol. inicial}} \times 100$$

III. CARACTERIZACION QUIMICA PARCIAL DE LAS PROTEINAS PRESENTES EN LOS CONCENTRADOS PROTEINICOS DE LA SEMILLA DE AMARANTO.

Para la caracterización química parcial de los concentrados proteínicos de la semilla de amaranto se utilizaron los métodos que se describen en la Fig. 4.

1. Cromatografía de filtración en gel .

De cada uno de los concentrados obtenidos se disolvieron muestras que contenían 100 mg de proteína en 9 ml de una solución amortiguadora de fosfatos que se denominó bufer A: 32.5 mM K₂HPO₄ 2,6mM KH₂PO₄, que además contenía 0.4 M de NaCl, 20mM de mercaptoetanol y 0,04% de azida de sodio, la cual tuvo una fuerza iónica de 0,5 y pH de 7,5. Para la filtración en gel se utilizó una columna de dimensiones de 2.0 X 90 cm, la cual se empaquetó con Sephadex G-200 (Pharmacia Fine Chemicals), de un rango de fraccionamiento de peso molecular de 5 000 a 600 000 Daltons y se equilibró previamente con 300 ml de bufer A. Para la determinación del volumen vacío (V₀) y volumen total (V_t) de la columna se utilizó Azul dextrano (PM 2000 kD) y Rojo de Fenol (PM 5kD).

La muestra se aplicó a la columna y se eluyó con el mismo bufer utilizando un flujo de 20 ml/h. Se colectaron fracciones de 4 ml en un colector de fracciones (Gilson Fc 203B Gilson Medical Electronics). En cada una de las fracciones colectadas se midió la absorbancia a diferentes longitudes de onda, esto es a 320 nm, longitud a la cual absorben compuestos fenólicos; a 280 nm, donde absorben compuestos nitrogenados, como proteínas, ácidos nucleicos; a 260 nm absorben ácidos nucleicos y a 235 nm, donde absorbe principalmente el enlace peptídico.

Se seleccionaron las fracciones que mostraron los picos mayores de absorbancia y en éstas se midió el contenido de proteína por el método del colorante ligado a la proteína (Bradford, 1976), previa la elaboración de una curva patrón de albúmina sérica bovina (Sigma, Chemical Co, St. Louis Mo.). Las absorbancias fueron medidas en un espectrofotómetro Model UV-260 (Shimatzu Corp. Kyoto Japón).

En el caso de los concentrados proteínicos obtenidos por solubilización a pH de 10, y a pH de 11 y el obtenido por succinilación al 50%, se eluyeron en una columna de las mismas características antes descritas, pero en esta ocasión se utilizó una solución amortiguadora de Tris de pH 8.9 que contenía 37.6 mM de Tris, 40 mM de glicina, además de 0.3 M de NaCl, azida de sodio 0.4% y 20 mM de 2-mercaptoetanol. Esta solución amortiguadora se denominó bufer B.

Para la determinación de los pesos moleculares de las fracciones proteínicas obtenidas se elaboró una curva patrón de marcadores de peso molecular conocido: β -

amilasa, 200 kD; Alcohol deshidrogenasa 150 kD; Albumina sérica bovina, 66 kD; Anhidrasa carbónica, 29 kD y Citocromo c, 12,4 kD (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.).

2. Electroforesis

Para cada uno de los concentrados proteínicos, las fracciones de mayor absorbancia a 280 nm y 595 nm, se seleccionaron y se aplicaron a geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.), para el análisis electroforético de acuerdo al método de Laemmli (1970). Los geles contenían un gradiente lineal del 10-20% de acrilamida (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.). Se aplicaron 50 μ l de cada una de las fracciones seleccionadas. Los geles fueron teñidos durante toda la noche con azul brillante de Coomassie R-250 (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.) en una concentración de 0.125% p/v en una mezcla de metanol 50%, ácido acético glacial (10:1 v/v) y se decoloraron con una solución de ácido acético glacial, etanol y agua (1,5:1:7,5 v/v/v). Para la determinación del peso molecular de las subunidades se aplicaron muestras de 30 μ l de una mezcla denominada Dalton Marck (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.), que contenían polipéptidos de los siguientes pesos moleculares: 14, 20, 24, 29, 36, 45 y 60 kD.

2. Cromatografía de Intercambio Iónico.

Las fracciones obtenidas por filtración en gel, con las lecturas de absorbancia a 280 nm y 595 nm más altas, se colectaron y se dializaron en bolsas de membrana de celofán Spectra 1,000 a 50,000 (Fisher Scientific, Co, USA) con dos cambios de agua destilada durante toda la noche. Posteriormente, los dializados se aplicaron a una columna de

intercambio iónico DEAE-Sepharose 6B-CL (Pharmacia Fine Chemicals) de dimensiones de 1,5 x 30 cm, equilibrada previamente con 80 ml del bufer A, libre de NaCl (pH 7.5; $\mu = 0.1$). Esta columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 2.0 M a una velocidad de flujo de 24 ml/h. Similarmente a la cromatografía de filtración en gel, las fracciones colectadas se monitorearon a las siguientes longitudes de onda: 320 nm, 280 nm, 260 nm y a 235 nm.

Las fracciones de las proteínas de los concentrados obtenidos por solubilización a pH 10 y 11 y por succinilación eluidas en filtración en gel con el bufer B, se aplicaron a una columna de Intercambio Iónico de las mismas características, en este caso se utilizó bufer B, libre de NaCl, siguiendo el mismo procedimiento de las fracciones eluidas con el bufer A. Finalmente de las fracciones que presentaron los mayores picos a 280 nm, se tomó una alícuota para el análisis electroforético.

VI. Análisis estadístico.-

Los resultados de cada prueba se analizaron por ANOVA de una vía y análisis de Duncan. También se realizó análisis de regresión lineal simple, por medio del paquete computacional SAS (Statistical Analytical System).

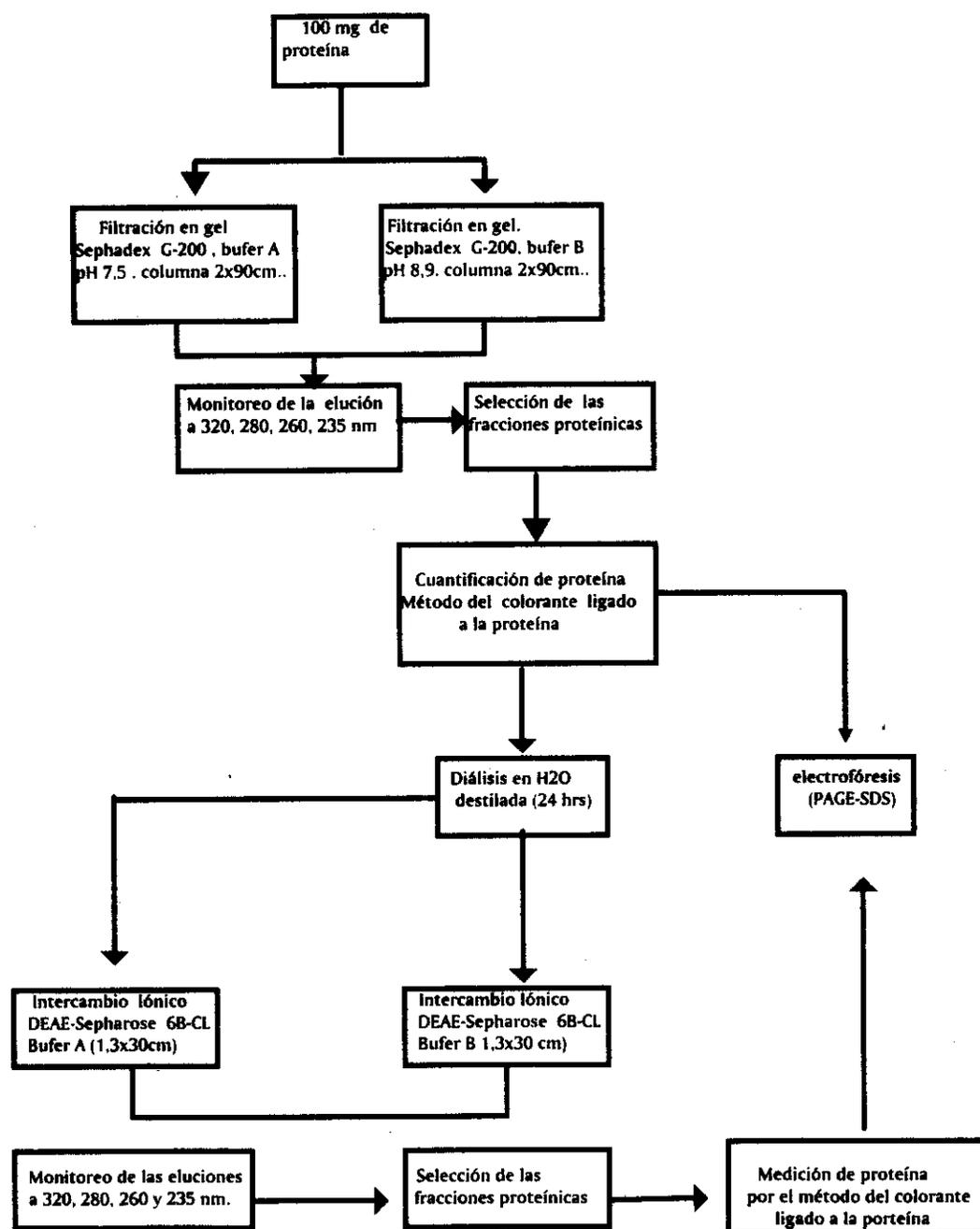


Fig.. 4. Diagrama de la secuencia de los métodos utilizados para la caracterización química de las proteínas contenidas en los diferentes concentrados proteínicos de amaranto.

RESULTADOS Y DISCUSION

I. PERFILES DE SOLUBILIDAD DEL NITROGENO DE LA SEMILLA DE AMARANTO.

1. Contenido de nitrógeno de la harina proteínica de la semilla de amaranto.

En la Tabla 8 se presenta el análisis bromatológico de los materiales que se emplearon en este estudio. Se observó que con el sistema de clasificación neumática, se obtuvo una concentración de proteína cruda en base seca del 170% para HPA-28 y del 180% para HPAD-29, con respecto al contenido del grano original. La razón de proponer la obtención de concentrados proteínicos de la semilla de amaranto, a partir de harinas proteínicas obtenidas por clasificación neumática, se debió a la complejidad que existe para concentrar las proteínas de la semilla de amaranto, a consecuencia de su bajo contenido de proteína. Hasta el momento no existen valores de referencia del contenido proteínico de concentrados y aislados de diferentes fuentes vegetales, sin embargo, se ha considerado, en granos como el cártamo y la soya, entre otros, los siguientes contenidos: para una harina de alto contenido proteínico se considera de 50 a 60%, para un concentrado entre 60-80% y para un aislado más de 80%. Debido a que los concentrados comerciales de soya contienen aproximadamente 70% de proteína cruda o NT, evaluada por el método de Kjeldahl (Wolf, 1977), los concentrados de la semilla de amaranto deberán presentar aproximadamente el mismo contenido. Originalmente, el frijol de soya contiene alrededor del 30% de proteína cruda o NT, en comparación al 16% de contenido en el grano de amaranto. Al comparar el contenido de proteína cruda o NT de HPA-28 con un concentrado proteínico de soya comercial, el primero sólo representa el 73% de la

proteína cruda del segundo, y esto representaría una desventaja para su comercialización. De la misma manera, un aislado comercial de soya contiene alrededor del 90% de proteína cruda o NT y se esperaría que un aislado comercial de la semilla de amaranto tuviese un contenido similar. Con el propósito de optimizar el proceso de aislamiento del N de la semilla, un paso intermedio de concentración del N, sería la obtención en primer lugar de un material con un contenido de proteína cruda o NT equiparable al del frijol de soya, como sucede al obtener HPA-28 ó HPAD-29; esto presentaría la ventaja de una mayor solubilización de N con menos material y menor volumen de disolventes, siempre y cuando el sistema de concentración del N no modifique significativamente la estructura nativa de las proteínas. Precisamente el sistema de clasificación neumática, se ha reconocido como uno de los métodos de concentración proteínica que cumple esta condición (Myers, 1988).

Tabla 8. análisis bromatológico de la semilla de amaranto y sus harinas proteínicas.

COMPONENTE	semilla de amaranto ¹	hpa-28 ²	hpad-29 ³
g/100 g			
humedad	10.8 ± 0.0 ⁵	9.2 ± 0.0	8.2 ± 0.0
proteína(%Nx5.85)	14.2 ± 0.0	24.3 ± 0.7	26.3 ± 0.4
extracto etéreo	6.8 ± 0.2	9.8 ± 0.0	0.8 ± 0.0
cenizas	2.9 ± 0.0	7.5 ± 0.0	8.2 ± 0.0
fibra cruda	4.5 ± 0.0	9.8 ± 0.0	10.3 ± 0.0
carbohidratos	60.8 ⁴	39.4	46.2

¹ semilla de amaranto.

² harina proteínica de amaranto.

³ harina proteínica de amaranto desengrasada.

⁴ por diferencia

⁵ representa la media y la desviación estándar de tres replicas.

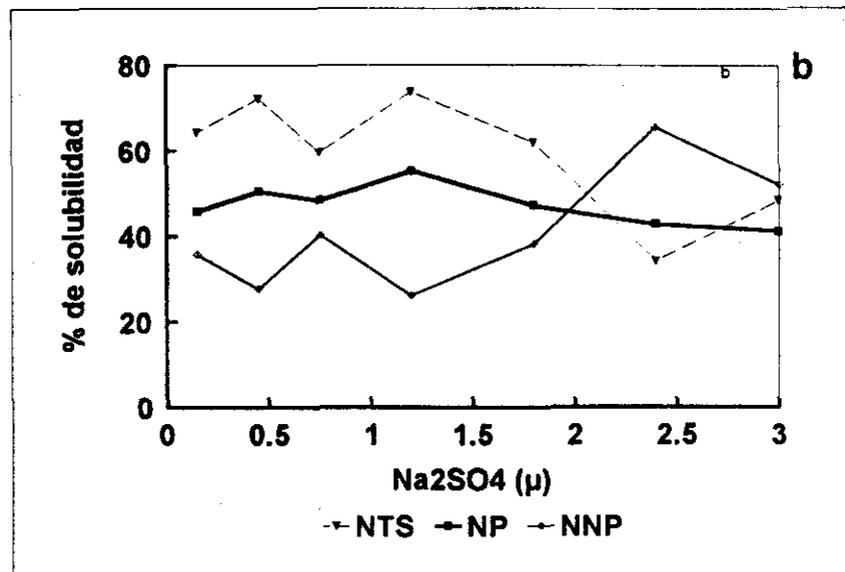
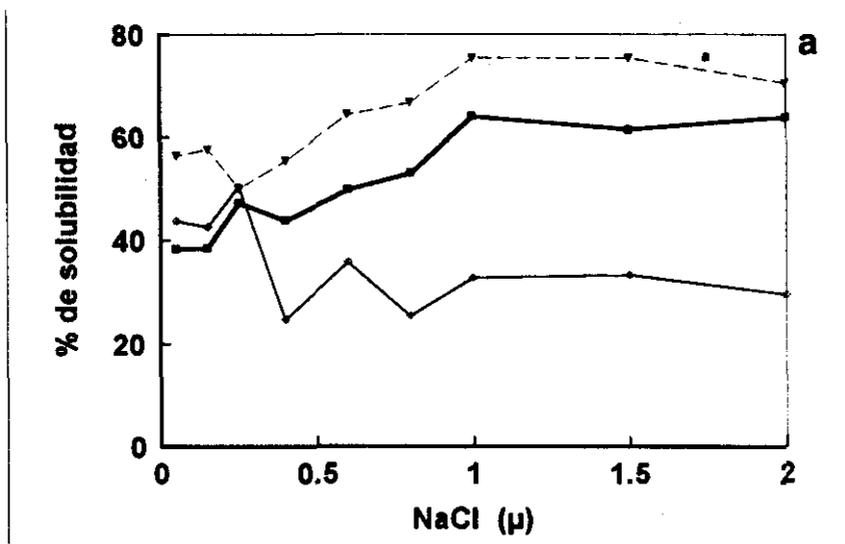
2. Solubilidad del nitrógeno del concentrado proteínico de la semilla de amaranto.

2.1 Solubilidad en disoluciones salinas.

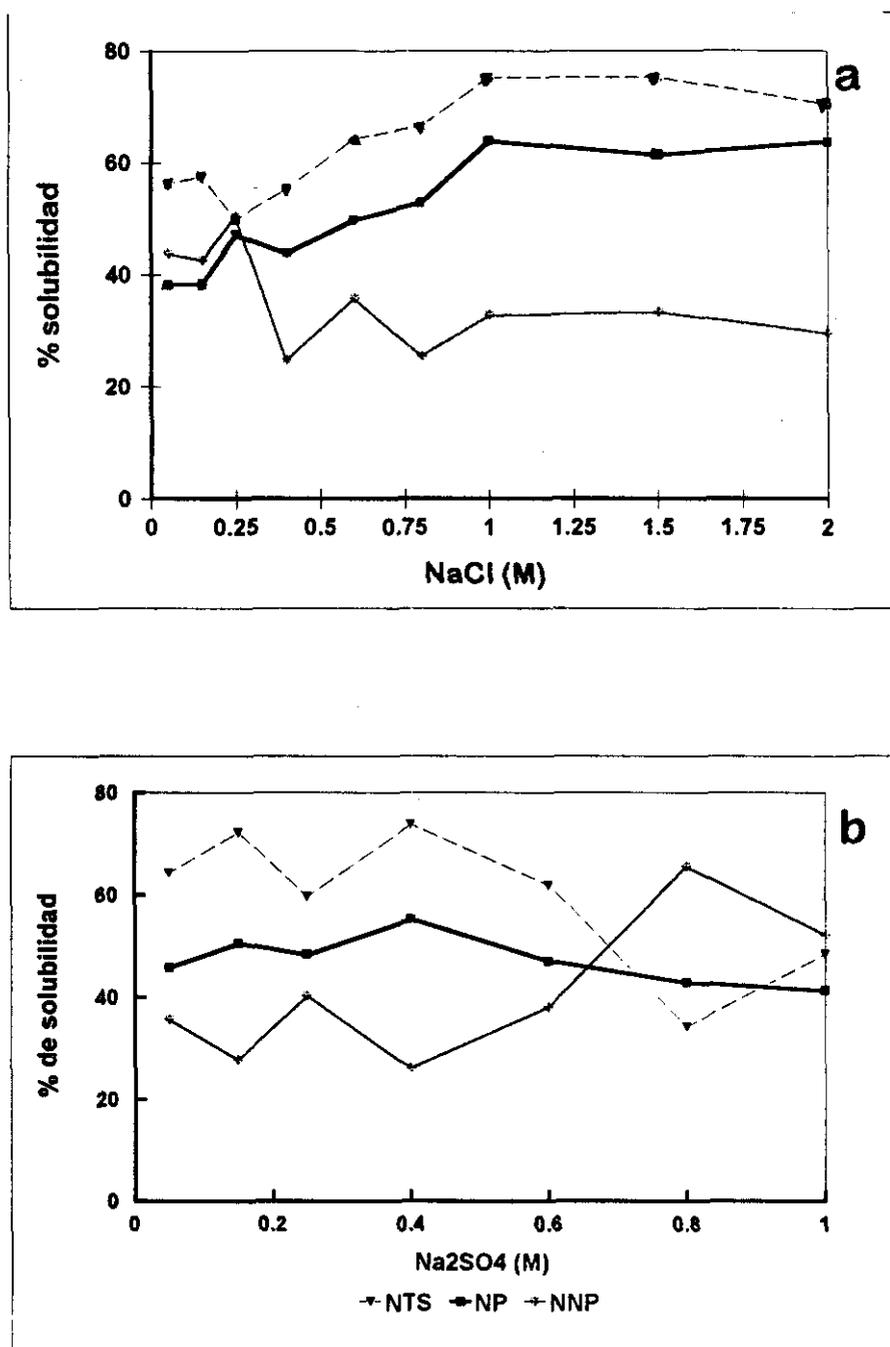
Los perfiles de solubilidad de NTS de HPAD-29 en disoluciones de NaCl o Na₂SO₄ en diferentes concentraciones y fuerzas iónicas (μ), se muestran en las Figs. 5 y 6 respectivamente. Cuando se utilizó NaCl, la mayor solubilidad de NTS se observó en el intervalo de concentraciones de 1 M a 2 M, ya que no se encontró diferencia significativa a $p < 0,05$ (64% aprox. del contenido inicial de HPAD-29 que fue de 4,89 g N/100 g de HPAD-29). Estos resultados fueron similares a los informados por Paredes-López y col., (1988), quienes observaron la mayor solubilidad de NTS del grano de amaranto en NaCl 1 M, pero con un rendimiento menor ($45,7 \pm 2$ % para la harina desengrasada). Cuando se utilizó Na₂SO₄ la mayor solubilidad de NTS se observó en una concentración de 0,4 M, la solubilidad de NTS fue de 55% aprox. En la Fig. 6a se puede observar que en el intervalo de 0,3 a 0,4 M con NaCl, se solubilizó aproximadamente el 45% de NTS de HPAD-29. Lo anterior concuerda con lo que informaron Soriano-Santos y col., (1992), estos autores observaron que la solubilización de N del grano de amaranto fue más eficaz en una disolución de Na₂SO₄ (0,04 M), que en una disolución de NaCl de concentración mayor (0,17 M). Si se analiza la Fig. 6b, se puede observar que en el intervalo de concentraciones entre 0,5 y 0,6 M de Na₂SO₄, esta sal posee una mejor capacidad como solubilizante de NTS, que cuando se utiliza NaCl en el mismo intervalo de concentraciones. Lo anterior se explica porque para una misma concentración de las sales monovalentes o divalentes, las fuerzas iónicas son diferentes, y en este caso mayores para todas las disoluciones de

Na₂SO₄, a las mismas concentraciones de NaCl (Tabla 7). En las Figs. 5a y 5b, se puede observar que la máxima solubilidad de NTS de amaranto, se obtuvo en un intervalo de μ de 1 a 1,5; tanto para NaCl como para Na₂SO₄. Cuando se consideró la concentración y naturaleza de la sal, se observó que a concentraciones bajas del Na₂SO₄ se solubilizó más NTS, que con el NaCl (Figs. 6a y 6b). Este fenómeno de solubilidad está asociado al efecto de la sal y no de la concentración de la misma (Figs. 5a y 5b). Se sabe teóricamente, que la solubilidad de las proteínas globulares es mayor en concentraciones bajas de sales divalentes neutras como el MgCl y (NH₄)₂SO₄, que cuando se utilizan sales monovalentes, como el NaCl, NH₄Cl y KCl. La μ influye en la solubilidad de la proteína, de tal manera que disminuye al aumentar la fuerza iónica y precipitan de una disolución a μ altas (Voet y Voet, 1990). La disminución de la solubilidad de NTS, también se observó en este estudio, a una $\mu > 2$ de Na₂SO₄. Se supone que a esta μ , la influencia se ejerce sobre el almidón en vez de las proteínas, puesto que se obtuvieron geles, que se creen fueron de almidón modificado. Padhye y Salunke (1977) en sus estudios de extracción de proteínas a partir de *Phaseolus mungo*, mencionaron que el Na₂SO₄ fue un mejor solubilizante de proteínas, que el NaCl, aunque no se explicó la razón.

Los perfiles de solubilidad en disoluciones salinas del NTS de HPAD-29 o de la semilla de amaranto, resultaron muy interesantes, ya que en los estudios de caracterización y cuantificación de las proteínas de amaranto, uno de los métodos más utilizados tradicionalmente, es el de Landry y Moureaux (1970), en este estudio se recomienda la extracción de las globulinas con NaCl 0,5 M ($\mu=0,5$).



Figuras 5. Perfil de Solubilidad del Nitrógeno de la semilla de amaranto en disoluciones de diferentes fuerzas iónicas de: a) NaCl; b) Na₂SO₄. NTS : nitrógeno total soluble; NP: nitrógeno proteínico; NNP: nitrógeno no proteínico



Figuras 6. Perfil de Solubilidad del Nitrógeno de la semilla de amaranto en disoluciones de diferentes concentraciones molares de: a) NaCl; b) Na2SO4. NTS : nitrógeno total soluble; NP: nitrógeno proteínico; NNP: nitrógeno no proteínico

Si se toma en consideración el perfil de solubilidades (Figs. 5a y 5b) para las proteínas del amaranto, a esta μ no se tendría una extracción cuantitativa de NTS, puesto que la mayor solubilización, se presenta en el intervalo de μ entre 1 a 1,5 para ambas sales. Por lo tanto en este y como en otros trabajos (Soriano-Santos y col., 1992), se considera que hasta la fecha no existe una cuantificación precisa del fraccionamiento de las proteínas del amaranto, porque estas proteínas poseen un perfil de solubilidad de NTS particular, puesto que, es también a esta fuerza iónica donde se obtiene la mayor cantidad de NP y la mínima cantidad de N no proteínico (NNP), que son los componentes del NTS. Lo anterior se sustenta en las observaciones que Osborne (Shewry y Miflin, 1983) realizó al extraer el NTS (albúmina + globulina) en NaCl al 10% de harina de cebada, quien observó que la presencia de sales en otras fuentes vegetales hacen imposible la extracción de la verdadera fracción de albúmina con agua. También es probable, que una extracción secuencial produzca una considerable contaminación entre albúmina y globulina y de aquí la dificultad en la reproducibilidad de la separación de ambas fracciones. Estas dificultades de fraccionamiento, se evidencian por la presencia de polipéptidos comunes en las dos fracciones detectadas por la electrofóresis. La proporción del NTS de una semilla, en disoluciones salinas varía dependiendo del contenido de NT del grano. También es probable que la desnaturalización durante el almacenamiento de la semilla o durante la extracción provoque, la insolubilidad de las proteínas solubles en sales y de ahí su presencia en glutelinas (Shewry y Miflin, 1983).

El N no proteínico (NNP) solubilizado en disoluciones salinas en este y otros informes, se registró en altas cantidades entre 30 y 40% del NTS. A la fecha no se ha

caracterizado la naturaleza química del NNP, pero se especula que incluye péptidos, aminoácidos libres (ambos producto de una hidrólisis parcial de las proteínas) y probablemente carbohidratos complejos, ácido fítico, y compuestos fenólicos como el ácido ferúlico, ácido clorogénico, ácido sinápico y sinapina, entre otros, que se solubilizan junto con el NP en las disoluciones salinas (Myers, 1988).

2.2 Solubilidad en disoluciones alcalinas.

Otra característica del NT de HPAD-29, fue que presentó una limitada solubilidad en el álcali. Paredes-López y col., (1988) indicaron que la mayor solubilidad de las proteínas del amaranto se obtuvo a pH 11. Por esta razón, en este estudio sólo se trabajó en un intervalo de pH entre 9 y 11. Se encontró que la solubilidad de NTS de HPAD-29 en el álcali, aumentó al elevarse el pH. Se observó una solubilización de 60 al 70% de NT de HPAD-29 que correspondió al NTS. También se evaluó el N insoluble en el álcali (NIR), en este caso se midió en el residuo de HPAD-29, que resultó entre el 30 y 40%. El NT de HPAD-29 medido experimentalmente (NTS + N insoluble en álcali del residuo) fluctuó entre el $99,3 \pm 0,6\%$ (Tabla 9). Lo anterior indicó que aún con la extracción alcalina de NT de HPAD-29, permanece insoluble una cantidad importante del NT de la harina. Lo anterior puede deberse a la desnaturalización de las proteínas, durante el almacenamiento de la semilla o por los disolventes durante la extracción de NTS o por el desengrasado previo al que son sometidos los materiales para la extracción de proteínas (Shewry y Mifflin, 1983).

En cuanto al contenido de NP y NNP aislado en el NTS, en el intervalo de pH de prueba, se observó que no hubo diferencia significativa entre los tres tratamientos ($p < 0,05$). El NP contenido en el NTS fluctuó entre el 87% y 89%; y el NNP entre el 11% y 13%. Este último quizá sea producto de la hidrólisis enzimática parcial de las proteínas durante la molienda previa de la semilla.

Tabla 9. rendimientos de extracción del n de la harina proteínica de amaranto desengrasada (hpad-29) en alcali a diferentes pH.

NaOH pH	g cpa ¹ /100 g (hpad-29)	g nts ² /100 g (hpad-29)	g nlr ³ /100 g (hpad-29)	g np ⁴ /100 g cpa
9	25.1 ± 1.5 ^{5a}	61.7 ± 0.2 ^b	36.6 ± 0.4 ^a	50.2 ± 0.5 ^b
10	25.0 ± 0.8 ^a	66.8 ± 1.2 ^{ab}	32.0 ± 1.0 ^{ab}	54.6 ± 1.2 ^{ab}
11	25.5 ± 0.9 ^a	70.6 ± 0.1 ^a	29.3 ± 0.1 ^b	57.6 ± 0.6 ^a

¹ cpa: concentrado proteínico obtenido en solubilización alcalina.

² nts: nitrógeno total soluble en alcali.

³ nlr: nitrógeno insoluble en alcali residual.

⁴ np: nitrógeno proteínico contenido en el cpa.

⁵ los resultados son la media de tres replicas. las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Se sabe que los tratamientos fuertemente alcalinos (pH >11) pueden modificar además de algunas de las propiedades funcionales de las proteínas nativas, también aminoácidos esenciales como la lisina y generar nuevos residuos de aminoácidos como la lisinoalanina, lantionina y ornitinoalanina. Estos residuos de aminoácidos son considerados tóxicos para el organismo. Sin embargo paradójicamente, estos mismos tratamientos pueden mejorar las propiedades funcionales de las proteínas. La naturaleza e

intensidad del tratamiento aplicado sea alcalino o químico, determinará las modificaciones que se produzcan en estas propiedades (Cheftel y col., 1989). Por lo anterior sería importante estudiar los cambios nutricionales de las proteínas, durante la obtención de los concentrados y aislados proteínicos y tratar de evitarlos en la medida de lo posible, si realmente se desea aprovechar al máximo su alto valor nutritivo.

2.3 Modificación química (succinilación).

La modificación química que se reconoce más efectiva para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas, entre ellas la solubilidad, es la succinilación (Choi y col., 1982). La Fig. 7 muestra el efecto de la succinilación sobre HPAD-29, donde se observó claramente la relación directa del aumento de la solubilidad de material soluble succinilado en relación al grado de succinilación de HPAD-29. Sin embargo, aparentemente el contenido de NTS disminuye al aumentar el nivel de succinilación de HPAD-29. Por otra parte, si se relaciona el contenido de NP con respecto al NTS por succinilación (en cada nivel), la relación permanece constante a partir del 40% hasta el 100% de succinilación de HPAD-29. Lo anterior quiere decir, que existe un límite de acilación de las proteínas contenidas en HPAD-29 entre 40% y 50% y a partir de este nivel se favorece la esterificación del almidón contenido en HPAD-29, con lo que se aumenta la solubilidad del material por succinilación, pero con el mismo contenido de NTS y NP. Se puede observar que al aumentar la relación de anhídrido succínico-proteína cruda de HPAD-29, se podrían obtener concentrados proteínicos con baja concentración de almidón y por otra parte, materiales proteínicos ricos en almidones modificados por esterificación con anhídrido succínico. En la Fig. 8 se

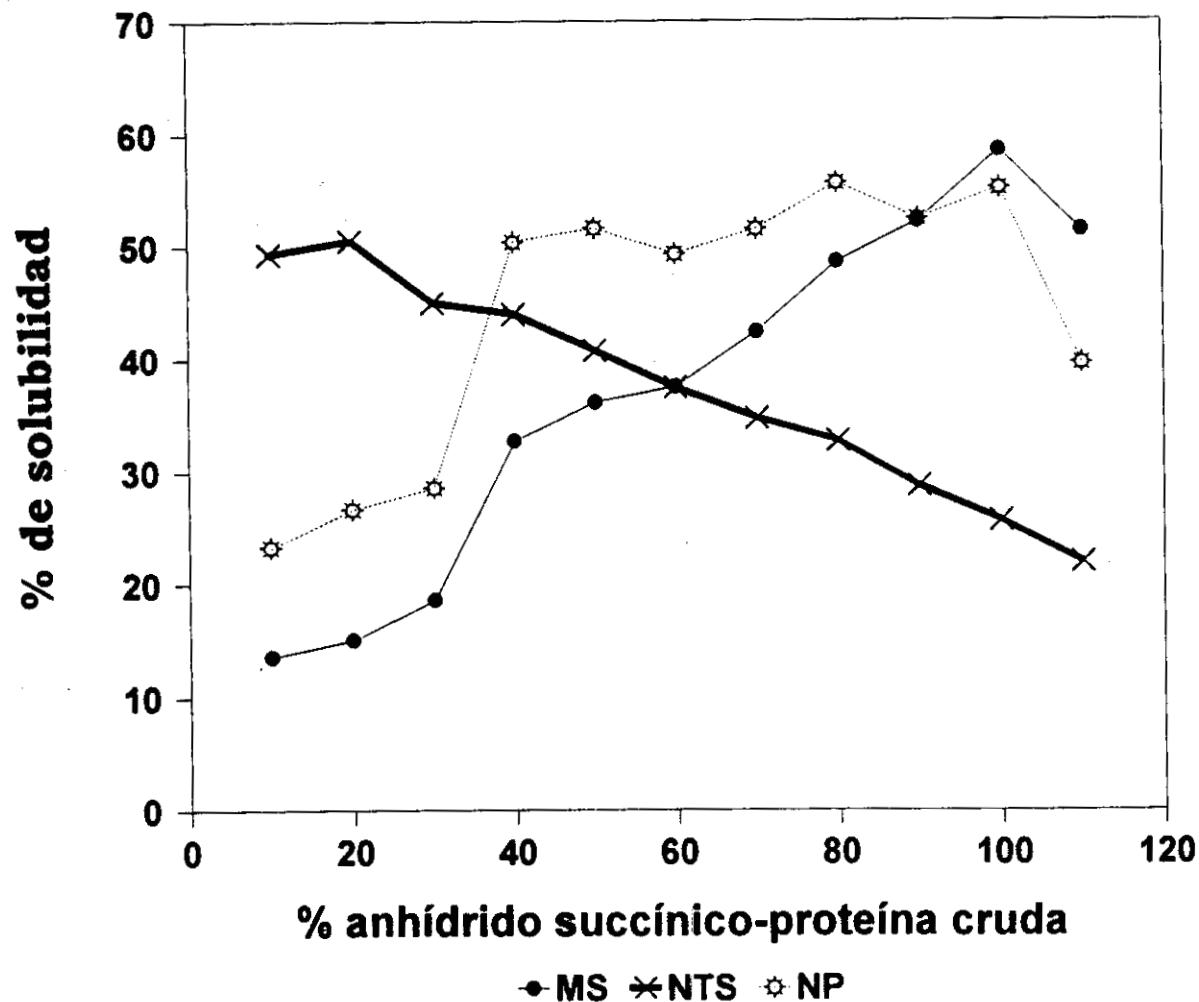


Figura 7. Perfil del solubilidad del Nitrogeno de la semilla de amaranto por succinilacion. MS=material soluble succinilado; NTS=Nitrogeno total soluble; NP= Nitrogeno proteínico

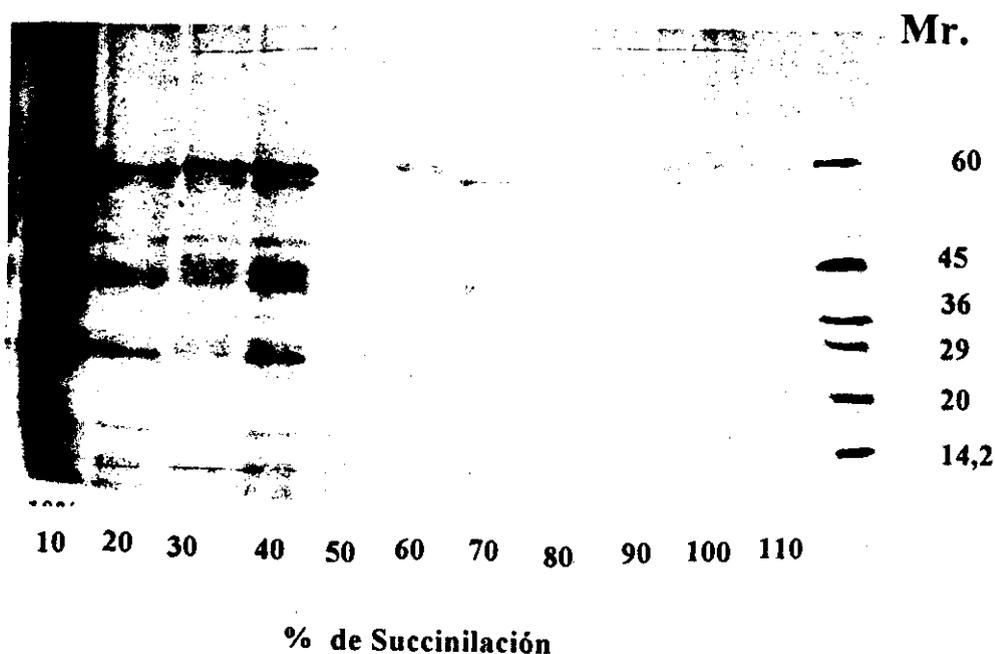


Figura 8. Perfil electroforético de diferentes tratamientos de succinilación. a) marcadores de peso molecular: albúmina sérica bovina, albúmina de huevo, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina y α -lactoalbúmina, con Mr. de: 66, 45, 36 29, 20 y 14.2 kD respectivamente.

muestra el perfil electroforético de los diferentes grados de succinilación, donde se aprecia claramente, la disminución del contenido de NTS en relación al aumento de la succinilación.

Delahaye y Gómez (1987) publicaron la obtención de un material succinilado (1,4% de succinilación respecto al contenido de proteína cruda) a partir de semilla de amaranto, con un rendimiento de 14% y un contenido de proteína cruda o NT de 67,1%. Además señalaron una modificación del 42% de los grupos ϵ amino de la lisina, como consecuencia de ese nivel de acilación. A pesar de que en este trabajo se realizó un barrido de acilación de las proteínas desde 10% al 110%, respecto al contenido de NT del HPAD-29, no se registraron valores de recuperación de NTS mayores al 55%, aún con una relación de anhídrido succínico-proteína cruda de HPAD-29 del 80%. En cuanto al NNP no hubo regularidad en la cantidad extraída, pero la tendencia fue una disminución del 40% al 20% para los niveles intermedios entre 10% y 110% de succinilación, respectivamente. Los autores antes mencionados identificaron al material succinilado con propiedades funcionales excelentes. Sin lugar a duda, sería interesante medir el grado de acilación, de manera que se cuantifique la posible disminución del valor biológico de las proteínas, como consecuencia de la disminución de lisina disponible. Se sabe que aún cuando los derivados de adición de la lisina sean liberados de las cadenas polipeptídicas y absorbidas, su aprovechamiento depende de la presencia o ausencia de acilasas eficaces en el riñón o en otros órganos de diferentes especies de animales. Asimismo se reduce la disponibilidad de serina y treonina aunque definitivamente se ha reconocido a la succinilación proteínica, como un tratamiento que mejora las propiedades funcionales, principalmente solubilidad y

actividad emulsificante de aislados proteínicos (Cheftel y col., 1989; Franzen y Kinsella, 1976).

3.0 Comparación de los métodos de solubilización de las proteínas de HPAD-29.

En la Tabla 10 se pueden apreciar los rendimientos de NTS de HPAD-29, en las mejores condiciones de aislamiento obtenidas en cada uno de los diferentes métodos de solubilización, con referencia a una solubilización acuosa. Como puede observarse, una solubilización acuosa rindió la menor cantidad de concentrado, pero con un mayor contenido de NP de acuerdo al análisis de Duncan ($p < 0,05$); lo anterior se explica porque las albúminas son solubles en agua y la semilla de amaranto es rica en esta fracción proteínica (Soriano y col., 1992). Los concentrados proteínicos que tuvieron mejores rendimientos en NP fueron los obtenidos por solubilización alcalina a pH de 10 y 11 y con la relación anhídrido succínico-HPAD-29 al 50%, seguidos de la solubilización en NaCl 1M y Na₂SO₄ 0,4M en este orden. Se acepta tradicionalmente que el contenido de proteína en los concentrados y aislados proteínicos, se expresen en términos de proteína cruda o NT. Sin embargo, en este trabajo se hace hincapié en que el valor en proteína cruda, no expresa la cantidad de proteína o N proteínico. Nutricionalmente hablando, lo anterior quizá no tenga importancia, ya que aún el NNP puede aprovecharse en el organismo humano, pues se compone, entre otras moléculas, por aminoácidos y péptidos. El propósito es entonces, contar con concentrados proteínicos de características químicas y funcionales bien definidas, que puedan ser utilizados como ingredientes en la formulación de alimentos. Además, en la Tabla 10 se indican los porcentajes de concentración de proteína que se obtuvieron en cada uno de los métodos de extracción utilizados; se pudo

observar que cuando se empleó el método de solubilización en agua se presentó el mayor nivel de concentración con 253,74 %, en tanto que el método de succinilación ofreció la menor concentración de proteína, sin embargo, este tratamiento ofrece los mayores rendimientos en material concentrado, por lo que este método de extracción, al presentar un nivel medio de contenido proteínico, representaría el tratamiento que rindiera o extrajera mayor cantidad de proteína, a partir de 100 g de harina integral (HPAD-29).

Los resultados refuerzan la idea, en el sentido de que las fracciones proteínicas de la semilla de amaranto (albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas) se han subestimado, en parte por la solubilización limitada en los diferentes disolventes empleados y porque no se han considerado las posibles alteraciones que las proteínas puedan sufrir durante su extracción.

Tabla 10. Rendimientos de extracción del n de la harina proteínica de amaranto desengrasada (HPAD-29) a las condiciones óptimas de extracción de cada uno de los métodos empleados.

% de concentración de proteína ⁴	método de extracción	g cp ¹ /100 g (HPAD-29)	g nts ² /100 g (HPAD-29)	g np ³ /100 g cp
253.84	agua (pH 7)	4.5 ± 0.6 ^{5E}	24.7 ± 0.6 ^E	57.6 ± 0.6 ^a
218.74	NaCl (1 M)	15.0 ± 0.9 ^N	67.2 ± 0.0 ^N	33.4 ± 0.9 ^N
232.77	Na2SO4 (0.4 M)	20.8 ± 1.6 ^C	58.6 ± 0.9 ^C	28.9 ± 0.8 ^E
216.76	NaOH (pH 10)	24.9 ± 0.8 ^b	75.1 ± 1.2 ^b	54.6 ± 1.2 ^{a,b}
208.89	NaOH (pH 11)	25.5 ± 0.9 ^b	76.1 ± 0.0 ^b	52.0 ± 0.7 ^b
187.07	succinilación (50%)	36.2 ± 1.8 ^a	71.4 ± 1.3 ^a	40.8 ± 0.3 ^C

¹ cp. concentrado proteínico obtenido por cada uno de los métodos de extracción.

² nts. nitrógeno total extraído por cada uno de los métodos de extracción.

³ np. nitrógeno proteínico contenido en el concentrado proteínico respectivo.

⁴ porcentaje en relación a la harina integral (HPAD-29).

⁵ los resultados son la media de tres replicas, las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (p < 0.05).

Por otra parte, en la Fig. 9 se muestra el perfil electrofórico en condiciones de desnaturalización para los diferentes concentrados proteínicos obtenidos; cabe mencionar que tanto la concentración como el volumen aplicado para el desarrollo del perfil electrofórico fue la misma. El peso molecular de los diferentes polipéptidos presentes en cada concentrado se obtuvo a partir de la curva de regresión lineal $\log PM = -1,4(Rf) + 2,27$. Los pesos moleculares de los diferentes polipéptidos detectados se indican en la Tabla 11. En la línea b se muestra el perfil del concentrado obtenido por succinilación, donde se aprecia aunque tenuamente, tres bandas principales (I, III, IV); en tanto las líneas c y d muestran el perfil de los concentrados obtenidos por solubilización en álcali a pH de 10 y 11, en los cuales se pudieron apreciar siete subunidades diferentes (I, II, III, IV, V, VI y VII), de las cuales cuatro se revelan como bandas muy intensas.

Tabla 11. peso molecular calculado para los diferentes polipéptidos presentes en los perfiles electrofóricos de los concentrados proteínicos de amaranto.

SUBUNIDADES	peso molecular calculado (kDa)
I	62.2
II	38.3
III	30.2
IV	20.1
V	14.2
VI	11.6
VII	10.9

La línea c, por su parte revela el perfil de las proteínas contenidas en el concentrado obtenido por solubilización acuosa, que se supone son principalmente albúminas, con

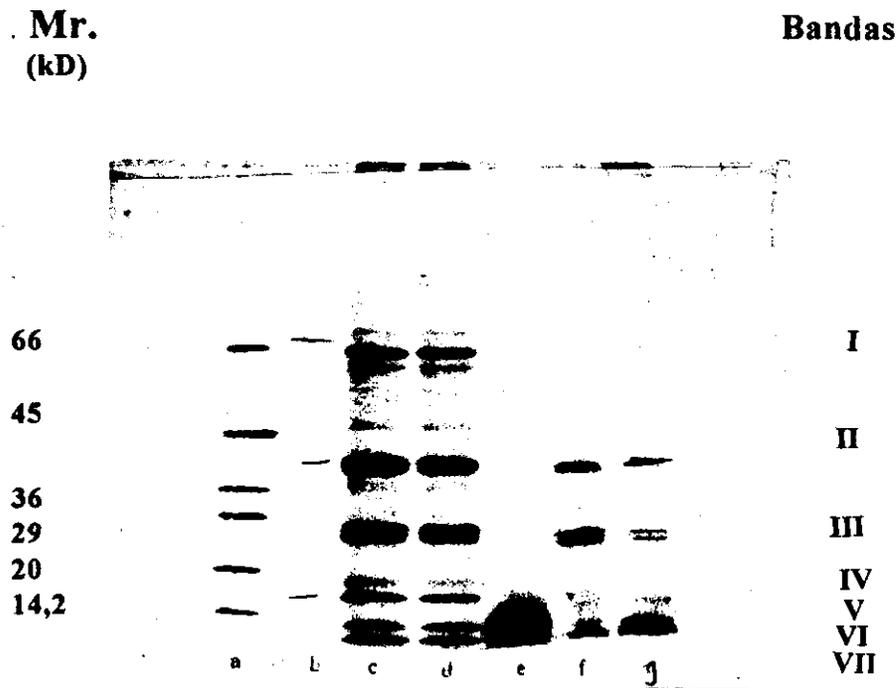


Figura 9. Perfil electroforético de los concentrados proteínicos de la semilla de amaranto , a) marcadores: α lactoalbúmina, inhibidor tripsina, anhidrasa carbónica, gliceraldehido 3-fosfato-deshidrogenasa, albúmina de huevo, albúmina sérica bovina. 14,2; 20; 29; 36; 45 y 66 kD, respectivamente; obtenidos por solubilización en: b) succinilación; c) álcali pH 10; d) álcali pH 11; e) en agua, pH 7; f) en Na₂S₂O₄; g) NaCl.

alguna fracción importante de globulinas, en este perfil predominaron pequeños polipéptidos (VI y VII) de peso molecular menor a 14,2 kD; también se puede apreciar una banda muy tenue (IV) que corresponde a una fracción de peso molecular mayor a 20 kD. Esto último contrasta con lo que encontraron Gorinstein y col. (1991), quienes en un estudio de fraccionamiento de las proteínas de varias especies de amaranto, analizaron el perfil electroforético de la fracción que reconocieron como albúminas, y encontraron que éstas se encontraban constituidas por varias subunidades principales, de un rango de peso molecular de 10 a 37 kD. De igual manera, Konishi y col. (1991) al hacer un fraccionamiento de albúminas y globulinas, utilizando en forma alterna extracciones con agua y disolución de NaCl, presentaron el perfil electroforético de las albúminas, el cual estuvo constituido por cuatro fracciones principales de peso molecular de 56, 36, 26 y 22 kD. Por otra parte, la caracterización electroforética de las proteínas solubilizadas en las disoluciones de NaCl y Na₂SO₄. (líneas f y g) no mostraron diferencias apreciables en las diferentes subunidades (III y IV), salvo que las proteínas solubilizadas en NaCl mostraron con mayor intensidad la fracción VII; de la misma manera, las subunidades III y IV de peso molecular calculado en 20,1 y 30,1 kD respectivamente, se mostraron más intensas en las bandas correspondientes a las proteínas solubilizadas en Na₂SO₄. Los datos encontrados en este trabajo difieren notablemente con lo publicado por autores como Gorinstein y col. (1991), quienes señalaron que las proteínas solubilizadas en disoluciones salinas como las globulinas, las cuales separaron de las albúminas por diálisis y una posterior centrifugación, se componen de diferentes subunidades de peso molecular de 14 a 18 kD;

por su parte, Barba de Rosa y col. (1992), informaron que la fracción proteínica de las globulinas constaba de polipéptidos de peso molecular de 38 kD.

II. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS CONCENTRADOS PROTEÍNICOS DE LA SEMILLA DE AMARANTO

1. Solubilidad de los concentrados proteínicos de amaranto en función del pH.

Las curvas de solubilidad de los seis concentrados proteínicos de amaranto y el de soya se muestran en la Fig. 10. Para todos los concentrados se pudo observar una región de mínima solubilidad en un rango de pH de 4-5, que corresponde a la zona donde se localiza el punto isoeléctrico de las proteínas presentes en estos concentrados.

Al comparar la solubilidad del concentrado succinilado con el resto de los concentrados proteínicos, se encontró que éste presentó un valor mínimo de solubilidad a pH 4; el comportamiento a pH ácido del concentrado modificado, se podría explicar por la alteración de los grupos amino catiónicos, lo que puede provocar un corrimiento del punto isoeléctrico (Barber y Warthessen, 1982). Asimismo, el concentrado proteínico obtenido por succinilación, presentó los valores más altos de solubilidad en un rango de pH de 6-9, en comparación con los concentrados sin modificación química. Este comportamiento es similar al que ya se ha observado en proteínas miofibrilares succiniladas de pescado, con aislados modificados de avena, en glutén succinilado de trigo, con aislados succinilados de girasol, en harinas modificadas de frijoles saltarines (*Psophocarpus tetragonolobus*), así como en aislados succinilados de harina de semilla de algodón, (Groninger, 1973; Barber y Warthessen, 1982; Narayana y Rao, 1984; Kabirullah y Wills, 1982, Choi y col., 1981a), en las que se ha observado un aumento de la solubilidad del nitrógeno. El incremento en la solubilidad de las proteínas

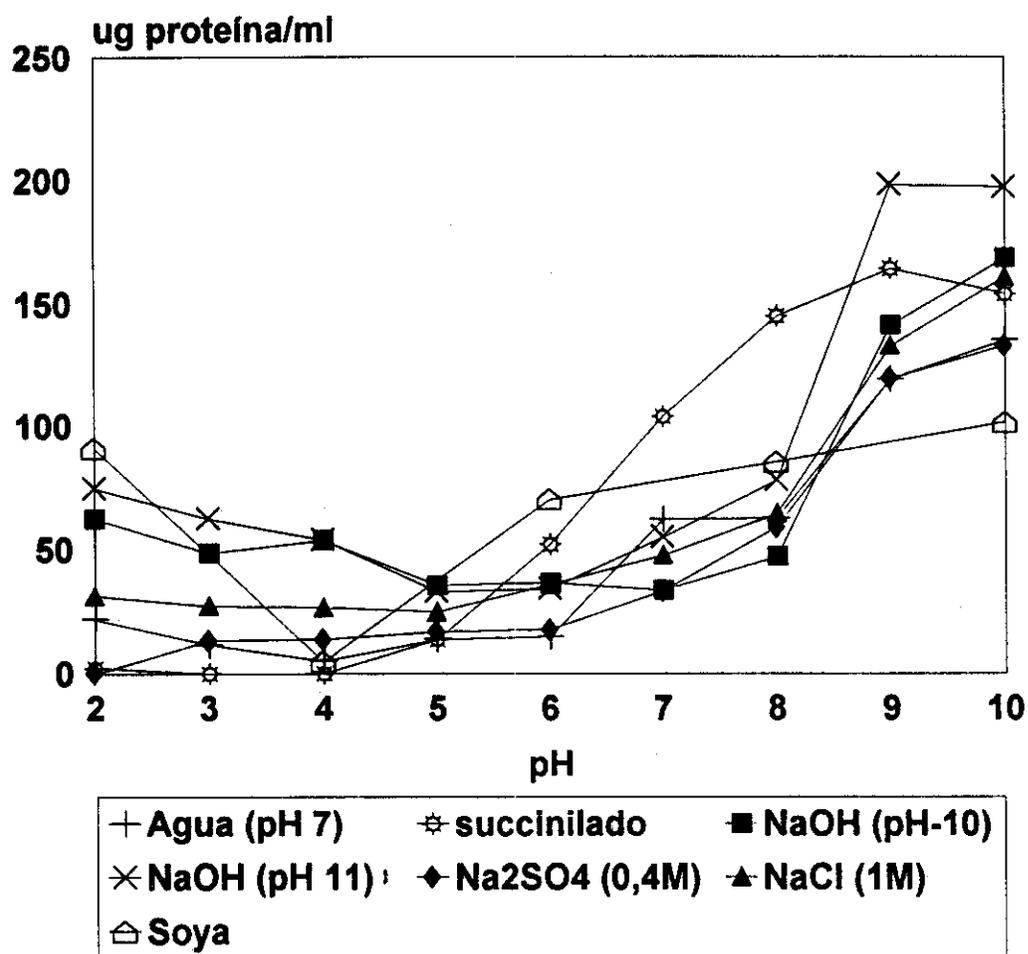


Figura 10. Solubilidad en función del pH de los concentrados proteínicos de amaranto obtenidos por diferentes métodos de solubilización y de soya comercial..

succiniladas, se le atribuye a la modificación de la carga neta de la proteína; aunque Choi y col. (1982), sugieren que el incremento en la solubilidad de las proteínas, además del cambio en la naturaleza electrostática ocurrido en la molécula, se da por el aumento en la fuerza iónica de la suspensión proteínica, ocasionado éste por la adición del anhídrido succínico. Por otra parte, en el concentrado NaOH (pH-11) se cuantificó la mayor cantidad de proteína soluble cuando se elevó el pH hasta 10 de la suspensión proteínica, en comparación de todos los concentrados estudiados. Por su parte, el concentrado proteínico comercial de soya tuvo mejor solubilidad que los concentrados proteínicos de amaranto a pH 2 y pH 6.

En general los concentrados proteínicos de amaranto presentaron valores altos de solubilidad de proteína a pH alcalinos; lo anterior contrasta con el comportamiento de los concentrados preparados a partir de oca o ajonjolí, que presentan una mayor solubilidad a pH's extremos ácidos y alcalinos (Dench y col. 1981; Bryant y col. 1988).

2. Capacidad de absorción de aceite y agua de los concentrados proteínicos de amaranto.

En la Tabla 12 se presentan los resultados obtenidos de la medición de estas propiedades funcionales. De acuerdo al análisis Duncan ($p < 0,005$) realizado, se encontró que los concentrados obtenidos por solubilización en disoluciones de NaCl ó Na₂SO₄ presentaron los valores más altos de absorción de agua, y simultáneamente la menor absorción de aceite.

Diferentes autores como Paredes-López y col. (1986), Dench y col. (1981) relacionan esta propiedad de absorción con la estructura nativa de la proteína; de esta manera, cuando midieron la absorción de agua en los concentrados de cártamo (*Chartamus*

Tabla 12. absorción de agua y aceite de concentrados proteínicos de amaranto obtenidos por diferentes métodos

método de extracción	absorción de aceite ml/g de concentrado	absorción de agua ¹
agua (pH 7)	0.80 ± 0.14 ^{c,2}	1.20 ± 0.08 ^d
NaCl (1 M)	0.76 ± 0.04 ^{c,N}	2.76 ± 0.12 ^a
Na ₂ SO ₄ (0.4 M)	0.61 ± 0.04 ^d	2.30 ± 0.04 ^b
NaOH (pH 10)	1.16 ± 0.06 ^a	1.66 ± 0.18 ^c
NaOH (pH 11)	1.20 ± 0.02 ^a	2.23 ± 0.16 ^b
succinilación (50%)	1.00 ± 0.16 ^b	1.52 ± 0.08 ^c
soya ³	2.11 ± 0.42	1.30 ± 0.31

¹ medida a pH 7.

² representa media y desviación standard de tres repeticiones

³ Shanmugasundaram y col. (1989)

^a letras iguales indican que las medias son significativamente diferentes

thinctorius) y ajonjolí (*Sesamum indicum*), explicaron los altos valores de absorción de agua a la preservación de la estructura nativa de las proteínas de los diferentes concentrados proteínicos, dado que para la preservación de la misma, influyó el método de extracción de las proteínas. Paredes-López y col. (1986) para la preparación de los concentrados de cártamo, recurrieron al principio de la formación de micelas, el cual involucra a las propiedades electrostáticas de las proteínas; el procedimiento implicó la solubilización de las proteínas en disolución de NaCl con una dilución posterior en agua fría; las proteínas

solubilizadas con este método forman micelas y precipitaron por una centrifugación posterior.

Por su parte, Dench y col. (1981) prepararon el concentrado de ajonjolí, por una solubilización de las proteínas en una disolución de NaCl y posterior precipitación isoeléctrica de las proteínas con ácido tricloroacético. De alguna manera, las condiciones que describen estos autores son similares a las utilizadas, para la preparación de los concentrados obtenidos por solubilización en disoluciones de Na₂SO₄ y NaCl a diferentes concentraciones, en este trabajo. Para que se preserve la estructura nativa de las proteínas, se debe de asegurar que los fragmentos hidrofílicos situados en el exterior de la molécula, interactúen con las moléculas circundantes de agua; en tanto que los fragmentos hidrofóbicos, que se orientan al interior, estabilicen la molécula proteínica. En el caso del concentrado NaOH (pH-11), se observó que éste presentó la absorción más alta de aceite, junto con el concentrado NaOH (pH-10) a $p < 0,005$. En cuanto a la absorción de agua, este concentrado no presentó diferencias significativas ($p < 0,005$) con el concentrado obtenido en solución de Na₂SO₄. La alta capacidad de absorción de aceite o de agua para cada concentrado obtenido en NaOH, podría explicarse debido a una alteración en la estructura nativa de las proteínas, probablemente por desnaturalización de éstas. Los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos se hayan expuestos irregularmente, debido a la modificación de su estructura, permitiendo la interacción tanto con moléculas de agua como de aceite (Paredes-López y col. 1986). Shanmugasundaram y col. (1989) cuando midieron la capacidad de absorción de la harina de maduca, indicaron que la alta absorción de aceite que

encontraron en esta harina, se pudo deber a la naturaleza eléctrica de los aminoácidos no polares.

Los valores de absorción de agua de los concentrados de amaranto encontrados en este trabajo, se asemejan a los observados en los aislados de ajonjolí que investigaron Dench y col. (1981), aunque son mayores que los valores para aislados de cártamo estudiados por Paredes-López y col. (1986). En lo que concierne a la capacidad de absorción de aceite, se encontró que los valores observados para los concentrados de amaranto son menores en comparación con los aislados de ajonjolí y cártamo. Debe de anotarse que en la composición original de estas semillas, el contenido de aceite es mayor que en la semilla de amaranto, lo que podría explicar en principio, una mayor afinidad de estas proteínas por el aceite. Por otra parte, Das y Kinsella, (1990) indicaron que para una misma proteína, los valores de absorción de agua o aceite obtenidos pueden variar según el equipo que se utilice para su evaluación.

3. Actividad y Estabilidad de emulsificación de los concentrados proteínicos en función del pH.

En la Fig. 11 se muestra el perfil de actividad de emulsificación en función del incremento del pH, que presentaron los concentrados proteínicos de amaranto, así como el de soya. En el concentrado NaOH (pH-11) se observó a pH 4, la actividad más alta de emulsificación de todos los concentrados, cabe mencionar que a este mismo pH, anteriormente se había observado la mínima solubilidad de nitrógeno (Fig. 10), para todos los concentrados estudiados. En el concentrado succinilado por su parte, también se observó

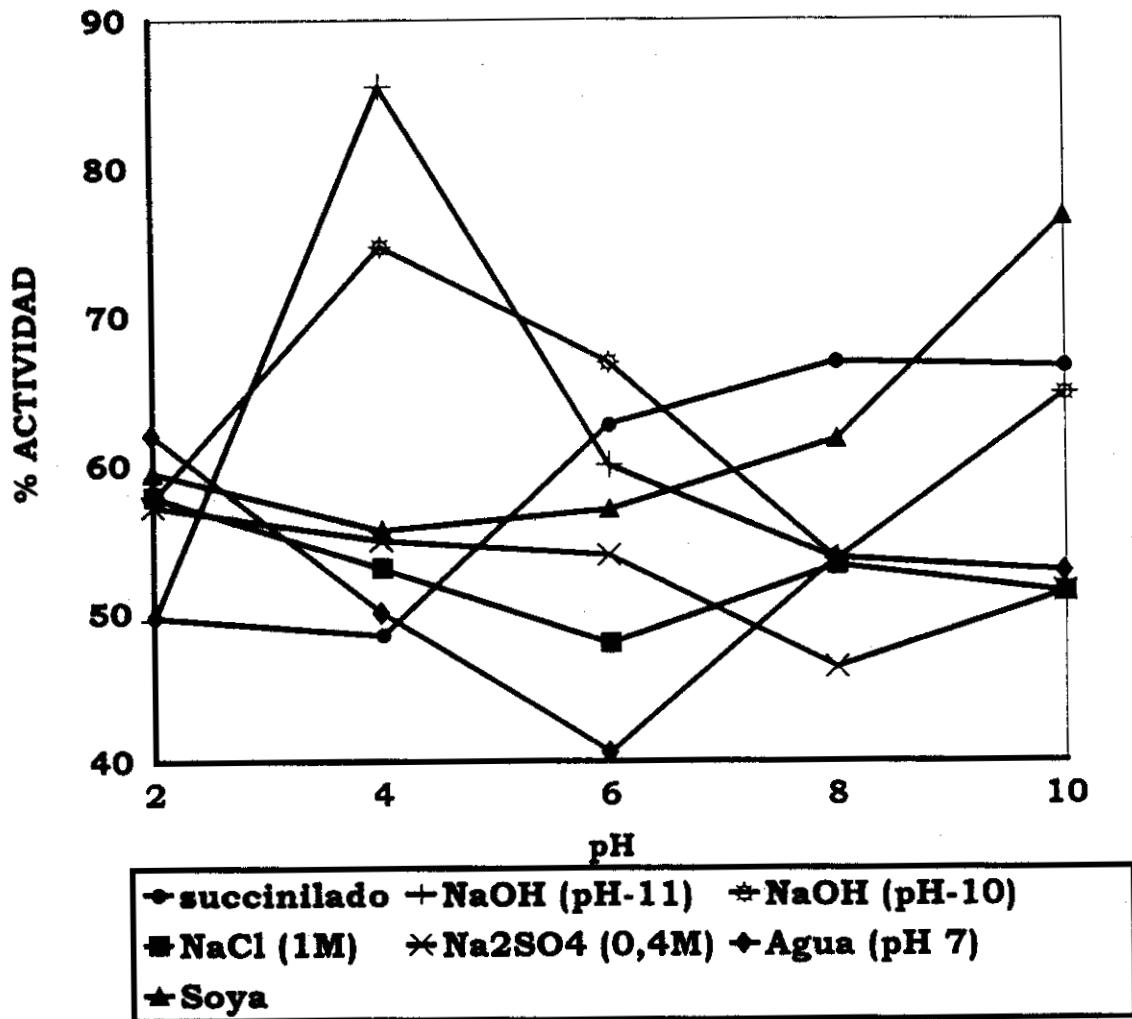


Figura 11. Perfil de la Actividad de emulsificación de los concentrados proteínicos de amaranto y soya en función del pH.

la mayor actividad de emulsificación a pH 6 y pH 8, posiblemente debido a que en ese rango de pH se ionizan los polipéptidos presentes en este concentrado, lo que permite una apertura de éstos, a lo largo de la interfase aceite-agua, abatiendo la tensión superficial y propiciando la formación de la emulsión. Diversos fenómenos de inestabilidad como la floculación, la cual puede ser provocada por la brusca supresión de cargas eléctricas debido a la modificación del pH y la fuerza iónica, se pueden observar en los sistemas emulsionantes; la floculación provoca que aumenten las repulsiones electrostáticas entre las gotitas emulsificadas; lo que explica de alguna manera, el comportamiento azaroso de la actividad de emulsificación de los concentrados proteínicos de amaranto en función del pH. Se sabe que según el pH, se puede producir la ionización de las cadenas laterales de los aminoácidos, este cambio en la naturaleza eléctrica puede aportar fuerzas de repulsión electrostática que favorecen la estabilidad de la emulsión.

Con la finalidad de determinar la relación de alta actividad y alta estabilidad emulsificante de los concentrados preparados, se realizó una prueba Duncan, que permitió localizar en relación del incremento del pH, aquellos concentrados que poseían simultáneamente la mayor actividad y estabilidad de emulsificación. En la Tabla 13 se presentan los resultados de esta prueba; se encontró que a pH 2, el concentrado succinilado y el concentrado obtenido por solubilización en agua, tuvieron los mejores valores promedios ($p < 0,005$) de actividad y estabilidad de emulsificación; mientras que a pH 4, correspondió a los dos concentrados obtenidos por solubilización alcalina, poseer la mejor actividad y estabilidad a $p < 0,005$; por otra parte, a pH 6 se observó nuevamente que el concentrado

succinilado, junto con el concentrado obtenido por solubilización a pH 10, tuvieron la más alta actividad y estabilidad de emulsificación; finalmente a pH de 8 y 10, el concentrado succinilado y el de soya que se utilizó de referencia, tuvieron los promedios más altos ($p < 0,005$). Se observó que cuando se midió la actividad de emulsificación a pH de 8, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,005$) en estos dos concentrados. Por último, a pH 10, la actividad de emulsificación del concentrado de soya fue más elevada ($p < 0,005$) en comparación a los concentrados de amaranto.

Tabla 13. prueba Duncan para la actividad y estabilidad de emulsificación de concentrados proteínicos de amaranto y soya en función del pH.

método de extracción del concentrado	a*	b**	a	b	a	b	a	b	a	b
	pH 2		pH 4		pH 6		pH 8		pH 10	
succinilación 50 %	49,7 ^b	70,21 ^a	48,5 ^d	75,9 ^k	62 ^{k,a}	60 ^k	66 ^a	75,8 ^a	66,6 ^b	61,9 ^a
NaOH (pH 11)	49,5 ^b	25,5 ^e	85,5 ^a	78,5 ^{a,k}	60 ^a	54,3 ^c	53,6 ^b	54,2 ^{k,c}	64,8 ^b	56,3 ^b
NaOH (pH 10)	57,7 ^a	48,6 ^d	74,7 ^b	83,6 ^a	66,9 ^a	63,7 ^a	53,6 ^b	54,1 ^{b,c}	64,8 ^b	56,2 ^b
NaCl (1 M)	57,9 ^a	56,2 ^c	53 ^{d,c}	46,0 ^d	47,9 ^e	43,9 ^d	53,2 ^b	49,4 ^c	51,4 ^c	56,6 ^b
Na2SO4 (0,4 M)	57,2 ^a	54,6 ^c	54,9 ^c	54,9 ^c	53,9 ^d	52,6 ^c	46,3 ^c	53,0 ^{k,c}	51,4 ^c	51,4 ^c
agua (pH 7)	62 ^a	62,6 ^b	50 ^{d,c}	50 ^{d,c}	40,6 ^f	56,0 ^c	53,7 ^k	52,5 ^{k,c}	52,8 ^c	56,6 ^b
soya comercial	59,5 ^a	54,1 ^c	55,6 ^c	55,3 ^c	57 ^{d,e}	53,2 ^c	61,7 ^a	56,2 ^b	76,7 ^a	62,4 ^a

* a= actividad de emulsificación

** b= estabilidad de emulsificación

l representa media de tres réplicas

a medias con letras iguales no son significativamente diferentes $p=0,05$

De los resultados anteriores se puede concluir que la modificación de las proteínas, en este caso por succinilación, que se reconoce como vehículo para el mejoramiento de las propiedades funcionales, donde participa activamente la naturaleza eléctrica de las proteínas, se mejoró tanto la actividad como la estabilidad de emulsificación, lo anterior coincidió ampliamente con lo que encontró Franzen y Kinsella (1976) y Ma (1984), en aislados succinilados de soya y con aislados succinilados de avena. Kabirullah y Wills (1982) indicaron que los aislados proteínicos de girasol, modificados por diferentes agentes químicos, incrementaron la solubilidad, la absorción en agua, y la actividad de emulsificación, sin embargo, hacen énfasis en la naturaleza de la modificación, ya que la acetilación del mismo material, aunque mejoró las propiedades funcionales, lo hizo en menor medida.

4. Regresión lineal de la actividad de emulsificación en función del pH o la solubilidad.

Diferentes autores han tratado de explicar las propiedades emulsionantes, considerando principalmente la solubilidad de las proteínas, o el pH en donde se desarrolla la emulsión; de esta manera, Bryant y col. (1982) indicaron que el papel de la solubilidad de la proteínas, es incierto. Sin embargo, Yasumatsu y col. (1972) así como Volkert y Klun (1979) encontraron que la proteína solubilizada se correlaciona positivamente, tanto con la actividad como con la estabilidad de la emulsión. No obstante, Lah y Cheryan (1980) así como Dench (1982) reportaron que la solubilidad del nitrógeno no necesariamente está correlacionada con estas propiedades emulsionantes. Sin embargo, en este trabajo, los resultados del análisis de regresión lineal simple realizado, que se ilustran en la Tabla 14,

indicaron que la actividad de emulsificación del concentrado succinilado se puede explicar por el pH o por la solubilidad en 79.62 % ($p=0.0001$). Resalta de estos resultados el comportamiento del concentrado succinilado, dado que es el único de todos los concentrados estudiados, donde se explica satisfactoriamente el comportamiento de la

Tabla 14. análisis de regresión lineal simple para la capacidad de emulsificación de concentrados proteínicos de amaranto y soya, en función del pH o la solubilidad.

método de extracción	propiedad funcional variable independiente	variable dependiente	coeficiente de determinación	p
succinilado 50%	emulsificación	pH	79.62	0.0001
		solubilidad	79.62	0.0001
agua (pH 7)	emulsificación	pH	8.0	n.s. ¹
		solubilidad	2.0	n.s.
NaOH (pH=10)	emulsificación	pH	3.0	n.s.
		solubilidad	3.0	n.s.
NaOH (pH=11)	emulsificación	pH	5.0	n.s.
		solubilidad	18.70	n.s.
naeso4 (0.4m)	emulsificación	pH	28.01	0.0422
		solubilidad	18.70	n.s.
NaCl (1m)	emulsificación	pH	18.70	n.s.
		solubilidad	5.90	n.s.
soya comercial	emulsificación	pH	55.19	0.0015
		solubilidad	37.37	0.015

¹ no significativo a $p < 0.05$.

actividad de emulsificación en función del pH o la solubilidad; aunque la actividad de emulsificación del concentrado comercial de soya, también puede explicarse por el pH, pero en un porcentaje de 55,19% a $p=0,0015$.

Los resultados encontrados para los restantes concentrados, en cuanto a su relación con el pH o la solubilidad, difieren con lo reportado por Paulson y Tung (1981) quienes encontraron una relación lineal de la actividad de emulsificación de aislados succinilados de canola, con respecto al pH. En tanto que Barber y Warthessen (1982) encontraron una aparente relación lineal entre la solubilidad y la actividad de emulsificación de gluten acilado de trigo. Se han desarrollado diferentes teorías para explicar el mejoramiento de las propiedades superficiales. Por ejemplo, Morr (1979), reportó que la desnaturalización de las proteínas puede mejorar tanto las propiedades emulsionantes como las espumantes, justifica que lo más probable del mejoramiento en la funcionalidad, pueda deberse al desenrollamiento de la molécula proteínica, que provoca la exposición de los residuos aminoácidos hidrofóbicos, haciendo a la proteína más anfifílica, orientándose en la interfase aire/agua ó aceite/agua. Mc Watters y Holmes (1979) reportaron que el aumento en la solubilidad del nitrógeno no necesariamente incrementa las propiedades emulsionantes y sugieren que la propiedad emulsionante pueda ser debida a la composición de la proteína total, que incluye además, compuestos solubles e insolubles, además de constituyentes no proteínicos como carbohidratos, entre otros.

5. Capacidad y estabilidad de espumado en función del pH de los concentrados proteínicos de amaranto.

En la Fig. 12 se muestran los perfiles de actividad de espumado desarrollados por los diferentes concentrados de amaranto y el de soya, en función del incremento del pH. Se

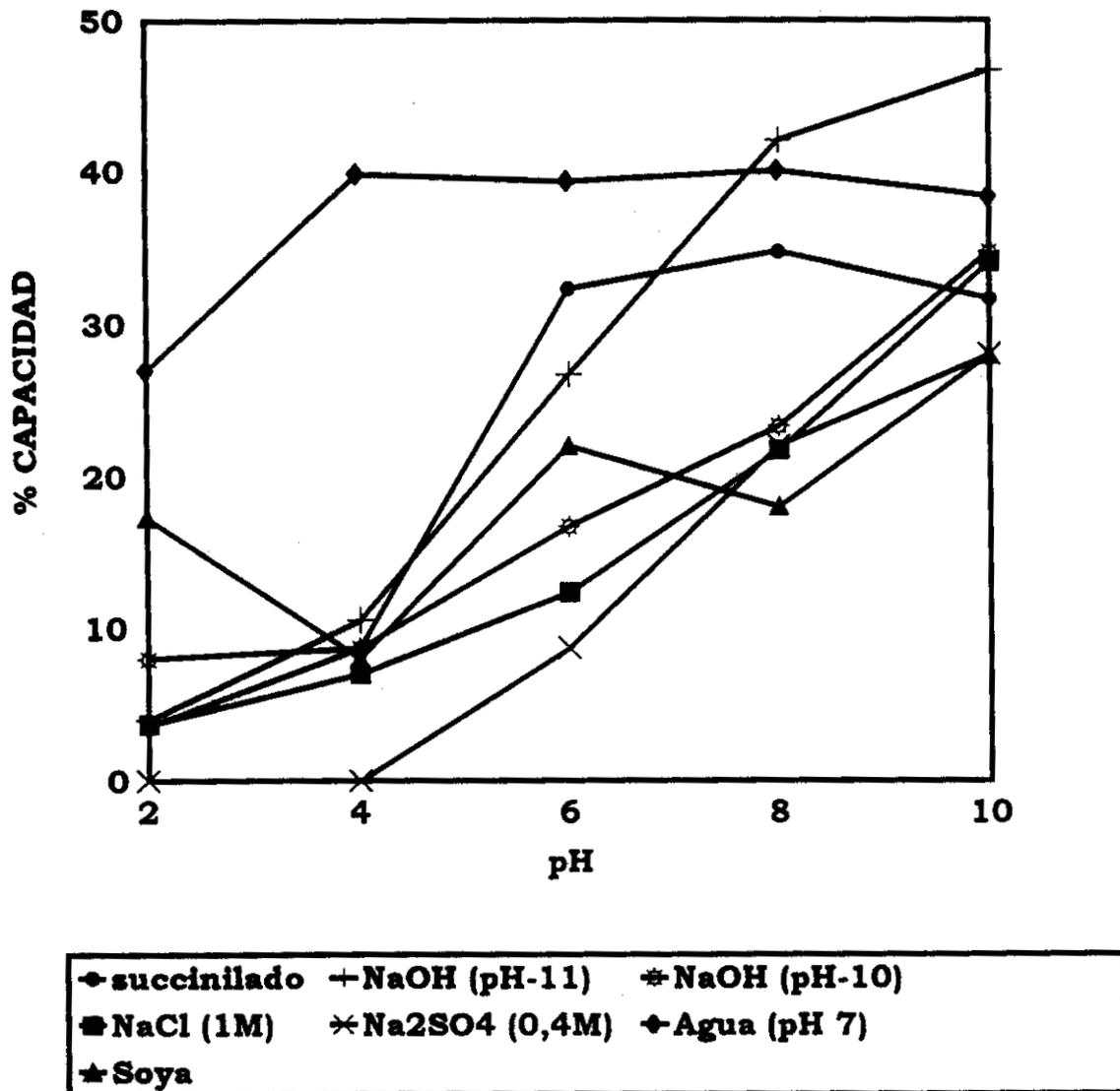


Figura 12. Perfil de la Capacidad de espumado de los concentrados proteínicos de la semilla de amaranto y soya en funcion del pH.

encontró que los concentrados de amaranto y soya desarrollaron perfiles semejantes a los que presentaron cuando se midió la solubilidad del nitrógeno, a excepción del concentrado obtenido por solubilización acuosa. El perfil de actividad que presentó el concentrado obtenido en agua, se atribuye a la clase de proteína que se solubizó, en este caso albúminas (Myers, 1988) que son abundantes en el grano de amaranto (Soriano Santos y col. 1992) y que poseen por lo general buenas propiedades espumantes (Cheftel y col., 1989). Por otra parte, el concentrado succinilado a pH cercano al neutro, pH 8, tuvo la más alta capacidad de espumado, mientras que en el concentrado NaOH (pH-11) se observó el valor más alto de capacidad de espumado a pH 10 de todos los concentrados estudiados..

Similarmente a la medición de las propiedades emulsificantes, también para las espumantes se realizó una prueba de Duncan (Tabla 15), que permitió relacionar los mejores niveles de actividad y estabilidad de espumado en el rango de pH estudiado. Se encontró que el concentrado obtenido por solubilización en agua, tuvo los mayores promedios de capacidad de espumado a pH de 2 y 6 ($p < 0,005$); en lo que se refiere a la estabilidad del espumado no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,005$), entre los valores promedio de este concentrado y el de soya. A pH 4, se observó nuevamente que el concentrado obtenido en agua, presentó los promedios más altos de capacidad de espumado; por otra parte, en lo referente a la estabilidad de espumado no se encontraron diferencias significativas a $p < 0,005$, en los valores promedios obtenidos por este concentrado, el de soya y el obtenido por solubilización a pH 11. A pH de 8, la prueba de Duncan indicó que no existieron diferencias significativas a $p < 0,005$, tanto en la capacidad como en la estabilidad

de espumado de los concentrados obtenidos en agua y por solubilización a pH 11; finalmente a pH 10 el concentrado NaOH (pH-11), observó la mayor capacidad de espumado ($p < 0,005$) de todos los concentrados, en tanto que en lo que concierne a la estabilidad, no se encontraron diferencias significativas para este concentrado, el de soya, el concentrado NaOH (pH-10) y el obtenido en NaCl 1M.

Tabla 15. prueba de Duncan para la capacidad y estabilidad del espumado de los concentrados proteínicos de amaranto y soya en función del pH.

método de extracción del concentrado	a*	b**	a	b	a	b	a	b	a	b
	pH 2		pH 4		pH 6		pH 8		pH 10	
sucrotilación 50%	3.6 ^{d1}	0.0 ^{d1}	8.7 ^{d1}	75 ^{k,c}	32.3 ^k	13.5 ^{d1}	29.7 ^{d1}	34.7 ^k	72.4 ^c	31.7 ^c
naoh (pH-11)	4.0 ^{d1}	0.0 ^{d1}	10.5 ^k	85 ^{k,a}	26.7 ^c	37.6 ^c	42.0 ^a	82.5 ^k	46.7 ^a	84.3 ^{k,a}
naoh (pH-10)	8.0 ^c	75.4 ^k	8.7 ^k	65 ^c	16.7 ^e	56 ^k	23.3 ^c	88 ^k	34.7 ^c	85.4 ^{k,a}
nacl (1m)	3.7 ^{d1}	50 ^c	7.0 ^k	42.5 ^{d1}	12.3 ^f	54.4 ^k	21.7 ^{d1}	87.5 ^k	34.0 ^c	88.2 ^{k,a}
na2so4 (0.4m)	0.0 ^{d1}	0.0 ^{d1}	0.0 ^c	0.0 ^e	8.7 ^d	80.8 ^{d1}	22 ^{d1,c}	69.7 ^c	28.0 ^{d1}	80.95 ^k
agua (pH 7)	27 ^a	91.2 ^a	39.8 ^a	94.9 ^a	39.3 ^a	91.6 ^a	40 ^a	90 ^{k,a}	38.3 ^k	22.6 ^{d1}
soya comercial	17.3 ^k	95.2 ^a	8.0 ^k	94.4 ^a	22 ^{d1}	87.0 ^a	18.0 ^{d1}	97.3 ^a	28.0 ^{d1}	94 ^a

*a= capacidad de espumado

**b= estabilidad de espumado

1 representa media de tres replicas

a medias con letras iguales no son significativamente diferentes $\alpha = 0.05$

6. Regresión lineal simple de la capacidad de espumado en función del pH o la solubilidad.

De manera similar que para la actividad de emulsificación, también para la capacidad espumante se estimó pertinente la realización de un análisis de regresión lineal simple, que dilucidará que variable presente en la suspensión proteínica tiene influencia sobre la capacidad de espumado, de estos concentrados. Los resultados del análisis de regresión lineal simple diseñado se muestran en la Tabla 16. Al analizar las variables independientes estudiadas que puedan explicar la capacidad de espumado de los concentrados proteínicos de amaranto, se encontró que a excepción del concentrado obtenido en agua, el pH de la solución proteínica explica esta propiedad en 75.88%, 92.14%, 95.31%, 92.79%, 90.57% y 90.57%, para los concentrados preparados por succinilación, en disoluciones de pH 10 ó 11; en Na_2SO_4 0,4 M, NaCl 1M y el de soya, respectivamente, a $p < 0,005$. Mientras que la otra variable analizada, la solubilidad de las proteínas de los diferentes concentrados, explicó relativamente la capacidad de espumado de los concentrados succinilado y el NaOH (pH 10), con un porcentaje de 69.45% y 53.05% respectivamente, a $p = 0,002$.

También se observó que a excepción del concentrado preparado por solubilización en agua, los restantes concentrados observaron una tendencia de comportamiento similar al perfil de solubilidad desarrollado, tal como se muestra en la Fig. 7. Esto concuerda con lo reportado por Kinsella (1979), quién explicó que la formación de espuma depende en gran

parte de la solubilidad de la proteína. De acuerdo con lo anterior, los concentrados proteínicos de amaranto tuvieron simultáneamente un

Tabla 16. análisis de la regresión lineal simple para la capacidad de espumado en concentrados proteínicos de amaranto y soya, en función del pH o la solubilidad.

método de extracción	propiedad funcional variable dependiente	variable independiente	coeficiente de determinación	p
amaranto 60%	espumado	pH	75.88	0.0001
		solubilidad	69.45	0.0001
agua (pH 7)	espumado	pH	40.30	0.0109
		solubilidad	3.01	n.s. ¹
NaOH (pH 10)	espumado	pH	92.14	.0001
		solubilidad	53.02	0.0021
NaOH (pH 11)	espumado	pH	95.31	0.0001
		solubilidad	35.47	0.019
Na ₂ SO ₄ (0.4M)	espumado	pH	92.79	0.0001
		solubilidad	35.47	0.01
NaCl (1M)	espumado	pH	90.57	0.0001
		solubilidad	35.47	0.0191
soya comercial	espumado	pH	90.57	0.0001
		solubilidad	2.02	n.s.

n.s.¹ no significativo a $p < 0.05$.

punto convergente de mínima capacidad de espumado y de solubilidad a pH 4. La espuma que desarrolla el concentrado obtenido por solubilización en agua, aún en ese pH, probablemente se deba a que se requieran mínimas cantidades de estas proteínas en solución para el desarrollo de la espuma. En la misma idea, Kinsella (1979) sugirió que la

actividad de espumado se ve beneficiada por procesos de desnaturalización o alteración de la estructura original, p.e. por tratamientos térmicos, uso de agentes desnaturalizantes, modificaciones químicas. También algunos compuestos contenidos en la fuente vegetal, como las saponinas, que actúan como surfactantes, tienden a favorecer tanto la capacidad como la estabilidad de espumado (Shanmugasundaram y col. 1989).

III. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA PARCIAL DE LOS CONCENTRADOS PROTEÍNICOS DE LA SEMILLA DE AMARANTO.

1. Análisis de los perfiles de elución de las proteínas contenidas en los concentrados proteínicos de amaranto por filtración en gel y monitoreo por electrofóresis.
 - a) Perfiles de elución en disolución amortiguadora de fosfatos de pH 7,5 de los concentrados obtenidos en disoluciones de NaCl 1M; Na₂SO₄ 0,4 M y en agua.

En las Figs. 14a, 14b y 14c se muestran los cromatogramas de las proteínas contenidas en los concentrados proteínicos obtenidos por solubilización en disoluciones de NaCl 1M, Na₂SO₄ 0,4M y en agua, respectivamente. Se puede observar que los tres perfiles de elución tuvieron gran similitud, ya que presentaron un pico de alta absorbancia cercano al volumen vacío (V₀) de la columna, en cada caso, estos picos se denominaron fracción-I_(NaCl), fracción-I_(Na₂SO₄) o fracción-I_(H₂O), cuyos pesos moleculares promedio fueron calculados por interpolación de la relación V_e/V₀ de marcadores de peso molecular conocido en una columna de Sephadex G-200, en bufer de fosfatos de pH 7,5 (Fig. 13); en los dos primeros casos fue de 381 kD y de 338 kD para el siguiente. En todos los casos, las eluciones obtenidas presentaron una apariencia turbia, blanquecina; característica que había sido reportada anteriormente por Konishi y col. (1985), Marcone y Yada (1992) y Soriano Santos (1992) entre otros. Por otra parte, en los tres perfiles se apreció un pico de alta absorbancia, cercano al volumen total (V_t) de la columna; estas fracciones se denominaron fracción-II_(NaCl), fracción-II_(Na₂SO₄) el peso molecular promedio calculado para estas fracciones fue de 7,6 kD. En el caso de las proteínas obtenidas por solubilización en agua, el segundo pico estuvo compuesto por dos fracciones, que se denominaron fracción-II_(H₂O) fracción-III_(H₂O), para las cuales se calculó

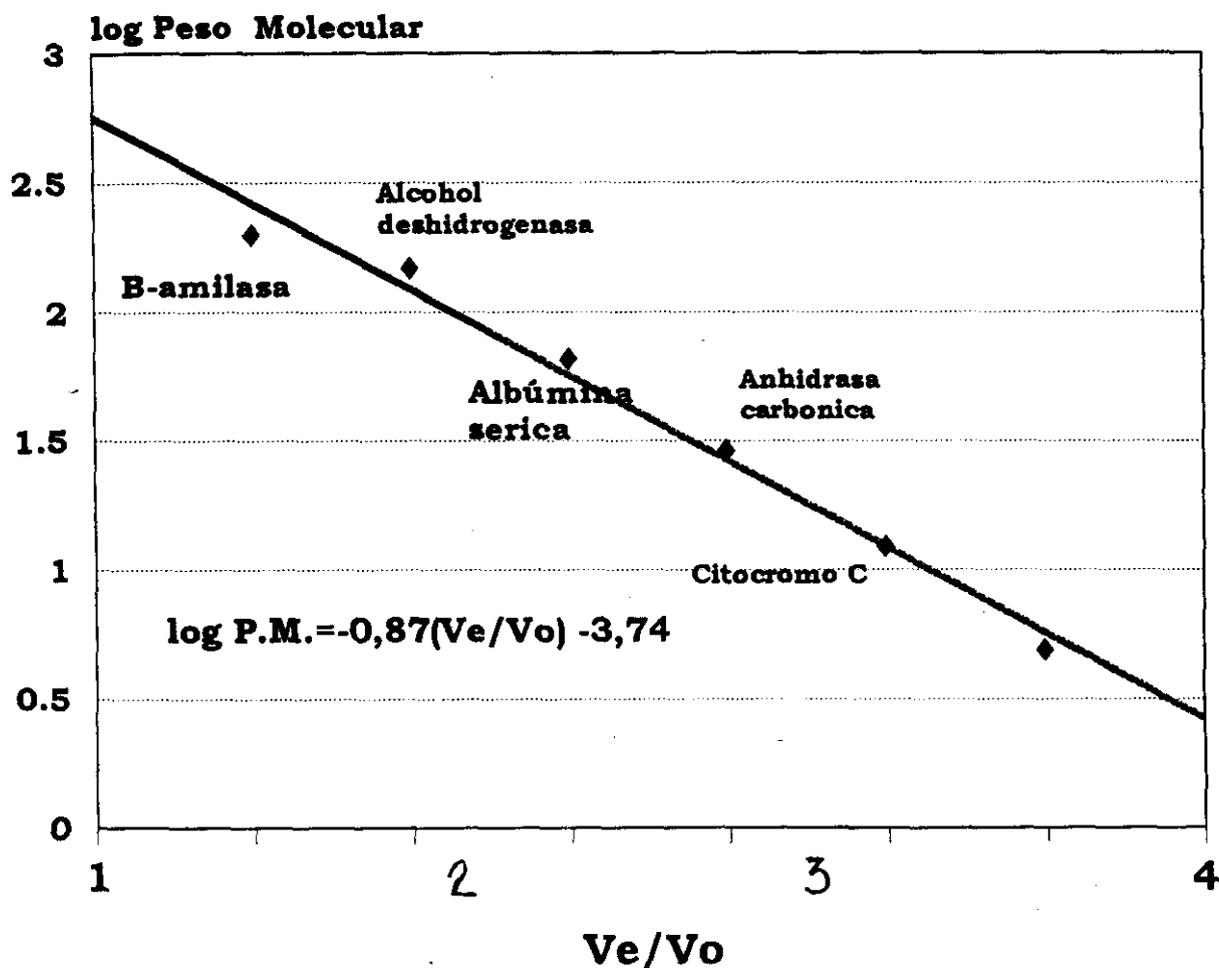


Figura 13. Curva de calibracion para marcadores de peso molecular, en columna de Sephadex G-200 (1,5x90 cm) En bufer de fosfatos pH 7,5.

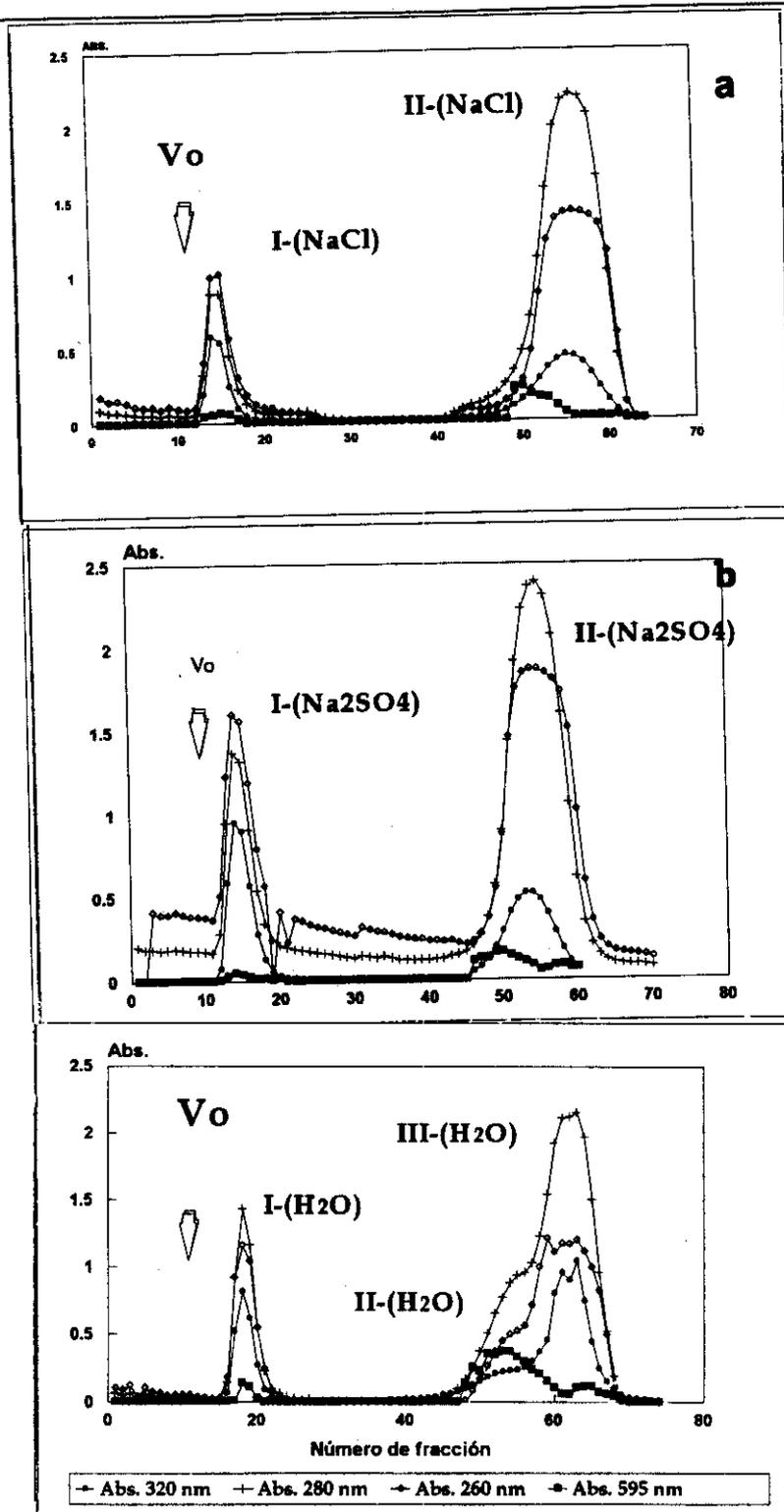


Figura 14. Perfiles de elución de la filtración en gel (Sephadex G-200 1,5x90 cm) en bufer de fosfatos (pH 7,5) de los concentrados proteínicos obtenidos por solubilización en: a) NaCl 1M; b) Na₂SO₄ 0,4M, c) en agua (pH 7). Volumen vacío: Vo.

un peso molecular de 19,5 y 6,0 kD, respectivamente. La relación V_0/V_e , así como los pesos moleculares calculados para las diferentes fracciones proteínicas obtenidas de los concentrados proteínicos de amaranto se presentan en la Tabla 17.

Por otra parte, cuando se caracterizaron por electrofóresis la fracción-II_(NaCl), fracción-II_(Na₂SO₄) o fracción-II_(H₂O) eluidas de la columna de Sephadex G-200 (Figs. 15a, 15b y 15c), se identificaron polipéptidos de peso molecular menor a 14,2 kD para las dos primeras. De manera particular en el monitoreo de las eluciones por electrofóresis, fracción-II_(H₂O) y fracción-III_(H₂O), se observaron dos subunidades, que se denominaron α_1 y α_2 , las cuales tuvieron un peso molecular menor a 14,2 kD. Lo que sustenta la observación realizada anteriormente, con respecto a que se trata de dos picos sobrepuestos.

Con respecto a trabajos previos sobre la caracterización por filtración en gel de las proteínas del grano de amaranto, se han encontrado informes de autores como Marcone y Yada (1991), quienes aislaron las globulinas a partir de harina integral de amaranto, utilizando una disolución de fosfatos de pH 7.5; el cromatograma que obtuvieron fue similar al de las proteínas del concentrado obtenido por solubilización en agua, que se presenta en este trabajo. De igual manera, encontraron varias fracciones, una cercana al V_0 y dos sobrepuestas, éstas cercanas al V_t de la columna. También, la apariencia de la fracción cercana al V_0 de la columna, la describieron como turbia y de alta absorbancia.

Por su parte Soriano-Santos (1992), reportó la solubilización de albúminas y globulinas en disoluciones de Na₂SO₄ 0,04 M, posterior a una diálisis; indicó que obtuvo dos fracciones, una que identificó como globulinas, en tanto que la segunda como albúminas. En

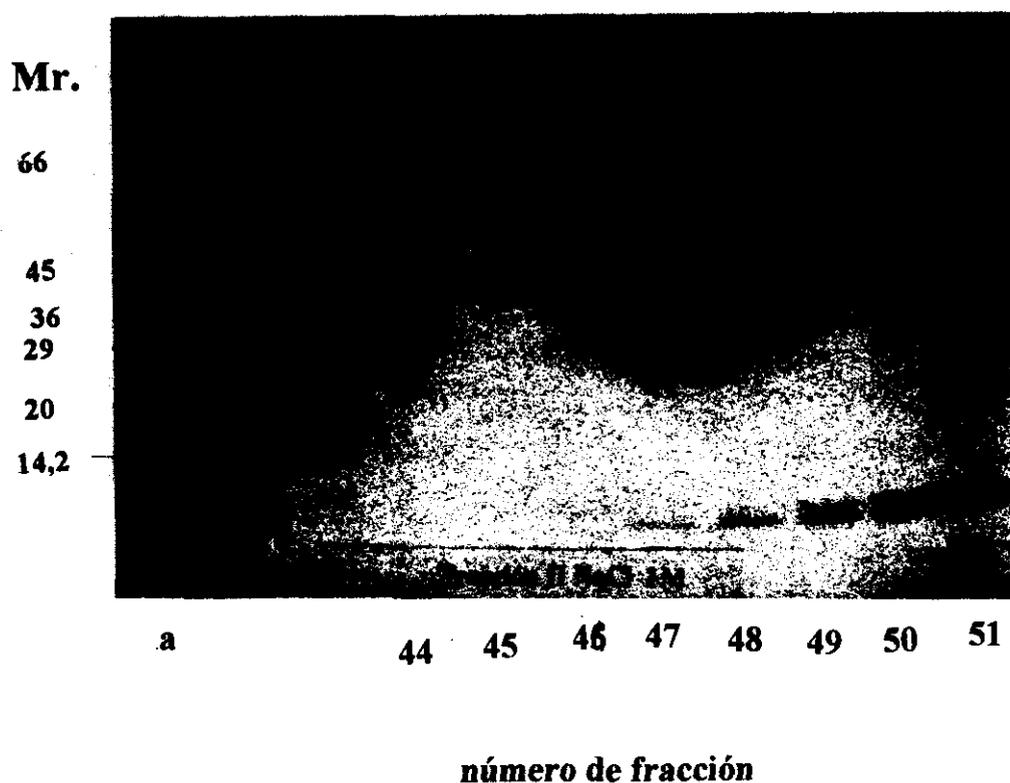


Figura 15a. Perfil electroforético de la fracción-II(NaCl), proveniente de la elución en bufer de fosfatos (pH 7.5) de la columna de filtración en gel (Sephadex G-200;1,5 x 90 cm) del concentrado obtenido por solubilización en NaCl 1M. a) marcadores de peso molecular: albúmina sérica bovina, albúmina de huevo, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina y α -lactoalbúmina, con Mr de: 66, 45, 36, 29, 20 y 14.2 kD, respectivamente.

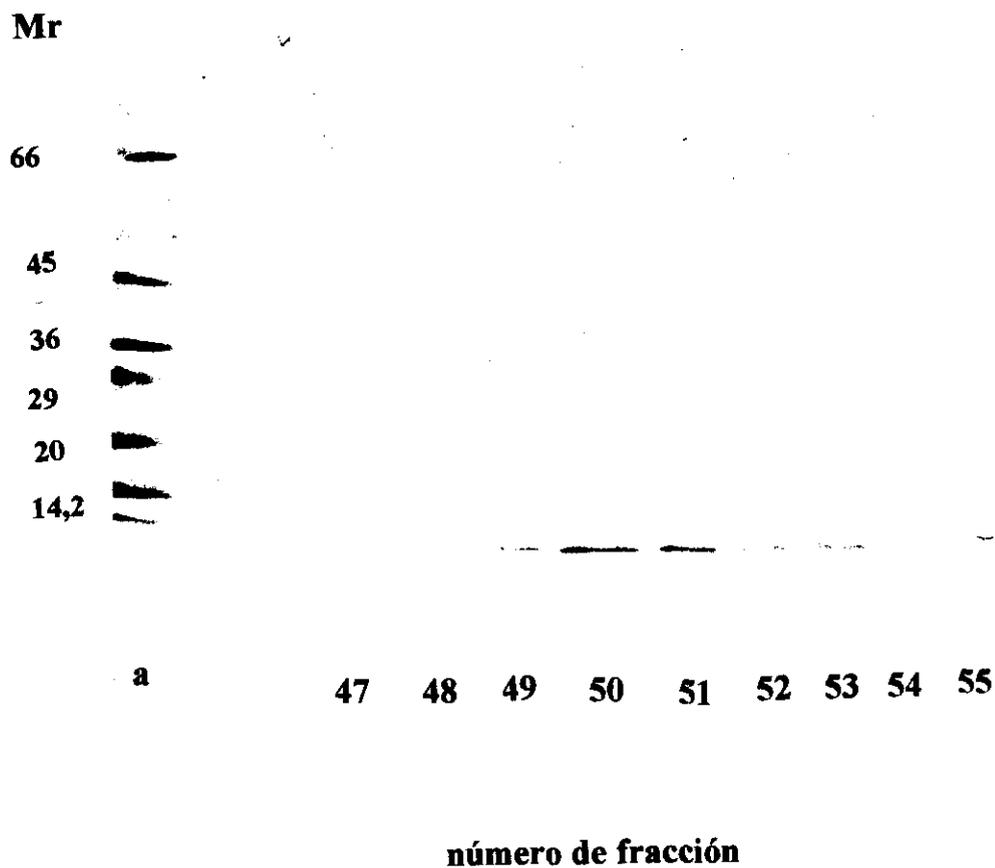
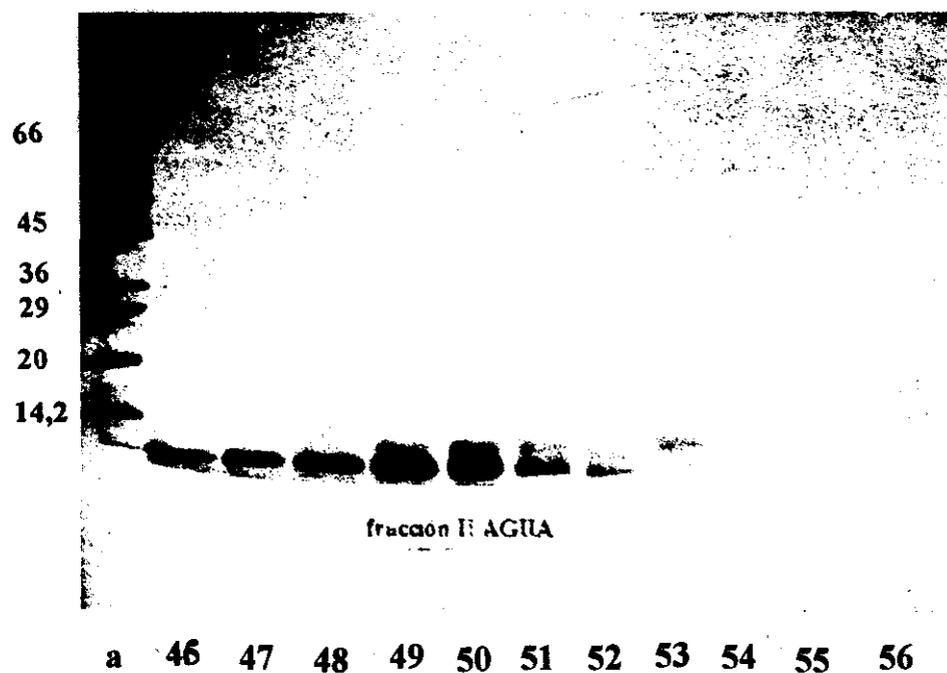


Figura 15b. Perfil electroforético de la fracción-II(Na_2SO_4), proveniente de la elución en bufer de fosfatos (pH 7.5) de la columna de filtración en gel (Sephadex G-200;1,5 x 90 cm) del concentrado obtenido por solubilización en Na_2SO_4 0,4 M. a) marcadores de peso molecular: albúmina sérica bovina, albúmina de huevo, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina y α -lactoalbúmina, con Mr de: 66, 45, 36 29, 20 y 14.2 kD respectivamente.

Mr



número de fracción

Figura 15c. Perfil electroforético de la fracción-II-(H₂O) proveniente de la elución en bufer de fosfatos (pH 7.5) de la columna de filtración en gel (Sephadex G-200; 1,5 x 90 cm) del concentrado obtenido por solubilización en Agua (pH 7). a) marcadores de peso molecular: albúmina sérica bovina, albúmina de huevo, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina y α -lactoalbúmina, con Mr de: 66, 45, 36, 29, 20 y 14.2 kD respectivamente.

Tabla 17. pesos moleculares calculados de las diferentes fracciones proteínicas obtenidas por filtración en gel, en una columna de sephadex q-200 (1.5 x 90 cm) con un buffer de elución de fosfatos de pH 7.5 de los concentrados proteínicos de la semilla de amaranto.

concentrado (método de extracción)	fracción-i		fracción-ii		fracción-iii	
	UO/UE	Mr (kd)	UO/UE	Mr. (kd)	UO/UE	Mr. (kd)
H ₂ O (pH 7)	1.38	338	2.83	19.5	3.42	6.0
NaCl (1M)	1.32	381	3.36	6.71	-	-
Na ₂ SO ₄ (0.4M)	1.32	381	3.36	6.71	-	-
NaOH (pH-10)	-	-	3.29	7.76	-	-
NaOH (pH-11)	-	-	3.29	7.76	-	-
succinilato 50%	-	-	3.30	7.61	-	-

los cromatogramas que presentó para las globulinas, se distinguieron tres picos de alta absorbancia, uno ubicado cerca al V_0 de la columna, coincidiendo también en señalar que esta fracción tuvo una apariencia turbia y de muy bajo contenido de proteína; en tanto que las dos restantes fracciones, las reportó con un peso molecular de 365 y 181 kD. Por otra parte, el cromatograma que encontró de las albúminas, se caracterizó por la presencia de tres picos de alta absorbancia, dos de ellos sobrepuestos y cercanos al V_t de la columna, el peso molecular que calculó fue de 239, 190 y 115 kD. Por su parte, Mora-Escobedo y col. (1990) en otro trabajo de caracterización de las proteínas del grano de amaranto, solubilizaron las proteínas en disoluciones de NaCl 0,5M, e indicaron obtener dos fracciones proteínicas, las cuales definieron como albúminas y globulinas. En este sistema de fraccionamiento se obtuvieron cromatogramas similares al trabajo de Soriano-Santos (1992), donde se solubilizaron las globulinas y albúminas en disoluciones de Na_2SO_4 0,04M. El cromatograma de las albúminas que presentaron, contiene dos picos de alta absorbancia, para los cuales calcularon un peso molecular de 81 y 12 kD. Por otra parte, en lo que se refiere a las globulinas, el cromatograma que reportaron consistió de tres fracciones principales, dos de ellas con peso molecular de 260 y 17 kD. En tanto que la tercera la reportaron como una fracción de alto peso molecular de apariencia turbia, que también omitieron, debido al bajo contenido proteínico que presentó al medir la proteína por el método de Bradford (1976). Aunque Barba de la Rosa y col. (1992) aislaron las globulinas del grano de amaranto por solubilización en bufer de Na_2HPO_4 (pH 7); el extracto crudo (albúminas y globulinas) se dializó y las globulinas se precipitaron por centrifugación.

Reportaron un peso molecular aparente de la fracción que reconocieron como globulinas de 166 kD.

b) Perfiles de elución en disolución amortiguadora de fosfatos de pH 7,5 de los concentrados proteínicos NaOH (pH-10); NaOH (pH-11) y succinilado.

En las Figs. 16a, 16b y 16c se muestran los perfiles de elución de las proteínas contenidas en los concentrados NaOH (pH-11), NaOH (pH-10), así como el succinilado, respectivamente. De manera particular, en los perfiles de elución correspondientes a los concentrados obtenidos por solubilización alcalina, (Figs. 16a y 16b) se observó un pico de alta absorbancia cercano al V_t de la columna, el cual se denominó, según el caso, fracción- $I_{NaOH-10}$ o fracción- $I_{NaOH-11}$; el peso molecular aparente calculado para estos polipéptidos fue de 7,8 kD. Cabe mencionar que en las diferentes ocasiones en que realizó la cromatografía, se apreciaron las fracciones que se indican, aunque las lecturas a 280, 320 y 260 nm de las fracciones colectadas fueron altas, pero constantes desde la fracción uno, no distinguiéndose algún otro pico bien definido.

Por su parte, en el perfil de elución de las proteínas del concentrado succinilado, que se ilustra en la Fig. 16c, se pudieron apreciar dos picos de alta absorbancia. El primero de ellos, que se denominó fracción- $I_{Succ-50}$, se identificó como un pico de relativamente baja absorbancia, cercano al V_o de la columna; para esta fracción se calculó un peso molecular aparente de 466 kD, aunque cabe indicar que esta fracción presentó baja cantidad de proteína, cuando se midió por el método de Bradford (1976). Por otra parte, a la extrema

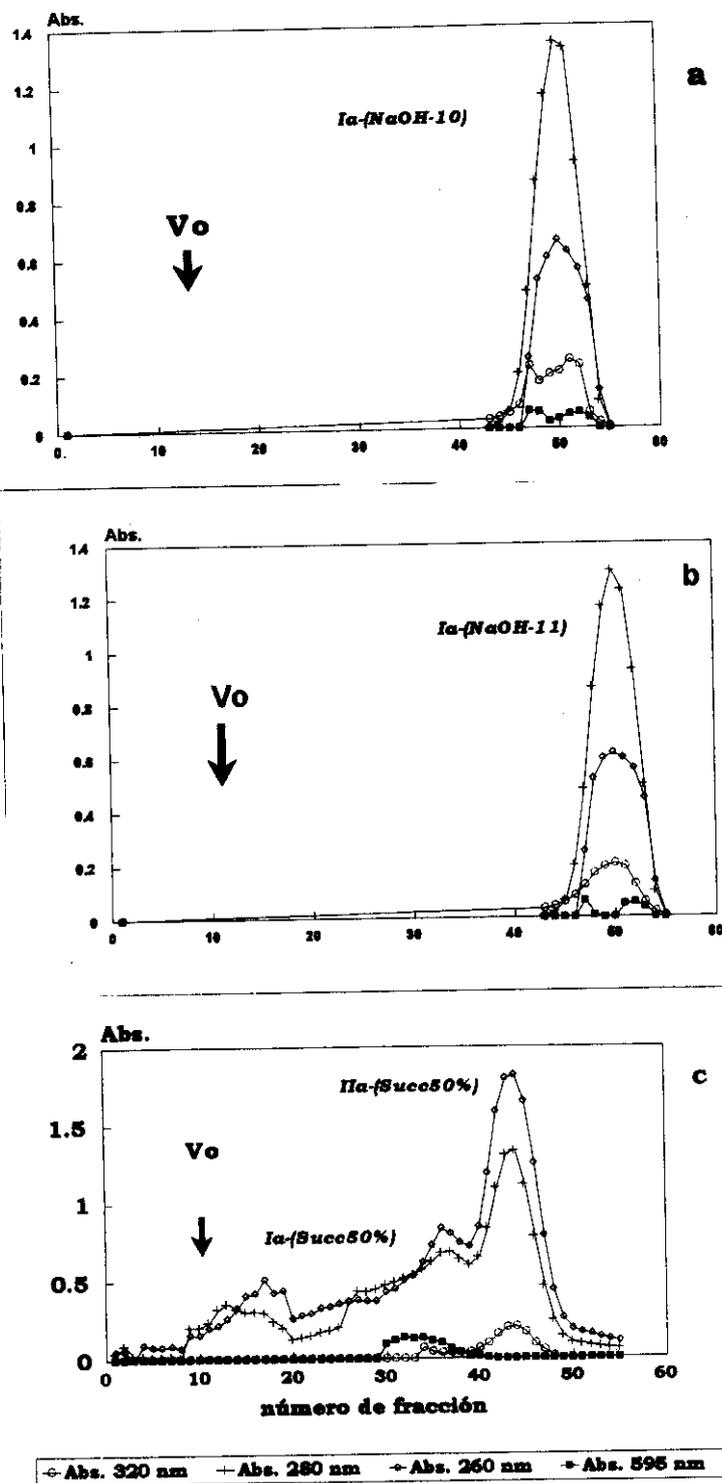


Figura 16. Perfiles de elución de filtración en gel (Sephadex G-200, 1,5 x 90cm) en bufer de fosfatos (pH 7,5) de los concentrados proteínicos obtenidos por solubilización en disoluciones de: a) NaOH (pH 10); b) NaOH (pH 11) y c) por succinilación 50%. Volumen vacío: Vo.

derecha del cromatograma se ubicó una segunda fracción que se distinguió cromatograma se ubicó una segunda fracción que se distinguió cromatograma se ubicó una segunda fracción que se distinguió como fracción-//a(Succ-50), cuyo peso molecular calculado fue de 7,60 kD.

c) Perfil de elución en disolución amortiguadora de Tris y glicina de pH de 8,9 de los concentrados NaOH (pH-10); NaOH (pH-11) y succinilado.

Cuando se realizó la electrofóresis de las fracciones de mayor absorbancia obtenidas en filtración en gel en bufer de fosfatos de pH 7,5, no fue posible evidenciar nítidamente las bandas de proteína, aún cuando estas se tiñeron con plata. Una posible respuesta se encontró al analizar el perfil de solubilidad que presentaron las proteínas contenidas en estos concentrados en función del pH, donde se apreció que a pH aproximadamente de 7,5, estos concentrados presentaron una solubilidad de 10 a 15%. Esta solubilidad limitada podría justificar la baja resolución de las proteínas de estos concentrados en las distintas cromatografías. Tomando en consideración lo anterior, se procedió a eluir las muestras en un bufer de pH alcalino, como el bufer de Tris y glicina de pH 8,9.

En las Figs. 17a, 17b y 17c se muestran los perfiles de elución de las proteínas de los concentrados NaOH (pH-10), NaOH (pH11) y el succinilado, respectivamente. Se puede apreciar que los cromatogramas de las Figs. 17a y 17b, tienen gran similitud, ya que en ambos se distinguieron dos fracciones de similar perfil de elución. En ambos casos, la

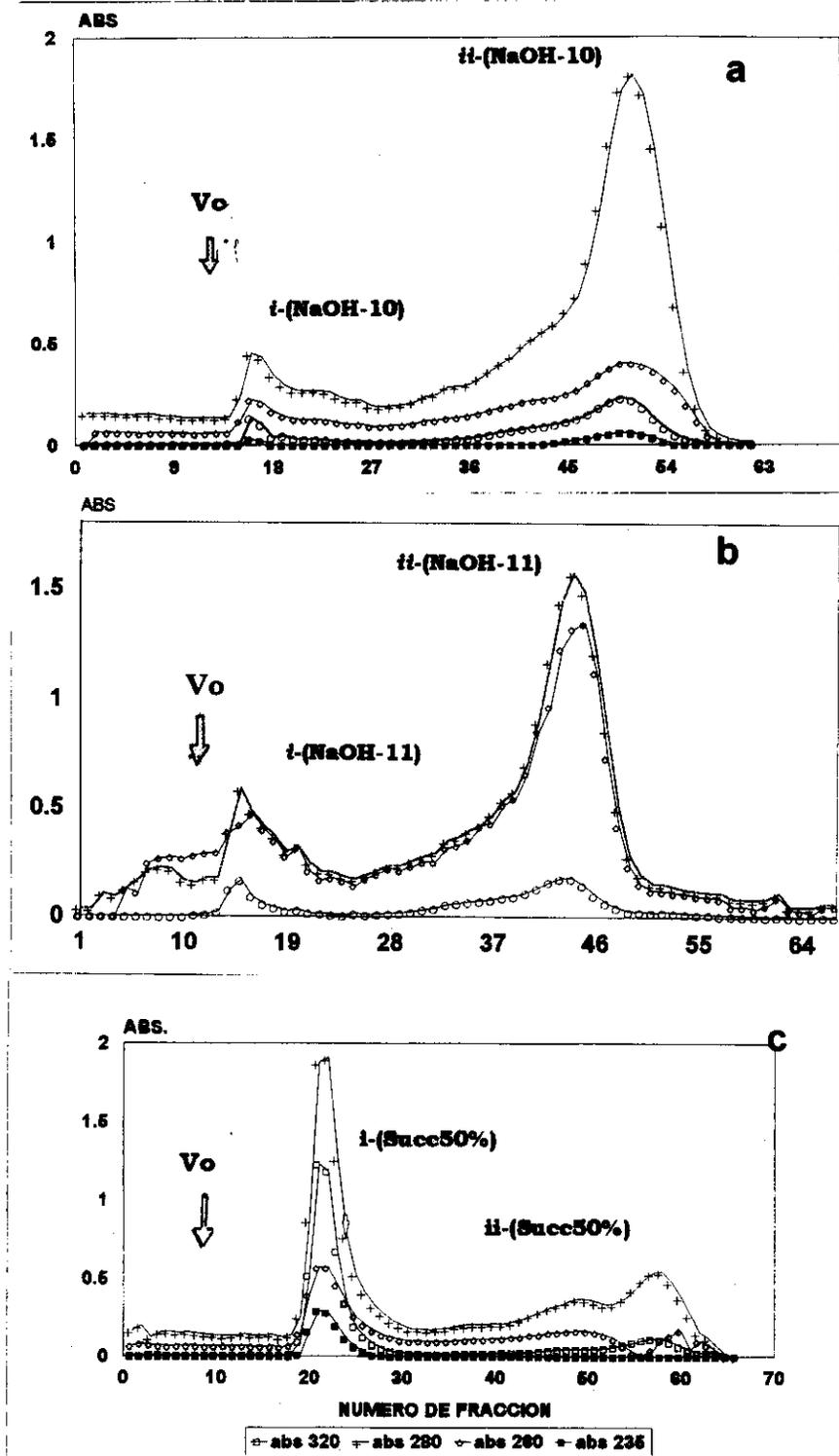


Figura 17. Perfiles de elución de filtración en gel (Sephadex G-200 1,5x90cm) en bufer de Tris (pH 8,9) de los concentrados proteínicos obtenidos por solubilización en disoluciones de: a) NaOH (pH 10); b) NaOH (pH 11) y c) por succinilación 50%. Volumen vacío: Vo.

fracción-II_(NaOH-10) o la fracción-II_(NaOH-11) se localizó cerca al V_0 de la columna; para estas fracciones se calculó un peso molecular promedio de 375 y 381 kD, respectivamente.

Con respecto al análisis electroforético de estas fracciones, en la Fig. 18a se presenta el perfil electroforético de la fracción-II_(NaOH-10), donde se apreciaron dos bandas con peso molecular de 60,25 kD y de 24,43 kD, respectivamente. Por su parte, el análisis electroforético de la fracción-II_(NaOH-11) (Fig. 18b), mostró que los polipéptidos presentes en las bandas tuvieron un peso molecular de 33,72 kD para la primera, y para la segunda de 25,23 kD, según la ecuación de la curva de regresión lineal ($\log PM = -1.4(Rf) + 2,27$) elaborada para tal efecto.

Por otra parte, en cada cromatograma se distinguió una segunda fracción de alta absorbancia cercana al V_t de la columna, que se denominó según el caso, fracción-II_(NaOH-10) o fracción-II_(NaOH-11); en ambos casos estas fracciones tuvieron un peso molecular de 7,76 kD.

Con respecto al cromatograma de las proteínas succiniladas, (Fig. 17c), éstas tuvieron un pico de alta absorbancia a 280 nm, en un punto cercano al V_0 de la columna, el cual se denominó fracción-I_(succ50). Para las proteínas contenidas en esta fracción se calculó un peso molecular de 381 kD. Cabe mencionar que esta fracción tuvo una apariencia turbia, similar a la fracción-I_(NaCl), fracción-I_(Na2SO4) o la fracción-I_(H2O). Sin embargo, la absorbancia que presentó la fracción-I_(succ50), con respecto a la fracción-II_(NaOH-10) o la fracción-II_(NaOH-11), fue aproximadamente tres veces superior, aunque la alta absorbancia a 260 y 320nm, se puede

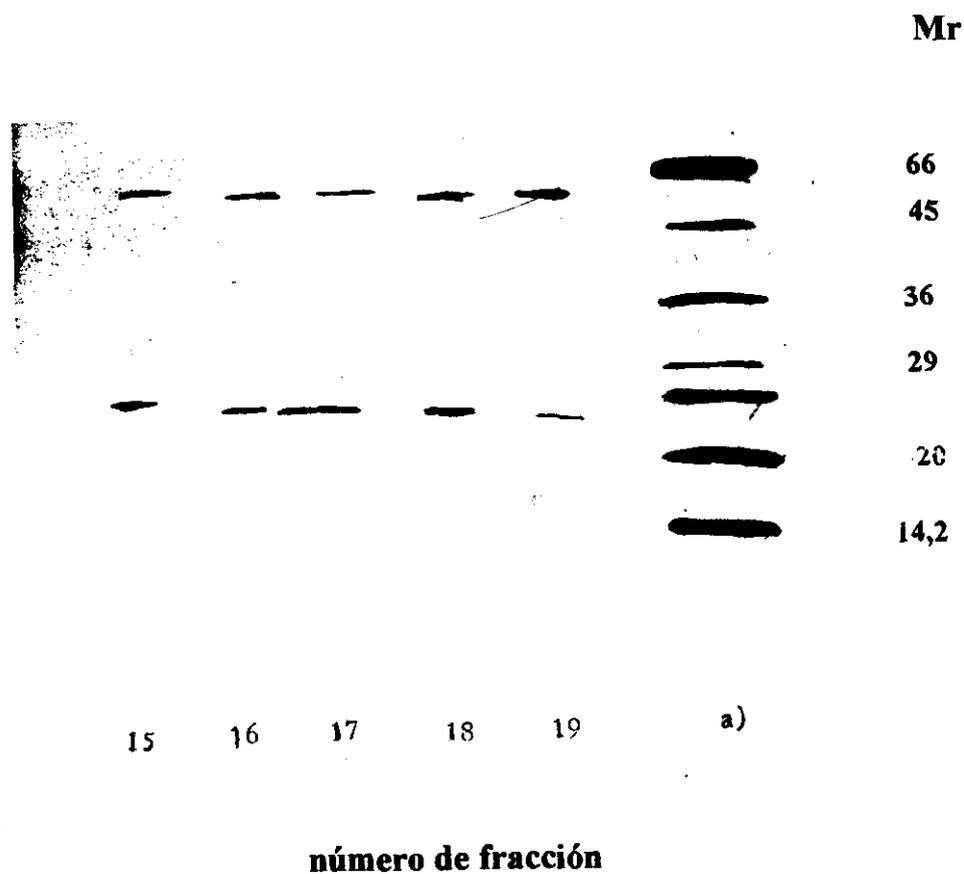


Figura 18a. Perfil electroforético de la fracción-II(NaOH-10), proveniente de la elución en bufer de Tris (pH 8,9), de la columna de filtración en gel (Sephadex G-200;1,5 x 90 cm) del concentrado NaOH (pH 10) a) marcadores de peso molecular: albúmina sérica bovina, albúmina de huevo, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina y α -lactoalbúmina, con Mr de: 66, 45, 36, 29, 20 y 14.2 kD respectivamente.

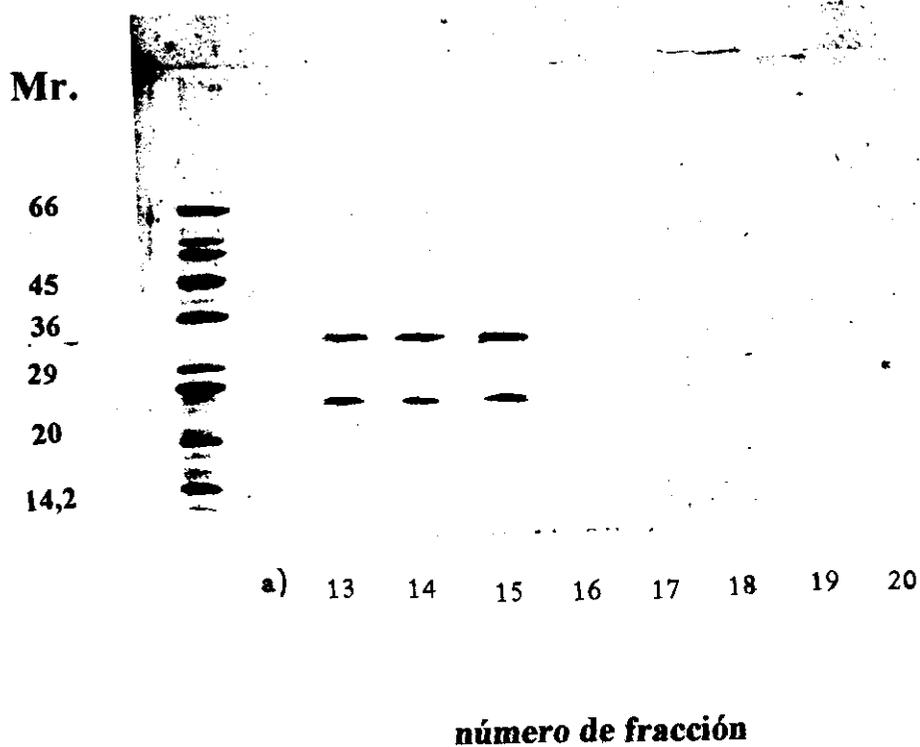


Figura 18b. Perfil electroforético de la fracción-II(NaOH-11), proveniente de la elución en bufer de Tris (pH 8.9) de la columna de filtración en gel (Sephadex G-200;1,5 x 90 cm) del concentrado NaOH (pH-11). a) marcadores de peso molecular: albúmina sérica bovina, albúmina de huevo, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina y α -lactoalbúmina, con Mr de: 66, 45, 36, 29, 20 y 14.2 kD, respectivamente.

deber a la interferencia de diversos compuestos, como la sinapina, el ácido sinápico, ácido fítico, ácido ferúlico, como lo han indicado otros autores (Soriano-Santos, 1992).

Con respecto al análisis electroforético de la fracción-I_(Succ50%) (Fig. 18c), éste reveló que estaba constituida por dos grupos principales de polipéptidos. En el primer grupo se distinguieron un par de bandas, de alto peso molecular, calculados en 65.53 y 64.26 kD, respectivamente; y otro grupo de polipéptidos, cuyos pesos moleculares calculados fueron de 29.03, 27.64 y 25.61 kD.

Por otra parte, a la extrema derecha del cromatograma de filtración en gel (Fig. 17c), también se pudo distinguir otro pico de menor absorbancia, que se denominó fracción-II_(Succ50%), para el cual se calculó un peso molecular de 5,61 kD. En la Tabla 18 se presentan las relaciones de V_0/V_e , así como los pesos moleculares calculados para estas fracciones.

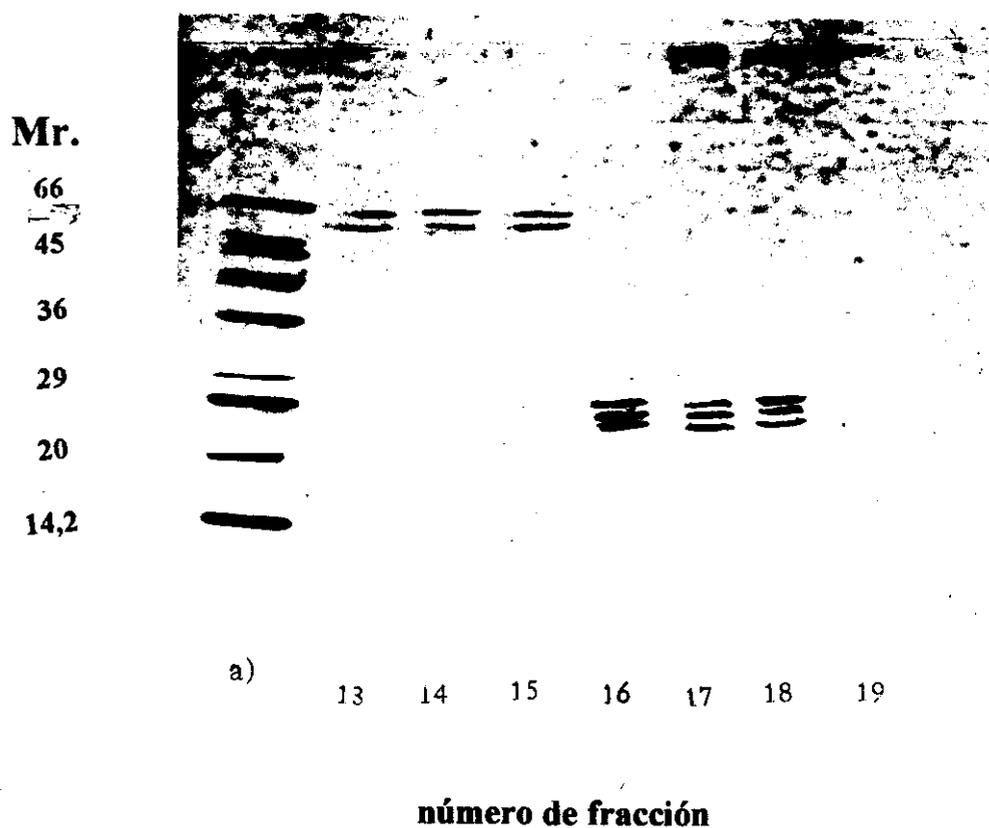


Figura 18c. Perfil electroforético de la fracción-II(succ50%), proveniente de la elución en bufer de Tris (pH 8.9) de la columna de filtración en gel (Sephadex G-200;1,5 x 90 cm) del concentrado succinilado a) marcadores de peso molecular conocido: albúmina sérica bovina, albúmina de huevo, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina y α -lactoalbúmina, con Mr de: 66, 45, 36, 29, 20 y 14.2 kD, respectivamente.

Tabla 18. pesos moleculares calculados de las diferentes fracciones proteínicas obtenidas por filtración en gel, en una columna de sephadex q-200 (1.5 x 90 cm) con un buffer de elución de tris y glicina de ph 8.9 de los concentrados proteínicos de la semilla de amaranto.

concentrado (método de extracción)	fracción-i		fracción-ii	
	UO/UE	mr (kd)	UO/UE	mr (kd)
naoh (ph-10)	1.35	359	3.29	7.76
naoh (ph-11)	1.32	381	3.29	7.76
succinilación 50%	1.32	381	3.50	5.61

Al comparar los cromatogramas de filtración en gel (Fig. 16c y 17c) de las proteínas del concentrado succinilado en los dos sistemas de bufer de elución (bufer A, de pH 7,5 y bufer B de pH 8,9), se puede observar que mientras la fracción de alto peso molecular (fracción-*I*_(Succ50%) fracción-*I*_(Succ50%)) aumenta su solubilidad y por lo tanto su resolución en el sistema de elución de bufer de pH 8,9, la fracción de bajo peso molecular (fracción-*II*_(Succ50%) o fracción-*II*_(Succ50%)) disminuye su solubilidad y resolución. La disociación y reasociación de muchas proteínas oligoméricas de plantas ha sido documentada, y se han atribuido a los cambios en el pH, lo que puede modificar la distribución de cargas en la superficie o cambios en la fuerza iónica que pueden mejorar o debilitar las interacciones de carga atractivas/repulsivas entre las unidades que componen las proteínas oligoméricas (Marcone y Yada, 1991), como parece que ocurre con las globulinas del amaranto, que se han reconocido como proteínas oligoméricas (Konishi y col. 1985; Marcone y Yada, 1991)

Con respecto a la solubilidad de globulinas y albúminas en función del pH, Soriano Santos y col. (1992) al medir la solubilidad de las fracciones que reconocieron como albúminas y globulinas en disoluciones de NaCl 0,4 M, indicaron que las globulinas son más solubles en función del incremento del pH. Añadieron que las globulinas presentaron valores superiores al 90% de nitrógeno solubilizado en un intervalo de pH de 9 a 10. En tanto que las albúminas, en el mismo intervalo de pH presentaron menores valores de solubilización (< del 25% de nitrógeno solubilizado).

2. Análisis de los perfiles de elución de las proteínas contenidas en los concentrados proteínicos de amaranto por cromatografía de intercambio iónico.

a) Perfiles de elución de la fracción-I_(NaCl), fracción-I_(Na₂SO₄) y fracción-I_(H₂O), disolución amortiguadora de fosfatos de pH 7,5.

De la filtración en gel de los concentrados proteínicos de amaranto, se obtuvieron diferentes eluciones que se denominaron fracción-I_(NaCl), fracción-I_(Na₂SO₄) y fracción-I_(H₂O). Posterior a un procedimiento de diálisis, estas fracciones se aplicaron a una columna de intercambio aniónico, DEAE-Sepharose 6B-CL. En las Figs. 19a, 19b y 19c se muestran los perfiles de elución de la fracción-I_(NaCl), fracción-I_(Na₂SO₄) y fracción-I_(H₂O), provenientes de los concentrados obtenidos por solubilización en NaCl 1M, en Na₂SO₄ 0,4M y en agua (pH 7), respectivamente. Por una parte, los cromatogramas de la Fig. 19a y 19b, tuvieron como característica común, la presencia de un pico de alta absorbancia (λ), que eluyó en concentraciones de 0,1-0,15 M de NaCl, para ambos casos. También se pudo observar que en la elución de la fracción-I_(Na₂SO₄) (Fig. 19b) se tuvo un conjunto de lecturas a 235 nm que se mantuvo alta, hasta una fuerza iónica de 1,5. La lectura a 235 nm considera la presencia y cantidad de proteína solubilizada, pues es en esta longitud donde absorbe el enlace peptídico. De hecho, Whitaker y Granum (1980) desarrollaron una expresión que permite conocer la cantidad de proteína presente en cada elución, a partir de la lectura de los coeficientes de extinción obtenidos a 280 y 235 nm, sin necesidad de emplear algún método de medición cuantitativo de proteína, como podrían ser el método del colorante ligado a la proteína (Bradford, 1976) o el método de Lowry. Por otra parte, cuando se eluyó la fracción-I_(H₂O); se tuvo como rasgo característico, la presencia de cuatro diferentes grupos de

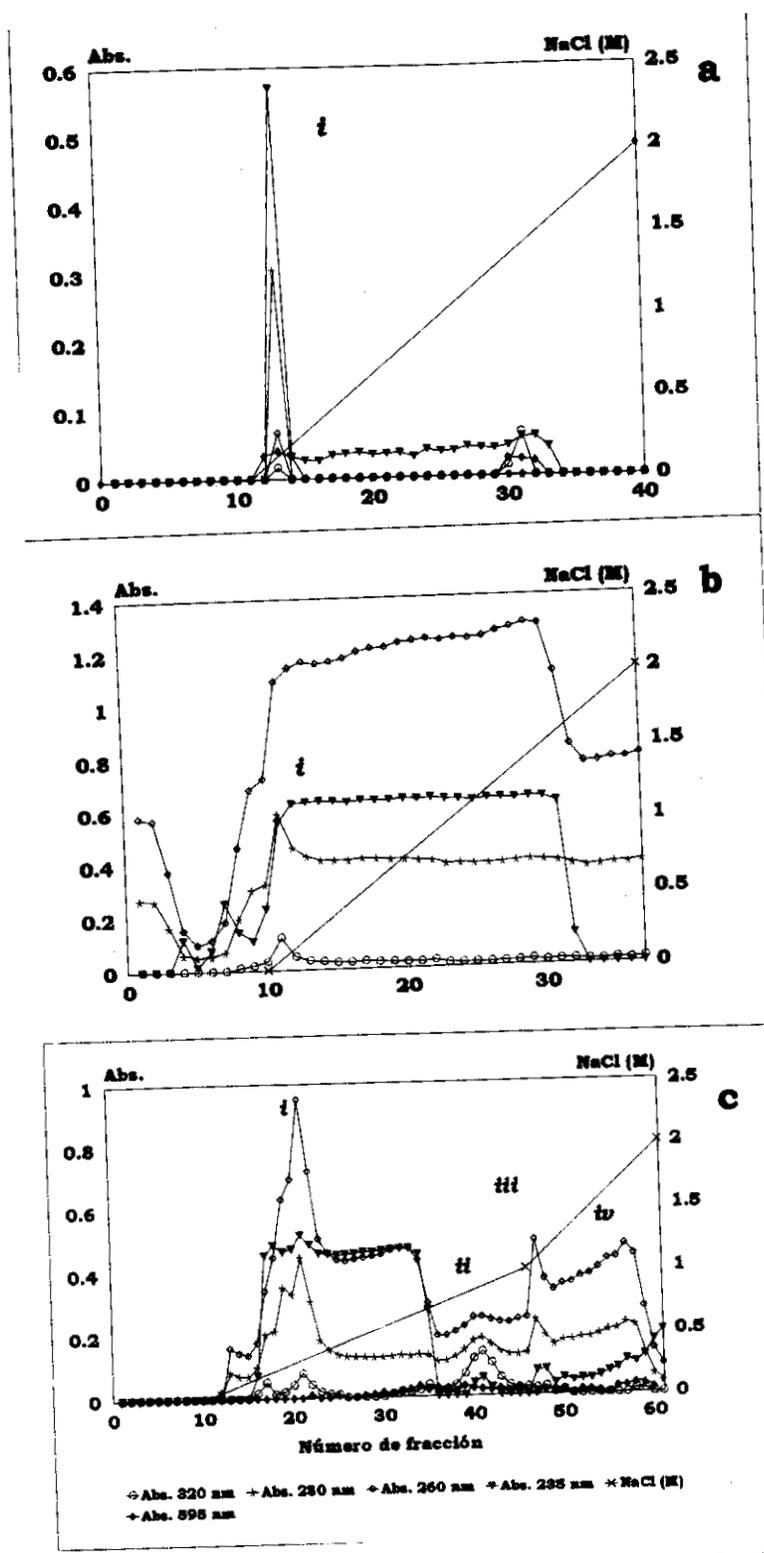
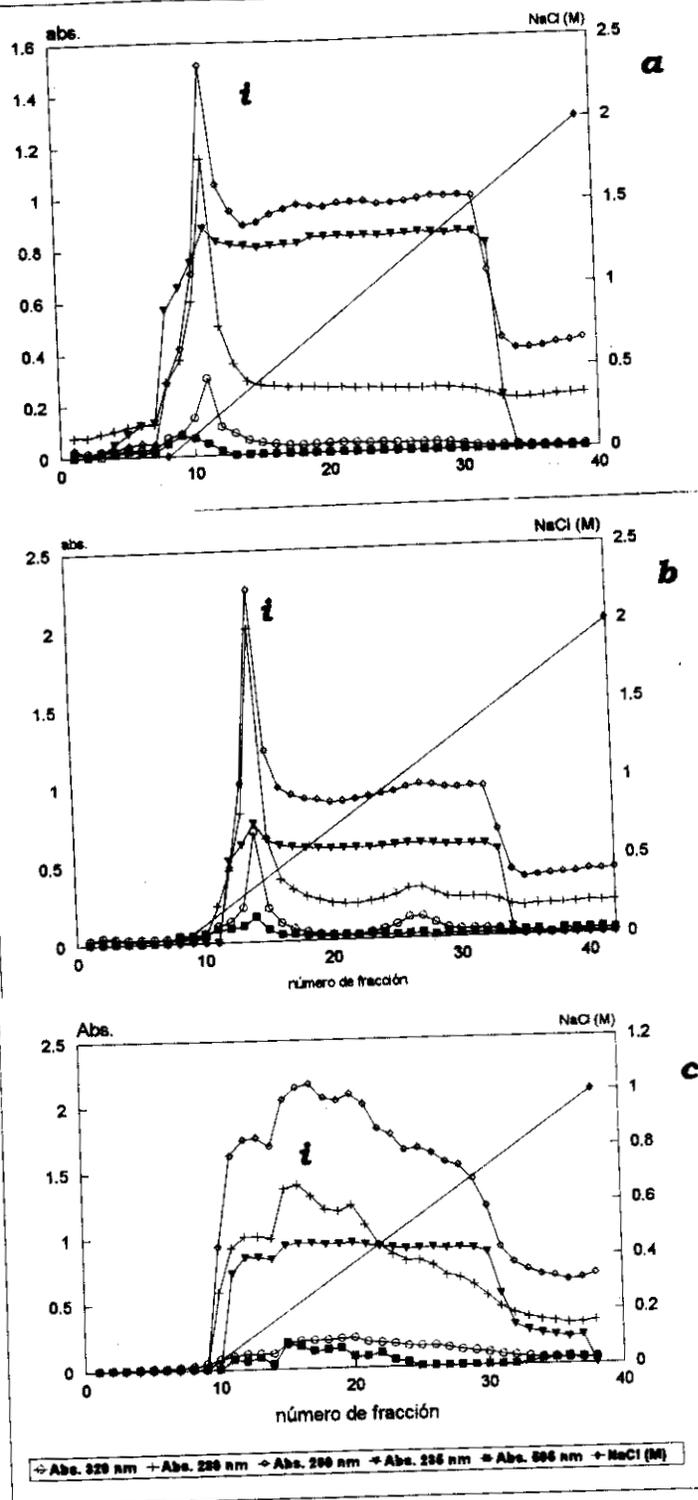


Figura 19. Perfiles de elución en intercambio iónico (DEAE-Sepharose 6B-CL, 1,5x30 cm) de la fracción-I(NaCl), b) fracción-I(Na₂SO₄) y c) fracción-I(H₂O). *i*: fracción *i*; *ii*: fracción *ii*; *iii*: fracción *iii*; *iv*: fracción *iv*.

proteínas que eluyeron a diversas fuerzas iónicas (Fig. 19c). Se lograron distinguir dos fracciones principales (*i*, *ii*), que eluyeron en un intervalo de fuerza iónica de 0,2-0,25 M de NaCl. También se pudieron distinguir tres fracciones más, que se presentaron en un intervalo de fuerza iónica de 0,8-1,7 M de NaCl. En todos los casos, la primera fracción (*i*) eluida en cada uno de los casos por la cromatografía de intercambio iónico, tuvieron una apariencia turbia y amarillenta, además de bajas lecturas de absorbancia a 280 y a 595 nm. Cabe recordar que las fracciones-I(NaCl, Na₂SO₄ ó H₂O), que provienen de la filtración en gel; autores como Konishi y col. (1985), Mora-Escobedo y col. (1990); Marccone y Yada (1991), Soriano Santos (1992); no la consideran como fracción componente de las globulinas del amaranto, precisamente por el bajo contenido proteínico que presentaron, cuando se evaluó por el método de Bradford (1976).

b) Perfiles de elución de la fracción-II(NaCl), fracción-II(Na₂SO₄) y fracción-II(H₂O), en disolución amortiguadora de fosfatos de pH 7,5.

En las Figs. 20a, 20b y 20c se muestran los perfiles de elución en columna de intercambio iónico de la fracción-II(NaCl), fracción-II(Na₂SO₄) y la fracción-II(H₂O), obtenidas previamente por filtración en gel. Se puede observar que las proteínas solubilizadas en las disoluciones de NaCl y Na₂SO₄, tuvieron cromatogramas muy similares; ya que en ambos casos se presentó un pico principal de fuerte absorbancia (*i*, en todos los casos), que eluyó en un intervalo de fuerza iónica de 0,20-0,25 M de NaCl; mientras que con las proteínas



Figuras 20. Perfiles de elución en intercambio iónico (DEAE-Sepharose 6B-CL, 1,5x30 cm) de la fracción-II(NaCl), b) fracción-II(Na₂SO₄) y c) fracción-II(H₂O). *i*: fracción *i*.

contenidas de la fracción-II(H₂O), se pudieron apreciar al menos tres picos principales (*i*, *ii*, *iii*) (Fig. 20c), que eluyeron a fuerza iónica de 0,2 a 0,4 M de NaCl. Es importante observar que las lecturas de las absorbancias a 320 y 260 nm de los tres cromatogramas fue alta, lo que presume la presencia de diferentes compuestos no proteínicos, posiblemente compuestos fenólicos, ácido fítico, ácido clorogénico, ácido sinápico, sinapina, etc. que están presentes en concentrados proteínicos de otra fuente vegetal y que absorben en la región ultravioleta (Soriano-Santos, 1992).

c) Perfiles de elución de la fracción-I(NaOH-10), fracción-I(NaOH-11), y la fracción-I(Succ50%), en disolución amortiguadora de Tris y glicina de pH 8,9.

En las Figs. 21a, 21b y 21c se muestran los cromatogramas obtenidos de la elución en la columna de intercambio iónico de las fracciones-I(NaOH-10, NaOH-11 y Succ50%), provenientes de la filtración en gel en Sephadex G-200, de los concentrados correspondientes. En los tres cromatogramas se tuvo como característica común un pico de alta absorbancia (*j*) a fuerzas iónicas bajas de aproximadamente 0,1-0,2M de NaCl. La fracción (*j*) de la fracción-I(NaOH-10) (Fig. 21a), se caracterizó por su baja absorbancia a 280 nm; la magnitud de ésta, correspondió aproximadamente a la tercera parte de la absorbancia que se tuvo para el resto de los cromatogramas. También en este mismo perfil de elución se pudo distinguir un segundo pico, que se denominó (*ii*); las proteínas de este pico se eluyeron de la resina aniónica, hasta que el gradiente de fuerza iónica alcanzó una concentración molar de 0,8 de NaCl. Asimismo, en la Fig. 21b se presenta el perfil de elución en gradiente correspondiente a

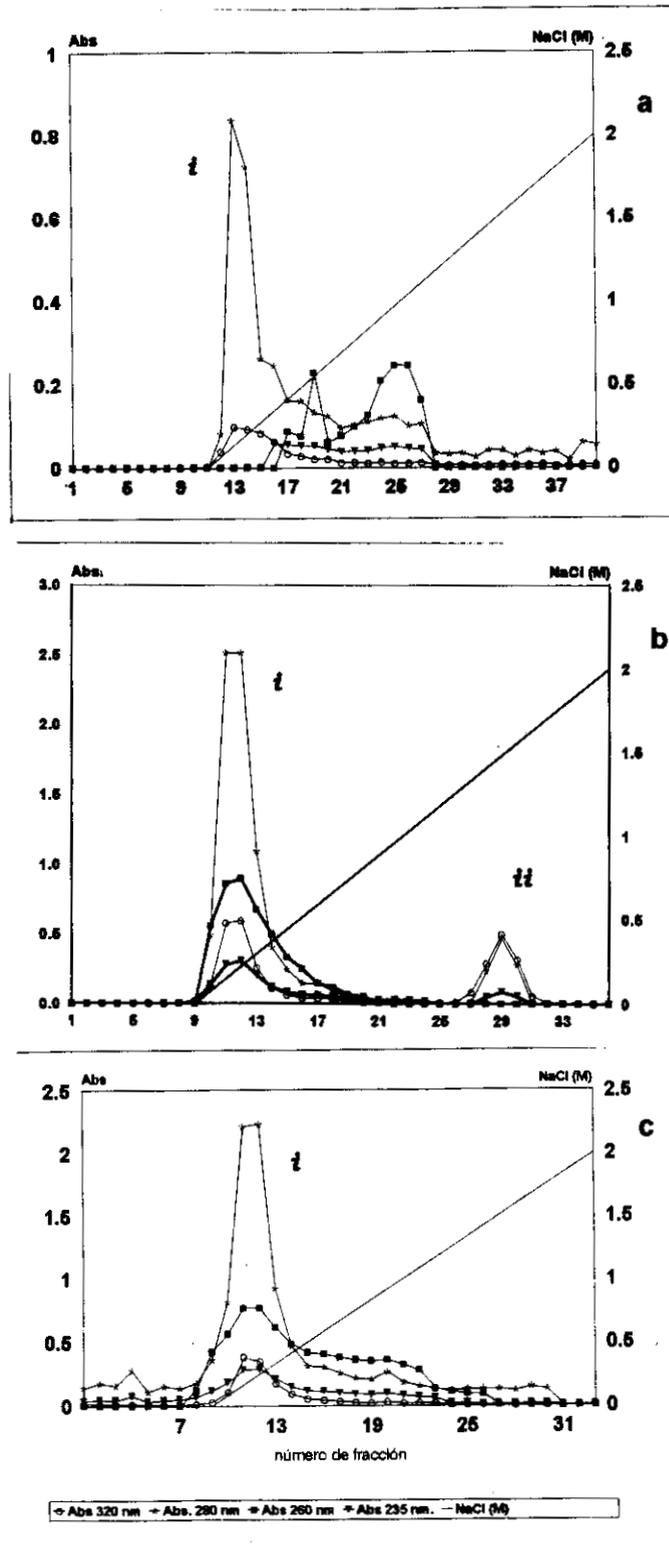
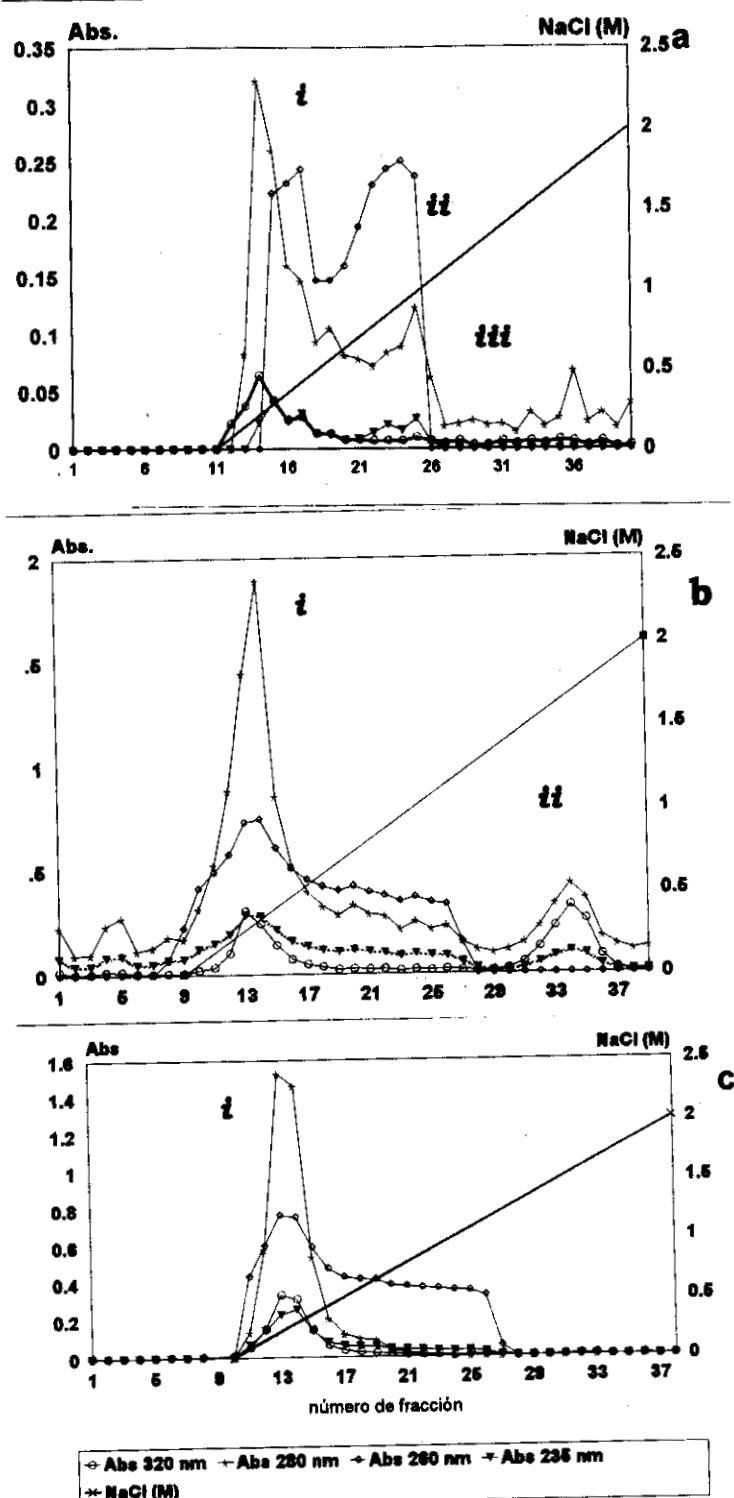


Figura 21. Perfiles de elución en intercambio iónico (DEAE-Sepharose 6B-CL, 1,5 x30 cm) de la fracción la fracción-II(NaOH-10), b) fracción-II(NaOH-11) y c) fracción-II(succ50%). *i*: fracción *i*, *ii*: fracción *ii*.

la fracción-I_(NaOH-11), en el cual destaca la presencia de un pico único de alta absorbancia (*ib*); este grupo de proteínas presentaron baja afinidad a la resina aniónica, pues sólo se necesitó llevar el gradiente de NaCl hasta una concentración de 0,1-0,2 M, para removerlas de ésta. Finalmente, en la Fig. 21c se presenta el cromatograma de la elución correspondiente a la fracción-I_(Succ-50%), en el cual se aprecian dos picos de alta absorbancia. El primero de ellos, denominado (*ic*), tuvo como característica principal presentar el valor de absorbancia más elevada de todas las fracciones eluidas; se observó que para eluir las proteínas contenidas en esta fracción, se necesitó emplear una fuerza iónica muy baja, cercana a 0,2 M de NaCl; en tanto que el pico de menor absorbancia (*iic*) se presentó cuando la elución alcanzó la fuerza iónica correspondiente a 1,8 M de NaCl.

d) Perfiles de elución de la fracción-II_(NaOH-10), fracción-II_(NaOH-11), y fracción-II_(Succ50%), en disolución amortiguadora de Tris y glicina de pH 8,9.

Con respecto a la elución en la columna de intercambio iónico de la fracción-II_(NaOH-10), NaOH-11 y Succ50%), obtenidas previamente por filtración en gel de los concentrados correspondientes, se obtuvieron los perfiles de elución que se muestran en las Figs. 22a, 22b y 22c. Para dos de los casos, se pudo observar como característica común del pico (*ib* ó *ic*), la presencia de un región de alta absorbancia a 280 nm. La fracción *ia*) correspondiente a la fracción-II_(NaOH-10), (Fig. 22a), se hizo evidente cuando la fuerza iónica fue de 0,1 M de NaCl. Por su parte, en el cromatograma de la fracción-II_(NaOH-11), se apreciaron dos picos de alta



Figuras 22. Perfiles de elución en intercambio iónico (DEAE-Sepharose 6B-CL, 1,5 x30 cm) de la fracción-II(NaOH-10), b) fracción-II(NaOH-11) y c) fracción-II(Succ50%). *i*. fracción *i*; *ii*. fracción *ii*.

absorbancia; el primer pico (*I*) apareció cuando la fuerza iónica fue aproximadamente de 0,1 M de NaCl. Una característica que llama la atención es el elevado valor de absorbancia que tuvo esta fracción. En tanto que el segundo pico (*II*), que tuvo una menor absorbancia, se presentó cuando la fuerza iónica fue más elevada, (1,8 M de NaCl). Finalmente, el perfil de elución (Fig. 22c) de la fracción-I(Succ50%), presentó un pico único (*I*), que tuvo como característica principal eluir a fuerzas iónicas de 0,1M de NaCl. También fue característico de estas eluciones, que las lecturas a 320 y 260 nm fueron muy bajas, esto representa un indicio de que tuvo menos interferencia de otros compuestos.

Una característica que compartieron los picos principales de todas las eluciones, sin considerar el pH de la disolución amortiguadora, con la cual se formó el gradiente de elución para las proteínas, fue una alta absorbancia a 280 nm a fuerzas iónicas muy bajas. Para todos los casos, la fracción (*I*) obtenida de esta cromatografía, que puede ser considerada por su alta absorbancia, como la fracción principal, se obtuvo cuando la elución presentó fuerzas iónicas menores de 0,3 M de NaCl. En diferentes estudios, como el que realizó Soriano Santos (1992), donde se detalla el fraccionamiento de las globulinas y las albúminas del grano de amaranto, se mencionó en términos generales, que la elución en gradiente de éstas, se efectuó a fuerzas iónicas menores a 0,4M de NaCl. De manera particular, en el caso de las globulinas, Konishi y col. (1985) y Soriano-Santos (1992) informaron que las diferentes fracciones que obtuvieron, presentaron una baja afinidad a una columna de Celulosa DE-52, las cuales fueron removidas con un gradiente de fuerza iónica de 0-0,4M de NaCl. Asimismo,

Barba de la Rosa y col. (1992) observaron que cuando se aplicó la fracción correspondiente a la globulina proveniente de una filtración en gel (Sephacryl S-300), a una columna de DEAE-Sepharose 6B-CL obtuvieron tres picos principales que eluyeron a 0.13, 0.17 y 0.2 M de NaCl.

IV. RELACION DE LOS METODOS DE EXTRACCION DE LAS PROTEÍNAS, LAS PROPIEDADES FUNCIONALES Y LA CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LOS CONCENTRADOS PROTEINICOS DE LA SEMILLA DE AMARANTO.

Al analizar las diferentes propiedades funcionales estudiadas en función de la naturaleza de los métodos de extracción de las proteínas, empleados en la preparación de los diferentes concentrados, se observó que los métodos reconocidos por su efecto desnaturalizante sobre las proteínas, como es la solubilización en álcali ó la modificación química pueden provocar alteraciones en las propiedades originales de las proteínas. Esto ocurrió en los concentrados obtenidos por solubilización en álcali a pH 10 ó 11, así como en el concentrado preparado por succinilación. De tal manera, que estos concentrados presentaron valores más elevados de las propiedades funcionales que el resto de ellos, como se puede observar en la Tabla 19. Aunque que hay que anotar que los valores más altos de las propiedades estudiadas se dan a pH alcalinos, y precisamente en esta región confluyen una serie de factores que dan pie a la expresión de estas características funcionales; uno de estos factores es el aumento de la solubilidad que tuvieron los concentrados en relación al incremento del pH de la solución, además que estos concentrados presentaron la mayor cantidad de proteína solubilizada de todos los concentrados estudiados. Al analizar en particular la alta capacidad de espumado que mostró el concentrado obtenido por solubilización a pH 11, ésta puede justificarse tomando en consideración lo que argumentó Cheftel y col., (1989), quién indicaron que la capacidad de espumado aumenta según lo hace la viscosidad y se sabe que ésta a su vez lo hace en función del aumento del pH. De lo

anterior se puede hacer la inferencia de que la propiedad estudiada en este concentrado se puede explicar apropiadamente, considerando tanto la cantidad de proteína solubilizada como la viscosidad en la solución proteínica.

Tabla 19. Principales propiedades funcionales de los concentrados proteínicos de amaranto.

concentrado (método de extracción)	absorción de agua	absorción de aceite	actividad de emulsión	capacidad de espumado	solubilidad
aqua	pH 7 (a)	--	--	pH 2, 4, 6, 8 y 10 (a)	--
NaCl (1m)	pH 7 (a)	--	--	--	--
Na ₂ SO ₄ (0.4m)	pH 7 (a)	--	--	--	--
NaOH (pH 10)	---	(pH 7) (a)	pH 4 y 10 (a)	--	--
NaOH (pH 11)	pH 7 (a)	(pH 7) (a)	pH 10 (a)	pH 8,10 (a)	pH 8,10 (a)
Succinilado 50%	---	--	pH 2, 6, 8 y 10 (a)	pH 6 y 8 (a)	pH 6,8 (a)

(a) indica las medias más altas según un análisis de Duncan ($p < 0.005$)

Una posible explicación de la polifuncionalidad que presentaron estos concentrados podría atribuirse a la clase de proteínas presentes en estos. Las condiciones de preparación de estos concentrados sugieren que se han solubilizado la mayor parte de las proteínas presentes (albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas) en la semilla de amaranto. Una evidencia que apoya lo anterior es el perfil electroforético (Fig. 9) de estos concentrados,

donde el número e intensidad de las bandas sugieren una alta concentración de diferentes tipos de proteínas.

En el caso del concentrado proteínico obtenido por modificación química, en este caso se realizó la acilación de las proteínas con anhídrido succínico, éste presentó la mayor actividad emulsionante, capacidad de espumado y de solubilidad en un rango de pH cercano al valor neutro, como se puede observar en la Tabla 19. Diversos autores (Franzen y Kinsella, 1976; Choi y col. 1981; Paulson y Tung, 1988) atribuyeron el aumento, principalmente de las propiedades superficiales (aquellas donde desempeña un papel muy importante la tensión superficial en las interfases agua/aire ó aceite/agua) debido al cambio de la carga neta de la proteína, provocado por el agente acilante; la inserción de éste resulta en un aumento de la repulsión entre las cadenas polipeptídicas generando el desdoblamiento de la molécula; de esta manera los polipéptidos resultantes, que son de naturaleza lineal y largos pueden acomodarse en las diversas interfase agua/aire ó aceite/agua, actuando como estabilizadores de la emulsión, al orientar sus fragmentos polares en el componente no polar de la emulsión y simultáneamente ocurre un fenómeno similar con los fragmentos no polares con la parte polar del sistema emulsionante. Esta nueva disposición de la molécula proteínica se manifiesta en la capacidad de espumado, provocando un abatimiento de la tensión superficial, lo que resulta en la prevención de la coalescencia entre las redes proteínicas que contienen las burbujas de aire. Este método de extracción ha sido ampliamente reconocido

como promotor del mejoramiento de diversas propiedades funcionales, tal como se demostró en este estudio.

Además de los cambios en la naturaleza eléctrica ocurrida en la molécula proteínica, es necesario analizar la clase de proteínas presentes en este concentrado. Los diferentes cromatogramas de filtración en gel (Fig. 16c y Fig. 17c) permitieron conocer que la composición de las proteínas está dada principalmente por dos fracciones de peso molecular distinto. Las diferentes fracciones I obtenidas en cada cromatograma tuvieron un peso molecular elevado (466 y 381 kD), en tanto que las fracciones II tuvieron un peso molecular que se ubicó en el rango de 5,6 a 7,6 kD.

Por otra parte, los concentrados preparados por métodos reconocidos por preservar la estructura nativa de las proteínas, como es la solubilización en agua o en disoluciones salinas, en este caso Na₂SO₄ y NaCl, presentaron sólo dos propiedades funcionales (Tabla 19). El concentrado obtenido por solubilización en agua, presentó los mejores valores de capacidad de espumado en casi todo el rango de pH estudiado, de todos los concentrados en estudio. Se ha discutido anteriormente que esta propiedad se debe principalmente a las albúminas; éstas pueden ser proteínas globulares de bajo peso molecular, con una gran capacidad de formar redes, abatir la tensión superficial aire/agua y atrapar burbujas de aire. Por este método de extracción se solubilizaron una gran cantidad de albúminas presentes en la semilla de amaranto, según se pudo constatar en el cromatograma de filtración en gel de

las proteínas de este concentrado; en éste se apreciaron tres fracciones principales, de las cuales las fracciones II y III, de peso molecular calculado en 19,5 y 6,0 kD respectivamente, representaron la mayoría de las proteínas solubilizadas, así lo confirmó el registro de las lecturas del ensayo de la prueba del colorante ligado a la proteína (Bradford, 1976). Así también el perfil electroforético de este concentrado que se ilustra en la Fig. 9 representa una evidencia más del tamaño relativamente pequeño de esta clase de proteínas, al presentar una gran cantidad de polipéptidos de peso molecular menor a 14,3 kD, como lo sugiere la intensidad de la banda.

Por otra parte, los concentrados obtenidos por solubilización salina, en este caso en disoluciones de Na_2SO_4 0,4M y NaCl 1M, tuvieron como característica principal presentar la absorción de agua más alta. Se podría argumentar que cierta cantidad de agua puede quedar atrapada por otro tipo de moléculas, principalmente carbohidratos; esto puede suceder y verse reflejado en el incremento de la absorción de agua, aunque en contraparte, también sucede que una fracción de las proteínas contenidas en este concentrado se solubilizaron. De la información que se recopiló de las características fisicoquímicas, se encontró que las proteínas contenidas en este concentrado se encontraban conformadas por dos grupos principales; uno de peso molecular de 381 kD y el restante de 6,7 kD. Ambos cromatogramas presentaron rasgos de similitud con diferentes investigaciones anteriormente reportadas (Marcone y Yada, 1991; Soriano-Santos, 1992; Mora-Escobedo y col. 1992). En estos trabajos se habían llegado a conclusiones tan importantes, como saber que las globulinas del grano

de amaranto, son moléculas oligoméricas. Estos autores emplearon varios métodos para el fraccionamiento de las diferentes clases de proteínas presentes en la semilla de amaranto; no obstante que los métodos empleados en la solubilización de las proteínas en esta investigación, se asemejan parcialmente a los que utilizaron los autores arriba citados, la similitud de los cromatogramas permite afirmar que las proteínas contenidas en estos concentrados han preservado su estructura nativa. Aunque las proteínas totales presentes en estos concentrados son principalmente una mezcla de globulinas, solubles principalmente en disoluciones salinas, y de una fracción de albúminas que se solubilizaron en la disolución salina.

Finalmente en la Tabla 20 se relacionan tanto la función más relevante de los concentrados, con las características fisicoquímicas más importantes evaluadas en este trabajo.

Tabla 20. relación de la caracterización funcional y la caracterización fisicoquímica de las proteínas contenidas en los diferentes concentrados proteínicos de amaranto.

metodo de solubilizacion de proteínas	principal propiedad funcional	funcion esperada de las proteínas	características fisicoquímicas
agua (ph 7)	alta capacidad de espumado	proteínas globulares de bajo peso molecular con gran capacidad de formar redes y atrapar aire, que dan lugar a la espuma a ph isoelectrico forman espumas.	no ha habido cambios en la conformación nativa. se encuentra solubilizada una fracción importante de albuminas las albuminas son de mr de 19 a 6 kd.
nacl (1m) o na2so4 (0.4m)	alta absorcion de agua.	se han solubilizado globulinas y parcialmente las albuminas. las proteínas globulares orientan sus grupos hidrofílicos al exterior de la molécula interactuando con el agua.	presentan dos grupos de proteínas. uno de alto peso molecular de 380 kd. y otro de 7.8 kd. estas proteínas presentan una carga eléctrica débil.
succinilado 50%	alta actividad de emulsificación. también alta capacidad de espumado. se ha mejorado la solubilidad	la carga neta de la proteína ha sido modificada. los polipeptidos largos y lineales pueden interactuar en las interfases agua/aceite o agua/aire.	la modificación química provocada influye en la conformación de la proteína. la nueva naturaleza eléctrica provoca repulsión entre las cadenas polipeptídicas, ocasionando desnaturalización de las proteínas.
naoh(ph:10) o naoh(ph:11)	alta absorcion de aceite. alta absorcion de agua. alta actividad de emulsificación.	se han solubilizado la mayor parte de las proteínas del grano de amaranto. se incrementa la solubilidad a ph alcalino.	se encuentran presentes una gran cantidad de proteínas y polipeptidos de mr de 381 a 7 kd. presumiblemente ha habido entrecruzamientos intra e intermoleculares de las cadenas polipeptídicas. estas proteínas tienen una carga eléctrica débil.

No obstante las perspectivas de aplicación que tienen los diferentes concentrados proteínicos obtenidos en esta investigación, es imprescindible el diseño de experimentos donde se analice la calidad nutrimental de estos. De esta manera se podrá ponderar la alteración ocurrida debida al proceso de extracción, que sufrieron en su calidad original las proteínas de la semilla de amaranto. Se sabe que los tratamientos fuertemente alcalinos pueden modificar además de algunas de las propiedades funcionales de las proteínas nativas, también aminoácidos esenciales como la lisina y generar nuevos residuos de aminoácidos como la lisinoalanina, lantionina y ornitinoalanina. Dependiendo de la severidad del tratamiento alcalino, puede ocurrir la racemización de varios aminoácidos, junto con la β -eliminación de cisteína, cistina y residuos fosforilados y glicosilados de serina y treonina. Los productos de la β -eliminación, a partir de la treonina son dehidroalanina y metildehidroalanina. Estos derivados son muy reactivos en presencia de varios grupos nucleofílicos, como los grupos ϵ -amino, sulfhidril, imidazol, indol y guanidinio de los aminoácidos. Estas reacciones causan entrecruzamientos intra e intermoleculares en las proteínas, originando un nuevo rearrreglo de la molécula proteínica. Este rearrreglo puede originar nuevas propiedades funcionales, además de producir un descenso en la digestibilidad de las proteínas, incluyendo productos que pueden considerarse mutagénicos (Feeney y Whitaker, 1988). En el caso del tratamiento de modificación química, el nucleófilo por excelencia es la lisina, que puede sugerirse una pérdida del valor nutritivo, según sea la

extensión de la acilación ocurrida; aunque en contrasentido se produzca la generación de nuevas propiedades funcionales.

CONCLUSIONES

a) La influencia de la fuerza iónica sobre los perfiles de solubilidad del Nitrógeno total soluble, Nitrógeno proteínico ó Nitrógeno no proteínico de HPAD-29, podrían emplearse tanto para la optimización de la extracción de las proteínas solubles en NaCl ó Na₂SO₄ de la semilla cruda de amaranto, con fines de fraccionamiento; así como para la obtención de concentrados proteínicos (ricos en albúminas y globulinas), que posean propiedades funcionales características.

b) Aunque generalmente la calidad nutrimental de un concentrado o aislado proteínico se expresa en términos de proteína cruda (N total), sería conveniente normalizar tanto el contenido de nitrógeno proteínico (proteína verdadera), como el método de solubilización, el cual daría como resultado un ingrediente con propiedades funcionales específicas.

c) El nitrógeno no proteínico presente en los concentrados contribuiría como fuente adicional de nutrimentos (aminoácidos, péptidos, carbohidratos, entre otros). Ambos atributos ampliarían la posibilidad de aplicación de éstos concentrados como materia prima en la formulación de alimentos.

d) La extracción de las proteínas de amaranto por disoluciones alcalinas (pH 10 y pH 11), así como la modificación química, por reacción de succinilación resultaron los métodos más eficientes para la obtención de los concentrados proteínicos. Sin embargo, aunque el rendimiento del concentrado proteínico obtenido por disolución acuosa fue bajo, el contenido de proteínas fue casi del 100%, a diferencia de los concentrados obtenidos por solubilización alcalina, que estuvieron comprendidos en un rango de 50 a 70%.

e) Se utilizó como paso inicial para la concentración de proteínas el sistema de clasificación neumática, seguido de un método de solubilización de proteínas, para lograr una mayor concentración de las mismas; sin embargo, aún empleando los métodos de solubilización de proteínas más eficientes, reconocidos para otros

materiales vegetales, como el frijol de soya, con el que se obtiene una concentración de proteína promedio del 70%, esto no sucede de la misma manera para las proteínas de amaranto, dado que queda alrededor de un 30-40% de proteína insoluble, debido a diversos factores, que aun no se investigan.

f) Las propiedades funcionales de los seis concentrados analizados, se relacionaron con el método de extracción de proteínas respectivo; esto quiere decir que las fracciones proteínicas fueron distintas en cada uno de los casos, lo que se reflejó en las propiedades funcionales desarrolladas en cada caso. Los concentrados proteínicos obtenidos a pH alcalino presentaron los valores más altos de las propiedades funcionales, que el resto de los concentrados proteínicos ensayados. Sin embargo, para el caso de cada uno de los concentrados restantes, estas se caracterizaron por presentar por lo menos una propiedad funcional, que se desarrolló mejor al resto de los concentrados analizados.

g) Los perfiles de elución de los concentrados proteínicos obtenidos por los diferentes métodos de solubilización mostraron que la composición de proteínas en cada uno de ellos fue diferente, lo que además se pudo reafirmar cuando estos perfiles se compararon con sus perfiles electroforéticos. Fue característico en todos los casos, a excepción del concentrado modificado químicamente por succinilación, que el principal grupo de proteínas obtenidos por los diferentes métodos de solubilización son catalogados como de bajo peso molecular; no así para el caso del concentrado obtenido por succinilación, en donde se identificó un conjunto principal de proteínas de alto peso molecular.

h) Al caracterizar la naturaleza eléctrica de las proteínas de todos los concentrados proteínicos analizados, coincidieron en presentar una naturaleza eléctrica débil, debido a que su elución completa se obtuvo en concentraciones de NaCl bajas entre 0,1 y 0,4 M.

BIBLIOGRAFIA

A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 14th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C. 1984.

Barba de la Rosa, A., Gueguen, J., Paredes-López, O. and Viboren G. J.. Fractionation procedures. Electrophoretic characterization and amino acid composition of Amaranth seed proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* (1992a) **40**, 931.

Barba de la Rosa, A., Paredes-López O. and Gueguen J. Characterization of Amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatographic techniques. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* (1992) **40**, 937-940.

Barber, K. and Warthesen J. Some functional properties of acylated Wheat gluten. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* (1982) **30**, 930-934.

Becker, R., Wheeler, E.L., Lorenz, K., Stafford, A.E., Grosjean, O.K., Betschart, A.A. and Saunders, R.M. A compositional study of amaranth grain. *Journal of Food Science* (1981) **46**, 1115.

Betschart, A.D., Irwing, W., Shepherd, A.D. and Saunders R.M. Nitrogen solubility of alfalfa protein concentrate as influenced by various factors. *Journal of Food Science* (1985) **46**, 1181.

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

Bressani, R., and García-Vela L.A. Protein fractions in Amaranthus grain and their chemical characterization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* (1990) **38**, 1205-1209.

Bryant, L.A. Montecalvo J, Morey K.S. and Loy B. Processing, functional and nutritional properties of Okra seed products. *Journal of Food Science* (1988) **53**, 810-816.

Cheftel, J.C. and Lorient, D. *Proteínas alimentarias*. Ed. Acribia S.A. España. (1989) pp 49-102.

Choi, Y. R., Lusas E.W. and Rhee, K.C. Effects of acylation of defatted cottonseed flour with various acid anhydrides on protein extractibility and functional properties of resulting protein isolates. *Journal of Food Science* (1982) **47**, 1713-1716.

Choi, Y. R., Lusas E.W. and Rhee, K.C. Succinylation of cottonseed flour: Effect on the functional properties of protein isolates prepared from modified flour. *Journal of Food Science*. (1981) **46**, 954-959.

Choi, Y. R., Lusas E.W. and Rhee, K.C. Effect of succinylation of cottonseed flour during protein extraction on the yield and some of the properties of protein isolates. *Journal American Oil Chemists Society*. (1981) **58**, 1044-1049.

Das K.P. and Kinsella, J.E. Stability of food emulsions: Physicochemical role of protein and non-protein emulsifiers. *In: Kinsella J.E. (Ed). Advances in Food and Nutrition Research*. Vol. **84** (1990) Academic Press, Inc. London. pp 81-181.

Delahaye E. and Gómez, V. Preparation processes of protein isolate from whole amaranth seed. *Amaranth Newletters*. (1987) 6-8.

Dench, J., Rivas, N and Caygill, J. Selected functional properties of sesame (*Sesamum indicum L.*) flour and two protein isolates. *Journal of Science and Food Agricultural*. (1981) **32**, 557-564.

Derbyshire, E. Wright, D.J. and Boulter, D. Review: Legumin and vicilin, storage proteins of legume seed. *Phytochemistry* (1976) **15**, 3-24.

FAO/WHO. Technical Report Series No. 724 (1985) Geneva: WHO.

Feeney, R. and Whitaker, J. R. Importance of cross-linking reactions in proteins. *In: Pomeranz, V (Ed.) Advances in Cereal Science and Technology*. American Association of Cereal Chemistry. Vol IX (1988). pp 37-39.

Franzen, K.L., and Kinsella, J.E. Functional properties of succinylated and acetyled leaf protein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* (1976) **24**, 914-918.

Gorinstein, S., de Nue, I. and Arruda, P. Alcohol soluble and total proteins from amaranth seed and their comparison with others cereals. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* (1991) **39**, 851-854.

Gorinstein, S., Moshe, R., Green, L. and Arruda, P. Evaluation of four *Amaranthus* Species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (1991) **39**, 851.

Gounaris, A. and Pearlman, G. *Journal Biology Chemistry* (1967) **242**, 2763.

Gronninger, H. Preparation and properties of succinylated fish myofibrillar proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (1973) **21**, 978.

Habbed, A., Cassidy, M. and Singer, S. *Biochim Biophys. Acta* (1958) **29**, 387.

Hermansson, A. M. Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins. *Journal American Oil Chemists Society* (1979) **56**, 272-279.

Huidobro A. y Tejada, M. Propiedades de hidratación del músculo de pescado. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. (1993) **33** (4), 365-381.

Kabirullah, M. and Wills, R.B. Functional properties of acetyled and succinylated sunflower protein isolates. *Journal Food Technology* (1982) **17**, 235-249.

Kakade, L. M. Biochemical basis for the differences in plant protein utilization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (1974) **22**, 550-550.

Kinsella, J.E. Functional properties of soy protein. *Journal American Oil Chemists Society*. (1979) **56**, 242-279.

Koeppe, S.J., Rupnow, J.H., Walker, C.E. y Davis, A., *Journal of Food Science*. (1985) **50**, 1519.

Konishi, Y. and Fumita, Y. Isolation and characterization of globulin from seed of *A. hypochondriacus*. *Agriculture Biological Chemistry* (1985) **49**(5), 1453-1459.

Konishi, Y., and Horikawa, K. Extraction of two albumin section from amaranth grains: comparison of some physicochemical properties and the putative localization in the grain. *Agriculture Biological Chemistry* (1991) **55**(11), 2745-2750.

Konishi, Y., and Yoshimoto, N. Amaranth globulin as a heat-stable emulsifying agent. *Agriculture Biological Chemistry* (1989) **53** (12), 3327-3328.

✓ **Laemli, U.K.** Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970) **227**, 680-685.

Landry J. and Moureaux, T. Hétérogénéité des glutélines du gran de maïs: Extraction sélective et composition en acides, amines de trois fractions esolées. *Bulletin Société Chimie Biologie*. (1970) **52**, 1021-1037.

Lorenz, Z. and Hwang, Y.S. Lipids in amaranth. *Nutrition Reports International*. (1985) **31**, 83-89.

Lumen de, Benito. Molecular approaches to improving the nutritional and functional properties of plant seed as food source: Developments and comments. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (1990) **38**, 1779-1788..

Ma, C.Y. Functional properties of acylated Oat protein. *Journal of Food Science*. (1989) **49**, 1128-1131.

Marcone, M., and Yada, R. Isolation, purification and characterization of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. *Agriculture Biological Chemistry*. (1991) **55**, 2281.

Mc Watters, K. and Holmes, M. Influence of moist heat on solubility and emulsification properties of soy flour. *Journal of Food Science* (1979) **42**, 1444.

Means, G.E and Feeney, R.E. **Chemical modification of proteins.** Fenney, R.E. and Whitaker, J.R. (Eds.) Holden-day, Inc., San Francisco, USA: (1971).

Moore, S. and Stein, W.H. *Methods in Enzymology*. (Academic Press, Inc. New York, 1955) 819.

Mora-Escobedo, R., Paredes-López, O. and Ordorica Falomir, C. Characterization of albumins and globulins from Amaranth. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. (1990) **23**, 484.

Morr, C. V. Conformation and functionality of milk proteins. *In: Functionality and protein-structure*. ACS Symposium Series 92, A. Pour-El (Ed) American Chemical Society, Washington, D.C. (1979) p-65.

Myers, C. Functional attributes of protein isolates *In: Characterization of proteins*. Franks, F. (Ed.). (The Human Press Inc. Clifton, New Jersey, 1988) pp-491-546.

Narayana, K. and Narasinga, R. Effect of acetylation and succinylation on the functional properties of winged Bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) flour. *Journal of Food Science* (1984) **49**, 547-550.

National Research Council. Amaranth: Modern prospects for an ancient crop. (National Academic Press. Washington, D.C. 1984) p-27.

Okezie, O. B and Bello, A.B. Physicochemical and functional properties of winged bean flour and isolate compared with Soy isolate. *Journal of Food Science* (1988) **53**, 450-454.

Padhye, V.W. and Salunke, D.K. J. Biochemical studies on black gram (*Phaseolus Mungo*): Solubilization and electrophoretic characterization of proteins. *Journal of Food Biochemistry* (1977) **1**, 111.

Paredes-López, O. Safflower proteins for food uses. *In: Hudson, B.J. (Ed.) Development in Food Proteins* (vol 7) (1988) Applied Science Publishers, London, 1-33.

Paredes-López, O. and Ordorica-Falomir, C. Functional properties of safflower protein isolates: water absorption, whipping and emulsifying characteristics. *Journal of Science and Food Agricultural*. (1986) **37**, 1104-1108.

Paredes-López, O., Mora-Escobedo, R. and Ordorica-Falomir, C. Isolation of Amaranth proteins. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. (1988) **21**, 59.

Paulson, A.T. and Marvin, A. Emulsification properties of succinylated Canola protein isolate. *Journal of Food Science*. (1988) **53**, 817-820.

Rivas, N., Dench, R. and Caygill, J. Nitrogen extractibility of Sesame (*Sesamum indicum L.*) seed and the preparation of two protein isolates. *Journal of Science and Food Agricultural* (1981) **32**, 565-571.

Sánchez, M. La Flora del Valle de México. Ed. Herrero. México D.F.

Sánchez-Marroquín, A. A two forgotten crops of agroindustrial importance amaranth and quinoa. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. (1983) **33**, 11.

Sánchez-Marroquín, A., Del Valle, F.R., Escobedo M., Avitia, R. Maya S. and M Vega. Evaluation of whole amaranth (*Amaranthus cruentus*) flour, its air-classified fractions and blends of these with wheat and oats as possible components for infant formulas. *International Journal of Food Science and Technology*. (1986) **51**, 1231.

Segura-Nieto, M., Vázquez, N., and Rubio, H. Characterization of amaranth seed protein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* (1992) **40**, 1553-1558.

Shanmugasundaram, T. and Venkataram, L.V. Functional properties of defatted and detoxified Maduca (*Madhuca butyraceae*) seed flour. *Journal of Food Science*. (1989) **54**, 351-353.

Shewry, P.R. and Mifflin, B.J. Characterization and synthesis of barley seed proteins. In: Werner, G. y Muller, H.P. (Ed.) **Seed Proteins. Biochemistry, genetics, nutritive value.** Netherlands, (1983). pp 143.

Singhal, R.S. and Kulkarni, P.R. Review: Amaranth an underutilized resource. *International Journal Food Science and Technology* . (1988) **23**, 125.

Soriano-Santos J., Iwabuchi, S. and Fujimoto, K. Solubility of amaranth seeds proteins in sodium sulphate and sodium chloride: The main factor in quantitative extraction for analysis. *International Journal of Food Science and Technology*. (1992) **27**, 337.

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

Sosulki, F. Food uses of sunflower proteins. *In: Hudson, B.J. (De.) Development in Food Proteins* (vol 1) Applied Science Publishers, London, (1988) pp 1-57.

Stainsby, G. Foaming and emulsification. *In: J.R: Mitchell and D.A: Ledword (Eds.) Functional properties of food macromolecules*. Elsevier Applied Science Publishers. (1986) pp 315-353.

Teutonico, R.A. and Knorr, D. Amaranth: Composition, properties and applications of discarded food crop. *Food Technology* (1985) **39**, 49.

Utami, S. Plant food protein engineering. *In: Advances in food and nutrition research*. (1992) **36**, pp 89-139.

Voet, D. and Voet, J.V. *Biochemistry* (John Wiley & Sons, 1990) pp. 75-107.

Volkert, M. and Klein, B. Protein dispersability and emulsion characteristics of four soy products. *Journal of Food Science* (1979) **44**, 93-96.

Wang, H., and Kinsella, J.E. Functional properties of novel protein: alfalfa leaf protein. *Journal of Food Science*. **41**, 286-292, 1976.

Whithaker, J.R. and Ganum, P.E. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 y 280 nm. *Analytical Biochemistry* (1980) **109**, 156-159.

Wolf, W.J. Physical and chemical properties of soybean proteins. *Journal American Oil Chemists Society*, **54**, 112A-117A.

Wright, D.J. The Seed Globulins. *In: Hudson, B.J. (Ed.) Development in Food Proteins* (vol 1) (1987) Applied Science Publishers, London, 18-157.

Yasumatsu, K., Sawada, K. Moritaka, S., Misaki, M., Toda, J., Wada, T. and K. Ishii. Whipping and emulsifying properties of soy beans products. *Agriculture Biological Chemistry* (1972) **36**, 719.

EPILOGO

Esta historia continuará



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

92352071

DENOMINACIÓN DE LA TESIS
PERFILES DE SOLUBILIDAD Y

CARACTERIZACION FISICOQUIMICA

DE CONCENTRADOS PROTEINICOS DE

LA SEMILLA DE AMARANTO.

En México, D. F. se presentaron a las 11:00 horas del día 14 del mes de JULIO del año 1995 en la Unidad IZTAPALAPA de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del Jurado.

DR. JORGE SORIANO SANTOS;

DRA. ISABEL GUERRERO LEGARRETA;

DRA. GABRIELA RODRIGUEZ SERRANO Y

DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ

bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último se reunieron para proceder al examen de grado de

Maestro en: BIOTECNOLOGIA

MARCO AURELIO CORDOBA SALGADO

quien presentó una comunicación de resultados, cuya denominación aparece al margen y de acuerdo con el artículo 33 fracciones I, II, III y V del Reglamento de Estudios de Posgrado de esta Universidad, los miembros del Jurado resolvieron:

Aprobado

Acto continuo, el Presidente del Jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



FIRMA DEL INTERESADO

REVISO

Rosa R.L.

DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES

Jorge Soriano Santos

DR. JORGE SORIANO SANTOS

PRESIDENTE

Isabel Guerrero Legarreta
Gabriela Rodriguez S.

DRA. ISABEL GUERRERO L.

DRA. GABRIELA RODRIGUEZ S.

VOCAL

Gustavo Viniegra G.

DR. GUSTAVO VINIEGRA G.

SECRETARIO

El suscrito Director de División de C.B.S. hace constar que las firmas que aparecen son auténticas y corresponden a los señores Miembros del Jurado cuyos nombres aparecen en esta acta.

Rosaura Grether Anguila
MTRA. ROSAURA GRETHER
DIRECTOR DE DIVISION



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

A QUIEN CORRESPONDA:

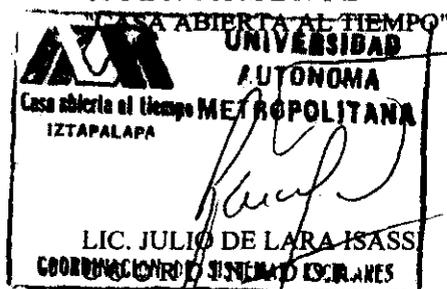
Por la presente se hace se hace constar que el alumno MARCO AURELIO CORDOBA SALGADO con matrícula 92352071 cubrió los 240 créditos correspondientes al Posgrado de Maestría en Biotecnología aprobando el Examen de Grado el día 14 de julio de 1995 con la tesis titulada:

“Perfiles de solubilidad y caracterización fisicoquímica de concentrados proteínicos de la semilla de amaranto”.

El Acta de Examen de Grado y el Certificado de Estudios Profesionales se encuentran en trámite en la Dirección de Sistemas Escolares.

A solicitud del interesado y para los fines que estime convenientes, se extiende la presente en la Ciudad de México, Distrito Federal a los veintisiete días del mes de julio de mil novecientos noventa y cinco.

ATENTAMENTE



UNIDAD IZTAPALAPA

COORDINACION DE SISTEMAS ESCOLARES

Av. Michoacán y la Purísima, Col. Vicentina, 09340 México, D.F. Apdo. Postal 55-532, 09000 México, D.F.,

Tels.: 724-4880 y 724-4883



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
Departamento de Biotecnología

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente hago constar que el DR. JORGE SORIANO SANTOS fué director de la tesis de Maestría titulada "Perfiles de solubilidad y características físico-químicas de aislados proteínicos de la semilla de amaranto", del alumno MARCO AURELIO CORDOBA SALGADO, quien estuvo inscrito en la Maestría de Biotecnología de esta Unidad.

Se extiende la presente para los fines que al interesado convengan, en la Ciudad de México, D.F. al primer día del mes de febrero de mil novecientos noventa y seis.

A t e n t a m e n t e

"CASA ABIERTA AL TIEMPO"

DR. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA
Coordinador de la Maestría en Biotecnología