

Tesis de Posgrado

Efecto del tratamiento térmico sobre la solubilidad y sorción de agua en proteínas de origen vegetal

Pilosof, Ana María Renata

1981

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pilosof, Ana María Renata. (1981). Efecto del tratamiento térmico sobre la solubilidad y sorción de agua en proteínas de origen vegetal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1679_Pilosof.pdf

Cita tipo Chicago:

Pilosof, Ana María Renata. "Efecto del tratamiento térmico sobre la solubilidad y sorción de agua en proteínas de origen vegetal". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1981.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1679_Pilosof.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

12-0

TESIS REALIZADA EN EL
DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

EFFECTO DEL TRATAMIENTO TERMICO SOBRE LA SOLUBILIDAD Y LA SORCION DE AGUA
EN PROTEINAS DE ORIGEN VEGETAL

Tesis presentada por
ANA MARIA RENATA PILOSOF
para optar al título de Doctor en Cs. Químicas
Orientación Bromatología y Tecnología de Alimentos

Director de tesis : Dr. Gualterio B. Bartholomai

- 1981 -

1679

2-2

A mi esposo

A la memoria de mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gualterio B. Bartholomai por el constante estímulo y dedicación brindados durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Jorge Chirife por la valiosa colaboración prestada con su asesoramiento durante todas las etapas de este trabajo.

Al Departamento de Industrias por haber permitido la realización de este trabajo.

A la Cátedra de Bromatología por haber brindado su laboratorio y su asesoramiento en algunos aspectos experimentales de este trabajo.

A la Universidad de Buenos Aires por haber permitido la realización de este trabajo.

A la Subsecretaría de Ciencia y Tecnología de la Nación (PROGRAMA NACIONAL DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS) por la financiación parcial del mismo.

INDICE

I	- INTRODUCCION	8	
	I.1.	- Las propiedades funcionales, su importancia y los métodos de evaluación	8
	I.2.	- Propiedades funcionales dependientes de la interacción agua-proteína: solubilidad y sorción de agua	15
	I.3.	- Desnaturalización y funcionalidad	22
II	- OBJETO DEL TRABAJO		
III	- PARTE EXPERIMENTAL		27
	III.1.	- Material utilizado	27
	III.1.1.	- Harina de porotos	27
	III.1.2.	- Aislado proteico de porotos	27
	III.2.	- Métodos de análisis de la composición química del material utilizado	28
	III.2.1.	- Determinación de humedad	28
	III.2.2.	- Determinación de proteína	28
	III.2.3.	- Determinación de lípidos	28
	III.2.4.	- Análisis químico cuantitativo de los hidratos de carbono	29
	III.2.4.1	- Extracción de los azúcares	29
	III.2.4.2	- Azúcares totales	30

III.2.4.3 - Azúcares reductores	30
III.2.4.4 - Azúcares invertibles	31
III.2.4.5 - Azúcares sacarificables	32
III.2.5. - Análisis de azúcares por cromatografía gas-líquido	32
III.3. - Técnica colorimétrica para la determinación de proteína soluble	34
III.4. - Determinación de proteína soluble	36
III.5. - Isotermas de sorción	39
III.6. - Preparación de las muestras	40
III.6.1. - Muestras de harina y aislado proteico de porotos	40
III.6.2. - Muestras de harina y aislado proteico de porotos con agregado de glucosa o de ésteres metílicos de ácidos grasos	42
III.7. - Tratamiento térmico	42
III.7.1. - Para la determinación de proteína soluble	42
III.7.2. - Para la determinación de las isotermas	43
IV - RESULTADOS Y DISCUSION	44
IV.1. - Composición química del material utilizado	44
IV.2. - Efecto del tratamiento térmico en la sorción de agua y su correlación con el nitrógeno soluble en harina y aislado proteico de	

	porotos	44
IV.2.1.	- Efecto del tratamiento térmico en las isotermas de sorción de agua de harina y aislado proteico de porotos	44
IV.2.2.	- Efecto del tratamiento térmico en el nitrógeno soluble de harina y aislado proteico de porotos	55
IV.2.3.	- Correlación entre los cambios en la sorción de agua y en la solubilidad de nitrógeno debidos al tratamiento térmico	58
IV.3.	- Cinética de la pérdida de nitrógeno soluble en harina y aislado proteico de porotos	62
IV.3.1.	- Efecto de la temperatura en la velocidad de pérdida de nitrógeno soluble	79
IV.3.2.	- Cálculo del error en las constantes de velocidad de pérdida de nitrógeno soluble	87
IV.3.3.	- Cálculo del error en la Energía de Activación de pérdida de nitrógeno soluble	89
IV.3.4.	- Estimación de los errores absolutos en t , T y C_g	89
IV.3.5.	- Conclusiones	91
IV.4.	- Mecanismos de pérdida de nitrógeno soluble en harina y aislado proteico de porotos	95

IV.4.1. - Conclusiones	112
V - CONCLUSIONES GENERALES	113
VI - NOMENCLATURA	115
VII - BIBLIOGRAFIA	117

I. INTRODUCCION

I.1. Las propiedades funcionales, su importancia y los métodos de evaluación

Los alimentos proteicos de origen animal son o resultan caros en términos de requerimiento de tierra y precios de mercado. En reconocimiento de la necesidad que existe en todo el mundo de aumentar las proteínas en la dieta, particularmente para los grupos de bajos ingresos, se han prodigado intensos esfuerzos para desarrollar alimentos proteicos de bajo costo y una creciente atención de la investigación se ha desviado de los alimentos proteicos tradicionales a las denominadas proteínas alimenticias "no convencionales" (Mattil, 1971).

En el desarrollo de nuevas proteínas, el valor nutricional de las mismas ha sido el criterio que ha predominado llevando a pensar que el conocimiento de su composición química y de su valor biológico es suficiente para la preparación de nuevos productos.

Si bien el valor nutricional constituye una característica importante, existen muchos otros requisitos que una proteína de uso potencial en alimentos debe cumplir. Entre éstos, las propiedades funcionales de las proteínas constituyen la característica más importante que determina el uso de las mismas en el desarrollo de nuevos alimentos (Kinsella, 1976).

El tipo de propiedades funcionales deseables en una proteína dependerá del alimento al cual será incorporada. Por ejemplo, si se trata de una bebida, se necesitará una proteína soluble y de adecuada viscosidad; si se

trata de un pan se requerirá que la proteína tenga una funcionalidad compatible con el gluten; una proteína destinada a la formulación de un producto cárneo deberá poseer buena capacidad ligante de agua, buena capacidad emulsionante y capacidad de ser texturizada en forma de fibras.

Si la proteína o el alimento al cual ella es incorporada no posee ciertas características organolépticas, de textura y estéticas que satisfagan al consumidor, el valor nutricional de las mismas por sí solo no será suficiente para determinar su aceptación por parte del consumidor. La suplementación exitosa de un alimento, y el reemplazo o simulación de una proteína tradicional, dependerá de la posibilidad de disponer de una proteína nueva que posea las características funcionales que están directamente relacionadas con la aceptabilidad del alimento como tal.

Las propiedades funcionales de las proteínas son propiedades físico-químicas que determinan el comportamiento de las mismas en los sistemas alimenticios, a juzgar por los atributos de calidad finales del producto (Kinsella, 1976; Hermansson, 1979). Ellas reflejan complejas interacciones entre composición, estructura, conformación, propiedades físico-químicas de la proteína per se, otros componentes del alimento y la naturaleza del medio donde se hallan o donde se miden.

En la Tabla 1 se da una reseña de las clases de propiedades funcionales de proteínas que son importantes desde el punto de vista de su aplicación en alimentos.

Algunas propiedades funcionales típicas son: emulsificación que es

TABLA 1: Propiedades funcionales de proteínas, importantes para su uso en alimentos.

<u>Propiedad general</u>	<u>Término Funcional Especial</u>
Organolépticas	Color, sabor, olor, textura, sensación bucal.
Hidratación	Solubilidad, dispersibilidad, mojabilidad, sorción de agua, hinchamiento, engrosamiento, gelación, retención de agua, sinéresis, viscosidad, formación de masa.
Superficie	Emulsificación, espumado, aereación, batido, formación de película lipoproteica, capacidad de ligar lípidos, de ligar aromas.
Estructurales	Elasticidad, arenosidad, cohesión, masticabilidad.
Textura	Viscosidad, adhesión, formación de red por entrecruzamiento.
Reológicas	Agregación, viscosidad, gelación, formación de masa, texturizabilidad, formación de fibra, extrudabilidad, elasticidad.

importante en productos cárneos procesados (salchichas, etc.); hidratación y retención de agua en productos a base de masa y de carne; viscosidad, importante en bebidas; gelación, requerida en jaleas y productos fríos a base de carne; espumado/batido en tortas y merengues; cohesión, importante en la manufactura de productos extrudados.

Las propiedades funcionales de las proteínas varían de acuerdo a la fuente de donde provienen, al método de extracción, separación, concentración, deshidratación y están afectadas por las condiciones del medio donde se encuentran, entre los cuales tienen especial influencia la temperatura, el pH y la fuerza iónica.

En el desarrollo de nuevas fuentes proteicas es necesario evaluar sistemáticamente sus propiedades funcionales, ya que su conocimiento permite evaluar sus características, sus aplicaciones potenciales y sus limitaciones.

Debido a la existencia de pocos métodos estandarizados para evaluar propiedades funcionales, los investigadores han utilizado métodos arbitrarios y empíricos con la consecuencia de que muchos de los datos de literatura sobre propiedades funcionales son de uso limitado a fin de comparar resultados sobre funcionalidad de distintas proteínas.

Por lo tanto son necesarios métodos normalizados para facilitar la comparación de datos sobre propiedades funcionales así como para su transferencia a condiciones operativas de especial interés tecnológico.

Los métodos de análisis de las propiedades funcionales pueden dividirse en 3 clases (Peri, 1981):

- Métodos de análisis en sistemas modelo.
- Métodos de análisis en sistemas reales.
- Métodos de análisis a nivel molecular.

Métodos de análisis en sistemas modelo

Es el método más sencillo de evaluación de las propiedades funcionales, realizable con pequeñas cantidades de muestra y muy útil en la puesta a punto de métodos de aislación y purificación (Hermansson, 1979).

Uno de los defectos de este método es que se estudia cada propiedad funcional aisladamente mientras se sabe que existen relaciones entre las mismas. La solubilidad, por ejemplo, determina la capacidad emulsionante o gelificante de una proteína, sin embargo esta relación no ha sido todavía esclarecida. Es evidente que solamente el conocimiento de los mecanismos de acción a nivel molecular puede esclarecer dicha relación e incluso simplificar la evaluación analítica.

Otro de los defectos es que la gran simplicidad del sistema hace muy difícil la transferencia de la información a un sistema complejo, como es generalmente un alimento.

Por último, la reproducibilidad de estos métodos está limitada por la falta de standards de referencia, o sea de productos con características funcionales constantes y reproducibles.

Los experimentos en sistemas modelo tienen especial validez como método de comparación de proteínas de distinto origen o como método de compa

ración de distintas tecnologías para obtener una nueva proteína.

Métodos de análisis en sistemas reales.

Lo que se busca de una nueva proteína es la posibilidad de usarla como sustitutiva o complemento de una proteína tradicional sin modificar (si es posible, o bien exaltar) su funcionalidad.

El mejor sistema de verificar esta aptitud es la de efectuar la substitución en la formulación real y evaluar la funcionalidad a través de las cualidades organolépticas o estructurales del producto.

Es evidente que este método permite la evaluación de la calidad de la formulación y preveer el comportamiento de la misma desde un punto de vista práctico; es por lo tanto un método indispensable en las etapas de optimización del sistema y definición de la tecnología industrial de producción.

Sin embargo cuando la puesta a punto de un proceso se halla en etapa de laboratorio, el método es objetable ya que requiere gran cantidad de producto y consume mucho tiempo.

Además la reproducibilidad de los métodos no es muy buena por las interferencias debidas al gran número de constituyentes y a las distintas variables de la tecnología.

Existe también la dificultad de expresar con parámetros objetivos el juicio sobre el resultado de la experiencia. Generalmente los métodos utilizados para dicha evaluación son reológicos, microscópicos u organolépticos, siendo estos últimos los menos reproducibles.

Métodos de análisis a nivel molecular

Este tipo de estudios lleva indudablemente al conocimiento de los fenómenos responsables de la manifestación de las propiedades funcionales.

Consiste en estudiar las propiedades funcionales en relación a su interacción con el solvente y con otros constituyentes que involucra un conocimiento del rol y de la energía de los enlaces covalentes y no-covalentes, de la estabilización de la estructura molecular y de las relaciones intermoleculares.

I.2. PROPIEDADES FUNCIONALES DEPENDIENTES DE LA INTERACCION AGUA-PROTEINA:

Solubilidad y sorción de agua.

Muchas de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas de uso alimenticio, dependen de las interacciones agua-proteína ya que para impartir la propiedad funcional deseada, deben primeramente interactuar con el agua para rehidratarse, hincharse y/o solubilizarse.

La naturaleza de las interacciones agua-proteína y proteína-proteína determina si la proteína se comportará en el sistema alimenticio como una dispersión coloidal, como gel o como un precipitado insoluble (Chou y Morr, 1979).

La solubilidad y la capacidad de sorción de vapor de agua, son dos propiedades funcionales que están relacionadas a la interacción de las proteínas con el agua.

La solubilidad (o bien la dispersibilidad de un material proteico) es una medida de la capacidad que posee una proteína de formar soluciones coloidales (Quaglia y col., 1981).

El conocimiento de las características de solubilidad en distintas condiciones experimentales, provee información muy útil en la selección de las condiciones óptimas de extracción de las proteínas de sus fuentes originales (Betschart y col., 1973; Hang y col., 1970); asimismo provee un buen índice de las aplicaciones potenciales (o limitaciones) de la proteína (Hermanson, 1973) y da información útil para la optimización de las condiciones de

procesamiento; además revela el efecto del tratamiento por calor que podría afectar sus aplicaciones actuales y potenciales (Wu e Inglett, 1974).

Los perfiles de solubilidad de nitrógeno son usados como guía de funcionalidad ya que ellos pueden relacionarse directamente a importantes propiedades como ser uso en bebidas, emulsificación, capacidad espumígena y gelación.

Los perfiles de solubilidad son la primer propiedad funcional a determinar en una nueva proteína, así como deberían determinarse también en cada etapa de la preparación y procesamiento de la proteína (Betschart, 1974; Mattil, 1971).

Las variantes que afectan la estructura macromolecular de la proteína afectando su solubilidad han sido clasificadas de la siguiente manera por Hermansson (1973):

a) Sales neutras. Cuando se agrega sal progresivamente a una solución de proteína nativa, la solubilidad primero aumenta (salting-in) y luego de pasar por un máximo comienza a disminuir (salting-out).

El proceso "salting-in" ha sido interpretado con suceso como un efecto inespecífico debido a las interacciones electrostáticas entre las moléculas proteicas cargadas y el medio iónico. Estas interacciones llevan a una disminución neta del coeficiente de actividad de la proteína que se refleja en un incremento de la solubilidad.

En contraste al efecto inespecífico del "salting-in", la efectividad de

las sales en inducir "salting-out" depende del tipo de sal.

El fenómeno de "salting out" posiblemente es el resultado de la competencia de las proteínas y de los iones salinos por las moléculas de agua.

b) pH. El cambio de pH modifica la carga de la proteína y por lo tanto el balance electrostático. En el lado alcalino o ácido del punto isoeléctrico las proteínas tienen una carga neta, ya sea negativa o positiva que origina fuerzas repulsivas que causan un incremento de las interacciones proteína-solvente y por ende de la solubilidad. En el punto isoeléctrico la carga neta es cero y las moléculas pueden agregarse ya que predominan las fuerzas atractivas, causando un mínimo de solubilidad.

c) Temperatura. Un incremento de temperatura tiene un efecto de desorden sobre las proteínas y el solvente. Las proteínas podrán desenrollarse y serán posibles nuevas interacciones, a una cierta temperatura la agregación y la coagulación ocurren.

estructura enrollada \rightleftharpoons estructura desenrollada \longrightarrow agregación

d) Solventes orgánicos. Los solventes orgánicos pueden afectar a las proteínas ya sea directamente por unión específica o indirectamente alterando el carácter del solvente.

Fukushima (1969) efectuó un estudio sistemático de la capacidad desnaturizante de 30 tipos de solventes orgánicos sobre proteína de soja. En general, la capacidad desnaturizante depende de la hidrofobicidad del sol

vente y del grado de dilución en agua.

Los solventes orgánicos altamente hidrofóbicos poseen baja capacidad desnaturante frente a las proteínas. El poder desnaturante de los solventes aumenta con la adición de agua; en consecuencia la mezcla agua-solvente tiene mayor capacidad desnaturante que los componentes por sí solos.

Hermansson (1971, 1973, 1974, 1979) estudió el efecto de las sales, del pH y de la temperatura sobre la solubilidad de proteínas de suero de leche, soja, colza y pescado. Mattil (1971), determinó los perfiles de solubilidad de las proteínas de harina de maíz, girasol, algodón y pescado, en agua pura y en presencia de sales. Las sales tuvieron distinto efecto de acuerdo al tipo de proteína y al pH.

Betschart (1974) estudió la influencia de la fuerza iónica, pH y temperatura en la solubilidad de proteína de alfalfa.

Lawhon y Cayer (1971) estudiaron el efecto del método de procesamiento y del pH de precipitación en la solubilidad de aislado proteico de semilla de algodón.

Romo y Bartholomai (1978) estudiaron la influencia del pH, fuerza iónica y del tratamiento térmico en la solubilidad de aislado proteico de porotos, *Phaseolus vulgaris*.

Además de la solubilidad, otras propiedades funcionales relacionadas con la interacción agua-proteína son: la absorción de agua, la capacidad de ligar agua, la adsorción de agua, la retención de agua, la viscosidad y

la gelación.

Los términos absorción de agua y capacidad de ligar agua han sido utilizados indistintamente en la literatura (Kinsella, 1976; Hagenmaier, 1972; Hermansson, 1977).

La sorción de agua se define como el agua adsorbida por una proteína seca de una atmósfera de humedad relativa conocida y constante, luego de alcanzado el equilibrio.

Muchos investigadores han estudiado los aspectos físico-químicos de las interacciones agua-proteína, los métodos para su cuantificación y han descrito los distintos estados del agua asociada a las proteínas (Mc Laren y Rowen, 1952; Bull y Breese, 1968; Fennema, 1977; Chou y Morr, 1979).

Las isotermas de sorción constituyen uno de los métodos más simples de estudiar las interacciones primarias agua-proteína que ha sido utilizado ampliamente por distintos investigadores.

Elas permiten conocer:

- Calores de sorción: importantes desde el punto de vista del secado.
- Entropías de sorción.
- La relación entre el contenido de agua y la actividad acuosa.
- Contenido de agua correspondiente a la monocapa: provee la base para estimar el contenido de humedad óptimo para la estabilidad del producto durante el almacenamiento, ya que a contenidos de humedad menores (menores a_w) se ven favorecidas las reacciones de oxidación de lípidos y a humedades

más altas pueden ocurrir reacciones de pardeamiento no enzimático y crecimiento de microorganismos (Labuza, 1968; Labuza y col., 1972).

Hermansson (1977) señaló que en general todos los estudios hechos en sorción de agua en proteínas están relacionados con la estabilidad de las mismas durante el almacenamiento o con el proceso de secado, siendo muy pocos los estudios hechos de las relaciones entre la sorción de agua y otras propiedades funcionales que dependen de la interacción agua-proteína, como la solubilidad.

Dicha investigadora estudió las isoterms de sorción de agua de distintas proteínas sometidas a tratamiento térmico (efectuado por calentamiento de dispersiones de proteína) y relacionó las diferencias en la sorción con la solubilidad y el hinchamiento de las mismas. Halló que la sorción de agua a actividades de agua bajas e intermedias aumenta con la capacidad de hincharse; a altas actividades acuosas, donde comienza el proceso de solvatación, las diferencias en la sorción se pueden relacionar ya sea al hinchamiento o a la solubilidad.

Kilara y col. (1972) estudiaron la solubilidad y la capacidad de sorción de agua de harina y aislado proteico de girasol.

Wu e Inglett (1974) señalaron que se han hallado algunas correlaciones entre algunas propiedades funcionales de la harina de soja y su solubilidad, por ejemplo entre absorción de agua y solubilidad.

Hutton y Campbell (1977) estudiaron la influencia del pH y de la temperatura en la solubilidad y absorción de agua de concentrado y aislado

de soja y su correlación.

Hermansson (1972) encontró una buena correlación entre fuerza del gel y capacidad de hinchamiento en aislado proteico de soja.

Fennema (1977) hizo una revisión de la relación entre capacidad de ligar agua (o agua "ligada"), desnaturalización y solubilidad de proteínas. Dicho autor concluyó que si bien el tema referente a las interacciones agua-proteína tiene gran importancia, poco se conoce respecto de la naturaleza del agua "ligada" y su relación con la solubilidad de las proteínas.

I.3. DESNATURALIZACION Y FUNCIONALIDAD

Los efectos de la desnaturalización parcial o total en la funcionalidad de las proteínas es de gran significación para su uso actual y potencial en los alimentos; el reconocimiento de la importancia de este fenómeno implica la necesidad de estudiar las condiciones prácticas bajo las cuales las proteínas son lábiles o estables a la desnaturalización (Kinsella, 1976).

Si bien el fenómeno de desnaturalización es familiar, no ha sido interpretado de la misma forma por los distintos investigadores.

En términos generales, el proceso de desnaturalización involucra una alteración de la estructura ordenada de la proteína nativa consistente en la modificación de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, sin ruptura de los enlaces covalentes primarios (Wu e Inglett, 1974; Kinsella, 1976).

La desnaturalización conlleva por lo tanto a un cambio de las propiedades físico-químicas y funcionales de las proteínas.

La solubilidad ha sido comúnmente utilizada como una medida de la desnaturalización ya que generalmente una proteína desnaturalizada posee baja solubilidad; sin embargo existen casos en que solubilidad y desnaturalización no varían paralelamente (Fukushima, 1959).

Es de notar que si bien usualmente la pérdida de solubilidad en proteínas calentadas es atribuible a un proceso de desnaturalización, los cambios en la solubilidad son el resultado del doble efecto de desdoblamiento

de las cadenas polipeptídicas (desnaturalización) y de la agregación de las proteínas; la importancia relativa de uno u otro mecanismo depende de cada sistema en particular y de las condiciones de calentamiento (Fennema, 1977).

La desnaturalización de las proteínas en solución lleva a la formación de un coágulo insoluble; asimismo la insolubilización que acompaña al proceso de secado o al almacenamiento de las proteínas se debe en gran parte a la interacción entre las proteínas desnaturalizadas.

La naturaleza de los enlaces que llevan a la agregación no puede ser muy distinta de la que da estabilidad a la proteína nativa.

Enlaces salinos, puente hidrógeno y disulfuro intermoleculares se han propuesto como responsables de la agregación, así como interacciones entre grupos hidrofóbicos de las proteínas en solución donde, excepto el enlace disulfuro, son poco factibles otros enlaces covalentes (Fukushima, 1970).

Sin embargo en el "estado seco" o de humedades intermedias, pueden ocurrir otros enlaces covalentes como enlaces amida que producen un "cross-linking" adicional.

Muchos concentrados y aislados proteicos se producen en forma deshidratada, la importancia de las isoterms de sorción de agua resulta evidente ya que proporcionan información sobre el estado del agua y su actividad, factores determinantes de la estabilidad de los alimentos de bajo contenido de agua (Labuza y col., 1970; Labuza, 1980). La desnaturalización parece tener poco efecto en la cantidad de agua ligada a las proteínas, manifestándose generalmente como un pequeño incremento de la cantidad de agua ligada (Fe

nema, 1977).

Hermansson (1977) estudió el efecto del tratamiento térmico en dispersiones de proteína de soja y de suero de leche sobre las isotermas de sorción de agua. El tratamiento resultó en un aumento de la capacidad de sorción de agua a actividades acuosas bajas e intermedias; por encima de una a_w de 0,7-0,75 las proteínas sin tratar tienen mayor capacidad de sorción.

El mismo tratamiento térmico provocó una disminución de la solubilidad de ambas proteínas.

Pence y col. (1953) estudiaron los efectos del tiempo, temperatura y contenido de humedad en la desnaturalización por calor del gluten de trigo; la desnaturalización fue medida como pérdida de solubilidad del gluten. La velocidad de pérdida de solubilidad se vio incrementada con la temperatura de tratamiento y con la humedad hasta un contenido de agua de 35%, por encima de este valor la velocidad de insolubilización comienza a disminuir.

Wu e Inglett (1974) publicaron una revisión detallada de los efectos de la desnaturalización por calor y por agentes químicos en las propiedades funcionales de proteínas de origen vegetal.

II. OBJETO DEL TRABAJO

El presente trabajo tiene como objetivo general el estudio del efecto del tratamiento térmico sobre dos propiedades funcionales de las proteínas dependientes de la interacción agua-proteína: sorción de agua y solubilidad.

Dentro del objetivo general se persiguieron las siguientes finalidades:

- estudio del efecto del tratamiento térmico en las isotermas de sorción de agua de las proteínas y su posible correlación con las variaciones de solubilidad que ocurren bajo las mismas condiciones de tratamiento.
- estudio del efecto del tiempo, temperatura y contenido de humedad en la pérdida de solubilidad de proteínas.
- estudio de los posibles mecanismos que conllevan a la pérdida de solubilidad de proteínas.

Se espera que los resultados sean de utilidad en dos aspectos:

- (I) BASICO: Contribuir al conocimiento de la influencia de variables como temperatura, tiempo y contenido de humedad en las propiedades funcionales y al esclarecimiento de los mecanismos básicos que llevan a la pérdida de solubilidad y de otras propiedades funcionales relacionadas.
- (II) APLICADO: El tratamiento térmico que se aplica a las proteínas durante su procesamiento para remover solvente, destruir antinutrientes, inactivar enzimas, eliminar off-flavors y secar, es la variable que más afec-

ta a su funcionalidad especialmente cuando se aplica calor húmedo.

La optimización de estos procesos con el fin de preservar propiedades funcionales de las proteínas, requiere datos cinéticos de pérdida de propiedades funcionales. Siendo la solubilidad el índice más adecuado de funcionalidad, el conocimiento de los parámetros cinéticos correspondientes a la pérdida de la misma (constantes de velocidad y energías de activación) en función del contenido de humedad puede proveer información útil para optimizar dichos procesos.

Variables como temperatura, humedad y tiempo determinan asimismo el deterioro de las proteínas durante su almacenamiento; el conocimiento de los parámetros cinéticos antes mencionados permite predecir cuantitativamente la magnitud de dicho deterioro.

El presente trabajo se realizó sobre harina de porotos (*Phaseolus vulgaris*, variedad alubia) y sobre aislado proteico del mismo poroto.

La elección del material de estudio respondió básicamente a la necesidad de disponer de una proteína con buena solubilidad inicial; el poroto como todas las leguminosas posee un bajo contenido de lípidos lo cual hace innecesaria su extracción previa y por ende el uso de solventes orgánicos que disminuyen la solubilidad y otras propiedades relacionadas.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. MATERIAL UTILIZADO

III.1.1. Harina de porotos

La harina se obtuvo por tamización a través de mallas de 80 "mesh" de porotos (*Phaseolus vulgaris*, variedad alubia), previamente molidos en un molino a paletas.

III.1.2. Aislado proteico de porotos

La proteína fue extraída de la harina de porotos por suspensión de la misma en agua destilada (relación harina:agua 1:10); el pH se ajustó a 10 por agregado de solución diluida de NaOH.

La suspensión se agitó por 1 hora a temperatura ambiente y luego se centrifugó por 1 hora a 2.000 r.p.m. en una centrífuga de laboratorio Rolco de 3 litros de capacidad.

El sobrenadante se filtró a través de papel Whatman N° 41, se ajustó el pH a 3,75 con solución diluida de HCl (punto isoeléctrico aproximado, Romo y Rolfe, 1974), y luego se centrifugó por 30 minutos a 2.000 r.p.m. El sobrenadante conteniendo hidratos de carbono solubles, proteínas y aminoácidos libres se descartó.

El coágulo proteico de color blanco se lavó dos veces con agua destilada y se centrifugó cada vez por 30 minutos a 2.000 r.p.m. El coágulo así obtenido se congeló rápidamente a -40°C en una congeladora a placas y luego

se liofilizó a temperatura ambiente por 30 horas en un liofilizador STOKES 902-1-8 cuya cámara estaba a una presión de 0.1 Torr.

El aislado proteico de color crema obtenido en estas condiciones se molió en un molinillo de laboratorio para lograr una granulometría homogénea, se envasó al vacío y se almacenó a -25°C hasta su uso.

La humedad final de dicho aislado fue de 3,5 g de H_2O /100 g de materia seca.

III.2. MÉTODOS DE ANALISIS DE LA COMPOSICION QUIMICA DEL MATERIAL UTILIZADO

III.2.1. Determinación de humedad

La humedad de las muestras de harina o aislado proteico se determinó gravimétricamente en estufa de aire a 110°C hasta lograr peso constante (1-2 horas).

III.2.2. Determinación de proteína

Se utilizó el procedimiento de Kjeldahl para dosar el nitrógeno total. El contenido de proteína se calculó con un factor de 6,25.

III.2.3. Determinación de lípidos

Se utilizó la técnica de Lyons-Lippert (1966).

A 25 g de harina o de aislado proteico se agregaron 228 ml de la mezcla $\text{CH}_3\text{OH}:\text{Cl}_3\text{CH}:\text{H}_2\text{O}$ (20:10:7,6 v/v), se agitó periódicamente y a las 24

horas se centrifugó y filtró; el residuo sólido se trató con otros 228 ml de la mezcla y se centrifugó y filtró.

Los filtrados (aprox. 500 ml) se adicionaron de 120 ml de agua, se agitó y dejó decantar, se centrifugó y se separó la capa inferior de Cl_3CH ; se deshidrató con SO_4Na_2 y filtró; se evaporó el solvente en rotavapor. El residuo, se tomó con éter etílico y se llevó a peso constante (70°C en vacío).

III.2.4. Análisis químico cuantitativo de los hidratos de carbono

III.2.4.1. Extracción de los azúcares

La extracción se efectuó de acuerdo al método oficial de A.O.A.C. (29.043, 1965).

10 gr de harina o de aislado proteico se pesaron en un Erlenmeyer, se neutralizaron por agregado de 1 gr de CaCO_3 y se añadieron 125 ml de etanol 50% (v/v) y mantuvo en baño de agua (1 hora, $83-87^\circ\text{C}$) empleando un pequeño embudo en el cuello del erlenmeyer como condensador. Una vez frío, se estacionó por una noche, centrifugó 15 minutos a 1.500 r.p.m., lavó por dos veces el residuo con 25-30 ml de etanol neutro cada vez, reuniendo los líquidos de lavado al sobrenadante original.

El líquido se concentró hasta un volumen de 20-40 ml (eliminación del etanol) y se transfirió a un tubo de centrifuga donde se procedió a la defecación por agregado de solución de acetato neutro de Pb, agitó y estacionó por 15 minutos, observando la formación de un precipitado floculento. El exceso de Pb se eliminó por agregado de solución saturada de oxalato de

potasio seguido por centrifugación.

Finalmente se llevó a volumen.

III.2.4.2. Azúcares totales

La determinación se basó en el método del fenol-sulfúrico propuesto por Whistler y Wolfrom (1962).

1 ml de la solución acuosa obtenida en III.2.4.1. conteniendo entre 10 y 70 μ de azúcares se pipeteó en una cuba colorimétrica. Se agregó 1 ml de solución 5% de fenol y se mezcló; asimismo se prepararon tres blancos con 1 ml de H₂O en vez de solución de azúcares.

Utilizando una pipeta modificada de flujo rápido se agregaron 5 ml de SO₄H₂ 96% a cada tubo de tal manera de lograr una buena mezcla y una buena distribución del calor.

Luego de 10 minutos los tubos se agitaron nuevamente y se colocaron en un baño de agua a 25-30°C por 20 minutos. Se observó una coloración amarillo anaranjada estable por algunas horas. Se midieron las absorbancias a 490 nm para hexosas y metilhexosas.

La absorbancia promedio de 3 blancos se sustrajo de la absorbancia de la muestra y se determinó la cantidad de azúcares por referencia a una curva standard de galactosa preparada previamente. Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

III.2.4.3. Azúcares reductores

Se determinaron gravimétricamente por el método de Munson y Walker (AOAC, Official Method 31.037, 1980) sobre el extracto de azúcares obtenido en III.2.4.1. a partir de harina de porotos.

Se colocaron en un vaso de precipitados 25 ml de solución de CuSO_4 , (440,9 mg $\text{Cu}/25\text{ml}$) y 25 ml de solución alcalina de tartrato de sodio y potasio (173 gr de tartrato de sodio y potasio $\cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ y 50 gr NaOH en 500 ml de agua destilada), se agregó 50 ml de la solución obtenida en III.2.4.1.

Se calentó la mezcla tapada con vidrio de reloj sobre un mechero

Bunsen de tal manera de llegar a ebullición en 4 minutos y se mantuvo en ebullición por 2 minutos exactamente.

Se filtró la solución caliente a través de asbestos purificado en

gouch de porcelana por succión. Se lavó el precipitado de Cu_2O con H_2O caliente a 60°C y se secó en estufa a 100°C por 30 minutos. Finalmente se pe-

sg.

Se efectuó un blanco de la misma manera sustituyendo la solución de azúcares por H_2O .

De tablas del AOAC se obtuvieron los valores correspondientes de \bar{a}

azúcares expresados como glucosa.

III.2.4.4. Azúcares invertibles

A una alícuota de 50 ml de la solución obtenida para la determinación de azúcares reductores de la harina, se agregaron 5 ml de HCl $\rho = 1,10$ y se calentó en baño de agua a 60°C durante 30 minutos. Se neutralizó la so-

zaron a temperatura ambiente.

Posteriormente dichos extractos se congelaron a -40°C y se liofiliz

acuerdo a la técnica de la sección III.2.4.1.

Los azúcares se extrajeron de la harina y del aislado proteico de

III.2.5. Análisis de azúcares por cromatografía gas-líquido (CGL)

se en almidón.

el resultado como glucosa. Se utilizó un factor de 0.9 para convertir glucos-

ficables por el método de Munson y Walker citado anteriormente y se expresó

Sobre esta solución se determinaron los hidratos de carbono sacari-

final de 1.000 ml.

1,125 y calentó a refluxo por 2 horas. Luego se filtró y llevó a un volumen

El residuo seco se trató con 671 ml de agua más 67,1 ml de HCl } =

neutro y se secó en estufa de vacío a 50°C sobre CaCl_2 .

1 hora a $83-87^{\circ}\text{C}$, luego se decantó el líquido, se lavó el residuo con etanol

lizo con CaCl_2 , suspendió en 125 ml de etanol 50% y mantuvo en baño de agua

Se partió de 10 gr de harina ó 20 gr de aislado proteico, se neutra

III.2.4.5. Azúcares sacarificables (Almidón)

Walker antes mencionado (AOAC Official Method 31.037, 1980).

Invertibles (expresados como Azúcar Invertido) por el método de Munson y

Sobre una alícuota de esta solución se determinaron los azúcares

lución con NaOH 10% (tornasol) y llevó a volumen en matraz aforado (100 ml).

Los azúcares se disolvieron en piridina y se agregó "TRISIL" para

obtener los trimetilsililderivados.

Se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 58304. La columna

de vidrio de 120 x 0,20 c. se rellena con Chromosorb W-AW DNCS 60-80 como so-

porte y OV-101 al 2% como fase fija.

El programa de temperaturas fue:

Temperatura 1: 150°C Tiempo 1: 0'

Temperatura 2: 250°C Tiempo 2: 30'

Se utilizaron muestras patrón de glucosa, fructosa, maltosa y sa-

carosa para la identificación de los azúcares.

III.3. TECNICA COLORIMETRICA PARA LA DETERMINACION DE PROTEINA SOLUBLE

Debido al gran número de determinaciones de proteína involucradas en el presente trabajo, se utilizó como técnica alternativa al Kjeldahl que es un procedimiento largo y laborioso, una técnica colorimétrica que utiliza Acido Naranja 12 propuesta por Romo y col. (1975) debido a su simplicidad y buena correlación con el tradicional método de Kjeldahl.

Cada material proteico (aún distintas variedades de una misma especie) da una ecuación de regresión diferente debido probablemente a las distintas cantidades de nitrógeno no proteico y distintos contenidos de aminoácidos básicos (Lakin, 1973) de cada uno de ellos.

Por ello se determinaron las curvas de calibración tanto para la proteína de harina de porotos como para el conjunto de partidas de aislado proteico liofilizado utilizados en el trabajo.

Reactivos

a) C. I. Acido Naranja 12. Se obtuvo colorante puro del Udy Analyzer Co., P. O. Box 148, Boulder, Colorado 80302, USA.

B) Reactivo colorante-buffer. Contenia 0,35 gr de C. I. Acido Naranja 12 puro disuelto en 1 litro de Acido cítrico 0.3 M.

Curva de calibración

8 gr de harina ó 2 gr de aislado proteico de porotos se extrajeron

con 90 ml de agua destilada ajustándose el pH a distintos valores con solución diluída de NaOH ó ClH para lograr distintas concentraciones de proteína soluble.

Las suspensiones se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente, centrifugaron por 30 minutos a 2.000 r.p.m. en una centrífuga de laboratorio GRIFFIN and GEORGE y se filtraron por papel Whatman N^o 41, finalmente se llevaron a un volumen final de 100 ml.

Sobre estas soluciones se determinó proteína cruda (total) por Kjeldahl ($N \times 6,25$).

Se efectuó una dilución 1:10 de dichas soluciones a fin de lograr una concentración final menor que 0.15% (p/v) de proteína ($N \times 6,25$). 5 ml de estas soluciones diluídas se mezclaron con 10 ml de solución buffer de colorante en tubos de ensayos, se mezclaron las soluciones por inversión de los tubos y se dejaron hasta el día siguiente para lograr el equilibrio.

Los sobrenadantes se filtraron a través de papel de filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/C) y se efectuó una dilución 1:20 de los mismos para medir la absorbancia a 482 nm (E_s) en un espectrofotómetro Beckman D-U usando cubetas de 1 cm.

Para la construcción de las curvas de calibración, las absorbancias de los sobrenadantes diluídos (E_s) se sustrajeron de la de un blanco (E_o) logrado agregando 5 ml de H₂O en vez de la solución proteica a los 10 ml de solución colorante.

La diferencia ($E_o - E_s$) se graficó en función del contenido de pro-

teína cruda (% p/v) determinado por Kjeldahl del extracto original de proteína (Figuras 1 y 2).

Las ecuaciones de regresión fueron las siguientes: donde KP es el contenido de proteína cruda (Kjeldahl).

$$\begin{aligned} KP &= 1,412 (E_o - E_g) + 0,062 && \text{harina de porotos} \\ KP &= 1,171 (E_o - E_g) + 0,115 && \text{aislado proteico de porotos} \end{aligned}$$

Los coeficientes de correlación fueron:

$$\begin{aligned} r &= 0,998 && \text{harina de porotos} \\ r &= 0,997 && \text{aislado proteico de porotos} \end{aligned}$$

III.4. DETERMINACION DE PROTEINA SOLUBLE

8 gr de harina ó 2 gr de aislado proteico de porotos se extrajeron con 90 ml de agua destilada, el pH se ajustó y mantuvo en 10 con solución de NaOH diluido y se agitó en un agitador magnético por 1 hora a 25°C.

Luego la dispersión se centrifugó por 30 minutos a 2.000 r.p.m. y el sobrenadante se filtró a través de papel Whatman N° 41, llevándose a un volumen final de 100 ml.

El nitrógeno soluble en estas condiciones se determinó por el método colorimétrico del Acido Naranja 12.

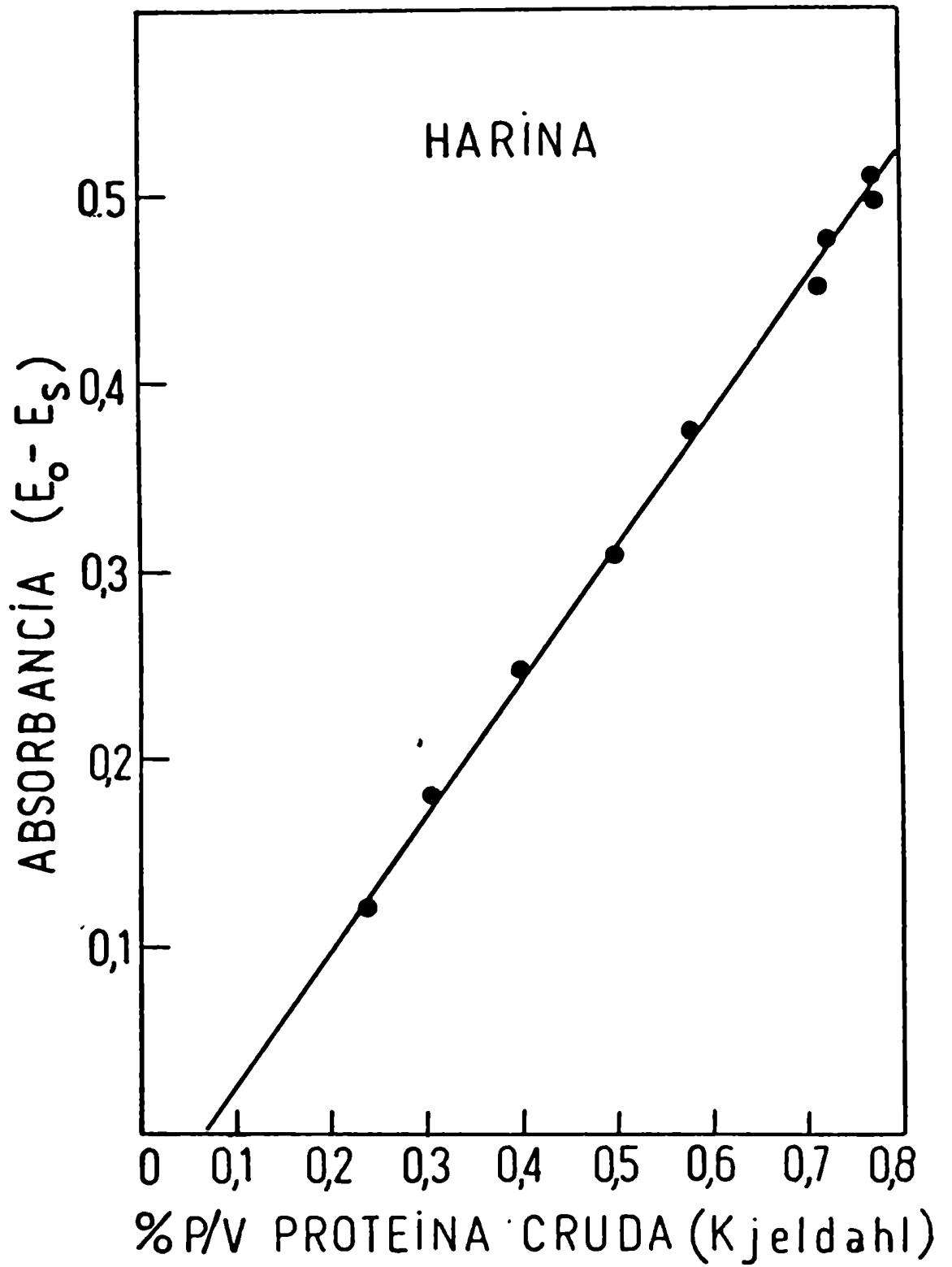


FIGURA 1 :Curva de calibración correspondiente a harina de porotos.

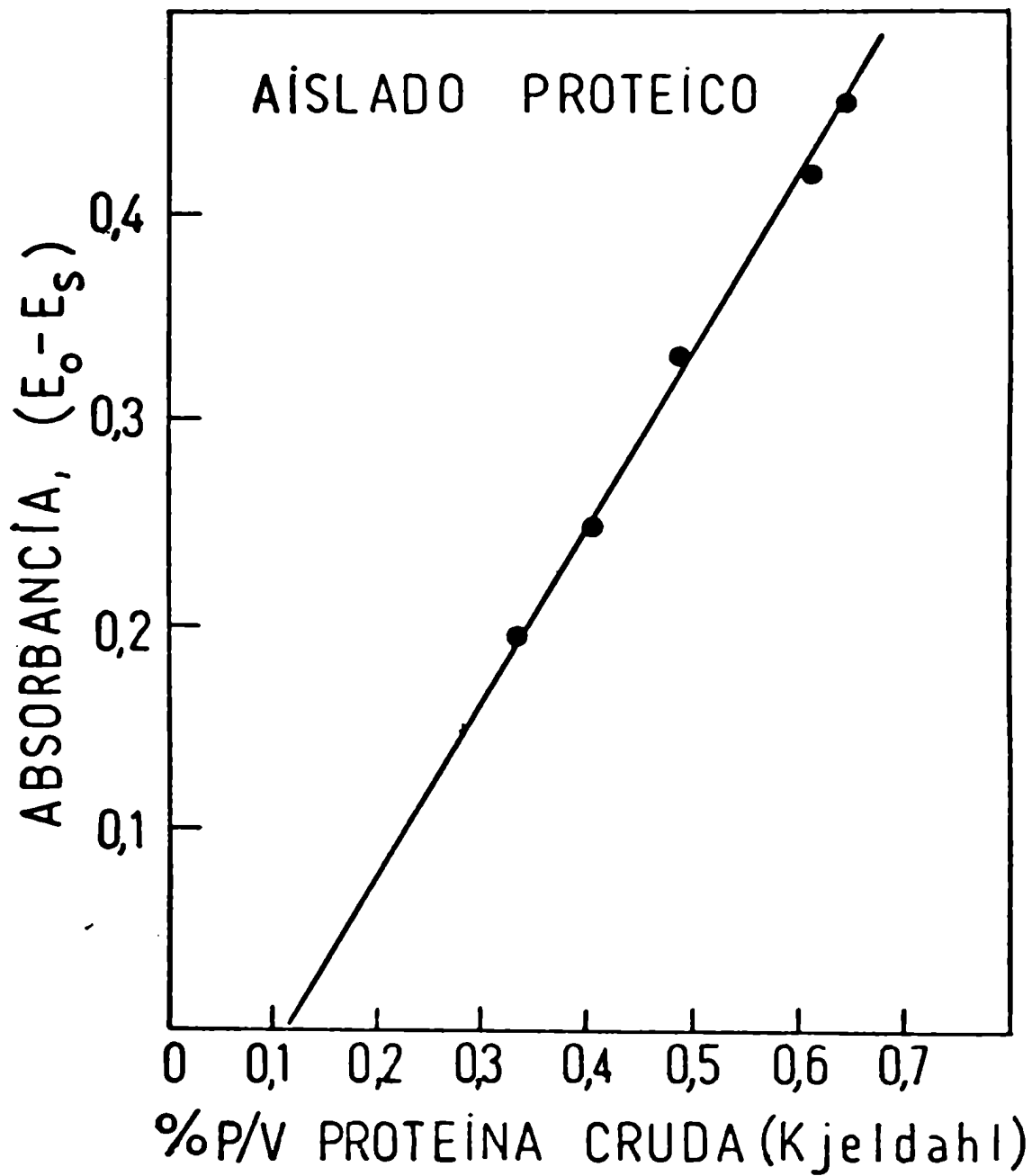


FIGURA 2 :Curva de calibración correspondiente a aislado proteico de porotos.

$$\% \text{ Nitrógeno soluble} = \frac{\text{nitrógeno soluble en H}_2\text{O}}{\text{nitrógeno total en la muestra (Kjeldahl)}} \times 100$$

III.5 ISOTERMAS DE SORCION

Las humedades de equilibrio se determinaron gravimétricamente en condiciones estáticas.

Se utilizaron desecadores para vacío de 20 cm de diámetro como recipientes que mantuvieran ambientes de humedad relativa constantes.

Las mismas se lograron mediante la utilización de soluciones salinas saturadas de humedades relativas constantes (O' Brien, 1948; Richardson y Malthus, 1955; Rockland, 1960; Young, 1967).

En cada desecador se colocaron a lo sumo 6 muestras utilizando como soporte pesafiltros de 4 cm de diámetro y 4 cm de altura y 100 ml de solución salina saturada que contenía un exceso del 30% en peso de sal para asegurar que las soluciones se mantuvieran siempre saturadas.

Se efectuó vacío en los desecadores a fin de disminuir el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio y se colocaron en una cámara a 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Las muestras se pesaron periódicamente y se consideró haber alcanzado el equilibrio cuando se verificó constancia de peso (en balanza de precisión 0,0001 gr).

El inconveniente de la putrefacción de las muestras a elevada humedad relativa, se evitó incorporando a las mismas un 0,5% de sorbato de pota-

blo.

Para determinar la masa seca de cada muestra, una vez alcanzado el equilibrio, se siguió la técnica descrita por Iglesias (1975) consistente en secar las muestras en estufa de vacío por 48 horas en presencia primero de $CaCl_2$ y luego de perclorato de magnesio como desecantes. Cada valor de las curvas de sorción de agua fue el promedio de dos determinaciones y la humedad de equilibrio se expresó como $g H_2O/g$ materia

seca.

El tiempo requerido para llegar al equilibrio osciló entre 5 y 28

días.

Las soluciones salinas utilizadas y las HR correspondientes a 25°C

se muestran en la Tabla 2.

III.6. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

III.6.1. Muestras de harina y aislado proteico de porotos

Los ensayos sobre harina y aislado proteico requirieron únicamente

el ajuste del contenido de humedad. Las muestras casi "secas" (0,5 - 1%

de humedad) se prepararon por liofilización a temperatura ambiente de tal

manera de no producir modificación por calor de las propiedades funcionales.

Para la preparación de las muestras "húmedas" se utilizó el siguiente

procedimiento: Una fina capa de harina o aislado proteico se rocía por

spray con la cantidad necesaria de agua para lograr el nivel de humedad de-

seado; las muestras humidificadas se envasaron en envases flexibles impermea-

TABLA 2: Humedades relativas a 25°C de las soluciones salinas saturadas.

Solución salina saturada	HR (%)
CuCl ₂	67
SiCl ₂	70
NaCl	75
(NH ₄) ₂ SO ₄	79
KBr	82,5
KCl	85
BaCl ₂	89,5
K ₂ SO ₄	97

bien y se dejaron en una heladera (4°C) 4 días hasta lograr una distribución uniforme del agua; se consideró que este tiempo era suficiente en base a que determinaciones de humedad de el material de distintas partes de la bolsa arrojaron resultados coincidentes.

III.6.2. Muestras de harina y aislado proteico de porotos con aoregado de

glucosa o de ésteres metílicos de ácidos grasos

Estos sistemas se prepararon dispersando ó bien la harina ó el aislado proteico en agua destilada en una proporción de 1 gramo de material por cada 4 gramos de agua.

Las dispersiones se agitaron a temperatura ambiente con un agitador a paletas y se agregaron lentamente ó bien la glucosa disuelta en agua ó los ésteres metílicos de ácidos grasos disueltos en 10 ml de etanol.

Se continuó agitando por 30 minutos para lograr una distribución uniforme y al cabo de éste tiempo las dispersiones se congelaron a -40°C en una congeladora a placas y se liofilizaron a temperatura ambiente en una cámara con una presión de 0.1 Torr. La humificación de estos sistemas se efectuó de la manera mencionada anteriormente en III.6.1.

III.7. TRATAMIENTO TERMICO

III.7.1. Para la determinación de proteína soluble

Muestras de harina o de aislado proteico de porotos casi "secas"

(0,5 - 1% humedad) o humidificadas fueron envasadas en envases de hojalata barnizados de 7 cm de diámetro y 4 cm de altura que fueron cerrados herméticamente mediante una remachadora manual.

Los envases fueron colocados en una estufa a temperatura controlada ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) y calentados por distintos periodos de tiempo al cabo de los cuales se los sacó de la estufa y enfrió rápidamente en una heladera para luego analizar el nitrógeno soluble.

Se verificó que los intervalos de tiempo requeridos para lograr una temperatura uniforme en el material contenido en los envases tanto durante el calentamiento como el enfriamiento eran despreciables frente a los tiempos de calentamiento estudiados.

III.7.2. Para la determinación de las isoterms

El tratamiento en "seco" se efectuó sobre muestras de harina o almidón protegido contenidas en fina capa en bandejas abiertas dentro de una estufa de temperatura controlada ($\pm 1^{\circ}\text{C}$).

El tratamiento en "húmedo" se efectuó en envases herméticos de hojalata.

En todos los casos el tratamiento térmico se efectuó a 50, 70 ó 90°C por 48 horas. Al cabo de este tiempo se retiraron las muestras de la estufa, se enfriaron rápidamente en una heladera y se determinaron las isotermas de sorción.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1. COMPOSICION QUIMICA DEL MATERIAL UTILIZADO

En la Tabla 3 aparecen los resultados (en base seca) obtenidos del analisis de los principales constituyentes de la harina y aislado de porotos Phaseolus vulgaris. En todos los casos las determinaciones se efectuaron por duplicado o triplicado.

En el caso de la harina de porotos la diferencia a 100 puede consistir

dejarse que constituye la suma de fibra y material inorgánico. Los resultados obtenidos para la harina de porotos son semejantes a los que se encuentran en literatura para porotos del género Phaseolus vulgaris.

IV. 2. EFECTO DEL TRATAMIENTO TERMICO EN LA SORCION DE AGUA Y SU CORRELACION

CON EL NITROGENO SOLUBLE EN HARINA Y AISLADO PROTEICO DE POROTOS

IV.2.1. Efecto del tratamiento térmico en las isoterms de sorción de agua

de harina y aislado proteico de porotos

Kilera y Humbert (1972) observaron que el tratamiento térmico de harina y aislado de semilla de girasol tenía muy poco efecto en la zona de isoterms correspondiente a bajas actividades acuosas (0,1 - 0,55) mientras que observaron cambios notables en la sorción de agua a a_w comprendidas entre 0,6 y 0,98.

Hermansson (1977) sugirió que en la zona de altas a_w , donde comienzan

TABLA 3: Composición química del material utilizado.

Material	Proteína % (Nx6,25)	Almidón (%)	Lípidos (%)	Azúcares totales (%)
Harina de porotos	23,6	51,1	2,7	8,1
Aislado proteico	88,1	0,7	2,5	1,1

za la etapa de solvatación, las diferencias en la sorción de agua debidas al tratamiento térmico se pueden relacionar con las diferencias en la solubilidad del nitrógeno.

Debido a esto, las isoterms de sorción se estudiaron en el rango de actividades acuosas comprendido entre 0,65 y 0,97.

La Figura 3 muestra el efecto del tratamiento térmico en "seco" en las isoterms de sorción a 27°C de harina de porotos.

Si bien el contenido inicial de agua de dicha harina era de 0,123 g H₂O/g materia seca, como la misma se dispuso en una capa fina en una bandeja durante el tratamiento térmico (48 horas a 50, 70 ó 90°C), se puede asumir que durante la mayor parte del tiempo de calentamiento se hallaba casi "seca".

En la Figura 4 se muestra el efecto del mismo tratamiento térmico pero en "húmedo" en las isoterms de sorción de harina de porotos. El contenido de humedad de la harina fue de 0,141 g H₂O/g materia seca.

La comparación visual de las isoterms correspondientes a las muestras tratadas y la no tratada (control) muestra que existe una modificación de la capacidad de sorción de agua; las muestras tratadas a 90°C por 48 horas, son en ambos casos las que acusaron una mayor variación en su capacidad de sorción siendo esta menor, en todo el rango de actividades acuosas investigado. Para las muestras tratadas a 50 y 70°C por 48 horas, la comparación no es tan sencilla, si bien las isoterms aparecen gráficamente distintas. El tratamiento térmico a los contenidos de humedad "seco" y

FIGURA 3: Efecto del tratamiento térmico en "seco" (48 horas) en las isoterias de sorción de agua de harina de porotos a 27 ° C.

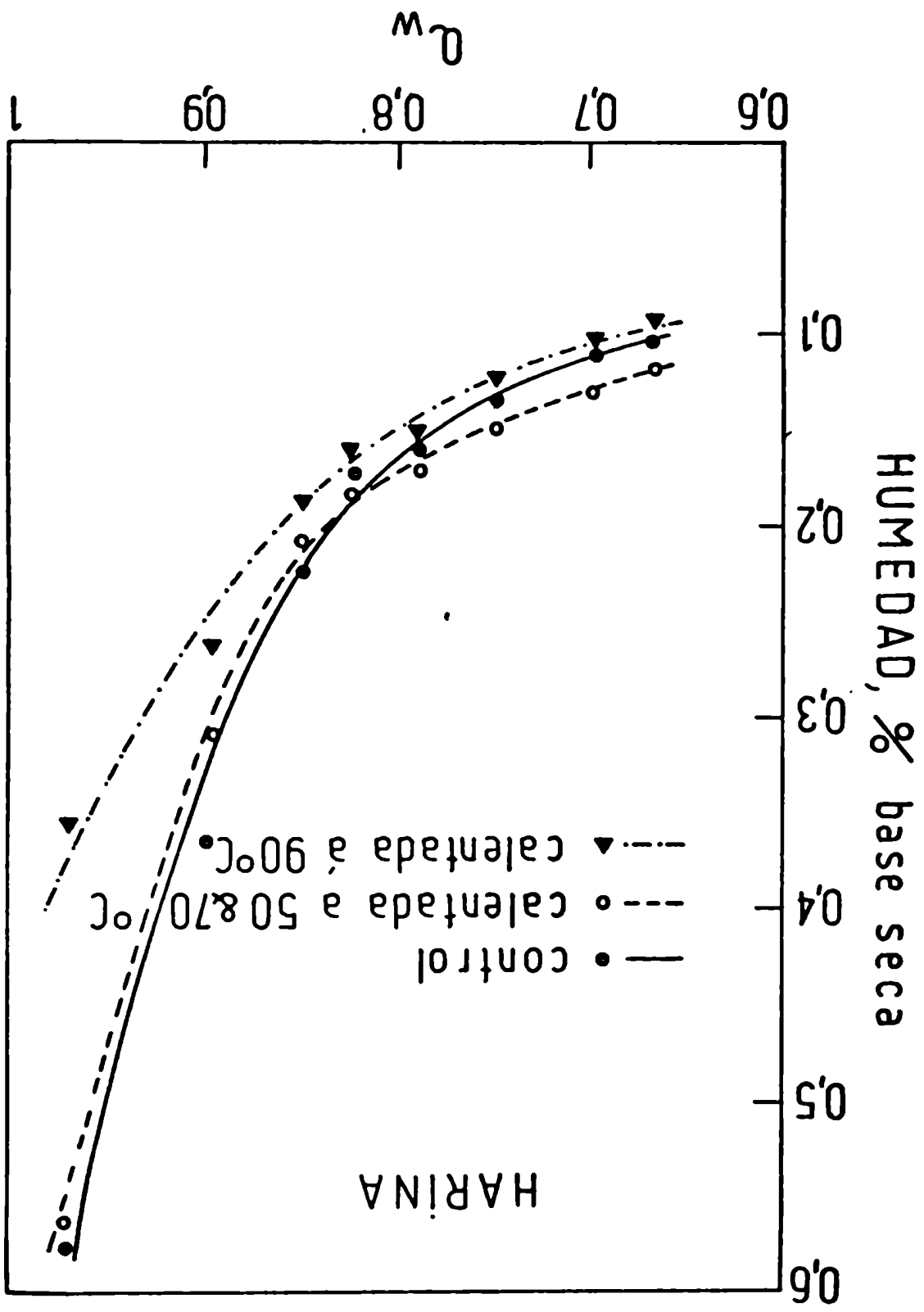
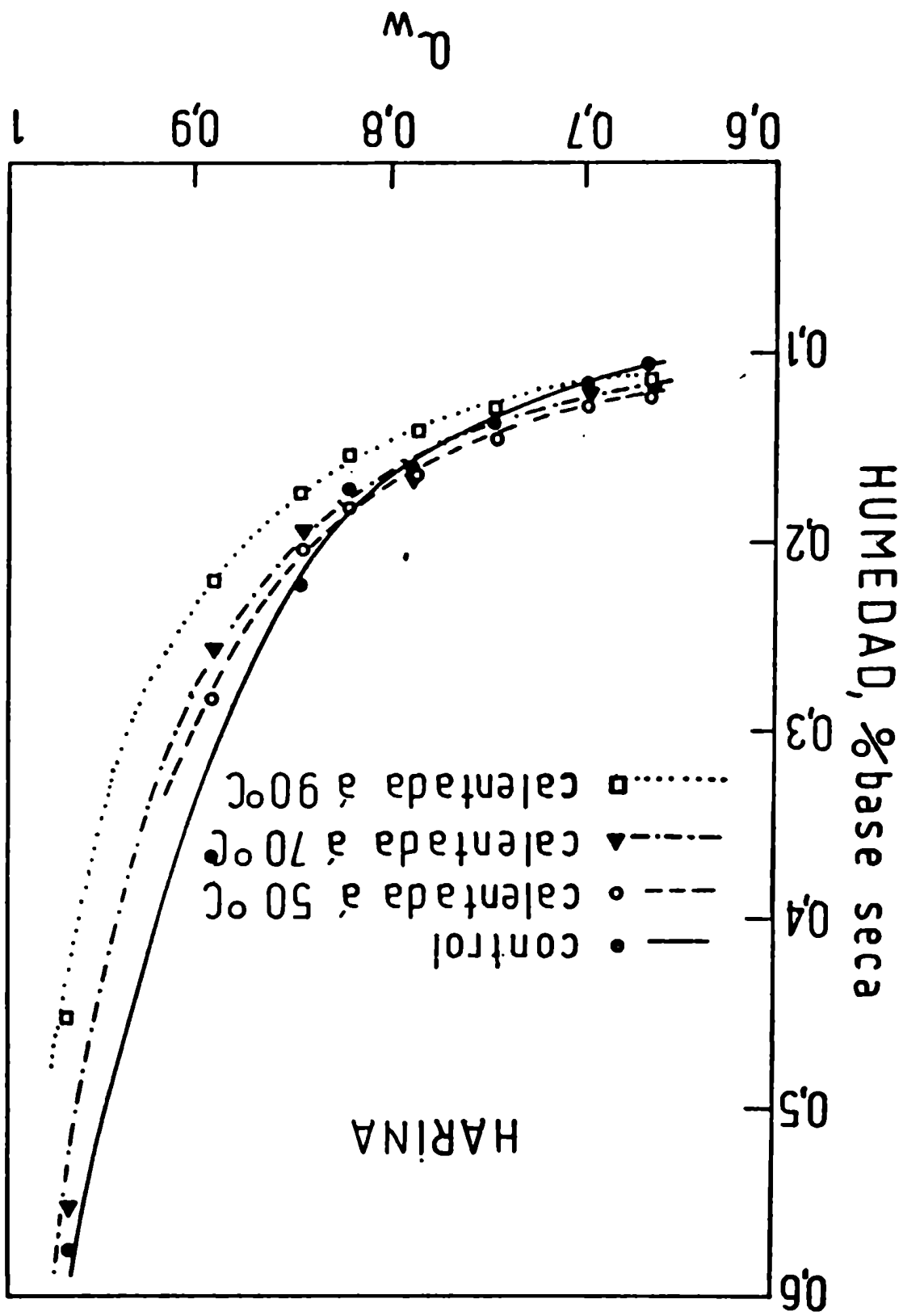


FIGURA 4: Efecto del tratamiento térmico en "húmedo" (48 horas) a un contenido de humedad de 0,141 g H₂O / g m.s. en las ígotemas de sorción de agua de harina de porotos a 27 °C.



0,141 g H₂O/g materia seca) resultó en una mayor capacidad de sorción de agua por debajo de una a_m cercana a 0,80, mientras que se observa lo opuesto por encima de ese valor.

Este tipo de comportamiento (cruce de las isotermas a un cierto v_g por de la a_m) fue observado también por Kilara y Humbert (1972) y por Hermanson (1977).

Hermanson halló que las isotermas de sorción a distintas temperaturas de muestras de concentrado proteico de suero y de Promina D (proteína de soja) tratadas térmicamente se cruzaban con la del control a valores de a_m comprendidos entre 0,7 y 0,75.

La figura 5 muestra el efecto del tratamiento térmico en "seco" en la isoterma de sorción de agua de aislado proteico de porotos; en este caso no se observó ninguna modificación de la capacidad de sorción debido al tratamiento térmico.

En la figura 6 se observan las isotermas de sorción de muestras de aislado proteico tratadas térmicamente en "húmedo" a un contenido de agua de 0,111 g H₂O/g masa seca; se observa un fenómeno opuesto al observado en la harina de porotos; por encima de una a_m cercana a 0,82 las muestras tratadas térmicamente tienen una mayor capacidad de sorción de agua.

Kilara y colaboradores (1972) observaron el mismo fenómeno; la harina de girasol tratada térmicamente tenía menor capacidad de sorción que la no tratada, mientras que el aislado proteico de girasol tenía un comportamiento opuesto.

FIGURA 5: Efecto del tratamiento térmico en "seco" (48 horas) en las isoterias de sorción de agua de aislado proteico de porotos a 27 °C.

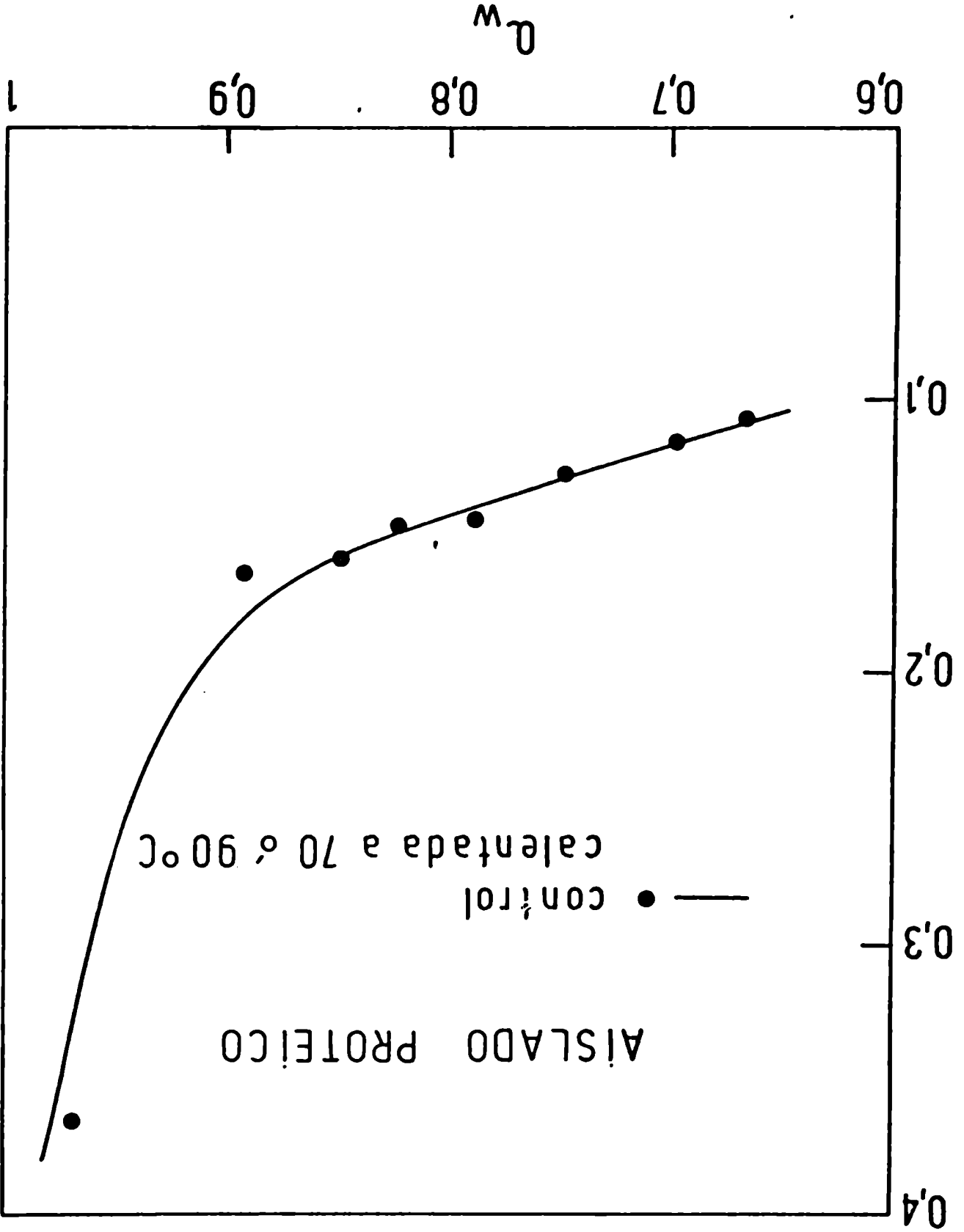
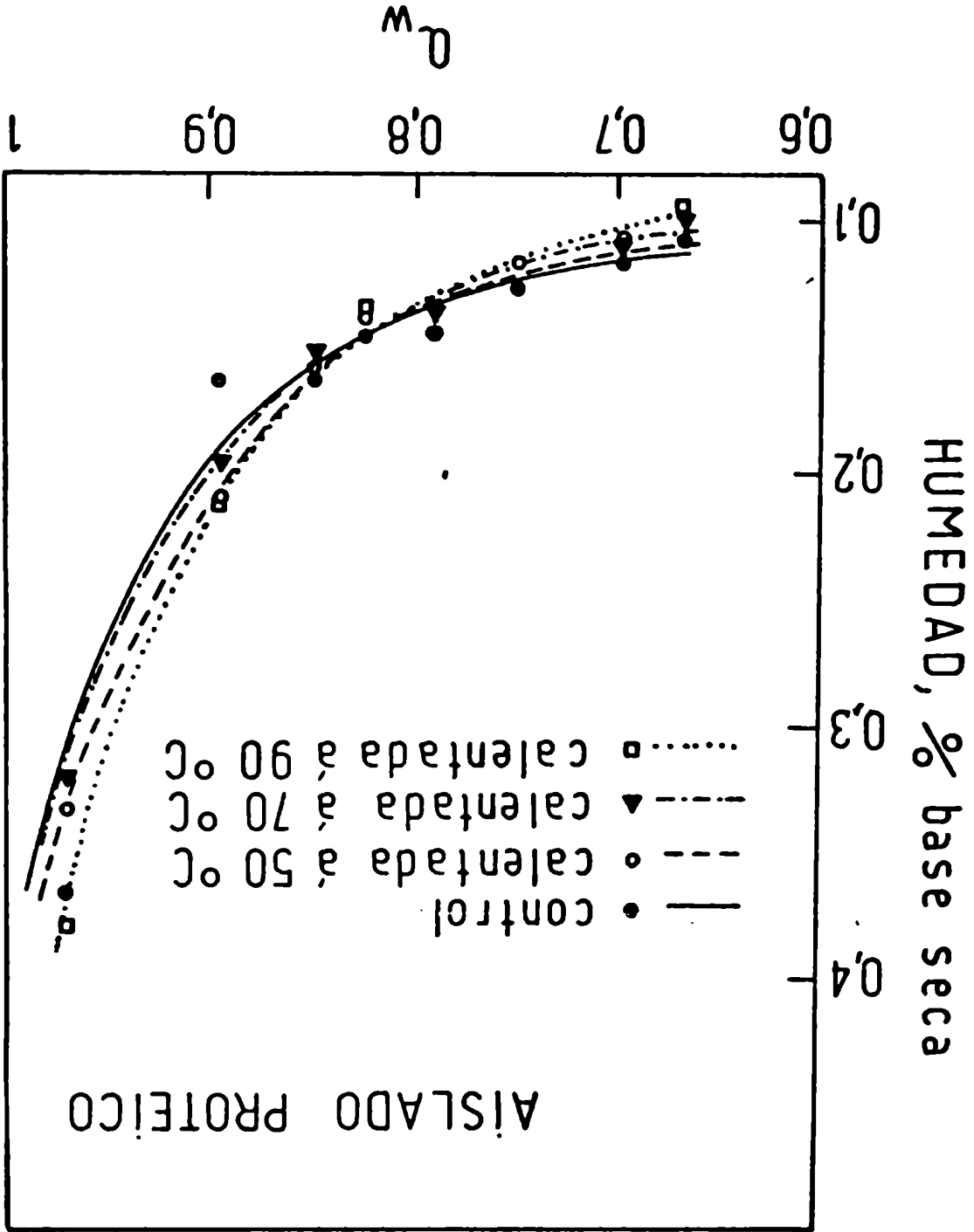


FIGURA 6: Efecto del tratamiento térmico en "húmedo" (48 horas) a un contenido de humedad de 0,111 g H₂O/g m.s., en las isotermas de sorción de agua de estado proteico de porotos a 27 °C.



En todos los casos la harina de porotos tiene mayor capacidad de sorción de agua que el aislado proteico, debido probablemente a la presencia de la fracción de carbohidratos en la harina.

Dada la importancia de las isoterms de sorción en la tecnología Alimentaria, se han hecho muchos estudios para establecer si diversas condiciones de procesamiento o distintos tratamientos afectan a las mermas (Mackenzie y col., 1967; Saravacos, 1967; Rasekh, 1971; Iglesias y Chirife, 1976).

En todos los casos, las isoterms correspondientes a las muestras sin tratar y a las tratadas se comparaban visualmente o en algunos casos se comparaban estadísticamente algunos puntos "aislados" de las isoterms.

Asimismo todas las conclusiones anteriores resultan de la comparación visual de las isoterms ya que no se utilizó ningún criterio matemático para discriminar si las diferencias observadas son significativas.

Por lo tanto, se utilizó un criterio estadístico propuesto por Boquet, Chirife e Iglesias (1977) que permite evaluar la existencia de diferencias significativas entre dos isoterms por comparación de las mermas como un todo.

Para cuantificar el problema, es necesario en primer lugar parametrizar (describir matemáticamente) las curvas que representan a las isoterms. Con este propósito se utilizó la ecuación desarrollada por Smith (1947) ya que como demostraron Chirife y col. (1979), describe adecuadamente la isoterma de sorción de biopolímeros en el rango de altas actividades acuosas (p. ej.

Para las muestras de aislado proteico calentadas en "seco", los resultados estadísticos indican que la capacidad de sorción de agua no es muy difícil; para las muestras calentadas a un contenido de humedad de 0,111 g H₂O/g materia seca los resultados son diferentes. Si tomamos como criterio para aceptar que existen diferencias significativas entre dos isoterma un

control, aparecen en la Tabla 4.

Los resultados del cómputo del parámetro "F" de Snedecor para las isoterma correspondientes a aislado proteico tratado térmicamente así como el riesgo estadístico implicado en suponer que las mismas no son iguales al correspondiente a muestras tratadas no es igual a la del control (sin tratar).

Dicho procedimiento conduce al cálculo del parámetro "F" de Snedecor que se halla relacionado con el riesgo estadístico (Tablas estadísticas de Abramowitz y Stegun, 1965) que implica suponer que cada isoterma

Para los detalles del procedimiento estadístico se recomienda remitirse a la publicación original (Boquet y col., 1977).

$$M = A - B \ln(1 - a^u) \quad \text{aislado proteico}$$

$$M = A - B \ln(0,9 - a^u) \quad \text{harina}$$

Las ecuaciones fueron las siguientes:

de la isoterma.

Smith se modificó empíricamente para obtener una representación más adecuada mayores que $a^u = 0,50$. Para el caso de la harina de porotos, la ecuación de

TABLA 4: Resultado de la evaluación estadística de diferencias significativas

entre las isoterms de sorción de agua de muestras de aislado pro-
teico de porotos, tratadas térmicamente por 48 hs.

Contenido de humedad g H ₂ O/g materia seca	Temperatura "F" de Snedecor (°C)	Riesgo estadístico (a)(%)
≈ 0	90	0,11
	70	0,09
0,111	90	2,68
	70	0,98
	50	1,56
11,7	90	11,7
	70	41
	50	26

(a) en concluir que las isoterms de las muestras tratadas no son iguales a la del control.

medad mayor produce una disminución notable en el nitrógeno soluble de ambos
Los resultados indican que el tratamiento térmico efectuado a la \bar{h}
co con humedades de 0,016 y 0,111 g H₂O/g m. s.

La Tabla 6 muestra los resultados obtenidos para el aislado proteico
0,005 y 0,141 g H₂O/g m. s.

Los niveles de humedad a los cuales se efectuó dichos tratamientos fueron de
agua (48 hs a 50, 70 y 90°C), sobre el nitrógeno soluble de harina de porotos.

go al efectuado para estudiar la modificación de la capacidad de sorción de
En la Tabla 5 se muestra el efecto de un tratamiento térmico analí
y aislado proteico de porotos.

IV.2.2. Efecto del tratamiento térmico en el nitrógeno soluble de harina y

térmicos efectuados (48 horas a 50, 70 y 90°C).
de porotos se vio significativamente modificada por todos los tratamientos
a decir que en todos los casos la capacidad de sorción de agua de la harina
cluir que no son iguales al control fue menor que 0,1%. Esto es equivalente
de Snedecor arrojaron en todos los casos valores tales que el riesgo en con-
"húmedo" (0, 143 y 143 g H₂O/g materia seca), los resultados del cómputo de la "F"
Para las muestras de harina tratadas térmicamente en "seco" y en
de asegurar que la sorción de agua se haya modificado.

bio, para las muestras calentadas a 50 y 70°C el riesgo es tal que no se pue
a 90°C tiene modificada significativamente su capacidad de sorción. En cam-
valor de riesgo de 12%, se puede concluir que solamente la muestra calentada

TABLA 5: Efecto del tratamiento térmico (en "seco" y en "húmedo") (48 horas)
 en el nitrógeno soluble de harina de porotos.

Contenido de humedad g H ₂ O/g materia seca	Temperatura (°C)	Pérdida de nitrógeno soluble (%)
0,005	50	-
	70	0,32
	90	13,4
0,141	50	2,6
	70	40,5
	90	100

TABLA 6: Efecto del tratamiento térmico (en "seco" y en "húmedo") (48 horas) en el nitrógeno soluble de aislado proteico de porotos.

Contenido de humedad g H ₂ O/g materia seca	Temperatura (°C)	Pérdida de nitró- geno soluble (%)
0,111	90	100
	70	62,3
	50	7,0
0,016	90	63,5
	70	17,3
	50	3,3

La harina y el aislado proteico tuvieron un comportamiento opuesto
 lor, aún en mayor medida que la harina.
 vea, el nitrógeno soluble del aislado proteico se ve muy afectado por el ca-
 rango de a_w estudiado, la misma se incrementa para a_w mayores que 0,80. A su
 lado proteico; si bien el efecto en la sorción de agua fue muy pequeño en el
 En cambio el tratamiento térmico tuvo un efecto distinto en el ais-
 dad de 0,141 g H₂O/g materia seca.
 portantes solamente para las muestras de harina tratadas a un nivel de hume-
 mientras que los cambios correspondientes en el nitrógeno soluble fueron im-
 significativo en la capacidad de sorción de agua de la harina de patos,
 El tratamiento térmico en "seco" o en "húmedo" provocó un cambio
 soluble debidos al tratamiento térmico.

IV.2.3. Correlación entre los cambios en la sorción de agua y en el nitrógeno

mayor pérdida de nitrógeno soluble a la mayor humedad ensayada.
 sible frente al tratamiento térmico que la harina y que para ambos ocurre una
 Se concluye por lo tanto que el aislado proteico es mucho más sen-
 proteico pierde hasta un 63,5% en las mismas condiciones.
 harina pierde muy poco nitrógeno soluble (a lo sumo un 13,4%), el aislado
 co" (0,005-0,016 g H₂O/g materia seca) es un poco distinto; mientras que la
 Sin embargo el comportamiento frente al tratamiento térmico en "se-
 a una pérdida total del nitrógeno soluble.
 sistemas; el tratamiento térmico a 90°C por 48 horas conduce en ambos casos

frente al tratamiento térmico en relación a la sorción de agua; esto sin embargo puede ser explicado de la siguiente manera: el comportamiento en cuanto a la sorción en la harina de porotos refleja las propiedades higroscópicas integradas de sus principales componentes que son fundamentalmente almidón (51,1% de la materia seca) y proteína (23,6% de la materia seca). Por lo tanto el cambio observado en la sorción debido al calor es la resultante de la modificación de las capacidades de sorción de ambos biopolímeros, almidón y proteína. Dado que el almidón forma la mayor parte de la materia seca, sus propiedades de sorción serán las dominantes.

Labuza (1968) notó que el almidón se ve muy afectado por dichos procedimientos (calor) que incrementan la cantidad de almidón cristalino imperecible al agua a expensas del almidón amorfo, lo cual da como resultado una menor sorción de agua.

Asimismo en las muestras tratadas a la mayor humedad, son posibles interacciones almidón-proteína (del tipo puente hidrógeno) que pueden ser responsables de la disminución de la sorción de agua (Iglesias y colabores, 1980).

De esta manera se comprende que el hecho de que la sorción de agua en la harina disminuya en vez de aumentar no se contrapona con el comportamiento observado en el aislado proteico.

Muchos investigadores (Labuza, 1968; Mc Laren y Rowen, 1952) notaron que el calentamiento tiene muy poca influencia en la capacidad de sorción de agua de las proteínas.

La falta de efecto observado al tratamiento en "seco" del sorbida en condiciones de humedad relativamente baja y la estabilidad estructural de las proteínas.

Takahashi y colaboradores (1980) comprobaron que la temperatura de desnaturalización de varias proteínas aumentaba enormemente con la disminución de la cantidad de agua adsorbida; p. ej. para ovalbúmina la temperatura de desnaturalización a 20% de humedad (base seca) es de 88°C mientras que a un 5% de humedad aumenta hasta alrededor de 125°C. Esto explica la falta de efecto en la sorción de agua debido al tratamiento térmico en el aislado proteico y también el efecto relativamente pequeño en el nitrógeno soluble a muy bajas humedades.

Cuando el calentamiento se efectúa a un contenido de humedad mayor, parece ocurrir algo de desnaturalización que provoca un pequeño aumento en la sorción de agua a a_w mayores que 0,80 y una disminución en el nitrógeno soluble. Por simplicidad los efectos observados en el nitrógeno soluble se atribuyen a la desnaturalización, aunque además son consecuencia de la agregación de las proteínas desnaturalizadas (Fennema, 1977).

Como conclusión, es importante notar que la magnitud de los cambios observados en la capacidad de sorción de agua del aislado proteico de porcitos, debido al tratamiento térmico, son considerablemente menores que los experimentados por el nitrógeno soluble.

Sobre esta base, se sugiere que los cambios relativos en la sorción

de agua (en el rango de a_w estudiado), no es uno de los índices más adecuados de los cambios que ocurren en el nitrógeno soluble en proteínas calentadas en "seco" o en "húmedo".

IV.3. CINETICA DE LA PERDIDA DE NITROGENO SOLUBLE EN HARINA Y AISLADO PROTEICO DE POROTOS

Para determinar el modelo cinético de pérdida de un componente alimenticio o de una característica organoléptica o de un factor de calidad durante el tratamiento térmico, pueden usarse procedimientos en estado estacionario o en estado no estacionario.

El procedimiento en estado estacionario involucra el calentamiento rápido de las muestras contenidas en envases apropiados hasta la temperatura de tratamiento a la cual se mantiene luego por el tiempo deseado; asimismo el enfriamiento debe ser rápido.

Se supone por lo tanto que todo el producto se halla a temperatura constante durante el tratamiento lo que simplifica notablemente el análisis final de los datos.

Luego del procesamiento se analiza en cada muestra tratada (distintas combinaciones de tiempo/temperatura) la concentración del componente o factor deseado.

Para determinar el modelo cinético de la pérdida de nitrógeno soluble se utilizó el procedimiento mencionado en estado estacionario debido a que el tiempo de vida media (tiempo necesario para que ocurra un 50% de pérdida de nitrógeno soluble) es suficientemente largo como para suponer que no ocurre una pérdida significativa de solubilidad durante el tiempo de calentamiento que transcurre hasta llegar a la temperatura de tratamiento.

De acuerdo a Lenz y Lund (1980) si la vida media es relativamente corta (20 minutos ó menos), puede ocurrir una destrucción significativa del componente estudiado durante el período que transcurre hasta llegar a la temperatura de tratamiento; en estas condiciones debe usarse un procedimiento en estado no-estacionario para determinar el modelo cinético.

Existen una variedad de técnicas para determinar la expresión matemática de la velocidad de reacción y pueden englobarse dentro de dos clases generales:

- Métodos diferenciales, basados en la diferenciación de los datos experimentales de concentración en función del tiempo para obtener la velocidad de reacción.
- Métodos integrales, basados en la integración de la expresión de velocidad de la reacción, supuesto un orden de reacción, y en la verificación del cumplimiento de dicha expresión mediante los datos experimentales.

Generalmente la determinación de la expresión de la velocidad de reacción involucra dos etapas: en la primera se determina la dependencia de la velocidad con la concentración a temperatura constante y en la segunda la dependencia de la velocidad de reacción con la temperatura.

En el presente trabajo se utilizó el método integral con procedimiento gráfico para determinar la expresión matemática de la velocidad de reacción.

Las etapas involucradas en éste procedimiento se detallan a continuación:

- Se supone una expresión matemática de la función velocidad de reacción $k \phi(C_1)$.
- Se combina dicha expresión con la definición básica de velocidad de reacción

$$\frac{1}{V} \frac{dx}{dt} = k \phi(C_1)$$

donde x es el grado de reacción en un sistema de volumen constante V .

- Se separan las variable y se integra:

$$t = \int_0^x \frac{dx}{kV \phi(C_1)}$$

Para evaluar dicha integral es necesario expresar todos los términos de la derecha en función de una única variable (fracción de conversión o concentración).

En sistemas isotérmicos, k es una constante que puede salir fuera del signo de la integral; si se representa el resultado de la integración como $\psi(C_1)$ se obtiene:

$$kt = \psi(C_1)$$

- A partir de los valores experimentales de las concentraciones y supuesto un orden de reacción, se calculan los valores de $\psi(C_1)$ a los tiempos correspondientes a dichas concentraciones.
- Se grafican los valores calculados de $\psi(C_1)$ en función del tiempo para evaluar si se obtiene una línea recta.
- Si se obtiene una recta satisfactoria, la expresión propuesta para la velo

La pérdida de reacción es consistente con los datos experimentales y la pendiente de la recta es igual a la constante de velocidad de la reacción K. Si no se obtiene una línea recta, se debe suponer una nueva expresión matemática de la velocidad de reacción.

La destrucción de muchos componentes alimenticios puede ser descrita adecuadamente por un modelo cinético de orden I (Stumbo, 1973; Labuza, 1980). Entre ellos se encuentran: la pérdida de ácido ascórbico (Karel y Nickerson, 1964; Labuza, 1972; Laing y col., 1978; Lee y col., 1977; Saguy y col., 1979 a); pérdida de color (Chou y Breene, 1972; Saguy y col., 1978 b); pérdida de solubilidad (Pence y col., 1953); pérdida de lisina (Ter-Fung Tsao y col., 1978; Wolf y col., 1977, 1981).

En base a estos datos se supuso un modelo cinético de orden uno para la pérdida de solubilidad.

En este caso el valor de $\psi(C_1)$ correspondiente resulta:

$$Kt = \psi(C_1) = -\ln \left(\frac{CA}{CA_0} \right)$$

y un gráfico de esta función en función del tiempo debe dar una línea recta cuya pendiente es igual a la constante de velocidad K.

En las Figuras 7 a 12 se ven los resultados obtenidos para la pérdida de nitrógeno soluble por tratamiento térmico de harina y aislado proteico de porotos a distintos niveles constantes de humedad. Las líneas rectas obtenidas al graficar el logaritmo del nitrógeno soluble en función del tiempo

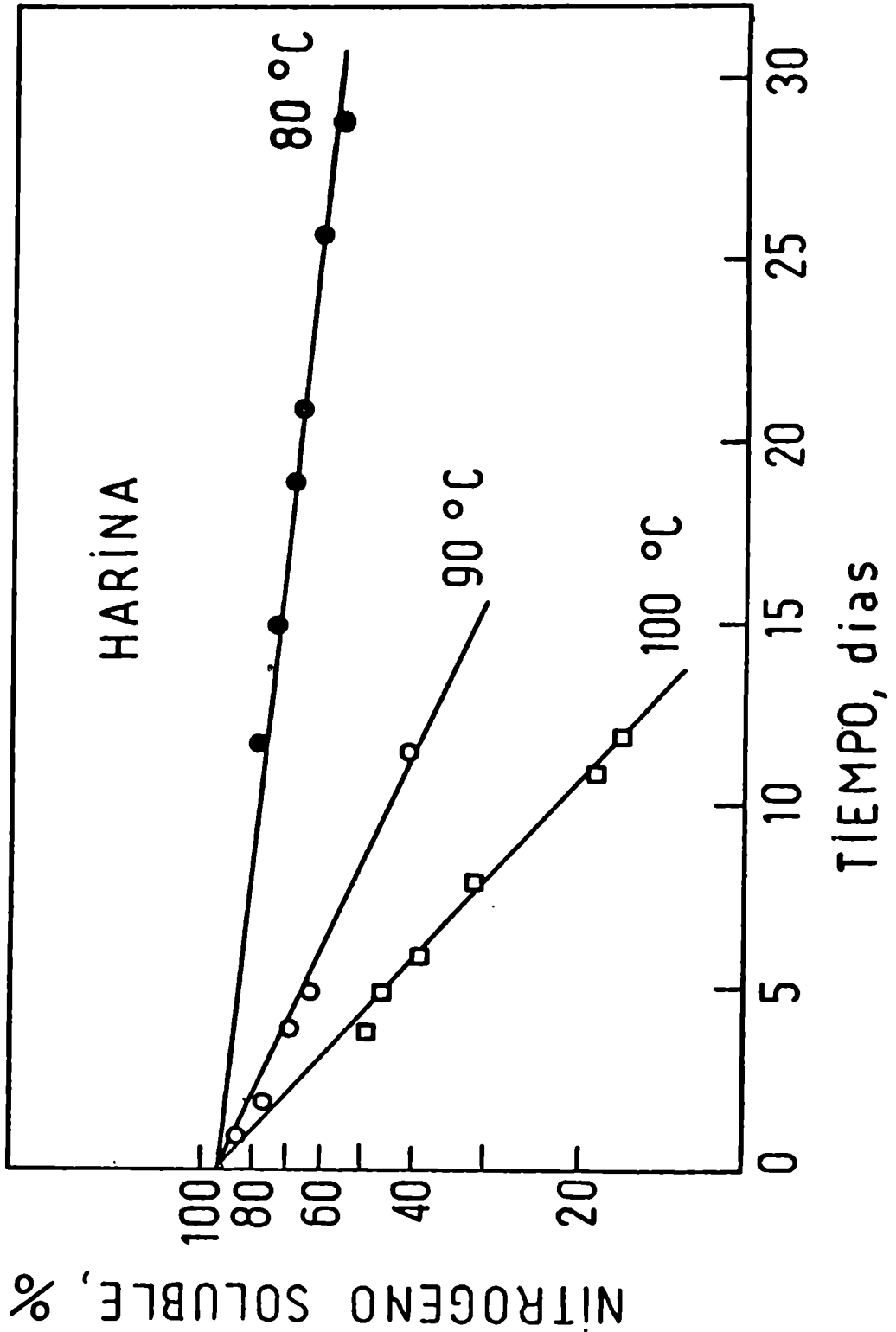


FIGURA 7 : Pérdida de nitrógeno soluble en harina de porotos tratada térmicamente a un contenido de humedad de 0,5 % (b.s.).

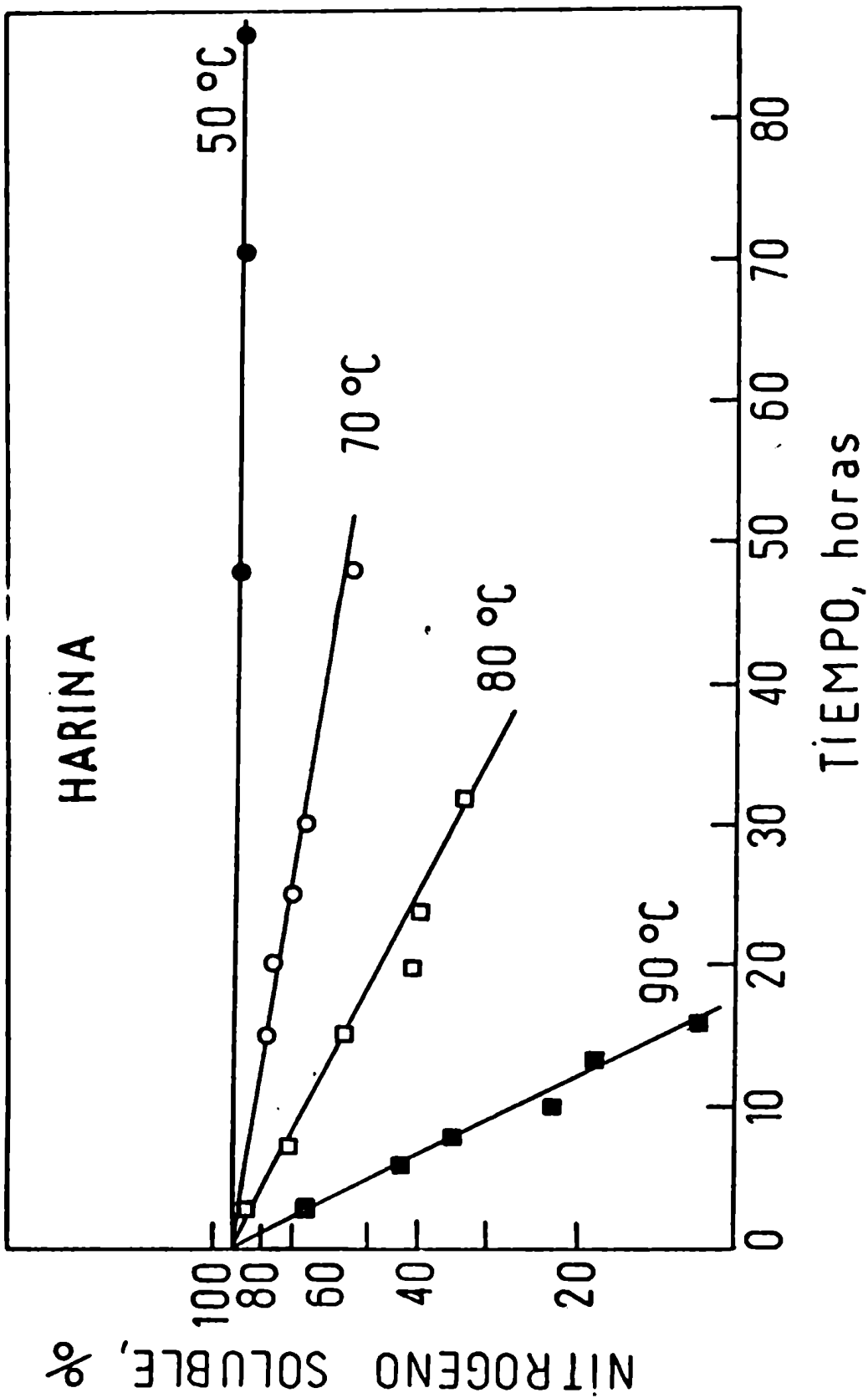


FIGURA 8 : Pérdida de nitrógeno soluble en harina de porotos tratada térmicamente a un contenido de humedad de 14,1 % (b.s.s.).

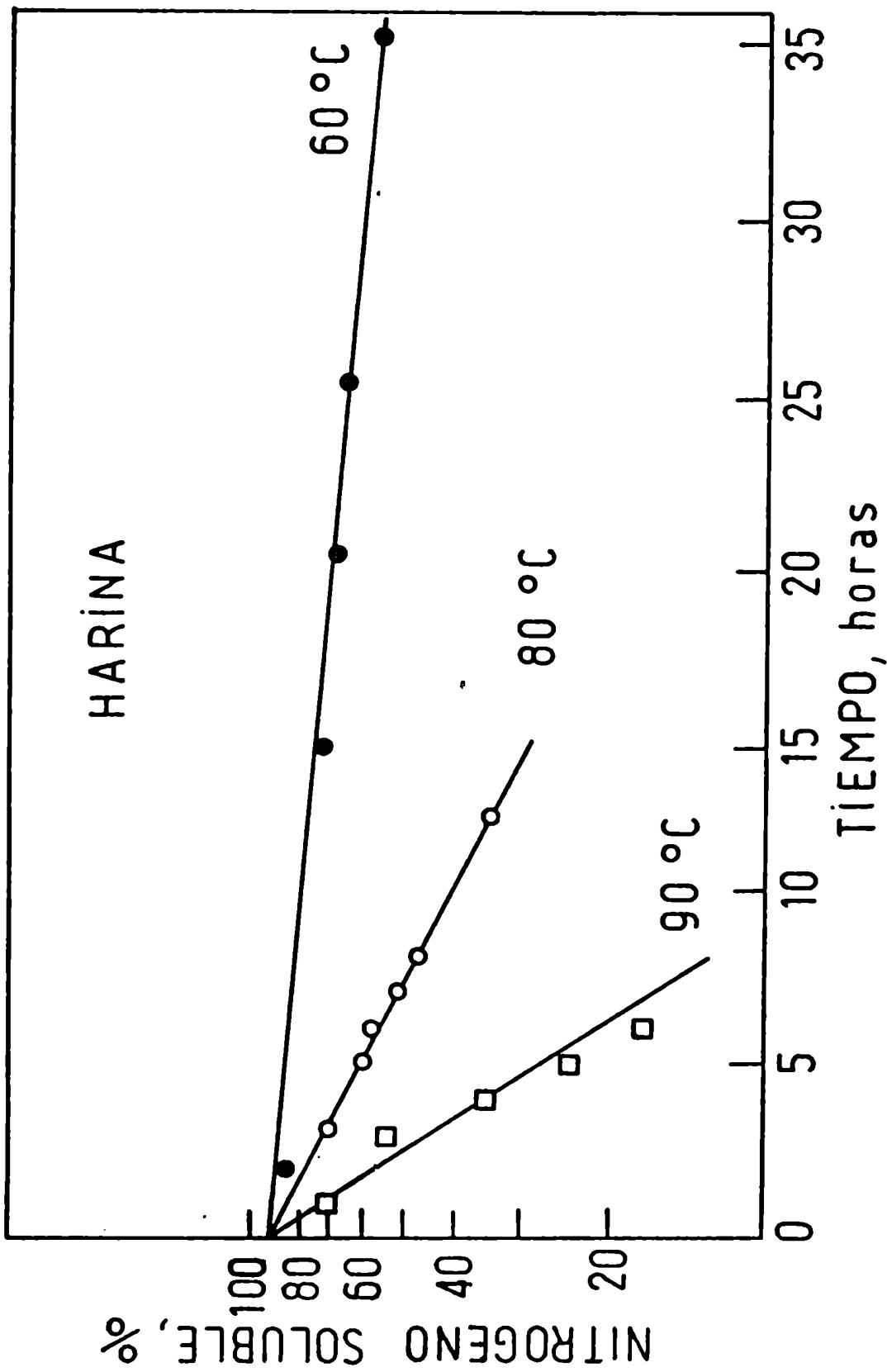


FIGURA 9 : Pérdida de nitrógeno soluble en harina de porotos tratada térmicamente a un contenido de humedad de 29,8 % (b.s.s.).

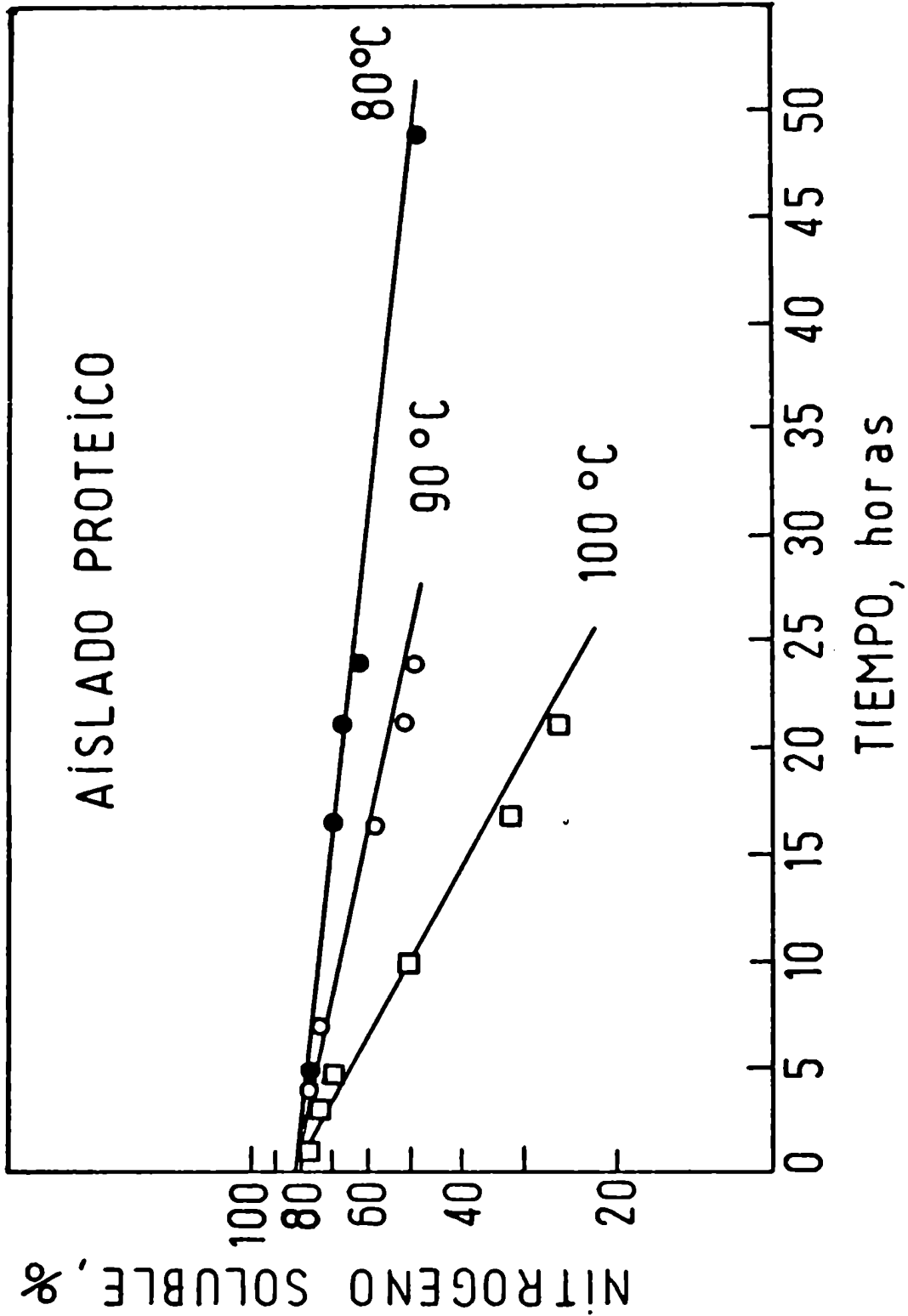


FIGURA 10 : Pérdida de nitrógeno soluble en aislado proteico de porotos tratado térmicamente a un contenido de humedad de 1,6 % (b.s.).

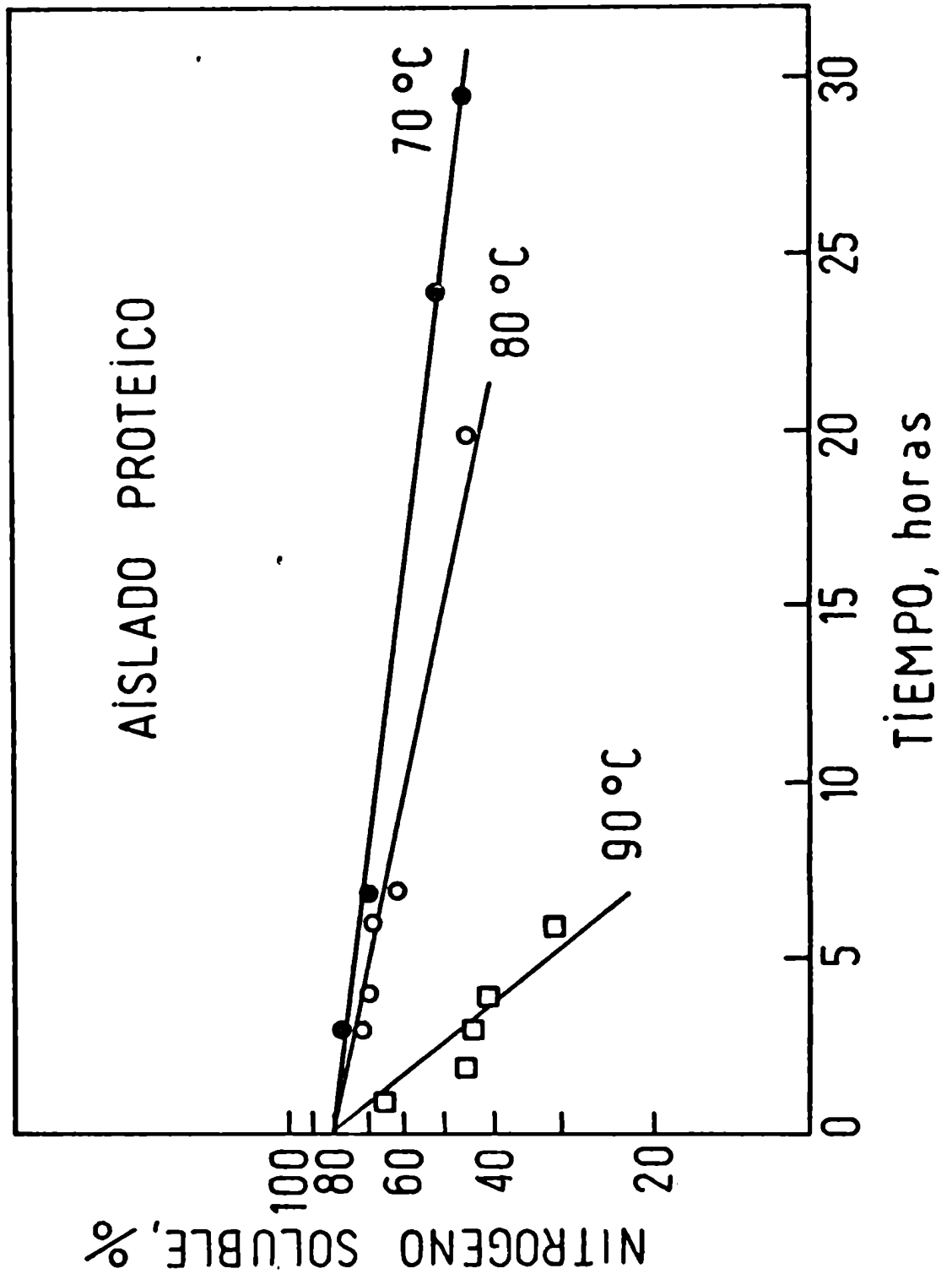


FIGURA 11 : Pérdida de nitrógeno soluble en aislado proteico de porotos tratado térmicamente a un contenido de humedad de 11,1 % (b.s.).

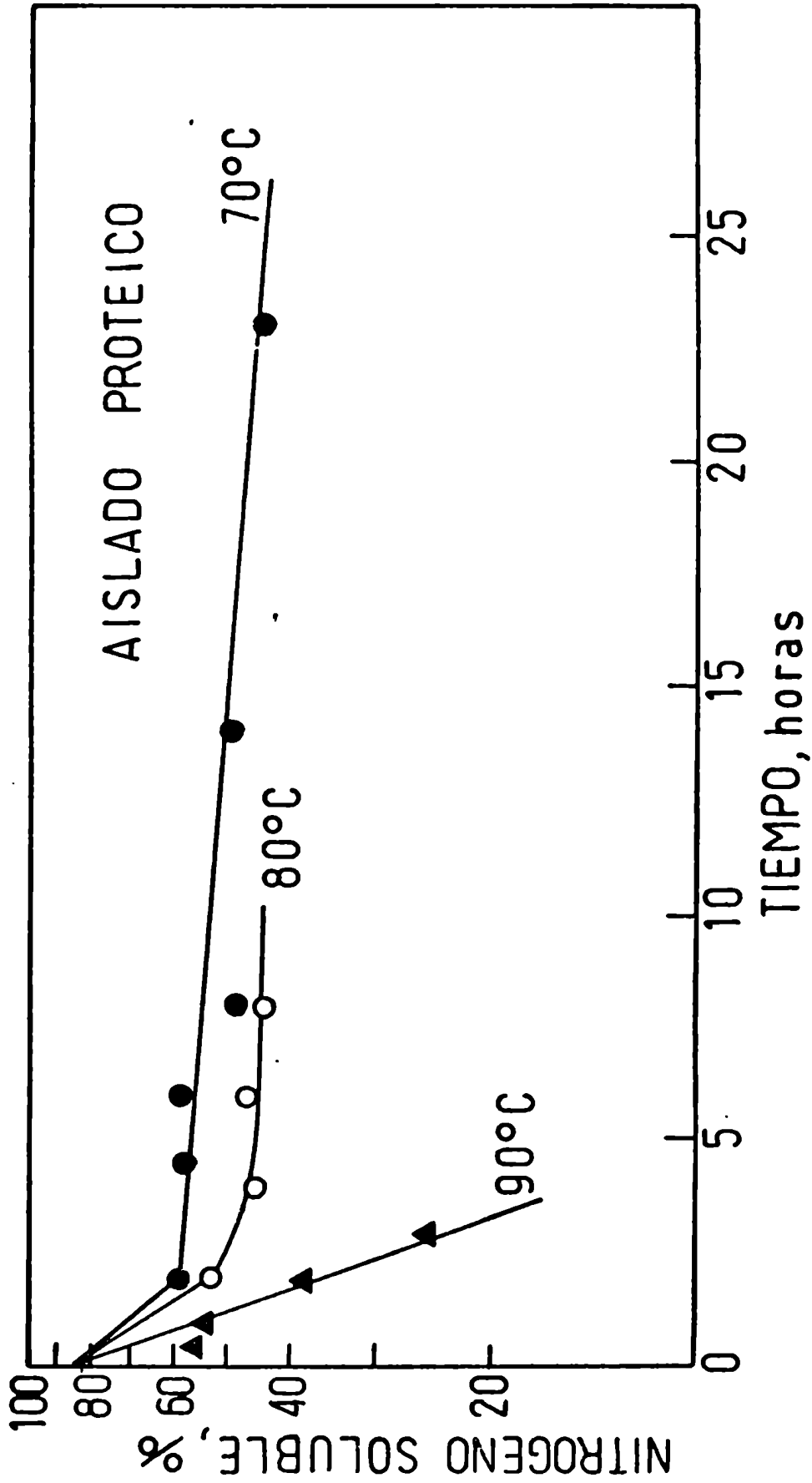


FIGURA 12 : Pérdida de nitrógeno soluble en aislado proteico de porotos tratado térmicamente a un contenido de humedad de 29,6 % (b.s.).

po indican que en casi todos los casos se cumple el modelo cinético propuesto de orden uno.

La única excepción corresponde a los datos obtenidos para el aislado proteico al mayor nivel de humedad (30%) (Fig. 12). Pence y col. (1953) también hallaron que la pérdida de solubilidad del glúten húmedo calentado a varias temperaturas podía representarse por una expresión de orden uno, aunque notaron que las últimas fases de la reacción parecían seguir mejor una cinética de segundo orden.

En las Tablas 7 y 8 aparecen los valores de las constantes de velocidad calculados por cuadrados mínimos a partir de los datos experimentales.

De la observación de los resultados obtenidos se desprende que al aumentar el contenido de humedad, aumenta considerablemente la pérdida de nitrógeno soluble para ambos sistemas y que en todos los casos el aislado proteico es más susceptible frente al calor que la harina.

Estos resultados se ven mejor en la Figura 13 en la cual se compara la vida media ($t_{\frac{1}{2}}$) (tiempo necesario para reducir el nitrógeno soluble a un 50% de su valor inicial) a distintos contenidos de humedad para harina y aislado proteico. Se usó una representación logarítmica debido a la gran variación del tiempo medio.

El tiempo medio se calculó de acuerdo a la expresión correspondiente a una cinética de orden uno.

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{0.693}{K}$$

TABLA 7: Constantes de Velocidad para la pérdida de nitrógeno soluble en
harina de porotos.

Contenido de humedad g H ₂ O/100 g materia seca	Temperatura (°C)	K ₁ (h ⁻¹)
0,5	80	0,0007
	90	0,003
	100	0,006
14,1	50	0,0006
	70	0,01
	80	0,03
	90	0,14
29,8	60	0,014
	80	0,08
	90	0,26

TABLA 8: Constantes de velocidad para la pérdida de nitrógeno soluble en aislado proteico de porotos.

Contenido de humedad g H ₂ O/100 g materia seca	Temperatura (°C)	h^{-1}
1,6	80	0,01
	90	0,02
	100	0,05
11,1	70	0,02
	80	0,03
	90	0,18
29,6	70	-
	80	-
	90	0,4

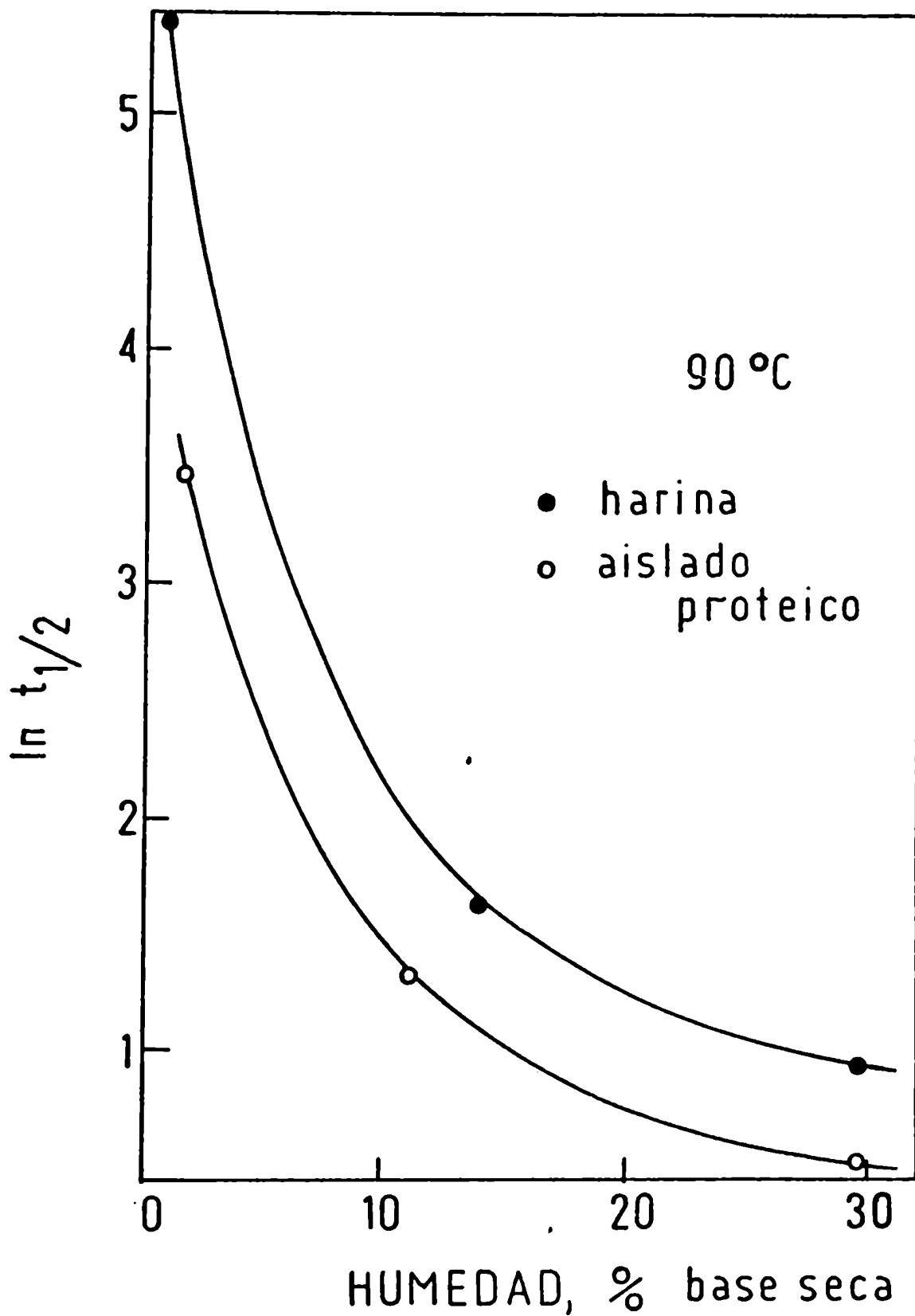


FIGURA 13 :Comparación del tiempo necesario para reducir en un 50 % el nitrógeno soluble ($t_{1/2}$) de la harina y del aislado proteico de porotos, a 90 °C.

donde K es la constante de velocidad calculada por cuadrados mínimos a partir de las pendientes de las rectas obtenidas en las Figuras 7 a 12.

Se observa que la humedad tiene una influencia enorme sobre la pérdida de nitrógeno soluble. Por ej.: cuando el contenido de humedad aumenta de un 5% a un 20% la vida media a 90°C disminuye en un factor de 8,3 y 5,1 para harina y aislado respectivamente.

Pence y col., (1953) también encontraron un efecto similar del contenido de agua en la velocidad de pérdida de solubilidad del glúten tratado térmicamente.

El contenido de agua no es siempre el mejor parámetro para describir el efecto del agua en la velocidad de una reacción; en su lugar se utiliza la actividad acuosa que se define como:

$$a_w = \left(\frac{p_A}{p_o} \right)_T$$

donde pA: presión parcial de agua en el alimento a la temperatura T.

po: presión parcial de agua a la temperatura T.

El crecimiento de microorganismos ha sido generalmente correlacionado con la actividad acuosa, pero la mayoría de las reacciones químicas se ven afectadas por la a_w de una manera más compleja, debido a que el agua puede actuar de muy distinta manera: como solvente de los reactivos y/o productos; como reactivo en reacciones de hidrólisis; como producto de reacción; como modificadora de la actividad de catalizadores e inhibidores.

Se han propuesto muchas expresiones para describir la dependencia de las velocidades de reacción con el contenido de humedad o con la actividad acuosa. Algunos investigadores que han estudiado pardeamiento en vegetales hallaron una relación exponencial entre velocidad de pardeamiento y contenido de humedad (Legault y col., 1951; Ross, 1948). Quast y Karel (1972) notaron que la velocidad de oxidación de papas fritas se podía relacionar de manera inversa con la raíz cuadrada de la actividad acuosa.

En muchos casos la retención de nutrientes en alimentos secos es descrita aceptablemente por una relación lineal entre la constante de velocidad y la humedad o la a_w .

Labuza (1972) sugirió que los logaritmos de las constantes de velocidad de retención de ácido ascórbico obtenidos por distintos investigadores presentaban una correlación lineal con la actividad acuosa. Wanninger (1972) propuso un modelo en el que la constante de velocidad es directamente proporcional al contenido de agua.

En la Fig. 14 se muestra la correlación lineal que se obtiene al graficar el logaritmo de las constantes de velocidad de pérdida de nitrógeno soluble a distintas temperaturas en función de la a_w para la harina de porotos.

Mientras que los dos valores mayores de a_w se estimaron de la isoterma de la harina de porotos a 27°C, el valor menor de a_w se estimó de la siguiente manera: se colocó una muestra de harina con un contenido de humedad

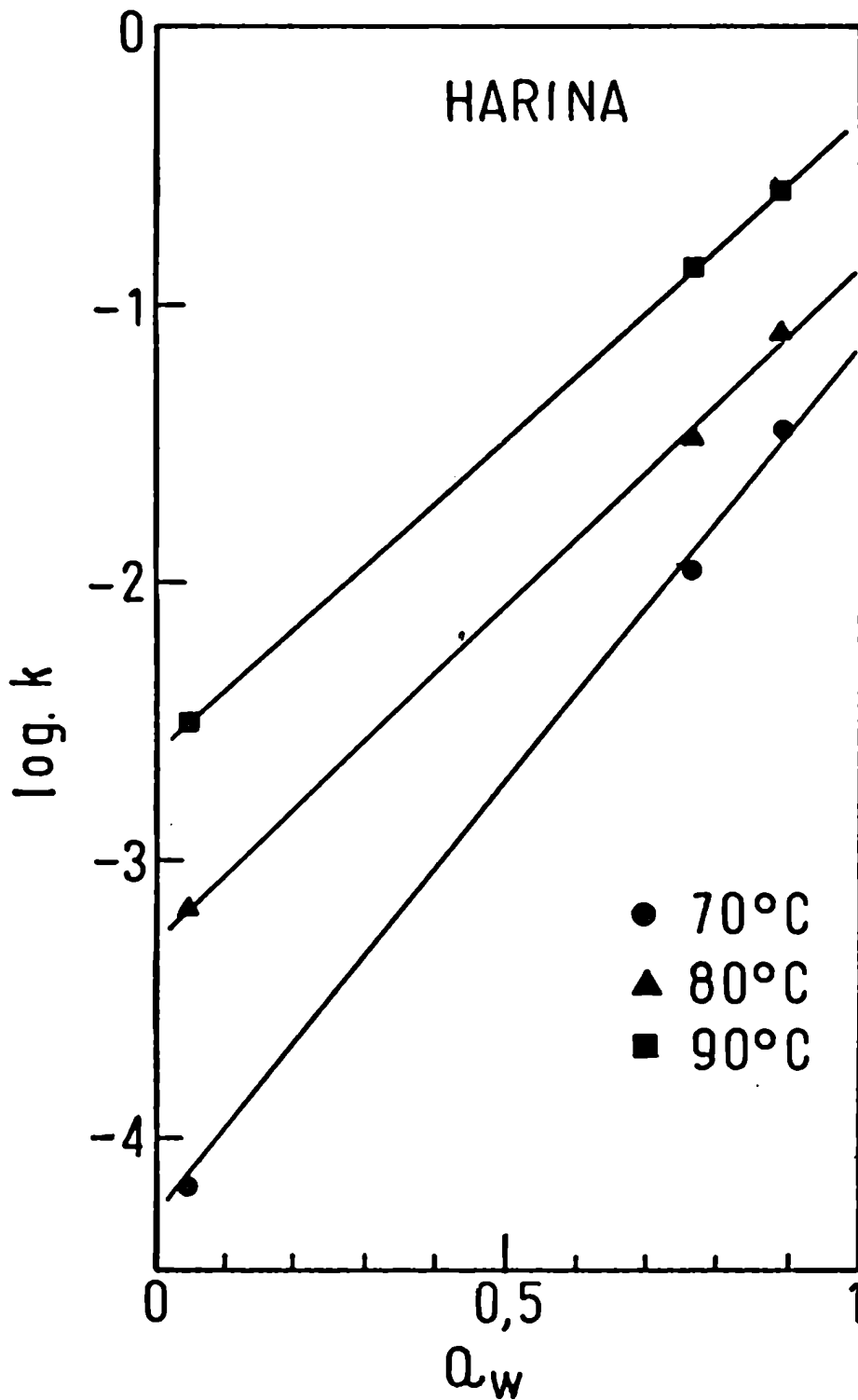


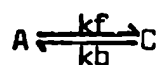
FIGURA 14 :Correlación entre constantes de velocidad de pérdida de nitrógeno soluble y la actividad acuosa, para harina de porotos.

de 0,5% en un desecador que contenía solución saturada de NaOH, cuya a_w a 27°C es de 0,07. Se hizo vacío y se almacenó a 27°C hasta llegar al equilibrio. Se comprobó que la harina absorbió agua, con lo cual se concluyó que su a_w es menor que 0,07.

IV.3.1. Efecto de la temperatura en la velocidad de pérdida de nitrógeno soluble.

Existen distintos puntos de vista desde los cuales se puede encarar el estudio del efecto de la temperatura en la velocidad de reacción. Arrhenius encaró dicho estudio desde un punto de vista termodinámico.

Si se estudia una reacción:



la variación de energía libre puede describirse por la expresión de Gibbs

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ} = -RT \ln K_{eq} \quad (1)$$

donde: ΔG° = variación de energía libre

ΔH° = variación de entalpía

ΔS° = variación de entropía

R = constante universal de los gases.

T = temperatura absoluta

K_{eq} = constante de equilibrio

En el equilibrio:

$$K_{eq} = \frac{(C)}{(A)} = \frac{K_f}{K_b}$$

Reordenando la ecuación (1) resulta:

$$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}$$

Si ΔH^0 y ΔS^0 no son muy dependientes de la temperatura resulta:

$$\frac{\partial \ln K_{eq}}{\partial (1/T)} = -\frac{\Delta H^0}{R} \quad (2)$$

Por lo tanto una representación gráfica de la constante de equilibrio en función de $(1/T)$ es una recta cuya pendiente es $-\frac{\Delta H^0}{R}$

Dado que:

$$\Delta H^0 = \Delta E^0 + P^0 \Delta V + V^0 \Delta P$$

donde: ΔE^0 = variación de energía interna.

$P^0, \Delta P$ = presión.

$V^0, \Delta V$ = volumen.

para una temperatura constante, P^0 y V^0 no pueden variar independientemente, por lo tanto:

$$\Delta H^0 = \Delta E^0 + \Delta n \bar{R} T$$

donde Δn = Variación del número de moles de la reacción.

Por lo tanto resulta:

$$\frac{\partial \ln K_{eq}}{\partial (1/T)} = - \frac{\Delta E^0}{R} \quad (3)$$

El mismo razonamiento puede usarse para determinar la dependencia de la constante de velocidad de reacción k_f ya que ella es directamente proporcional a K_{eq} ; por lo tanto resulta:

$$\frac{\partial \ln k_f}{\partial (1/T)} = - \frac{E_A}{R} \quad (4)$$

donde E_A es la energía que la molécula A debe adquirir antes de transformarse en el producto C.

Esto se ve esquemáticamente en la Fig. 15 donde se grafica el estado energético en función de la coordenada de reacción.

Integrando la ecuación (4) se obtiene la clásica expresión de Arrhenius:

$$k_f = K_0 e^{-E_A/RT} \quad (5)$$

donde K_0 es una constante que puede ser interpretada en términos de frecuencia o probabilidad con que los reactivos con una energía mayor que E_A se

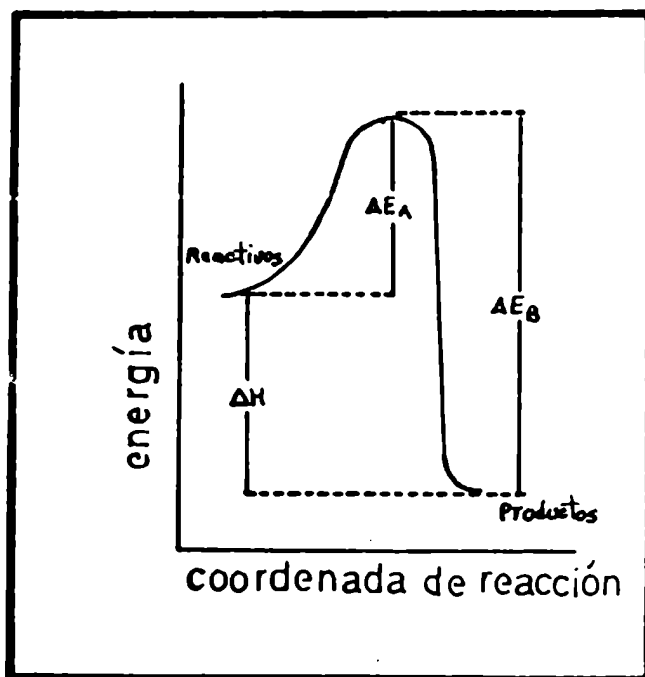


FIGURA 15 : Energía de reacción en función de la coordenada de reacción.

transforman en productos.

La Energía de activación se calcula por lo general a partir de la pendiente de la recta que se obtiene al graficar el $\ln K$ en función de $(1/T)$ y depende de ciertos factores como la actividad acuosa, el contenido de humedad, la concentración de sólidos, el pH y otros (Hendel y col., 1955; Jensen, 1969; Karel y Nickerson, 1964; Labuza, 1972; Lee y col., 1977; Mizrahi y col., 1970 a; Riemer y Karel, 1978; Saguy y col., 1979 a, b; 1980).

En las Figuras 16 y 17 se muestran las rectas obtenidas al graficar los logaritmos de los valores de las constantes de velocidad de orden uno en función de la inversa de la temperatura absoluta para la harina y el aislado proteico respectivamente y para los distintos niveles de humedad; se observa que se cumple la relación de Arrhenius en todos los casos.

Los valores calculados de E_A se muestran en la Tabla 9. La magnitud de los valores obtenidos indica que la temperatura tiene un efecto relativamente importante en la velocidad de pérdida de solubilidad. Pence y col., (1953) encontraron un valor de E_A de 43,8 Kcal/mol para la pérdida de solubilidad de glúten de trigo tratado térmicamente.

Antes de discutir cualquier relación entre la energía de activación y el contenido de humedad en la harina y aislado proteico, es necesario estimar el error asociado con dichas determinaciones para poder evaluar si los valores obtenidos de E_A son significativamente distintos. Dicho cálculo se basó en un trabajo de Hill y Grieger-Block (1980).

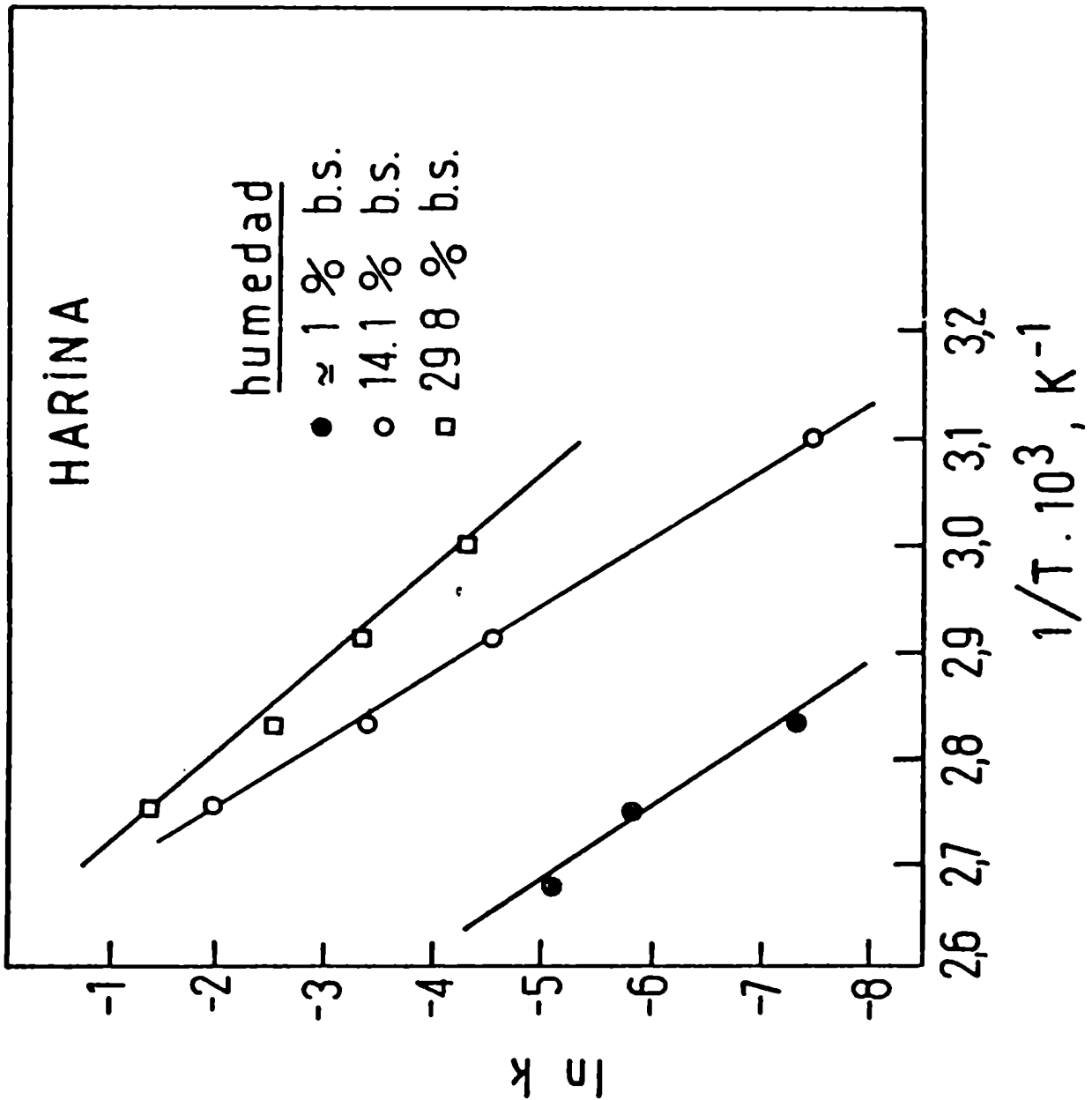


FIGURA 16 :Representación gráfica de la relación de Arrhenius para la pérdida de nitrógeno soluble en harina de porotos.

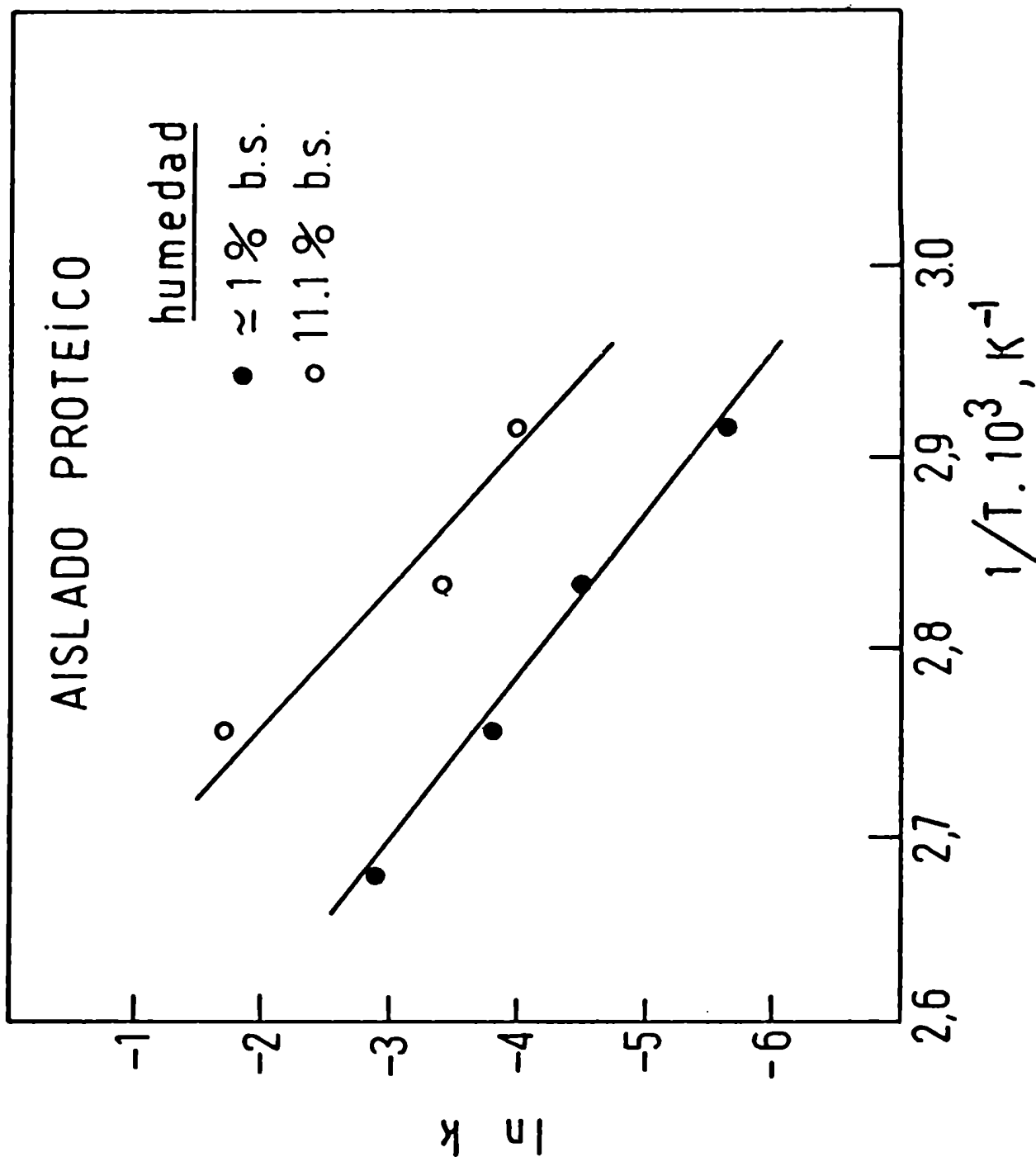


FIGURA 17 :Representación gráfica de la relación de Arrhenius para la pérdida de nitrógeno soluble en aislado proteico de porotos.

TABLA 9: Energías de activación para la pérdida de nitrógeno soluble en
harina y aislado proteico de porotos a distintos niveles de humedad.

Sistema	Contenido de humedad g H ₂ O/100 g materia seca	E _a (Kcal/mol)
Harina	0,5	29
	14,1	32
	29,8	23
Aislado proteico	1,6	21
	11,1	28

IV.3.2. Cálculo del error en las constantes de velocidad de pérdida de nitrógeno soluble.

La constante de velocidad de una reacción se puede calcular a partir de una forma integrada de la ecuación cinética si se poseen los datos del estado del sistema a dos tiempos diferentes (Hill y col., 1980). Esta metodología supone que se han hecho suficientes mediciones para establecer la cinética de la reacción.

Considérese la expresión cinética de orden n

$$v = K C_a^n$$

si la reacción ocurre en un sistema de volumen constante, la velocidad está dada por

$$K = \frac{1}{(n - 1) (t_2 - t_1)} \left(\frac{1}{C_{a2}^{n-1}} - \frac{1}{C_{a1}^{n-1}} \right) \quad (1)$$

donde C_{a2} y C_{a1} son las concentraciones de A a los tiempos t_2 y t_1 respectivamente y $n \neq 1$.

En un caso general de una variable dependiente $Y = f(X_1, X_2, \dots, X_m)$ que es una función conocida de las variables independientes, el error relativo en Y estará dado por:

$$\left(\frac{\partial Y}{Y} \right)^2 = \sum_{i=1}^m \left(\frac{\partial \ln f}{\partial \ln X_i} \right)^2 \left(\frac{\Delta X_i}{X_i} \right)^2$$

Si se supone que los errores en las cuatro magnitudes t_1 , t_2 , C_{a1}

y C_{a2} , son independientes y que h es una constante conocida, el error casual en la constante de velocidad ΔK , estará dado por:

$$\left(\frac{\Delta K}{K}\right)^2 = \left(\frac{\partial \ln K}{\partial \ln t_1}\right)^2 \left(\frac{\Delta t_1}{t_1}\right)^2 + \left(\frac{\partial \ln K}{\partial \ln t_2}\right)^2 \left(\frac{\Delta t_2}{t_2}\right)^2 + \left(\frac{\partial \ln K}{\partial \ln C_{a1}}\right)^2 \left(\frac{\Delta C_{a1}}{C_{a1}}\right)^2 + \left(\frac{\partial \ln K}{\partial \ln C_{a2}}\right)^2 \left(\frac{\Delta C_{a2}}{C_{a2}}\right)^2$$

De acuerdo a (1) resulta,

$$\left(\frac{\Delta K}{K}\right)^2 = \left(\frac{t_1}{t_2 - t_1}\right)^2 \left(\frac{\Delta t_1}{t_1}\right)^2 + \left(\frac{t_2}{t_2 - t_1}\right)^2 \left(\frac{\Delta t_2}{t_2}\right)^2 + \left\{\frac{(1-n) C_{a1}^{n-1}}{C_{a1}^{n-1} - C_{a2}^{n-1}}\right\}^2 \left(\frac{\Delta C_{a2}}{C_{a2}}\right)^2 + \left\{\frac{(n-1) C_{a2}^{n-1}}{C_{a1}^{n-1} - C_{a2}^{n-1}}\right\}^2 \left(\frac{\Delta C_{a1}}{C_{a1}}\right)^2$$

para el caso $n = 1$.

$$\left(\frac{\Delta K}{K}\right)^2 = \left(\frac{\Delta t_1}{t_2 - t_1}\right)^2 + \left(\frac{\Delta t_2}{t_2 - t_1}\right)^2 + \left\{\frac{1}{\ln \frac{C_{a1}}{C_{a2}}}\right\}^2 \left(\frac{\Delta C_{a1}}{C_{a1}}\right)^2 + \left\{\frac{1}{\ln \frac{C_{a1}}{C_{a2}}}\right\}^2 \left(\frac{\Delta C_{a2}}{C_{a2}}\right)^2 \quad (2)$$

Dado que los intervalos de tiempo estudiados fueron grandes, la mayor fuente de error en la ecuación (2) es la que proviene de la determinación de C_a que corresponde a la determinación de proteína soluble.

IV.3.3. Cálculo del error en la E_a de pérdida de nitrógeno soluble

La E_a de una reacción puede determinarse a partir del conocimiento de las constantes de velocidad a dos temperaturas diferentes. La relación de Arrhenius que describe esta dependencia es:

$$E_a = \left(\frac{R T_1 T_2}{T_2 - T_1} \right) \ln \frac{k_2}{k_1}$$

Si los errores en cada una de las magnitudes k_1 , k_2 , T_1 y T_2 , son casuales, el error relativo en la E_a es:

$$\left(\frac{\Delta E_a}{E_a} \right)^2 = \left(\frac{T_2}{T_2 - T_1} \right)^2 \left(\frac{\Delta T_1}{T_1} \right)^2 + \left(\frac{T_1}{T_2 - T_1} \right)^2 \left(\frac{\Delta T_2}{T_2} \right)^2 + \left(\frac{1}{\ln \frac{k_2}{k_1}} \right)^2 \left\{ \left(\frac{\Delta k_1}{k_1} \right)^2 + \left(\frac{\Delta k_2}{k_2} \right)^2 \right\} \quad (3)$$

El error relativo en la E_a depende enormemente del intervalo de temperatura elegido y del factor $1/\ln \frac{k_2}{k_1}$; en consecuencia si la constante de velocidad no varía apreciablemente en el rango de temperatura elegido, el error asociado a E_a será grande.

IV.3.4. Estimación de los errores absolutos en t , T y C_a

$$\Delta t = \pm 2'$$

$$\Delta T = \pm 1^\circ\text{C}$$

ΔC_a involucra el error en la técnica analítica de determinación de proteína soluble y se estimó de la siguiente manera:

Se efectuaron 10 determinaciones de proteína soluble sobre una

muestra sin tratar de aislado proteico de porotos; las determinaciones englobaron todas las etapas: extracción, dilución y dosaje mediante el método colorimétrico de Acido Naranja 12.

En base al cálculo del valor promedio y de la desviación estandar "S" se estimó el error absoluto $\pm \Delta C_a$ para un nivel de confianza del 95% mediante el parámetro "t" de Student.

Los resultados fueron los siguientes:

<u>Nº muestra</u>	<u>% Proteína soluble</u>
1	76,65
2	79,10
3	74,81
4	75,67
5	77,26
6	77,26
7	77,87
8	75,67
9	77,75
10	79,1

El valor promedio fue:

$$\bar{x} = 77,10$$

y la desviación estandar "S"

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} = 1,44$$

Como \bar{x} y S se obtuvieron con un número pequeño de mediciones, se calcularon los límites ($\pm x$) dentro de los cuales caen el 95% de los valores mediante el parámetro "t" de Student.

$$\pm t = (\bar{x} - \mu) \frac{N^{1/2}}{S}$$

Si $N = 1$, \bar{x} resulta una observación aislada y la expresión anterior puede aplicarse si se conoce S de una serie anterior de mediciones.

Para un nivel de confianza de 95%, $S = 1,44$ y $N = 1$, resulta $\pm t = 2,26$ (Kolthof y colab., 1972).

Por lo tanto,

$$\Delta x = \Delta C_a = (x - \mu) = 3,25\%$$

La sustitución de Δt , ΔT y ΔC_a en las ecuaciones (2) y (3) da los resultados que se muestran en las Tablas 10 y 11.

Para la harina de porotos la precisión lograda en la medición de la E_g es tal que no se puede asegurar que los valores a 0,5% y a 14,1% de humedad sean distintos; sin embargo el valor de la E_g al mayor contenido de humedad (29,8%) puede ser considerado significativamente menor que los otros dos. Para el aislado proteico también resulta difícil asegurar que los valores de E_g a 1,6% y 11,1% de humedad son distintos.

IV.3.5. Conclusiones.

La pérdida de nitrógeno soluble por tratamiento térmico de harina

TABLA 10: Errores aproximados en las constantes de velocidad y Energías de activación para la pérdida de nitrógeno soluble en harina de porotos.

Contenido de humedad g H ₂ O/100 g materia seca	Temperatura (°C)	$\frac{\Delta K}{K}$ (ec. 2)	$\frac{\Delta E_a}{E_a}$ (ec. 3)
0,5	80	0,133	0,108
	100	0,120	
14,1	70	0,131	0,104
	90	0,145	
29,8	60	0,13	0,076
	90	0,116	

TABLA 11: Errores aproximados en las constantes de velocidad y Energías de activación para la pérdida de nitrógeno soluble en aislado proteico de porotos.

Contenido de humedad g H ₂ O/100 g materia seca	Temperatura (°C)	$\frac{\Delta K}{K}$ (ec. 2)	$\frac{\Delta E_a}{E_a}$ (ec. 3)
1,6	80	0,145	0,135
	100	0,114	
11,1	70	0,140	0,108
	90	0,115	

y aislado proteico se puede describir en casi todos los casos por una cinética de orden uno en el rango de humedades estudiado.

La velocidad de pérdida de solubilidad se ve afectada de manera muy importante por un aumento del contenido de humedad y/o actividad acuosa, incrementándose enormemente la pérdida de solubilidad.

El aislado proteico resulta ser más sensible frente al tratamiento térmico que la harina de porotos a todos los niveles de humedad debido probablemente a que las especies reactivas están más "concentradas" en este último.

La mayoría de los datos que se encuentran en la literatura de E_a , muestran que la E_a aumenta con la disminución de la actividad acuosa (Vojnovich y Pfeifer, 1970; Mizrahi y col., 1970); sin embargo existen precedentes de comportamientos opuestos (Kirk y col., 1977) o de casos en el que la E_a no se ve afectada por la a_w (Labuza, 1980).

Los datos obtenidos en este trabajo y la precisión de los mismos no permite hacer afirmaciones categóricas respecto del efecto de la humedad en la energía de activación, sin embargo parece ser que para el nivel más alto de humedad aquí estudiado (30%) la E_a para la harina tiende a disminuir.

No obstante, la magnitud de las E_a es suficientemente grande a todos los niveles de humedad como para que pequeñas variaciones de la temperatura afecten notablemente la velocidad de pérdida de nitrógeno soluble.

IV.4. MECANISMOS DE PERDIDA DE NITROGENO SOLUBLE EN HARINA Y AISLADO PROTEICO DE POROTOS

La pérdida de nitrógeno soluble en sistemas proteicos puede ser la consecuencia de uno o más de los siguientes mecanismos:

- a) desnaturalización de las proteínas seguida por agregación,
- b) cross-linking de las proteínas no desnaturalizadas,
- c) interacción de las proteínas nativas o desnaturalizadas con lípidos o carbohidratos.

Existen muchas evidencias que indican que en sistemas lipo-proteicos los radicales libres y otras especies reactivas provenientes de la oxidación de los lípidos pueden reaccionar con las proteínas provocando una disminución de la solubilidad de las mismas (Karel, 1973; Schaich, 1974).

Algunos productos de la oxidación de lípidos que no son radicales libres pueden reaccionar con las proteínas produciendo el deterioro de las mismas (Chio y Tappel, 1969); entre dichos productos los aldehídos y las cetonas pueden participar de reacciones de pardeamiento no enzimático.

Roubal y Tappel (1966) indicaron que los radicales libres producidos durante la oxidación de lípidos son responsables de la degradación de las proteínas; las bases para dicha hipótesis son (1) la semejanza entre los efectos que producen en las proteínas la radiación y la exposición a lípidos peroxidados (2) la polimerización de las proteínas que ocurre en presencia de lípidos peroxidados sin incorporación de fragmentos lipídicos (Roubal y

Tappel, 1966).

En estudios posteriores (Zirlin y Karel, 1969; Takahashi, 1970) se comprobó que la exposición de gelatina y otras proteínas al linoleato de metilo, producía reacciones muy semejantes a las que se producen por la exposición de proteínas a la radiación. En la gelatina en ausencia de agua, la interacción con los lípidos oxidables conduce a una ruptura de la cadena polipeptídica mientras que en proteínas que contienen sulfuro ocurre cross-linking tanto en "seco" como en "húmedo" (Takahashi, 1970).

Kanner y Karel (1976) estudiaron las reacciones entre lizosima y linoleato de metilo en un sistema modelo liofilizado y de a_w controlada. Los resultados indicaron que ocurre un cross-linking muy notable, especialmente a altas actividades acuosas y un disminución muy importante en la solubilidad.

En la Figura 18 se muestra el efecto del agregado de lípidos (60% de ácido linoleico) en el nitrógeno soluble de la harina de porotos tratada térmicamente en "seco" (0,7g H₂O/100 g materia seca). En las Figuras 19 y 20 se observan los mismos resultados pero para un contenido de H₂O de 14,8 y 30,9 g H₂O/100 g de materia seca respectivamente.

Se observa que la pérdida de solubilidad se puede describir también en estos casos con una cinética de primer orden y que ésta se ve incrementada por el agregado de lípidos a todas las humedades.

En la Tabla 12 se cuantifica el efecto del agregado de lípidos en harina de porotos mediante el cálculo de la constante de velocidad de orden

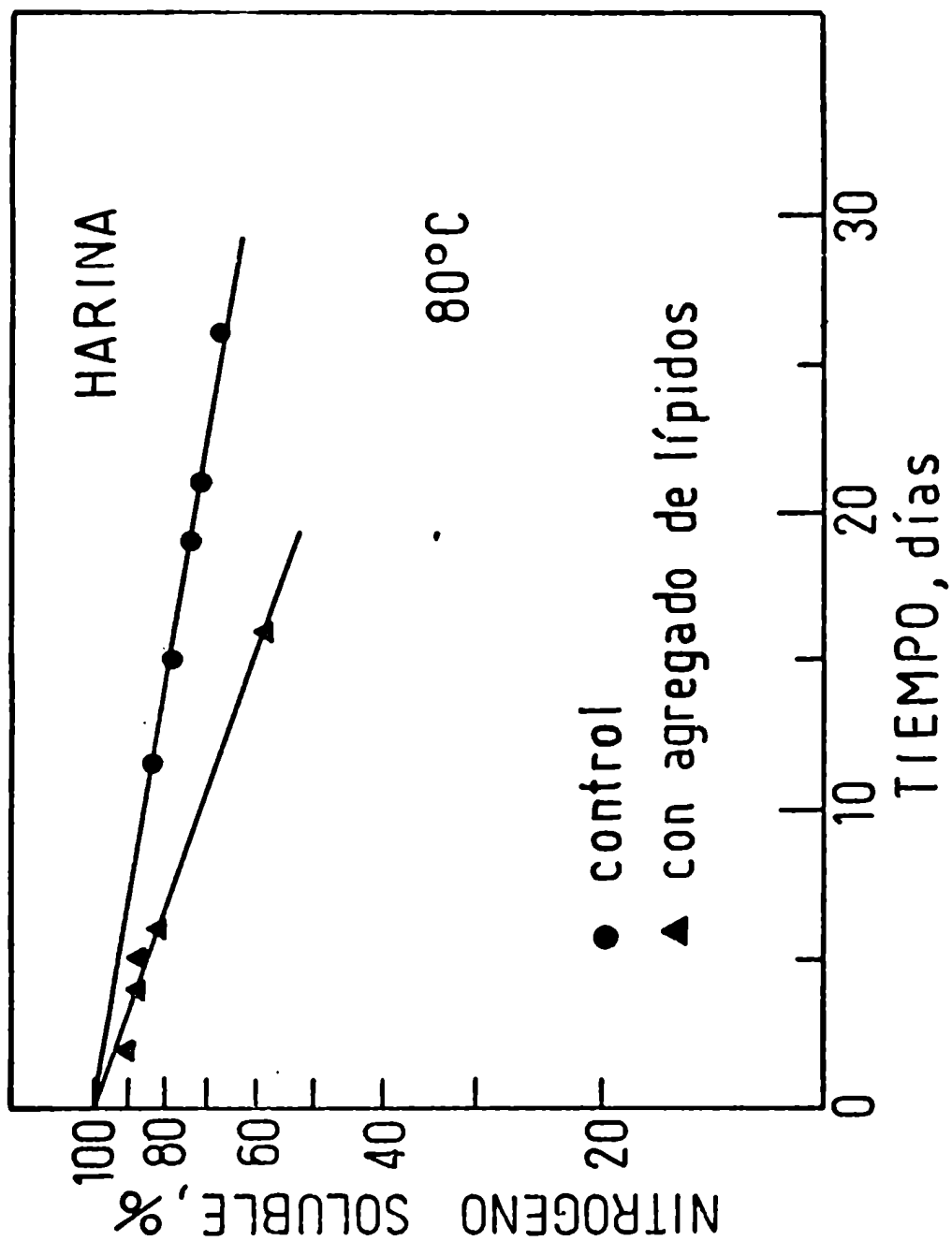


FIGURA 18 :Efecto del agregado de lípidos insaturados en la pérdida de nitrógeno soluble en harina de porotos con un contenido de humedad de 0,7 % (b.s.).

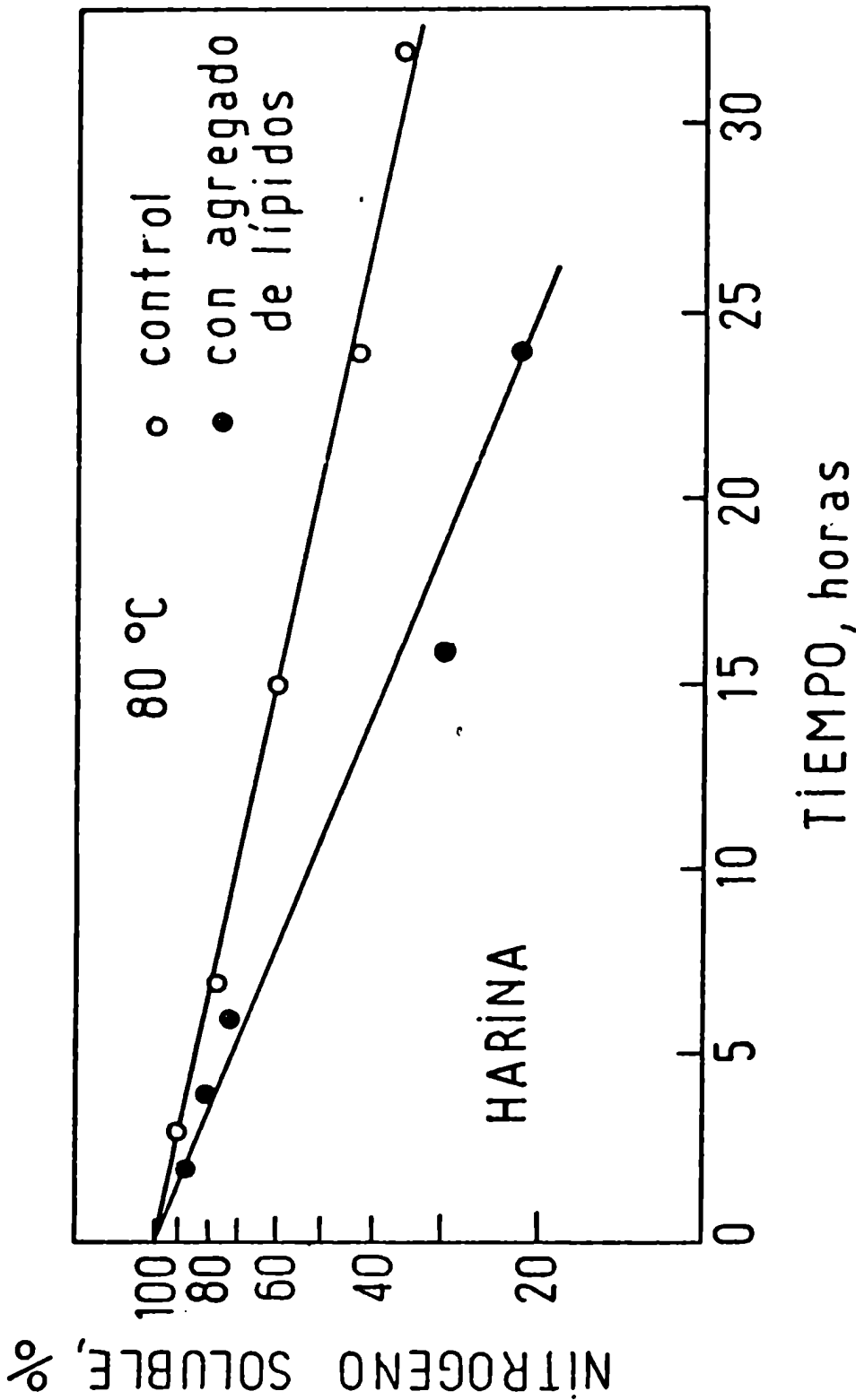


FIGURA 19 :Efecto del agregado de lípidos insaturados en la pérdida de nitrógeno soluble en harina de porotos con un contenido de humedad de 14,8% (b.s.).

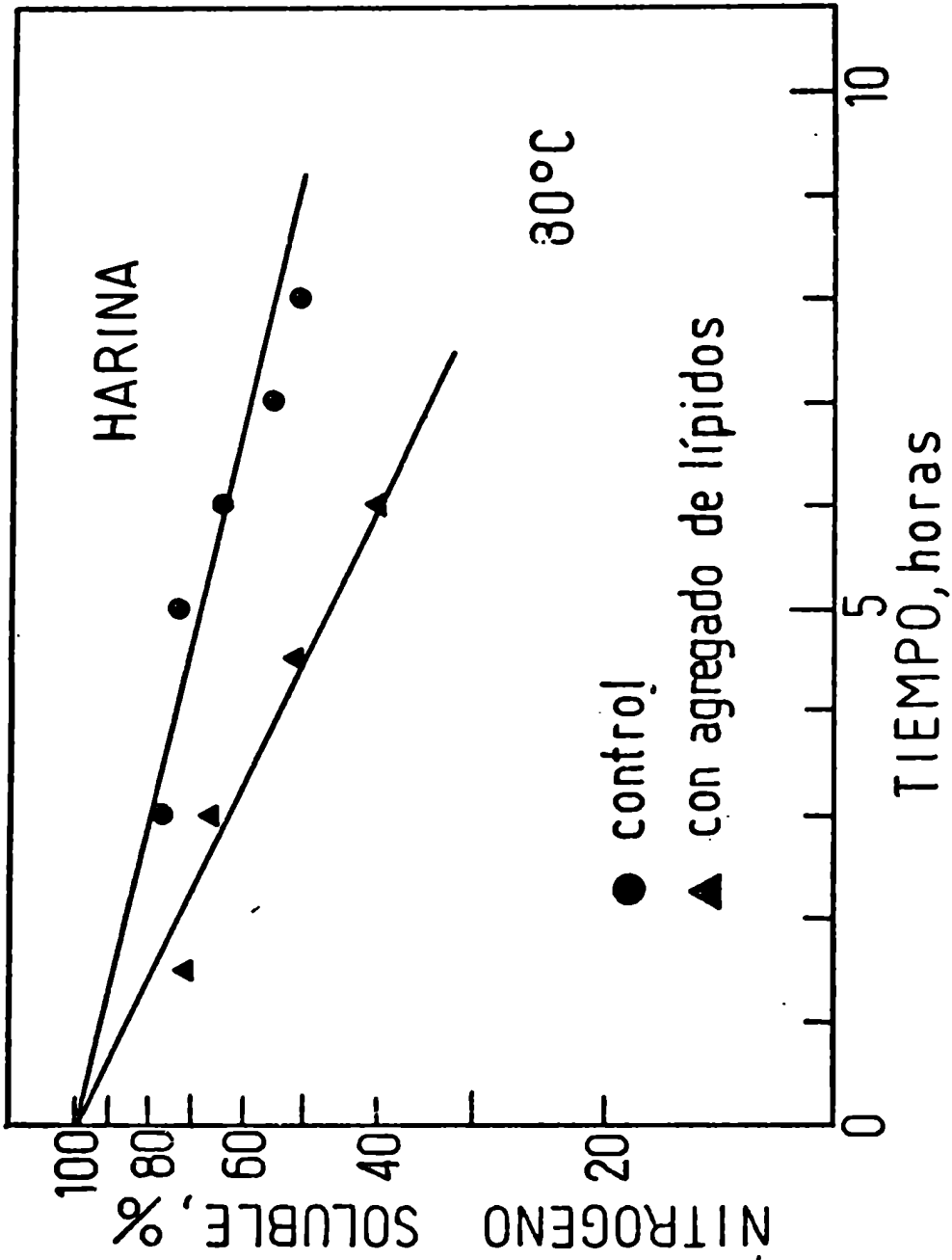


FIGURA 20 :Efecto del agregado de lípidos insaturados en la pérdida de nitrógeno soluble en harina de porotos con un contenido de humedad de 30,9 % (b.s.).

uno por cuadrados mínimos a partir de los valores experimentales; asimismo se calculó el tiempo necesario para que ocurra un 50% de pérdida de nitrógeno soluble ($t_{\frac{1}{2}}$).

Si bien la presencia de lípidos acelera la pérdida de solubilidad, el efecto relativo depende del contenido de humedad observándose un efecto máximo a 14% de humedad.

Kanner y Karel (1976) indicaron que las reacciones entre las proteínas y los lípidos autooxidables, pueden progresar a distinta velocidad o por diferentes mecanismos dependiendo del contenido de agua y de la actividad acuosa.

El efecto del contenido de agua y/o actividad acuosa en la oxidación de lípidos ha sido estudiado por muchos investigadores (Maloney y col., 1966; Labuza y col., 1966; Heidelbaugh y Karel, 1970; Quast y Karel, 1972; Labuza y col., 1970; Karel, 1977).

Al aumentar el contenido de agua por encima de la monocapa, la velocidad de oxidación de los lípidos disminuye hasta alcanzar un mínimo en el rango de humedad intermedia, debido al efecto protector del agua (forma puentes de hidrógeno con los hidroperóxidos evitando su descomposición, hidrata trazas de metales inhibiendo la actividad catalítica, reacciona con los metales dando hidróxidos insolubles, afecta directamente los radicales libres producidos).

Al aumentar más el contenido de agua, comienza a incrementarse la velocidad de oxidación pues la matriz porosa se hincha y permite una entrada

TABLA 12: Efecto del agregado de lípidos insaturados (3% sobre el contenido de proteína) en la cinética de pérdida de nitrógeno soluble en harina de porotos calentada a 80°C a distintos contenidos de humedad.

Sistema	Contenido de humedad g H ₂ O/100 g materia seca	K (h ⁻¹)	t $\frac{1}{2}$ (h)
Control	0,5	0,0007	1019
+ agregado de lípidos	0,7	0,0009	770
Control	14,1	0,033	21
+ agregado de lípidos	14,8	0,069	10
Control	29,8	0,080	6,7
+ agregado de lípidos	30,9	0,13	5,2

de oxígeno más rápida y una mayor difusión de los catalizadores metálicos no inactivados.

Por otro lado, las reacciones secundarias entre los productos de oxidación de los lípidos y las proteínas se ven aceleradas por el aumento del contenido de agua (Roubal y Tappel, 1966 b; Kanner y Karel, 1976). Schaich (1974) estudió la formación de radicales libres en sistemas lipo-proteicos y encontró que procesos iniciados por radicales libres como el cross-linking entre proteínas se ve incrementado por el aumento del contenido de agua.

Labuza y col., (1969) indicaron además que las proteínas se pueden oxidar y que en contraste con la oxidación de lípidos ésta se ve acelerada a medida que aumenta el contenido de agua. En este caso el agua actúa probablemente como solvente causando el hinchamiento de la matriz proteica y exponiendo nuevos sitios susceptibles a la oxidación.

Es probable por lo tanto que, debido a los posibles y contrapuestos mecanismos de acción del agua, se observe un efecto máximo en la pérdida de solubilidad en presencia de lípidos autooxidables a un contenido de humedad de 14%.

Para evaluar la posible contribución de reacciones entre lípidos y proteínas a la insolubilización de las proteínas de la harina y el aislado proteico de porotos, se investigó el tenor de lípidos de cada sistema.

Los resultados obtenidos fueron: 2,7 g lípidos/100g materia seca para harina de porotos y 2,5 g lípidos/100 g materia seca para el aislado proteico.

Por lo tanto, puede ocurrir una interacción entre los lípidos presentes naturalmente en el poroto y la proteína; esto dependerá fundamentalmente del grado de reactividad de dichos lípidos. Como los lípidos del poroto *Phaseolus vulgaris* contienen cantidades muy importantes de ácido linoleico y linolénico (Hilditch y Williams, 1964), su actividad química es grande y por lo tanto pueden contribuir a la pérdida de solubilidad de las proteínas.

Se sabe que la reacción de Maillard entre azúcares reductores y proteínas conduce a una disminución de la solubilidad de las proteínas (Coulter y col., 1951; Karel, 1968; Watanabe, y col., 1980).

La reacción de Maillard que ocurre entre azúcares reductores y grupos amino libres de la proteína, como el grupo ϵ -amino de la lisina disminuye además el valor biológico de la proteína y la calidad del producto ya que origina cambios de color y olor.

En general se ha observado que la mayoría de los alimentos exhiben una velocidad máxima de pardeamiento en el rango de a_w comprendido entre 0,60 y 0,85 (Karel y Labuza, 1969; Labuza, 1970; Loncin y col., 1968); esto se debe a que el agua cumple dos roles, como solvente y como producto de la reacción. A bajas a_w el factor limitante es la movilidad, y un agregado de agua acelera la reacción. A altos contenidos de agua, la dilución de los reactivos y la inhibición por producto que provienen de la condensación, retardan fuertemente la reacción (Eichner y Karel, 1972; Labuza y col., 1970; Karel y Labuza, 1968; Labuza y col., 1977; Lea, 1951; Burvall y col., 1978; Labuza

y Saltmarch, 1980; Eichner y Ciner-Daruk, 1980).

En la Figura 21 se muestra el efecto del agregado de glucosa en la velocidad de pérdida de nitrógeno soluble en harina de porotos tratada térmicamente a un contenido de agua de 30% (b.s.). La Figura 22 muestra el mismo tipo de resultados pero para aislado proteico de porotos a 11% de humedad (b.s.).

En ambos casos los sistemas que contienen glucosa siguen una cinética aparente de orden uno y se observa un aumento muy significativo de la velocidad de pérdida de solubilidad si se los compara con los sistemas control.

En la Tabla 13 se muestra el efecto del agregado de glucosa en el aislado proteico tratado térmicamente a varias temperaturas a un contenido de humedad de 11% (b.s.).

Se puede observar que el agregado de glucosa provoca un aumento de la constante de velocidad de pérdida de solubilidad de 2 a 7 veces.

La Figura 23 muestra la recta obtenida al graficar el logaritmo de las constantes de velocidad en función de la inversa de la temperatura absoluta para el aislado mencionado en presencia de glucosa; se observa que los datos son consistentes con la relación de Arrhenius; la Energía de Activación calculada por cuadrados mínimos fue de 37 Kcal/mol y comparada con la que corresponde al aislado proteico solo, que fue de 28 Kcal/mol, resulta mucho más alta. El valor de 37 Kcal/mol es semejante a otros valores de E_a que se encuentran en la literatura para la reacción de Maillard (Cheftel, 1977; Resnik y Chirife, 1979), confirmando que dicha reacción tiene un rol importan

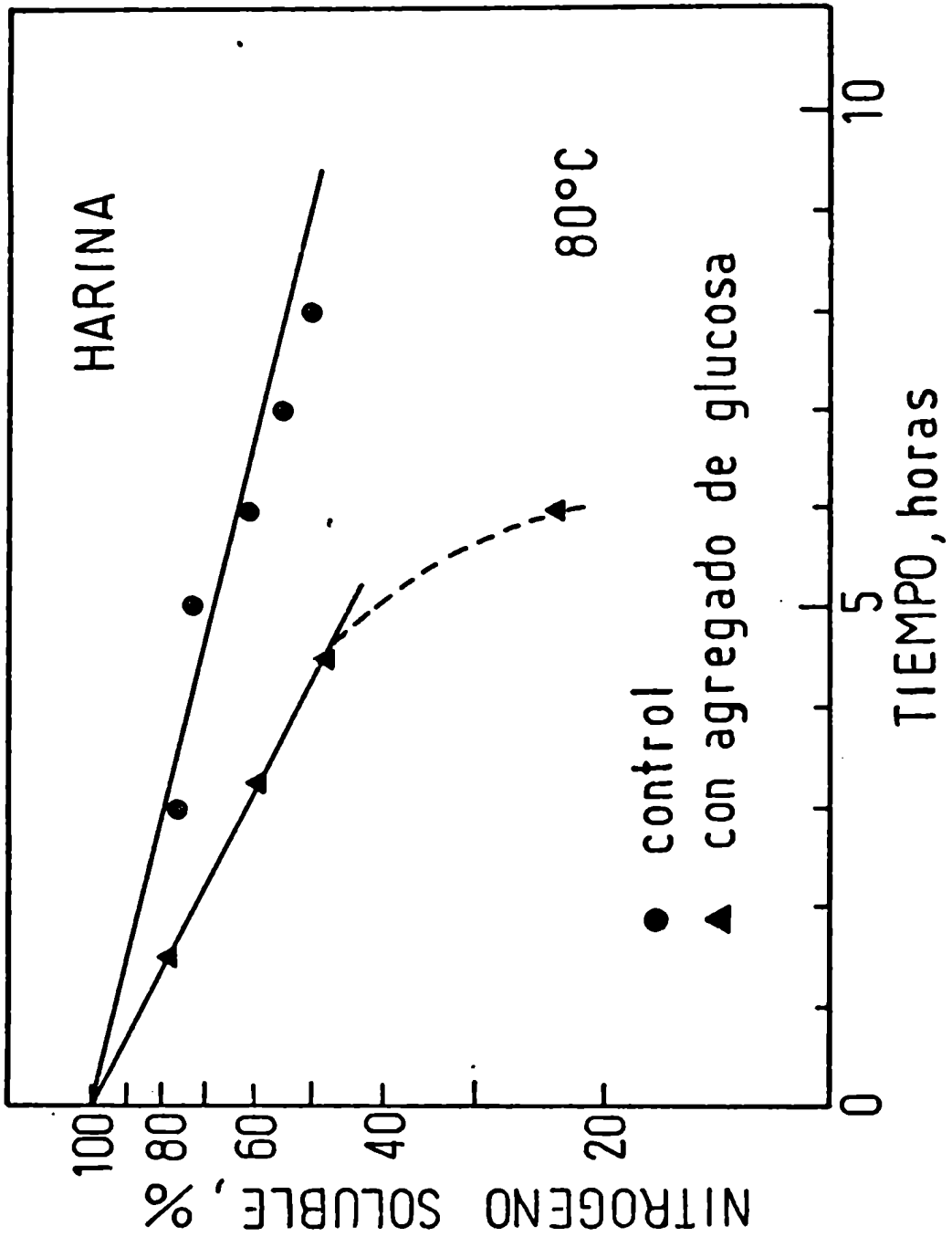


FIGURA 21 :Efecto del agregado de glucosa en la pérdida de nitrógeno soluble ,en harina de porotos con un contenido de humedad de 30 % (b.s.).

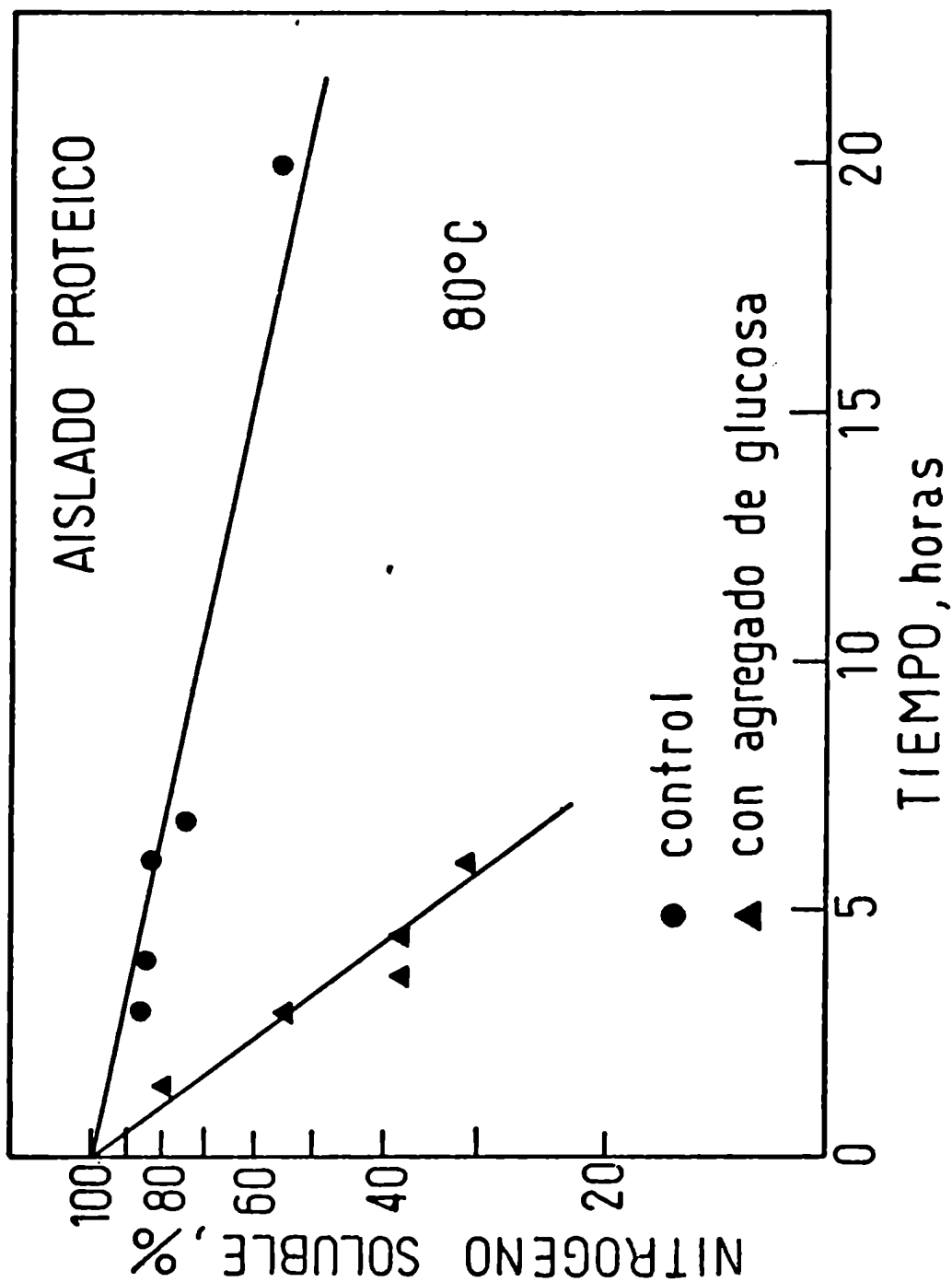


FIGURA 22 :Efecto del agregado de glucosa en la pérdida de nitrógeno soluble en aislado proteico de porotos con un contenido de humedad de 11 % (b.s.).

TABLA 13: Efecto del agregado de glucosa (10% sobre el contenido de protefna)
en la cinética de pérdida de nitrógeno soluble en aislado proteico
de porotos de 11% de humedad, calentado a distintas temperaturas.

Sistema	Temperatura (°C)	K (h ⁻¹)	t $\frac{1}{2}$ (h)
Control	60	0,0056	123,7
+ agregado de glucosa	60	0,0094	73,7
Control	70	0,019	36,5
+ agregado de glucosa	70	0,076	9,1
Control	80	0,031	22,3
+ agregado de glucosa	80	0,21	3,3

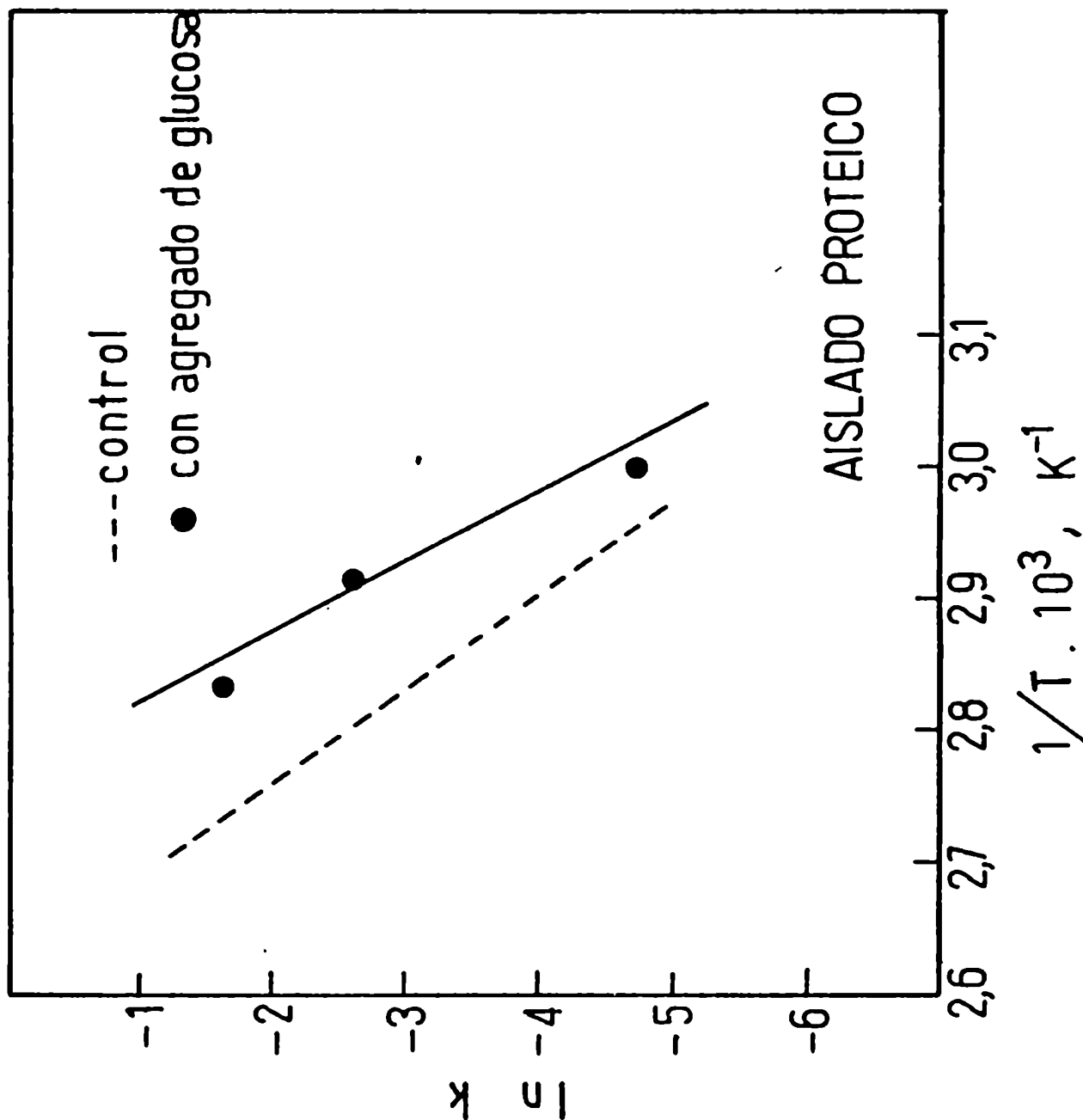


FIGURA 23 : Representación gráfica de la relación de Arrhenius para la pérdida de nitrógeno soluble en presencia de glucosa, en aislado proteico de porotos con un contenido de humedad de 11 % (b.s.).

te en la pérdida de solubilidad de aislados proteicos calentados en presencia de glucosa.

Con el objeto de comprobar si la reacción de Maillard contribuye a la pérdida de solubilidad de las proteínas en la harina y el aislado proteico de porotos, se investigó la presencia natural de azúcares reductores en ambos sistemas.

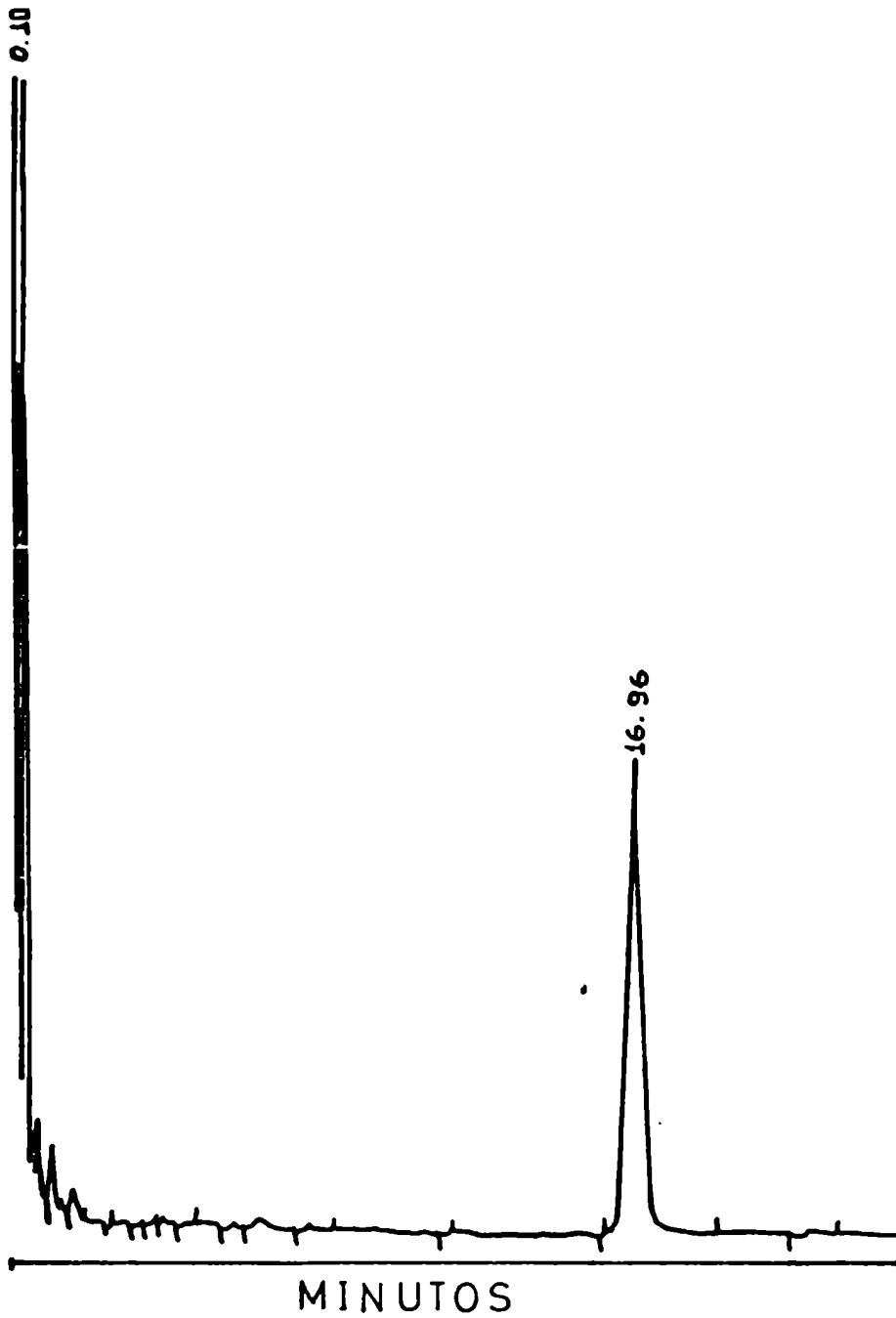
En la harina de porotos no se detectaron azúcares reductores por análisis químico, mientras que se detectó un 2,7% (b. s.) de azúcares invertibles.

La cromatografía gas-líquido de los silil-derivados de los azúcares confirmó dicho resultado ya que no se detectó ni glucosa, ni fructosa, ni maltosa.

El único azúcar presente fue un disacárido no identificado (no es sacarosa) que representa el 88,6% del área total (Figura 24).

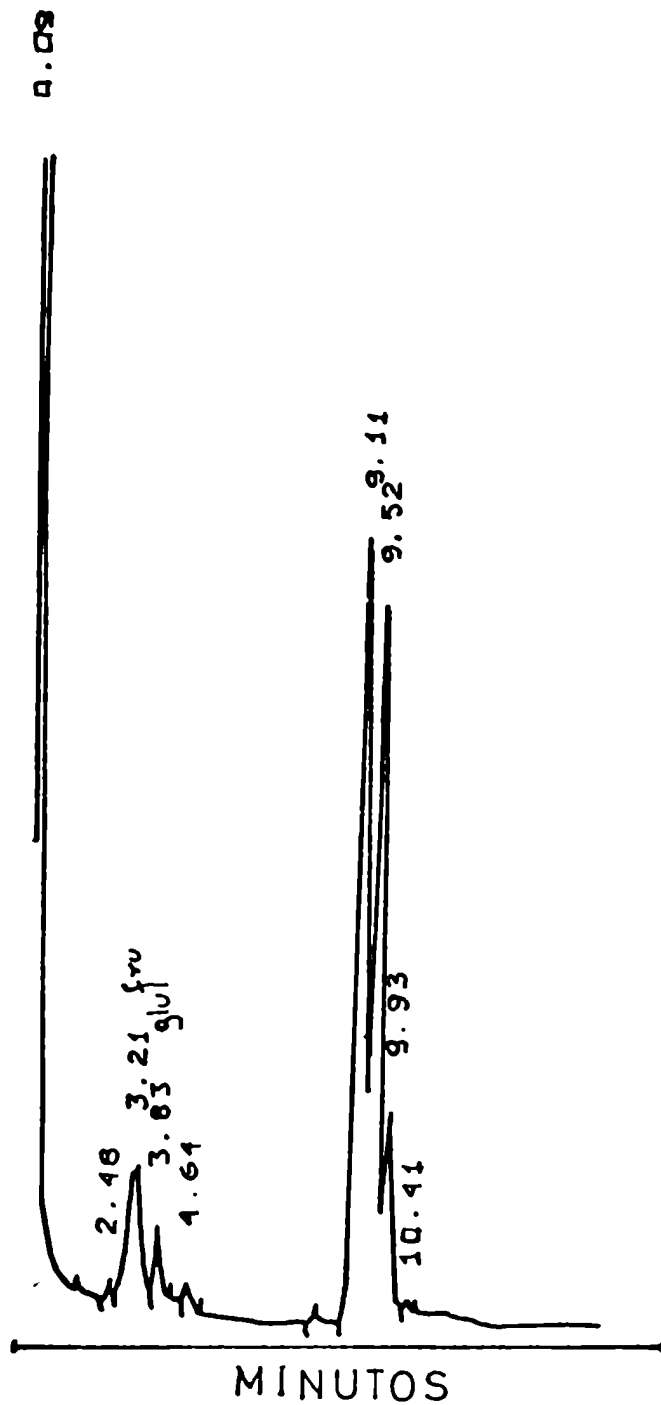
Dado que el aislado proteico tiene una cantidad muy baja de azúcares totales (1,1% (b.s.)) se efectuó únicamente una cromatografía GLC de los silil-derivados de los azúcares (Figura 25). El cromatograma indica que el aislado proteico contiene una pequeña cantidad de glucosa y fructosa, formadas probablemente durante el proceso de aislación de la proteína; sin embargo ambos azúcares juntos representan únicamente alrededor de un 0,13% del aislado proteico.

Por lo tanto, la ausencia de cantidades significativas de azúcares reductores en la harina y el aislado proteico elimina la posibilidad de ocu-



<u>Patrones</u>	<u>I.R.(min)</u>
glucosa	5.40
fructosa	4.31
sacarosa	17.36
maltoza	18.35

FIGURA 24 :Cromatografía gas-líquido de los trimetilsilil-derivados de los azúcares de la harina de porotos.



<u>Patrones</u>	<u>T.R. (min)</u>
glucosa	3.95
fructosa	3.29
sacarosa	10.18
maltosa	10.07

FIGURA 25 :Cromatografía gas-líquido de los trimetilsilil-derivados de los azúcares del aislado proteico de porotos.

rrencia de una reacción de Maillard típica, como mecanismo coadyuvante a la pérdida de solubilidad.

IV.4.1. Conclusiones.

Si bien la desnaturalización y posterior agregación de las proteínas son los mecanismos básicos que contribuyen a la pérdida de solubilidad de las mismas, los resultados encontrados indican que la interacción entre los intermediarios y/o productos de oxidación de los lípidos y las proteínas también contribuyen a la pérdida de solubilidad.

Esto se basa en el aumento de la velocidad de pérdida de solubilidad en presencia de un agregado de lípidos insaturados y en la existencia en la harina y el aislado proteico de porotos de cantidades significativas de lípidos oxidables.

V. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron obtener información acerca del efecto del tratamiento térmico, a bajos contenidos de humedad, sobre dos propiedades funcionales de las proteínas dependientes de su interacción con el agua: sorción de agua y solubilidad.

Se demostró que los cambios relativos en la sorción de agua (en el rango de a_w estudiado), no son un índice adecuado de los cambios en el contenido de nitrógeno soluble que ocurren en el aislado proteico de porotos calentado en "seco" o en "húmedo", ya que, si bien el tratamiento térmico de la proteína produce una disminución muy significativa en el nitrógeno soluble, la capacidad de sorción de agua no se ve prácticamente afectada.

El comportamiento en cuanto a la sorción en la harina de porotos, refleja las propiedades higroscópicas integradas de sus principales componentes que son fundamentalmente almidón y proteína. Por lo tanto el cambio significativo observado en la sorción debido al calor, es la resultante de la modificación de las capacidades de sorción de ambos componentes y dado que el almidón forma la mayor parte de la materia seca, sus propiedades de sorción serán las dominantes.

El estudio cinético de la pérdida de nitrógeno soluble en harina y aislado proteico de porotos permitió obtener los parámetros cinéticos (constantes de velocidad y Energías de activación) necesarios para la predicción de la pérdida de dicha propiedad funcional en el rango de humedades estudia-

do (0,5 - 30% b.s.).

Siendo la solubilidad el índice más adecuado de funcionalidad, el conocimiento de los parámetros cinéticos antes mencionados permite la optimización de los procesos que involucran un tratamiento por calor y la predicción del deterioro que se produce durante el almacenamiento de dichos materiales proteicos.

Es destacable el efecto del contenido de humedad en la pérdida de nitrógeno soluble, que se manifestó en un aumento muy importante de la velocidad de pérdida de solubilidad a medida que el contenido de humedad aumenta.

Por otro lado, la magnitud de los valores de la Energía de activación resultó ser suficientemente grande a todos los niveles de humedad, como para que pequeñas variaciones de la temperatura afecten notablemente la velocidad de pérdida de nitrógeno soluble.

El estudio de los posibles mecanismos a través de los cuales ocurre la pérdida de solubilidad de las proteínas en los sistemas estudiados, indicó que si bien la desnaturalización y posterior agregación de las proteínas son los mecanismos básicos que llevan a la pérdida de solubilidad de las mismas, la interacción entre los intermediarios y/o productos de oxidación de los lípidos y las proteínas también contribuye a la insolubilización de las mismas.

J. Sancho

S. S. S.

VI. NOMENCLATURA

A = parámetro de la Ecuación de Smith.

a_w = actividad acuosa.

B = parámetro de la Ecuación de Smith.

C_A = concentración del componente A.

C_{A0} = concentración inicial del componente A.

c_i = concentración del componente i.

E_a = energía de activación, Kcal/mol.

HR = humedad relativa.

K = constante de velocidad.

K_b = constante de velocidad correspondiente a la reacción $C \rightarrow A$.

K_{eq} = constante de equilibrio.

K_f = constante de velocidad correspondiente a la reacción $A \rightarrow C$.

KP = contenido de proteína cruda, % P/V.

M = contenido de humedad, base seca.

n = orden de la reacción.

N = n^0 de mediciones.

p_A = presión parcial del agua en el alimento.

p_0 = presión parcial del agua pura.

p^0 = presión.

r = coeficiente de correlación.

R = constante universal de los gases, cal/ 0 K mol.

s = desviación estandard.

t = tiempo.

"t" = parámetro de Student.

$t_{\frac{1}{2}}$ = vida media.

T = temperatura.

v = velocidad de la reacción.

V = volumen.

x = grado de reacción.

x_1 = valor de una medición.

\bar{x} = valor promedio de N mediciones.

δ = densidad (gr/cm³).

μ = valor verdadero.

ΔC_A = error absoluto en C_A .

ΔE_A = error absoluto en E_a .

ΔE^0 = variación de energía interna.

ΔG^0 = variación de energía libre.

ΔH^0 = variación de entalpía.

ΔK = error absoluto en K.

Δn = variación del número de moles de la reacción.

ΔS^0 = variación de entropía.

Δt = error absoluto en el tiempo.

ΔT = error absoluto en la temperatura.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abramowitz, A. M. and Stegun, I. A., 1965, "Handbook of mathematical functions".
Dover Publ. Inc., New York.
- A.O.A.C., 1965, "Official methods of analysis", Association of Official and
analytical Chemist, Washington, D. C.
- Betschart, A. A. and Kinsella, J. E., 1973, "Extractability and solubility
of leaf protein concentrate". J. Agric. Food Chem. 21, 60.
- Betschart, A. A., 1974, "Nitrogen solubility of alfalfa protein concentrate
as influenced by various factors". J. Food Sci. 39, 1110.
- Boquet, R., Chirife, J. and Iglesias, H. A., 1977, "A criterium for the
evaluation of significant differences between water sorption
isotherms of a food sample subjected to different treatments".
Lebensm. -Wiss.u- Technol. 10, 246.
- Burwall, A., ASP, N. G., Bosson, A., San Jose, C. and Dahlgvist, A., 1978,
"Storage of lactose-hydrolysed dried milk: effect of water
activity on the protein nutritional value". J. Dairy Sci. 45, 381.
- Coulter, S. T., Jenness, R. and Geddes, W. F., 1951, "Physical and chemical
aspects of the production, storage and utility of dry milk
products". Ad. Food Res. 3, 45.
- Cheftel, J. C., 1977, "Chemical and nutritional modifications of food proteins
due to processing and storage", in "Food Proteins", ed. by J. R.
Whitaker and S. R. Tannenbaum, AVI Pub. Co. Inc., Westport, Conn.,

U.S.A.

- Chio, K. S. and Tappel, A. L., 1969, "Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and amino acids". *Biochemistry* 8 : 2827.
- Chirife, J., Boquet, R. and Iglesias, H. A., 1979, "The mathematical description of water sorption isotherm of foods in the high range of water activity". *Lebensm. Wiss -u. Technol.* 12, 150.
- Chou, D. H. and Morr, C. V., 1979, "Protein-water interactions and functional properties". *J. Am. Oil Chemist's Soc.* 56 : 53 A.
- Chou, H. and Breene, W. M., 1972, "Oxidation decoloration of β -carotene in low-moisture model systems". *J. Food Sci.* 37, 66.
- Eichner, D. and Giner-Doruk, M., 1980, "Formation of browning reaction as affected by water in foods" in "Properties of water related to food quality and stability". Ed. L. B. Rockland and G. F. Stewart. Academic Press. San Francisco.
- Eichner, K. and Karel, M., 1972, "The influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model system under various conditions". *J. Agric. Food Chem.* 20, 218.
- Fennema, O., 1977, "Water and protein hydration", in, "Food Proteins" ed. by J. R. Whitaker and S. R. Tannenbaum, p. 50. AVI Pub. Co., Inc. Westport, Conn., U.S.A.
- Fukushima, D., 1959, "Studies on soybean proteins. Part I. Water dispersibility of protein of defatted soybean flour as a criterion for degree of

- denaturation". *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 23 : 1, p. 7.
- Fukushima, D., 1969, "Denaturation of soybean proteins by organic solvents". *Cereal Chem.*, 46 : 156.
- Fukushima, D. and Van Buren, J., 1970, "Mechanisms of protein insolubilization during the drying of soy milk. Role of disulfide and hydrophobic bonds". *Cereal Chem.* 47, 597.
- Hagenmaier, R., 1972, "Water binding of some purified oilseed proteins" *J. Food Sci.*, 37, 965.
- Hang, Y. O., Steinkraus, K. and Hackler, L. R., 1970, "Comparative studies on nitrogen solubility of mung beans, pea beans and red kidney beans". *J. Food Sci.*, 37, 318.
- Hendel, C. E., Silveira, V. G. and Harrington, W. O., 1955, "Rates of non-enzymatic browning of white potato during dehydration". *Food Technol.* 9 : 433.
- Hermansson, A. M., 1972, "Functional properties of proteins for foodswelling". *Lebensm. Wiss. u.- Technol.* 5 : 1, 24.
- Hermansson, A. M., 1973, "Functional properties of proteins for foods: solubility". *Biluga Till Malu; University of Lund (Sweden) Bulletin* 2.
- Hermansson, A. M., 1977, "Functional properties of proteins for foods. Water vapour sorption". *J. Food Technol.* 12, 177.
- Hermansson, A. M., 1979, "Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins". *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 56 : 272.

- Hermansson, A. M., Olsson, D. and Holmberg, B., 1971, "Functional properties of proteins for foods. Modification studies on rapeseed protein concentrate". *Lebensm -Wiss. u. Technol.* 7 : 3, 176.
- Hermansson, A. M., Sivik, B. and Skjöldebrand, C., 1971, "Functional properties of proteins for foods. Factors affecting solubility, foaming and swelling of fish protein concentrate". *Lebensm. -Wiss. u. Technol.* 4 : 6, 201.
- Hilditch, T. P. and Williams, P. N., 1964, "The chemical constituents of natural fats". Chapman and Hall, London.
- Hill, C. G. and Grieger-Block, R. A., 1980, "Kinetic data: generation, interpretation and use". *Food Technol.* 34 : 2, p. 56.
- o Hutton, C. W. and Campbell, A. M., 1977, "Functional properties of a soy concentrate and a soy isolate in simple systems. Nitrogen solubility index and water absorption". *J. Food Sci.* 42, 454.
- Iglesias, H. A., 1975, Tesis: Isotermas de sorción de agua en remolacha azucarera y análisis del fenómeno de sorción de agua en alimentos.
- Iglesias, H. A. and Chirife, J., 1976, *J. Food Technol.* 11, 565.
- Iglesias, H. A., Chirife, J. and Boquet, R., 1980, "Prediction of water sorption isotherms of food models from knowledge of components sorption behavior". *J. Food Sci.* 45 ; 450.
- Jensen, A., 1969, "Tocopherol content of seaweed and seaweed meal. III. Influence of processing and storage on the content of tocopherols, carotenoids and ascorbic acid in seaweed meal". *J. Sci. Food Agr.*

20 ; 622.

- Kanner, J. and Karel, M., 1976, "Changes in lysozyme due to reactions with peroxidizing methyl linoleate in a dehydrated model system". J. Agr. Food Chem. 24 : 468.
- Karel, M., 1968, "Unsolved problems in chemical stability of freeze-dried foods" Proceeding of the meat industry Research Conference, University of Chicago, Mar. 21; 22.
- Karel, M., 1973, Symposium: "Protein-lipid interactions". J. Food Sci. 38, 756.
- Karel, M. and Labuza, T. P., 1968, "Non-enzymatic browning in model systems containing sucrose". J. Agric. Food Chem. 16, 717.
- Karel, M. and Labuza, T. P., 1969, "Optimization of protective packaging of space foods . Final Report". U.S.A. F School of Aerospace Medicine. Brooks Air Force Base, Texas. Contract # 41-609-68-C-0015.
- Karel, M. and Nickerson, F. T. R., 1964, "Effects of relative humidity, air and vacuum on browning of dehydrated orange juice". Food Technol. 18 : 104.
- Kilara, A., Humbert, E. S. and Sosulski, F. W., 1972, "Nitrogen extractibility and moisture adsorption characteristics of sunflower seed products". J. Food Sci. 37, 771.
- Kinsella, I. E., 1976, "Functional properties of proteins in foods: a survey". Critical Reviews in Food Sci. and Nutrition. April, p. 219.
- Kirk, J., Dennison, D., Kokoczka, P. and Heldman, D., 1977, "Degradation of

ascorbic acid in a dehydrated food system". J. Food Sci., 42 :
1274.

Kolthoff, I. M., Sandell, E. B., Mecham, E. J. and Bruckenstein, S.,
"Análisis químico cuantitativo". 4^a edición, Ed. Nigar.

Kuntz, I. D., Jr. and Kauzmann, W., 1974, "Hydration of proteins and
polypeptides". Advan, Protein Chem. 28, 239.

Labuza, T. P., 1968, "Sorption phenomena in foods". Food Technol. 22, 263.

Labuza, T. P., 1970, "Properties of water as related to the keeping quality
of foods". Third Int. Congress of Food Sci. and Technol.,
Washington, D. C., Aug. 9-14, 1970, p. 618.

Labuza, T. P., 1972, "Nutrient losses during drying and storage of dehydrated
foods". CRC Critical Rev. Food Technol. 3 (2) : 217.

Labuza, T. P., 1972, "Nutrient losses during drying and storage of dehydrated
foods". CRC Crit. Rev. Food Technol. 25 (10) : 51.

Labuza, T. P., 1980, "The effect of water activity on reaction kinetics
of food deterioration". Food Technol. 34, 36.

Labuza, T. P., Tannenbaum, S. R. and Karel, M., 1970, "Water content and
stability of low-moisture and intermediate-moisture foods". Food
Technol. 24, 543.

Labuza, T. P., Mc Nally, L., Gallagher, D. and Hurtado, F., 1972, "Stability
of intermediate moisture foods". J. Food Sci. 37, 154.

Labuza, T. P., Warren, R. and Warmbier, J., 1977, "The physical aspects with
respect to water and non-enzymatic browning". Adv. Exp. Med.

Biol. 86 B, 379.

- Labuza, T. P. and Saltmarch, M., 1980, "The non-enzymatic browning reaction as affected by water in foods". In "Properties of water related to food quality and stability". Ed. L. B. Rockland and G. F. Stewart. Academic Press, San Francisco.
- Laing, B. M., Schlueter, D. L. and Labuza, T. P., 1978, "Degradation kinetics of ascorbic acid at high temperature and water activity". J. Food Sci. 43 : 1440.
- Lakin, A. L., 1973, IFST Proceeding, 6, 30.
- Lea, C. H., 1951, "Non enzymatic browning XXXVII Text of papers". Second Int. Congress on Canned Foods, Paris, p. 1.
- Lee, Y. C., Kirk, J. R., Bedford, C. L. and Heldman, D. R., 1977, "Kinetics and computer simulation of ascorbic acid stability of tomato juice as functions of temperature, pH, and metal catalyst". J. Food Sci., 42 : 640.
- Legault, R. R., Hendel, C. E., Talburt, W. F. and Pool, M. F., 1951, "Browning of dehydrated sulfited vegetables during storage". Food Technol. 5 : 417.
- Lenz, M. K. and Lund, D. B., 1980, "Experimental procedures for determining destruction kinetics of food components". Food Technol., 34, 51.
- Lorcin, M., Bimbenet, J. J. and Lenges, J., 1968, "Influence of the activity of water on the spoilage of food stuffs". J. Food Technol. 3 : 131.
- Lyons, M. J. and Lippert, L. F., 1966, "Characterization of fatty acids from

- root and shoot lipids of capsicum species". *Lipids*, 1 : 136.
- Mc Kenzie, A. Pq. and Luyet, B. J., 1967, *Criobiology* 3, 341.
- Mc Laren, A. D. and Rowen, I. W., 1952, "Sorption of water vapor by proteins and polymers : a review". *J. of Polymer Sci.* VII : 289.
- Mattil, K. F., 1971, "The functional requirements of Proteins for Foods". *J. Am. Di Chem. Soc.* 48, 477.
- Mizrahi, S., Labuza, T. P. and Karel, M., 1970 a, "Feasibility of accelerated test for browning in dehydrated cabbage". *J. Food Sci.* 35 : 804.
- O' Brien, F. E. M., 1948, *J. Scientific Instrum.* 25, 73.
- Pence, J. W., Mohammad, A. and Mecham, D. K., 1953, "Heat denaturation of gluten". *Cereal Chem.* 30 : 115.
- Peri, C., 1981, "Ruolo e proprietà funzionali della proteine nelle formulazioni alimentari". In "Proprietá funzionali delle proteine" Progetto "Ricerca di nuove fonti proteche e di nuove formulazioni alimentari". Consiglio Nazionale della Ricerche. Italia.
- Quaglia, G. B., Alessandrini, A. e Riccardi, A., 1981, "Solubilitá". In "Proprietá funzionali delle proteine". Progetto "Ricerca di nuove fonti proteche e di nuove formulazioni alimentari". Consiglio Nazionale delle Ricerche. Italia.
- Quast, D. G. and Karel, M., 1972, "Effects of environmental factors on the oxidation of potato chips". *J. Food Sci.* 37 : 584.
- Rasekh, J. G., Stillings, B. R. and Dubrow, D. L., 1971, *J. Food Sci.* 36, 705.
- Resnik, S. and Chirife, J., 1979, "Effect of moisture content and temperature

- on some aspects of non-enzymatic browning in dehydrated apple".
J. Food Sci., 44 : 601.
- Richardson, G. M. and Malthus, R. S., 1955, J. Appl. Chem. 5, 557.
- Riemer, J. and Karel, M., 1978, "Shelf-life studies of vitamin C during food storage. Prediction of L-ascorbic acid retention in dehydrated tomato juice". J. Food Proc. Preserv. 1 : 293.
- Rockland, L. B., 1960, Anal. Chem. 32, 1375.
- Romo, C. R. and Bartholomai, G. B., 1978, "Functional properties of protein isolate from the bean Phaseolus vulgaris". Lebensm. -Wiss. u.- Technol. 11, 35.
- Romo, C. R. and Rolfe, E. J., 1974, Proc. 4th Int. Congress of Food Sci. and Technol., Madrid, 5 : 172.
- Romo, C. R., Lakin, A. L. and Rolfe, E. J., 1975, "Properties of protein isolates prepared from ground seeds. I. Development and evaluation of a dye-binding procedure for the measurement of protein solubility . J. Food Technol. 10, 541.
- Ross, A. F., 1948, "Deterioration of processed potatoes". Adv. Food Res. 1 : 257.
- Roubal, W. T. and Tappel, A. L., 1966, "Polymerization of proteins induced by free-radical lipid peroxidation". Arch. Biochem. Biophys. 113 : 150.
- Saguy, I., Kopelman, I. J. and Mizrahi, S., 1978 b, "Thermal kinetic degradation of red beet pigments (betanine and betalamic acid)".

- J. Agr. Food Chem. 26 : 360.
- Saguy, I., Kopelman, I. J. and Mizrahi, S., 1979 a, "Simulation of ascorbic acid stability during heat processing and concentration of grapefruit juice". J. Food Proc. Eng. 2 : 213.
- Saguy, I., Kopelman, I. J. and Mizrahi, S., 1979 b, "Extent of non enzymatic browning in grapefruit juice during thermal and concentration processes: kinetics and prediction". J. Food Preserv. 2 : 175.
- Saguy, I., Kopelman, I. J. and Mizrahi, S., 1980, "Computer-aided prediction of beet pigment (betanine and vulgaxanthin-I) retention during air-drying". J. Food Sci. 45, 230.
- Saravacos, G. D., 1967, J. Food Sci. 32, 81.
- Schaich, K. M., 1974, "Free radical formation in proteins exposed to peroxidizing lipids". Sc. D. Thesis, M. I. T. Department of nutrition and food Sci., Cambridge, Mass, U.S.A.
- Smith, S. E., 1947, "The sorption of water vapour by high polymers". J. Amer. Chem. Soc., 69 : 646.
- Stumbo, C. R., 1973, "Thermobacteriology in food processing". 2nd ed. Academic Press, New York.
- Takahashi, I., 1970, "Reaction products of hystidine with autoxidized methyl linoleate". S. M. Thesis, M. I. T., Cambridge, Mass., U.S.A.
- Takahashi, K., Shirai, K., Wada, K. and Kawamura, A., 1980, "Thermal behaviors of proteins under the condition of relatively low moisture content". Nippon Nogeikagaku Kaishi, 54 : 357.

- Ter-Fung Tsao, Frey, A. L. and Harper, J. M., 1978, "Available lysine in heated fortified rice meal". J. Food Sci. 43 : 1106.
- Vojnovich, C. and Pfeifer, V. P., 1970, "Stability of ascorbic acid in blends of wheat flour, CSM and infant cereals". Cereal Sci. Today, 15 : 6377.
- Weninger, L. A. Jr., 1972, "Mathematical model predicts stability of ascorbic acid in food products". Food Technol. 26 (6) : 42.
- Watanabe, K., Sato, Y. and Kato, Y., 1980, "Chemical and conformational changes of ovalbumin due to the Maillard reaction". J. Food Processing and Preserv., 3 : 263.
- Whistler, R. L. and Wolfrom, M. L., 1962, "Methods in carbohydrate chemistry", Vol. I. p. 388. Academic Press. N. Y.
- Wolf, J. C., Thompson, D. R. and Reineccius, G. A. 1977, "Initial losses of available lysine in model systems". J. Food Sci. 42 : 6, 1540.
- Wolf, J. C., Thompson, D. R., Warthesen, J. J. and Reineccius, G. A., 1981, "Relative importance of food composition in free lysine and methionine losses during elevated temperature processing". J. Food Sci. 46 : 1074.
- Wu, Y. V. and Inglett, G. E., 1974, "Denaturation of plant proteins related to functionality and food applications: A review". J. Food Sci. 39, 218.
- Young, I. F., 1967, "Humidity control in the laboratory using salt solutions". J. Appl. Chem. 17, 241.

Zirlin, A. and Karel, M., 1969, "Oxidation effects in a freeze-dried gelatin-methyl linoleate system". J. Food Sci. 34 : 160.