



UNR

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS –
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LAS
PROTEÍNAS DE *Chenopodium quinoa* Y SUS HIDROLIZADOS

Presentada por

Lic. en biotecnología Natalia Montellano Duran

Rosario, Argentina

Año 2017

"PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS DE *Chenopodium quinoa* Y SUS HIDROLIZADOS"

Natalia Montellano Duran

Licenciada en biotecnología

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta y otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área Físicoquímica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el periodo comprendido entre el 01 de abril de 2014 y el 15 de diciembre de 2017, bajo la dirección de la Dra. Valeria Boeris y el Dr. Dario Spelzini.

Directora: Dra. Valeria Boeris

Co – Director: Dr. Darío Spelzini

Jurado:

Jurado:

Jurado:

Defendida:

DEDICATORIA

“Las ideas que no llevamos a cabo nunca sabremos si no valían la pena”

*A mi familia: Ruth, Ibar y Mauricio,
porque siempre están donde quiera que estén,
los amo!*

AGRADECIMIENTOS

A mi familia porque siempre me apoyan en todo lo que hago y me acompañan.

A mis directores Dra. Valeria Boeris y Dr. Darío Spelzini por darme la oportunidad de aprender, la orientación brindada y por formarme como investigadora. Al Prof. Dr. Fernando Barroso da Silva por enseñarme que los conocimientos van más allá de las fronteras e incluso de lo que ya sabemos.

A mis tutoras de tesis Dra. Roxana Verdini y Dra. Gisela Piccirilli por todas las sugerencias hechas, su amabilidad y por tomarse el tiempo para hacer las correcciones.

A mis compañeros y los profesores del laboratorio y del pasillo del primer piso por toda su disposición a ayudarme, consejos y el tiempo que me brindaron.

A la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario por brindarme la formación y el lugar de trabajo. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por la beca de finalización otorgada que me permitió terminar con la tesis. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el financiamiento para la realización del trabajo.

A mis amigos de: la FBIOyF, Rosario, Santa Cruz y los diferentes lugares del mundo que pude conocer (Argentina, Alemania, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Cuba, Egipto, España, Estados Unidos, Francia, India, Irán, Italia, México, Nigeria, Perú, Portugal, Puerto Rico, Serbia, Ucrania, Venezuela) a lo largo del camino en cursos y congresos, y que formaron parte de este proceso de aprendizaje científico y personal. Cada uno me ayudo a crecer y aprender distintas cosas, además de que a pesar de las diferencias de idioma, cultura o estereotipos, nos reímos, padecemos y creemos en un mundo mejor de la misma manera.

“La ciencia no sabe de países, porque el conocimiento le pertenece a la humanidad y es la antorcha que ilumina el mundo. La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de todo progreso.”

– Louis Pasteur

ARTÍCULO CIENTÍFICO PUBLICADO

Durante el período de desarrollo de esta tesis doctoral, se publicó el siguiente artículo científico:

- “A combined experimental and molecular simulation study of factors influencing interaction of quinoa proteins – carrageenan”. Natalia Montellano Duran, Darío Spelzini, Natael Wayllace, Valeria Boeris, Fernando Luis Barroso da Silva. International Journal of Biological Macromolecules. Septiembre, 2017.

ESTADÍAS EN EL EXTERIOR

Algunos de los resultados presentados en esta tesis han sido obtenidos durante una estadía en el exterior en el marco de proyectos de cooperación:

- Pasantía “Simulación de sistemas proteína – polímero por el método de Monte Carlo” en la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de São Pablo – Ribeirão Preto, Brasil bajo la dirección del Prof. Dr. Luis Fernando Barroso da Silva. Período Septiembre de 2015.

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

- 10/2017 Proteínas de quinoa y chía; aislamiento y evaluación de sus propiedades. XI Jornada de Ciencia y Tecnología 2017 – SCyT. Rosario.
- 10/2017 Producción de peptidasas de *Aspergillus niger* y su aplicación en la hidrólisis de proteínas vegetales. XI Jornada de Ciencia y Tecnología 2017 – SCyT. Rosario.
- 09/2017 Microestructura de geles ácidos de proteínas de quinoa y carragenano. XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos 2017, Mar del Plata.
- 05/2017 Interacción entre las proteínas de la semilla de quinoa y quitosano. Estudios experimentales y computacionales. XX Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica 2017, Villa Carlos Paz.
- 04/2017 Caracterización fisicoquímica de aislados de proteínas vegetales. Feria Internacional de la Alimentación - Rosario.
- 03/2017 Interaction of quinoa protein and carrageenan. Experiment and computational simulation. Curso: School on Biological Soft Matter: from molecular interactions to engineered materials. International Centre for Theoretical Physics, South American Institute for Fundamental Research. Sao Paulo, Brasil.
- 11/2016 Interaction of quinoa protein and carrageenan. Experiment and Computational Simulation. Simposio: “Frontiers in Physical Sciences” Symposium. International Center for Advanced Studies and the Max Planck Liarson Office for Latin America, in cooperation with the Kolleg Programme of the Alexander von Humboldt Foundation. Buenos Aires.
- 11/2016 Determinación de las condiciones apropiadas para la obtención de geles de proteínas de quinoa y carragenano. VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Córdoba.
- 11/2016 Estudio de la agregación de proteínas de quinoa por tratamiento térmico y acidificación. VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Córdoba.

- 05/2015 Caracterización fisicoquímica de la interacción entre proteínas de quinua y carragenano. XIX Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Buenos Aires.
- 03/2015 Quinoa proteins: physicochemical properties and their interaction with polyelectrolytes. Onuchic Minicourse on Energy Landscapes in Biophysics & Minischool on Biophysics of Protein Interactions. Curso: School on Biological Soft Matter: from molecular interactions to engineered materials – International Centre for Theoretical Physics, South American Institute for Fundamental Research. Sao Paulo, Brasil.
- 11/2014 Estudios preliminares de la solubilidad de proteínas de quinua. XVI Congreso de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario.

PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- 01/2015–12/2018 Aprovechamiento de subproductos lácteos y frutihortícolas y valorización de recursos autóctonos para la producción de alimentos funcionales, promoviendo el desarrollo de zonas económicamente vulnerables (LACFUN). Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED). Código: 415RT0495. Directora de grupo de investigación: Patricia Risso. Directora de proyecto: María del Pilar Buera.
- 01/2015–12/2016 Obtención y modificación de proteínas de quinua y chía. Secretaría de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Rosario. Código: 1BIO430. Directora: Valeria Boeris.
- 06/2014–06/2016 Coacervación e hidrólisis de proteínas vegetales. Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica. Agencia de promoción científica y tecnológica. Código: PICT-2014-1571. Directora: Valeria Boeris.
- 01/2014–12/2015 Incompatibilidad termodinámica entre polisacáridos y proteínas en sistemas alimentarios. Secretaría de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Rosario. Directora: Valeria Boeris. Código: 1BIO385

BECAS ACADÉMICAS

05/2017	Beca para asistencia al congreso de la AAIFQ.
03/2017	Beca de asistencia y estadía para el curso School on Biological Soft Matter: from molecular interactions to engineered materials de ICTP-SAIFR.
11/2016	Beca de asistencia y estadía en el Frontiers in Physical Sciences de CELFI.
04/2016	Beca de finalización del doctorado por CONICET.
05/2015	Beca para asistencia al congreso de la AAIFQ.
03/2015	Beca de asistencia y estadía en el Minischool on Biophysics of Protein Interactions de ICTP-SAIFR.

ÍNDICE

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
ARTÍCULO CIENTÍFICO PUBLICADO	V
ESTADÍAS EN EL EXTERIOR	V
PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS	VI
PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN	VIII
BECAS ACADÉMICAS	IX
ÍNDICE.....	X
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	XIV
RESUMEN	XIX
ABSTRACT	XX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>PROTEÍNAS</i>	1
1.1.1. PROTEÍNAS ALIMENTARIAS	1
1.1.2. PROTEÍNAS VEGETALES	2
1.1.3. IMPORTANCIA DE LAS PROTEÍNAS Y LOS PÉPTIDOS EN LA TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS.....	3
1.1.4. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS.....	4
1.2. <i>QUINOA</i>	9
1.2.1. RELEVANCIA DE LAS PROTEÍNAS DE QUINOA	10
1.2.2. COMPOSICIÓN DE LA SEMILLA	10
1.2.3. OTROS COMPONENTES DE LA SEMILLA DE QUINOA	13
1.2.4. OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS PROTEICOS.....	13

1.2.5. OBTENCIÓN DE LA HARINA DE QUINOA DESGRASADA	13
1.2.6. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO DE PROTEÍNAS DE QUINOA	14
1.3. <i>HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS</i>	15
1.3.1. PEPTIDASAS MICROBIANAS	16
1.4. <i>POLISACÁRIDOS</i>	17
1.4.1. CARRAGENANO	17
1.4.2. ALGINATO	17
1.4.3. CARBOXIMETILCELULOSA	17
1.4.4. QUITOSANO	18
1.5. <i>INTERACCIÓN PROTEÍNA – POLISACÁRIDO</i>	18
1.6. <i>SIMULACIÓN COMPUTACIONAL</i>	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. <i>Objetivo general</i>	22
2.2. <i>Objetivos parciales</i>	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. <i>MATERIALES</i>	23
3.1.1. Harina de quinoa	23
3.1.2. Microorganismo	23
3.1.3. Polisacáridos	23
3.1.4. Otros reactivos	23
3.2. <i>MÉTODOS EXPERIMENTALES</i>	23
3.2.1. Solubilidad en distintos medios	23
3.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida	24
3.2.3. Obtención de aislado de PQ	24
3.2.4. Diagramas de solubilidad	25
3.2.5. Microscopía de barrido confocal láser	26
3.2.6. Espectroscopía de fluorescencia	26
3.2.7. Dicroísmo circular	26
3.2.8. Potencial ζ y diámetro hidrodinámico	26
3.2.9. Obtención de proteasa de <i>A. niger</i> por fermentación en estado sólido ..	27

3.2.10.	Temperatura y pH óptimos de hidrólisis y rango de estabilidad.....	29
3.2.11.	Obtención de hidrolizados de PQ	29
3.2.12.	Grado de hidrólisis	30
3.2.13.	Hidrofobicidad superficial.....	30
3.2.14.	Solubilidad de los HPQ.....	31
3.2.15.	Actividad antioxidante.....	31
3.2.16.	Titulaciones de PQ con PS.....	32
3.2.17.	Tratamiento térmico de las PQ	32
3.2.18.	Cinética de agregación ácida.....	32
3.2.19.	Condiciones necesarias para la gelificación ácida.....	33
3.2.20.	Capacidad de retención de agua	34
3.2.21.	Microestructura de los geles	35
3.2.22.	Color y apariencia de los geles.....	36
3.2.23.	Propiedades de textura.....	38
3.2.24.	Determinaciones analíticas.....	38
3.2.25.	Análisis estadístico	38
3.3.	<i>MODELADO COMPUTACIONAL</i>	38
3.3.1.	Modelo de célula	40
3.3.2.	Método de Monte Carlo	41
3.3.3.	Modelo de proteína	42
3.3.4.	Interacción proteína – polímero cargado eléctricamente.....	43
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1.	<i>ESTUDIO FISICOQUÍMICO DE LAS PROTEINAS DE QUINOA</i>	45
4.1.1.	OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE AISLAMIENTO DE PQ A PARTIR DE LA HARINA	45
4.1.2.	RENDIMIENTO DEL PROCESO DE AISLAMIENTO	48
4.1.3.	MICROSCOPÍA CONFOCAL	51
4.1.4.	ESPECTRO DE FLUORESCENCIA	51
4.1.5.	DICROÍSMO CIRCULAR	53
4.1.6.	DIÁMETRO HIDRODINÁMICO	54
4.1.7.	POTENCIAL ζ	55
4.2.	<i>HIDROLIZADOS ENZIMATICOS DE QUINOA</i>	57

4.2.1. OBTENCIÓN DE LAS ENZIMAS PROTEOLITICAS.....	57
4.2.2. PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE LOS HPQ	60
4.2.2. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS HPQ.....	64
4.3. <i>INTERACCIÓN ENTRE LAS PQ Y POLIELECTROLITOS.....</i>	66
4.3.1. SOLUBILIDAD.....	66
4.3.2. TITULACIONES CON POLISACÁRIDOS	71
4.3.3. DIÁMETRO HIDRÓDINAMICO	73
4.3.4. POTENCIAL ζ	75
4.3.5. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA	76
4.3.6. HIDROFOBICIDAD SUPERFICIAL.....	77
4.3.7. SIMULACIÓN COMPUTACIONAL.....	79
4.4. <i>ESTUDIO DE LOS AGREGADOS Y GELES PROTEÍCOS DE QUINOA .</i>	94
4.4.1. SOLUBILIDAD.....	94
4.4.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO.....	95
4.4.3. AGREGACIÓN ÁCIDA	98
4.4.4. GELIFICACIÓN ÁCIDA	102
4.4.5. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA	106
4.4.6. MICROESTRUCTURA	108
4.4.7. COLOR y APARIENCIA	112
4.4.8. TEXTURA.....	114
4.4.9. RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA Y LAS PROPIEDADES DE LOS GELES DE PQ Y Cgn.....	116
5. CONCLUSIONES	118
6. BIBLIOGRAFIA.....	121

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A	absorbancia
A(r)	energía libre de interacción
a*	componente cromático verde – rojo
AA	aminoácidos
AAO	actividad antioxidante
ABTS*	ácido 2'2-azino-bis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]
Ac	acetato
Alg	alginato
ANS	8-anilino-1-naftalensulfonato
AP	actividad proteasa
b*	componente cromático azul-amarillo
BSA	albúmina sérica bovina
c	concentración
C	capacitancia
CF	cargas fijas
Cgn	carragenano
CH	carbohidratos
Ch	chenopodina
ChDM	chenopodina construída por dinámica molecular
ChM	chenopodina construída por Modeller
ChR (1-5)	chenopodina construída aleatoriamente (1-5)
CM	cargas móviles

CMC	carboximetilcelulosa
CN	cáscara de naranja
CRA	capacidad de retención de agua
Cs	cascarilla de soja
CS	quitosano
Dh	diaméto hidrodinámico
DM	dinámica molecular
DPPH [•]	radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo
e	carga elemental
EFE	extracto fúngico extracelular
EQ	fase de equilibrio
FDR	función de distribución radial
Fm	firmeza
F _{máx}	fuerza máxima
GDL	glucono- δ -lactona
GH	grado de hidrólisis
GLCM	matriz de coocurrencia de niveles de gris
HPQ	hidrolizados de proteína de quinoa
HQ	harina de quinoa
IA	índice de amarillez
IB	índice de blancura
IGA	índice de ganancia de agua
IO	índice de opacidad
k	constante de Boltzman

KS	Kirkwood-Shumaker
L*	luminosidad
l_B	distancia de Bjerrum
M	Modeller
MB	medio basal
MC	Monte Carlo
MPM	marcador de peso molecular
n	índice de refracción
N	número de Avogadro
N _c	número de contraiones
N _{mov}	número total de partículas móviles
N _p	número de partículas
N _s	número de monómeros
P	peso de las muestras
ρ	coeficiente de Pearson
p	probabilidad asociada
P(1-3)	fase de producción (1-3)
P(r)	probabilidad de distribución
PA	peptidasa de <i>Aspergillus niger</i>
PC	polímero cargado eléctricamente
PCMN	polímero con media carga negativa
PCMP	polímero con media carga positiva
PCN	polímero de carga unitaria negativa
PCP	polímero de carga unitaria positiva

Pi	fosfato
pI	punto isoeléctrico
PM	peso molecular
PQ	proteínas de quinoa
PQTT	proteínas de quinoa tratadas térmicamente
PS	polisacárido/s
PV	proteínas vegetales
Q	factor de disociación promedio
r	distancia
R	relación másica entre glucono- δ -lactona y proteínas de quinoa
R(1-3)	rango de pH 1/2/3 definido experimentalmente
R(1-3)S	rango de pH 1/2/3 de la simulación
Ra	radio de un átomo de la proteína
Rc	radio del espacio de la simulación
So	hidrofobicidad superficial
SMA	segundo momento angular
SN	sobrenadante
SS	sustrato sólido
T	temperatura absoluta
TA	tamaño de agregado
TNBS	ácido trinitrobencenosulfónico
TP	tamaño de poro
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
TT	tratamiento térmico

U	energía total del sistema
$u(r)$	potencial de interacción
u^{enlace}	potencial de enlace
$w(r)$	potencial de fuerza máxima
Z	carga
β	parámetro relacionado con el tamaño
ϵ_r	constante dieléctrica relativa
ϵ_0	permitividad en el vacío
κ	constante de Debye
τ	turbidez

RESUMEN

La quinoa es un alimento que está siendo revalorizado en los últimos años. En este trabajo de tesis se estudiaron las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas de quinoa (PQ) a partir de un aislado proteico obtenido desde la harina desgrasada comercial. Las PQ obtenidas mantuvieron parte de su estructura nativa y resultaron solubles a pH alcalinos. Se optimizó el uso de una peptidasa de *Aspergillus niger* para la hidrólisis de las PQ y se encontró que los péptidos producidos presentaron moderada actividad antioxidante. Se estudió la interacción de las PQ con polisacáridos (PS) alimentarios (ι -carragenano, alginato, carboximetilcelulosa y quitosano) en forma experimental y mediante simulación por Monte Carlo. Las interacciones asociativas de las PQ con los cuatro PS ensayados se atribuyeron principalmente a fuerzas electrostáticas y en menor medida a interacciones hidrofóbicas. Se estudió el cambio en las propiedades funcionales de solubilidad, agregación y gelificación que se producen en las PQ al interactuar con el ι -carragenano (Cgn). Se encontró que el Cgn modifica la solubilidad de las PQ según el rango de pH y también la agregación ácida de las PQ tratadas térmicamente. Se determinó que la presencia de Cgn favorece la formación de geles ácidos de PQ pero se requiere de mayor acidez del medio. Se determinó la capacidad de retención de agua, textura, microestructura, color y apariencia de los geles de PQ y Cgn obtenidos. Se concluyó que las características de los geles resultan de la competencia entre la interacción PQ – Cgn y la interacción PQ – PQ.

ABSTRACT

Quinoa is a grain that in recent years is being revalued. In this thesis work, the physicochemical and functional properties of quinoa proteins (QP) of a protein isolate obtained from commercial defatted flour were studied. The obtained QP partially retained their native structure and were soluble at alkaline pH. The use of a peptidase from *Aspergillus niger* for the hydrolysis of QP was optimized, and the produced peptides were found to have moderate antioxidant activity. The interaction of QP with edible polysaccharides (PS) (ι -carrageenan, alginate, carboxymethylcellulose and chitosan) was studied experimentally and by Monte Carlo simulation. The associative interactions between QP and the four PS tested were attributed mainly to electrostatic forces and to a minor degree to hydrophobic interactions. The change in the functional properties of solubility, aggregation and gelation of QP when they interact with ι -carrageenan (Cgn) was studied. It was found that Cgn modifies the solubility of QP according to the pH range and also the acid aggregation of the thermally treated QP. It was determined that the presence of Cgn is advantageous for the formation of acidic QP gels although higher acidity of the medium is required. The water holding capacity, texture, microstructure, color and appearance of the obtained QP and Cgn gels were determined. It was concluded that the characteristics of the gels result from the competition between the QP – Cgn interaction and the QP – QP interaction.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PROTEÍNAS

En la ciencia y tecnología de los alimentos, las proteínas son un tema de interés ya que constituyen una fuente de nutrientes esenciales para el metabolismo humano y animal ¹. Son macromoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos (AA) y son fundamentales en cuanto a su estructura y función ². En general se clasifican según su composición química y solubilidad, como se muestra en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1: Clasificación de las proteínas según su solubilidad ^{3,4}.

Simples	Escleroproteínas		Esencialmente insolubles, fibrosas, con un grado de cristalinidad relativamente alto. Resistentes a la acción de muchas peptidasas y desempeñan funciones estructurales en el reino animal.
	Esfero proteínas	Albúminas	Solubles en agua y soluciones salinas diluídas.
		Globulinas	Solubles en soluciones salinas.
		Glutelinas	Solubles en medios ácidos, básicos o soluciones de agentes disociantes.
		Prolaminas	Solubles en etanol al 50% - 80%.
	Histonas	Solubles en medios ácidos.	
Conjugadas			Su hidrólisis produce AA y otras sustancias no proteicas.

1.1.1. PROTEÍNAS ALIMENTARIAS

Las proteínas alimentarias son proteínas fácilmente digeribles, no tóxicas, nutricionalmente apropiadas, útiles en los alimentos y disponibles en abundancia ⁵. El factor fundamental que determina las necesidades proteicas de un organismo es la provisión de los AA que ese organismo es incapaz de producir por sí mismo. Para el ser humano hay ocho AA indispensables: valina, leucina, isoleucina, fenilalanina,

triptófano, metionina, treonina, lisina; y son nueve si se incluye a la histidina que es indispensable en la infancia. Entre ellos, suele ser la metionina la que tiene mayores dificultades para satisfacer las cantidades requeridas por las necesidades dietéticas diarias ⁶.

Se han determinado los requerimientos normales de cada AA indispensable en el ser humano y se han propuesto las cantidades relativas de cada uno de ellos que tendría que contener una proteína para ser considerada “ideal” en términos nutricionales. Estas cantidades calculadas son muy similares a las encontradas en las proteínas de huevo de gallina o de la leche de vaca ⁷. La calidad de una proteína no sólo depende del contenido de AA indispensables sino también de su digestibilidad, y, en general, de su capacidad de promover el crecimiento corporal de los animales o del ser humano. Los alimentos de origen animal contienen una mayor cantidad de proteína digerible que los de origen vegetal ⁸. Entre los alimentos que aportan proteínas de alta calidad nutricional se encuentran la leche, la carne vacuna, el pescado y el huevo (contenido proteico: 20 – 23; 15 – 20 y 13,5%, respectivamente). En la actualidad se reconoce que los productos cárnicos aportan a la dieta humana proteínas caracterizadas por dos rasgos de interés nutricional: una excelente digestibilidad y un aporte equilibrado de los AA indispensables. No obstante, pueden observarse algunas diferencias cuando se comparan diversas especies, animales que difieren en edad o alimentación ⁹.

Por otro lado, las proteínas vegetales (PV) son una buena fuente de proteína para la mayoría de la población mundial, siendo consumidas en cantidades relativamente grandes en las zonas rurales ¹⁰. Sin embargo, los requerimientos proteicos no suelen ser satisfechos por las leguminosas, ya que en su mayoría son deficientes en AA azufrados, como por ejemplo la soja ¹¹.

1.1.2. PROTEÍNAS VEGETALES

Las PV constituyen una fuente de nutrientes e ingredientes funcionales de interés por su variedad, disponibilidad y costo ¹². Se obtienen principalmente de semillas de leguminosas, cereales, oleaginosas y en baja proporción, de hojas verdes¹³. El contenido proteico de distintas fuentes proteicas vegetales se muestra en la Tabla 1.2. Las posibilidades de aprovechamiento en la industria alimentaria dependen tanto de su resistencia al procesamiento como de la presencia de compuestos antinutricionales en la fuente vegetal de interés. El grupo proteínico

preponderante varía de acuerdo al grupo de plantas del que se trate: en el caso de los cereales dominan las glutelinas; en las leguminosas y en los pseudocereales, las globulinas ¹⁴. El valor comercial de las PV puede incrementarse al obtener y explotar componentes con composición y funcionalidad modificada, rubro en el que han adquirido gran importancia los aislados proteicos de diferentes fuentes ⁵.

Tabla 1.2: Contenido de proteínas de las principales fuentes vegetales expresado como g de proteínas en 100 g de muestra seca ⁵.

Cereales	Proteína total	Leguminosas	Proteína total
Cebada	8,2-11,6	Garbanzo	20,0-28,0
Maíz	7,2-9,4	Haba	20,0-30,0
Mijo	10,0-11,0	Lenteja	23,0-29,0
Avena	12,1-14,2	Frijol	19,0-21,0
Arroz	7,5-9,0	Arveja	21,0-28,0
Sorgo	9,0-15,0	Maní	25,0-28,0
Trigo	11,0-14,0	Soja	32,0-42,0
Pseudocereales		Oleaginosas	
Amaranto	13,2-18,2	Algodón	17,0-21,0
Trigo sarraceno	13,8	Colza	20,0-25,0
Quinoa	12,0-20,0	Ajonjolí	25,0

1.1.3. IMPORTANCIA DE LAS PROTEÍNAS Y LOS PÉPTIDOS EN LA TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Hace algunos años se empezó a reconocer a las proteínas alimentarias no sólo por su capacidad nutricional, sino también por su importancia en la tecnología de los alimentos. Es por esto que surge el interés por desarrollar nuevas metodologías para su producción y procesamiento ¹².

Para la obtención de alimentos con mayor contenido proteico se obtienen los denominados aislados proteicos, que constituyen un purificado proteico a partir del alimento o fuente orgánica inicial. De esta manera, se ha llegado a obtener un macronutriente purificado con rol nutricional en la alimentación, y con un papel

funcional en la elaboración tecnológica e industrial de alimentos. Se considera aislado proteico aquel cuyo contenido de proteínas es mayor al 70% y en el cual las proteínas constituyentes deben ser exactamente las que se encontraban en la fuente orgánica inicial, sin haber sufrido procesos de degradación o hidrólisis ¹.

Los aislados proteicos pueden ser utilizados en la elaboración de diferentes productos en la industria alimentaria, tales como productos horneados, en la elaboración de bebidas para deportistas, en embutidos, en la preparación de alimentos para bebés, entre otros ¹⁵. Los aislados proteicos se usan como aditivos para mejorar el perfil de AA e incrementar el contenido de proteínas, pero también para aportar beneficios funcionales como emulsificación, estabilización e incremento de viscosidad, mejoramiento de la apariencia, del gusto, la textura y la absorción de agua o aceite ¹⁶.

1.1.4. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS

Las propiedades funcionales son aquellas propiedades no nutricionales que son capaces de impartir una característica tecnológica específica deseable a un producto alimenticio. Las propiedades funcionales de las proteínas pueden clasificarse en tres grupos principales de acuerdo a la interacción de las moléculas proteicas entre sí o con el solvente ¹:

Propiedades de solvatación: dependientes de las interacciones proteína – solvente.

Propiedades texturales: dependientes de las interacciones proteína – proteína.

Propiedades superficiales: dependientes de las interacciones proteína – interfases.

Estas propiedades dependen fundamentalmente de factores intrínsecos propios de las proteínas (conformación, relación y disposición de los AA, hidrofobicidad, carga eléctrica, peso molecular, etc.), así como de factores extrínsecos del medio, y que en ocasiones pueden modificarse (pH, fuerza iónica, temperatura, actividad acuosa, constante dieléctrica, etc.) ¹⁷. La conformación de las proteínas afecta la funcionalidad de las mismas: en una proteína globular los AA ionizables están en la superficie, lo que facilita la hidratación y solubilidad; las proteínas que se despliegan más fácilmente en interfases lipídicoacuosa tienen buenas propiedades emulsificantes ya que se exponen los AA hidrofóbicos ¹⁸.

El estudio de las propiedades funcionales de las proteínas es importante para determinar los usos que pueden darse a las mismas y a sus aislados proteicos en la

industria alimentaria, para que éstos impartan características deseadas a los alimentos.

1.1.4.1. Agregación de proteínas

Una de las propiedades texturales de las proteínas es la agregación, que se debe a la interacción proteína – proteína ¹⁹. La agregación de proteínas globulares puede ser el resultado de uniones covalentes, interacciones electrostáticas, enlaces de hidrogeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals ²⁰⁻²³. Para la formación de agregados influyen la preparación de la solución proteica, su concentración, la velocidad, la temperatura y duración del calentamiento, las condiciones de enfriamiento y la presencia de cosolutos (PS, sales, tioles, sulfitos, y/o lípidos) ²⁴. En la literatura se han estudiado agregados de proteínas de interés en la industria alimentaria como las proteínas de soja o las de la leche. Las proteínas de soja en dispersión forman agregados luego de calentarse y enfriarse, previa desalinización y tratamiento alcalino ²⁵. Las proteínas del suero de la leche, como la β -lactoglobulina, pueden agregarse entre ellas o con polisacáridos (PS) de interés comercial ^{24,26}.

1.1.4.2. Gelificación de proteínas

La gelificación es una manera de convertir un fluido en un sólido y ha sido usada desde la antigüedad para producir una variedad de alimentos con texturas distintas. La gelificación de proteínas es una agregación de moléculas desnaturalizadas con un cierto grado de orden, resultando en la formación de una matriz continua. Ésta consta básicamente de un proceso de dos pasos: desnaturalización y agregación ^{27,28}. La gelificación es una de las propiedades funcionales más utilizadas e importantes de las proteínas para las ciencias de los alimentos, farmacéuticas y de los materiales. En la industria alimentaria se utilizan los geles tanto en alimentos dulces (por ejemplo: gelatina) como salados (por ejemplo: queso) ²⁹.

El proceso de gelificación normalmente involucra muchos estados intermedios incluyendo cambios conformacionales de las proteínas, su agregación, y la formación de una matriz de gel tridimensional a partir de la interacción de agregados poliméricos previamente formados. La gelificación, al contrario de la coagulación (agregación aleatoria), tiene una reasociación más ordenada de los polipéptidos desplegados ³⁰.

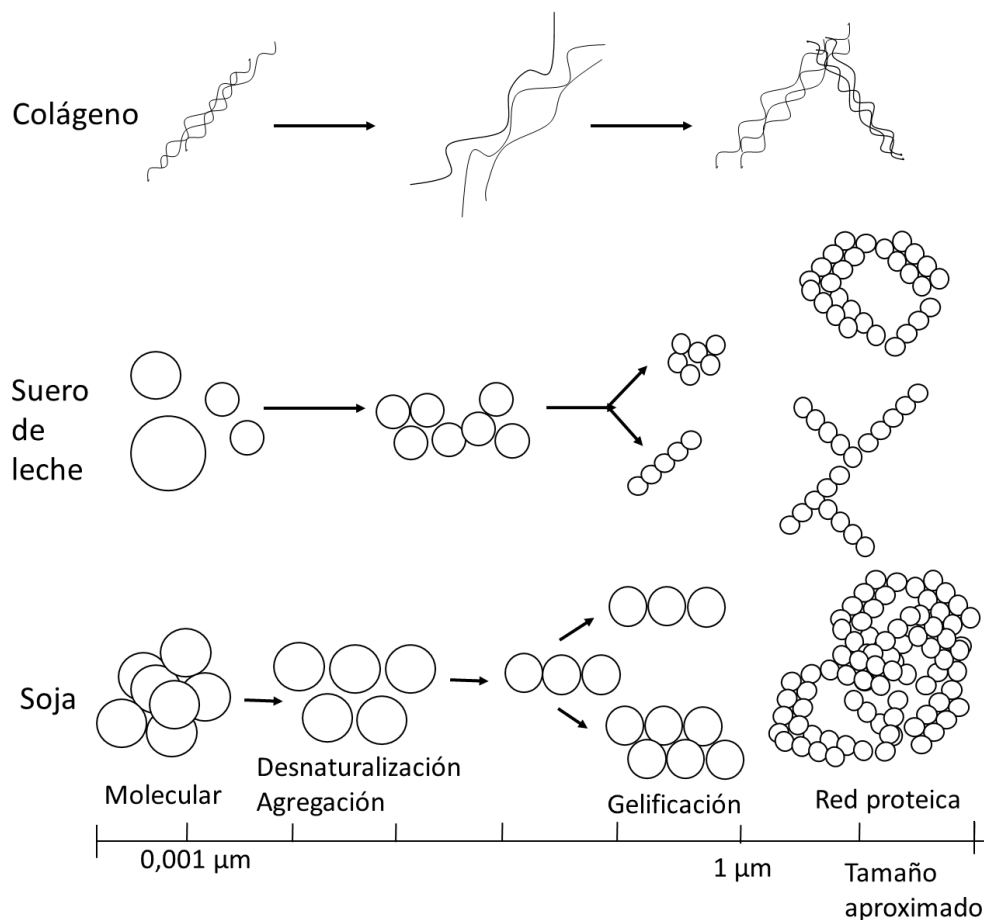


Figura 1.1: Elementos estructurales que se forman durante la gelificación de diferentes proteínas (la escala es sólo referencial) ³¹.

Macroscópicamente, un gel está definido como una sustancia que resiste a la deformación cuando se le aplica una fuerza tractiva. El gel es capaz de reestablecer algo de la energía que se le aplica para la deformación ³². Microscópicamente los geles se distinguen de otros biomateriales por: a) una estructura continua de material interconectado (moléculas o agregados); b) la presencia de algunos puntos de restricción dentro de la estructura que mantiene las cadenas juntas evitando que fluya; y c) una mayor proporción de fase líquida que se encuentra dispersa en la estructura polimérica¹².

Las propiedades de un gel dependerán de la microestructura a partir de la cual se construye. En la Figura 1.1 se muestra el mecanismo de formación de geles a partir de partículas fibrilares o esféricas ¹².

Dependiendo de las condiciones del medio, las proteínas globulares tenderán a agregarse en forma de microgeles o hebras, dando lugar a geles particulados o fibrilares, respectivamente. En general, si la agregación es inespecífica, debido al movimiento browniano, se obtienen geles opacos; por el contrario, si la agregación se da a través de sitios específicos se obtienen geles translucidos ²⁴.

1.1.4.3. Métodos de gelificación de proteínas

En la Tabla 1.3 se muestran los métodos físicos y químicos que pueden inducir la formación de geles de proteínas.

Tabla 1.3: Métodos de formación de geles proteicos ³².

Físicos	Calor
	Alta presión
Químicos	Iónico
	Ácido
	Enzimático

La gelificación inducida por calentamiento es probablemente el método más importante y común para obtener geles en el procesamiento de muchos alimentos. Es un proceso de dos pasos: primeramente hay un despliegue o disociación de la proteína debido a que el tratamiento térmico favorece la exposición de los sitios reactivos de la molécula; el segundo paso es la asociación de las moléculas desplegadas, generando agregados de mayor peso molecular. La gelificación ocurre si la concentración de la proteína está por encima de un valor crítico, si al menos una parte de la proteína ha sido desnaturizada por el calentamiento y si las condiciones ambientales son adecuadas. El primer paso puede ser reversible, el segundo por lo general no lo es. Los enlaces involucrados en la estructura del gel son de muchas naturalezas, aunque los puentes disulfuro e interacciones hidrofóbicas son los que suelen predominar en este tipo de geles ³².

Los tratamientos de alta presión producen la desnaturización parcial de las proteínas, permitiendo su gelificación. Estos tratamientos pueden combinarse con otros (generalmente con tratamientos térmicos). Las presiones elevadas producen,

además, cambios en la fuerza iónica y pH del solvente debido a que alteran las propiedades del agua y por lo tanto la solvatación de las proteínas ³³.

El aumento de la fuerza iónica en las soluciones de proteína produce el apantallamiento de las cargas de las mismas que puede dar lugar a la gelificación, como resultado de una reducción o neutralización de las fuerzas electrostáticas repulsivas. Además, los cationes divalentes como el calcio pueden promover la agregación de proteínas a pH por encima de su punto isoelectrico (pI) por la formación de puentes intermoleculares de calcio. La gelificación inducida por iones, en contraste con la gelificación inducida por calentamiento, suele denominarse gelificación fría ^{34,35}. El proceso de dos pasos comienza con el desplegamiento de las proteínas globulares en solución a baja fuerza iónica por calentamiento, presión o un proceso enzimático que lleva a la formación de agregados. En un segundo paso los geles son formados por la adición de sal, para favorecer la interacción entre los agregados.

La gelificación inducida por enzimas está basada en la introducción de uniones covalentes artificiales en las proteínas alimentarias. Las reacciones catalizadas por la transglutaminasa, peroxidasa y polifenol oxidasa son útiles para entamar las proteínas. Las características del gel dependen de la concentración de la enzima, el tiempo de incubación y el tipo y concentración de las proteínas ¹².

La gelificación ácida se da como resultado de la acidificación de una solución de proteínas. Esto puede lograrse por la adición de ácidos o debido a la fermentación microbiana. El descenso de pH modifica la carga neta de la proteína y altera las interacciones entre las moléculas de proteína entre sí y con el solvente. La carga neta de la proteína en su pI es cero y por lo tanto, las fuerzas repulsivas son mínimas, lo que favorece las interacciones hidrofóbicas y la agregación de las moléculas. Por el contrario, cuando el pH se aleja del pI, la repulsión electrostática evita la formación de geles.

El mecanismo de la formación de geles ácidos puede explicarse mediante la teoría de agregación fractal que considera que las partículas esféricas de un radio determinado pueden moverse por movimiento browniano y se agregan cuando colisionan. Estos agregados pueden agruparse entre sí, generando racimos fractales que constituyen las unidades formadoras de los geles ³⁶.

1.1.4.3.1. *Sistemas mixtos (proteína – polisacárido)*

Cuando un alimento incluye más de un hidrocoloide, las características de textura, reológicas o sensoriales del sistema pueden resultar una combinación de las propiedades de cada hidrocoloide o pueden ser diferentes a las que otorga cada uno de ellos individualmente. Un gel formado por dos hidrocoloides puede ser el resultado de la sinergia entre ambos. Puede haber formación de enlaces covalentes entre los polímeros; sin embargo, no es lo más común en alimentos. Pueden existir interacciones atractivas entre polímeros de cargas opuestas, que puede resultar tanto en un precipitado o en la formación de geles mixtos. La interacción también puede ser desfavorable y dar como resultado una exclusión mutua en donde los polímeros se separan en dos fases, que en ocasiones pueden dar lugar a geles multitexturados ³⁷.

La desnaturalización de proteínas globulares involucra un despliegue de las cadenas polipeptídicas y un incremento del volumen excluido de la molécula. La presencia de un PS incompatible en la solución altera el equilibrio entre las proteínas nativas y desnaturalizadas hacia la forma nativa más compacta, aumentando la estabilidad conformacional. Por otro lado, la presencia de un PS incompatible incrementa la actividad termodinámica de la proteína en una solución, intensificando la agregación de moléculas desnaturalizadas, inhibiendo la renaturalización y promoviendo la gelificación ³⁸.

1.2. QUINOA

En la búsqueda de nuevas fuentes de PV que pudieran ser útiles para solucionar en parte el déficit proteico – calórico, en los años '60 se inició el estudio de un pseudocereal denominado quinua, quinoa o quingua. Desde tiempos ancestrales la quinoa se cultiva en la región del altiplano andino de América del Sur. En la actualidad, las mayores áreas productivas corresponden a Perú y Bolivia, aunque también se produce en Colombia, Argentina, Chile y Ecuador ³⁹.

La quinoa es una planta de la familia *Chenopodiaceae*, género *Chenopodium*, sección *Chenopodia* y subsección *Cellulata* ⁴⁰. Es una planta anual herbácea que alcanza alturas entre uno y dos metros; y que presenta acumulaciones de pequeñas semillas en panojas, ubicadas en los extremos superiores de las ramificaciones. Las semillas son pequeñas, alrededor de 1,5 mm de diámetro, aunque en algunas variedades llegan hasta 4 mm ⁴¹.

1.2.1. RELEVANCIA DE LAS PROTEÍNAS DE QUINOA

En la actualidad se están revalorizando las proteínas de fuentes vegetales debido al aumento de la popularidad de las dietas vegetarianas y a una creciente conciencia sociopolítica de comida “saludable”, donde se necesita suplementar AA sin consumir proteínas animales, dado que los consumidores conocen su valor nutritivo y su importancia en la alimentación ¹⁴.

La quinoa tiene muchos beneficios nutricionales y una gran versatilidad agronómica, lo que permite su expansión en distintos ecosistemas y representa un cultivo con alto potencial para contribuir a la seguridad alimentaria de diversas regiones del planeta. Para algunas poblaciones incluir proteínas de alta calidad nutritiva en sus dietas constituye un problema, especialmente en aquellos países donde la población no tiene acceso a fuentes de proteína de origen animal o donde las condiciones de producción son limitadas por la escasa humedad, la baja disponibilidad de insumos y la aridez. En dichas condiciones se deben obtener proteínas de cereales, leguminosas y otros granos. Aún cuando el aporte energético de estos alimentos es adecuado, las concentraciones insuficientes de AA indispensables pueden contribuir a aumentar la prevalencia de desnutrición. La quinoa contiene un porcentaje relativamente elevado de proteínas, pero su mayor importancia radica en su excelente balance de AA. Además, contiene oligoelementos y vitaminas ⁴².

Por otro lado, actualmente existe un aumento en el diagnóstico de la intolerancia al gluten en la dieta (enfermedad celiaca), por lo cual no todas las PV son aptas para el consumo masivo ⁴¹. La quinoa no contiene gluten, ni alérgenos conocidos y el mayor antinutriente que contiene, las saponinas, puede ser fácilmente eliminado mediante lavados ⁴³.

El año 2013 fue declarado el Año Internacional de la Quinoa por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura en donde se destacaron sus cualidades nutricionales, su adaptación a diversas condiciones de crecimiento y su potencial contribución a la lucha contra el hambre y la malnutrición mundial, destacando su alto contenido en AA indispensables ⁴⁴.

1.2.2. COMPOSICIÓN DE LA SEMILLA

En la Figura 1.2 se muestra un esquema de una semilla de quinoa donde se observa que la distribución de proteínas en la semilla no es uniforme. Las mayores

concentraciones de proteínas se encuentran en las capas más externas del endospermo, en la aleurona (gránulos proteicos en la parte externa del endospermo) y en el gérmen (embrión) de la semilla. Las prolaminas y glutelinas se encuentran localizadas principalmente en el endospermo; las albúminas y globulinas están en las cubiertas exteriores y en el gérmen ⁴⁵.

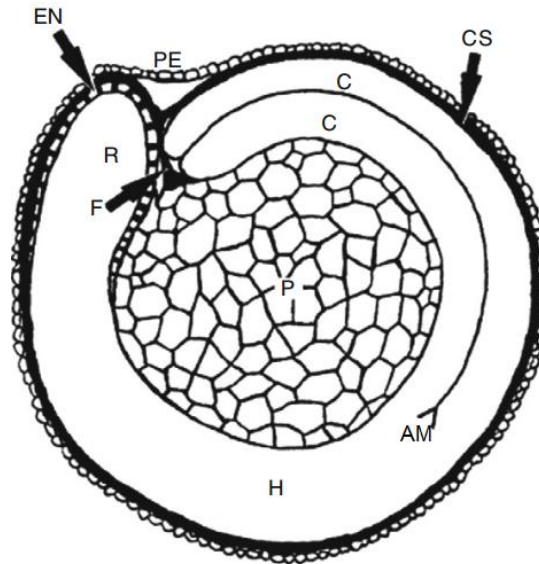


Figura 1.2: Grano de quinoa. PE: Sección de longitud media de la semilla de quinoa mostrando el pericarpio, EN: Endospermo, R: Radícula, F: Funículo, H: Hipocotíleo, AM: Ápice del meristemo, C: Cotiledones, P: Perisperma, CS: Cubierta de la semilla ⁴⁶.

La planta de quinoa tiene diferentes usos, sin embargo el producto primario es la semilla. La composición de la semilla se muestra en la Figura 1.3. La misma contiene ácidos grasos esenciales como los ácidos grasos insaturados, destacando su alto contenido de ácido linoleico (50,2-56,1%) y oleico (22,0-24,5%), y moderado de linolénico (5,4-7%) ⁴⁷. Asimismo, la quinoa posee un alto contenido de vitaminas del complejo B, C y E; y minerales tales como: hierro, fósforo, potasio y calcio ⁴⁸.

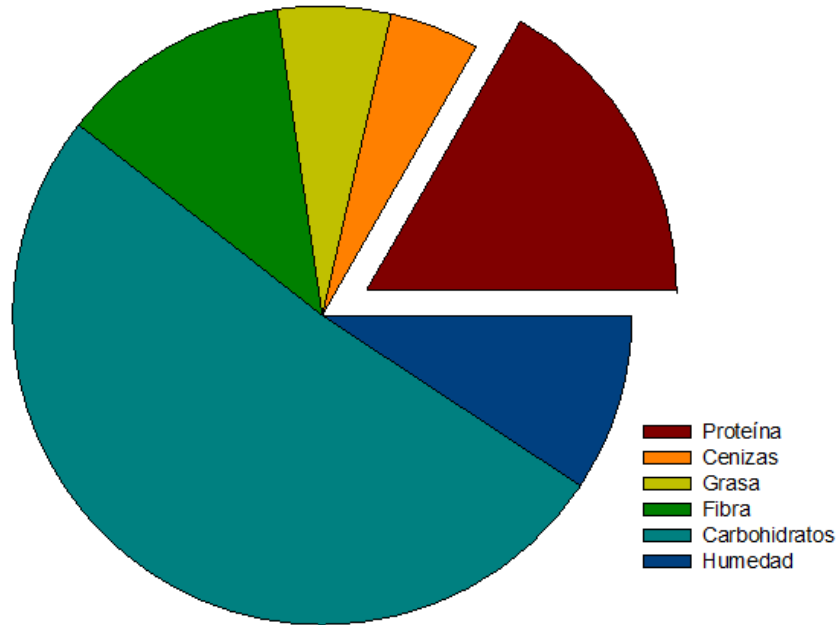


Figura 1.3: Composición porcentual de la semilla de quinoa. Humedad 9,0 %, proteína 13,0 %, grasa 7,4 %, carbohidratos 64,1 %, fibra cruda 2,7 %, cenizas 3,0 % ⁴⁹.

Como se puede apreciar en la Figura 1.4, las proteínas de quinoa (PQ) contienen elevada cantidad de ácido glutámico, ácido aspártico, isoleucina, lisina, fenilalanina, tirosina y valina.

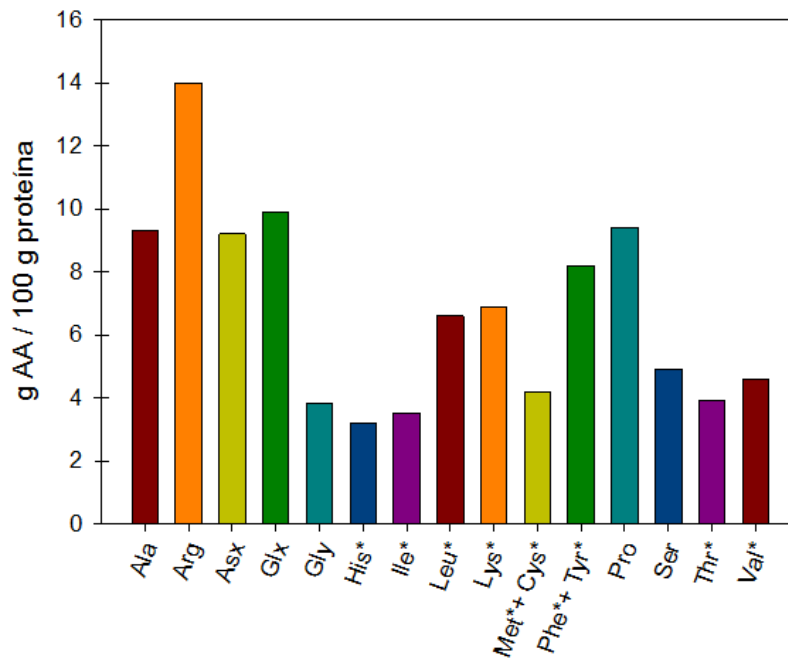


Figura 1.4: Contenido de AA de las proteínas de quinoa ⁵⁰.

La lisina es uno de los AA más escasos en los alimentos de origen vegetal, sin embargo, en la quinoa, se encuentra en una proporción que al menos duplica la contenida en los otros cereales. Ésta ha sido la principal razón para buscar reemplazar la harina de trigo con harina de quinoa (HQ) ⁵¹.

En la HQ se encuentran muy bajas cantidades de prolaminas, mientras que predominan las albúminas del tipo 2S, de peso molecular (PM) menor a 20 kDa, y globulinas 11S (chenopodina), de PM entre 31 y 33 kDa ⁵². Las albúminas están involucradas en diversas funciones biológicas, y las globulinas son proteínas de reserva ⁵³.

1.2.3. OTROS COMPONENTES DE LA SEMILLA DE QUINOA

Existen otros productos de interés provenientes de la quinoa como es el caso del aceite de quinoa, el almidón, las saponinas, colorantes de las hojas y semillas, y que son considerados con potencial económico para la industria alimentaria, química, cosmética y farmacéutica ^{41,54}.

Las saponinas son glicoalcaloides que se encuentran en el epispermo de los granos de diversas variedades comerciales de quinoa y son solubles en metanol y agua. Éstas le otorgan un sabor amargo al grano lo que no resulta agradable al consumidor. Las saponinas producen espuma estable en soluciones acuosas, bajan el nivel de colesterol y causan hemólisis en las células sanguíneas ^{39,43}.

1.2.4. OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS PROTEICOS

Se han ensayado muchos métodos para tratar de mejorar el proceso de aislamiento de PV. Se han elaborado concentrados proteicos de otras harinas de granos con altas concentraciones de proteínas como la harina de soja y amaranto, tratando a su vez optimizar los procesos de obtención de concentrados proteicos para tener un mejor rendimiento de proteínas por cantidad de harina o grano ^{55,56}.

La investigación pionera con HQ fue de Abugoch ⁵⁷, en la que se aislaron las PQ por solubilización alcalina y posterior precipitación isoiónica. Este método de aislamiento de PV se ha utilizado con otros granos como soja, amaranto ⁵⁸, trigo ⁵⁹, cebada ⁶⁰ y avena ⁶¹, entre otros.

1.2.5. OBTENCIÓN DE LA HARINA DE QUINOA DESGRASADA

La HQ desgrasada es utilizada en la industria alimentaria y se comercializa para su consumo. La HQ es una excelente contribución para la dieta por su contenido

proteico y composición aminoacídica. Sin embargo, se ha reportado que el almacenamiento de la HQ puede producir la pérdida de solubilidad de las proteínas y la disminución de la capacidad de absorción de agua de las mismas. Para evitar los cambios en estas propiedades funcionales, la HQ debe ser almacenada a temperatura entre 20 y 30°C en bolsas de papel kraft ⁶².

La HQ ha sido caracterizada por un análisis proximal y se ha visto que contiene fibra, grasas, carbohidratos y proteínas (las cuales contienen los AA indispensables) ⁶³.

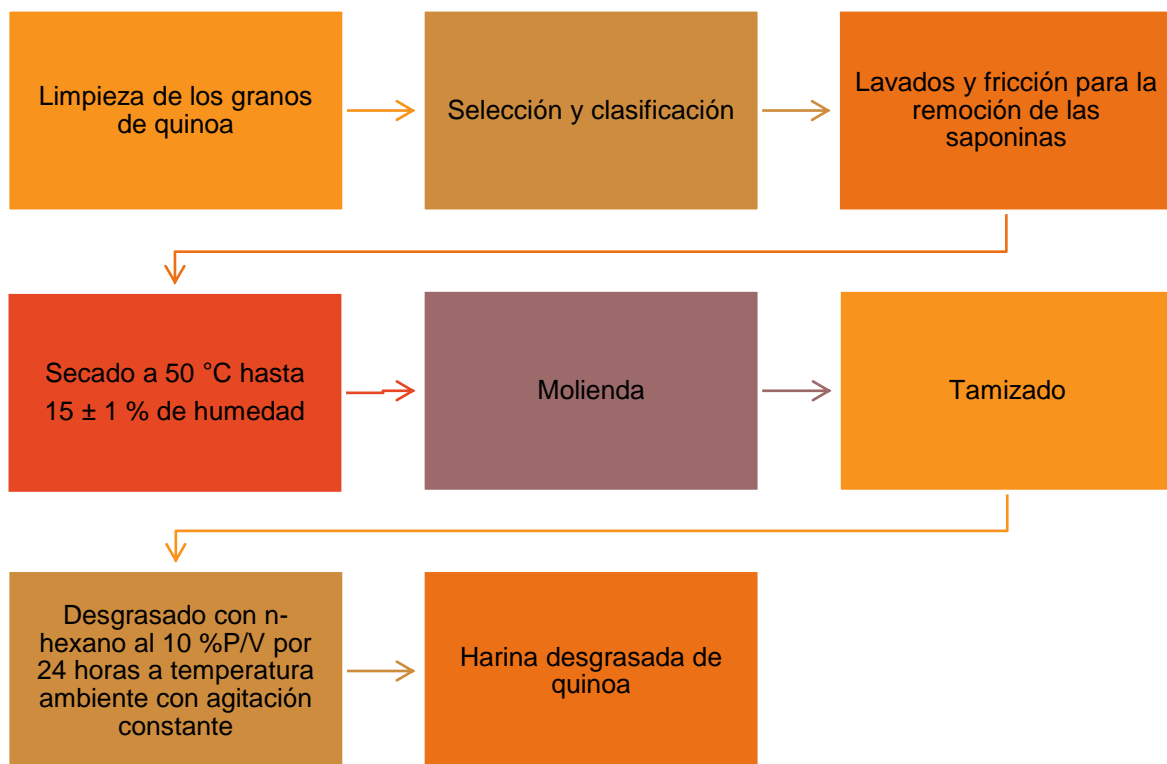


Figura 1.5: Diagrama de flujo de la obtención de la HQ desgrasada a partir de los granos ⁵⁷.

En la Figura 1.5 se esquematiza el diagrama de flujo de una de las formas de obtener la HQ desgrasada a partir de los granos crudos.

1.2.6. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO DE PROTEÍNAS DE QUINOA

Se han estudiado algunas de las propiedades funcionales de la HQ. Las capacidades espumante y estabilizante de espumas resultaron bajas. Sin embargo, las capacidades emulsificante, estabilizante de emulsiones así como la capacidad de retención de agua y de aceite resultaron apropiadas ⁴³.

La obtención de un aislado de PQ a partir de sus semillas ha sido estudiada previamente por muchos investigadores ⁶³⁻⁶⁵. El proceso consiste en dos etapas

principales: primeramente, extracción de las PQ por solubilización a pH alcalino con agitación constante; y luego, precipitación de las PQ a pH ácido, cercano a su pl.

Las PQ muestran una alta solubilidad a pH alcalinos y valores de digestibilidad mayores a otros granos como el maíz y el arroz. Su alta capacidad de retención de agua muestra potencial para la industria panificadora. Contrariamente a lo reportado para la HQ, se han observado altos valores de capacidad espumantes y estabilizantes de espuma, con valores bajos de emulsificación para las PQ ⁶³.

Se ha estudiado el efecto de la alcalinización de las PQ entre pH 8 y pH 12, concluyendo que por encima de pH 10 se producen efectos significativos en su estructura. Estos cambios promueven la formación de enlaces intra e intermoleculares que involucran enlaces disulfuro ⁶⁴.

La estructura, la solubilidad y el proceso de gelificación ácida de PQ desnaturalizada en distintas condiciones también ha sido de interés ⁶⁶, encontrándose una alta dependencia de las propiedades estructurales y funcionales de las PQ con el pH al cual se lleva a cabo el tratamiento térmico de desnaturalización. Por otra parte, se ha estudiado la agregación inducida térmicamente de PQ y se ha encontrado que la misma puede producirse tanto por formación de enlaces disulfuro como por interacciones hidrofóbicas ⁶⁷. Adicionalmente, se han caracterizado geles de PQ obtenidos por tratamiento térmico a pH por debajo de 9 ⁶⁵.

1.3. HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS

La hidrólisis de proteínas disminuye su tamaño, altera su conformación y modifica las interacciones intra e intermoleculares. La magnitud de estos cambios depende de la enzima proteolítica utilizada, las condiciones de reacción y el grado de hidrólisis (GH) alcanzado ⁶⁸. Se ha obtenido un gran número de hidrolizados y péptidos por hidrólisis enzimática a partir de fuentes vegetales, cambiando las propiedades nutricionales, bioactivas y funcionales de las proteínas, que incluyen la digestibilidad, actividades biológicas, calidad sensorial (como textura o gusto), o la reducción de los componentes alergénicos ⁶⁹.

La hidrólisis de proteínas puede producir péptidos con propiedades biológicas o fisicoquímicas distintas a las de la proteína de la que provienen. De hecho, muchas de las propiedades biológicas que se le adjudican a las proteínas se deben a la presencia de secuencias en la estructura primaria de las mismas que, mediante la hidrólisis en el sistema digestivo, da lugar a péptidos bioactivos ⁷⁰.

Los péptidos bioactivos contienen entre 3 y 20 AA, aunque en algunos casos pueden ser de mayor longitud ⁷¹. Las propiedades biológicas que se pueden presentar incluyen: opioide, unión de minerales, actividad antitrombótica, antioxidante ^{72,73}, antihipertensiva, antiinflamatoria, hipocolesterolémica ⁷², prevención de fenilcetonuria, antialérgica, prevención de enfermedades hepáticas, antifúngicas ^{74,75} y antitumorales ⁷⁶, entre otras ⁷⁷. Se han encontrado péptidos bioactivos en muchas fuentes vegetales (pseudocereales, algas, ajo, cúrcuma, tubérculos, sésamo, maní, alfalfa, espinaca, girasol, cacao, entre otros) como consecuencia de fermentación o hidrólisis enzimática ¹⁰.

La hidrólisis de las proteínas alimentarias usando proteasas modifica sus propiedades funcionales, entre lo que se destaca que si la hidrólisis es lo suficientemente extensiva se puede producir la solubilización de las proteínas antes insolubles ^{77,78}.

1.3.1. PEPTIDASAS MICROBIANAS

Muchos microorganismos son capaces de producir enzimas proteolíticas durante su crecimiento. Los períodos de fermentación pueden llevar desde un par de horas hasta muchos días, dependiendo del tipo de microorganismo ⁷⁷.

Los hongos del género *Aspergillus* constituyen algunos de los primeros organismos que fueron cultivados en medios artificiales y son de los hongos más comunes en el ambiente. Se trata de hongos filamentosos con características morfológicas distintivas ⁷⁹.

Uno de los microorganismos más utilizados en la industria biotecnológica es *Aspergillus niger* (*A. niger*). Por décadas, ha sido usado para producir ácido cítrico y muchas enzimas empleadas en alimentos. Adicionalmente, muchos productos obtenidos a partir de este hongo son considerados generalmente reconocidos como seguros por la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos ⁸⁰.

Las peptidasas son enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis en las cuales las proteínas son degradadas a péptidos y AA. Las peptidasas de hongos filamentosos del género *Aspergillus* se producen tanto en fermentaciones sumergidas como en estado sólido, siendo éste último caso el que presenta los mayores rendimientos ⁸¹. Dentro de las peptidasas que produce este hongo, se encuentran las proteasas aspárticas o ácidas, denominadas aspergillopepsinas, que se caracterizan por tener pH óptimos bajos (entre 3 y 4) ⁸². Por otra parte produce peptidasas neutras

o alcalinas ⁸³⁻⁸⁶, las cuales son generalmente serin – proteasas que se caracterizan por tener pH óptimos altos (entre 7 y 11) y por su estabilidad a altas temperaturas.

1.4. POLISACÁRIDOS

1.4.1. CARRAGENANO

El carragenano es una mezcla de varios PS que se encuentran rellenando los huecos de la celulosa en las paredes celulares de algunas algas de varias familias de *Rhodophyceae* (algas rojas). Estas algas se han utilizado desde hace 600 años para fabricar postres lácteos haciéndolas hervir para que liberen el carragenano ⁸⁷.

Los carragenanos están formados por unidades de galactosa y/o de anhidrogalactosa, sulfatadas o no, unidas por enlaces alternos α - (1 – 3) y β - (1 – 4). El PM es normalmente de 300 – 400 kDa. Los tres tipos importantes de carragenanos, designados cada uno de ellos mediante una letra griega, son: ι , iota, λ , lamda, y κ , kappa. El ι -carragenano (Cgn) tiene un pKa de 1,0 y está formado por unidades alternas de galactosa con un grupo sulfato en el C-4 y de anhidrogalactosa con un grupo sulfato en el C-2 ^{88,89}.

1.4.2. ALGINATO

El alginato (Alg) es un PS que se encuentra en gran cantidad en las algas marinas pardas (*Phaeophyceae*), representando el 30 % a 60 % de su peso (base seca). Este PS se acumula en las algas marinas en forma de “cuerpos gelatinosos” después de combinarse con las sales del agua de mar.

Compuesto por residuos alternados de ácido α -L-gulurónico y α -D-manurónico, el Alg tiene un pKa de entre 1,5 y 3,5. Entre sus aplicaciones comerciales se destaca su uso como espesante, gelificante, estabilizante de dispersiones, coagente de textura y formador de filamentos, o películas ⁹⁰.

1.4.3. CARBOXIMETILCELULOSA

La carboximetilcelulosa (CMC) es un compuesto orgánico derivado de la celulosa, compuesto por grupos carboximetil, enlazados a algunos grupos hidroxilos presentes en los polímeros de α -glucopiranososa ⁹¹. Es similar a la celulosa, pero a diferencia de ella, es soluble en agua.

La CMC (pKa=3,0) se utiliza como aditivo alimentario y tiene una variedad de funciones, como espesante, emulsificante y humectante, entre otros. La misma se ha

utilizado para sustituir algunos hidrocoloides en alimentos, como la gelatina, el agar y el Alg.

1.4.4. QUITOSANO

El quitosano (CS) se obtiene de los exoesqueletos de camarones y cangrejos, que son un deshecho abundante de la industria pesquera. Es de gran interés científico debido a las propiedades químicas que presenta. El CS está formado por residuos de α -(1-4)-D-glucosamina que es el producto de la desacetilación de la quitina ⁹².

El CS es soluble a pH ácido ya que por debajo de su pKa (~6,5), el mismo se protona y se solubiliza. El estado de carga del CS es altamente dependiente del pH y de su grado de desacetilación. El PM del CS varía entre 3,8 y 20 kDa.

1.5. INTERACCIÓN PROTEÍNA – POLISACÁRIDO

Las propiedades macroscópicas de los productos alimentarios se debe no sólo a la composición de los mismos sino también a la interacción entre sus constituyentes, resultando de particular importancia la interacción entre las especies poliméricas. Los PS suelen utilizarse como estabilizantes, gelificantes, emulsificantes y espesantes ⁹³, por lo que los mismos afectan la fluidez, la estabilidad, la textura y la consistencia de los alimentos.

Cuando se mezclan proteínas con PS en solución se pueden presentar tres situaciones distintas ⁹⁴:

Cosolubilidad: ambos biopolímeros permanecen en solución. Se genera una sola fase en la que éstas moléculas no se encontrarían interaccionando entre sí o bien se encontrarían formando complejos solubles en medio acuoso.

Incompatibilidad termodinámica: ocurre en sistemas en donde dos tipos de macromoléculas se repelen entre sí y, como consecuencia, la interacción entre ambos es segregativa. Se forman dos fases acuosas, cada una de las cuales es rica en uno de los dos biopolímeros.

Asociación (formación de complejos): ocurre cuando ambos biopolímeros se atraen electrostática o hidrofólicamente entre sí formando complejos, dando lugar a sistemas de dos fases, una de las cuales es rica en ambos biopolímeros y la otra está muy diluida.

La cosolubilidad ocurre generalmente a concentraciones bajas de ambos biopolímeros, mientras que la incompatibilidad o la formación de complejos ocurre a

concentraciones mayores, dependiendo de si la naturaleza de la interacción entre éstos es repulsiva o atractiva, respectivamente ⁹⁵.

Si bien es importante describir y controlar los mecanismos responsables de la interacción entre macromoléculas, la descripción molecular correcta resulta un desafío en muchos sistemas complejos encontrados en la práctica.

Cuando las macromoléculas están cargadas eléctricamente, es comúnmente aceptada la idea de que su interacción es gobernada mayormente por fuerzas electrostáticas. Sin embargo, considerando algunos resultados experimentales, si sólo se consideran las fuerzas electrostáticas en los fenómenos de interacción se encuentra que existen interacciones “inesperadas” entre moléculas que poseen la misma carga. Algunos autores llaman a este fenómeno que las moléculas interaccionan “en el lado opuesto” del pl ⁹⁶. Existen dos posturas respecto de este fenómeno. Por un lado, se postula la existencia de zonas, o “parches”, cargados en regiones de complementariedad de densidad de carga en la superficie. Si se piensa de esta manera, un monómero de polianión podría unirse con una región de elevada concentración de cargas positivas de otra macromolécula cargada negativamente ⁹⁷. Otros trabajos teóricos proponen un mecanismo de fluctuación de cargas de los AA en el caso de proteínas (que son una consecuencia del equilibrio ácido–base) como el responsable de las fuerzas atractivas de esta situación ⁴¹. Estos estudios tienen como base el trabajo de Kirkwood y Shumaker (KS) ⁹⁸ donde se describió analíticamente que las fluctuaciones de carga de dos AA pueden resultar en fuerzas electrostáticas atractivas.

La energía libre de interacción $A(r)$ para dos moléculas A y B, separadas una distancia r , con fuerza iónica nula, puede ser calculada en función de la carga de cada una de ellas (Z_A y Z_B), como:

$$\frac{A(r)}{kT} \approx \frac{l_B \langle Z_A \rangle \langle Z_B \rangle}{r} - \frac{l_B^2}{2r^2} (C_A C_B + C_A \langle Z_B \rangle^2 + C_B \langle Z_A \rangle^2) \quad \text{Ecuación 1.1}$$

donde C_A y C_B son las capacitancias de A y B, respectivamente, k es la constante de Boltzman, T es la temperatura absoluta y l_B es la distancia de Bjerrum definida como:

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r kT} \quad \text{Ecuación 1.2}$$

donde e es la carga elemental, ϵ_0 es la permitividad en el vacío y ϵ_r es la constante dieléctrica relativa del medio.

La capacitancia, o parámetro de regulación de cargas, es una propiedad intrínseca de cada molécula y se define como la variación de su carga con el pH:
 $C_A \approx \partial Z_A / \partial pH = \langle Z_A^2 \rangle - \langle Z_A \rangle^2$

El primer término de la ecuación 1.1 corresponde a las interacciones coulombicas, pudiendo ser negativo o positivo en función de las cargas de las moléculas A y B, resultando en interacciones atractivas o repulsivas, respectivamente. El segundo término corresponde a la regulación de cargas, es siempre negativo y se corresponde con interacciones siempre atractivas. Este término puede adquirir valores mayores que el primero, permitiendo la atracción de moléculas con cargas del mismo signo. En presencia de sal, los términos de esta expresión son multiplicados por $\exp(-\kappa R)$ y $\exp(-2\kappa R)$, respectivamente, para describir el efecto de la fuerza iónica donde κ es la constante de Debye y R es la constante de los gases ⁹⁹.

1.6. SIMULACIÓN COMPUTACIONAL

El modelado molecular y las simulaciones de Monte Carlo (MC) son herramientas de la computación y matemática que ayudan a describir el mecanismo de interacción entre proteínas y PS cargados eléctricamente. Las fuerzas que dominan las interacciones en este tipo de sistemas son coulombicas y van a depender, además de las características de las macromoléculas, del pH, concentración de sales y temperatura ²⁶.

La mecánica estadística es una herramienta que permite abordar teóricamente y explorar los puntos más importantes de la interacción de dos macromoléculas en una solución de electrolitos ¹⁰⁰ y correlaciona el comportamiento microscópico con propiedades macroscópicas. Mediante la teoría de probabilidad se puede describir el comportamiento de los sistemas físicos macroscópicos constituidos por una cantidad estadísticamente significativa de componentes equivalentes a partir de ciertas hipótesis sobre las partes que lo conforman y sus interacciones. Algunos modelos ofrecen la posibilidad de explorar hechos físicos en un sistema con una reducción importante en los parámetros. Así es como muchos modelos moleculares fueron descritos para poder estudiar la interacción entre dos macromoléculas ¹⁰¹ y fueron resueltos por simulaciones de MC ¹⁰²⁻¹⁰⁴.

Los métodos de MC son herramientas de integración numérica que se han convertido en procedimientos comunes para computar promedios termodinámicos en bioquímica teórica durante los últimos 30 años. Por medio de la generación de

números aleatorios, MC es usado para resolver expresiones matemáticas complejas por aproximación. Se puede aplicar a cualquier tipo de problema, ya sea estocástico o determinista ¹⁰⁵.

Cuando se aplican los métodos de MC a sistemas macromoleculares se obtiene una serie de configuraciones relevantes para un dado modelo físico, que puede ser usado para calcular propiedades estructurales y termodinámicas de interés ¹⁰⁶.

En la actualidad se busca cada vez más la comodidad y conformidad del consumidor. Un consumidor cada vez más demandante en todos los aspectos de la vida cotidiana, tiene una mayor exigencia con la alimentación para mantener el estilo de vida agitado, balanceado en calorías y nutrientes, económico y más saludable (menos saturado en ácidos grasos y colesterol), con una alta calidad, racionado apropiadamente y empaquetado atractivamente. Atributos de calidad en alimentos, como el sabor, olor, color, gusto, textura, y sensación dentro de la boca son los que se esperan satisfacer las demandas del consumidor. Por lo cual en esta tesis buscamos no solo la utilización de proteínas innovadoras en el consumo cotidiano, sino también el mejoramiento de sus propiedades funcionales y biológicas por combinación con polisacáridos y por la hidrólisis de las mismas para producir nuevas propiedades y características.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- › Caracterizar fisicoquímicamente sistemas compuestos por proteínas o péptidos provenientes de la semilla de quinoa.

2.2. Objetivos parciales

- › Determinar la solubilidad de las proteínas de quinoa en distintos medios y condiciones y optimizar el aislamiento de las mismas.
- › Obtener hidrolizados enzimáticos de proteínas de quinoa y caracterizarlos fisicoquímica y biológicamente.
- › Evaluar la interacción de polisacáridos alimentarios cargados eléctricamente con las proteínas de quinoa tanto experimentalmente como por simulación computacional.
- › Estudiar el proceso de agregación ácida de las proteínas de quinoa en presencia de distintas concentraciones de carragenano.
- › Determinar las condiciones apropiadas para la gelificación de sistemas acuosos de proteínas de quinoa y carragenano.
- › Estudiar la estructura, textura y apariencia de geles ácidos de proteínas de quinoa con carragenano.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Harina de quinoa

Se utilizó como materia prima harina comercial desgrasada de quinoa “Los Andes” (Saite S.R.L., Cochabamba, Bolivia).

3.1.2. Microorganismo

Se utilizó la cepa de *A. niger* NRRL3 proporcionada por CEREMIC Rosario. El hongo filamentoso fue crecido en tubos picos de flauta de agar papa a 37 °C hasta la producción de conidios (alrededor de los 7 días de incubación). Se mantuvieron en heladera a 4 °C hasta su utilización.

3.1.3. Polisacáridos

Los PS usados: el quitosano (CS), la carboximetilcelulosa (CMC, baja viscosidad), el alginato (Alg) y el ι-carragenano (Cgn) fueron “Sigma” (St. Louis, EEUU). Se prepararon soluciones concentradas en el medio adecuado para cada uno de los mismos y luego fueron utilizados en las concentraciones y condiciones adecuadas para cada experimento.

3.1.4. Otros reactivos

Se utilizaron soluciones acetato (Ac), fosfato (Pi) y Tris–hidroximetil–aminometano (Tris) de concentración 10 mM a distinto pH para regular el medio. Las drogas sólidas y líquidas utilizadas para la preparación de las soluciones mencionadas fueron de calidad analítica, y se llevaron a pH con NaOH o HCl. El resto de los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

3.2. MÉTODOS EXPERIMENTALES

3.2.1. Solubilidad en distintos medios

Como se mencionó en la sección 1.1 las proteínas se pueden clasificar según su solubilidad en distintos medios. Para determinar el medio más apropiado para extraer las proteínas de quinoa (PQ) a partir de la harina, se dispersó harina de quinoa (HQ) en distintos solventes (agua destilada, NaCl 0,1 y 0,01 M, HCl 0,1 N y 0,01 M; NaOH 0,1 y 0,01 M; etanol 80 % y 50 %; SDS 2% y 1%) en una proporción 1:10 y se mantuvo en agitación durante 24 horas. Luego, se centrifugaron las dispersiones a

1000 g durante 20 min, y se cuantificaron tanto las proteínas (método de Lowry) como los hidratos de carbono (método de Dubois) en el sobrenadante (SN).

Posteriormente, se determinó la proporción más apropiada de HQ y solvente para obtener la máxima solubilidad de las PQ en este medio. Para ello se disolvieron distintas cantidades de HQ en NaOH 0,1 N y luego de centrifugar las mismas (1000 g, 20 min.), se determinó el contenido de PQ en el SN por el método de Lowry ¹⁰⁷.

3.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se realizaron electroforesis en geles de distintas concentraciones de poliacrilamida en condiciones nativas, desnaturalizantes (con dodecilsulfato de sodio) y reductoras, con β -mercaptoetanol ¹⁰⁸. Como marcador de peso molecular (MPM) se utilizaron proteínas del suero lácteo bovino: inmonoglobulina G (161 kDa), lactoferrina (76 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), β -lactoglobulina (18 kDa) y α -lactoalbúmina (14 kDa). En geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, los porcentajes de monómero de acrilamida total utilizados fueron 13 % para el gel de concentración y 17 % para el gel de separación. Para el gel en condiciones nativas los porcentajes de acrilamida fueron de 4 y 8 %, respectivamente. En todos los casos la relación entre volumen de muestra líquida y el volumen de solución reguladora de muestra fue de 1:2. La solución reguladora de muestra para las electroforesis nativas se compuso de: azul de bromofenol 0,001 %P/V y glicerol 25 %V/V en medio acuoso regulado por Tris 62,5 mM pH 6,8. Para las electroforesis en condiciones desnaturalizantes no reductoras la solución de muestra contuvo, además, 2 %P/V de dodecilsulfato de sodio. La solución correspondiente a las electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras contuvieron, además, β -mercaptoetanol 5,25 %V/V. Las electroforesis fueron llevadas a cabo a voltaje constante de 24,4 V.

3.2.3. Obtención de aislado de PQ

Se aislaron las PQ mediante extracción alcalina seguida de precipitación isoiónica, como se muestra en la figura 3.1.

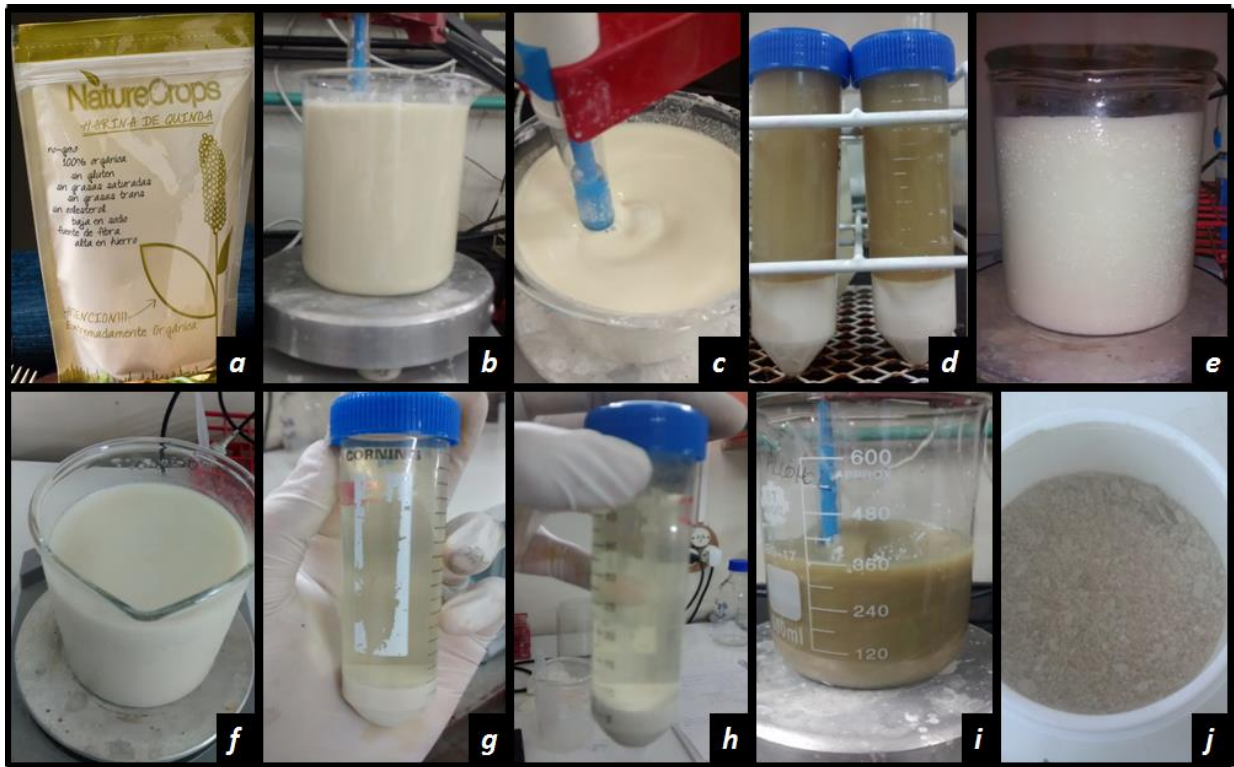


Figura 3.1: Proceso de aislamiento de PQ a partir de la HQ desgrasada comercial. a) HQ desgrasada, b) Disolución de HQ en NaOH diluido, c) Alcalinización de la suspensión acuosa de HQ hasta pH 9, d) Centrifugación durante 20 min a 1000 g y recuperación el SN, e) Acidificación del SN hasta pH 4,5, f) Agitación durante 2 h, g) Centrifugación de la muestra durante 20 min a 1000 g, h) Lavado del precipitado resultante con HCl diluido a pH 4,5 y centrifugación de la muestra durante 20 min a 1000 g, i) Redisolución del precipitado a pH 9, j) Liofilización de la muestra.

Se solubilizó la HQ en una proporción 1:5 en medio acuoso a pH 9 agitando a temperatura ambiente durante 2 h. Posteriormente se centrifugó durante 20 minutos a 1000 g. La fracción soluble en este medio fue acidificada hasta pH 4,5; se centrifugó nuevamente y el precipitado fue lavado con HCl diluido (pH 4,5) y, para favorecer su solubilización, se resuspendió a pH 9 en un volumen igual al inicial. Esta suspensión fue liofilizada y conservada a 4°C.

Se calculó la concentración de proteínas en cada paso tomando muestras en durante el proceso de aislamiento de proteínas.

3.2.4. Diagramas de solubilidad

Se prepararon soluciones de PQ (0,5 g/L) en ausencia o en presencia de CS 0,04 g/L, Alg 0,04 g/L, CMC 0,04 g/L y Cgn 0,04 g/L en medio Ac 10mM – Pi 10 mM – Tris 10 mM a distintos pH, en el rango de 1 a 10. Las muestras se agitaron durante 15 minutos, se les midió absorbancia a 600 nm, y luego de centrifugar 20 min a 1000

g se determinó la concentración de proteínas en el SN. La concentración de proteínas se cuantificó por el método de Lowry utilizando caseinato de sodio como patrón y se expresó en g/L.

3.2.5. Microscopía de barrido confocal láser

Se visualizaron por microscopia confocal de barrido láser las dispersiones de PQ (0,5 g/L) en ausencia y en presencia de PS (0,4 g/L) en medio Ac 10 mM – Pi 10 mM – Tris 10 mM a distintos pH tiñiendo a las proteínas con Rodamina B (0,05 g/L). Las muestras (100 μ L) fueron colocadas en placas Lab-Tek® II. Se visualizó con el láser de luz roja del microscopio Confocal NIKON C1SiR PLUS, con un aumento 20x y un zoom de 2, abarcando un campo cuadrado de 250 μ m de lado.

3.2.6. Espectroscopía de fluorescencia

Se realizaron espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de hidrolizados de PQ (HPQ, producción en la sección 3.2.11), PQ (0,5 g/L) y PQ tratada térmicamente (PQTT, metodología detallada en la sección 3.2.17) en ausencia y presencia de PS entre 300 nm y 400 nm excitando a 280 nm en un espectrofluorómetro AMINCO BOWMAN Series 2. Se utilizó una cubeta de cuarzo triangular para evitar el efecto de filtro interno, de 1 cm de paso óptico.

3.2.7. Dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular fueron realizados en un espectropolarímetro Jasco 810, utilizando una cubeta termostatzada a 25 °C. Se utilizó nitrógeno como gas purgante con una velocidad de flujo de 10 L/min. Se hicieron espectros de dicroísmo circular con muestras de PQ (0,5 g/L) en solución diluida en medio Ac 10 mM – Pi 10 mM a pH 9 en una cubeta de paso óptico de 1 mm. Los espectros fueron registrados entre 200 nm y 300 nm, se realizaron 3 barridos. Se informaron los espectros en grados de elipticidad en función de la longitud de onda. Se procesaron los espectros por medio del programa CDPro del algoritmo CONTIN-LL¹⁰⁹, para obtener los porcentajes de estructura secundaria.

3.2.8. Potencial ζ y diámetro hidrodinámico

Se determinó el potencial ζ y el diámetro hidrodinámico (D_h) de PQ (0,5 g/L) en ausencia y presencia de PS en el rango de pH (1 a 10) en medio Ac 10 mM – Pi 10 mM - Tris 10 mM, en un analizador de tamaño de partícula HORIBA SZ-100. También

se determinaron el potencial ζ y el D_h a soluciones acuosas de PQ (0,5 g/L) tratadas térmicamente a pH 9 (10 min, 100°C). El índice de refracción utilizado para las mediciones de D_h fue de 1,6; próximo a otras proteínas alimentarias como las del suero de la leche. Todas las medidas fueron realizadas por quintuplicado.

3.2.9. Obtención de proteasa de *A. niger* por fermentación en estado sólido

3.2.9.1. Sustratos sólidos

Los sustratos sólidos (SS) no inertes empleados para la fermentación fueron cascarilla de soja (Cs) cedida por Molinos S. A. y cáscaras de naranja (CN) adquiridas en mercados locales. El medio sólido constó de una mezcla de CN y Cs.

3.2.9.2. Medio basal e índice de ganancia de agua

El medio basal (MB) se preparó con la siguiente composición: 10 g/L $MgSO_4$; 10 g/L NaCl; 0,08 g/L $FeSO_4$. Además, se le adicionaron distintas cantidades de $NaNO_3$, con concentraciones comprendidas entre 3-5 g/L, de acuerdo al diseño experimental.

Los resultados preliminares indicaron que cuando el pH final de la fermentación era inferior a 5, la actividad enzimática era despreciable, lo que estaría indicando que las proteasas producidas por *A. niger* NRRL3 en este medio son neutras o alcalinas. Para favorecer la producción de peptidasas, se adicionó K_2HPO_4 250 mM al medio basal como regulador del pH. Tanto el MB como los SS fueron esterilizados por separado a 121 °C durante 15 minutos.

El índice de ganancia de agua (IGA) de los SS representa la cantidad de agua no libre que absorben los mismos. El mismo fue determinado previamente¹¹⁰ según la ecuación 3.1.

$$IGA = \frac{m_{SS\text{ húmedo}} - m_{SS\text{ seco}}}{m_{SS\text{ seco}}} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

donde m representa la masa del SS.

El IGA de la Cs y de la CN fue de 3,4 y 6,7 respectivamente. De esta manera, teniendo en cuenta las masas de SS empleadas (0,6 g de Cs y 2,4 g de CN), se calculó el volumen de MB necesario para cada placa de Petri, según la ecuación 3.2, que resultó ser 18,12 mL de MB por placa.

$$V_{MB} = m_{SS_{Cs}} * IGA_{Cs} + m_{SS_{CN}} * IGA_{CN} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

3.2.9.3. Determinación de la concentración de conidios

Los conidios se obtuvieron de los cultivos de *A. niger* crecidos sobre agar-papa en tubos pico de flauta, extraídos con agua destilada estéril por raspado con espátula. Se prepararon diluciones de la suspensión de conidios y se midió la turbidez a 620 nm.

Para la determinación de la concentración de conidios se correlacionaron los valores de absorbancia con el número de conidios determinados por cámara de Neubauer¹¹⁰. A partir de la correlación obtenida, se calculó el número de conidios por μL de una suspensión de conidios según la Ecuación 3.3.

$$N^{\circ} \text{ conidios}/\mu\text{L} = \frac{A_{620} + 0,0106}{0,0174 \times \text{dilución}} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

donde A_{620} es la absorbancia a 620 nm de la suspensión de conidios; 0,0106 y 0,0174 son la ordenada al origen y la pendiente de la recta de correlación, respectivamente.

3.2.9.4. Fermentación y obtención de extractos fúngicos

La fermentación se llevó a cabo colocando 3 g de la mezcla de SS y el MB estéril en cada placa de Petri. Luego, cada placa fue inoculada con 50.000 conidios e incubada en estufa a una temperatura constante de 30 °C durante 8 días.

Una vez finalizado el período de incubación, se prepararon extractos fúngicos extracelulares (EFE) colocando, al contenido total de la placa de Petri, 10 mL de agua destilada y agitando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Estas suspensiones fueron centrifugadas, permitiendo separar las fases líquida, que contenía las peptidasas extracelulares, y sólida. Los EFE fueron conservados a -20 °C.

3.2.9.5. Diseño experimental para la obtención de peptidasas de *A. niger*

En un trabajo previo se realizó un diseño experimental factorial fraccionario de 12 experimentos (Plackett – Burman) para determinar aquellos factores que afectan de forma significativa la producción de peptidasas extracelulares de *A. niger* (PA), resultando el pH inicial y la concentración de NaNO_3 en el MB¹¹⁰. En este trabajo se llevó a cabo una fase de optimización mediante un diseño central compuesto evaluando el efecto de estos factores sobre la variable respuesta actividad peptidasa (AP) de los EFE. El rango de los factores ensayados fue: pH inicial entre 6,5 y 7,5, concentración de NaNO_3 entre 3 y 5 g/L.

3.2.9.6. *Determinación de actividad enzimática*

La determinación de la AP se realizó mediante el método de Cupp–Enyard ¹¹¹. Se hicieron reaccionar a 37 °C durante 30 min 1 mL de PQ 6,5 g/L desnaturalizada en K₂HPO₄ 50 mM a pH 7,0 con 25 µL de EFE. La reacción se detuvo por adición de 1 mL de ácido tricloroacético 5 %P/V y se centrifugó 10 min a 2500 g. A 500 µL del SN de le adicionaron 250 µL de una dilución al medio del reactivo de Folin y 1,25 µL de Na₂CO₃ 0,55 M, se incubó 30 min a 37 °C y se midió absorbancia a 660 nm. Se definió una unidad de actividad proteolítica como la cantidad de EFE capaz de incrementar la absorbancia en una unidad durante el ensayo. La PQ fue desnaturalizada por incubación a pH 2 durante 1 h para favorecer su proteólisis.

3.2.10. Temperatura y pH óptimos de hidrólisis y rango de estabilidad

El pH óptimo se determinó llevando a cabo la reacción durante 15 min a 37 °C, utilizando 100 µL del EFE en un rango de pH de 2 a 12. Una vez que se hubo determinado el pH óptimo de la enzima se determinó el rango de pH en el cual la misma es estable. La estabilidad de pH se determinó incubando durante 1 hora los EFE a distintos pH en el rango de 2 a 12 en medio Ac 10 mM – Pi 10 mM – Tris 10 mM. Luego del tiempo de incubación se midió la AP a pH 9,1 y 37 °C. Los resultados se informaron como el porcentaje de actividad que se retiene respecto de la máxima actividad determinada.

Se determinó la temperatura óptima de hidrólisis llevando a cabo la reacción en medios a distintas temperaturas en el rango de 30 a 95 °C a pH 9,1. Luego que se hubo determinado la temperatura óptima de la enzima se determinó el rango de temperatura en el cual la enzima es estable. La estabilidad térmica se determinó incubando durante 1 hora los EFE a distintas temperaturas entre 30 a 90 °C. Luego del tiempo de incubación se midió la AP a pH 9,1 y 37 °C. Los resultados se informaron como el porcentaje de actividad que se retiene respecto de la actividad máxima determinada.

3.2.11. Obtención de hidrolizados de PQ

Para obtener los hidrolizados de PQ (HPQ) se mezclaron 10 µL de EFE con 600 µL de PQ 20 g/L a pH 9,0. La mezcla se incubó a 40 °C a distintos tiempos (0 - 0,25 - 0,5 – 1 – 2 – 3 – 4 - 5 - 6 horas) y se detuvo la reacción por calentamiento (100

°C, 5 min). A continuación, los tubos fueron centrifugados a 10000 g por 10 min, y se utilizó la fase soluble de los HPQ.

3.2.12. Grado de hidrólisis

Para la determinación del grado de hidrólisis (GH) de los HPQ, se utilizó como referencia el protocolo descrito por Adler–Nissen ¹¹². Se tomaron 50 µL de HPQ y se mezclaron con 400 µL de fosfato 0,2125 M, pH 8,2; y 400 µL de solución de ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS) 0,1 %V/V. La mezcla se cubrió con papel de aluminio para mantenerla en oscuridad, y se incubó durante 1 h a 50°C. La reacción se detuvo por el agregado de 800 µL de HCl 0,1 N y se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, se midió la absorbancia de cada muestra a 340 nm.

Como control positivo se preparó una solución estándar de HPQ por hidrólisis ácida. Se preparó PQ 20 g/L en HCl 6 N, y se incubó a 100 °C durante 12 h. A esta muestra se la sometió al mismo protocolo descrito previamente y el valor de absorbancia obtenido para la misma correspondió al 100 % de hidrólisis. El GH se calculó como:

$$GH (\%) = \frac{(A_M - A_B)}{(A_{100} - A_B)} \cdot 100\% \quad \text{Ecuación 3.4}$$

donde A_M es la absorbancia a 340 nm de la muestra, A_B es la absorbancia del blanco (todos los reactivos menos el EFE), y A_{100} es la absorbancia que tiene la muestra obtenida mediante hidrólisis ácida.

3.2.13. Hidrofobicidad superficial

Se determinó la hidrofobicidad superficial (S_0) relativa de suspensiones de HPQ (0,5 g/L) o PQ (0,5 g/L) en ausencia y presencia de PS en un rango de pH (1 a 10) en medio Ac 10 mM – Pi 10 mM – Tris 10 mM mediante la técnica descrita por Kato & Nakai ¹¹³. Para ello, se titularon 3 mL de una solución de la sonda fluorescente 8-anilino-1-naftalénsulfonato (ANS) 6 mM, con 10 alícuotas de 20 µL de muestra. Se registró la fluorescencia a 484 nm excitando a 380 nm en un espectrofluorómetro AMINCO BOWMAN Series 2. La S_0 se define como la pendiente de la gráfica de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de proteína en la solución. En el caso de los HPQ se informó la S_0 en función del tiempo de hidrólisis. En el caso de las mezclas de PQ + PS se informó, a cada pH, la S_0 relativa calculada como:

$$S_0 \text{ relativa} = \left(\frac{S_0 (\text{PQ+PS}) - S_0 (\text{PS})}{S_0 (\text{PQ})} \right) \quad \text{Ecuación 3.5}$$

donde S_0 (PQ), S_0 (PS) y S_0 (PQ+PS) son los valores de hidrofobicidad superficial determinados para PQ en ausencia de PS, PS en ausencia de PQ y la mezcla de PQ y PS, respectivamente. La concentración de CS fue de 0,04 g/L y de Cgn 0,16 g/L. De esta manera la S_0 relativa permite estimar la variación en la superficie hidrofóbica expuesta por PQ en presencia de cada uno de los PS ensayados.

3.2.14. Solubilidad de los HPQ

Se determinó la solubilidad de los péptidos resultantes de la hidrólisis de las PQ en función del tiempo de hidrólisis. Para ello, los HPQ fueron llevados a pH 4,5 (debido a que a este pH las PQ son insolubles), se centrifugó 10 min a 10000 g y se midió concentración de péptidos en solución por el método de Lowry.

3.2.15. Actividad antioxidante

- Método del radical ABTS*

Una solución de ácido 2'2-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico] (ABTS) 7 mM se mezcló con $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 2,45 mM, y se dejó reaccionar en oscuridad durante 12 h, para obtener el radical ABTS^{\cdot} ¹¹⁴. Luego, el reactivo se diluyó en medio fosfato 5 mM pH 7, hasta obtener una absorbancia de ~0,7 UA a 730 nm. Se mezclaron 50 μL de HPQ con 1 mL de la dilución apropiada del reactivo. Se determinó la absorbancia a 730 nm en función del tiempo, y se registró el valor absoluto de la pendiente. Este valor es una medida de la actividad antioxidante (AAO) de los HPQ.

- Método del radical DPPH*

Se preparó una solución de radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH*) 0,5 mM en etanol absoluto. Se mezclaron 50 μL de HPQ con 100 μL de solución de DPPH* 0,5 mM y 950 μL de etanol absoluto. Se incubó la mezcla por 90 minutos y a continuación se determinó la absorbancia a 515 nm ¹¹⁵. Se preparó un control con 1 mL de etanol absoluto y 100 μL de solución de DPPH* 0,5 mM y un blanco de muestras con 50 μL de HPQ y 1050 μL de etanol absoluto. Se determinó la actividad antioxidante utilizando la Ecuación 3.6.

$$AAO (\%) = 100 - \frac{(A_M - A_B)}{A_{100}} \cdot 100\% \quad \text{Ecuación 3.6}$$

donde AAO es actividad antioxidante, A_M es la absorbancia de la muestra, A_B es la absorbancia del blanco y A₁₀₀ es la absorbancia del control.

3.2.16. Titulaciones de PQ con PS

Se titularon 2 mL de soluciones de PQ (0,5 g/L) con alícuotas de CS (10 g/L) y Cgn (10 g/L) en medio Ac 10 mM – Pi 10 mM - Tris 10 mM pH 6. Al inicio y luego de cada adición de PS se determinó la turbidez a 600 nm. Además, se cuantificó la concentración de PQ en el SN luego de centrifugar (1000 g, 20 min), por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se informó la turbidez de cada uno de los sistemas al agregar el PS (Cgn o CS según correspondiese) y la concentración de proteínas en el SN en función de la concentración de PS en el medio.

3.2.17. Tratamiento térmico de las PQ

Se trataron las PQ térmicamente por incubación a 95 °C durante 10 min. Se determinó el efecto del tratamiento térmico (TT) de las PQ sobre el D_h, potencial ζ y espectros de emisión de fluorescencia.

3.2.18. Cinética de agregación ácida

Se estudiaron los cambios conformacionales de las PQ tratadas térmicamente (PQTT) a bajas concentraciones durante el proceso de agregación ácida mediante turbidimetría en el rango visible.

Como indica la ecuación 3.7, la turbidez (τ) es función de H (relacionada con constantes físicas del sistema), del peso molecular promedio (PM) de las partículas en solución, de su concentración (c) y del factor de disipación promedio (Q) de los agregados en suspensión, que depende de la forma y el grado de compactación de los mismos.

$$\tau = Hc(PM)Q \quad \text{donde} \quad H = \frac{32\pi^2 n_0^2 (\frac{\partial n_1}{\partial c})^2}{3N\lambda^4} \quad \text{Ecuación 3.7}$$

donde n₀ y n₁ son los índices de refracción del solvente puro y de la solución respectivamente, N es el número de Avogadro y ∂n₁/∂c es el incremento específico del índice de refracción.

Trabajando matemáticamente, se puede llegar a la siguiente ecuación:

$$\beta = 4,2 + \frac{\partial(\log \tau)}{\partial(\log \lambda)} \quad \text{Ecuación 3.8}$$

donde β es un parámetro relacionado con Q y, por lo tanto, con el tamaño y grado de compactación de las partículas ¹¹⁶.

Se prepararon soluciones de PQT 0,5 g/L a pH 8,5 con distintas concentraciones de Cgn (0 - 0,002 - 0,004 - 0,006 - 0,008 - 0,01 y 0,05 %P/V). A cada una de las mezclas PQT – Cgn se les adicionó la cantidad de GDL necesaria para conseguir una relación másica GDL/PQT (R) de 0,17; 0,33; 0,66; 1,00 y 1,33. Cada 60 s se registró el espectro de absorbancia usando un espectrofotómetro con arreglo de diodos (Spekol 1200) y el pH de la solución. Todas las determinaciones fueron llevadas a cabo a 31 °C. Se determinaron los valores de β a cada tiempo utilizando la ecuación 3.8 para el cálculo.

3.2.19. Condiciones necesarias para la gelificación ácida

En una primera etapa se determinó visualmente, por inversión de los sistemas, la concentración mínima de PQT necesaria para formar geles (Figura 3.2) a distintos valores de R variando las concentraciones de PQT desde 0,3 %P/V hasta 4,0 %P/V.

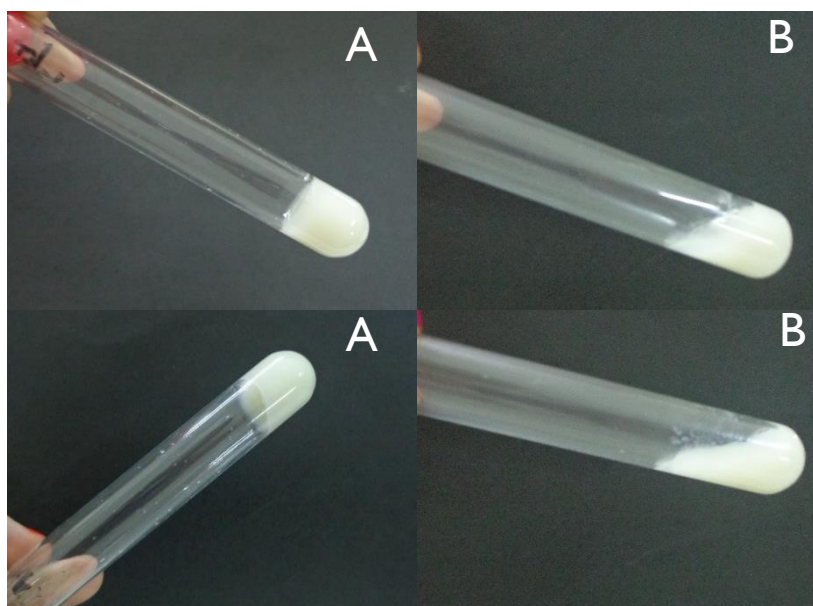


Figura 3.2: Determinación de la formación de geles de PQ con GDL por inversión de los sistemas: A) Se forma el gel, B) No se forma el gel.

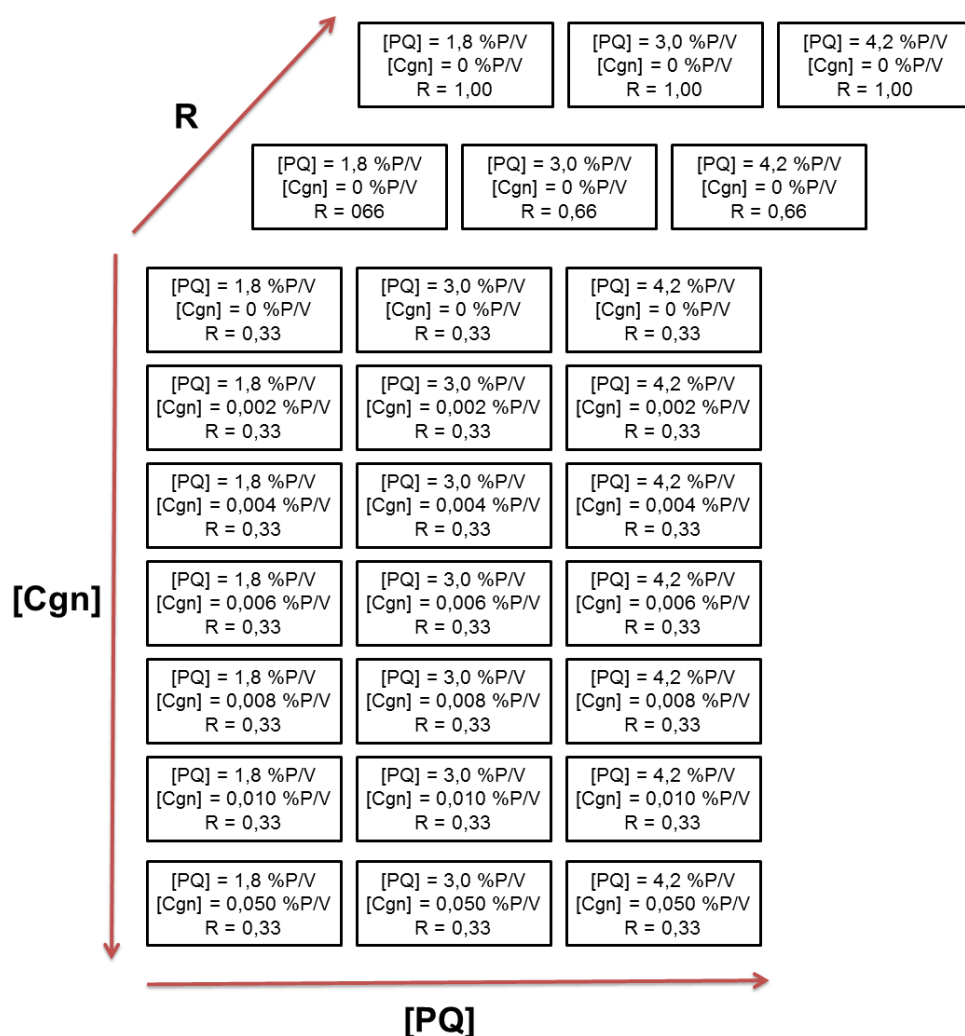
Posteriormente, se determinó el rango de R apropiado para obtener geles fijando la concentración de PQT en 2,4 %P/V.

Por último, se evaluó el efecto de la presencia de distintas concentraciones de Cgn (0 a 0,05 %P/V) sobre la capacidad de gelificar de las PQT acidificando con distinta cantidad de GDL.

Se prepararon 2 mL de cada sistema y se les determinó el pH luego de 24 horas de incubación. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

3.2.20. Capacidad de retención de agua

Se prepararon geles con distintas concentraciones de PQTT (1,8 - 3,0 y 4,2 %P/V), de Cgn (0 - 0,002 - 0,004 - 0,006 - 0,008 - 0,01 y 0,05 %P/V) y valores de R (0,33 - 0,66 - 1,0 y 1,3). Las combinaciones de las condiciones ensayadas se resumen en el siguiente esquema:



Para el estudio de la capacidad de retención de agua (CRA) de los geles se prepararon 10 mL de cada sistema. Después de 24 horas de incubación se pesaron y se centrifugaron las muestras a 100 g durante 10 minutos y se determinó el peso de líquido expelido. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La CRA se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$CRA(\%) = \frac{m_{gel} - m_{liq}}{m_{gel}} \cdot 100\% \quad \text{Ecuación 3.9}$$

donde m_{gel} y m_{liq} son las masas del gel y del líquido expelido, respectivamente.

3.2.21. Microestructura de los geles

Se prepararon geles con distintas concentraciones de PQ (1,8 - 3,0 y 4,2 %P/V), de Cgn (0 - 0,002 - 0,004 - 0,006 - 0,008 - 0,01 y 0,05 %P/V) y utilizando valores de R (0,33 - 0,66 y 1). A todas las muestras se les agregó una concentración de Rodamina B en relación 1:600 (Rodamina B:PQ), después de 1 hora se visualizaron las muestras por microscopia confocal.

Se caracterizó la microestructura de los geles mediante análisis digital de las imágenes obtenidas. Utilizando un programa computacional para el análisis de imágenes, *ImageJ*, y sus complementos *BoneJ* y *GLCM Texture* se pudo determinar la distribución de tamaños de poro (TP) y de agregados (TA) y el parámetro de textura digital relacionado con la homogeneidad de las imágenes, el segundo momento angular (SMA).

Para el análisis digital de imágenes empleando *BoneJ*, las imágenes se binarizaron. A partir de la imagen RGB (Ejemplo: Figura 3.3 A) se creó otra en tonos de grises (8-bits) (Ejemplo: Figura 3.3 B), y por último se obtuvo la imagen binarizada (blanco y negro). Una imagen binarizada creada a partir de una en tonos de grises asigna a cada pixel sólo uno de dos niveles de gris posibles: 0 (negro) o 255 (blanco)⁹. La selección de un método para binarizar las imágenes es un paso crucial en el análisis digital ya que clasifica a cada pixel de la imagen en una u otra categoría (parte del gel o como parte del fondo, agua entrampada). La binarización de imágenes se hace con distintos algoritmos, en este trabajo se utilizó “*Default*”, que usa el algoritmo de *IsoData* con algunas modificaciones¹¹⁷. Se asignó al agua (fondo) el color negro y al gel (proteínas teñidas con Rodamina B) el color blanco (Ejemplo: Figura 3.3 C). La determinación de TP puede llevarse a cabo usando distintos criterios^{118,119}; para este trabajo se utilizó el comando “*Thickness*” de *BoneJ*. Este comando rellena los espacios con círculos del mayor tamaño posible y le asigna a cada punto el valor del diámetro de dicho círculo¹²⁰.

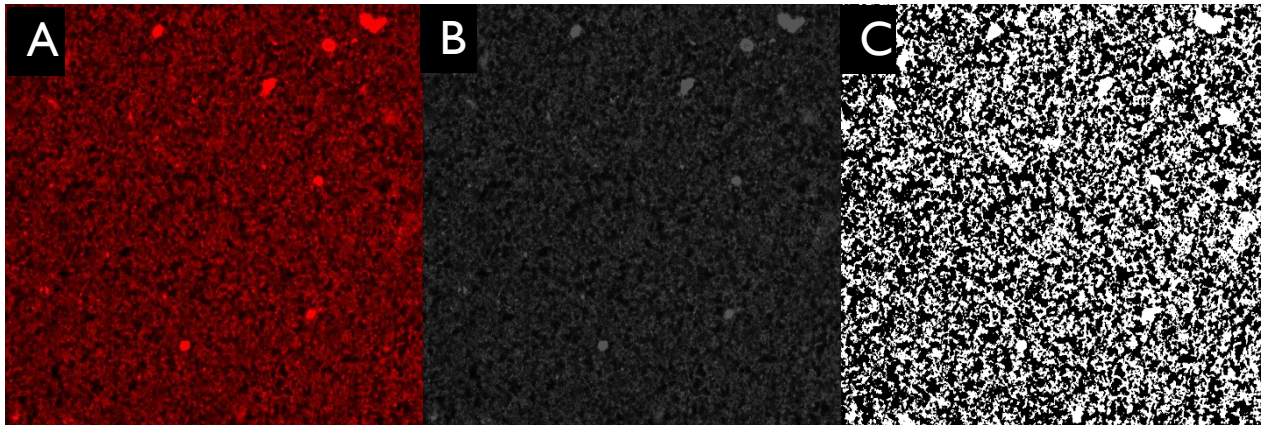


Figura 3.3: Imagen del gel de $[PQ]=1,8\%P/V$ con $R=0,33$, sin Cgn, teñido con Rodamina B. A) Imagen obtenida desde el software de NIKON: proteína teñida en rojo, B) Imagen en tono de grises: proteína en gris, C) Imagen binarizada: proteína en blanco. El fondo en todas las imágenes es negro.

El análisis digital de textura, usando *GLCM Texture*, tiene en cuenta la variación de los niveles de gris de cada pixel y su posición en la imagen. En este caso, la intensidad de color rojo debido a la mayor concentración de Rodamina B en la imagen se correspondió con un gris más claro en la escala de grises (más blanco significa mayor concentración de proteína unida a Rodamina B) ^{121,122}. *GLCM Texture* usa matrices de co-ocurrencia del nivel de gris (“*Grey-Level Co-occurrence Matrix*”) y utiliza las imágenes en escala de grises para determinar los parámetros de textura. En este trabajo se analizó el parámetro de segundo momento angular (SMA), relacionado con la homogeneidad de la imagen ¹²¹: un alto valor de este parámetro implicará muchas transiciones de tonos de gris. Para el cálculo del parámetro de textura se utiliza la siguiente ecuación ¹²³.

$$SMA = \sum_i \sum_j P^2(i, j) \quad \text{Ecuación 3.10}$$

donde P es la matriz normalizada de co-ocurrencia de los niveles de grises, i son los valores de grises y j la longitud entre dos pixeles.

3.2.22. Color y apariencia de los geles

Se prepararon 2 mL de los geles con distinta concentración de PQ (1,8 – 3,0 – 4,2 %P/V), de Cgn (0 – 0,002 – 0,004 – 0,006 – 0,008 – 0,01 – 0,05 %P/V) y valores de R (0,33 – 0,66 – 1,00) en envases cilíndricos plásticos de 1,5 cm de radio y 2,5 cm de alto.

Se tomaron fotografías a color de alta resolución (cámara NIKON P 7100, con una resolución de 3648 x 2736 píxeles) de los geles. Las imágenes fueron tomadas con dos fondos mate (blanco y negro) usando las siguientes especificaciones: modo manual con una apertura de lentes igual a 8 y un tiempo de exposición de 1/200, sin flash (con luz provista por 4 lámparas fluorescentes en todos los ángulos), sensibilidad ISO de 400, y un almacenamiento en formato RAW. Se utilizó una carta de color (Wolf Faust) para la calibración, obteniendo una foto de la carta bajo las mismas condiciones. Para obtener el perfil de colores se utilizó el software LProf (Free Software Foundation). El perfil de colores obtenidos se aplicó a las imágenes simples usando Photoshop CS6 (Adobe Systems) ¹²⁴. Las imágenes obtenidas permitieron determinar los parámetros L, a y b, que son valores promedio de la imagen total. Se calcularon luego L*, a* y b*, de acuerdo a las siguientes ecuaciones ¹²⁵:

$$L^* = \frac{L}{255} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 3.11}$$

$$a^* = \frac{240a}{255} - 120 \quad \text{Ecuación 3.12}$$

$$b^* = \frac{240b}{255} - 120 \quad \text{Ecuación 3.13}$$

L* es la luminosidad, y a* y b* los componentes cromáticos. Los valores de L* pueden variar entre 100% (blanco) y 0% (negro). Cuando a* < 0 su valor absoluto indica la tonalidad de verde y cuando a* > 0, la de rojo. Cuando b* < 0 la muestra presenta tonalidad azul y cuando b* > 0, amarilla ¹²⁶.

A partir de estos parámetros se calcularon el índice de amarillez (IA) ¹²⁷, el índice de blancura (IB) ¹²⁸ y el índice de opacidad (IO) de los geles ¹²⁹, mediante las siguientes ecuaciones:

$$IA(\%) = \frac{142.86}{L^*} \cdot b^* \quad \text{Ecuación 3.14}$$

$$IB(\%) = L^* - 3b^* \quad \text{Ecuación 3.15}$$

$$IO(\%) = \frac{L^*_{negro}}{L^*_{blanco}} \cdot 100\% \quad \text{Ecuación 3.16}$$

donde L*_{blanco} es la luminosidad de los geles cuando la foto se obtuvo sobre fondo blanco y L*_{negro} es la luminosidad de los geles cuando la foto se obtuvo sobre fondo negro.

3.2.23. Propiedades de textura

Se prepararon 20 mL de los geles en envases cilíndricos de plástico de 2,25 cm de radio y 3 cm de alto. Se realizaron curvas de penetración uniaxial (fuerza vs. distancia) para los distintos geles formados a distintas concentraciones de PQ (1,8 – 3,0 y 4,2 %P/V), de Cgn (0 – 0,002 – 0,004 – 0,006 – 0,008 – 0,01 y 0,05 %P/V) y valores de R (0,33 – 0,66 y 1,00).

La penetración se realizó con un texturómetro Perten TVT 6700, utilizando una sonda cilíndrica de acero inoxidable de 25 mm de diámetro. Las características de ensayo fueron: un solo ciclo de penetración al 50 % de la altura total del gel (18 mm), velocidad de medición 1 mm/s y una fuerza inicial de medición 2 gf.

A partir de las curvas de fuerza vs. desplazamiento se calcularon los parámetros de firmeza (F_m), definida como la pendiente inicial de la curva, y fuerza de quiebre (F_{max}), definida como la fuerza máxima alcanzada ¹³⁰.

3.2.24. Determinaciones analíticas

3.2.24.1. Cuantificación de proteínas

Para la determinación de proteínas totales se utilizaron los métodos de Lowry ¹⁰⁷ y Bradford ¹³¹.

3.2.24.2. Cuantificación de carbohidratos totales

Se utilizó el método de Dubois ¹³² para cuantificar los carbohidratos (CH) totales.

3.2.25. Análisis estadístico

El análisis de los resultados de los geles ácidos mixtos de PQ y Cgn para la obtención de ecuaciones modelo se hizo utilizando el programa Design Expert. Se analizaron 3 factores determinantes: [PQ], R y [Cgn] a 3, 3 y 7 niveles respectivamente sobre las variables respuesta CRA, TP, TA, SMA, parámetros de color y de textura.

3.3. MODELADO COMPUTACIONAL

Para las simulaciones se tomaron en cuenta: i) la energía de interacción coulombica entre átomos de la proteína, monómeros del polímero cargado eléctricamente (PC) y los iones libres en solución, ii) el cambio de estado de ionización de los AA (simulación a pH constante) y iii) el potencial de enlace entre los monómeros del PC. Los criterios de aceptación de nuevas configuraciones fueron basados en la

energía total del sistema, donde se aplicó un algoritmo de Monte Carlo – Metropolis ¹⁰². Se calcularon las funciones de distribución radial (FDR) entre el centro geométrico de la proteína y los monómeros del PC y entre los centros de las dos macromoléculas. Las FDR se convirtieron en un potencial de fuerza media, lo que permitió obtener la energía libre de interacción correspondiente. Previo a simular los sistemas proteína – PC se hicieron simulaciones de la proteína en solución salina. Éstas proporcionaron las cargas y las capacitancias medias a los distintos pHs.

Para el PC el potencial de enlace (u^{enlace}) entre dos monómeros vecinos se calcula como:

$$u^{enlace} = \frac{l_B}{2r_{min}^3} \sum_{i=1}^{N_{mon}-1} (r_{i,i+1})^2 \quad \text{Ecuación 3.17}$$

en donde $r_{i,i+1}$ es la distancia entre los monómeros i y $i+1$, r_{min} es la distancia de separación que corresponde al mínimo de energía para un dímero.

La energía total del sistema proteína – PC para una dada configuración (U), está dada por:

$$U = \sum_{i=1}^{N_{mov}} u^{ex}(r_i) + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N u(r_{ij}) + u^{enlace} \quad \text{Ecuación 3.18}$$

donde $N_{mov}=N_c+N_s+N_{mon}$ es el número total de partículas móviles siendo N_c la cantidad de contraiones, N_s , la cantidad de iones de sal agregados, y N_{mon} el número de esferas que representan los monómeros del PC mientras que $N=N_{mov}+N_p$ es el número total de partículas, que incluye a las de la proteína (N_p). $u(r_{ij})$ es el potencial de interacción entre dos partículas, i y j , separadas una distancia r_{ij} ¹⁰⁴.

El término $u^{ex}(r_i)$ es el límite que define el “espacio de simulación”:

$$u^{ex}(r_i) = \begin{cases} 0 & r_i \leq R_c \\ \infty & \text{de otra manera} \end{cases} \quad \text{Ecuación 3.19}$$

en donde R_c es el radio del espacio de simulación. En algunas simulaciones, para cuantificar la energía libre de las interacciones, debido a las elevadas barreras energéticas, fue necesario emplear una técnica de muestreo sesgado. Para ello, se introdujo una penalización de las configuraciones generadas, basadas en la probabilidad de distribución, $P(r)$, para la separación entre el centro de masa de las dos macromoléculas, conforme se describe en la bibliografía ¹⁰⁴. De esta forma, la medida de $P(r)$, permite obtener el potencial de fuerza media, $w(r)$,

$$w(r) = -\ln P(r) + cte \quad \text{Ecuación 3.20}$$

Los detalles del modelo de simulación se presentan a continuación.

3.3.1. Modelo de célula

Se ejecutaron dos conjuntos de simulaciones: i) un sistema de proteína inmersa en una solución salina (Figura 3.4, izquierda) y ii) un sistema conteniendo proteína y PC inmersos en una solución salina (Figura 3.4, derecha). Se usó un modelo de célula donde cada sistema está confinado en el espacio de simulación esférico y neutro como se ilustra en la Figura 3.4. Se usaron modelos simplificados tomando un número mínimo de parámetros para el cálculo de las interacciones de forma de permitir racionalizar el proceso de interacción de esos sistemas. Se han descrito modelos mesoscópicos continuos que pueden ser resueltos por simulaciones de MC y que no tienen excesivo costo computacional (tiempo de procesamiento o exigencia de supercomputadoras) ¹³³. En el modelo utilizado se incluyen detalles de asociación/disociación de OH^- y H^+ , ya que el modelo permite el ingreso y el egreso de estas especies que son cruciales en la interacción.

La motivación física de este modelo es equivalente a dividir la solución salina en células, en donde cada una contenga una proteína (o un par proteína–polisacárido) con sus electrolitos (contraiones y la sal adicionada). Se considera que no existen interacciones entre las diferentes células del sistema real. La única manera en que son consideradas las interacciones entre las células es directamente a través de la definición de c_p . El R_c fue 220 \AA , determinado a partir de la concentración de proteína (c_p) ¹³⁴.

Cada átomo de la proteína se describió durante la simulación mediante 4 valores numéricos: sus coordenadas en el espacio de la célula x , y , z ; y su carga (Z). El PC se describió suponiendo una cadena altamente flexible con una cantidad N_{mon} de monómeros ligados por el potencial armónico de interacción, cada uno de ellos descrito como una esfera rígida de radio R_{mon} con carga negativa o positiva, según sea el caso.

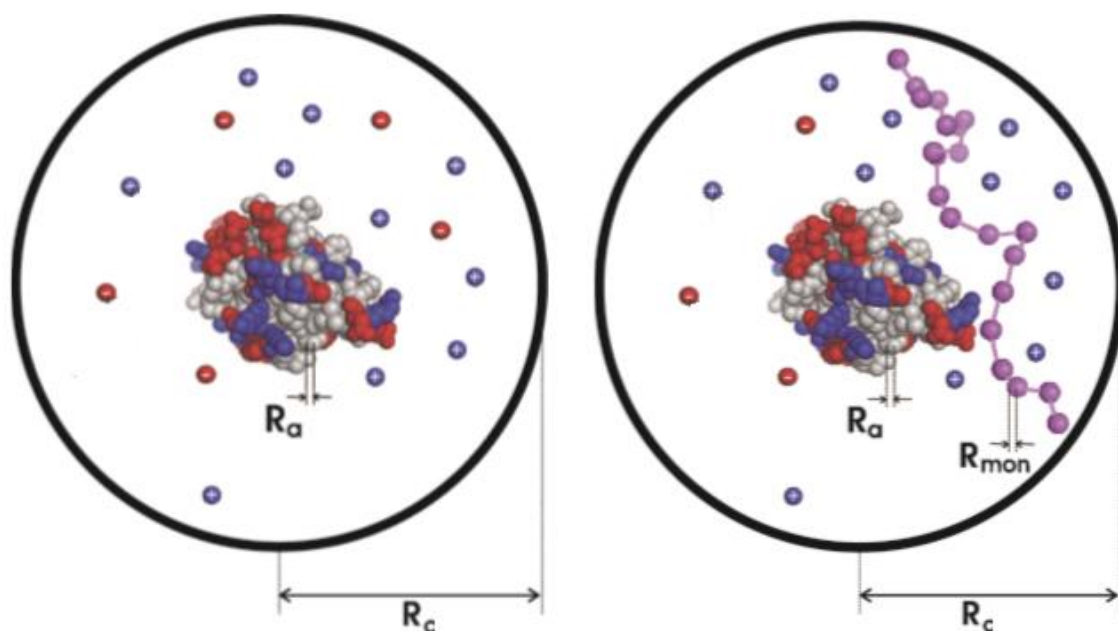


Figura 3.4: Esquema del modelo celular usado en las simulaciones. Izquierda: proteína, derecha: sistema proteína – PC

El potencial de interacción (u) entre dos partículas i y j separadas una distancia r_{ij} está dada por:

$$u(r_{ij}) = \begin{cases} \infty & r_{ij} \leq 2R_a \\ \frac{Z_i Z_j}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r_{ij}} & \text{de cualquier otra manera} \end{cases} \quad \text{Ecuación 3.21}$$

donde ϵ_0 es la permitividad en el vacío, ϵ_r es la constante dieléctrica relativa del medio, Z_i y Z_j son las cargas de las partículas i y j , respectivamente, y R_a es el radio de cada átomo de la proteína. Se trabajó con un solvente implícito, se consideró un comportamiento dieléctrico continuo, ya que si se tomara en cuenta un modelo con moléculas de agua como solvente el costo computacional sería muy alto. Esto significa que el agua fue caracterizada como un medio dieléctrico sin estructura por una constante dieléctrica relativa ϵ_r . La misma constante dieléctrica estática fue asignada para todas las especies cargables en el interior del modelo¹³⁵. La constante dieléctrica relativa, ϵ_r , fue fijada en 77,8 a temperatura ambiente de 298 K.

3.3.2. Método de Monte Carlo

Las simulaciones fueron llevadas a cabo en un ensamble semi-gran canónico. Durante las simulaciones de Monte Carlo (MC) se midieron varias propiedades fisicoquímicas (carga y capacitancia, en función del pH), derivadas de la energía libre

(potencial de fuerza media entre los centros de las macromoléculas), FDR entre el centro de la proteína y los monómeros del PC, y el correspondiente número de coordinación. Las simulaciones se realizaron a temperatura constante de 298 K.

Como cualquier modelo de interacción entre dos macromoléculas se tomó solo en cuenta la interacción cruzada proteína – PC. No se tuvo en cuenta la interacción proteína – proteína, la interferencia de la agregación proteica, un problema común en la práctica experimental ^{136,137}.

Se describieron todos los átomos de la proteína como esferas rígidas de radio de 2 Å sin movilidad durante la simulación. Las cargas fueron variando en función del pH, de acuerdo a los pKa de cada AA ¹³⁸.

El PC fue simulado considerando $N_{\text{mon}} = 21$ y 31 monómeros, $R_{\text{mon}} = 2$ Å, $Z_{\text{mon}} = -1, -0,5, +0,5$ y $+1$ y $r_{\text{min}} = 4$ Å (distancia entre monómero y monómero). La carga de cada uno de los monómeros fue fija durante las simulaciones.

En todos los modelos se incluyeron iones monovalentes para garantizar los efectos de correlación ion – ion. Se estableció un reservorio de protones en la célula para establecer un pH constante en el sistema. Además, se utilizaron algunas cargas móviles para remover o insertar protones en los grupos titulables de los AA de la proteína.

Para MC se utilizaron tres réplicas, un equilibrio (para estabilizar los resultados de probabilidad) con $4 \cdot 10^4$ ciclos y, posteriormente, producciones de $5 \cdot 10^5$ ciclos.

3.3.3. Modelo de proteína

La chenopodina (Ch) representa el 37% de las PQ ^{139,140} y fue la primer PQ secuenciada. La secuencia de aminoácidos de la Ch fue obtenida en la base de datos de proteínas ¹⁴¹.

Como primer paso se caracterizó la proteína individualmente (en ausencia de PC) en solución salina. Esto permitió elegir un mejor rango de estudio para las interacciones proteína – PC. Durante las simulaciones a distintos pH se cuantificaron las cargas de la proteína. Como no se conoce la estructura cristalográfica de la Ch, se ensayaron cuatro métodos para obtener las conformaciones proteicas.

3.3.3.1. Aleatoria

A partir de la secuencia primaria de la Ch se construyó un modelo de AA ordenados aleatoriamente partiendo del centro geográfico de una esfera de radio fijo

(de 40 nm). Para el ordenamiento aleatorio se respetó el movimiento del enlace péptido y el radio máximo que puede adoptar la proteína. Cada uno de los aminoácidos ionizables puede protonarse o desprotonarse en función del pH.

3.3.3.2. *Cargas fijas*

Los costos computacionales en simulaciones de MC son elevados, por lo cual para tratar de optimizar recursos computacionales, a partir del modelo aleatorio descrito previamente se fijaron las cargas de los AA ionizables con el valor que tienen los mismos a cada uno de los pH estudiados en la titulación de la Ch.

3.3.3.3. *Modeller*

Se utilizó la plataforma de Modeller para poder asignar una estructura secundaria y terciaria a la cadena polipeptídica de la Ch por similitud de secuencias con la amarantina (globulina 11S del amaranto), previamente cristalizada ¹⁴².

3.3.3.4. *Dinámica molecular*

Para poder incluir los efectos de los movimientos conformacionales dependientes de la temperatura, se trabajó con dos modelos aleatorios de las simulaciones por dinámica molecular (DM). Este tipo de simulación se utiliza para calcular propiedades de un sistema clásico, es decir que el movimiento de las partículas obedece las leyes de la mecánica clásica. Por lo tanto, en este tipo de simulación se define un sistema modelo de N partículas y se resuelven las ecuaciones de Newton hasta que las propiedades del sistema no varíen en el tiempo, es decir, el sistema encuentre el equilibrio. En el caso de simulación de proteínas por medio de la DM, se calculan las posiciones más estables en la estructura tridimensional para cada uno de los AA de la estructura primaria respetando las leyes de Newton. Del conjunto de configuraciones generadas durante el muestreo, a través de un proceso de agrupación, se escogen las más representativas como describen Jönsson y col. ¹⁴³. Se llevó a cabo una simulación de DM, estabilizando a la Ch durante un tiempo de 200 ns.

3.3.4. Interacción proteína – polímero cargado eléctricamente

Para las simulaciones por MC de la interacción de cada estructura de proteína con un PC con carga unitaria positiva (PCP) o con carga unitaria negativa (PCN) se llevó a cabo una titulación en el rango de pH de 1,0 a 11,0 con determinaciones cada

0,5 unidades de pH. Se determinaron las FDR en las simulaciones de MC con los modelos de Ch y PCN o PCP, calculando la distancia entre los centros de masa de cada uno de los polímeros. La probabilidad de interacción entre la Ch y el PC a cada pH puede calcularse a través de las FDR en cada uno de los ciclos fijando una distancia mínima (50 Å) de interacción entre la Ch y el PC donde se consideró que se produjo la interacción asociativa. Para cuantificar la interacción entre Ch y cada PC en las simulaciones se asignó, a cada pH, un valor correspondiente a la frecuencia máxima de las interacciones $P(r)$.

Para poder comparar los resultados experimentales y computacionales se calcularon las probabilidades de distribución relativas (interacción relativa) y las absorbancias experimentales relativas (turbidez relativa), según correspondiera a resultados computacionales o experimentales, respectivamente.

$$Turbidez\ rel = \frac{Turbidez - Turbidez\ mínima}{Turbidez\ máxima} \quad \text{Ecuación 3.22}$$

$$Interacción\ rel = \frac{P(r) - P(r)\ mínimo}{P(r)\ máximo} \quad \text{Ecuación 3.23}$$

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTUDIO FISICOQUÍMICO DE LAS PROTEINAS DE QUINOA

Las proteínas de quinoa (PQ) han despertado el interés de muchos investigadores en la última década por sus características ventajosas con respecto a otros granos, como se destacó previamente. Se comenzó estudiando las propiedades fisicoquímicas de las PQ y optimizando la obtención de las mismas a partir de la harina desgrasada comercial.

Se determinó la solubilidad de las PQ extraídas a partir de la harina de quinoa (HQ), se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida y se las visualizó a distintos pH a través de microscopia confocal. La estructura de las PQ en solución se estudió a través de espectros de emisión de fluorescencia, espectros de dicroísmo circular, determinación de diámetro hidrodinámico y potencial ζ .

4.1.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE AISLAMIENTO DE PQ A PARTIR DE LA HARINA

Para poder caracterizar fisicoquímica y funcionalmente a las PQ, es necesario aislarlas. Es por esto que la determinación de su solubilidad tanto como la de los CH de la HQ en distintos medios permitirá la selección de un método apropiado para su aislamiento.

Para ello se decidió disolver la HQ en distintos medios, y luego de centrifugar cada una de las muestras se midió la concentración de proteínas y CH en el SN. Los resultados se observan en la Figura 4.1.

Las mismas muestras fueron sembradas para una electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturizante (con dodecil sulfato de sodio) para detectar la cantidad de proteínas y diferenciar la solubilidad de cada una de ellas en los medios ensayados.

Como se observa en las Figuras 4.1 y 4.2, se encontró que las PQ presentan mayor solubilidad en NaOH 0,1 M.

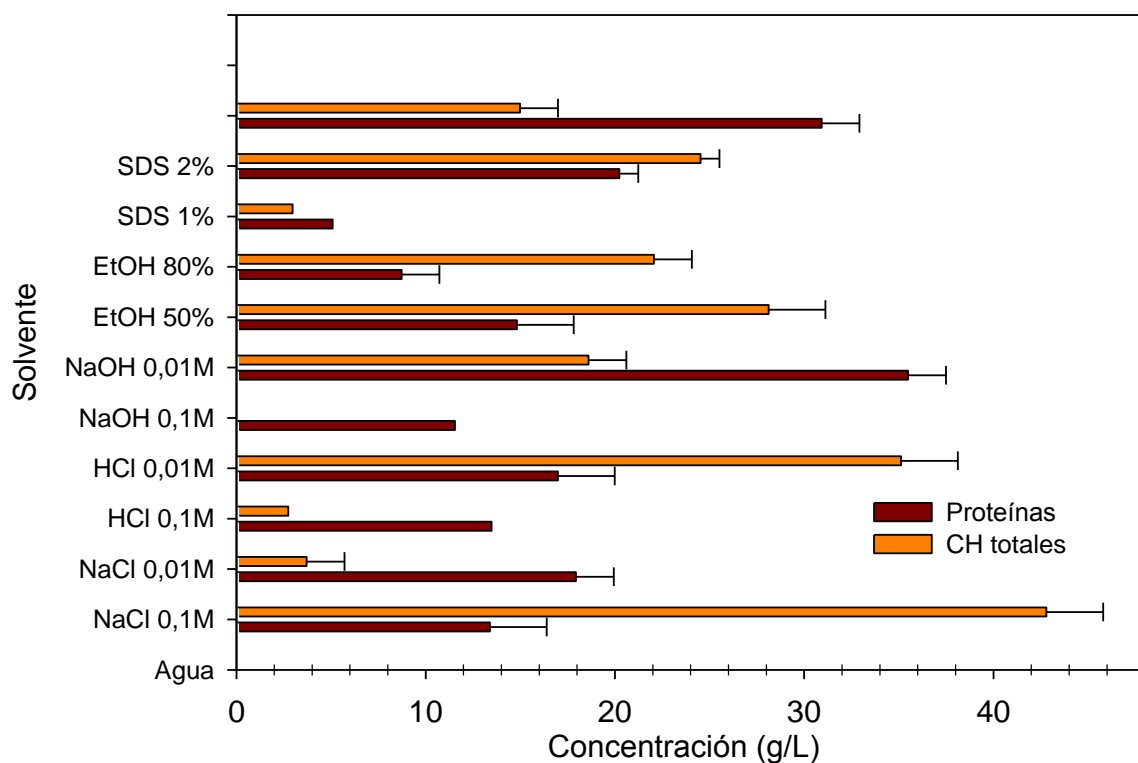


Figura 4.1: Contenido de proteínas y CH en el sobrenadante (SN) de la suspensión de HQ en distintos medios. Proporción HQ:solvente 1:10.

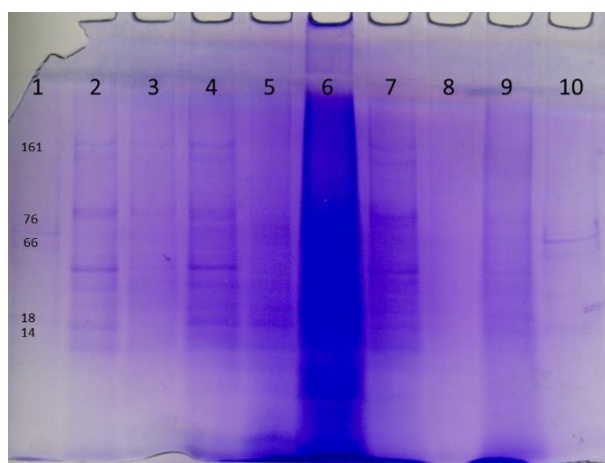


Figura 4.2: Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras de los SN de las dispersiones de HQ en distintos medios. Calles: 1) Marcador de peso molecular (MPM); HQ en 2) agua (1:10); 3) NaCl 0,1 M; 4) HCl 0,01M; 5) NaOH 0,01 M; 6) NaOH 0,1 M; 7) EtOH 70 %P/V; 8) dodecil sulfato de sodio 1 %P/V; 9) agua (1:20); 10) MPM.

Resulta de interés la determinación de la solubilidad de las PQ en este medio así como también la cantidad de HQ que es necesario dispersar para solubilizar la

mayor cantidad de PQ. Por lo tanto, se dispersaron distintas cantidades de HQ en NaOH 0,1 M y se determinó la cantidad de PQ solubilizada. Los resultados se muestran en la Figura 4.3.

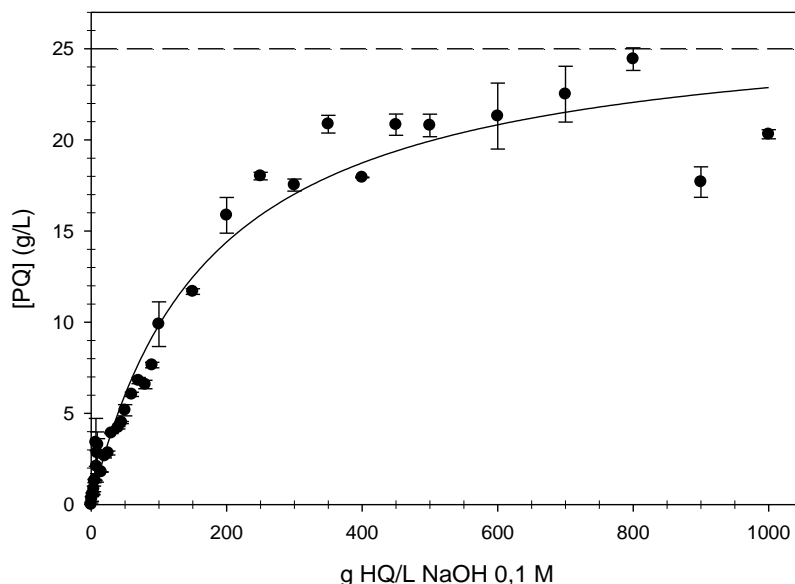


Figura 4.3: Solubilidad de PQ en función de la cantidad de HQ disuelta en NaOH 0,1M. Temperatura 25 °C.

El mayor rendimiento de PQ soluble en este medio se obtuvo dispersando HQ por debajo de 250 g/L, ya que a esta concentración se asegura una relación lineal entre la cantidad de HQ dispersada y la concentración de proteínas solubles (Figura 4.3).

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes del SN de dispersiones de PQ (preparadas por dispersión de 200 g de HQ por cada 1000 mL de NaOH 0,1 M) ajustada a distintos pH en un rango de 1 a 10.

En la electroforesis (Figura 4.4) se observan grandes cantidades de proteína en distintas bandas no definidas en las calles de las muestras correspondientes a pH 5,5 hasta 9,0. Se pone de manifiesto la dependencia de la solubilidad de las PQ con el pH. A pH menores a 5,0 se evidenció una disminución en la solubilidad de las PQ lo que se corresponde con la separación de fases observada durante la acidificación. A pH muy ácidos (1,0 y 1,5) se vio que las PQ se resolubilizan parcialmente, lo cual puede ser debido a que las proteínas adquieren carga eléctrica neta positiva.

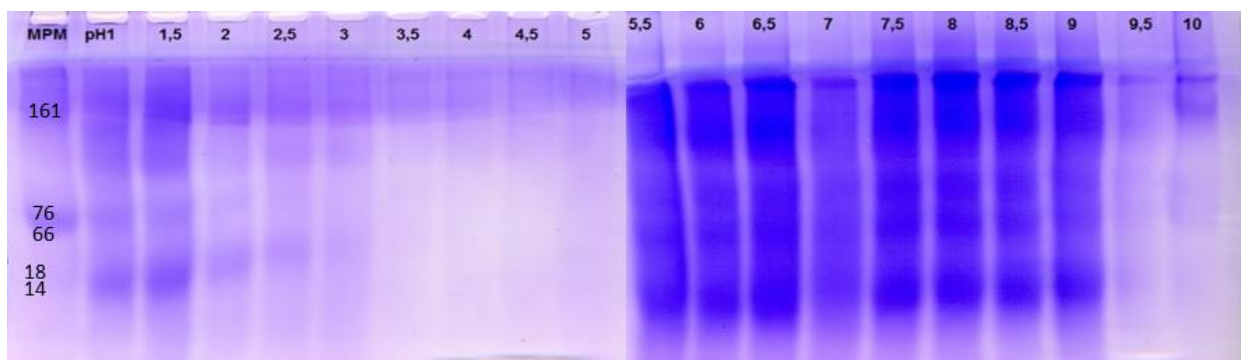


Figura 4.4: Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras de los SN de las muestras solubilizadas en NaOH 0,1 M, ajustadas a distintos pH (de 1 a 10, como se indica en la parte superior de cada calle). Calle 1) MPM

El método descrito por Abugoch ⁵⁷ para la obtención de un concentrado de PQ por disolución en medio alcalino y precipitación isoiónica de las proteínas fue optimizado con los resultados de los experimentos previos. Se decidió dispersar la HQ en NaOH 0,1 M, a pH 9,0, en una proporción de 1:5, y precipitar las PQ a pH 4,5 para asegurar el mayor rendimiento del proceso de aislamiento de PQ.

4.1.2. RENDIMIENTO DEL PROCESO DE AISLAMIENTO

Para determinar la contribución al rendimiento de cada una de las operaciones del proceso de aislamiento de PQ, se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford ¹³¹ en muestras extraídas en cada uno de los pasos del proceso. Los resultados se muestran en la Figura 4.5.

Se puede observar que cuando se solubilizó la HQ en medio alcalino a pH 9 se extrajeron hasta 19 g de PQ por cada 100 g de HQ. Después de centrifugar la muestra se obtuvo alrededor de 18 g de PQ. Al precipitar las PQ a pH 4,5 en el SN quedaron 4,5 g de PQ y en el lavado con HCl diluido a pH 4,5 se perdió alrededor de 0,5 g más de PQ. Al final del proceso de aislamiento se obtuvieron alrededor de 10 g de PQ por cada 100 g de HQ, el rendimiento del proceso resultó alrededor de 10 % respecto del material de partida y 52 % respecto de la cantidad de proteína.

En la Figura 4.6 se muestran las electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas, y desnaturalizantes, tanto reductoras como no reductoras, de las muestras obtenidas en cada paso del proceso de aislamiento.

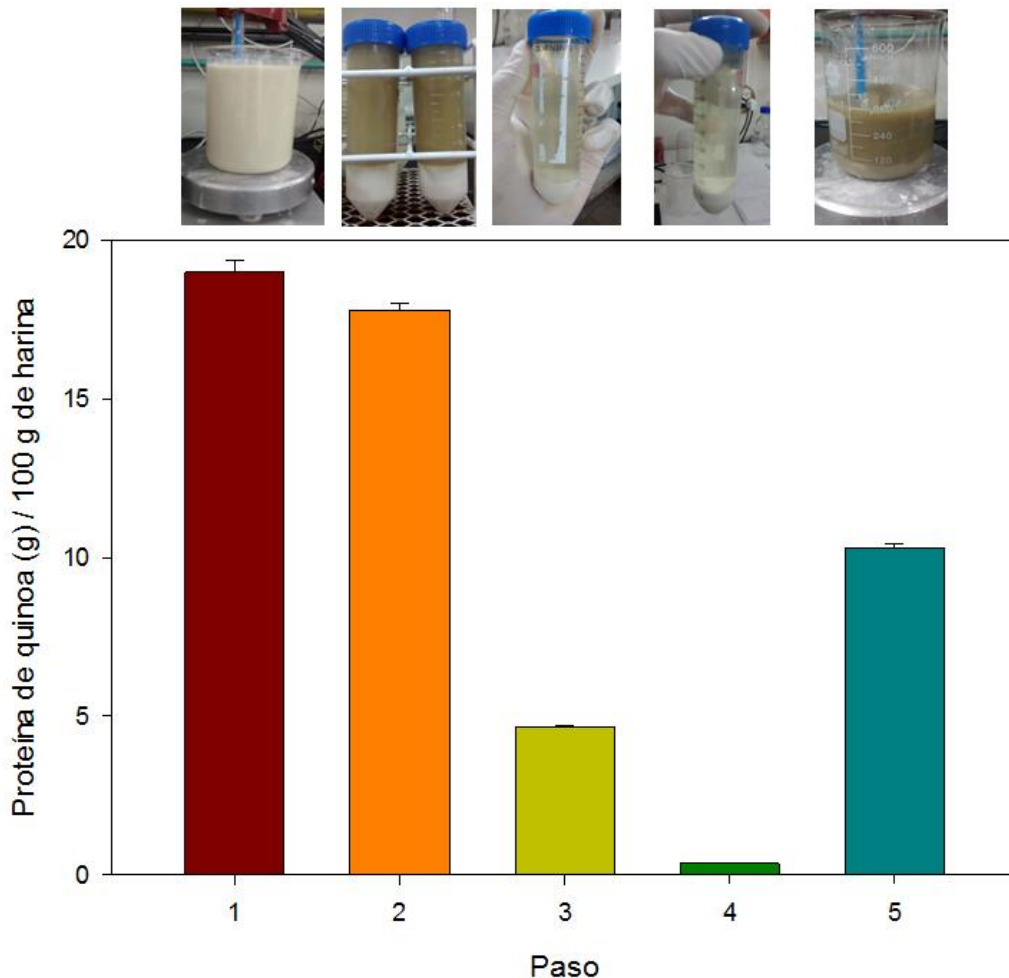


Figura 4.5: Evaluación del rendimiento de PQ en cada paso del proceso de aislamiento. Se acompaña cada resultado con una fotografía de la etapa en la cual se realizó la determinación de la concentración de PQ por el método de Bradford. 1) Dispersión de la HPQ en NaOH diluido a pH 9. 2) Sobrenadante luego de centrifugar la suspensión a pH 9. 3) Sobrenadante luego de centrifugar la suspensión acidificada a pH 4,5. 4) Sobrenadante obtenido del lavado del precipitado a pH 4,5. 5) Resuspensión, a pH 9, del precipitado.

En los gels de electroforesis se observan distintas bandas, identificadas previamente por otros autores^{63,144}. La Ch)⁶⁴, una globulina, posee un PM de 55 kDa y está compuesta por dos subunidades: la ácida (A, 32 – 39 kDa) y la básica (B, 22 – 23 kDa)¹³⁹. Se ha reportado que las bandas de 8 – 9 kDa corresponden a las proteínas 2S comúnmente encontradas en proteínas vegetales de semillas⁵³. En la electroforesis realizada en condiciones nativas (Figura 4.6 A) fue posible identificar una banda intensa y se asignó a la Ch en su forma globular nativa, mientras que en condiciones desnaturizantes (Figura 4.6 B) se visualizaron sus subunidades A y B, alrededor del peso molecular informado. En la electroforesis llevada a cabo en

condiciones reductoras se visualizaron bandas de bajo peso molecular, verificando la presencia de puentes disulfuro entre subunidades de las PQ (Figura 4.6 C).

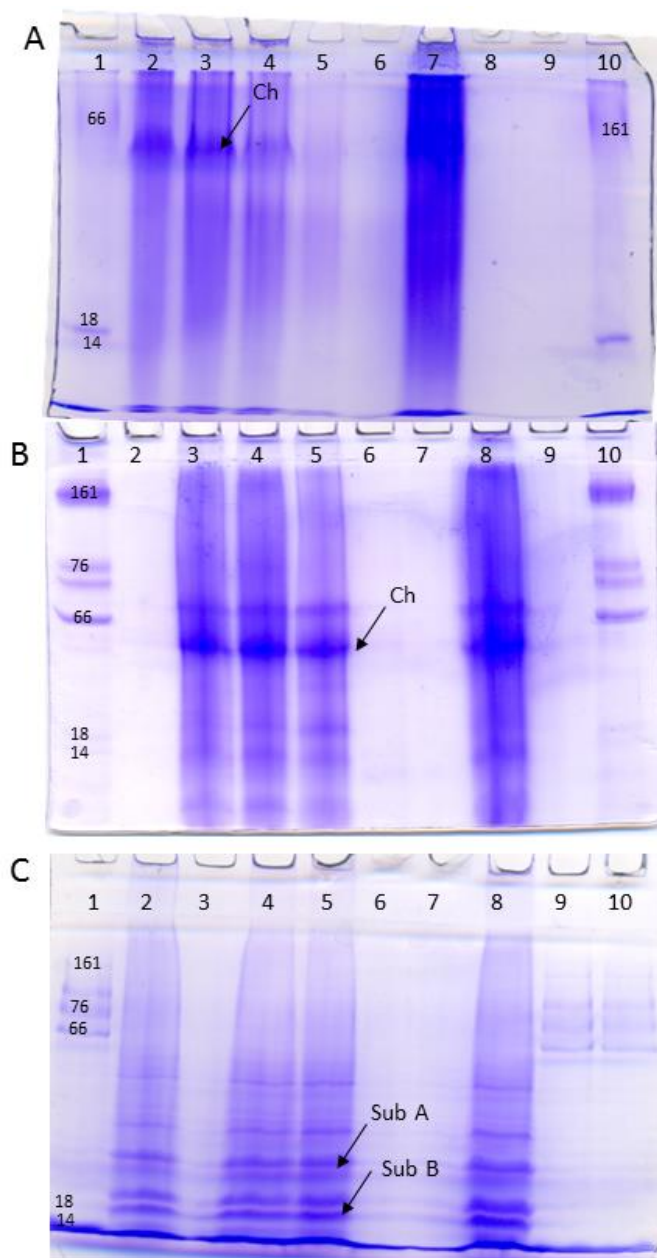


Figura 4.6: Electroforesis en geles de poliacrilamida de las muestras de cada paso del proceso de aislamiento de las PQ. **A) Condiciones nativas.** Acrilamida: 4% en el gel de concentración y 8% en el de resolución. Calles: 1) MPM; 2) Dispersión de la HPQ en NaOH diluido a pH 9; 3) sobrenadante luego de centrifugar la suspensión a pH 9; 4) suspensión de PQ a pH 4,5; 5) sobrenadante luego de centrifugar la suspensión acidificada a pH 4,5; 6) sobrenadante obtenido del lavado del precipitado a pH 4,5; 7) resuspensión, a pH 9, del precipitado; 10) MPM. Se marcó la banda que corresponde a la chenopodina (Ch). **B) Condiciones desnaturizantes no reductoras.** Acrilamida: 8% en el gel de concentración y 13% en el de resolución. Calles: 1) MPM; 3) Dispersión de la HPQ en NaOH diluido a pH 9; 4) sobrenadante luego de centrifugar la suspensión a pH 9; 5) suspensión de PQ a pH 4,5; 6) sobrenadante luego de centrifugar la suspensión acidificada a pH 4,5; 7) sobrenadante obtenido del lavado del precipitado a pH 4,5; 8) resuspensión, a pH 9, del precipitado; 10) MPM. Se indica la banda correspondiente a la Ch. **C) Condiciones desnaturizantes y reductoras.**

Acrilamida: 8% en el gel de concentración y 13% en el de resolución. Calles: 1) MPM; 2) Dispersión de la HPQ en NaOH diluido a pH 9; 4) sobrenadante luego de centrifugar la suspensión a pH 9; 5) suspensión de PQ a pH 4,5; 6) sobrenadante luego de centrifugar la suspensión acidificada a pH 4,5; 7) sobrenadante obtenido del lavado del precipitado a pH 4,5; 8) resuspensión, a pH 9, del precipitado; 10) MPM. En el gel se indican las bandas correspondientes a las subunidades ácida (Sub A) y básica (Sub B) de la Ch. En cada calle se sembraron 20 μ L.

4.1.3. MICROSCOPIA CONFOCAL

La visualización de las PQ teñidas con un colorante fluorescente puede dar una idea del arreglo supramolecular de las mismas, en suspensiones a distintos pH.

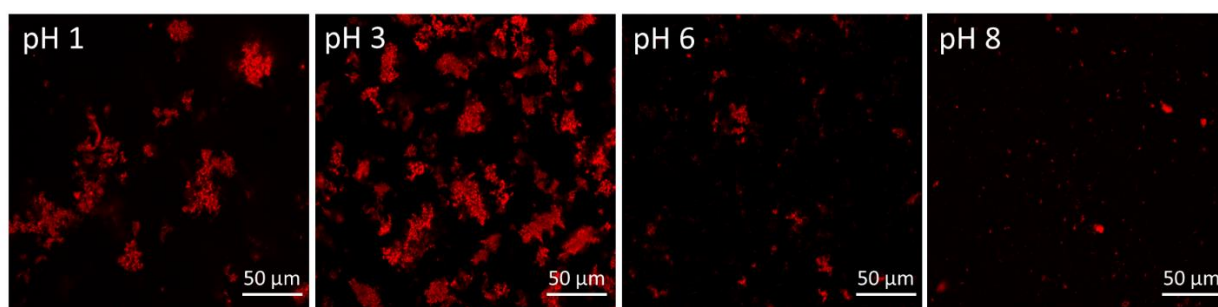


Figura 4.7: Fotografías obtenidas por microscopía confocal de PQ 0,5 g/L teñidas con Rodamina B a distintos pH (1 – 3 – 6 – 8).

En la Figura 4.7 se destaca que a pH más ácidos, se observa la agregación de las PQ mientras que a pH 8 no se observan agregados macroscópicos. Esto último está de acuerdo con lo observado en los geles de poliacrilamida ya que se evidenciaron agregados retenidos en los pocillos, que no ingresaron al gel de concentración. Los agregados de mayor tamaño se observan a pH 3, siendo intermedios a pH 1 y menores a pH 6.

El tamaño de los agregados presentó correlación inversa con la solubilidad de las PQ a los distintos pH. Estas observaciones están de acuerdo con lo reportado por otros autores respecto a la solubilidad y agregación de las PQ a distintos pH. Las cargas de las PQ se neutralizan a pH cercanos a su pI (4,5) y tienden a formar agregados. Sin embargo, es conocido que el tamaño y estructura de los agregados depende no sólo del pH sino también de las condiciones del proceso a los que se somete a las PQ ^{65,66,145}.

Los agregados que se forman a pH 9 y 11 se han visualizado por microscopía electrónica (aumento 3000x y 2500x) y se vio que tienen forma de disco bicóncavo con los agregados más anchos en los extremos ⁵⁷.

La forma en la que las PQ se agregan sería por racimos fractales ya que pequeños agregados van uniéndose entre sí para formar otros de mayor tamaño ¹⁴⁶.

4.1.4. ESPECTRO DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia intrínseca de una proteína se debe exclusivamente a sus residuos aromáticos. Siendo el Trp el que tiene mayor rendimiento cuántico. La

proximidad entre Phe, Tyr y Trp en la estructura de una proteína permite que ocurra transferencia de energía entre Phe y Tyr y entre Tyr y Trp, siendo la fluorescencia del Trp la única que no se transfiere. Por esto, la longitud de onda de emisión y la intensidad de fluorescencia emitida por una proteína son indicadores del entorno de sus Trp y pueden usarse para monitorear cambios estructurales de la misma ¹⁴⁷.

Se realizaron espectros de emisión de fluorescencia a una solución diluída del aislado de PQ en medio Ac 10 mM – Pi 10 mM – Tris 10 mM a pH 9,0 entre 300 y 400 nm, excitando a 280 nm.

Al excitar a 280 nm el espectro obtenido proviene mayoritariamente de la emisión directa de Tyr y Trp, existiendo también contribución de la emisión indirecta de Tyr por transferencia, ya que el pico de emisión de Tyr es alrededor de 300 nm que coincide con la excitación del Trp, alrededor de 290 nm. La forma del espectro de PQ (Figura 4.8) resultó similar a la de los espectros publicados en otros trabajos ⁶². Se observó el máximo del espectro de emisión alrededor de 330 nm y también un “hombro”, alrededor de 360 nm. La posición del máximo de emisión corresponde con el máximo de emisión de los Trp en medio apolar, lo que estará indicando que, a pesar del proceso de aislamiento, las PQ conservan cierta estructura en la que los AA fluorescentes se encuentran protegidos en el interior proteico. Por otra parte, el hombro a 360 nm estaría indicando que también hay una proporción de Trp expuestos al solvente. Esto podría deberse a un cierto desplegamiento de las PQ; de hecho, se ha observado en PV globulares que al desnaturalizarse, el pico de emisión de fluorescencia se desplaza hacia longitudes de onda mayores, mostrando un pico alrededor de 360 nm ¹⁴⁸. Por otra parte, también podría deberse a la presencia de polipéptidos de menor peso molecular, sin estructura terciaria definida. Esto estaría de acuerdo con lo observado en las electroforesis en condiciones desnaturizantes ya que se observaron bandas muy cercanas al frente de corrida.

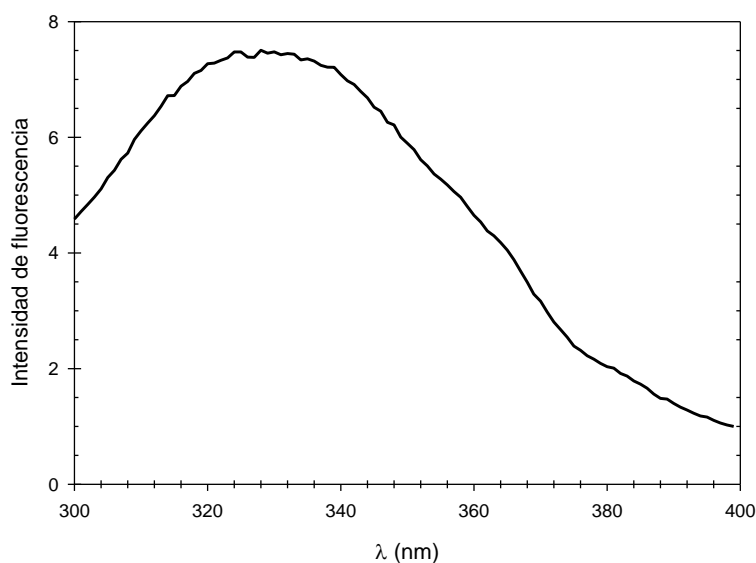


Figura 4.8: Espectro de fluorescencia (300 – 400 nm) de PQ a pH 9. $\lambda_{exc}=280$ nm.

4.1.5. DICROÍSMO CIRCULAR

Las medidas de dicroísmo circular son utilizadas para el análisis de estructuras secundarias de las proteínas. En la Figura 4.9 se muestra el espectro de dicroísmo circular en la región UV lejano de las PQ.

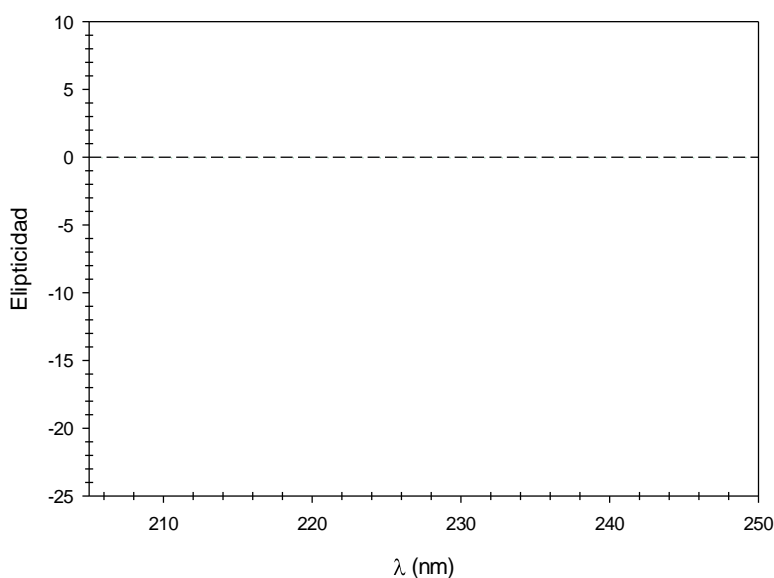


Figura 4.9: Espectro de dicroísmo circular entre 200 y 250 nm de PQ a pH 9,0. Medio Ac 10 mM – Pi 10 mM – Tris 10 mM.

Se analizó el espectro por medio del programa CDPPro para cuantificar el contenido de estructuras secundarias de las PQ a pH 9,0 en medio Ac 10 mM – Pi 10

mM, por comparación con el espectro de 29 proteínas de estructura conocida ¹⁴⁹. Se determinó que las PQ poseen: 44 % de hélice α , 27 % de lámina β , 12 % de ovillo estadístico y 17 % de giros. La proporción de estructura encontrada sugiere que las PQ se encuentran en una conformación nativa, o al menos que no presentan un alto grado de desnaturalización

Los dos mínimos a 208 y 220 nm característicos de la hélice α explican la proporción calculada para este tipo de estructura ¹⁵⁰.

Existen publicaciones en las cuales se informan proporciones de estructura secundaria para PQ, siendo las mismas muy dispares y altamente dependientes de las condiciones del medio. Kaspchak y col. ¹⁵⁰ encontraron una proporción particularmente elevada de hélice α para PQ a pH 7 (98,1% de hélice α y 1,9 % de ovillo estadístico) mientras que a pH 3,5 determinaron 56,1 % de hélice α , 2,9 % de lámina β , 15,3 % de giro y 25,7 % de ovillo estadístico. Por otro lado, Mäkinen y col. ⁶⁷ informaron que la proporción de estructura secundaria de PQ en medio alcalino es: 16,7 % de hélice α , 30,4 % de lámina β , 17,2 % de giro β y 35,7 % de ovillo estadístico. Esta última publicación presenta resultados más similares a los aquí mostrados, aunque indican que estos autores han trabajado con PQ con un mayor grado de desnaturalización que la utilizada en este trabajo.

4.1.6. DIÁMETRO HIDRODINÁMICO

Se determinó la distribución de tamaños de partícula de las PQ solubles por dispersión dinámica de luz. En la Figura 4.10 se muestra el D_h (diámetro hidrodinámico medio) a distintos pH.

A partir de la Figura 4.10 puede inferirse que en todo el rango de pH ensayado se encuentran en solución agregados proteicos de gran tamaño. Esto también ha sido informado por otros autores, que han detectado la formación de agregados de PQ por cromatografía de exclusión molecular ⁶⁷.

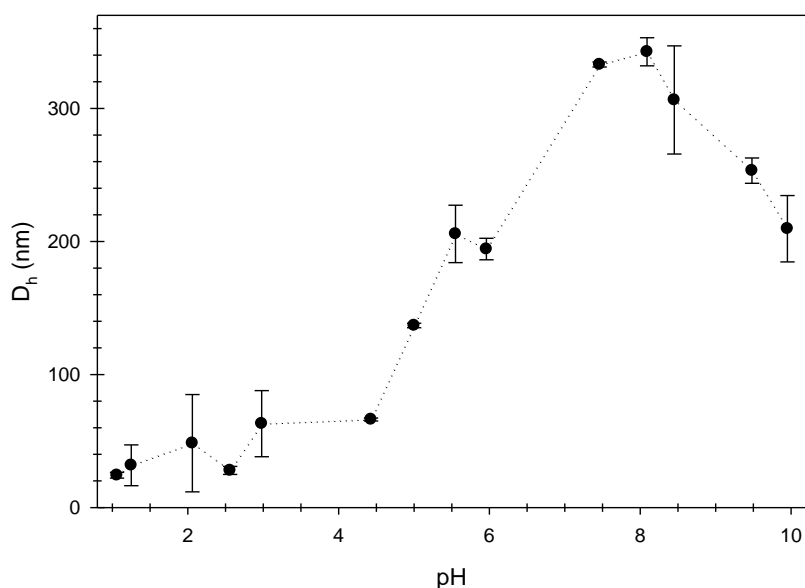


Figura 4.10: Tamaño de partícula (D_h) de PQ a distintos pH. Medio Ac 10 mM – Pi 10 mM – Tris 10 mM.

Por otra parte, se observa una gran dependencia del D_h de los agregados solubles con el pH del medio: el D_h es menor en medio ácido mientras que a pH alcalino se observan partículas de mayor tamaño. En las distribuciones de D_h no se observaron los grandes agregados que se vieron por microscopía confocal en la Figura 4.7 a pH ácidos, ya que en las mediciones de D_h se trabajó con la fracción soluble, luego de centrifugar la muestra. De esta manera, a pH ácido los agregados proteicos característicos de las PV globulares fueron visualizados mediante microscopía, y mediante dispersión de luz. Se obtuvo información acerca del tamaño de los agregados de las PQ solubles.

4.1.7. POTENCIAL ζ

El potencial ζ es una medida de la magnitud de la carga eléctrica de partículas coloidales. La magnitud del potencial ζ brinda información acerca de la estabilidad de un sistema coloidal ¹⁵¹ ya que define las fuerzas electrostáticas repulsivas, y por lo tanto, la capacidad de agregación o floculación de las partículas. Se determinó el potencial ζ de muestras de PQ solubles a distintos pH por dispersión dinámica de luz.

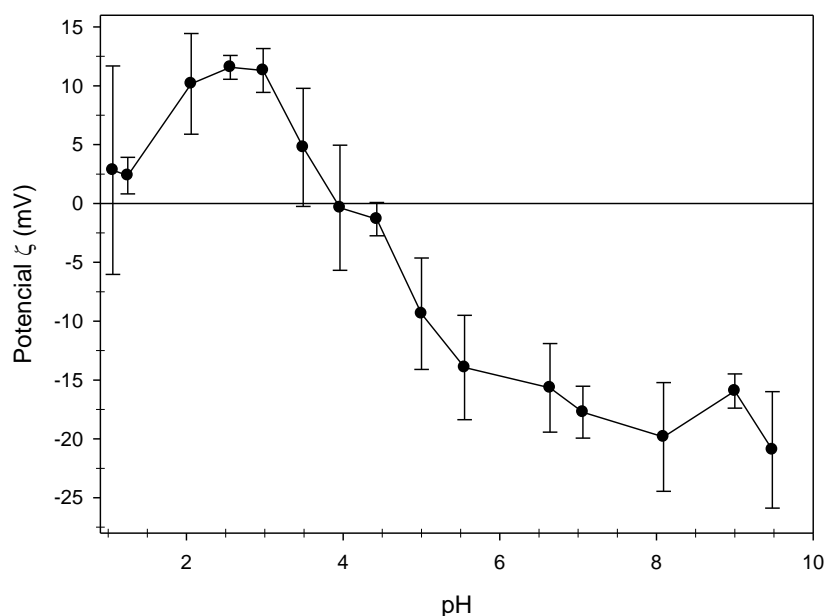


Figura 4.11: Medidas de potencial ζ de PQ a distintos pH en medio Ac 10 mM – Pi 10 mM – Tris 10 mM.

Los resultados de la Figura 4.11 sugieren que las PQ tienen carga neta positiva a pH menores a 4, con un valor potencial ζ de hasta +15 mV. Por otra parte, a pH más alcalinos las PQ tienen un potencial ζ negativo de hasta -25 mV a pH 9,5, indicando que las mismas estarían cargadas negativamente en este rango de pH. Alrededor de pH 4, la magnitud del potencial ζ fue casi nula, indicando que a este pH todas las cargas de las PQ estarían neutralizadas, lo que podría favorecer su agregación. Los resultados obtenidos son comparables a los publicados por otros autores ⁶⁵.

Se aislaron PQ a partir de la HQ comercial por medio de solubilización alcalina (a pH 9,0) y precipitación isoiónica (a pH 4,5) con un rendimiento de alrededor de 10 %. Las PQ obtenidas presentaron estructuras secundaria y terciaria características de proteínas globulares. Se determinó que las PQ tienen la capacidad de formar agregados de alrededor de 300 nm a pH alcalino y su potencial ζ se anula alrededor de pH 4.

4.2. HIDROLIZADOS ENZIMATICOS DE QUINOA

En esta sección se muestran los estudios de los hidrolizados de proteínas de quinoa (HPQ) producidos por una peptidasa de *A. niger*. En primer lugar, se detalla la obtención y caracterización parcial de las enzimas proteolíticas producidas por *A. niger* por fermentación en estado sólido. Luego, se describen algunas de las propiedades estructurales y biológicas de los hidrolizados como su tamaño, hidrofobicidad superficial, emisión de fluorescencia, solubilidad, grado de hidrólisis y potencial antioxidante.

4.2.1. OBTENCIÓN DE LAS ENZIMAS PROTEOLITICAS

El estudio de exploración para la producción de la peptidasas de *A. niger* (PA) por fermentación en estado sólido usando como sustratos una mezcla de cáscara de naranja (CN) y cascarilla de soja (Cs) se realizó en trabajos previos, usando un diseño de experimentos ¹¹⁰. En este trabajo de tesis se procedió con la fase optimización y validación de las condiciones de cultivo de *A. niger* para la obtención de la enzima con AP.

4.2.1.1. Optimización y validación de la producción de enzima

Los factores determinantes para la producción de PA encontrados en la fase de exploración fueron el pH inicial y la concentración de NaNO₃ como fuente adicional de nitrógeno en el MB.

Se midió la actividad proteolítica de los EFE utilizando PQ como sustrato, mediante el protocolo descrito previamente y los resultados obtenidos fueron procesados para obtener un modelo predictivo de superficie de respuesta que se muestra en la Figura 4.12.

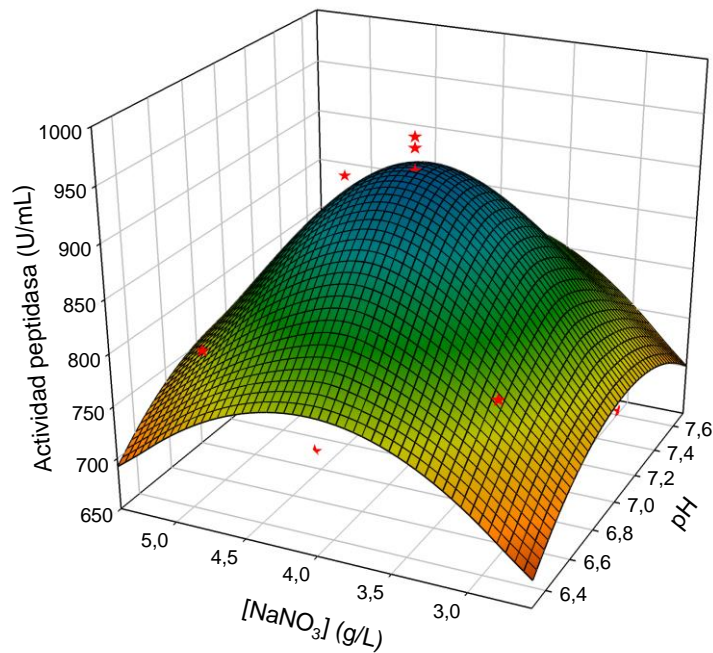


Figura 4.12: Superficie de respuesta de la actividad peptidasa en función del pH y concentración de NaNO_3 . Los datos experimentales se muestran con estrellas rojas.

Por ajuste de los datos experimentales se obtuvo la siguiente ecuación, que modela el efecto del pH y la concentración de NaNO_3 (g/L) en el MB sobre la AP.

$$AP \left(\frac{U}{mL} \right) = -13430 + 3669\text{pH} + 713,5[\text{NaNO}_3] - 260,4\text{pH}^2 - 88,66 [\text{NaNO}_3]^2$$

Ecuación 4.1

A partir de la ecuación 4.1 y de la Figura 4.12 se desprende que la AP se maximiza hacia el centro del espacio muestral ensayado. Tanto el pH como la concentración de NaNO_3 incidieron sobre la AP y se encontró que las mejores condiciones de fermentación resultaron cuando el MB tuvo un pH neutro (pH 7,05) y una concentración intermedia de NaNO_3 (4,03 g/L).

Para validar la optimización se realizaron, por quintuplicado, fermentaciones en las condiciones determinadas y la AP obtenida resultó (1000 ± 100) U/mL, rango incluye a 929 U/mL, el valor de la AP predicha por el modelo.

4.2.1.2. Determinación de las condiciones de pH y temperatura de hidrólisis

Para evaluar la actividad enzimática de las PA sobre las PQ, se determinaron pH y temperatura óptimos así como los rangos de pH y temperatura de estabilidad de las PA obtenidas por fermentación en estado sólido.

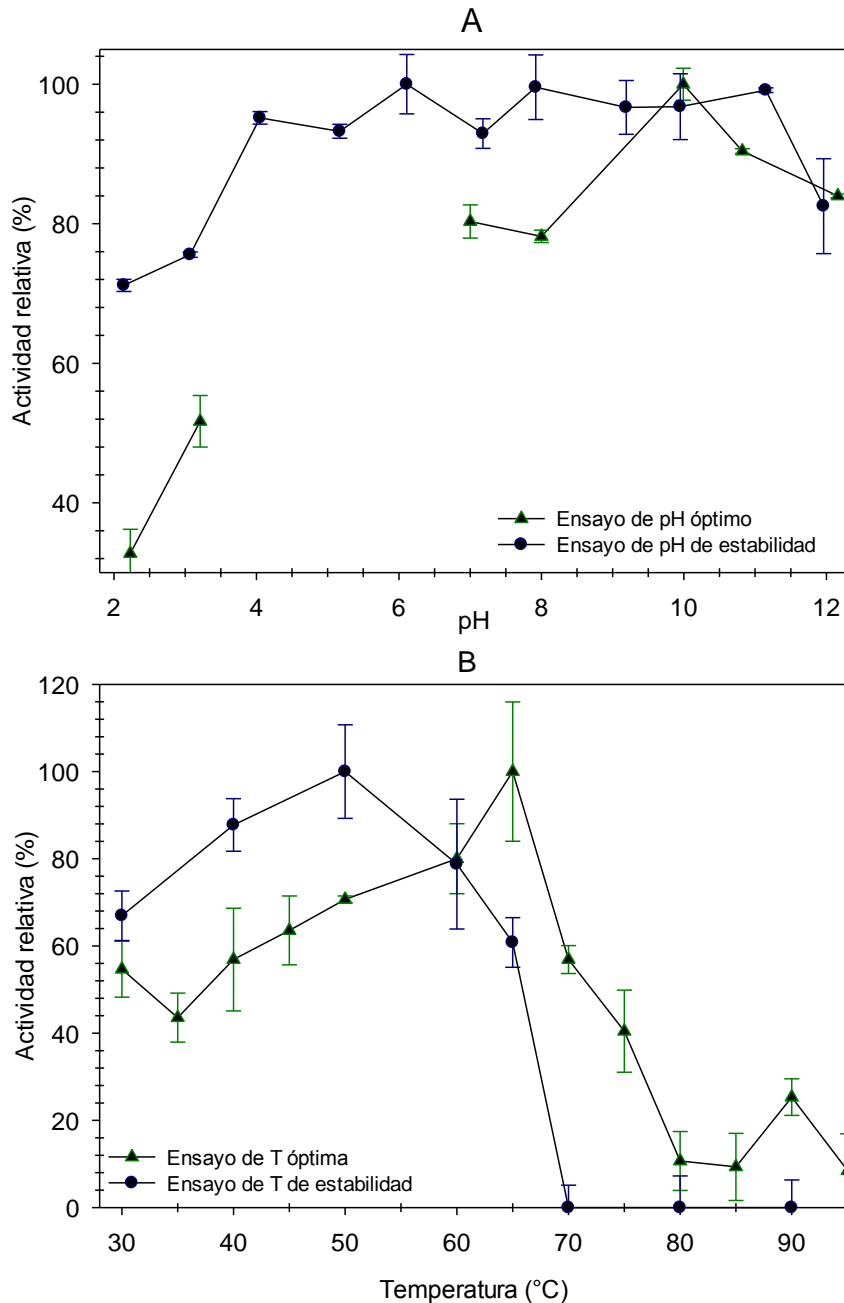


Figura 4.13: A) Actividad proteolítica y estabilidad de la AP de los EFE en función del pH. Temperatura 37 °C. B) Efecto de la T y estabilidad térmica de la AP de los EFE. Actividad determinada a pH 9,1.

En la figura 4.13 A se observan los resultados del ensayo de la determinación del pH óptimo. La AP resultó mayor a pH alcalinos, el pH óptimo fue 10 resultando

superior a 80 % en el rango de pH 7 a 12. Se han informado resultados similares para algunas peptidasas comerciales de microorganismos que tienen una actividad máxima en el rango de pH entre 8 y 12 ¹⁵². Hacia pH muy ácidos la AP disminuye debido a que disminuye la solubilidad de las PQ. No se ensayaron valores de pH comprendidos entre pH 3,2 y 7,0 debido a la insolubilidad de las PQ en este rango.

Por otra parte, respecto de la estabilidad, las PA retuvieron alrededor del 80 % de su actividad luego de una incubación durante 1 h a distintos pH en el rango de pH de 4 a 11.

En la Figura 4.13B, se muestran los resultados del ensayo de determinación de la temperatura óptima en el rango de 30 a 95 °C a pH 9,1. El rango de temperatura de mayor actividad fue de 40 a 70 °C, la temperatura óptima fue de 65 °C, similar a la encontrada para las peptidasas de *Bacillus spp.* ^{153,154} aunque más alta que la temperatura óptima informada para peptidasas purificadas de *Aspergillus spp.* ^{155,156}.

Las PA presentes en los EFE mostraron estabilidad por 60 minutos en el rango de 30 – 65 °C encontrándose la mayor actividad peptidasa cuando la PA se incubó a 50 °C. Por encima de 65 °C la AP decayó abruptamente en las condiciones ensayadas.

Las PA obtenidas por fermentaciones en estado sólido en las condiciones optimizadas serían peptidasas alcalinas, aunque se requiere de estudios utilizando inhibidores específicos para confirmar esta hipótesis.

4.2.2. PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE LOS HPQ

4.2.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes de los HPQ obtenidos a distintos tiempos de hidrólisis (0 - 0,25 – 0,5 – 1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6 horas).

La calle 1 del gel de electroforesis en condiciones desnaturizantes (Figura 4.14), correspondiente al control de las PQ adicionadas con PA, sin hidrolizar. Se observaron bandas de polipéptidos de bajo peso molecular, por debajo de 14 kDa, cuyas intensidades y definición en la calle van disminuyendo a medida que transcurre el tiempo de reacción (hacia la derecha), lo cual podría indicar que hay una hidrólisis de las PQ por la cual la intensidad de las bandas disminuye ya que los péptidos se hacen más pequeños. Se observaron bandas menos intensas de peso molecular de

aproximadamente 30 a 20 kDa que aparecen en tiempos de hidrólisis cortos (hasta las 2 horas) y desaparecen a tiempos mayores de hidrólisis. A tiempos de hidrólisis de 5 y 6 horas, no se detectaron bandas (calles 9 y 10) lo que indicaría que los productos de hidrólisis a estos tiempos tienen tamaños menores a 6,5 kDa y podrían estar migrando junto al frente de corrida.

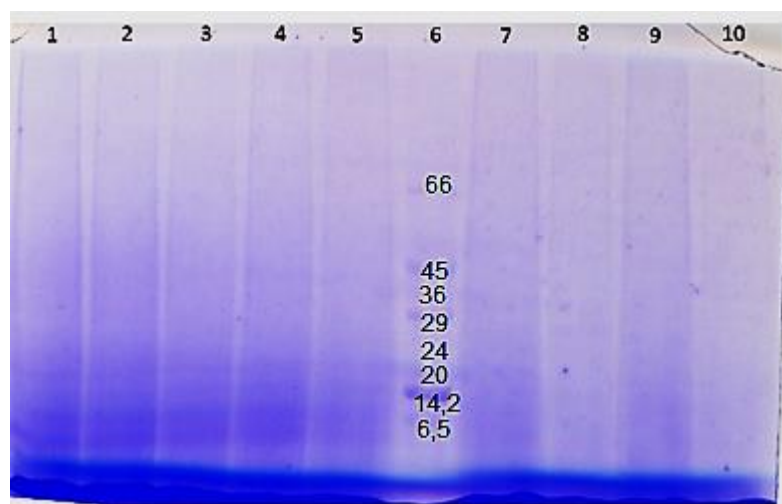


Figura 4.14: Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. HPQ. 1-5) 0; 0,25; 0,5; 1 y 2 h de hidrólisis. 6) MPM de bajo rango (Sigma). 7-10) 3; 4; 5 y 6 h de hidrólisis. Hidrólisis enzimática con PA a 37 °C y pH 7,0. Acrilamida: concentración del gel de concentración 13 % y gel de concentración de resolución 17 %.

Aún cuando el control a tiempo 0 de reacción muestra péptidos de baja masa molecular, el PM de las muestras tratadas con PA es menor.

4.2.2.2. Espectros de fluorescencia

Se realizaron espectros de emisión de fluorescencia de los HPQ a distintos tiempos de hidrólisis. En la Figura 4.15 se muestran los espectros de los HPQ donde se observó una disminución en la intensidad de fluorescencia y un corrimiento de los picos de emisión hacia longitudes de onda mayores a medida que transcurre el tiempo de hidrólisis de las PQ. Se observó que el pico menos intenso a 360 nm, que también está presente en el espectro de emisión de PQ, se torna más importante en relación al pico a menor longitud de onda al aumentar el tiempo de hidrólisis. El corrimiento hacia longitudes de onda mayores se da porque los AA aromáticos de las PQ pasan de un entorno apolar o hidrofóbico a otro polar o hidrofílico debido a que presentan una mayor exposición al solvente. El cambio en la polarizabilidad del medio también afecta la intensidad de fluorescencia: una mayor accesibilidad al solvente produce un aumento de los mecanismos de desexcitación no radiante.

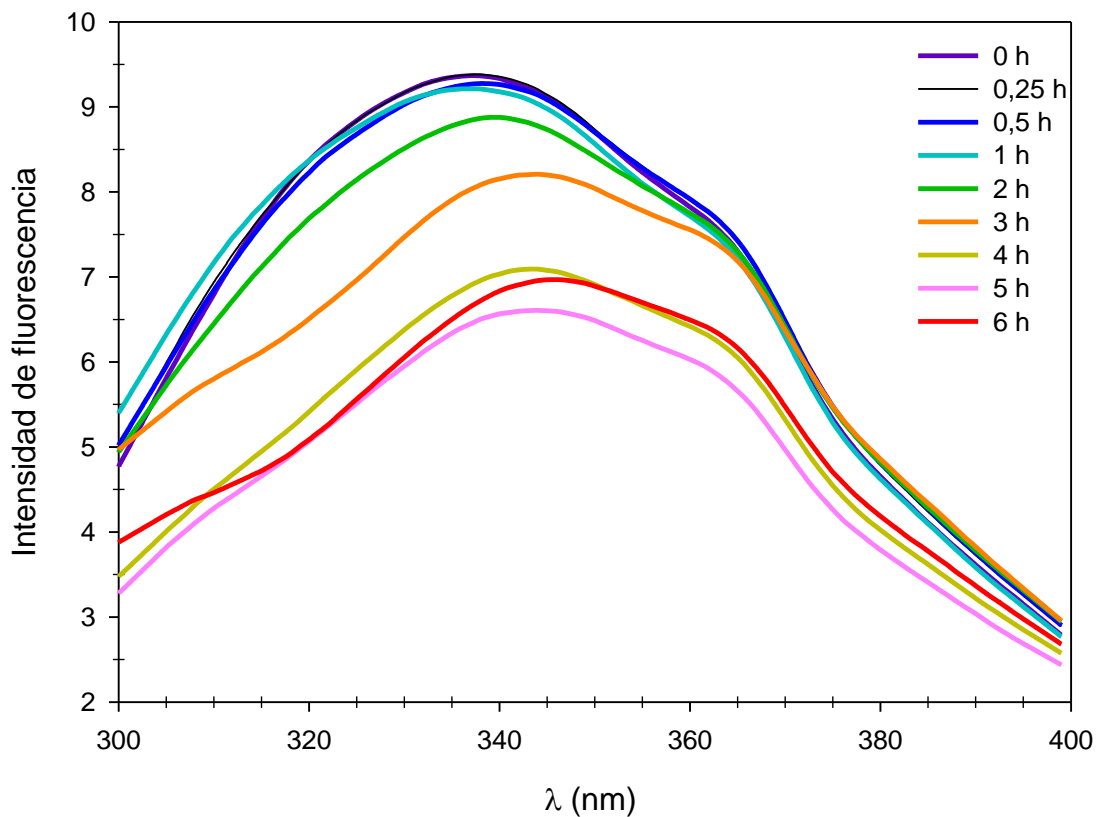


Figura 4.15: Espectros de emisión de fluorescencia de los HPQ a distintos tiempos de hidrólisis. $\lambda_{em} = 300 - 400 \text{ nm}$. $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$.

4.2.1.1. Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) es la propiedad fundamental de un hidrolizado y determina en gran medida las características del mismo y, por lo tanto, su posible uso. Se define como la relación entre la cantidad de grupos amino libres en el hidrolizado respecto del total de grupos amino en la muestra. El GH está determinado por las condiciones: concentración de sustrato, relación enzima/sustrato, tiempo de incubación, pH y temperatura. Otro factor importante y determinante en la hidrólisis es la naturaleza de la enzima proteolítica que es caracterizada por su especificidad, que le otorga características particulares a los péptidos producidos ¹⁵⁷.

Los hidrolizados que se producen para su uso en la alimentación se pueden clasificar según su grado de hidrólisis: bajo (1 – 10 %), que mejoran las propiedades funcionales; variable, para su uso como saborizantes; y extensivos (> 10 %), para su uso en alimentación especializada ⁶⁸.

Se determinó el grado de hidrólisis (GH) de los HPQ. Los resultados son presentados en la Figura 4.16, como porcentajes de hidrólisis respecto a la hidrólisis ácida de PQ. Se observó un aumento a medida que aumenta el tiempo de la reacción hasta llegar a un 24 % a las 6 horas, indicando que estos HPQ pueden ser útiles para la alimentación especializada pero no mejoran las propiedades funcionales.

4.2.1.2. Hidrofobicidad superficial

Se observó una disminución de la S_0 de los HPQ a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis, alcanzando un valor de 53 % a las 6 horas (Figura 4.16). Esto indica que la superficie hidrofóbica de las PQ disminuye, lo que sugiere que algunos de los sitios de unión a la sonda ANS desaparecen debido a la hidrólisis de los mismos.

4.2.1.3. Solubilidad

En la Figura 4.16 se observa que la concentración de péptidos solubles a pH 4,5 aumentaron con el GH, llegando a un valor de 13,34 g/L a las 6 horas de hidrólisis. Esto puede ser debido a que se producen péptidos de bajo peso molecular a medida que aumenta el GH o bien a que los péptidos obtenidos poseen distinto pI por lo que podría estar portando carga neta a este pH, lo que favorecería su solubilidad.

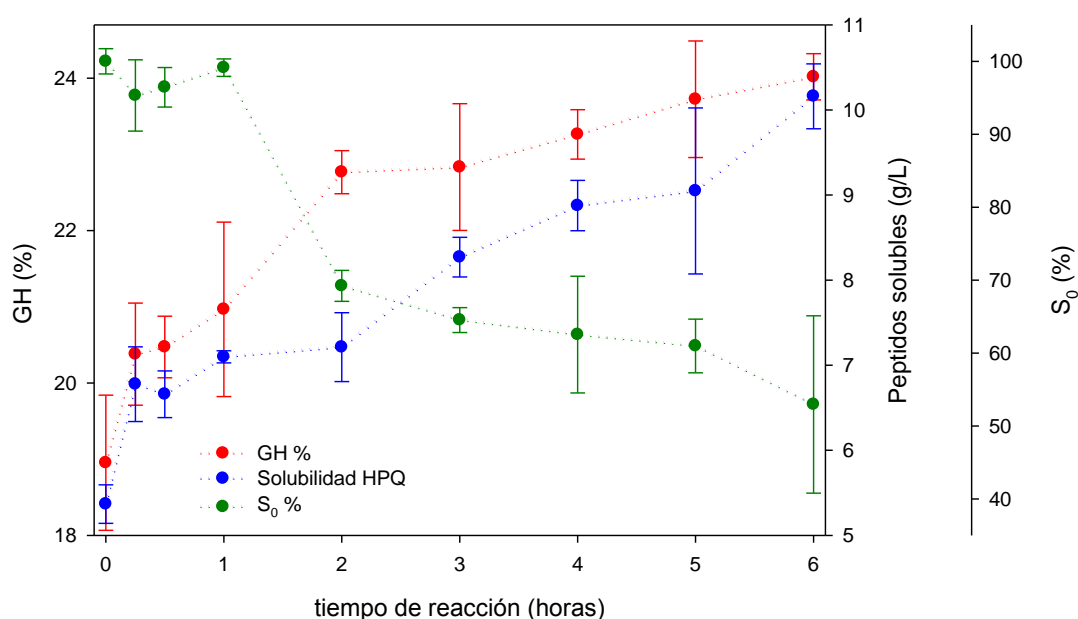


Figura 4.16: Solubilidad a pH 4,5; S_0 y GH en función del tiempo de reacción. Estandarizando un 100% de hidrólisis con los hidrolizados producidos por hidrólisis ácida.

4.2.2. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS HPQ

4.2.2.1. Actividad antioxidante

Los antioxidantes potencialmente desactivan los radicales libres minimizando el deterioro de alimentos así como el daño al organismo ¹⁵⁸. La actividad antioxidante *in vitro* de una muestra se suele determinar con al menos dos métodos, lo cual puede dificultar el análisis de los resultados.

Los ensayos utilizados en esta tesis fueron captura del radical ABTS[•] y reducción de DPPH[•], los cuales están basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno ¹⁵⁹. En la Figura 4.17 se observa un aumento de la actividad antioxidante determinada por la captura de radicales ABTS[•] a medida que aumenta el GH, de hecho, cuando el GH fue máximo, el HPQ mostró la mayor actividad antioxidante.

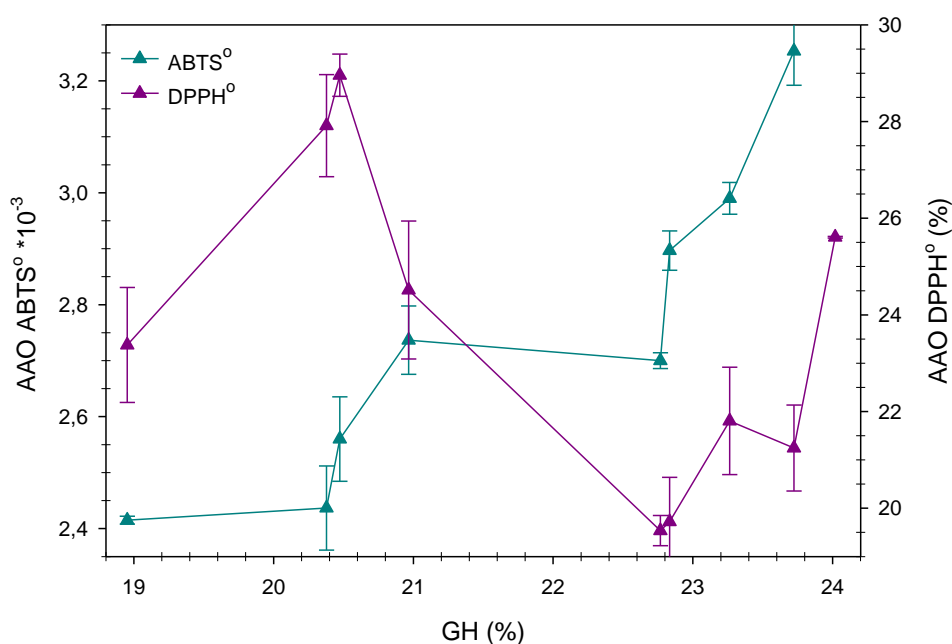


Figura 4.17: Actividad antioxidante de captura del radical ABTS[•] y DPPH[•] en función del grado de hidrólisis.

Sin embargo, no se observó una correlación, estadísticamente significativa, entre el GH y la actividad antioxidante determinada por captura del radical DPPH[•]. En la Figura 4.17 se observa un máximo de 29 % de actividad antioxidante para los HPQ obtenidos por hidrólisis durante 30 minutos. La capacidad de captura de radical DPPH[•] de los HPQ obtenidos en los tiempos ensayados resultó entre 20 y 30 %. Si bien se han publicado artículos en los cuales se reportan valores de poder

antioxidante con DPPH^{*} de 60 – 85 % en extractos etanolicos de quinoa, y de 72 % para la quinoa boliviana hidrolizada ¹⁶⁰, los resultados mostrados son comparables con los obtenidos para las PQ tratadas con alcalasa ¹⁶¹.

Se optimizaron las condiciones de fermentación en estado sólido para obtener PA. Se obtuvieron HPQ por tratamiento con la PA obtenida cuyas propiedades fisicoquímicas dependieron del GH, que estuvo determinado por el tiempo de reacción. La AAO de los HPQ generados con PA fue aceptable. Una caracterización de la composición peptídica de los HPQ podría ayudar a comprender mejor qué secuencias peptídicas son responsables de la AAO. En el futuro se podría evaluar la AAO de estos HPQ sobre un alimento, de manera tal de evidenciar la existencia de un mejoramiento del mismo frente a la oxidación o diversas propiedades funcionales como la estabilización de espumas o estabilización de emulsiones. Además, sería necesaria una evaluación de los HPQ in vivo para determinar su efecto en el organismo.

4.3. INTERACCIÓN ENTRE LAS PQ Y POLIELECTROLITOS

La interacción entre proteínas y polielectrolitos ha sido estudiada exhaustivamente por muchos autores con diversos intereses ^{136,162}. La interacción proteína – polielectrolito puede dar lugar a complejos solubles o macroagregados insolubles, dependiendo de las condiciones del medio. La interacción de las PQ con diversos PS puede permitir la modificación de las propiedades funcionales de las mismas para su uso en alimentos. Con el objetivo de mejorarlas, se estudió el efecto de cuatro PS alimentarios sobre algunas propiedades fisicoquímicas y funcionales de las PQ.

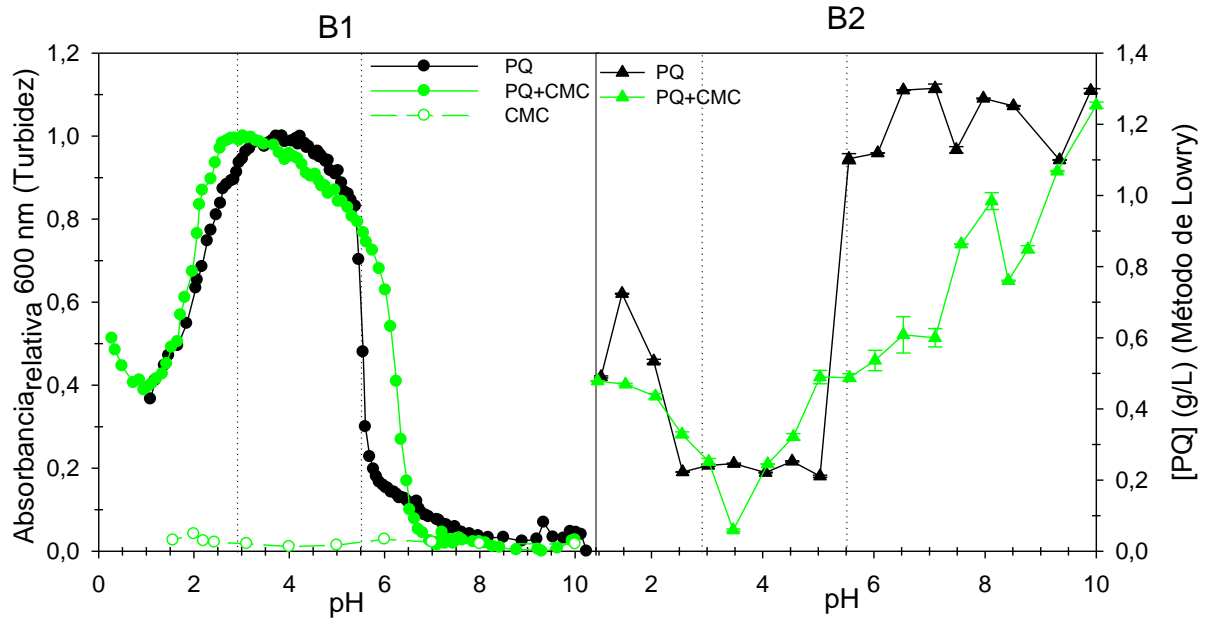
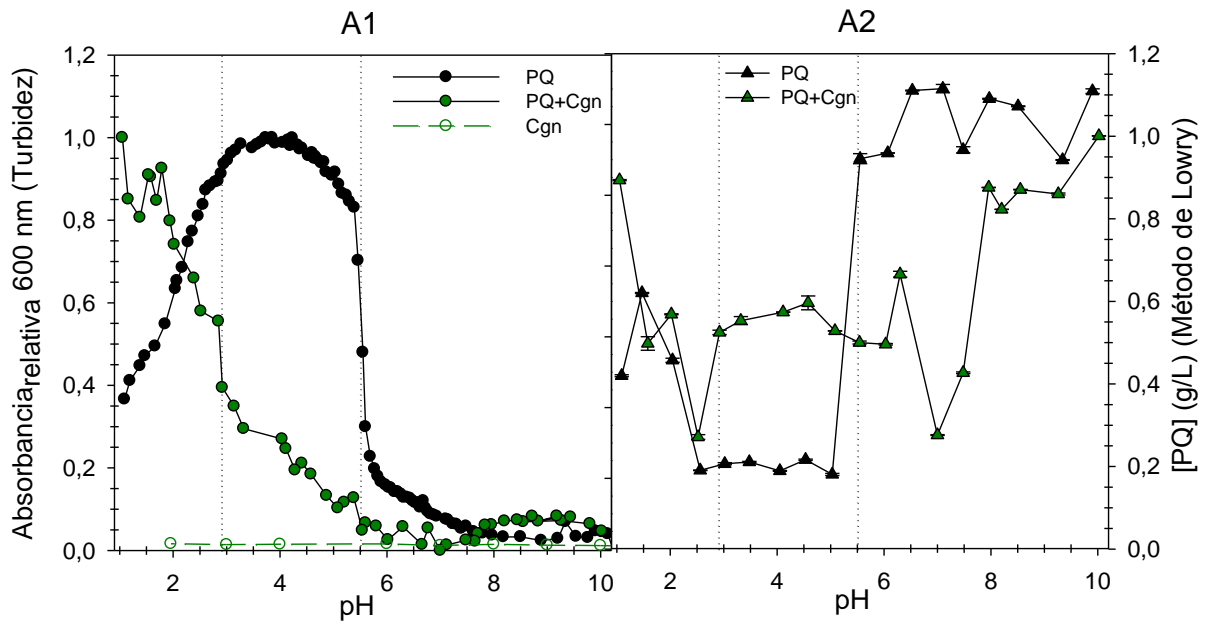
Se seleccionaron cuatro PS alimentarios con carga eléctrica: quitosano (CS); alginato (Alg); carboximetilcelulosa (CMC) y ι -carragenano (Cgn).

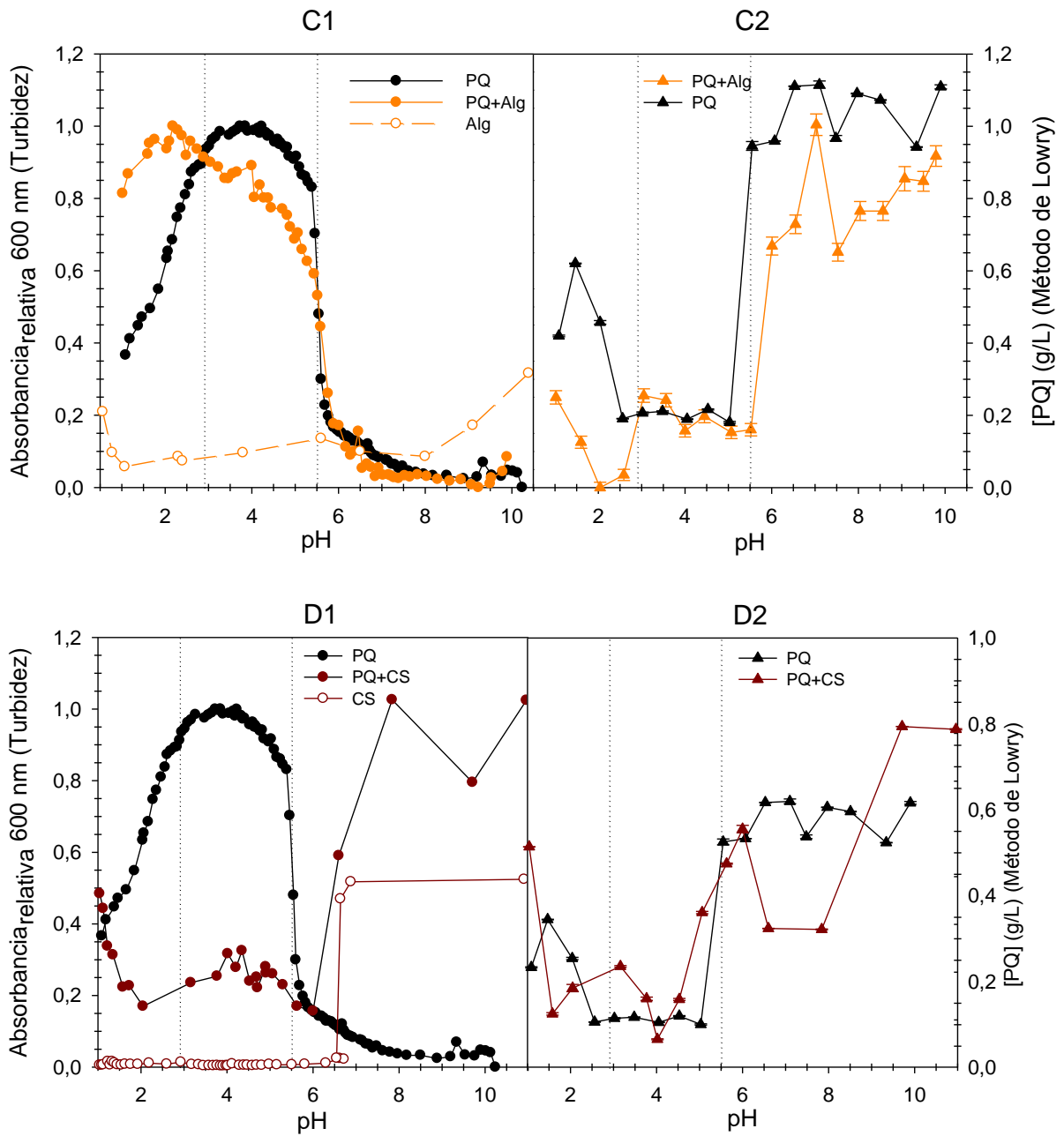
En este capítulo se estudió la interacción entre las PQ y los PS elegidos, se determinaron las propiedades de los coacervados formados como diámetro hidrodinámico de partícula, potencial ζ , el cambio que se producen en los espectros de fluorescencia, hidrofobicidad superficial y, usando métodos computacionales, se determinó el rango de pH de interacción entre la chenopodina (Ch) y los polímeros cargados electricamente (PC).

4.3.1. SOLUBILIDAD

Se obtuvieron curvas de titulación turbidimétricas determinando la absorbancia a 600 nm y se cuantificaron las proteínas solubles (centrifugando 20 min a 1000 g) de las mezclas de PQ y los cuatro PS: CS, Alg, CMC y Cgn. En la Figura 4.18 se muestran las curvas de titulación turbidimétricas y la concentración de PQ soluble en función del pH para todos los sistemas ensayados.

Como se observa en la Figura 4.18 D, el CS resulta soluble a pH menor a 6,5 mientras que por encima de este pH se insolubiliza debido a la neutralización de sus grupos amonio, de acuerdo a lo reportado previamente ¹⁶³. El resto de los PS estudiados resultaron solubles en todo el rango de pH estudiado, como fue previamente informado por otros autores ^{23,88,90}.





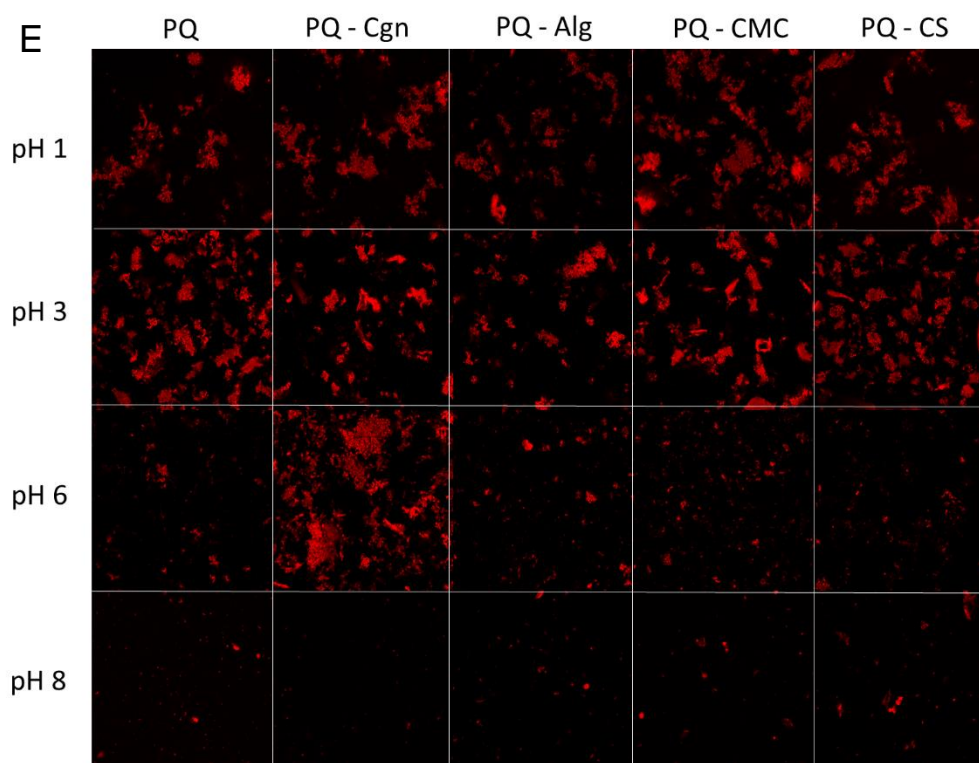


Figura 4.18: Curvas de titulaciones turbidimétricas (1) y de solubilidad de las PQ (2, método de Lowry) en presencia de los distintos PS en medio Ac 10 mM – Pi 10 mM – Tris 10 mM a temperatura ambiente. Los triángulos representan a la concentración de proteínas en el SN mientras que los círculos representan a la turbidez del sistema. Los símbolos negros representan a los sistemas compuestos por PQ en ausencia de PS, los de color verde oscuro representan los sistemas compuestos por PQ y Cgn, los de color verde claro representan los sistemas compuestos por PQ y CMC, los de color naranja representan a los sistemas compuestos por PQ y Alg, los de color rojo representan los sistemas compuestos por PQ y CS. Los símbolos vacíos representan la turbidez de los PS. A) Mezclas PQ – Cgn, B) Mezclas PQ – CMC, C) Mezclas PQ – Alg, D) Mezclas PQ – CS. E) Imágenes obtenidas por microscopía confocal de las muestras PQ + PS a distintos pH.

Como se discutió anteriormente, la solubilidad de las PQ es altamente dependiente del pH del medio. La presencia de PS alteró de manera diferencial la solubilidad de las PQ. Sin embargo, puede identificarse una tendencia general, dependiente del rango de pH:

- Entre 1 y 2,9, las muestras conteniendo PS ácidos resultaron igual o más turbias que las muestras de PQ, lo que podría corresponderse a que la presencia de PS ácidos da lugar a agregados de mayor tamaño o de menor solubilidad. En la Figura 4.18 se observa que la presencia de PS en este rango produjo una leve modificación de la solubilidad de las PQ.

- Entre 2,9 y 5,5, la turbidez de las muestras conteniendo PS resultó menor que la de la muestra de PQ, siendo la solubilidad de PQ aún en presencia de los PS muy baja.
- Entre 5,5 y 10 la presencia de los PS produjo una disminución de la solubilidad de las PQ. Particularmente, la presencia de CS produjo un significativo incremento de la turbidez del sistema en este rango.

Se denominó a cada uno de estos rangos de pH como R1, R2 y R3 respectivamente y se indicó el límite entre ellos como líneas punteadas en la Figura 4.18. Debido a que, más allá del efecto diferencial de cada uno de los PS sobre la turbidez y la solubilidad de las PQ se encuentra una tendencia general, puede inferirse que estos rangos de pH dependen mayoritariamente de las características de las PQ y no de los PS ensayados ⁹⁹. El efecto de la presencia de PS sobre la solubilidad de PQ puede explicarse considerando que cuando ambas macromoléculas poseen carga eléctrica de signo contrario, las mismas se atraerán electrostáticamente. Esto es lo que ocurre en la región R1 para el sistema PQ – Cgn. Este mismo efecto se observa para Alg y CMC pero a pH extremadamente ácidos (por debajo de su pKa), los mismos pierden su carga negativa y la atracción electrostática disminuye. En la región R2 las PQ se encuentran cercanas a su pl y poseen baja solubilidad. Sin embargo, la presencia de PS favorece levemente su solubilidad probablemente debido a que cuando los PS interactúan con los agregados de PQ, les confieren carga eléctrica del mismo signo y aumentan su estabilidad en suspensión. Cuando las PQ poseen cargas del mismo signo que las cargas del PS, pueden ocurrir dos fenómenos: ausencia de interacción o agregación por exclusión ¹⁶⁴. Considerando que la solubilidad de PQ se vio disminuida por la presencia de Cgn, Alg y CMC en R3 y por la presencia de CS en R1, puede inferirse que la presencia de estos PS favorecería la agregación de las PQ por exclusión.

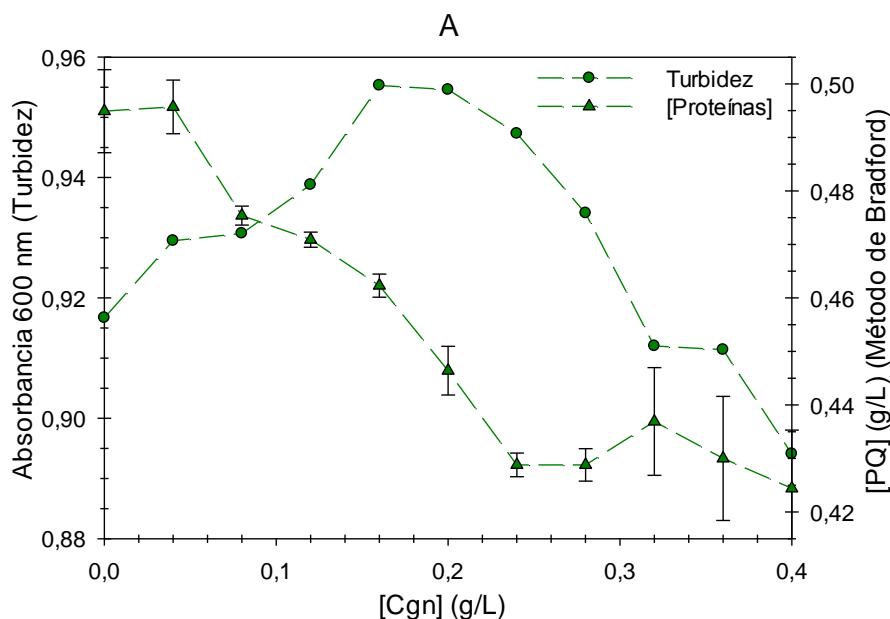
Para estudiar mejor el comportamiento de una proteína en un sistema alimenticio complejo se puede combinar la caracterización fisicoquímica con ensayos de microestructura. Para ello, se tomaron imágenes en solución de las mezclas de PQ con los PS estudiados a distintos pH (1, 3 y 6), teñidos con Rodamina B. En la Figura 4.18 se observan los resultados donde se puede visualizar la formación de agregados de distintos tamaños y compactación en las muestras.

Las soluciones de las mezclas a pH 3 (R2) es donde se observaron las partículas más grandes ya que las PQ son insolubles y se forman agregados al neutralizar sus cargas por coalescencia. Para las mezclas de PQ con CS, Alg y CMC se observaron agregados a pH 1 y 3 (R1 y R2), y para el Cgn se ven agregados en todos los pH. Los agregados de PQ en presencia de Cgn observados a pH 3 (pH cercano al pI de las PQ) tienen una forma más compacta en todos los sistemas que los agregados que se observan a pH 1 ó 6.

Para poder estudiar el efecto diferencial de PS con cargas eléctricas positiva y negativa se estudiaron las interacciones de PQ con Cgn (PS que puede cargarse negativamente) y CS (PS que puede cargarse positivamente). El Cgn se encuentra cargado negativamente en todo el rango de pH trabajado (1 a 10) y el CS posee carga positiva hasta pH 6,5 (pKa).

4.3.2. TITULACIONES CON POLISACÁRIDOS

Para determinar la relación de concentraciones a la cual se maximiza el efecto de Cgn y CS sobre la solubilidad de las PQ, se midió la turbidez (absorbancia a 600 nm) durante la titulación de una solución de PQ 0,5 g/L a pH 6 en medio Ac 10 mM – Pi 10 mM – Tris 10 mM con cada uno de los PS, y se determinó la concentración de PQ solubles en el SN luego de centrifugar. Se hicieron las titulaciones a pH 6 ya que a este pH se observó interacción de ambos PS con las PQ.



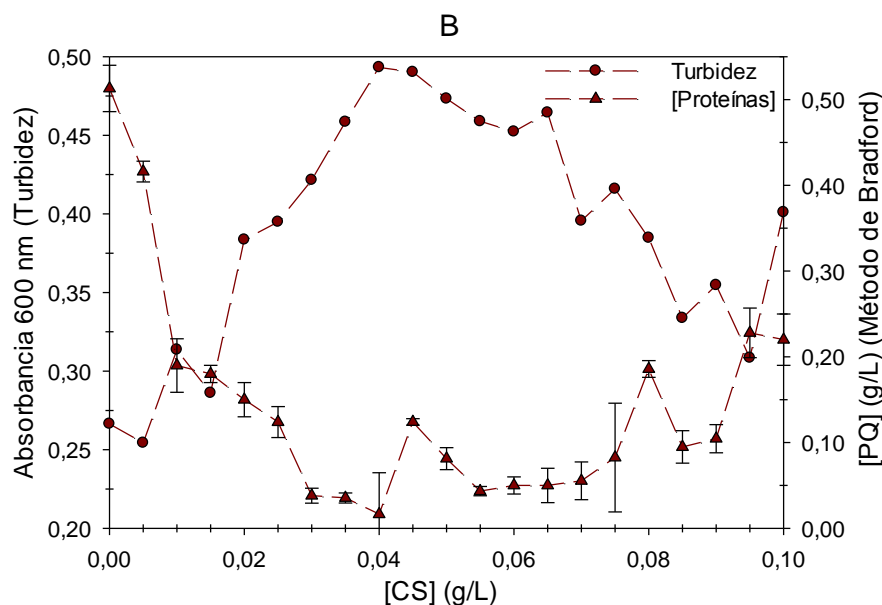


Figura 4.19: Curva de titulación de PQ (0,5 g/L) con A) Cgn y B) CS en medio Ac 10 mM – Pi 10 mM – Tris 10 mM pH 6 a temperatura ambiente. Los triángulos representan a la concentración de proteínas en el SN mientras que los círculos representan a la turbidez del sistema. Los símbolos de color verde oscuro representan los sistemas compuestos por PQ y Cgn y los de color rojo representan los sistemas compuestos por PQ y CS.

En ambos casos la turbidez de las suspensiones de PQ se incrementó al adicionar PS al medio. Esto puede deberse a la disminución de la solubilidad de las PQ en presencia de los PS o bien al aumento de tamaño de los agregados solubles. En ambos casos se observó un máximo en la turbidez, que se correspondió con una concentración de 0,16 g/L de Cgn y 0,04 g/L de CS (Figura 4.19). Concentraciones mayores de PS produjeron una disminución de la turbidez, que podría deberse a la redisolución de la fracción insoluble, a la sedimentación de los agregados de gran tamaño ¹⁶⁵ o a la modificación del estado de agregación de las proteínas ¹⁶⁶. Para determinar qué fenómeno produce la disminución de la turbidez, se midió concentración de proteínas, por el método de Bradford, en el SN luego de centrifugar. La concentración de PQ en el SN disminuyó al incrementarse la concentración de PS en el medio, indicando que no ocurre una resolubilización sino que la disminución de la turbidez puede ser explicada considerando la sedimentación de los macroagregados.

4.3.3. DIÁMETRO HIDRÓDINAMICO

Se determinó el D_h de PQ (0,5 g/L) en ausencia y presencia de Cgn y de CS en las concentraciones correspondientes al máximo de turbidez de las curvas de titulación (Figura 4.19) en el rango de pH 1 – 10.

La Figura 4.20 muestra el efecto del pH sobre el tamaño de las partículas en suspensión. Las PQ forman agregados solubles de tamaño ~300 nm a pH alcalino, característicos de las proteínas globulares vegetales. A pH ácido, el tamaño de los agregados solubles de PQ es menor a 100 nm.

Para las mezclas PQ – Cgn se observaron dos curvas en el rango de pH ensayado: una población con tamaños de partícula menores (<100 nm) y otra población con tamaños mayores (200 – 350 nm). En ambas poblaciones, el tamaño se incrementa cuando el medio se alcaliniza hasta pH 8.

En las regiones R1 y R2, el D_h de las partículas de menor tamaño de los sistemas PQ – Cgn coincide con el de los agregados solubles de PQ para pH menores a 5. Esto podría indicar que la población de menor tamaño en los sistemas PQ – Cgn consiste en agregados solubles de PQ. Por otra parte, la población de mayor D_h podría consistir en agregados mixtos PQ – Cgn, formados por atracción electrostática. En el rango R3 la población de mayor D_h presentó tamaño similar al de la PQ, sugiriendo que en este rango de pH la población de mayor tamaño corresponde a macroagregados solubles de PQ. Por otra parte, se determinaron los tamaños de una solución de Cgn (puntos vacíos) y los mismos resultaron por debajo de 50 nm.

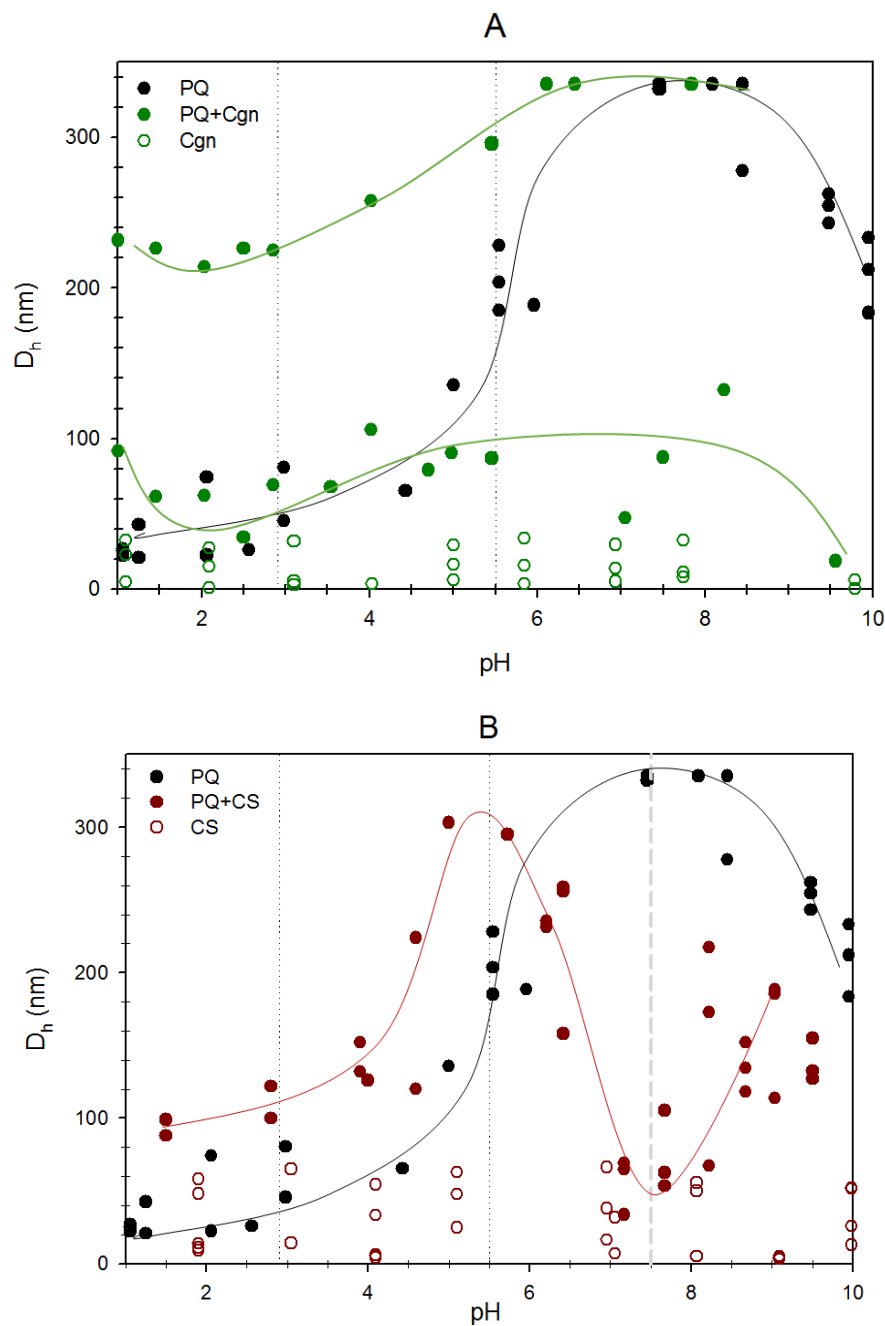


Figura 4.20: Efecto del pH sobre el D_h en sistemas compuestos por: A) PQ – Cgn, B) PQ – CS. $[PQ]= 0,5$ g/L, $[Cgn]= 0,16$ g/L y $[CS]= 0,04$ g/L. Medio Ac 10 mM – Pi 10 mM – Tris 10 mM. Temperatura ambiente.

En el caso de los sistemas PQ – CS se observó una única población de distribuciones de D_h . En las regiones R1 y R2 se observaron partículas con diámetros mayores a los de los agregados de PQ. Esto podría deberse a que la presencia de CS favorece la interacción PQ – PQ por mecanismos de exclusión preferencial. Por otra parte, en la región R3 se observó un comportamiento más complejo: al

incrementarse el pH desde 5,5 a 7,5 el D_h disminuyó drásticamente, mientras que a partir de pH 7,5 el D_h se incrementó. Las PQ adquirirían carga negativa a partir de pH 4,1 lo que le permitirá asociarse electrostáticamente con el CS, cargado positivamente hasta pH 6,5. La asociación de PQ – CS produce la separación de fases (coacervación) en el rango de pH 6,5 – 7,5. A partir de pH 7,5 el CS pierde completamente su carga positiva por lo que ya no puede asociarse con PQ, de manera que el incremento en el tamaño de los agregados en este rango podría explicarse por la presencia de los agregados de PQ.

4.3.4. POTENCIAL ζ

Las medidas de movilidad electroforética pueden ser usadas para detectar la variación en la composición y cambios estructurales en macromoléculas como también en sus propiedades funcionales ¹⁶⁷. Factores como la composición química, concentración de compuestos cargados, pH y temperatura tienen un efecto importante en los valores de potencial ζ ¹⁶⁸.

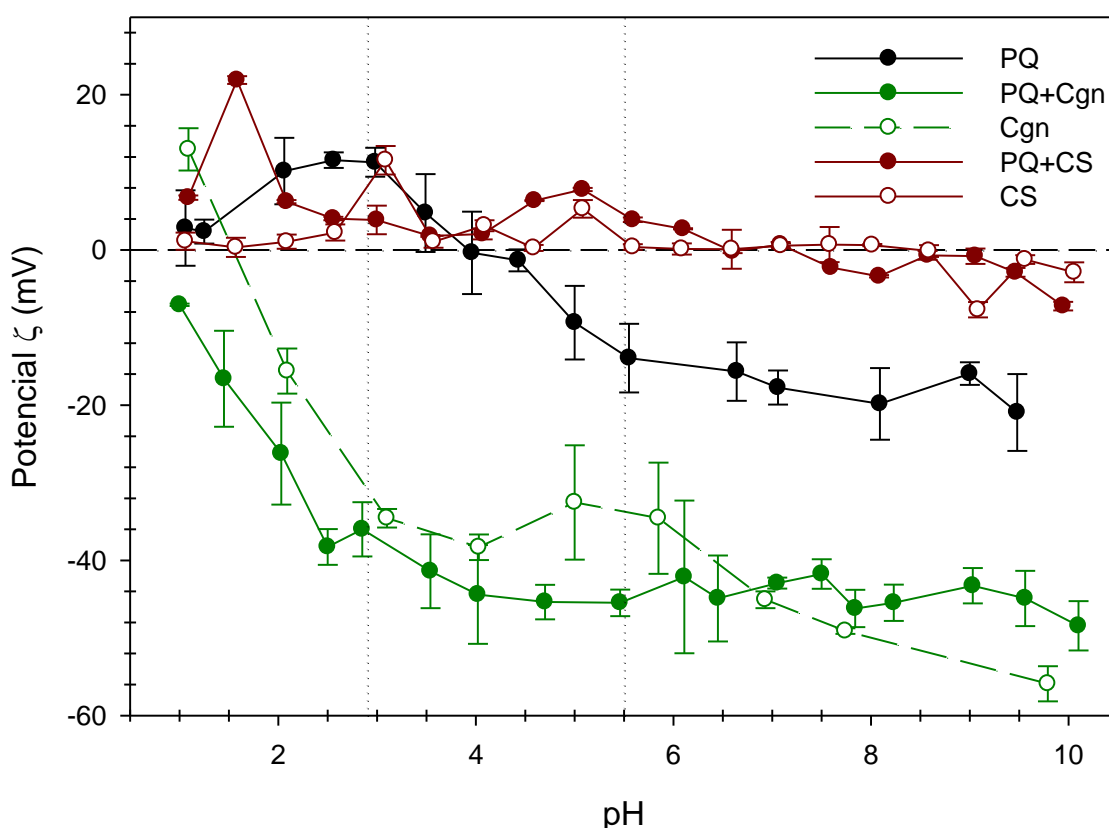


Figura 4.21: Efecto del pH en el potencial ζ (mV) de los sistemas estudiados. [PQ]= 0,5 g/L; [Cgn]= 0,16 g/L y [CS]= 0,04 g/L. Medio Ac 10 mM – Pi 10 mM – Tris 10 mM. Temperatura ambiente.

Como se mostró previamente, el potencial ζ de las PQ es positivo por debajo de pH 4, a este pH resulta cero y a pH más alcalinos es negativo. Para poder cuantificar el efecto de Cgn y CS sobre la carga superficial de las PQ, se determinó el potencial ζ de las suspensiones mixtas en medio Ac 10 mM – Pi 10 mM – Tris 10 mM a distintos pH, como se muestra en la Figura 4.21.

Se observó que las curvas de potencial ζ para Cgn y PQ – Cgn son muy similares entre sí, mostrando valores negativos en todo el rango de pH ensayado, entre -30 y -60 mV desde pH 3 a 10. Estos valores negativos concuerdan con el hecho de que el ι -Cgn ($pK_a=1$) tiene carga negativa en todo el rango de pH ensayado. De igual manera, si se comparan los resultados obtenidos para el sistema de PQ – CS y para el CS en solución, los valores obtenidos en todo el rango de pH estudiado son muy similares entre sí, mostrando valores entre -10 mV (pH 10) y +10 mV (pH 3). El CS tiene carga positiva a pH menor a su pK_a por lo cual el potencial ζ a pH < 6,5 es positivo, como se observa en la Figura 4.22.

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que el potencial ζ de los sistemas acuosos PQ – PS está determinado por la carga del PS. Esto puede explicarse considerando las elevadas relaciones utilizadas de PS:PQ (~3:1 para Cgn y ~1:1 para CS).

4.3.5. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA

Con el objetivo de detectar cambios en la estructura terciaria de las PQ por efecto de la presencia de Cgn o CS, se determinaron los espectros de emisión de la fluorescencia intrínseca de las PQ entre 300 y 400 nm, excitando a 280 nm, como se muestra en la Figura 4.22.

La presencia de Cgn afectó levemente el espectro de PQ: se observó un aumento en la intensidad del hombro a 360 nm, indicando un leve incremento de la exposición de los aminoácidos fluorescentes al medio. Por otra parte, la presencia de CS ocasionó un incremento significativo en la intensidad de fluorescencia entre 340 y 360 nm lo que indicaría que la presencia de CS modifica la conformación de las PQ de tal manera que éstas exponen más sus residuos aromáticos al medio.

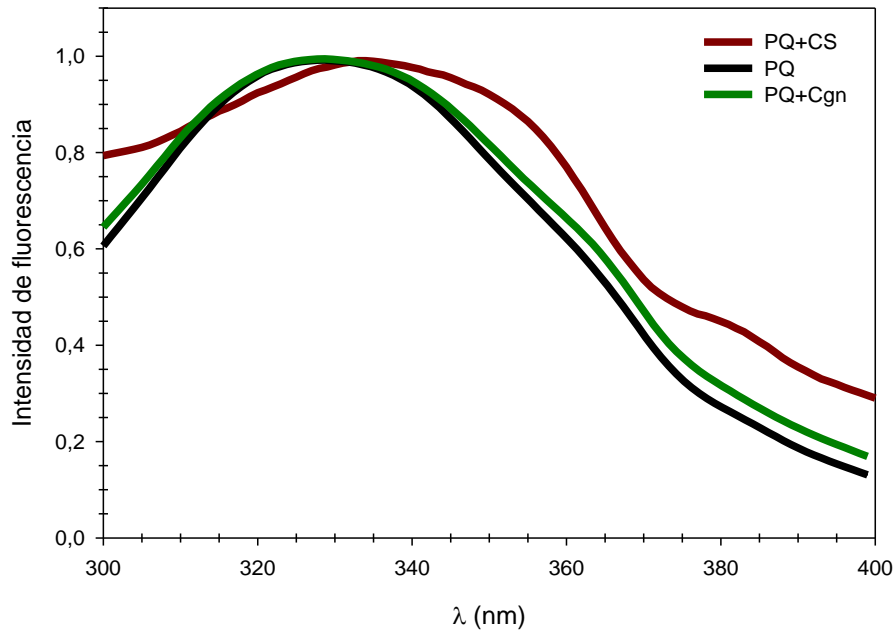


Figura 4.22: Espectros de emisión de fluorescencia de 300 a 400 nm a pH 6 de PQ y Cgn o CS, en medio Ac 10 mM – Pi 10 mM – Tris 10 mM. Temperatura ambiente. $\lambda_{exc}=280$ nm.

4.3.6. HIDROFOBICIDAD SUPERFICIAL

Como ya se ha discutido anteriormente, la presencia de los PS afecta el estado de agregación de las PQ en solución. Debido a que el efecto hidrofóbico suele jugar un rol fundamental en las interacciones proteína – proteína así como en las interacciones proteína – PS, resulta de particular interés evaluar el efecto de la presencia de los PS sobre la S_0 de las PQ.

Se determinó S_0 de las soluciones de PQ, de Cgn y de CS así como de las mezclas PQ – Cgn y PQ – CS. Para cuantificar el efecto diferencial de los PS sobre la S_0 de las PQ se calculó la relación entre la S_0 de los sistemas PQ – PS y la S_0 de PQ. Valores unitarios de S_0 relativa indicarían que no hay diferencias significativas en la S_0 debido a la presencia de los PS. Los resultados se observan en la Figura 4.23.

Se observó que la presencia de Cgn produjo una disminución de la S_0 de las PQ en las regiones R1 y R3, sin embargo en la región R2 la S_0 no fue afectada significativamente. Se propone que tanto la interacción asociativa entre las PQ y el Cgn (R1) como las interacciones proteína-proteína que dan lugar a la formación de macroagregados solubles (R3) podrían estar involucrando zonas hidrofóbicas de las PQ.

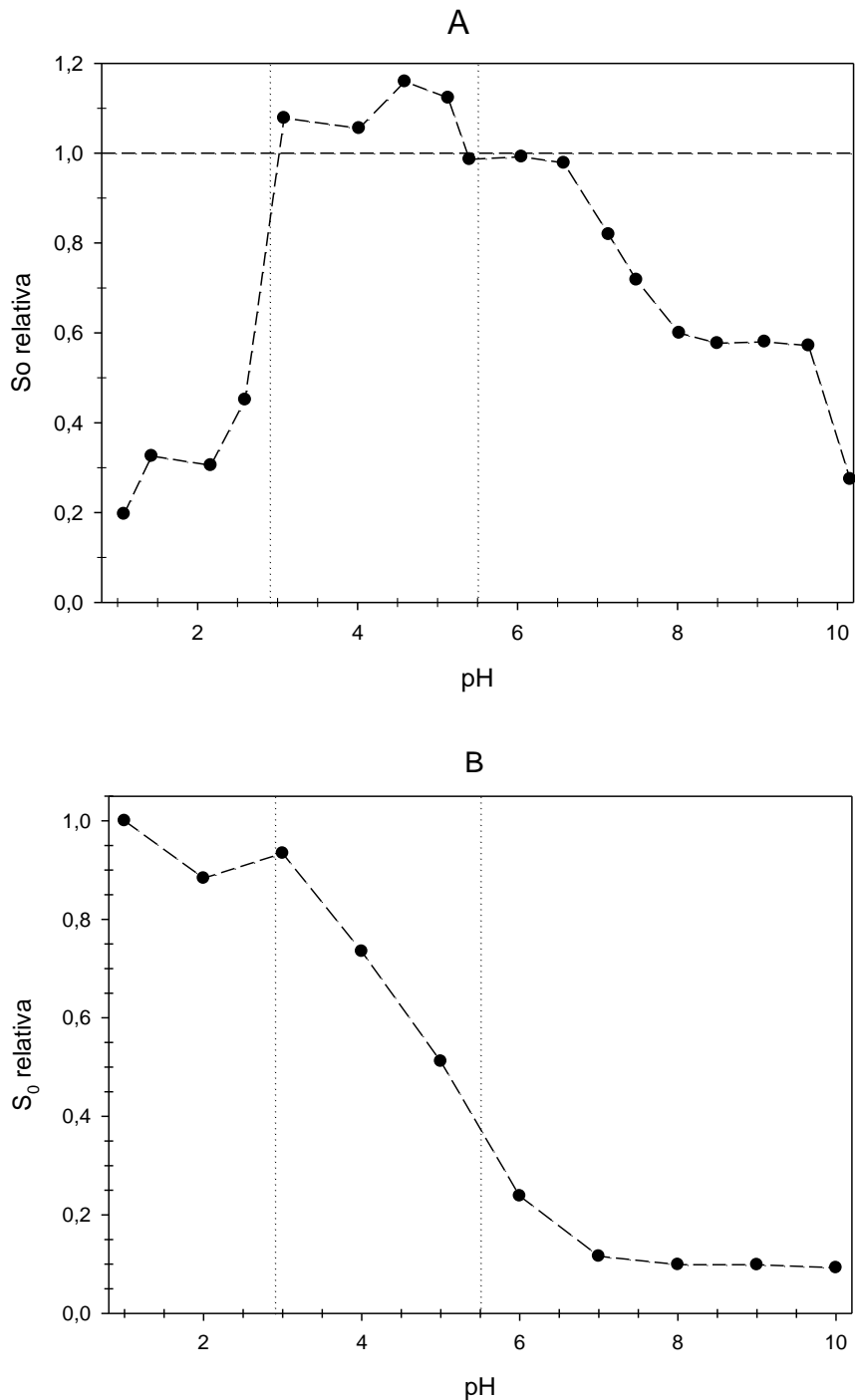


Figura 4.23: S_0 relativa de A) PQ + Cgn B) PQ + CS, en función del pH. Medio Ac 10 mM – Pi 10 mM – Tris 10 mM.

La S_0 de las PQ en la región R1 no se vió afectada significativamente por la presencia de CS. Sin embargo, en la región R2, los sistemas adicionados con CS, presentaron una significativa disminución de la S_0 al alcalinizarse el medio. En la región R3 la S_0 continuó disminuyendo hasta estabilizarse a partir de pH 7. La disminución de S_0 en R2 y R3 debido a la presencia de CS podría indicar que las

zonas hidrofóbicas de PQ expuestas al solvente en ausencia de CS están involucradas en las interacciones PQ – CS o PQ – PQ cuando CS está presente en el medio.

4.3.7. SIMULACIÓN COMPUTACIONAL

4.3.7.1. Modelos aleatorios de proteína con cargas fijas y móviles

Se obtuvieron cinco estructuras aleatorias de proteína basadas en la secuencia lineal de AA de la Ch¹⁴¹. Para la obtención de las estructuras aleatorias en todos los modelos se fijó un radio máximo de 40 Å para la disposición de los AA y su ordenamiento en el espacio. Se eligió este tamaño para la construcción de la proteína ya que es el radio promedio de las proteínas globulares¹⁶⁹. El ordenamiento fue similar a la forma de ovillo estadístico (forma desnaturalizada de una proteína) en la cual no hay estructura secundaria. Las estructuras obtenidas por este método fueron nombradas según el orden cronológico en el que se las obtuvo como: ChR1, ChR2, ChR3, ChR4 y ChR5. En la Figura 4.24 se muestra una de las estructuras obtenidas.

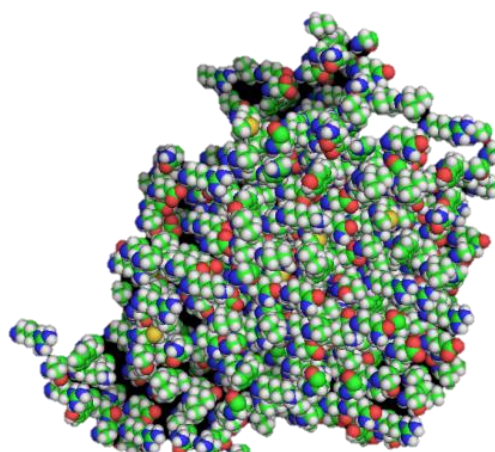


Figura 4.24: Estructura esquemática de ChR1, forma aleatoria de la proteína.

Se compararon los resultados de las simulaciones de MC obtenidos para ChR1 con cargas móviles (CM) y ChR1 con cargas fijas (CF) con los resultados experimentales procesando los resultados a través de las ecuaciones 3.22 y 3.23.

En la Figura 4.25 se observa que los resultados experimentales y los de las simulaciones mostraron un comportamiento similar en función del pH. Estos resultados estarían de acuerdo con una cooperatividad positiva asociada a la interacción, ya que este tipo de comportamiento se observa generalmente cuando las

especies que interactúan son macromoléculas y existen varios puntos de interacción entre las mismas¹⁷⁰.

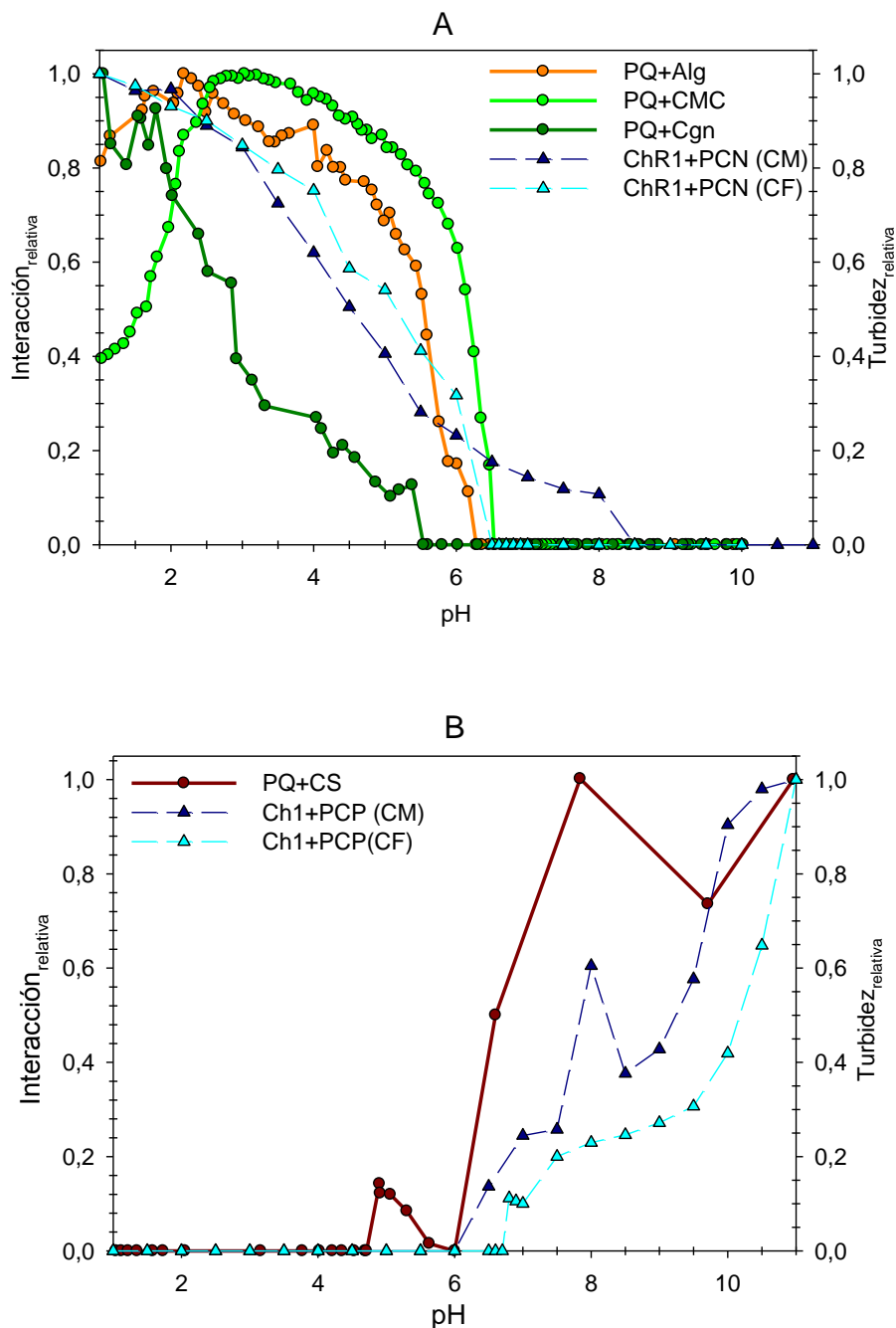


Figura 4.25: Resultados comparativos para el modelo de cargas móviles (CM) y el modelo de cargas fijas (CF) con los sistemas experimentales respectivos A) sistema ChR1 + PCN y PQ + Cgn/CMC/Alg, B) sistema ChR1 + PCP y PQ + CS.

En las simulaciones se encontró interacción ChR1 – PCN en rangos de pH alcalinos en los que no se observó interacción entre PQ y Cgn, Alg o CMC. Esta diferencia se puede atribuir a la sensibilidad que tienen ambos métodos, ya que la

turbidez depende del rango en el cual se trabaje por lo que puede ser menos sensible cuando la interacción es débil.

Por otra parte, se observó una diferencia entre el modelo proteico de CF y el modelo de CM. Para la simulación ChR1 – PCN el modelo de CM se aproxima más hacia la curva experimental obtenida con el sistema PQ – Cgn. La simulación, en las condiciones ensayadas, no se aproximó a las curvas de titulación de los sistemas de PQ – Alg y de PQ – CMC. Para la simulación ChR1 – PCP la curva obtenida por el modelo de CM se acercó más a los valores experimentales (sistema PQ – CS) que la curva de CF. El modelo de CF no resultó la mejor aproximación ya que no representó adecuadamente los movimientos de carga que se dan en un sistema real, por esto se decidió trabajar con el modelo de CM a pesar de los costos computacionales.

4.3.7.2. Simulación de la interacción Ch – PC: modelos aleatorios

Se hicieron 3 réplicas de MC (un equilibrio y tres producciones) para simular la interacción de ChR1 y ambos PC. En la Figura 4.26 se muestran los resultados obtenidos de una producción de MC, donde se visualiza $P(r)$.

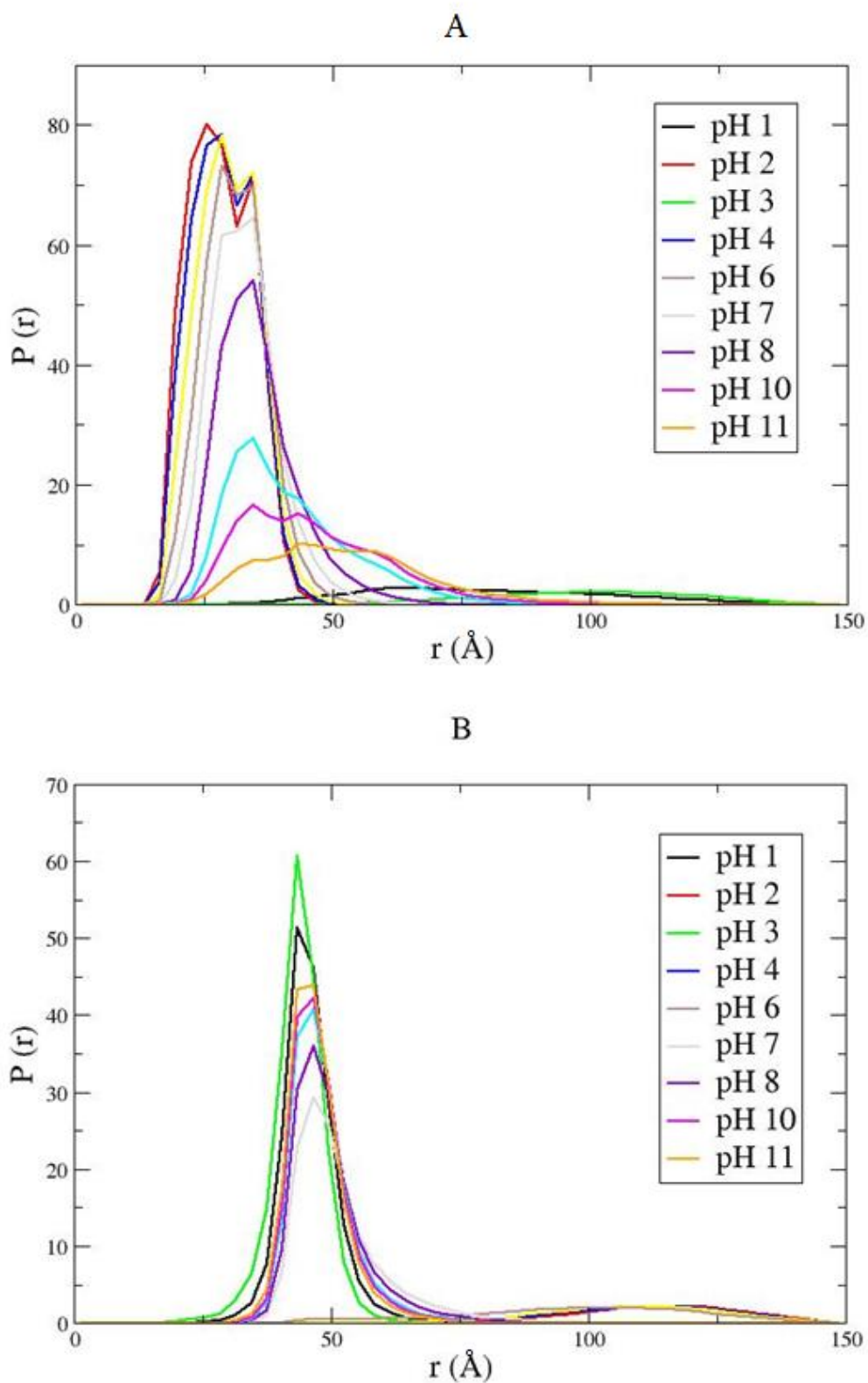


Figura 4.26: Función de distribución radial, $P(r)$, para una réplica de MC a los distintos pH de la titulación utilizados para A) ChR1 – PCN, B) ChR1 – PCP.

En la Figura 4.26 se puede observar cómo ChR1 y PC tienen alta probabilidad de interacción a ciertos pH, cuando la distancia entre ChR1 y PC es menor a 50 Å. En el caso del PCN la interacción asociativa se da a pH ácidos, mientras que para el PCP la interacción se da a pH alcalinos.

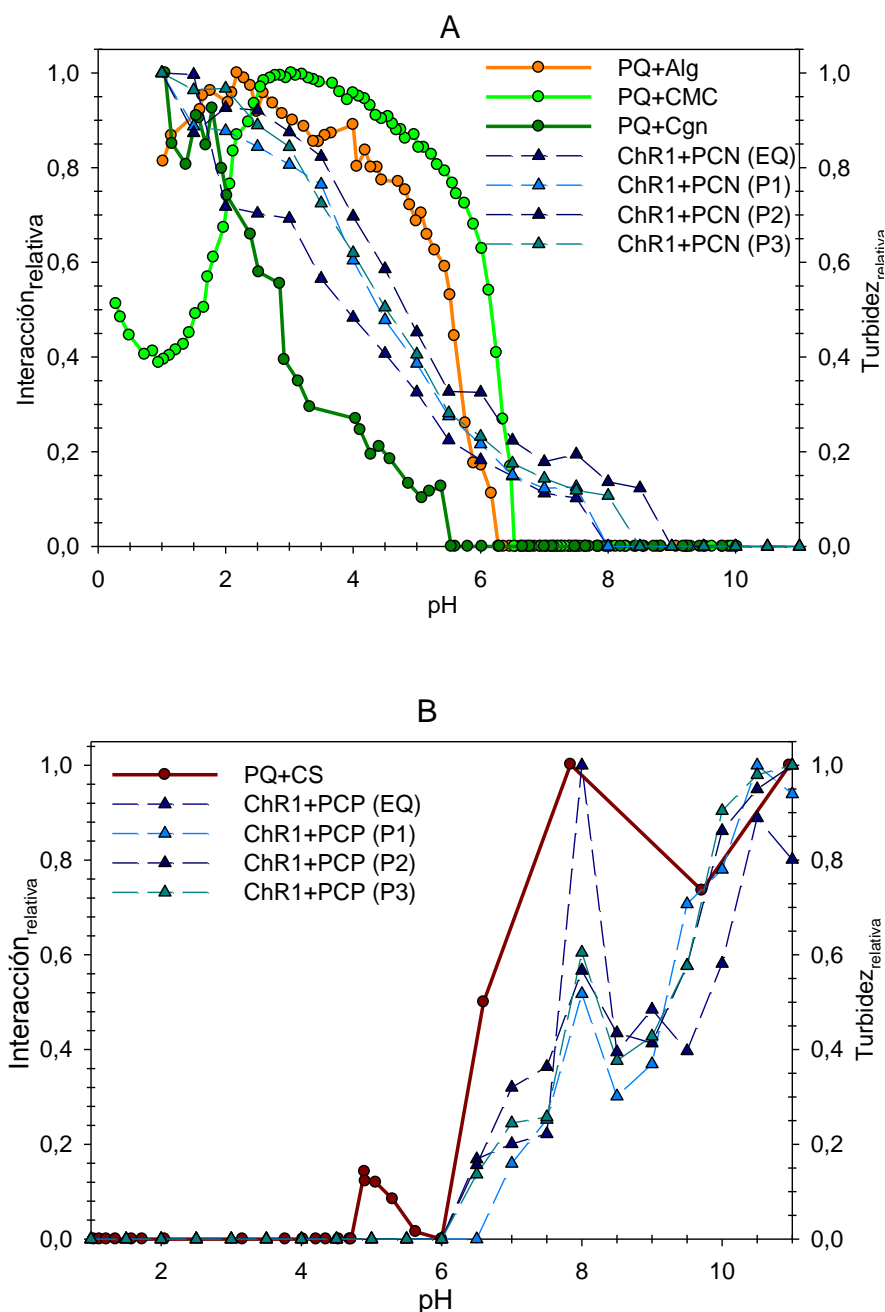


Figura 4.27: Comparación de los resultados experimentales con el equilibrio y las 3 producciones de las simulaciones de MC en función del pH para A) ChR1 – PCN y PQ – Cgn/CMC/Alg, B) ChR1 – PCP y PQ – CS.

En la Figura 4.27 se observan las curvas resultantes experimentales y computacionales (equilibrio y tres producciones de MC). Se destaca que los resultados obtenidos con las 3 réplicas de producción de MC son muy similares entre sí y se evidencia una estabilización de los valores respecto de los obtenidos en el equilibrio.

Se estudió la interacción de los PC con cada una de las cinco estructuras de ChR obtenidas. En la Figura 4.28 se muestran imágenes aleatorias obtenidas durante cada una de las simulaciones en la fase de producción, tanto para PCN como para PCP con las 5 formas aleatorias de la proteína para dos valores de pH: pH 3,0 (ácido) y pH 9,0 (alcalino).

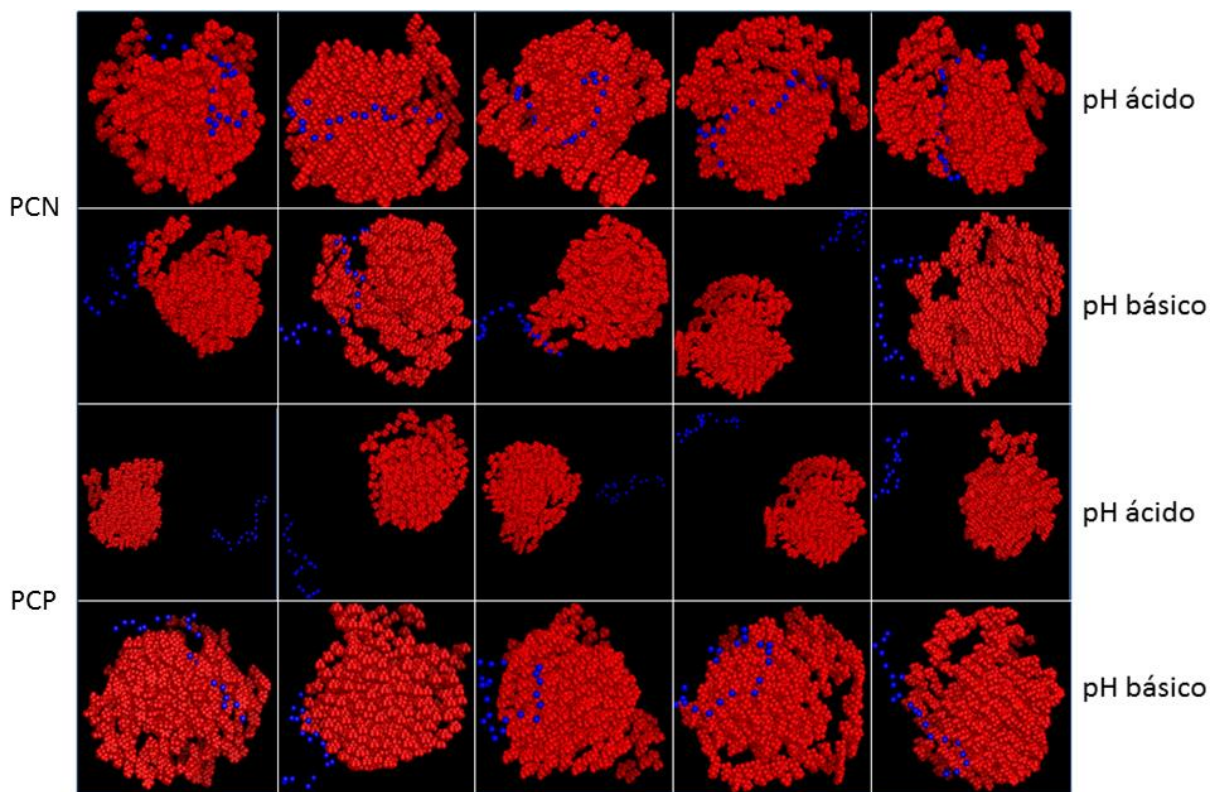


Figura 4.28: Imágenes obtenidas para las 5 formas aleatorias de Ch interaccionando con PCP y PCN a pH ácido (3) y básico (9). Rojo: átomos de Ch. Azul: monómeros del PS.

En las imágenes de la Figura 4.28 se puede observar que la interacción de la Ch es asociativa con el PCN a pH ácidos y con el PCP a pH alcalinos. Esto se visualiza por la disminución de la distancia entre ambas macromoléculas cuando se produce la interacción.

Con los resultados de las simulaciones de MC (equilibrio y tres producciones) para la interacción entre las cinco formas aleatorias y el PCN o PCP se graficaron las interacciones relativas para comparar con los resultados experimentales.

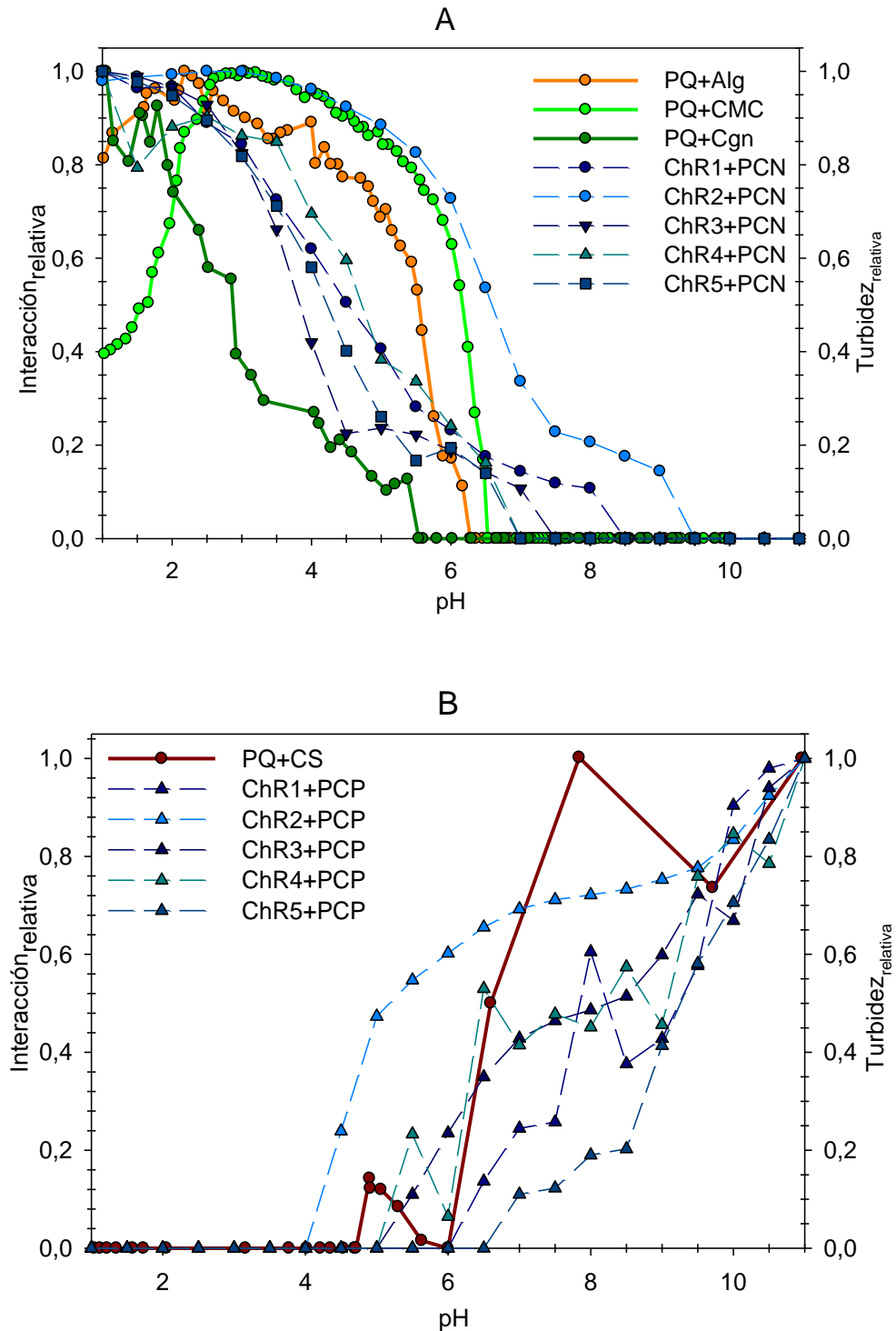


Figura 4.29: Comparación de los resultados experimentales y de las simulaciones de MC para las cinco formas aleatorias de Ch. A) ChR+PCN y PQ+Cgn/CMC/Alg, B) ChR+PCP y PQ+CS.

Los rangos de pH de interacción entre las ChR y PCN fue, en la mayoría de los casos, entre pH 1,0 y 7,5 (Figura 4.29 A), mientras que la ChR2, también interacciona hasta pH 9,0. Para las ChR y el PCP (Figura 4.29 B) el rango de pH de interacción es entre 5,0 y 11,0; comenzando la interacción a pH 4,0 para la ChR2. Las curvas correspondientes a ChR1, ChR3, ChR4 y ChR5 resultaron similares entre sí, mientras que la curva correspondiente a ChR2 fue la más alejada, mostrando una mayor interacción con los PC en todo el rango de pH. Esta diferencia puede atribuirse a que la conformación obtenida para ChR2 presenta un momento dipolar (μ_P) significativamente mayor al del resto: el μ_P de la ChR2 fue 311 D, mientras que para el resto de los modelos los valores de se encontraron en el rango entre 143 y 225 D.

En general las curvas de las simulaciones para el ChR – PCN muestran valores numéricos distintos a los valores experimentales. La simulación ChR2 – PCN se acerca más a la curva de titulación del sistema PQ – CMC mientras que las demás simulaciones tienen un comportamiento más parecido a los sistemas PQ – Alg y PQ – Cgn. Para el PCP las curvas resultantes de las simulaciones indicaron menor magnitud de interacción que lo indicado por los datos experimentales, exceptuando el caso de la ChR2. Si bien el CS no se encontraría cargado a $\text{pH} > 6,5$ (por encima de su pKa), en presencia de las PQ existiría una interacción electrostática PQ – CS que puede explicarse considerando el mecanismo de compensación de cargas. Por otra parte, también se puede considerar que existen interacciones hidrofóbicas entre ambos.

Para obtener un modelo promedio de la interacción, se calculó el promedio de los valores de interacción relativa obtenidos para las cinco formas aleatorias. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.30 donde se pueden observar los resultados del promedio de las interacciones del modelo aleatorio de la ChR y los PC.

En analogía con las curvas turbidimétricas experimentales, se definieron tres regiones resultantes de las simulaciones (R1S, R2S y R3S) en el rango de pH ensayado. En las dos regiones correspondientes a pH ácido se encontraron interacciones atractivas entre PQ y los PS cargados negativamente. Para el PCN la región de mayor interacción, R1S, es donde hay atracciones coulombicas puras, en R2S es donde actúa el mecanismo de regulación de cargas debido a la elevada capacitancia de la ChR y en R3S será donde haya repulsión entre los polímeros debido a que tienen carga del mismo signo. Para el sistema ChR – PCP en la región

R1S habrá repulsión, en la región R3S habrá interacción atractiva pura y en la R2S la atracción se deberá a la regulación de cargas de la ChR.

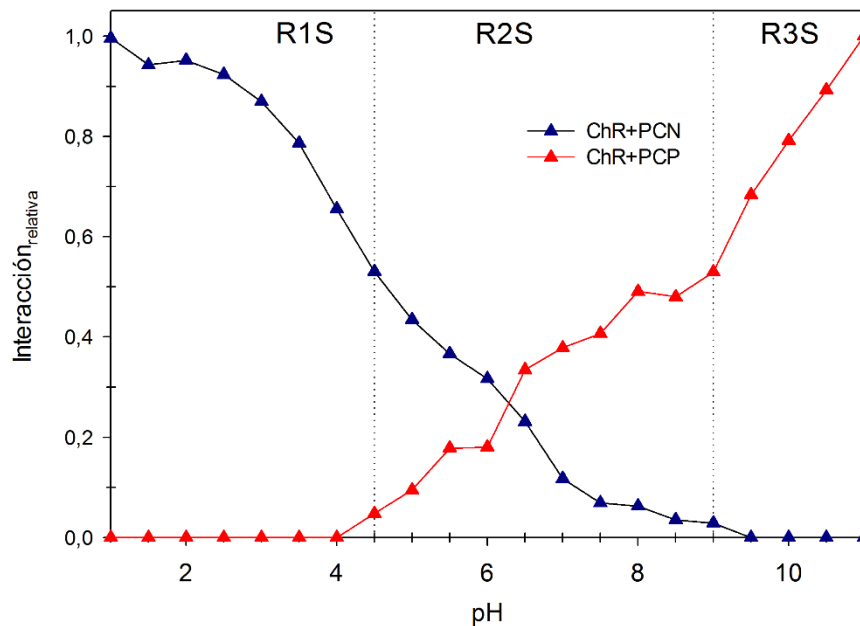


Figura 4.30: Efecto del pH en la interacción entre Ch y cada uno de los PC. Promedio de las simulaciones de Monte Carlo para los modelos aleatorios de ChR.

Se observó que el límite entre R2S y R3S (pH 9,5) no coincide numéricamente con el límite entre R2 y R3 experimental (pH 5,5). De igual forma, el pH límite entre R1S y R2S resultó ser 4,5, diferente al límite determinado experimentalmente entre R1 y R2 (pH 2,9). El cambio en los valores de los límites de cada región puede ser debido a que la magnitud de la carga neta de la ChR obtenida por simulación no coincide con la carga neta de las PQ a cada pH ensayado. De hecho, el pI de Ch resultó 6,9, superior al pI de PQ, cercano a 4. Estas diferencias afectarán no sólo a los rangos en los que se observen interacciones coulombicas puras sino también a los rangos en los que la interacción dependa de las fluctuaciones de carga en la proteína, que dependerá de la capacitancia de las mismas. Se encontraron valores elevados de capacitancia de ChR a pH cercano a 6 lo que le permitió interactuar con los PC ensayados.

4.3.7.3. Efecto del cambio del polisacárido

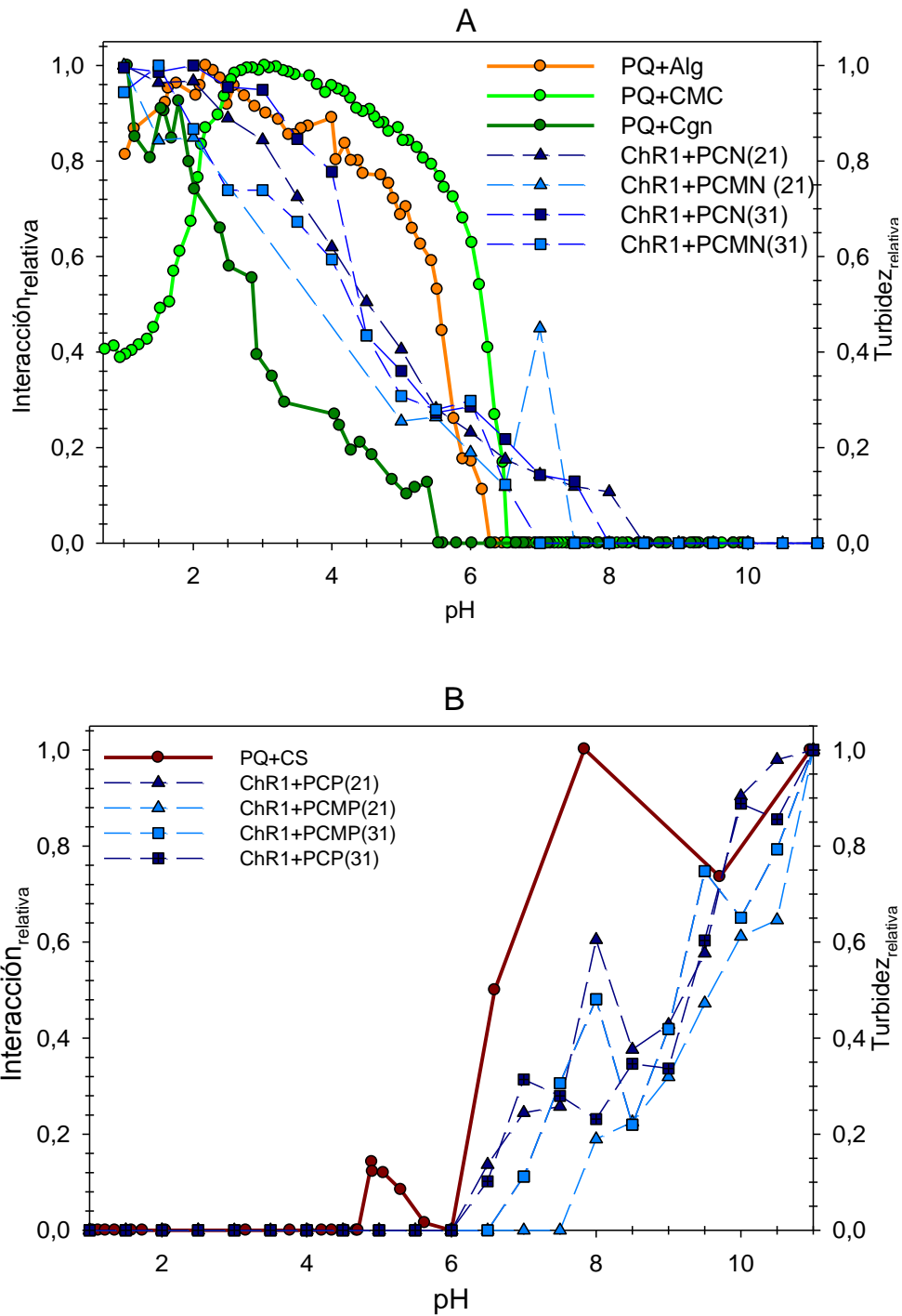


Figura 4.31: Efecto de la carga y grado de polimerización de los PC en su interacción con ChR. A) PCN, B) PCP. El grado de polimerización de cada PC se indica entre paréntesis.

Se estudió el efecto de la magnitud de la carga y número de monómeros de los PC sobre su interacción con ChR1. Se ensayaron las siguientes cargas: -1; -0,5; +0,5 y +1 y grados de polimerización: 21 y 31.

Como se muestra en la Figura 4.31, la magnitud de la carga y el grado de polimerización de los PC afectaron levemente la magnitud de la interacción PC – ChR. El aumento de la magnitud de carga y del tamaño de los PC incrementó la interacción, lo cual es esperable debido a una mayor atracción electrostática entre las macromoléculas. Sin embargo, los resultados obtenidos al modificar estas variables no se acercaron más a los resultados experimentales.

4.3.7.4. Modelo de similitud de secuencias y modelo por dinámica molecular

A partir de la secuencia primaria de la Ch, a través del programa en línea *Modeller*, se encontró una proteína cristalizada cuya secuencia resultó muy similar a la de Ch. La amarantina (Am), globulina 11S de amaranto, tiene la misma secuencia lineal que la Ch exceptuando por 14 AA del extremo carboxilo de Ch. Se construyó un modelo con estructura secundaria y terciaria a partir de la estructura cristalizada de la Am. En la Figura 4.32 A y B se pueden observar las estructuras de la Am y la de Ch obtenida por similitud de secuencia (ChM). Se puede notar que la ChM tiene un extremo muy flexible.

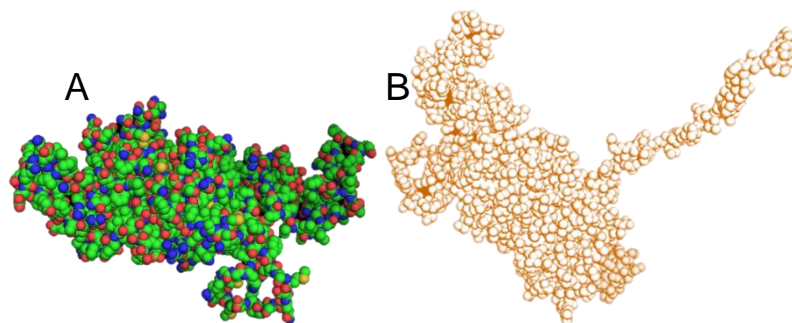


Figura 4.32: A) Estructura cristalizada de la Am; B) Modelo obtenido por similitud de secuencia de la chenopodina, ChM.

Por otro lado, se utilizó la secuencia primaria lineal de AA de la Ch para obtener la estructura tridimensional por DM, que se muestra en la figura 4.33.

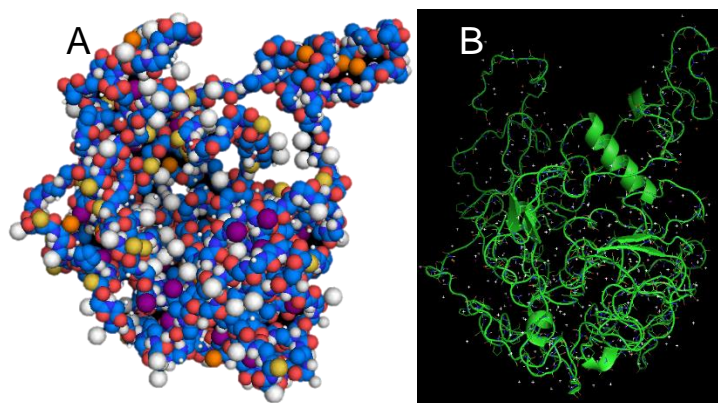


Figura 4.33: Estructura de Ch obtenida por DM desde la secuencia de AA, A) Estructura con átomos explícitos, B) Visualización de las estructuras secundarias.

Se utilizaron estas estructuras: Am, ChM y ChDM para simular por MC su interacción con el PCN o el PCP. En la Figura 4.34 se muestran los resultados de las simulaciones de la interacción entre PC y ChDM, ChM y Am. Se encontró que la magnitud de la interacción entre ambos PC y Am resultó mayor que la magnitud de interacción PC – ChM, indicando que los 14 AA adicionales de la ChM en el extremo carboxilo dificultan la interacción con los PC. Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos para la interacción de ambos PC con ChDM, ChM y ChR, se encontró que el modelo de la proteína afecta significativamente el límite entre las regiones de repulsión y de interacción por regulación de cargas. Los resultados obtenidos al simular la interacción de los PC con el modelo de ChDM resultaron intermedios a los resultados obtenidos para ChR y ChM. Esto puede explicarse debido a que en ChR se estaría exponiendo más AA titulables que en ChM y ChDM, lo que aumentaría la capacidad de regular las cargas. La diferencia entre ChDM y ChM es que probablemente ChDM exponga más residuos titulables que ChM.

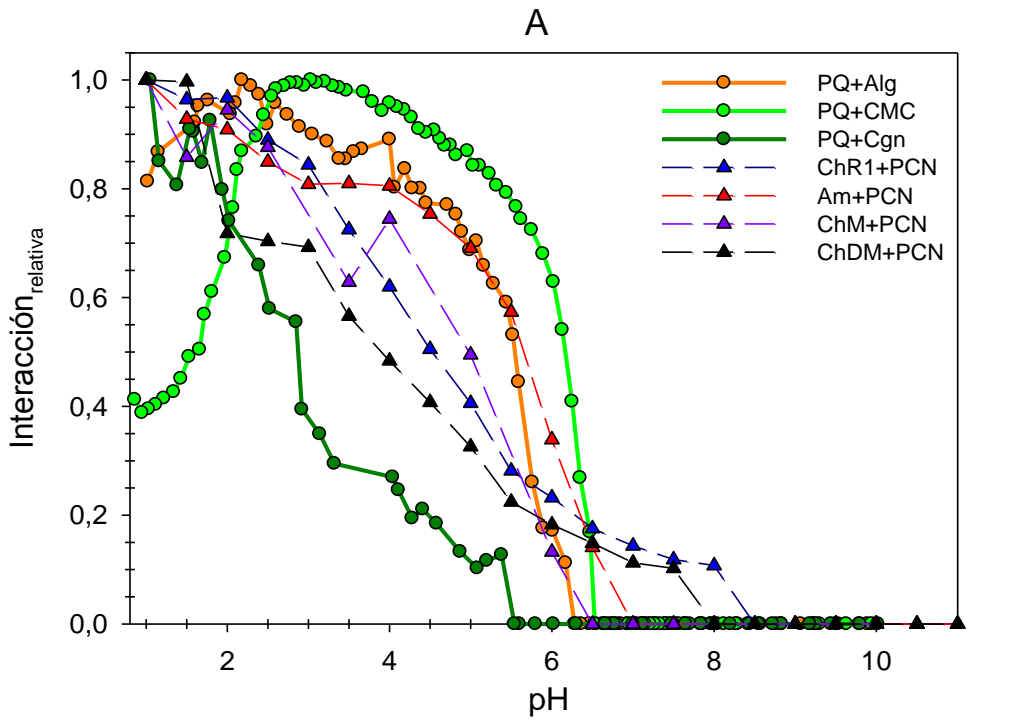


Figura 4.34: Comparación de los resultados experimentales y de las simulaciones de MC para ChR, Am, ChM y ChDM. A) PCN (experimentales: Cgn, CMC y Alg), B) PCP (experimental: CS).

Las diferencias cuantitativas encontradas tanto en la magnitud de la interacción proteína – polímero así como entre los límites de cada una de las regiones pueden ser atribuidos a muchos factores. Puede mencionarse que las PQ no están totalmente caracterizadas y en este trabajo fueron representadas sólo por diferentes modelos de la Ch, que en el rango de pH estudiado las PQ cambiarán de conformación, pudiendo presentar conformaciones globulares a pH intermedios y desplegadas a pH extremos. Por otra parte, el modelo de los PC en las simulaciones no considera la rigidez de los PS ni su equilibrio de disociación. Esta diferencia resulta más significativa en el caso de los sistemas compuestos por PQ – CMC, ya que este PS ácido es el más rígido de todos y tiene el pKa más alto. En las simulaciones no se tomó en cuenta el efecto hidrofóbico (debido al uso de un modelo de solvente continuo) y tampoco se tomaron en cuenta las interacciones proteína – proteína. Más allá de los modelos utilizados, una diferencia importante entre las simulaciones y los experimentos es que las escalas que permite apreciar cada uno de estos métodos es diferente: mediante los experimentos es posible apreciar propiedades macroscópicas mientras que las simulaciones permiten obtener datos a nivel mesoscópico, lo que incide directamente en la sensibilidad de los métodos.

En este capítulo se estudió la interacción de las PQ con PS cargados eléctricamente y el efecto que tiene la concentración de PS y el pH sobre esta interacción. Se identificaron, tanto experimental como computacionalmente, tres regiones con particularidades en la interacción PQ – PS. Cada una de estas regiones está caracterizada por: 1) atracción coulombica, 2) mecanismo de regulación de cargas (que depende exclusivamente de PQ) y 3) repulsión o exclusión entre ambas moléculas. A pesar de las diferencias numéricas en el valor de pH de los límites entre las regiones de interacción determinados experimentalmente y computacionalmente, el comportamiento observado es coincidente. Las diferencias se pueden asignar al hecho de que tanto la proteína como el polielectrolito utilizado en la simulación son aproximaciones: por un lado, la Ch se utilizó para simular a las PQ, una mezcla de proteínas y, por otro lado, el modelo del polielectrolito son esferas con cargas fijas y de movimiento flexible. Además, dentro de los parámetros utilizados para la simulación sólo se tomaron en cuenta las interacciones electrostáticas y no las interacciones hidrofóbicas. Experimentalmente se encontró que estas últimas son fuertes en las mismas regiones en las que se encontraron interacciones electrostáticas.

Por todo esto, a pesar de sus limitaciones intrínsecas, las simulaciones fueron una herramienta práctica para explicar los factores fisicoquímicos que afectan el proceso de interacción entre proteínas y polisacáridos cargados eléctricamente. Las simulaciones permitieron una caracterización cualitativa de la interacción entre las PQ y los PS, ayudando a explicar los resultados experimentales y contribuyendo una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares. En este sentido, se encontró que en la interacción proteína – polisacárido está fuertemente implicado el mecanismo de regulación de cargas que depende únicamente de las capacitancias de las proteínas que están involucradas en la interacción.

4.4. ESTUDIO DE LOS AGREGADOS Y GELES PROTEÍCOS DE QUINOA

Muchas de las propiedades funcionales de las proteínas alimentarias se relacionan con las interacciones agua – proteína, como por ejemplo la solubilidad, la gelificación, la emulsificación y el espesamiento. Según Mattil ¹⁷¹, el estudio sistemático de las propiedades funcionales comienza con el estudio de las propiedades de solubilidad de las proteínas ¹⁷². El perfil de solubilidad en un rango de pH es usualmente el primer ensayo que se realiza cuando se quieren estudiar propiedades funcionales texturales como la agregación y la gelificación ¹⁷².

Se decidió continuar trabajando con Cgn ya que este PS es ampliamente usado en la industria alimentaria argentina como espesante y gelificante ¹⁷³. En este capítulo se muestra el estudio de las propiedades funcionales de agregación y gelificación de sistemas mixtos PQ – Cgn, por lo que se comenzó estudiando el efecto de distintas concentraciones de Cgn sobre el perfil de solubilidad de las PQ. Por otra parte, se estudió el efecto de Cgn sobre el tratamiento térmico ya que para favorecer la agregación y gelificación de las PQ es necesario llevar a cabo un calentamiento de las mismas.

4.4.1. SOLUBILIDAD

En la Figura 4.35 se observa que el efecto de la presencia del Cgn en las concentraciones ensayadas coincide con el efecto ya observado para una concentración mayor de Cgn (Figura 4.17): la solubilidad de PQ disminuye significativamente en R3 y se incrementa levemente o mantiene en R2.

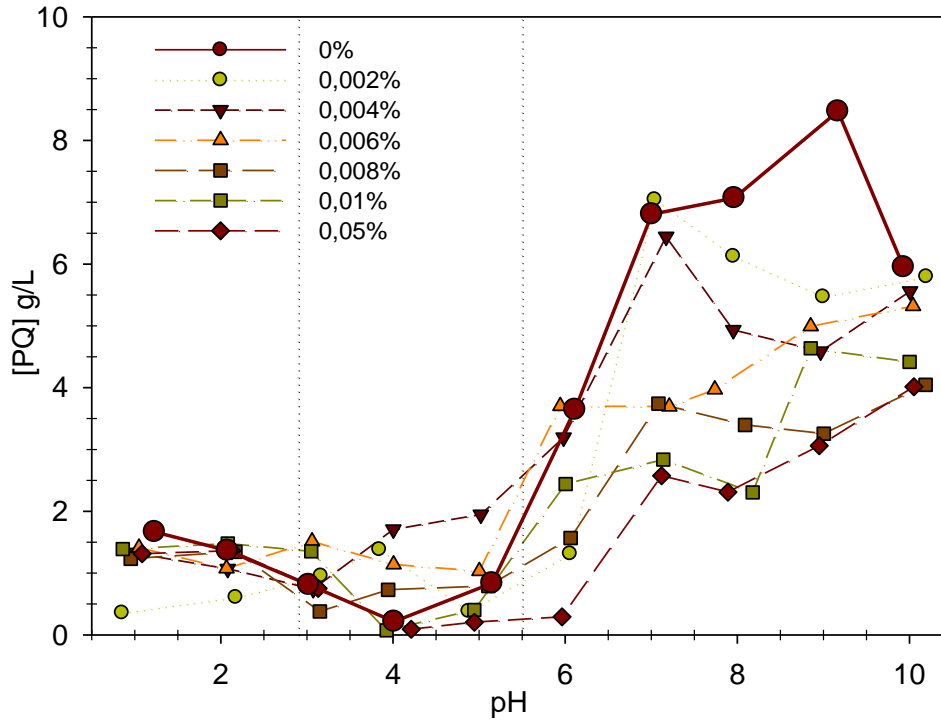


Figura 4.35: Efecto de distintas concentraciones de Cgn (indicadas en la figura) sobre la solubilidad de las PQ en el rango de pH de 1 a 10. Buffer Ac 10 mM – Pi 10 mM – Tris 10 mM.

4.4.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO

4.4.2.1. Espectros de fluorescencia

Primeramente se estudió el efecto que tiene el tratamiento térmico (TT) sobre las PQ, para ello se calentaron a 95 °C por 10 min.

En la Figura 4.36 se observa que el TT de PQ provocó un aumento de la fluorescencia a 360 nm, lo que indica una mayor exposición de los aminoácidos fluorescentes al medio. Esto se explica considerando que el TT produce un desplegamiento de las cadenas polipeptídicas. Cuando el Cgn se adiciona a las muestras de PQTT, el corrimiento al rojo del espectro de emisión de fluorescencia es menor que para las PQTT en ausencia de Cgn. Esto podría sugerir que el Cgn presenta un efecto protector frente a la desnaturalización térmica de las PQ, como fue encontrado para el caso de las proteínas del suero lácteo ¹⁷⁴.

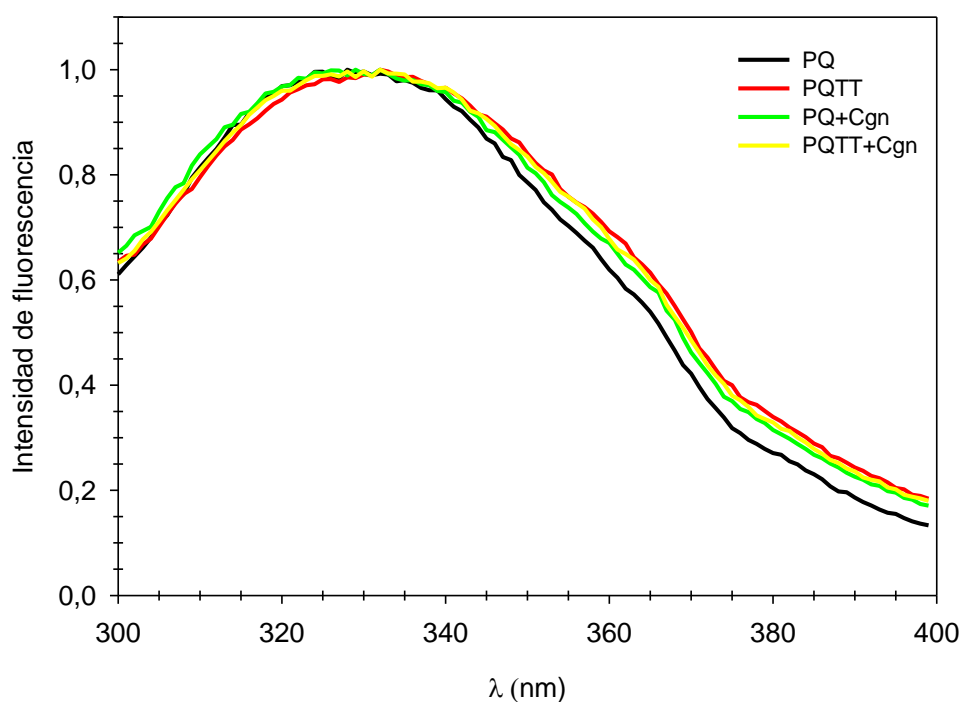


Figura 4.36: Espectros de fluorescencia de PQ en ausencia y presencia de Cgn, con y sin TT a pH 9 en buffer Ac – Tris – Pi 10 mM.

4.4.2.2. Potencial ζ y diámetro hidrodinámico

Como se observa en la Figura 4.37 A, el potencial ζ de PQ en NaOH diluido es aproximadamente -35 mV. El TT produce una ligera disminución del mismo, probablemente debido a la mayor exposición al solvente de grupos ionizables. La presencia de Cgn provocó una significativa disminución del potencial ζ , que podría deberse a que el Cgn disminuye la cantidad de contraiones disponibles para apantallar las cargas de las PQ. En presencia de Cgn, el TT no produjo alteraciones significativas del potencial ζ , probablemente debido a que la presencia de Cgn estaría contribuyendo mayoritariamente al valor del ζ . El efecto de la disminución de la carga por la presencia de un polielectrolito negativo se ha visto en otras proteínas vegetales. El potencial ζ puede disminuir en mayor o menor magnitud dependiendo de la concentración del polielectrolito ¹⁷⁵.

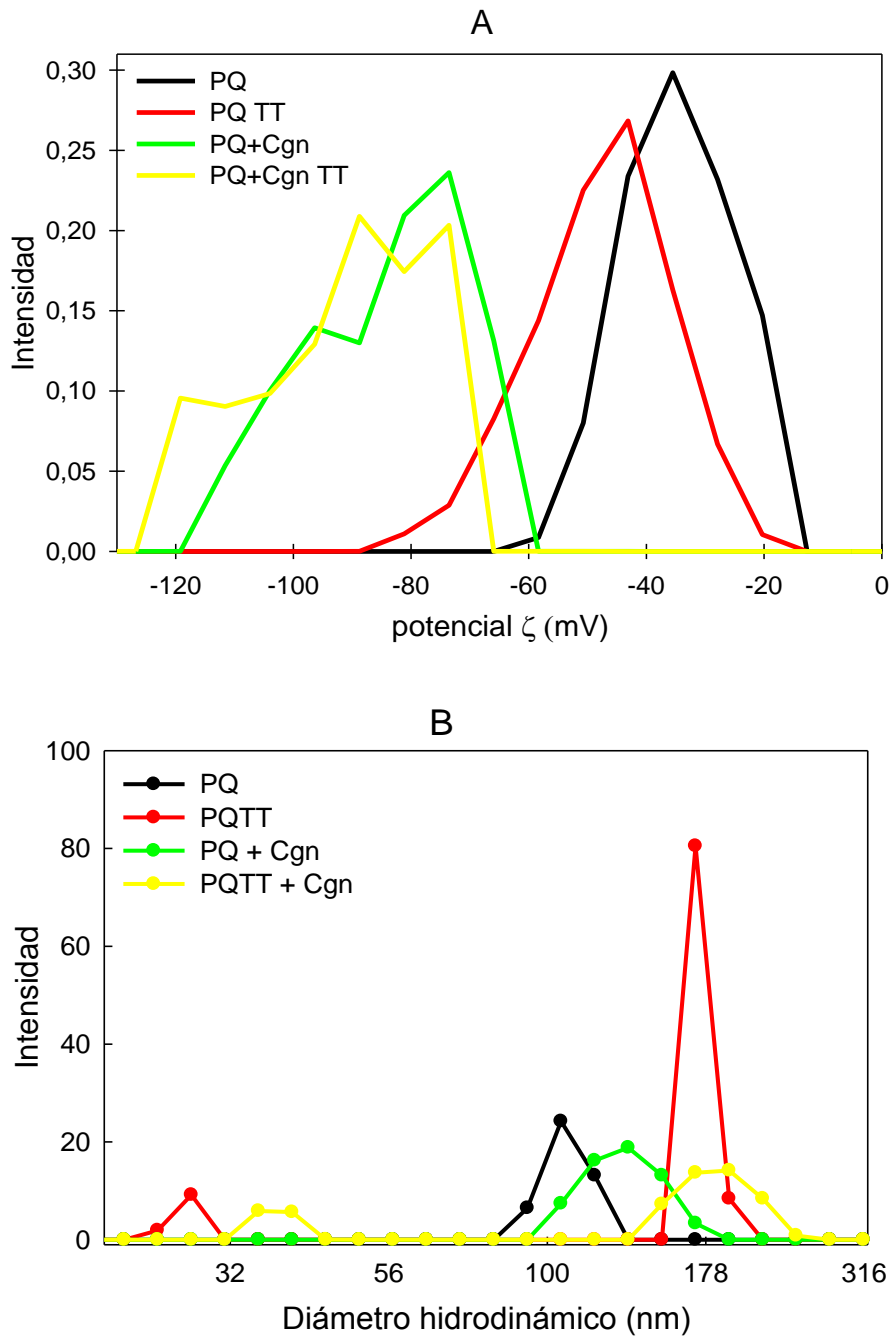


Figura 4.37: A) Potencial ζ , y B) Diámetro hidrodinámico; de las muestras de PQ y PQTT, con y sin Cgn. pH 9 y temperatura de 25 °C

En la Figura 4.37 B se observa que el TT incrementó el tamaño de las partículas, probablemente debido a que se produjo una disminución del grado de compactación de las proteínas. La presencia del Cgn produjo un aumento en el tamaño en las partículas con y sin TT. Esto podría deberse, como se discutió anteriormente, a que la presencia de Cgn favorece las interacciones proteína – proteína. El incremento en el tamaño de las partículas cuando hay un polielectrolito

presente en la muestra depende del tipo de interacción entre la proteína y el polieléctrolito, se ha observado este mismo efecto para otras proteínas alimentarias
176.

4.4.3. AGREGACIÓN ÁCIDA

Se estudió el proceso de agregación de las PQTT, suficientemente diluidas (0,05 %P/V), para evitar la formación de geles, en ausencia y presencia de distintas concentraciones de Cgn. Para acidificar lentamente los sistemas se adicionó GDL en distintas relaciones con las PQTT (GDL/PQTT=R). Se graficaron los valores de β , relacionado con el tamaño de los agregados.

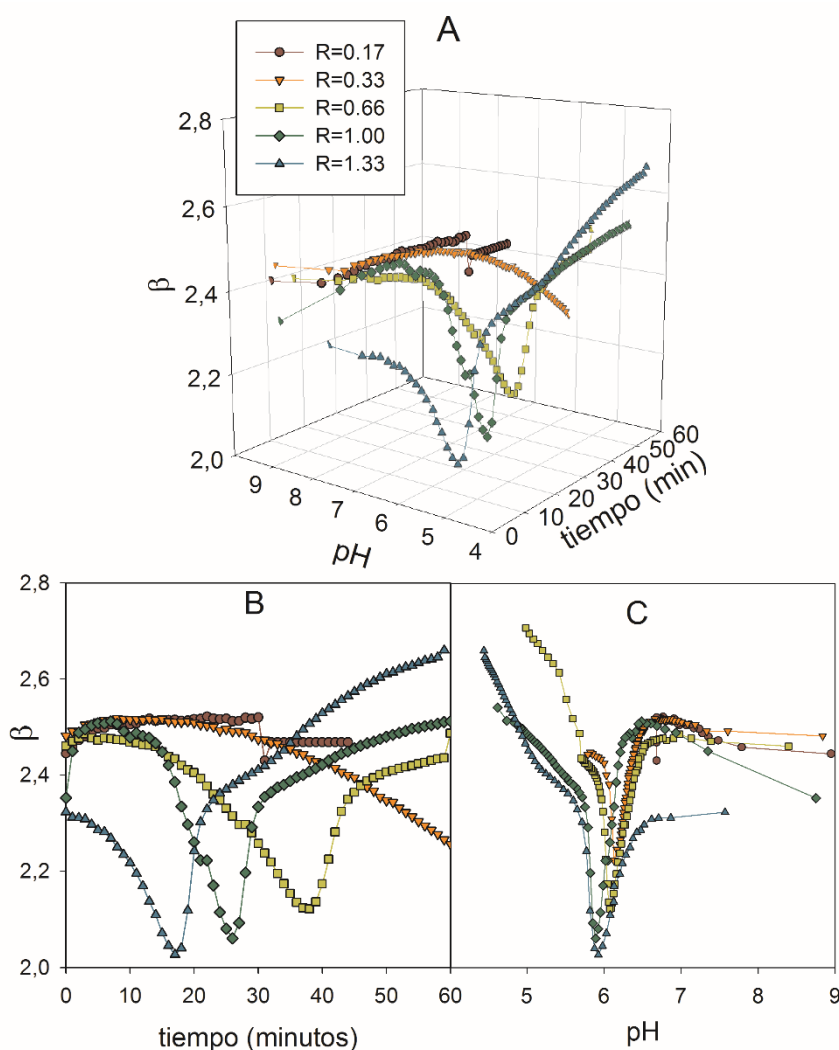


Figura 4.38: Evolución del parámetro β en función del pH de la solución y el tiempo desde la adición de GDL al medio para los distintos valores de R ensayados. [PQTT]=0,5 g/L. Temperatura=31 °C. A) imagen tridimensional del parámetro β en función de pH y tiempo; B) parámetro β en función del tiempo; C) parámetro β en función del pH.

En la Figura 4.38 se muestra la evolución del parámetro β con el tiempo para la acidificación de PQTT con los distintos R, en ausencia de Cgn. Se pudieron observar dos etapas distintas en el proceso. En una primera etapa, el valor de β disminuyó, lo que estaría relacionado con una disminución del tamaño medio de los agregados, y posteriormente, se incrementó, indicando que se estarían formando agregados de mayor tamaño. Este comportamiento es característico de la agregación ácida de proteínas^{31,177} y se explica considerando que la variación de pH del medio induce, en una primera instancia, una disociación lenta de los agregados de la muestra. Sin embargo, el TT puede favorecer la formación de puentes disulfuro intercatenarios por lo que los agregados de PQ estabilizados de este modo no serán afectados por el descenso de pH. Luego de alcanzado el mínimo en el parámetro β , estos agregados de menor tamaño se reestructurarían, al acercarse al pI, para formar agregados de mayor tamaño, mediante interacciones hidrofóbicas.

Se observó que a mayor cantidad de GDL adicionada, los valores del parámetro β fueron menores durante la primera etapa y que el tiempo al cual se alcanzó el mínimo de este parámetro fue menor. Este fenómeno podría explicarse considerando que al incrementar la concentración de GDL, la acidificación del medio se produce más rápidamente, lo que acelera y magnifica el proceso de disociación de los agregados iniciales. Sin embargo, el pH al cual se produjo este mínimo no se vio alterado por los distintos valores de R, indicando que este fenómeno depende exclusivamente del estado de carga de las PQ. Por otra parte, en la etapa de reestructuración de los agregados, se produjeron agregados de mayor tamaño en los casos en los que los valores de R fueron mayores. Esto podría deberse a que, al producirse una acidificación rápida, las interacciones primarias proteína – proteína, relativamente inespecíficas, tienen menos tiempo para reestructurarse, por lo que los agregados formados a partir de los agregados pequeños son de mayor tamaño. De esta manera puede concluirse que el valor de R tendrá un efecto significativo sobre la estructura y características de los geles de PQTT. De hecho, para el menor valor de R ensayado ($R=0,17$) no se observaron cambios de los valores de β durante la evolución, indicando que los procesos de disociación y posterior agregación no estarían ocurriendo. Esto puede deberse a que la acidificación producida por esta relación GDL/PQTT no es suficiente para neutralizar las cargas de las PQ y permitir que éstas formen agregados de mayor tamaño.

En la Figura 4.39 se muestran los valores de β en función del pH y el tiempo para cada una de las relaciones GDL/PQTT ensayadas y las distintas concentraciones de Cgn.

Puede observarse que la presencia de Cgn tiene un efecto significativo sobre la cinética de variación del parámetro β . La presencia de Cgn retrasó la disociación de los agregados, no sólo el tiempo en el cual se obtuvieron los agregados más pequeños (valor mínimo de β) fue mayor, sino que también se modificó el pH en el cual se observó este fenómeno. Para las menores concentraciones de Cgn ensayadas, se observó que el perfil de β vs. tiempo y pH resultó similar a lo observado en ausencia de Cgn; sin embargo cuando las concentraciones de Cgn fueron intermedias, se modificaron no sólo las condiciones de pH necesarias para obtener los agregados más pequeños sino que no se produjo la etapa de agregación posterior de los mismos. Para las mayores concentraciones de Cgn, el comportamiento observado fue diferente ya que en algunos casos no se observó la etapa de disociación de los agregados. Esto podría deberse al efecto que posee el Cgn sobre el estado de carga de las PQ, como se vio en la sección anterior (Figura 4.37 A). La presencia de Cgn produjo un aumento de la carga negativa de las PQ, lo que produjo una disminución en el pH requerido para disociar los agregados iniciales de las PQTT. Por otra parte, la presencia de Cgn dificultó la formación de agregados de mayor tamaño una vez que los agregados iniciales se disociaron, probablemente debido a que la presencia de Cgn estaría interfiriendo en las interacciones hidrofóbicas entre las PQTT.

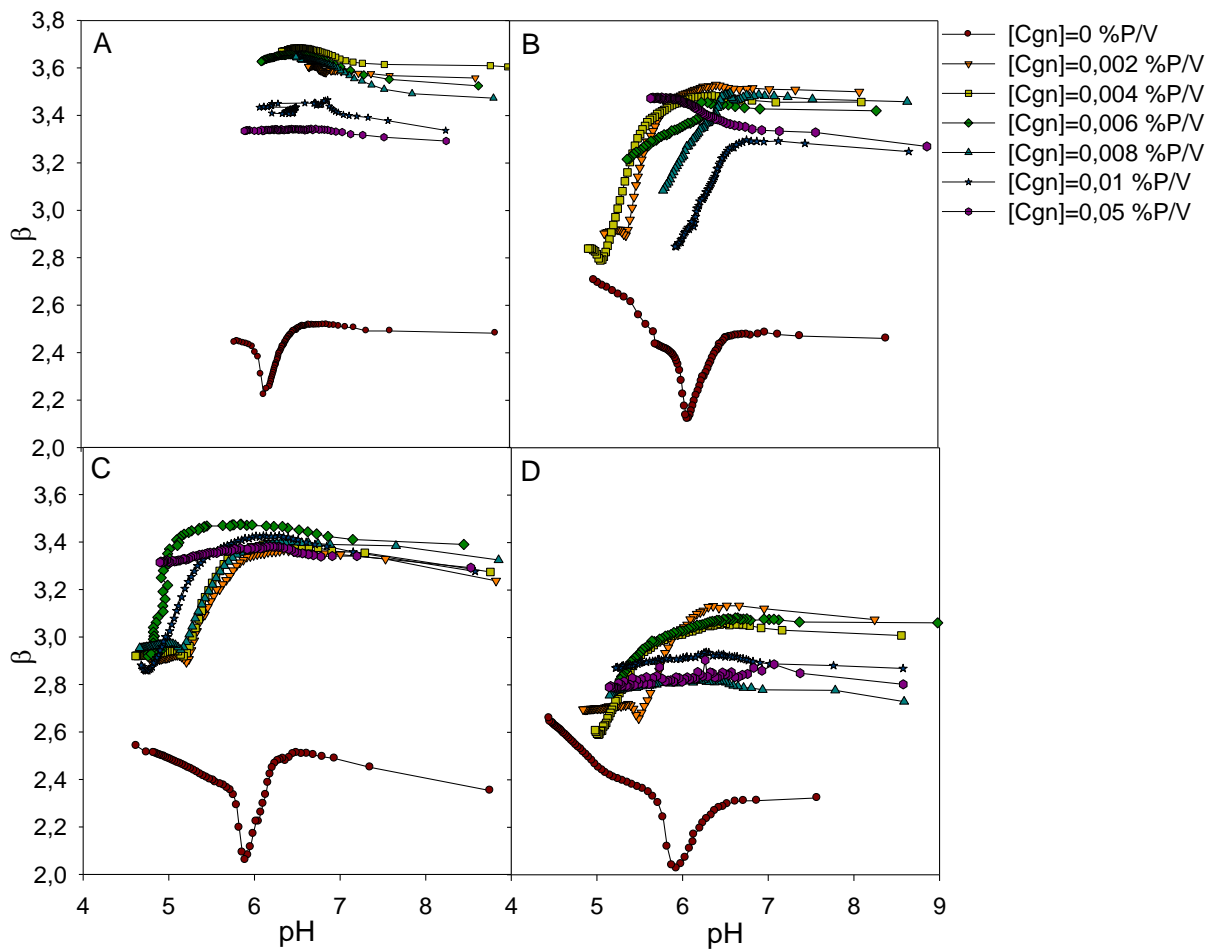


Figura 4.39: Efecto de la concentración de Cgn sobre el proceso de agregación de las PQT. A) $R=0,33$, B) $R=0,66$, C) $R=1,00$, D) $R=1,33$. $[PQT]=0,5$ g/L. Temperatura=31 °C.

En las imágenes de microscopía confocal, Figura 4.40, de PQT y PQT – Cgn se puede observar que a cantidades mayores de GDL en el sistema (R más alto) el tamaño de los agregados se incrementa y se va formando la red que dará lugar a la matriz del gel. Para los sistemas mixtos PQT – Cgn es necesario un mayor R para que se observen agregados de mayor tamaño, cuando se lo compara con los sistemas de PQT en ausencia de Cgn. Esto concuerda con lo observado anteriormente mediante turbidimetría: los sistemas con Cgn necesitan de un pH menor para que se formen los agregados de mayor tamaño.

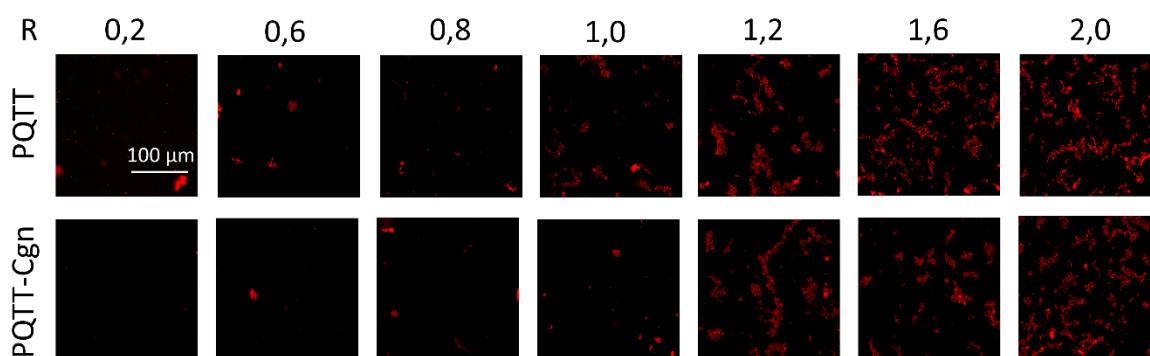


Figura 4.40: Imágenes de microscopía confocal de PQTT (0,5 g/L) y PQTT (0,5 g/L) + Cgn (0,04 g/L) a distintos R. Tinción con Rodamina B en una proporción Rodamina B: PQTT (1:600).

4.4.4. GELIFICACIÓN ÁCIDA

Se determinó la concentración necesaria de PQTT a la cual los agregados proteicos fueron capaces de formar una estructura de gel (red polimérica) y el rango de pH al cual se formaron los geles de PQTT. En una primera instancia se determinó la concentración mínima de proteína necesaria para gelificar, utilizando un R fijo de 0,33 basado en trabajos previos⁶⁶ y se halló que la misma es de 1,2 %P/V (Figura 4.41 A).

Considerando estos resultados, se procedió a estudiar las condiciones de formación de estos geles a partir de una concentración fija de PQTT de 2,4 %P/V, variando la relación con el GDL (R), y midiendo el pH final de cada sistema. Se eligió esta concentración para asegurar un rango en el cual las PQTT resulten en una red de gel en un rango de R variable. En la Figura 4.41 B se muestran los valores de pH obtenidos para todos los R ensayados y se distinguen los sistemas que gelificaron de los que no gelificaron (círculos negros y círculos vacíos, respectivamente). Se observó una relación inversa entre el pH obtenido en los sistemas y la concentración de GDL adicionada. Se observó que los sistemas fueron capaces de gelificar si el pH final se encontraba por encima de 3,1 y por debajo de 5,4, lo que se consigue utilizando un R entre 0,27 y 1,30.

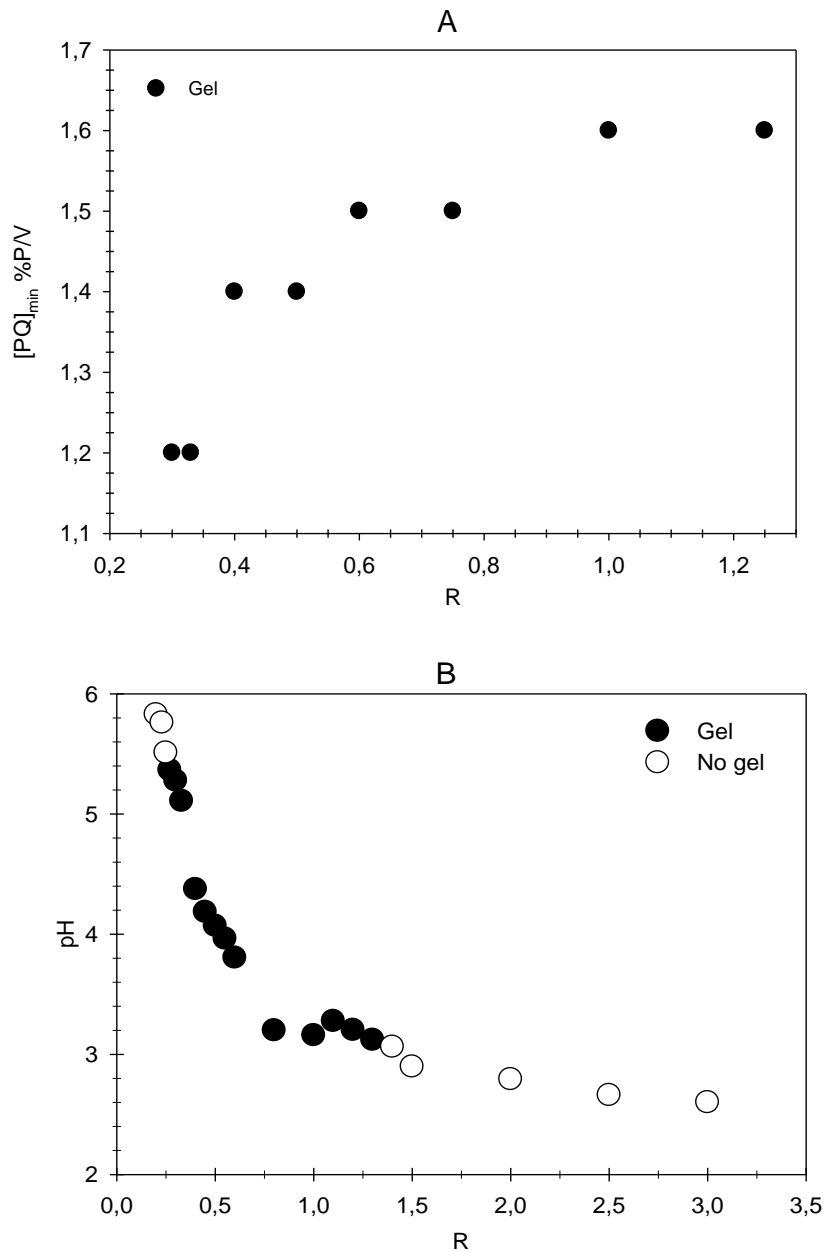


Figura 4.41: A) Cantidad mínima necesaria de PQT para la formación de geles en función de R. B) Capacidad de formación de geles y pH final para una concentración de PQT de 2,4 %P/V con distintos R.

En primer lugar, se observó que el valor de R altera la concentración mínima de PQT requerida para formar los geles. Esto estaría relacionado con el pH del sistema al finalizar la hidrólisis del GDL. Una acidificación más lenta da lugar a una microestructura más extendida porque los agregados que se van formando en la acidificación tienen más tiempo para agregarse entre sí¹⁷⁸. La relación entre GDL y PQT en la solución es un factor importante para la formación de esta red estable. La concentración de GDL en la solución determina la velocidad de acidificación y el pH

final de la solución, por lo cual será responsable de la neutralización de cargas adecuada para la formación de agregados, incidiendo en el tamaño de agregados formados. Como se observa en la Figura 4.41, es necesario que la cantidad de PQTТ y el valor de R se encuentren en un rango adecuado para que ocurra la formación del gel. Por otro lado, la cantidad de PQTТ necesaria en la solución para formar un gel estable es mayor para mayores valores de R. Una acidificación más extensiva produce un descenso del pH por debajo del pI y las PQTТ adquieren carga positiva; aumenta su solubilidad, lo cual es una desventaja cuando se quiere formar un gel por agregación de proteínas.

La adición de un PS a una solución que dará lugar a la formación de geles, permite la formación de geles con características distintas. Dependiendo de la interacción proteína – PS y del grado de (in)compatibilidad termodinámica de los sistemas mixtos, podrán obtenerse geles con estructuras particulares. Esto afectará, no solo la reología y capacidad de retención de agua de los geles, sino que también se alterarán las condiciones mínimas requeridas para la gelificación. Para determinar estas condiciones, se evaluó la formación de geles a partir de PQTТ 2,4 %P/V, ensayando distintos R y concentraciones de Cgn, como se muestra en la Figura 4.42. Se utilizó la concentración de 2,4 %P/V de PQTТ, ya que es el doble del mínimo de la concentración a la cual se empiezan a formar los geles con un R de 0,33 que fue de 1,2 %P/V. Se observó que la presencia de Cgn altera el pH máximo al cual se pueden formar los geles, siendo necesarios pH más ácidos para la gelificación. Esto estaría de acuerdo con lo observado en los experimentos de agregación: la presencia de Cgn disminuyó el pH al cual la velocidad de agregación supera a la velocidad de disociación de los agregados, de manera que los sistemas de PQTТ conteniendo Cgn requerirán un medio más ácido para la formación de agregados, y posteriormente, geles. Este comportamiento fue advertido para todas las concentraciones de Cgn, exceptuando la mayor. Esto podría deberse a que la presencia de una concentración muy elevada de Cgn altera la estabilidad de los agregados de PQTТ de alguna manera que compensa lo observado anteriormente.

Por último, se determinó la cantidad mínima necesaria de PQTТ para formar geles en presencia de distintas concentraciones de Cgn, utilizando un R=1; los resultados se muestran en la Figura 4.43. El R=1 fue utilizado debido a que a este R la cantidad de PQTТ necesaria para formar los geles es alta y permite detectar

variaciones en la misma al aumentar las concentraciones de Cgn en las mezclas formadoras de gel.

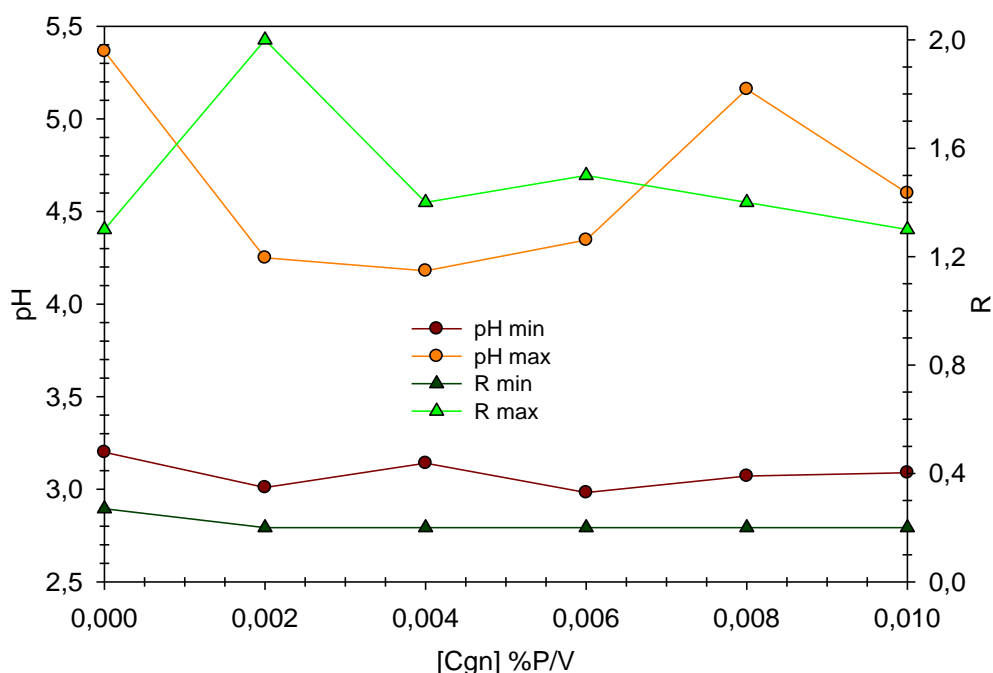


Figura 4.42: R máximos y mínimos y pH máximos y mínimos para la formación de geles con las distintas concentraciones de Cgn. [PQTT]=2,4 %P/V.

Se observó que la presencia de Cgn disminuyó la cantidad de PQTT mínima requerida para formar geles. Incluso si se considera la concentración total de polímero (PQTT – Cgn) en la mezcla, la presencia de Cgn no compensa la disminución observada en la concentración de PQTT requerida para formar los geles. Es decir, hay una interacción de PQ con el Cgn favorable para la formación de geles ácidos ¹⁷⁹.

La interacción de PQ y Cgn en el rango de pH en cual se forman los geles es asociativa teniendo esto en cuenta se puede sugerir que la mezcla PQ – Cgn forma la matriz en los geles ácidos. Las propiedades de los geles mixtos se estudiaron y se presentan en las secciones siguientes.

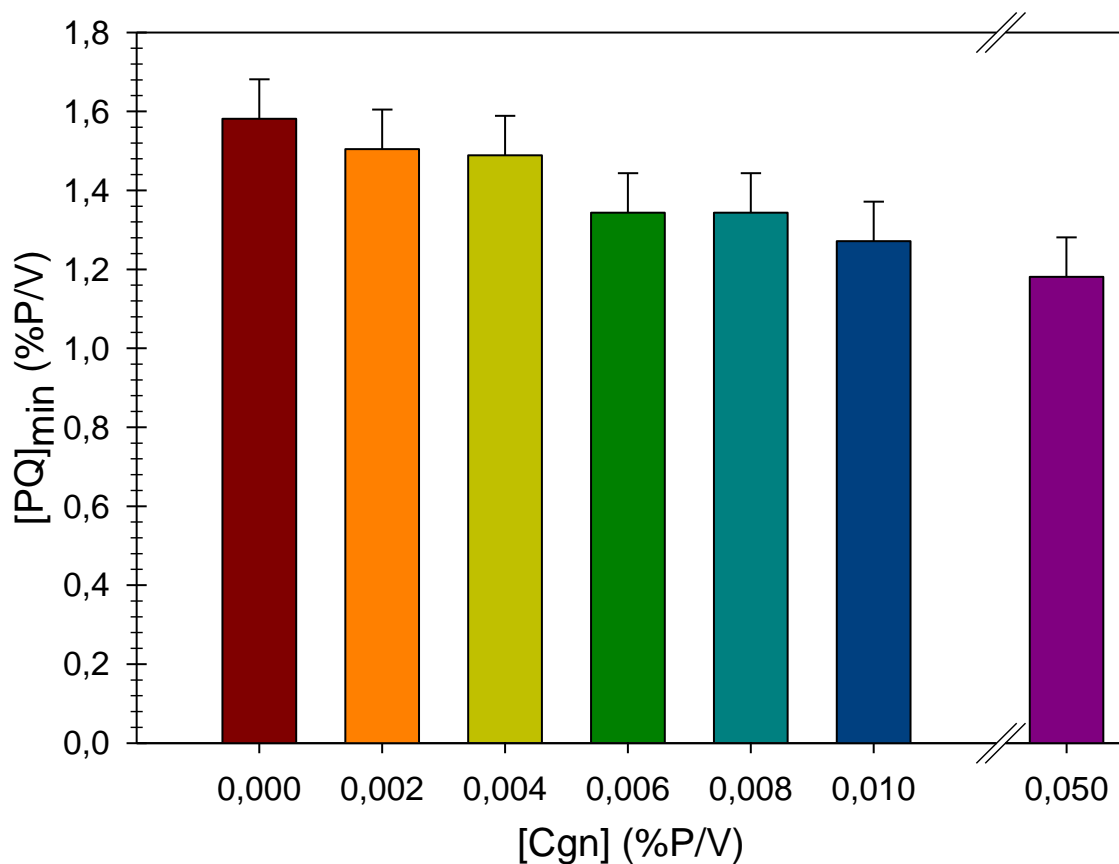


Figura 4.43: Concentración mínima de PQ para formar geles ácidos en función de la concentración de Cgn.

4.4.5. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA

Para poder iniciar la caracterización de los geles proteicos ensayados, se determinó la cantidad de agua expelida cuando se somete al gel a una centrifugación moderada por corto tiempo, sin romper la red proteica durante el centrifugado ¹⁸⁰. Se analizó la capacidad de retención de agua (CRA) preparando geles con distinta concentración de PQT y de Cgn variando la relación GDL/PQ (R), los resultados se muestran en la Figura 4.44. Analizando todos los resultados se obtuvo la ecuación modelo 4.2 para determinar los factores significantes para la CRA.

$$CRA(\%) = 91,5 - 5,37[PQ] + 23,5R - 2,07[Cgn] - 23,3R^2 + 6,06[PQ]R + 0,545[PQ][Cgn]$$

Ecuación 4.2

[PQ] es la concentración de PQ en %P/V, R es adimensional y [Cgn] es la concentración de Cgn en 10^{-3} %P/V. Se utilizará esta misma nomenclatura de ahora

en adelante para la obtención de las ecuaciones modelo ya que todos los experimentos fueron realizados con muestras de las mismas concentraciones. Como puede observarse en la Ecuación 4.2 y la Figura 4.44, los tres factores afectaron de manera significativa a la CRA de los geles.

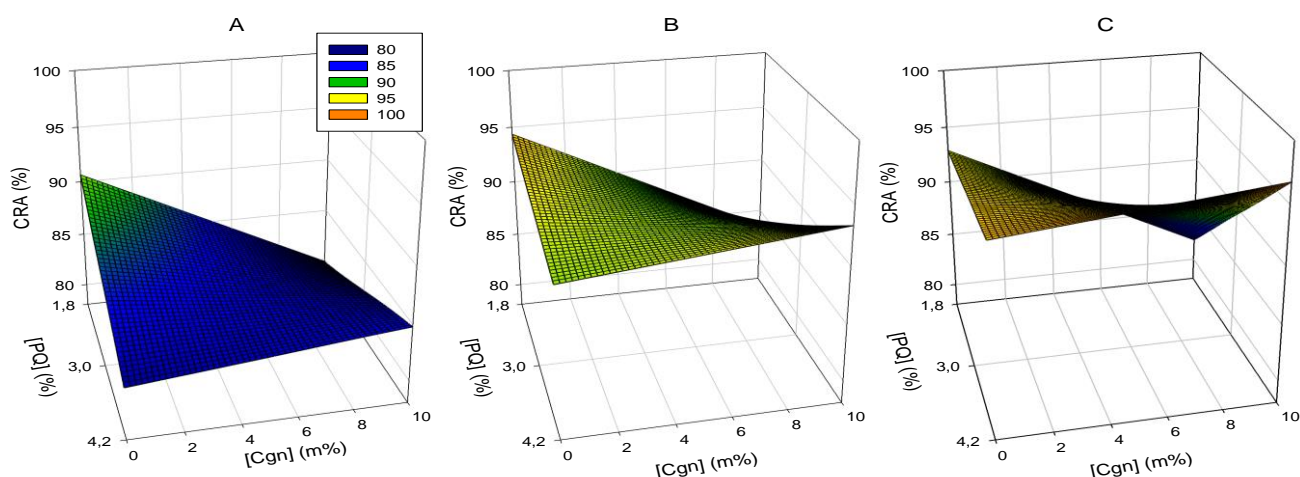


Figura 4.44: Capacidad de retención de agua para distintas relaciones PQ/Cgn. A) $R=0,33$; B) $R=0,66$; C) $R=1,00$

Tanto la concentración de PQ como la de Cgn tiene un efecto negativo sobre la CRA, es decir que al incrementarse la concentración de una u otra macromolécula se esperaría un descenso de la CRA. Sin embargo, estos dos factores presentan una interacción entre sí, representado por el último término de la ecuación. De esta manera, puede inferirse que la presencia de Cgn tiene un efecto sinérgico con la concentración de PQ sobre la CRA de los geles. Esta sinergia estaría relacionada con lo observado respecto de la disminución de la concentración mínima de PQ requerida para formar geles en presencia de Cgn (Figura 4.43). Por otra parte, el R tiene un efecto positivo sobre la CRA, es decir que la acidificación utilizando elevados R, dentro del rango ensayado, permite obtener geles con mayor CRA. Esto estaría relacionado con lo observado en los experimentos de agregación, en los cuales se encontró que los agregados obtenidos con mayor R fueron de mayor tamaño (Figura 4.38), por lo que puede proponerse que en su estructura engloban agua que no es expelida durante la centrifugación.

En modelos cárnicos (geles de proteínas cárnicas) se observó que la adición de κ -carragenano y el incremento de la concentración de proteína aumentan la CRA. Se determinó que el κ -carragenano no participa en la formación de la matriz

polimérica del gel y se propuso que el mismo estaría presente en los espacios intersticiales de la matriz proteica ¹⁸¹. Considerando esta experiencia, podría sugerirse que la concentración de biomoléculas estaría afectando la CRA no sólo por su efecto en las propiedades estructurales del gel sino también por el efecto osmótico.

En otro trabajo ¹⁸² se ha visto que la adición de CMC a una solución de proteínas de lactosuero modifica la microestructura de los agregados así como la fuerza de la matriz y la CRA de los geles ácidos. La concentración de PS afectó diferencialmente a los geles, y a su CRA, dependiendo de la concentración de proteínas en el sistema, lo que coincide con lo observado para los geles de PQ y Cgn aquí estudiados.

Debido a que la CRA puede relacionarse directamente la interacción entre los polímeros que construyen la estructura al gel, su organización espacial y sus propiedades mecánicas; se estudió la microestructura y la textura de los geles.

4.4.6. MICROESTRUCTURA

Las características microestructurales de geles ácidos compuestos por proteínas y PS se encuentran íntimamente vinculadas con las concentraciones de sus componentes, la velocidad de acidificación y el pH final del sistema. Las interacciones múltiples (proteína – proteína, PS – PS o proteína – PS) son las responsables de la formación de la matriz tridimensional que forme el gel ¹⁸³.

Por microscopía confocal se obtuvieron las imágenes de los geles elaborados a distintas concentraciones de PQ, Cgn y GDL. En la Figura 4.45 se muestran las imágenes obtenidas utilizando el colorante Rodamina B que se une a las proteínas y las tiñe con fluorescencia roja.

A partir de las imágenes binarizadas (Figura 4.46), se determinó la distribución de los tamaños de poro (TP, Ecuación 4.3) y de los tamaños de agregados (TA, Ecuación 4.4). Estas distribuciones resultaron monomodales y sesgadas a la derecha, por lo que se seleccionó a la mediana de los datos para describir a la población ¹⁸⁴. A partir de las medianas obtenidas para cada condición, se ajustaron las siguientes ecuaciones para describir el tamaño de poro y de los agregados de los geles mixtos:

$$TP(\mu m) = 2,35 - 0,11[PQ] + 0,04[Cgn] + 2,54R - 0,01[PQ][Cgn] - 0,68[PQ]R$$

Ecuación 4.3

$$TA(\mu m) = 1,84 - 0,28R$$

Ecuación 4.4

El TP de los geles resultó afectado por los 3 factores estudiados: el aumento en la concentración de PQ produjo una disminución en el TP y mientras que el efecto de R y de la concentración de Cgn resultaron dependientes de la concentración de PQ. El aumento de R y/o de la [Cgn] produjeron un aumento en el TP a bajas [PQ], mientras que para la mayor [PQ], un aumento de cualquiera de estos factores produjo una disminución del TP. En geles ácidos de proteínas lácteas adicionados con pectina el incremento de la concentración de PS produjo un incremento en el TP de los geles que fue atribuido a que las interacciones PS – PS y proteína – proteína se ven favorecidas por sobre las interacciones PS – proteína ¹⁸⁵. En este caso, este efecto sólo se observó para las mayores concentraciones de PQ, indicando que a bajas concentraciones de biopolímero se favorecen las interacciones PQ – PS y por encima de cierta concentración se favorece el efecto de exclusión.

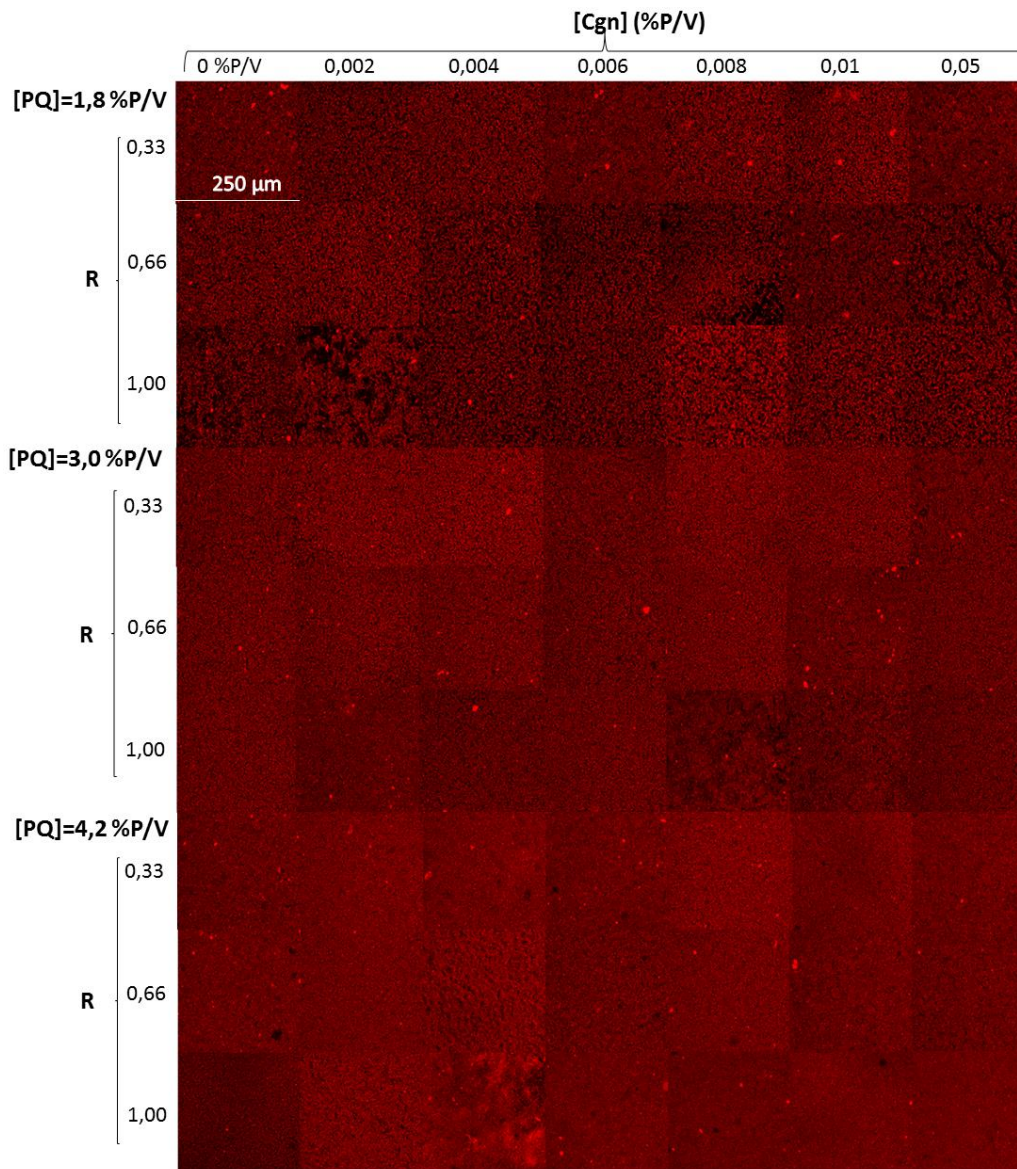


Figura 4.45: Imágenes de microscopía confocal obtenidas para todas las muestras propuestas. [PQ] (%P/V)= 1,8 – 3,0 – 4,2. [Cgn] (%P/V) = 0 – 0,002 – 0,004 – 0,006 – 0,008 – 0,01 – 0,05. R = 0,33 – 0,66 – 1,00.

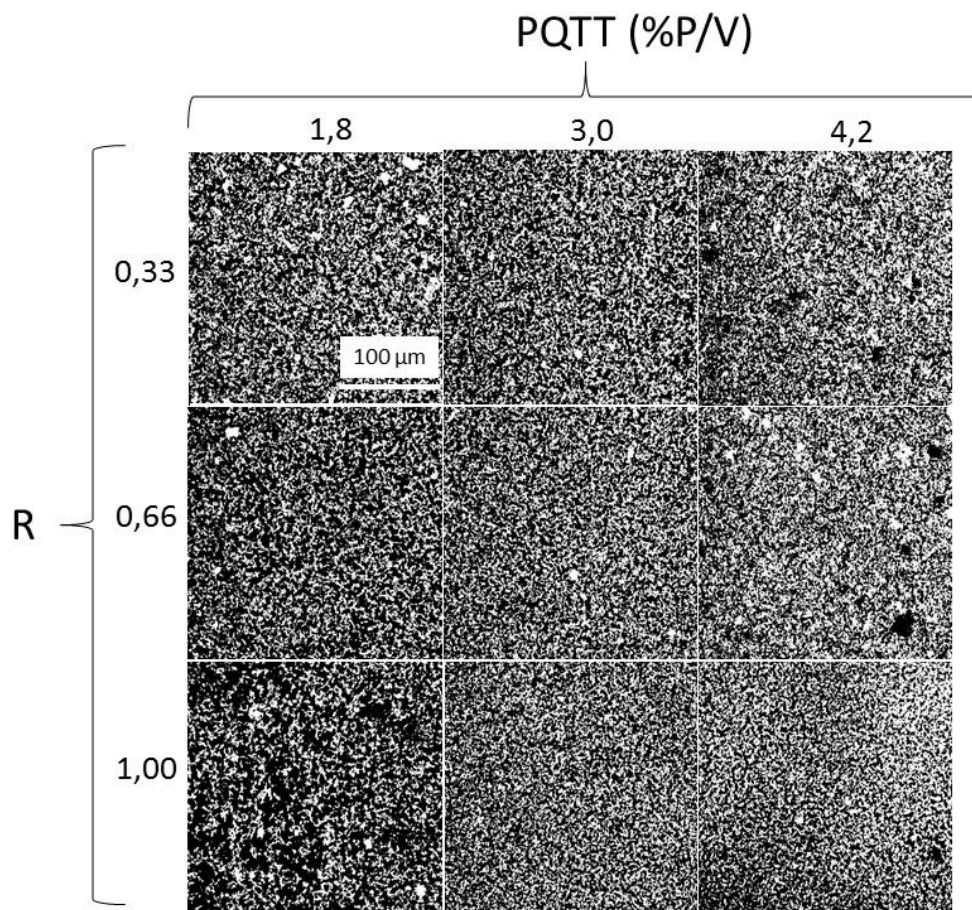


Figura 4.46: Imágenes binarizadas de geles ácidos de PQ, A) [PQ] = 1,8, R = 0,33; B) [PQ] = 1,8 %P/V, R = 0,66; C) [PQ] = 1,8 %P/V, R = 1,00; D) [PQ] = 3,0 %P/V, R = 0,33, E) [PQ] = 3,0 %P/V, R = 0,66; F) [PQ] = 3,0 %P/V, R = 1,00; G) [PQ] = 4,2 %P/V, R = 0,33, H) [PQ] = 4,2 %P/V, R = 0,66; I) [PQ] = 4,2 %P/V, R = 1,00.

Por otro lado, sólo el valor de R resultó significativo para el TA, lo que indicaría que el TA sólo depende del pH final o bien de la velocidad con la cual se acidifica el medio. Se ha visto en otros trabajos que la velocidad de acidificación o hidrólisis de GDL es importante en el TA ¹⁸⁶. También se ha reportado que la presencia de pequeños cosolutos influye en el TA de los geles inducidos por GDL ¹¹⁹. Por otra parte, la conformación y carga de las macromoléculas implicadas en la gelificación están influidas por la temperatura, así como también la velocidad de hidrólisis de la GDL ¹⁷⁸. Al igual que lo observado en este trabajo, en geles ácidos de caseína y goma xantana se observó que si bien el incremento del PS afectó al TP, el TA no se vio modificado ^{187,188}. En el mismo trabajo indican que el aumento de la concentración de PS produce estructuras más heterogéneas. Esto sugiere que la presencia de PS produce agregados proteicos de tamaño similar pero con mayor contenido proteico.

Se calculó el segundo momento angular (SMA), un parámetro de textura digital, para cada una de las imágenes de los geles ácidos. Este parámetro se relaciona con la homogeneidad de las imágenes y se calcula considerando la distribución de las intensidades de gris de las imágenes transformadas en tonos de gris. El SMA resultó dependiente de la concentración de PQ y de Cgn e independiente de R.

$$SMA = 2,434 \cdot 10^{-3} - 1,786 \cdot 10^{-4}[PQ] + 1,025 \cdot 10^{-5}[Cgn] \quad \text{Ecuación 4.5}$$

Como se observa en la ecuación 4.5, el aumento de la [PQ] produjo una disminución de la homogeneidad, mientras que el aumento de la [Cgn] produjo un aumento de la misma. Esto podría relacionarse con el tipo de estructura que se forma, un aumento de la [PQ] produce agregados más compactos. El pH de formación de geles se encuentra en el rango R2 (pH 2,9 a 5,5) por lo que mayores concentraciones de Cgn aumentan la solubilidad de las PQ en este rango de pH, sugiriendo que hay una mayor cantidad de proteína soluble distribuida más homogéneamente. La formación de una red polimérica en los geles resulta de una competencia entre la interacción asociativa de PQ – Cgn y la agregación PQ – PQ. Este resultado podría estar indicando que al aumentar la concentración de Cgn se producen agregados más homogéneos por la interacción asociativa PQ – Cgn y que un aumento de la concentración de PQ produce un desordenamiento de los agregados al favorecer la interacción PQ – PQ.

4.4.7. COLOR y APARIENCIA

En las Figura 4.47 se muestran las fotografías de los geles tomadas sobre fondo blanco y sobre fondo negro. Las imágenes obtenidas con el fondo blanco se utilizaron para calcular los parámetros de color L^* , a^* y b^* . En general, los geles de ensayos mostraron valores de L^* entre 82 y 90, a^* entre 3,5 y 6, y b^* entre 13,5 y 24,5. Estos valores indican que las muestras tienen alta luminosidad y presentan una coloración amarillenta con un muy pequeño aporte de componente rojo. Estos parámetros permiten calcular índices de color apropiados para el tipo de muestra con la que se trabajó: índice de blancura (IB), índice de amarillez (IA) y opacidad (IO). El IO y el IB de los geles están relacionados con la refracción de luz y dependen del tamaño de las partículas sólidas: mientras más densas o compactas sean, mayor será su capacidad de refractar la luz ¹⁸⁹.

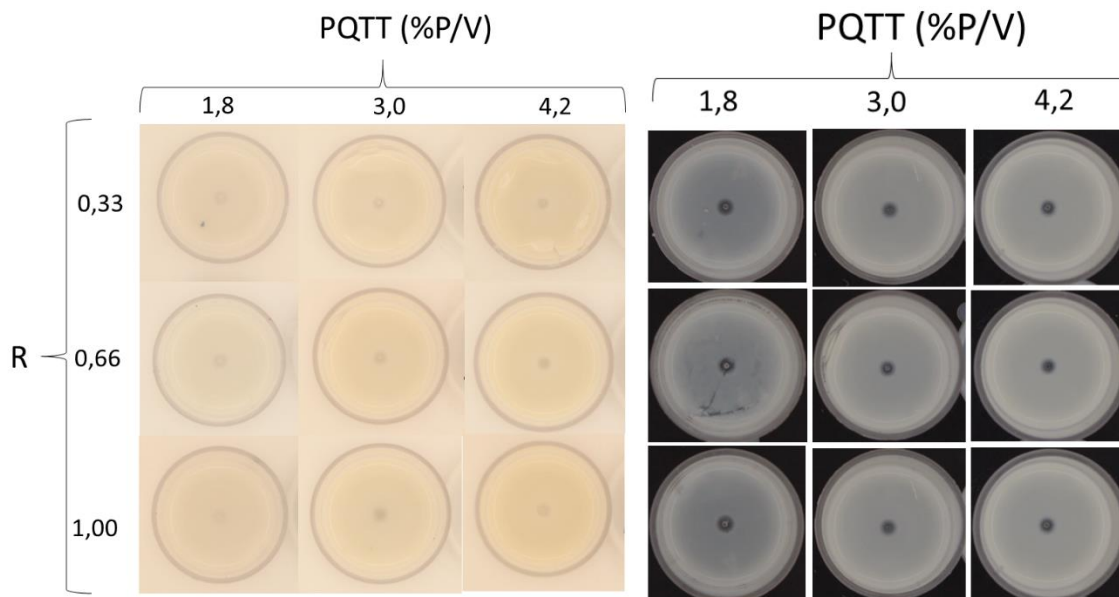


Figura 4.47: Fotos sobre fondo blanco y negro, a distintas concentraciones de PQ (1,8 – 3,0 – 4,2 %P/V) y distinto R (0,33 – 0,66 – 1,00).

Los valores de IA resultantes variaron entre un 21 % y 42 %, y los de IB entre 9 % y 85 %. Se destaca que una disminución en el IB no fue siempre acompañada de un incremento del IA. Los valores calculados de IO fueron calculados con los parámetros de color provenientes de las imágenes con fondo blanco y fondo negro. Los mismos variaron entre 55 % y 79 %, indicando que estos geles son opacos, lo cual es esperable cuando se forman geles proteicos a partir de proteínas globulares¹³⁹ por acidificación y formación de la red polimérica cercana al pl de las proteínas¹⁹⁰. Los valores de IO se encontraron entre 55 y 75 %, valores muy por encima de los reportados para otro tipo de geles. En geles térmicos de proteínas de suero lácteo el IO resultó 33,5 % y 44 % para concentraciones proteicas de 120 g/L y 160 g/L respectivamente¹⁹¹. Esto estaría indicando que los geles estudiados son muy opacos, incluso considerando las bajas concentraciones de PQ con las cuales se trabajó.

Las ecuaciones modelo resultantes para IA (Ecuación 4.9), IB (Ecuación 4.10) y IO (Ecuación 4.11) calculadas a partir de los resultados experimentales están descritas a continuación, mostrando los factores significativos para cada una de las respuestas.

$$IA = 23,14 + 3,787[PQ] \quad \text{Ecuación 4.9}$$

$$IB = 40,336 - 5,13[PQ] + 6,662R - 3,165[PQ]R \quad \text{Ecuación 4.10}$$

$$IO = 51,244 + 6,267[PQ] - 3,361R \quad \text{Ecuación 4.11}$$

Tanto el IA como el IO de los geles se incrementaron con la concentración de PQ, mientras que el IB fue afectado negativamente por la misma. Esto puede explicarse debido al color que tienen las PQ a pH 8,5 cuando inicia la gelificación ácida. Steffolani¹⁴⁵ determinó el color de aislados de PQ ($L^* = 65,9$, $a^* = 1,5$ y $b^* = 17,3$) y sugirió que, debido a su color, su aplicación estaría destinada a postres de chocolate, productos de panadería, pasta, embutidos, cereales azucarados, salsas, y productos alimentarios para niños. En comparación con las proteínas de amaranto y soja¹⁹², las PQ presentan una menor luminosidad. Esto ha sido explicado debido a la extracción de un pigmento propio de la harina, con propiedades de solubilidad similares a las de las PQ y cuyo pKa estaría en el rango de pH de trabajo.

Tanto el IO como el IB están, además, afectados por los valores de R. A mayores R se obtienen geles más translúcidos y menos opacos, relacionando la transparencia de los geles con el pH final de los mismos¹⁹³.

4.4.8. TEXTURA

La textura de geles proteicos se relaciona con las interacciones que se dan en la matriz, que a su vez dependen de la concentración de proteína, del grado de desnaturalización de la misma y de la diferencia entre el pH del sistema y el pl de las proteínas^{28,194,195}. En geles mixtos, la presencia de PS modifica las interacciones intermoleculares y, si el PS es ionizable, también modifica la velocidad de acidificación y el pH final del sistema, afectando a las propiedades mecánicas de los geles¹⁹⁶.

Los perfiles de fuerza vs. penetración (Figura 4.48) se procesaron y, a partir de los mismos se obtuvieron ecuaciones modelo para las respuestas: fuerza máxima alcanzada ($F_{m\acute{a}x}$, la resistencia opuesta por el gel a la penetración uniaxial) y firmeza (F_m , pendiente del perfil).

$$\text{Log}(F_{m\acute{a}x}) = 0,861 + 0,227[PQ] + 6,23 \cdot 10^{-3}[Cgn] - 0,176R \quad \text{Ecuación 4.12}$$

$$F_m = -6,34 + 4,133[PQ] - 0,023[Cgn] + 0,041[PQ][Cgn] \quad \text{Ecuación 4.13}$$

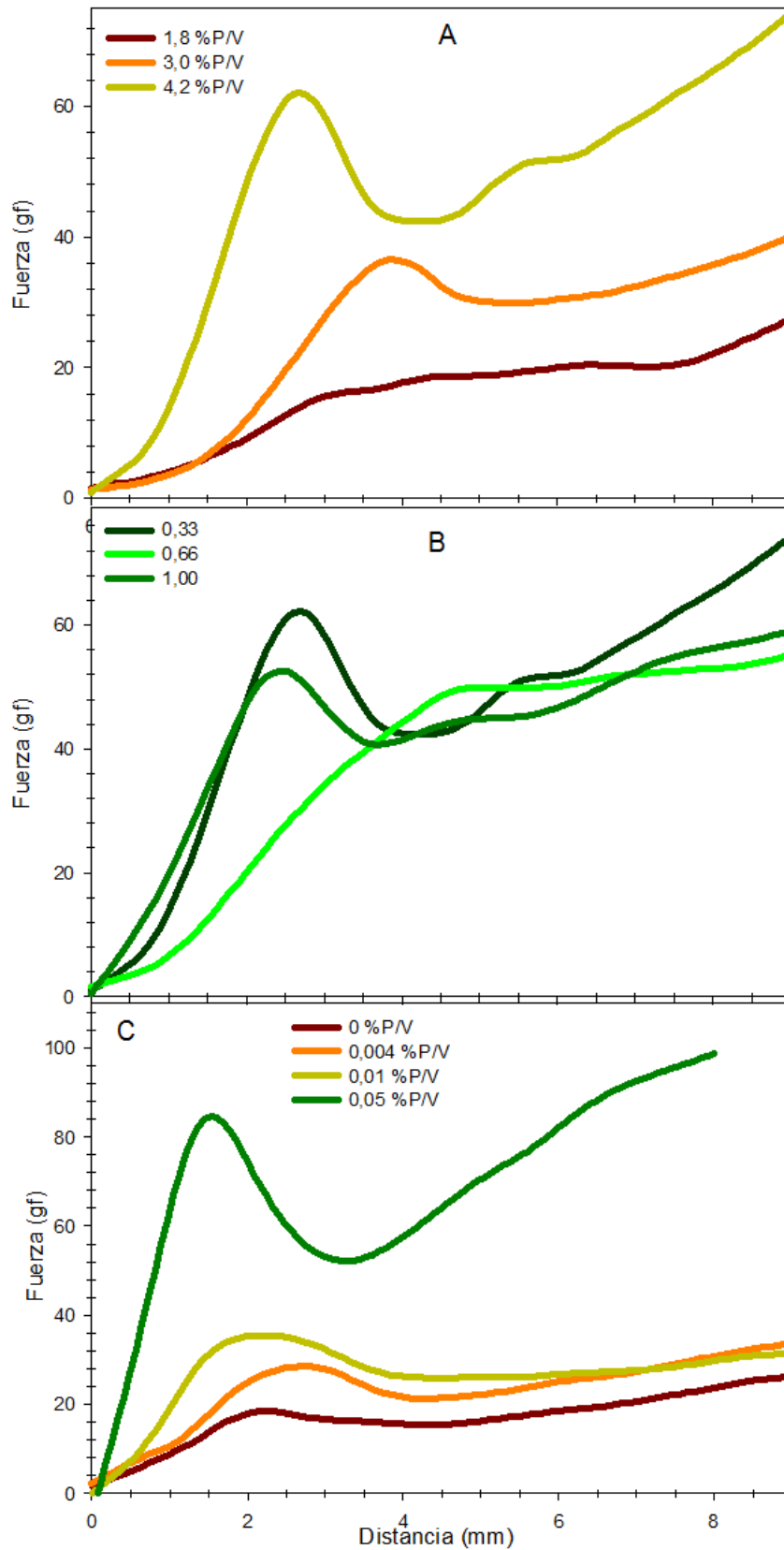


Figura 4.48: Ejemplos de los perfiles de textura resultantes. Perfil de textura de los geles de A) distintas [PQ], [Cgn] = 0 %P/V, R = 0,33; B) [PQ] = 1,8 %P/V, [Cgn] = 0 %P/V, distinto R; C) [PQ] = 4,2 %P/V, distintas [Cgn], R = 0,66.

Se observa en la Ecuación 4.12 que los 3 factores en estudio son significativos para la $F_{m\acute{a}x}$. Sin embargo, sólo la [PQ] y la [Cgn] son significativas para la F_m (Ecuación 4.13). Un incremento en la concentración de cualquiera de estos biopolímeros produce un aumento de la $F_{m\acute{a}x}$ y la F_m de los geles. Además la concentración de PQ y Cgn tienen un efecto sinérgico sobre la F_m , lo que se relaciona a lo discutido previamente respecto de la concentración mínima de gelificación. Lo contrario se observó para sistemas compuestos por proteínas y polisácaridos que se separan en fases segregativamente ¹⁹⁷.

El efecto de R sobre la $F_{m\acute{a}x}$ resultó negativo, indicando que la mayor velocidad de acidificación produce geles menos fuertes. Esto podría relacionarse con lo que se discutió anteriormente, respecto del efecto de R sobre la posibilidad de reestructuración de los agregados proteicos. Por otra parte, si se incrementa R, disminuye el pH final del sistema. El pH final de los geles estudiados se encontró en el rango 3,2 a 4,5, por lo que se desprende que los mayores R ensayados produjeron geles con un pH más alejado del pI de las PQ y en dichos geles las interacciones PQ – PQ serían menos fuertes que cuando $R=0,33$.

4.4.9. RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA Y LAS PROPIEDADES DE LOS GELES DE PQ Y Cgn

La velocidad de acidificación de los sistemas se encuentra regulada por el R y, por lo tanto, éste incide sobre la estructura de agregados formados y su tamaño. Las interacciones PQ – PQ son las responsables de formar la red polimérica de los geles y la presencia de Cgn modifica las condiciones de formación de los geles, su estructura y propiedades.

Se encontró que el TP incide sobre el IB (medido en fondo blanco) y el IO; esto puede ser debido a que los geles con mayores TP son más transparentes debido a que permiten más el paso de la luz. Se calculó el índice de correlación de Pearson (ρ) entre el TP y el IB ($\rho = 0,577$; $p < 0,005$) y entre el TP y el IO ($\rho = -0,832$; $p < 0,005$). Sin embargo, los parámetros cromáticos de los geles sólo se relacionan con la concentración de proteína y el pH final de los geles.

Tanto el TP como la CRA se encuentran afectados por todos los factores estudiados. En ausencia de Cgn, TP y CRA aumentan cuando se incrementa R y disminuyen con la concentración de PQ, indicando que geles de PQ con TP mayores tienen la capacidad de almacenar mayor cantidad de agua. Sin embargo, en los geles

mixtos estudiados, no se encontró correlación significativa entre ambos parámetros ($p = 0,0696$), lo que puede atribuirse al efecto de la presencia de Cgn. Para la menor concentración de PQ, el aumento en la concentración de Cgn aumenta el TP, debido a que las interacciones PQ – Cgn dan lugar a agregados más compactos. En esta misma situación, el incremento en la concentración de Cgn produce una disminución en la CRA debido a que la competencia entre la interacción PQ – PQ y PQ – Cgn debilita la matriz proteica que constituye el gel, en cuanto a su capacidad de retener agua.

La concentración de ambos biopolímeros incrementa la $F_{\text{máx}}$ de los geles. Se encontró una correlación negativa entre el TP y la $F_{\text{máx}}$ ($p = 0.00167$), indicando que los geles con poros más pequeños son más fuertes, debido al mayor entrecruzamiento de la red.

5. CONCLUSIONES

La quinoa es un alimento que está siendo revalorizado en los últimos años, destacando sus propiedades nutricionales, debido a su elevado contenido proteico y su balance de aminoácidos imprescindibles; es apta para celíacos, no contiene alérgenos conocidos y es un grano versátil agronómicamente. En este trabajo de tesis se estudiaron las propiedades fisicoquímicas y texturales de las proteínas de quinoa (PQ) así como su hidrólisis con peptidasas de *Aspergillus niger*, y su interacción con polisacáridos ionizables.

Se optimizó el aislamiento de las PQ a partir de harina desgrasada comercial con un 10% de rendimiento. En el estudio mediante espectroscopía de fluorescencia y de dicroísmo circular, dispersión dinámica de la luz, microscopía confocal y electroforesis se determinó que las PQ se encontraban compuestas mayoritariamente por proteínas globulares con elevado contenido de estructura nativa. Las PQ presentaron un perfil típico de solubilidad para proteínas vegetales, con un *pI* de 4,1. Se encontró que en medio alcalino las PQ forman agregados solubles.

El medio optimizado para la producción de peptidasas de *A. niger* por fermentación en estado sólido para la hidrólisis de PQ consistió en cáscara de naranja y cascarilla de soja en una proporción 3:1, pH 7,05 y concentración de NaNO₃ de 4 g/L. Se determinó el rango de pH y temperatura de estabilidad de las peptidasas obtenidas, encontrándose que las mismas resultan estables entre pH 4 y 12 y hasta 65°C. Por otro lado, la máxima actividad proteolítica se observó a pH 10 y 65 °C. Se ensayaron distintos tiempos de hidrólisis de las PQ a pH 9,1 a 37°C y se estudiaron las características fisicoquímicas y actividad antioxidante de los péptidos producidos. Se encontró una correlación entre el tiempo de hidrólisis, el grado de hidrólisis de los péptidos y su solubilidad a pH 4,5. Por otra parte, se encontró que el proceso de hidrólisis incrementó la capacidad antioxidante de los péptidos.

Se estudió la interacción de las PQ con polisacáridos (PS) ionizables (*i*-carragenano, Cgn, alginato, carboximetilcelulosa y quitosano) y el efecto de los mismos sobre la solubilidad y las propiedades fisicoquímicas de las PQ. Se encontraron diferentes comportamientos según el pH: 1) interacción atractiva, dando lugar a la asociación de las macromoléculas o, 2) exclusión preferencial, dando lugar

a la agregación de las PQ. Las interacciones entre PQ y PS se explicaron teniendo en cuenta factores electrostáticos y el efecto hidrofóbico.

Se construyeron distintas estructuras tridimensionales para la chenopodina (Ch) con el objetivo de simular su interacción con polielectrolitos. Mediante simulaciones de Monte Carlo se realizaron titulaciones ácido base en un modelo de célula de Ch en ausencia y presencia de diferentes polielectrolitos. La comparación de los resultados obtenidos mediante simulación con los obtenidos experimentalmente permitió concluir que la capacidad de regulación de cargas de las PQ es el factor responsable de la interacción entre las mismas y los PS a pHs cercanos al pl.

Mediante espectroscopía de fluorescencia y dispersión dinámica de la luz se estudió el efecto sobre las PQ de un tratamiento térmico a 95°C durante 10 min en ausencia y presencia de Cgn. Se encontró que este PS posee un efecto protector sobre las PQ ya que su presencia atenuó el efecto del tratamiento térmico. Se estudiaron las propiedades funcionales de agregación y gelificación ácida de las PQ tratadas térmicamente en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de Cgn. Se estudió el proceso de agregación de las PQ variando la velocidad de acidificación y la concentración de Cgn. Se encontró que inicialmente los agregados solubles de PQ se disocian y posteriormente, al acercarse al pl, se asocian para formar agregados de mayor tamaño. El tamaño de los mismos fue altamente dependiente de la concentración de glucono- δ -lactona (GDL) utilizada para acidificar el medio. Por otro lado, se encontró que la concentración adicionada de Cgn afecta significativamente el proceso de agregación así como también el tamaño de los agregados. Se determinaron las concentraciones necesarias de PQ y GDL para la formación de geles. La concentración mínima requerida de PQ depende directamente del R utilizado para la gelificación y se encuentra en el orden del 1,2 %P/V. El pH necesario para que se formen los geles resultó ser entre 3,1 y 5,4. Se evaluó también el efecto de la presencia de Cgn y se encontró que concentraciones crecientes del mismo produjeron una disminución de la concentración mínima de PQ. Se estudiaron las características microestructurales de los geles ácidos de PQ adicionados con Cgn, su capacidad de retención de agua, su apariencia y su textura mecánica. El tamaño de los agregados proteicos en los geles resultó dependiente de la relación GDL/PQ (R), indicando que el tamaño de los agregados depende de la velocidad de

acidificación. Se determinaron los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) de los geles, que fueron afectados por la concentración de PQ, debido a su coloración amarillenta; y al R, relacionado con el pH final de los geles, que incide sobre la coloración del sistema. Se calcularon los índices de amarillez, blancura y opacidad de los geles mixtos ácidos de PQ – Cgn. La opacidad de los geles se vio inversamente correlacionada con el tamaño de los poros, determinado por microscopía confocal. La capacidad de retención de agua se vio incrementada por el R y afectada por la concentración de ambos biopolímeros. Se correlacionó el TP con los índices de blancura y opacidad. Se realizaron perfiles de textura por penetración uniaxial y a partir de los mismos se determinaron la fuerza máxima de quiebre y la firmeza de los geles. La fuerza máxima de quiebre resultó afectada por la concentración de PQ, de Cgn y por el R mientras que la firmeza sólo por la concentración de los biopolímeros. Se encontró que la firmeza de los geles se correlaciona inversamente con el parámetro de textura digital “homogeneidad” obtenido a partir del análisis digital de las micrografías de los geles. Las características de los geles resultan de la competencia entre la interacción de PQ – Cgn y la interacción PQ – PQ.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Cheftel, J.-C. C., Lorient, J.-L. & Capont, D. L. *Proteínas alimentarias: bioquímica propiedades funcionales valor nutricional modificaciones químicas*. (1989).
2. Pennacchiotti Monti, I. Las proteínas: generalidades y su importancia en nutrición y en la industria de alimentos. (1998).
3. Braverman, J. B. S., Berk, Z. H. & Fernando, A. *Introducción a la bioquímica de los alimentos*. (1980).
4. Osborne, T. B. *The proteins of the wheat kernel*. (Carnegie institution of Washington, 1907).
5. De, C. *et al. Química de los alimentos*. (2006).
6. Rojas, R. M. *Nutrición y dietética para tecnólogos de los alimentos*. (Ediciones Díaz de Santos, 2013).
7. Reeds, P. J. Dispensable and indispensable amino acids for humans. *J. Nutr.* **130**, 1835S–1840S (2000).
8. Sarwar, G. & McDonough, F. E. Evaluation of protein digestibility-corrected amino acid score method for assessing protein quality of foods. *Journal-Association Off. Anal. Chem.* **73**, 347–356 (1989).
9. Schaafsma, G. The protein digestibility–corrected amino acid score. *J. Nutr.* **130**, 1865S–1867S (2000).
10. García, M. C., Puchalska, P., Esteve, C. & Marina, M. L. Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta* **106**, 328–349 (2013).
11. Monzó, J. M. *Nutrición Humana. Univ. Politéc. Val.* (2006).
12. Cuthbertson, D. P. *Proteins in Food. Bmj* **1**, (Elsevier, 1960).
13. Young, V. R. & Pellett, P. L. Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **59**, 1203S–1212S (1994).
14. Shewry, P. R. & Casey, R. *Seed proteins*. (Springer, 1999).
15. Morr, C. V & Ha, E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **33**, 431–476 (1993).
16. Giese, J. Spices and seasoning blends: A taste for all seasons. *Food Technol.* (1994).
17. Pilosof, A. M. R. & Bartholomai, G. B. Caracterización funcional y estructural de

- proteínas. *Cyted-Eudeba* (2000).
18. Ghosh, A. K. & Bandyopadhyay, P. Polysaccharide-Protein Interactions and Their Relevance in Food Colloids. (2012).
 19. Ortiz, S. E. M., Puppo, M. C. & Wagner, J. R. Relationship between structural changes and functional properties of soy protein isolates – carrageenan systems. *Food Hydrocoll.* **18**, 1045–1053 (2004).
 20. Clark, A. H. H., Judge, F. J. J., Richards, J. B. B., Stubbs, J. M. M. & Suggett, A. Electron microscopy of network structures in thermally-induced globular protein gels. *Int. J. Pept. Protein Res.* **17**, 380–92 (1981).
 21. Hill, S. E., Ledward, D. A. & Mitchell, J. R. *Functional Properties of food Macromolecules*. (Springer Science & Business Media, 1998).
 22. Ziegler, G. R. & Foegeding, E. A. The Gelation Of Proteins. *Adv. Food Nutr. Res.* **34**, 203–298 (1990).
 23. Hosseini, S. M. H. *et al.* Polysaccharide type and concentration affect nanocomplex formation in associative mixture with β -lactoglobulin. *International Journal of Biological Macromolecules* **93**, (Elsevier B.V., 2016).
 24. Kharlamova, A., Inthavong, W., Nicolai, T. & Chassenieux, C. The effect of aggregation into fractals or microgels on the charge density and the isoionic point of globular proteins. *Food Hydrocoll.* **60**, 470–475 (2016).
 25. Nishinari, K., Fang, Y., Guo, S. & Phillips, G. O. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocoll.* **39**, 301–318 (2014).
 26. Delboni, L. A. & da Silva, F. L. B. On the complexation of whey proteins. *Food Hydrocoll.* **55**, 89–99 (2016).
 27. Phillips, L. G., Whitehead, D. M. & Kinsella, J. Introduction to Functional Properties of Proteins. *Struct. Prop. Food Proteins* 107–109 (1994). doi:10.1016/B978-0-12-554360-6.50009-7
 28. Kang, I. I. J., Matsumura, Y. & Mori, T. Characterization of Texture and Mechanical Properties of Heat-Induced Soy Protein Gels. **5**, 339–345 (1991).
 29. Ikeda, S., Foegeding, E. A. & Hagiwara, T. Rheological Study on the Fractal Nature of the Protein Gel. 8584–8589 (1999).
 30. Catsimpoolas, N. & Meyer, E. W. Gelation Phenomena of Soybean Globulins. I. Protein-Protein Interactions. *Unknown* **47**, 559–570 (1970).

31. Alting, A. C. *et al.* Acid-induced cold gelation of globular proteins: effects of protein aggregate characteristics and disulfide bonding on rheological properties. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 623–631 (2004).
32. Van der Linden, E. & Foegeding, E. A. *Gelation. Principles, Models and Applications to Proteins. Modern Biopolymer Science* (2009). doi:10.1016/B978-0-12-374195-0.00002-1
33. Heremans, K. High pressure effects on biomolecules. *High Press. Process. foods* **7**, 81–97 (1995).
34. Bryant, C. M. & McClements, D. J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends Food Sci. Technol.* **9**, 143–151 (1998).
35. Weel, K. G. C. *et al.* Flavor Release and Perception of Flavored Whey Protein Gels: Perception Is Determined by Texture Rather than by Release. (2002). doi:10.1021/JF0202786
36. Lucey, J. A. & Singh, H. Formation and physical properties of acid milk gels: A review. *Food Res. Int.* **30**, 529–542 (1997).
37. Tolstoguzov, V. B. Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocoll.* **4**, 429–468 (1991).
38. Tolstoguzov, V. B. Interactions of gelatin with polysaccharides. *Gums stabilisers food Ind.* **5**, 157–175 (1990).
39. Jancurová, M., Minarovičová, L. & Dandár, A. Quinoa – a Review. **27**, 71–79 (2009).
40. Giusti, L. El género *Chenopodium* en Argentina: I. Números de cromosomas. *Darwiniana* 98–105 (1970).
41. Bazile, D., Salcedo, S. & Santivañez, T. Conclusions: Challenges, opportunities and threats to quinoa in the face of global change. (2016).
42. Martínez, E. A., Fuentes, F. F. & Bazile, D. History of Quinoa : Its Origin , Domestication , Diversification , and Cultivation with Particular Reference to the Chilean Context. *Quinoa Improv. Sustain. Prod.* 19–24 (2015). doi:10.1002/9781118628041.ch2
43. Abugoch James, L. E. Quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*): composition, chemistry, nutritional, and functional properties. *Adv. Food Nutr. Res.* **58**, 1–31 (2009).

44. FAO, I. WFP. 2013. *state food insecurity world* (2013).
45. Primo, Y. E. Química Agrícola. III Alimentos. *Editor. Alhambra. Madrid* 129–159 (1979).
46. Prego, I., Maldonado, S. & Otegui, M. Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. *Ann. Bot.* **82**, 481–488 (1998).
47. Ruales, J. & Nair, B. M. Content of fat, vitamins and minerals in quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*) seeds. *Food Chem.* **48**, 131–136 (1993).
48. Albarran, C. Estudio de algunos componentes químicos, caracteres morfoanatomicos y patrones proteicos en semillas de dos ecotipos de quinua (*Chenopodium quinoa wild*). *Concepción, Chile. Univ. Concepción* (1993).
49. Paredes, T. & Alejandra, M. Caracterización de Aislados proteicos de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) y su Digestibilidad gástrica y duodenal (in vitro). (2016).
50. Drzewiecki, J. *et al.* Identification and Differences of Total Proteins and their Soluble Fractions in some Pseudocereals Based on Electrophoretic Patterns. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7798–7804 (2003).
51. Tapia, M. *et al.* *La Quinoa y La Kañiwa: Cultivos Andinos.* **40**, (Bib. Orton IICA/CATIE, 1979).
52. Berti, C. *et al.* Immunochemical and molecular properties of proteins in *Chenopodium quinoa*. *Cereal Chem.* **81**, 275–277 (2004).
53. Brinegar, C., Sine, B. & Nwokocha, L. High-cysteine 2S seed storage proteins from quinoa (*Chenopodium quinoa*). *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1621–1623 (1996).
54. Steffolani, M. E., León, A. E. & Pérez, G. T. Study of the physicochemical and functional characterization of quinoa and kañiwa starches. *Starch - Stärke* **65**, 976–983 (2013).
55. Bejarano-Luján, D. L. & Netto, F. M. Effect of alternative processes on the yield and physicochemical characterization of protein concentrates from *Amaranthus cruentus*. *LWT - Food Sci. Technol.* **43**, 736–743 (2010).
56. Chronakis, I. S., Kasapis, S., Richadson, R. K. & Doxastakis, G. Characterisation of a Commercial Soy Isolate By Physical Techniques. *J. Texture Stud.* **26**, 371–389 (1995).
57. Abugoch, L. E., Romero, N., Tapia, C. A., Silva, J. & Rivera, M. Study of some

- physicochemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa willd*) protein isolates. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 4745–4750 (2008).
58. Salcedo-Chávez, B., Osuna-Castro, J. A., Guevara-Lara, F., Domínguez-Domínguez, J. & Paredes-López, O. Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6515–6520 (2002).
 59. Hettiarachchy, N. S., Griffin, V. K. & Gnanasambandam, R. Preparation and functional properties of a protein isolate from deffated wheat germ. *Cereal Chem.* **73**, 363–367 (1996).
 60. Mohamed, A., Hojilla-Evangelista, M. P., Peterson, S. C. & Biresaw, G. Barley Protein Isolate: Thermal, Functional, Rheological, and Surface Properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **84**, 281–288 (2007).
 61. Mohamed, A., Biresaw, G., Xu, J., Hojilla-Evangelista, M. P. & Rayas-Duarte, P. Oats protein isolate: Thermal, rheological, surface and functional properties. *Food Res. Int.* **42**, 107–114 (2009).
 62. Abugoch, L. E. *et al.* Stability of quinoa flour proteins (*Chenopodium quinoa Willd.*) during storage. *Int. J. Food Sci. Technol.* **44**, 2013–2020 (2009).
 63. Elsohaimy, S. A., Refaay, T. M. & Zaytoun, M. A. M. Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Ann. Agric. Sci.* **60**, 297–305 (2015).
 64. Valenzuela, C., Abugoch, L. E., Tapia, C. & Gamboa, A. Effect of alkaline extraction on the structure of the protein of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) and its influence on film formation. 843–849 (2013). doi:10.1111/ijfs.12035
 65. Avila, G., Xiao, W., Boekel, M. Van, Minor, M. & Stieger, M. Effect of extraction pH on heat-induced aggregation , gelation and microstructure of protein isolate from quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*). *Food Chem.* **209**, 203–210 (2016).
 66. Mäkinen, O. E., Zannini, E. & Arendt, E. K. Modifying the Cold Gelation Properties of Quinoa Protein Isolate: Influence of Heat-Denaturation pH in the Alkaline Range. *Plant Foods Hum. Nutr.* **70**, 250–256 (2015).
 67. Mäkinen, O. E., Zannini, E., Koehler, P. & Arendt, E. K. Heat-denaturation and aggregation of quinoa (*Chenopodium quinoa*) globulins as affected by the pH value. *Food Chem.* **196**, 17–24 (2016).
 68. Clemente, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food*

- Sci. Technol.* **11**, 254–262 (2001).
69. Tavano, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **90**, 1–11 (2013).
 70. Neklyudov, a. D., Ivankin, a. N. & Berdutina, a. V. Properties and uses of protein hydrolysates (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **36**, 452–459 (2000).
 71. Shahidi, F. & Zhong, Y. Bioactive peptides. *J AOAC Int* **91**, 914–931 (2008).
 72. Coda, R., Rizzello, C. G., Pinto, D. & Gobbetti, M. Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1087–96 (2012).
 73. Jakubczyk, A., Karaś, M., Baraniak, B. & Pietrzak, M. The impact of fermentation and *in vitro* digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from pea proteins. *Food Chem.* **141**, 3774–3780 (2013).
 74. Coda, R. *et al.* Long-term fungal inhibitory activity of water-soluble extracts of *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto and sourdough lactic acid bacteria during bread storage. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 7391–8 (2008).
 75. Rizzello, C. G., Cassone, A., Coda, R. & Gobbetti, M. Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food Chem.* **127**, 952–959 (2011).
 76. Rizzello, C. G., Nionelli, L., Coda, R. & Gobbetti, M. Synthesis of the Cancer Preventive Peptide Lunasin by Lactic Acid Bacteria During Sourdough Fermentation. *Nutr. Cancer* **64**, 111–120 (2012).
 77. Rizzello, C. G. *et al.* Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *J. Funct. Foods* **27**, 549–569 (2016).
 78. Mannheim, A. & Cheryan, M. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: Preparation and functional properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 1163–1169 (1992).
 79. Raper, K. B. & Fennell, D. I. The genus *Aspergillus*. *The genus Aspergillus*. (1965).
 80. Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. & Van Dijck, P. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 426–435 (2002).
 81. Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G. & Pandey, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-

- state fermentation. *Process Biochem.* **40**, 2689–2694 (2005).
82. Inoue, T., Yoshida, T. & Ichishima, E. Molecular cloning and nucleotide sequence of the 1,2- α -d-mannosidase gene, *msdS*, from *Aspergillus saitoi* and expression of the gene in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1253**, 141–145 (1995).
 83. Barthomeuf, C., Pourrat, H. & Pourrat, A. Collagenolytic activity of a new semi-alkaline protease from *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 233–236 (1992).
 84. Coral, G., Arikan, B., Unaldi, M. N. & Guvenmez, H. Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Ann. Microbiol.* **53**, 491–498 (2003).
 85. Abidi, F., Aissaoui, N., Chobert, J.-M., Haertlé, T. & Marzouki, M. N. Neutral Serine Protease from *Penicillium italicum*. Purification, Biochemical Characterization, and Use for Antioxidative Peptide Preparation from *Scorpaena notata* Muscle. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **174**, 186–205 (2014).
 86. Kalpana Devi, M., Rasheedha Banu, A., Gnanaprabhal, G. R., Pradeep, B. V. & Palaniswamy, M. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J. Sci. Technol.* **1**, 1–6 (2008).
 87. Imeson, A. P. & Corporation, F. M. C. 5 Carrageenan. *Handb. Hydrocoll.* 87–101 (1973).
 88. Di Rosa, M. Biological properties of carrageenan. *J. Pharm. Pharmacol.* **24**, 89–102 (1972).
 89. Hurtado-Ponce, A. Q. Carrageenan properties and proximate composition of three morphotypes of *Kappaphycus alvarezii* Doty (*Gigartinales*, *Rhodophyta*) grown at two depths. *Bot. Mar.* **38**, 215–220 (1995).
 90. Draget, K. I. 22 Alginates. *Handb. Hydrocoll.* 379–395 (2009).
 91. Baar, A., Kulicke, W., Szablikowski, K. & Kiesewetter, R. Nuclear magnetic resonance spectroscopic characterization of carboxymethylcellulose. *Macromol. Chem. Phys.* **195**, 1483–1492 (1994).
 92. Dutta, P. K., Dutta, J. & Tripathi, V. S. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *J. Sci. Ind. Res. (India)*. **63**, 20–31 (2004).
 93. Rinaudo, M. Relation between the molecular structure of some polysaccharides

- and original properties in sol and gel states. *Food Hydrocoll.* **15**, 433–440 (2001).
94. De Kruif, C. G. & Tuinier, R. Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocoll.* **15**, 555–563 (2001).
 95. Dickinson, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocoll.* **17**, 25–39 (2003).
 96. De Vries, R. Monte Carlo simulations of flexible polyanions complexing with whey proteins at their isoelectric point. *J. Chem. Phys.* **120**, 3475–3481 (2004).
 97. Mattison, K. W., Brittain, I. J. & Dubin, P. L. Protein-polyelectrolyte phase boundaries. *Biotechnol. Prog.* **11**, 632–637 (1995).
 98. Kirkwood, J. G. & Shumaker, J. B. Forces between protein molecules in solution arising from fluctuations in proton charge and configuration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **38**, 863–871 (1952).
 99. da Silva, F. L. B. & Jönsson, B. Polyelectrolyte – protein complexation driven by charge regulation. *Soft Matter* **5**, 2862 (2009).
 100. Lund, M. & Jönsson, B. On the charge regulation of proteins. *Biochemistry* **44**, 5722–5727 (2005).
 101. Kurut, A., Persson, B. A., Åkesson, T., Forsman, J. & Lund, M. Anisotropic interactions in protein mixtures: self assembly and phase behavior in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Lett.* **3**, 731–734 (2012).
 102. Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., Teller, A. H. & Teller, E. Equation of state calculations by fast computing machines. *J. Chem. Phys.* **21**, 1087–1092 (1953).
 103. Frenkel, D. & Smit, B. *Understanding molecular simulations: from algorithms to applications.* (Academic Press, 1996).
 104. da Silva, F. L. B., Lund, M., Jönsson, B. & Åkesson, T. On the complexation of proteins and polyelectrolytes. *J. Phys. Chem. B* **110**, 4459–4464 (2006).
 105. Kalos, M. H. & Whitlock, P. A. *Monte carlo methods.* (John Wiley & Sons, 2008).
 106. Hammersley, J. *Monte carlo methods.* (Springer Science & Business Media, 2013).
 107. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* (1951).
 108. Laemmli, U. Relevant page on gel electrophoresis. *Nature* **227**, 681 (1970).

109. Sreerama, N. & Woody, R. W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Anal. Biochem.* **287**, 252–260 (2000).
110. Piaruchi, J. Producción de proteasas de origen fúngico y evaluación de su actividad enzimática sobre proteínas lácteas. (Universidad Nacional de Rosario., 2014).
111. Cupp-Enyard, C. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. *J. Vis. Exp.* **e899**, 1–3 (2008).
112. Adler Nissen. Enzymic hydrolysis of food proteins. *Enzym. Hydrolys. food proteins.* (1986).
113. Kato, A. & Nakai, S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct.* **624**, 13–20 (1980).
114. Re, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231–1237 (1999).
115. Garcia, E. J. *et al.* Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. *Braz. Dent. J.* **23**, 22–27 (2012).
116. Horne, D. S. Determination of the fractal dimension using turbidimetric techniques. Application to aggregating protein systems. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **83**, 259 (1987).
117. Ridler, T.W. Calvard, S. Picture Thresholding Using an Iterative Slection Method. *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.* **8**, 630–632 (1978).
118. Mellema, M., Heesakkers, J. W. M., Van Opheusden, J. H. J. & Van Vliet, T. Structure and scaling behavior of aging rennet-induced casein gels examined by confocal microscopy and permeametry. *Langmuir* **16**, 6847–6854 (2000).
119. Pugnali, L. A., Matia-Merino, L. & Dickinson, E. Microstructure of acid-induced caseinate gels containing sucrose: Quantification from confocal microscopy and image analysis. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **42**, 211–217 (2005).
120. Hildebrand, T. & Rüeeggsegger, P. Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* **1**, 15–23 (1997).
121. Haralick, R. M., Shanmugam, K. & Dinstein, I. Textural Features for Image

- Classification. *Syst. Man Cybern. IEEE Trans.* 610–621 (1973).
doi:10.1109/TSMC.1973.4309314
122. Longstaff, D. *et al.* Improving Co-occurrence Matrix Feature Discrimination. *PROC. DICTA'95, 3 RD Int. Conf. Digit. IMAGE Comput. Tech. Appl.* 643–648 (1995).
 123. Zheng, C., Sun, D.-W. & Zheng, L. Recent applications of image texture for evaluation of food qualities—a review. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 113–128 (2006).
 124. Soazo, M., Pérez, L. M., Rubiolo, A. C. & Verdini, R. A. Prefreezing application of whey protein-based edible coating to maintain quality attributes of strawberries. *Int. J. Food Sci. Technol.* **50**, 605–611 (2015).
 125. Yam, K. L. & Papadakis, S. E. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. *J. Food Eng.* **61**, 137–142 (2004).
 126. León, K., Mery, D., Pedreschi, F. & León, J. Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images. *Food Res. Int.* **39**, 1084–1091 (2006).
 127. Chang, J., Da Silva, J. D., Sakai, M., Kristiansen, J. & Ishikawa-Nagai, S. The optical effect of composite luting cement on all ceramic crowns. *J. Dent.* **37**, 937–943 (2009).
 128. Shie, J. S. & Park, J. W. Physical Characteristics of Surimi Seafood as Affected By Thermal Processing Conditions. *J. Food Sci.* **64**, 287–290 (1999).
 129. Rhim, J. W., Wu, Y., Weller, C. L. & Schnepf, M. Physical Characteristics of a Composite Film of Soy Protein Isolate and Propyleneglycol Alginate. *J. Food Sci.* **64**, 149–152 (1999).
 130. Pons, M. & Fiszman, S. M. Instrumental Texture Profile Analysis With Particular Reference To Gelled Systems. *J. Texture Stud.* **27**, 597–624 (1996).
 131. Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **254**, 248–254 (1976).
 132. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* **28**, 350–356 (1956).
 133. Jönsson, B., Lund, M. & Barroso da Silva, F. L. Electrostatics in macromolecular solutions. in *Conference on Food Colloids 2006* **302**, 129–154 (Royal Society of

- Chemistry, 2007).
134. Marcus, R. A. Calculation of thermodynamic properties of polyelectrolytes. *J. Chem. Phys.* **23**, 1057–1068 (1955).
 135. Da Silva, F. L. B., Jönsson, B. & Penfold, R. A critical investigation of the Tanford-Kirkwood scheme by means of Monte Carlo simulations. *Protein Sci.* **10**, 1415–1425 (2001).
 136. Anema, S. G. & de Kruif, C. G. K. Complex coacervates of lactotransferrin and β -lactoglobulin. *J. Colloid Interface Sci.* **430**, 214–220 (2014).
 137. Kizilay, E. *et al.* Structure of bovine β -lactoglobulin–lactoferrin coacervates. *Soft Matter* **10**, 7262–7268 (2014).
 138. Skoog, B. & Wichman, A. Calculation of the isoelectric points of polypeptides from the amino-acid-composition. *Trac-Trends Anal. Chem.* **5**, 82–83 (1986).
 139. Brinegar, C. & Goundan, S. Isolation and characterization of chenopodin, the 11S seed storage protein of quinoa (*Chenopodium quinoa*). *J. Agric. Food Chem.* **41**, 182–185 (1993).
 140. Carrillo, W., Carpio, C., Toapanta, A. & Vilcacundo, R. Analysis of protein isolate from quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **9**, 332–334 (2016).
 141. Kaspchak, E. *et al.* Determination of heat-set gelation capacity of a quinoa protein isolate (*Chenopodium quinoa*) by dynamic oscillatory rheological analysis. *Food Chem.* **232**, 263–271 (2017).
 142. Romero-Zepeda, H. & Paredes-Lopez, O. Isolation and characterization of amarantin, the 11S amaranth seed globulin. *J. Food Biochem.* **19**, 329–339 (1995).
 143. Jönsson, B., Lund, M. & da Silva, F. L. B. Electrostatics analysis of the mutational and pH effects of the N-terminal domain self-association of the major ampullate spidroin. *Conf. Food Colloids 2006* **302**, 129–154 (2016).
 144. Vilcacundo, R. *et al.* Digestibility of Quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) Protein Concentrate and Its Potential to Inhibit Lipid Peroxidation in the Zebrafish Larvae Model. *Plant Foods Hum. Nutr.* **72**, 294–300 (2017).
 145. Steffolani, M. E. *et al.* Physicochemical and Functional Characterization of Protein Isolated from Different Quinoa Varieties (*Chenopodium quinoa Willd.*). *Cereal Chem. J.* **93**, 275–281 (2015).

146. Maltais, A., Remondetto, G. E. & Subirade, M. Mechanisms involved in the formation and structure of soya protein cold-set gels: A molecular and supramolecular investigation. *Food Hydrocoll.* **22**, 550–559 (2008).
147. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. (Springer Science & Business Media, 2013).
148. Gorinstein, S., Zemser, M., Friedman, M., Vasco-Méndez, N. L. & Paredes-López, O. Denaturant-Induced Conformations of Globulins. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 93–99 (1996).
149. Johnson, W. C. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **35**, 307–312 (1999).
150. Navarro-Lisboa, R. *et al.* Quinoa proteins (*Chenopodium quinoa Willd.*) fractionated by ultrafiltration using ceramic membranes: The role of pH on physicochemical and conformational properties. *Food Bioprod. Process.* **102**, 20–30 (2017).
151. Hunter, R. J. *Zeta potential in colloid science: principles and applications.* **2**, (Academic press, 2013).
152. Yadav, S. K., Bisht, D., Tiwari, S. & Darmwal, N. S. Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **4**, 667–677 (2015).
153. Beg, Q. K. & Gupta, R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme Microb. Technol.* **32**, 294–304 (2003).
154. Deng, A., Wu, J., Zhang, Y., Zhang, G. & Wen, T. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus sp.* B001. *Bioresour. Technol.* **101**, 7100–7106 (2010).
155. Tunga, R., Shrivastava, B. & Banerjee, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochem.* **38**, 1553–1558 (2003).
156. Wang, S.-L., Chen, Y.-H., Wang, C.-L., Yen, Y.-H. & Chern, M.-K. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme Microb. Technol.* **36**, 660–665 (2005).

157. Sarmadi, B. H. & Ismail, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* **31**, 1949–1956 (2010).
158. Padilla, F. C. & Rincón, A. M. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. **58**, 303–308 (2008).
159. Huang, D., Boxin, O. U. & Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1841–1856 (2005).
160. Nsimba, R. Y., Kikuzaki, H. & Konishi, Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus spp.* seeds. *Food Chem.* **106**, 760–766 (2008).
161. Aluko, R. E. & Monu, E. Functional and Bioactive Properties of Quinoa Seed Protein Hydrolysates. *J. Food Sci.* **68**, 1254–1258 (2003).
162. Mattison, K. W., Dubin, P. L. & Brittain, I. J. Complex Formation between Bovine Serum Albumin and Strong Polyelectrolytes: Effect of Polymer Charge Density. *J. Phys. Chem. B* **102**, 3830–3836 (1998).
163. Yuan, Y., Wan, Z. L., Yang, X. Q. & Yin, S. W. Associative interactions between chitosan and soy protein fractions: Effects of pH, mixing ratio, heat treatment and ionic strength. *Food Res. Int.* **55**, 207–214 (2014).
164. Hattori, T., Hallberg, R. & Dubin, P. L. Roles of electrostatic interaction and polymer structure in the binding of β -lactoglobulin to anionic polyelectrolytes: measurement of binding constants by frontal analysis continuous capillary electrophoresis. *Langmuir* **16**, 9738–9743 (2000).
165. Lombardi, J., Picó, G. & Boeris, V. Physicochemical study of the formation of complexes between pancreatic proteases and polyanions. *Int. J. Biol. Macromol.* **79**, 160–166 (2015).
166. Silva, C. P. *et al.* Proposed molecular model for electrostatic interactions between insulin and chitosan. Nano-complexation and activity in cultured cells. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **537**, 425–434 (2018).
167. Benelhadj, S., Gharsallaoui, A., Degraeve, P., Attia, H. & Ghorbel, D. Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate. *Food Chem.* **194**, 1056–1063 (2016).
168. Williams, P. A. *Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques. International Journal of Food Science & Technology* **36**, (Blackwell Science Ltd, 2001).

169. Montellano Duran, N., Spelzini, D., Wayllace, N., Boeris, V. & Barroso da Silva, F. L. A combined experimental and molecular simulation study of factors influencing interaction of quinoa proteins–carrageenan. *Int. J. Biol. Macromol.* **107**, 949–956 (2018).
170. Keskin, O., Ma, B., Rogale, K., Gunasekaran, K. & Nussinov, R. Protein–protein interactions: organization, cooperativity and mapping in a bottom-up Systems Biology approach. *Phys. Biol.* **2**, S24 (2005).
171. Mattil, K. F. The functional requirements of proteins for foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **48**, 477–480 (1971).
172. Kinsella, J. E. & Melachouris, N. Functional properties of proteins in foods : A survey. *Food Sci. Nutr.* **7:3**, 219–280 (1976).
173. Argentino, C. in *Calidad de aguas de bebida* 10–11 (2007).
174. Ibanoglu, E. Effect of hydrocolloids on the thermal denaturation of proteins. *Food Chem.* **90**, 621–626 (2005).
175. Malhotra, A. & Coupland, J. N. The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates. *Food Hydrocoll.* **18**, 101–108 (2004).
176. Mounsey, J. S., O’Kennedy, B. T., Fenelon, M. A. & Brodkorb, A. The effect of heating on β -lactoglobulin-chitosan mixtures as influenced by pH and ionic strength. *Food Hydrocoll.* **22**, 65–73 (2008).
177. Hidalgo, M. E., Riquelme, B. D., Alvarez, E. M., Wagner, J. R. & Risso, P. H. *Acid-Induced Aggregation and Gelation of Bovine Sodium Caseinate-Carboxymethylcellulose Mixtures. Food Industrial Processes - Methods and Equipment* (INTECH Open Access Publisher, 2012).
178. De Jong, S., Klok, H. J. & Van de Velde, F. The mechanism behind microstructure formation in mixed whey protein–polysaccharide cold-set gels. *Food Hydrocoll.* **23**, 755–764 (2009).
179. Picone, C. S. F. & da Cunha, R. L. Interactions between milk proteins and gellan gum in acidified gels. *Food Hydrocoll.* **24**, 502–511 (2010).
180. Quéguiner, C., Dumay, E., Cavalier, C. & Cheftel, J. C. Reduction of *Streptococcus thermophilus* in a whey protein isolate by low moisture extrusion cooking without loss of functional properties. *Int. J. Food Sci. Technol.* **24**, 601–612 (2007).

181. Verbeken, D., Neirinck, N., Van Der Meeren, P. & Dewettinck, K. Influence of κ -carrageenan on the thermal gelation of salt-soluble meat proteins. *Meat Sci.* **70**, 161–166 (2005).
182. Huan, Y., Zhang, S. & Vardhanabhuti, B. Effect of CMC Molecular Weight on Acid-Induced Gelation of Heated WPI-CMC Soluble Complex. *J. Food Sci.* **81**, N502–N507 (2016).
183. Matia-Merino, L. & Singh, H. Acid-induced gelation of milk protein concentrates with added pectin: Effect of casein micelle dissociation. *Food Hydrocoll.* **21**, 765–775 (2007).
184. Lombardi, J. *et al.* Mineral fortification modifies physical and microstructural characteristics of milk gels coagulated by a bacterial enzymatic pool. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **161**, 296–301 (2018).
185. Matia-Merino, L. & Singh, H. Acid-induced gelation of milk protein concentrates with added pectin: Effect of casein micelle dissociation. *Food Hydrocoll.* **21**, 765–775 (2007).
186. Lucey, J. A., Tamehana, M., Singh, H. & Munro, P. A. A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono- δ -lactone. *Food Res. Int.* **31**, 147–155 (1998).
187. Sanchez, C., Zuniga-Lopez, R., Schmitt, C., Despond, S. & Hardy, J. Microstructure of acid-induced skim milk-locust bean gum-xanthan gels. *Int. Dairy J.* **10**, 199–212 (2000).
188. Doublier, J. L., Garnier, C., Renard, D. & Sanchez, C. Protein-polysaccharide interactions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **5**, 202–214 (2000).
189. Bohren, C. F. & Huffman, D. R. *Absorption and scattering of light by small particles.* (Wiley, 2004).
190. Zafiriadis, T. Gelation of globular food proteins. (2006).
191. Spotti, M. J., Santiago, L. G., Rubiolo, A. C. & Carrara, C. R. Mechanical and microstructural properties of milk whey protein/espina corona gum mixed gels. *LWT - Food Sci. Technol.* **48**, 69–74 (2012).
192. Marcone, M. F. & Kakuda, Y. A comparative study of the functional properties of amaranth and soybean globulin isolates. *Nahrung - Food* **43**, 368–373 (1999).
193. Tabilo-Munizaga, G. & Barbosa-Casanovas, G. V. Color and textural parameters of pressurized and heat-treated surimi gels as affected by potato

- starch and egg white. *Food Res. Int.* **37**, 767–775 (2004).
194. Foegeding, E. A. Food biophysics of protein gels: A challenge of nano and macroscopic proportions. *Food Biophys.* **1**, 41–50 (2006).
 195. Campbell, L. J., Gu, X., Dewar, S. J. & Euston, S. R. Effects of heat treatment and glucono-delta-lactone-induced acidification on characteristics of soy protein isolate. *Food Hydrocoll.* **23**, 344–351 (2009).
 196. Zhang, S. & Vardhanabhuti, B. Acid-induced gelation properties of heated whey protein-pectin soluble complex (part II): Effect of charge density of pectin. *Food Hydrocoll.* **39**, 95–103 (2014).
 197. López, D. N., Galante, M., Alvarez, E. M., Risso, P. H. & Boeris, V. Effect of the espina corona gum on caseinate acid-induced gels. *LWT - Food Sci. Technol.* **85**, 121–128 (2017).