

R: 8081

1/5424

MAR

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Departamento de Nutrición y Bromatología III

(Higiene y Tecnología de los Alimentos)

BIBLIOTECA UCM



5305866543

**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO TERMICO  
EN LA HIDROFOBICIDAD, EN LOS  
GRUPOS -SH, EN LA ANTIGENICIDAD Y  
EN LA CAPACIDAD DE LIGAR GRASA DE  
LAS PROTEINAS CARNICAS**



María Luisa Marín Martínez

Madrid, 1993



La Tesis Doctoral de D. MARIA LUISA MARIN MARTINEZ

.....  
Titulada EFECTOS DEL TRATAMIENTO TERMICO EN LA HIDROFOBICIDAD,  
EN LOS GRUPOS -SH, EN LA ANTIGENICIDAD Y EN LA CAPA  
.....CIDAD DE LIGAR.GRASA DE LAS PROTEINAS.CARNICAS.

Director Dr. D. BERNABE SANZ PEREZ y Dña. CARMEN CASAS VALENCIA

fue leida en la Facultad de .. VETERINARIA .....

de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, el día .....

de ..... de 19 ....., ante el tribunal

constituido por los siguientes Profesores:

PRESIDENTE .. JUAN ANTONIO ORDOÑEZ PEREDA .....

YOCAL .. PASCUAL LOPEZ LORENZO .....

YOCAL .. MIGUEL ANGEL ASENSIO PEPEZ .....

YOCAL .. ARACELI REDONDO CUENCA .....

SECRETARIO .. FERNANDA FERNANDEZ ALVAREZ .....

.....  
habiendo recibido la calificación de .....

..... *Apt. cum laude. p. S. unanimidad*

Madrid, a 2 de julio de 1972

EL SECRETARIO DEL TRIBUNAL.

*María Fernanda Tenorio*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA III  
(HIGIENE Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS)

**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO TERMICO  
EN LA HIDROFOBICIDAD, EN LOS GRUPOS -SH, EN LA  
ANTIGENICIDAD Y EN LA CAPACIDAD DE LIGAR GRASA  
DE LAS PROTEINAS CARNICAS**

Memoria que para optar al grado de  
Doctor en Veterinaria presenta la  
Licenciada Marta Luisa Martín Martínez.

Madrid, Mayo de 1992



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Dpto. de Nutrición y Bromatología III

(Higiene y Tecnología de los Alimentos)

Ciudad Universitaria

28040 Madrid

CARMEN CASAS VALENCIA, PROFESORA TITULAR DE NUTRICION  
Y BROMATOLOGIA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada "Efectos del tratamiento térmico en la hidrofobicidad, en los grupos -SH, en la antigenicidad y en la capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas", de la que es autora Dña. María Luisa Marín Martínez, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos) bajo la dirección conjunta del catedrático Dr. D. Bernabé Sanz Pérez y de la profesora titular que suscribe y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Veterinaria.

Madrid, 15 de Mayo de 1992

Fdo.: Bernabé Sanz Pérez

Fdo.: Carmen Casas Valencia

*Algunos dicen hace mucho tiempo que  
para ser feliz en el trabajo propio  
hay que ser capaz de realizarlo,  
para dar la satisfacción de esto ni  
faltarle a nada, y no trabajar en  
demasia.*

**Albert L. Lehninger**

*A todos las personas encantadoras  
que hacen que merezca la pena vivir  
cada día*

## AGRADECIMIENTOS

Quiera manifestar mi más sincero agradecimiento a todas las personas cuya colaboración ha hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

Al profesor D. Bernabé Sana Pérez por la codirección de este trabajo y la minuciosa labor de corrección llevada a cabo en esta memoria, así como por las constantes muestras de confianza, ánimo, comprensión y cariño.

A la profesora Carmen Casas Valencia, quién dirigió mis primeros pasos en el campo de la investigación, por la codirección de esta tesis y por ser una fuente inagotable de estímulo, alegría y vitalidad contagiosas que ayudan a superar los momentos más difíciles.

De manera muy especial a los profesores Juan Antonio Ordóñez Pereda, José Tormo Iguacel e Isabel Casero Rodríguez por su cariño y acertados consejos y orientaciones. Al profesor Gonzalo García de Fernando Minguillón por su valiosa colaboración en mi "lucha" contra el ordenador.

A todos los restantes miembros del Departamento de Nutrición y Bromatología III, por su desinteresada ayuda y su apoyo continuo y, particularmente a los doctorandos, por los inevitables momentos que juntos compartimos cada día. A Isa, por su amistad y su infinita paciencia en "mis terribles otoños" ("You've got a friend").

Al personal facultativo y auxiliar del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital "Gómez Ulla" por su asistencia en el proceso de inmunización de los conejos.

Para Fátima, Olga, Lina, Susana y Sonia no existen palabras suficientes que expresen los lazos que nos unen y el estímulo que supone vuestro cariño y saber que estais a mi lado. Espero que el tiempo y el espacio nunca pueda separarnos.

A Carlos, por su afecto, su apoyo y sus detalles.

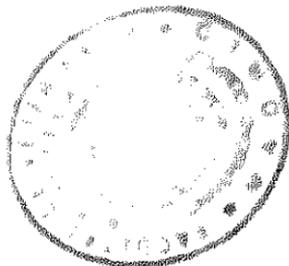
A Teo, por amenizarme tantas horas de trabajo con su voz y su música.

A Juan, por su simpatía y su colaboración en fotocopiar tanta ciencia durante estos años.

A todas las personas y amigos que han contribuido de alguna manera a superar mis tiempos más difíciles, en especial, a la Dra. Moreno por su confianza y por ayudarme a salir de la oscuridad.

A mis hermanos, Mónica y Fernando, por su ánimo y su cariño y muy especialmente a mis padres, por su paciencia, su amor y por habernos dedicado su vida.

Muchas gracias a todos.

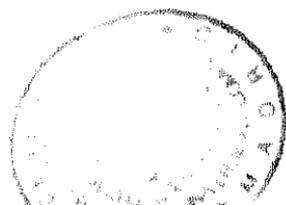


## **INDICE**

<b>I.- INTRODUCCION</b>	1
<b>I.1.- PROTEINAS CARNICAS</b>	2
<b>I.2.- PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEINAS</b>	3
<b>I.3.- FUNCIONALIDAD DE LAS PROTEINAS CARNICAS</b>	6
I.3.1.- CAPACIDAD DE RETENCION DE AGUA	6
I.3.2.- CAPACIDAD GELIFICANTE	7
I.3.3.- CAPACIDAD EMULSIONANTE Y CAPACIDAD DE LIGAR GRASA	10
I.3.3.1.- Mecanismo de la adsorción de grasa	13
I.3.3.2.- Controversia <i>meat emulsion / meat batter</i>	14
I.3.3.3.- Factores que influyen en la capacidad emulsionante y en el poder ligante de grasa de las proteínas	18
A.- Solubilidad	18
B.- Concentración	19
C.- pH	20
D.- Fuerza iónica	21
E.- Picado	22
F.- Grasa	22
G.-Temperatura	23
<b>I.4.- RELACION ESTRUCTURA-FUNCIONALIDAD DE LA PROTEINA</b>	23
<b>I.5.- DESNATURALIZACION, ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD       PROTEICA</b>	28

I 5 1 - Parámetros físico-químicos utilizados para predecir la funcionalidad de las proteínas	31
I 5 1 1 - Hidrofobicidad	32
I 5 1 2 - Grupos sulfhidrilo (-SH)	36
I 5 1 3 - Amigenicidad	39
<b>II - OBJETIVOS</b>	<b>44</b>
<b>III - MATERIALES Y METODOS</b>	<b>47</b>
<b>III 1 - MATERIAL GENERAL</b>	<b>48</b>
III 1 1 - MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO	48
III 1 2 - MATERIAL BIOLÓGICO	50
III 1 2 1 - Origen de las muestras	50
III 1 2 2 - Obtención de los extractos	50
III 1 3 - REACTIVOS	51
<b>III 2 - METODOS</b>	<b>51</b>
III 2 1 - PREPARACION DE LOS EXTRACTOS CARNICOS (Proteínas cárnicas hidrosalinas-solubles o PCHSS)	51
III 2 2 - DETERMINACION DE LA PROTEINA	54
III 2 2 1 - Técnica de Folin-Ciocalteu, según Lowry y col (1951)	54
III 2 2 2 - Método del biuret	57
III 2 2 3 - Técnica espectrofotométrica de Layne (1957)	58

III.2.3. TRATAMIENTO TERMICO DE LOS EXTRACTOS CARNICOS	60
III.2.4. TECNICAS INMUNOLOGICAS	61
III.2.4.1.- Extractos antigénicos	61
III.2.4.2.- Obtención de los inmunosueros	61
A.- Pauta de inmunización	61
B.- Sangrías parciales	62
C.- Sangría final	62
D.- Obtención y conservación del suero	65
III.2.4.3.- Comprobación del proceso de inmunización	65
A.- Preparación del gel de agarosa	66
B.- Preparación de las placas de inmunodifusión	66
C.- Llenado de las excavaciones e incubación de las placas	67
D.- Lavado y secado de los geles	68
E.- Tinción	68
III.2.4.4.- Técnica inmunoenzimática (ELISA indirecto)	69
A.- Extractos antigénicos	69
B.- Anticuerpos	69
C.- Conjugado	69
D.- Tampones y reactivos	70
E.- Metodología	71
F.- Construcción de la gráfica patrón	73
G.- Determinación del antígeno original detectable	74
III.2.5.- DETERMINACION DE LA HIDROFOBICIDAD PROTEICA	75



III 2.5.1 - Condiciones de trabajo	75
A - Componentes del ensayo	75
A.1 - Reactivos	75
A.2 - Extractos cárnicos	76
B - Condiciones de la prueba	76
III 2.5.2 - Metodología	77
III 2.5.3 - Determinación de las concentraciones exactas	78
III 2.5.4 - Determinación del número de sitios de fijación del ligando por unidad de proteína	78
III 2.6 - DETERMINACION DE GRUPOS SULFHILO	80
III 2.6.1 - Trazadores y reactivos	81
III 2.6.2 - Procedimiento	81
III 2.7 - DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE LIGAR GRASA	82
III 2.7.1 - Reactivos	83
III 2.7.2 - Construcción de la curva patrón	83
III 2.7.3 - Metodología	85
III 3 - ANALISIS ESTADISTICO	87
IV - RESULTADOS Y DISCUSION	92
IV 1 - EXTRACCION DE LAS PROTEINAS HIDRO-SALINO-SOLUBLES DE LA CARNE	93
IV 2 - HIDROFILICIDAD DE LAS PROTEINAS CARNICAS HIDRO-SALINO-SOLUBLES	96

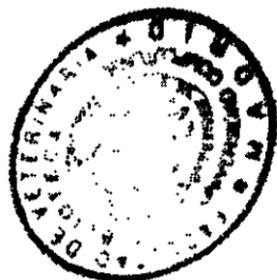
IV.2.1 - Hidrofobicidad aromática y alifática	97
IV.2.2 - Valoración de la hidrofobicidad	98
IV.2.3 - Determinación de la hidrofobicidad aromática (Número de sitios de fijación del ANS por unidad de proteína)	98
IV.2.4 - Determinación de la hidrofobicidad alifática (Número de sitios de fijación del RET por unidad de proteína)	105
IV.2.5 - Tratamiento térmico e hidrofobicidad proteica	105
IV.2.6 - Relación entre porcentaje de aumento de la hidrofobicidad proteica y tratamiento térmico aplicado	120
IV.3 - DETERMINACION DEL CONTENIDO DE GRUPOS SULFHIDRIL.O (-SH) DE LAS PROTEINAS CARNICAS HIDRO-SALINO-SOLU- BLES	125
IV.3.1 - Variación del contenido de grupos sulfhidrilo de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles según el tratamiento térmico aplicado	126
IV.4 - DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE LIGAR GRASA DE LAS PROTEINAS CARNICAS HIDRO-SALINO-SOLUBLES	131
IV.4.1 - Variación de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles según el tratamiento térmico aplicado	133

IV 4 2	Relación entre propiedades físico-químicas (hidrofobicidad, grupos -SH) y propiedad funcional (capacidad de ligar grasa) de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles	137
IV 5	PREDICCIÓN DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO TÉRMICO EN ALGUNAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS CÁRNICAS HIDRO-SALINO-SOLUBLES EN FUNCIÓN DE LA VARIACIÓN DE LA ANTIGENICIDAD	143
IV 5 1	Audiencia por inmunodifusión en gels de agarosa, de las inmunoserones obtenidos al inocular en conejos los extractos antigénicos PCHES	145
IV 5 2	Condiciones de aplicación de la técnica del ELISA indirecto	147
	A. Determinación de las concentraciones óptimas de conjugado y anticuerpos a utilizar en las pruebas	147
	B. Controles	148
	C. Variación de la concentración de antígeno original detectable según el tratamiento térmico aplicado	151
IV 5 3	Predicción del efecto del tratamiento térmico en la hidrofobicidad y en el contenido de grupos -SH de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles, en función de la variación de la antigenicidad	162
IV 5 4	Predicción del efecto del tratamiento térmico en la capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles	166

INDICE

IV.6- CONSIDERACIONES FINALES	174
V.- CONCLUSIONES	178
VI.- BIBLIOGRAFIA	181

## I. INTRODUCCION



## II.- PROTEINAS CARNICAS

Las proteínas son los principales componentes estructurales y funcionales de los productos cárnicos y las que determinan, en última instancia, su manipulación, su textura y su apariencia característica (Hermanson y col., 1986).

Atendiendo a su solubilidad, las proteínas cárnicas se clasifican en tres grupos: miofibrilares, sarcoplásmicas y del estroma. Las proteínas miofibrilares constituyen del 50 al 55% de las proteínas totales del músculo esquelético, las sarcoplásmicas del 30 al 35% y las del estroma del 10 al 15%. Las proteínas miofibrilares son solubles en soluciones salinas de gran fuerza iónica (0,5 a 0,6), mientras que las sarcoplásmicas lo son en agua y en soluciones salinas diluidas (fuerza iónica  $\leq$  0,1). Las proteínas del estroma constituyen la fracción insoluble que permanece en el músculo después de sometido a extracción con soluciones salinas diluidas y con otras de fuerza iónica grande.

Las proteínas miofibrilares, miosina en el músculo en estado de pre-rigor y actomiosina en el que se encuentra en post-rigor, son los contribuyentes fundamentales de la funcionalidad de los productos cárnicos (Smath, 1988a). Las proteínas sarcoplásmicas y del estroma también influyen en la funcionalidad pero por un mecanismo diferente del que llevan a cabo las proteínas miofibrilares (Asghar y Henrickson, 1982; Sakonji y col., 1984; Gallet, 1987a, 1987b).

## 1.2.- PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEINAS

Las proteínas son un grupo importante de macromoléculas que desarrollan una gran variedad de funciones fisiológicas en el organismo vivo (hormonas, enzimas, etc.). Sin embargo, como componentes esenciales de los alimentos, las proteínas realizan una función *primordialmente nutritiva y constituyen uno de los productos responsables de las características deseables de los alimentos*. Los alimentos, hasta que se consumen, se someten a diversos procesos que les ocasionan transformaciones distintas; en este sentido, las propiedades organolépticas o sensoriales tienen mayor relevancia que el valor nutritivo, ya que un alimento que no fuera aceptado por el consumidor *no significaría nada en el mercado, por muy nutritivo que fuera*. La mayoría de las propiedades funcionales influyen en las características sensoriales de los alimentos, pero también ejercen un papel decisivo en el comportamiento físico de los ingredientes alimenticios durante su preparación, transformación y almacenamiento (Cheftel y col., 1989).

Los factores que afectan a la funcionalidad de las proteínas son muy diversos, los más importantes son su naturaleza química y el grado de alteración de la proteína, su método y condiciones de aislamiento, las modificaciones que sufren durante el procesado y las condiciones del medio o entorno como pH, temperatura y fuerza iónica (Kinsella, 1982).

Para definir el término "propiedades funcionales" se han empleado criterios diferentes. Kinsella (1976) las define como las

propiedades que indican alguna característica físico-química que afecta al procesamiento y comportamiento de las proteínas en los sistemas alimenticios. Pour-El (1981) define la "funcionalidad aplicada a las proteínas" como toda propiedad no nutricional que condiciona su utilidad en un alimento. Estas propiedades confieren a los componentes alimenticios la capacidad de interactuar unos con otros y de cambiar sus características durante el procesamiento (Cheftel y col., 1989).

Las propiedades funcionales se clasifican siguiendo diversos criterios. Kinsella (1982) las agrupó, en función de sus aplicaciones alimentarias, como sigue:

- Organolépticas: color, olor, etc.
- Hidratantes: solubilidad, dispersabilidad, etc.
- Superficiales: capacidad emulsionante y espumante, etc.
- Estructurales: elasticidad, cohesividad, etc.
- Reológicas: viscosidad, gelificación, etc.
- Enzimáticas: coagulación.

En la actualidad las actividades enzimáticas se consideran funcionales ya que las enzimas pueden utilizarse para alterar las características físicas y químicas de los componentes alimenticios (Kinsella, 1982).

Morrissey y col (1987) clasificaron así las propiedades funcionales:



## INTRODUCCION

- Hidratantes: capacidad de retención de agua, viscosidad, gelificación, solubilidad.
- Estructurales: cohesión-adhesión, elasticidad.
- Ligantes: de lípidos, de aromas y sabores.
- Otras: antioxidantes.

Actualmente, las propiedades funcionales se clasifican atendiendo a la interacción prioritaria responsable de cada una de ellas (Cheftel y col., 1989):

- *Propiedades de hidratación (dependientes de la interacción proteína-agua): absorción y retención de agua, hinchamiento, solubilidad, dispersabilidad, viscosidad.*
- *Propiedades dependientes de la interacción proteína-proteína: precipitación, gelificación.*
- *Propiedades superficiales: capacidad emulsionante y capacidad espumante.*

Estos grupos no son absolutamente independientes y muchas propiedades funcionales presentan varios tipos de interacción; por ejemplo, la gelificación no solamente implica interacciones proteína-proteína, sino también proteína-agua. Asimismo, viscosidad y solubilidad dependen de las interacciones proteína-agua y proteína-proteína.

### 1.3.- FUNCIONALIDAD DE LAS PROTEINAS CARNICAS

Las proteínas musculares participan en tres tipos de interacciones: proteína-agua, proteína-lípido y proteína-proteína (Acton y Dick, 1984). En la fabricación de productos cárnicos, estas interacciones se reflejan en sus propiedades funcionales de capacidad de retención de agua (interacción proteína-agua), capacidad emulsionante y de ligar grasa (interacción proteína-lípido) y capacidad gelificante (interacción proteína-proteína) (Schmidt y col., 1981; Whiting, 1988).

La elaboración de productos cárnicos depende de la formación de una matriz proteica funcional en el seno del producto. El mecanismo responsable es la extracción de las proteínas miofibrilares que constituyen un cemento de unión que facilita la absorción del agua y la estabilidad de la grasa que queda retenida en dicha matriz. Finalmente este sistema se estabiliza mediante la gelificación de la matriz proteica como consecuencia del tratamiento térmico.

#### 1.3.1.- CAPACIDAD DE RETENCION DE AGUA

El contenido de agua del medio y la capacidad de las proteínas de interactuar con ella son en gran medida los principales responsables de muchas propiedades funcionales ya que las proteínas, en general, no son funcionales en ausencia de fase acuosa. La conformación de las moléculas proteicas en solución se debe, fundamentalmente, a su interacción con el agua que, a su vez, depende de los grupos polares de las proteínas y de la cantidad y actividad de agua.

Existen dos conceptos importantes relacionados con esta propiedad funcional: *capacidad de absorción de agua*, que se define como el agua absorbida por polvos proteicos a una determinada humedad relativa y *capacidad de ligar agua*, que se refiere al agua retenida por una proteína después de filtrarla y aplicarle una presión o fuerza centrífuga.

La capacidad de retención de agua varía en función del tipo de proteína, de su concentración, del pH, temperatura, fuerza iónica y de la presencia de otros componentes (carbohidratos, lípidos, sales) que intervienen en las interacciones proteína-agua (Kinsella, 1976; Chou y Morr, 1979).

La capacidad de retención de agua de las proteínas cárnicas y las propiedades funcionales con ella relacionadas, son los principales responsables de la textura y de la jugosidad de la carne y productos cárnicos (Kinsella, 1976). En el caso de los productos cárnicos picados tratados por el calor, son de importancia primordial en relación con la capacidad de retención de agua: el pH, la temperatura, el grado de picado de la carne, el momento en el que se agrega la sal, la concentración salina y la presencia de grasa y de otros componentes.

### 1.3.2.- CAPACIDAD GELIFICANTE

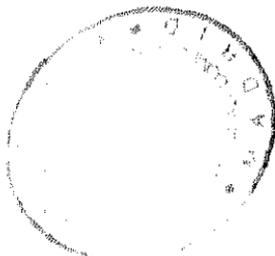
La gelificación mediante el calor y los cambios que se producen en las propiedades viscoelásticas de la matriz proteica están estrechamente relacionados con la textura de los productos cárnicos, así

como con su capacidad de ligar agua y grasa. La gelificación proteica también se utiliza para favorecer la adhesión de las partículas y para estabilizar las emulsiones.

La gelificación consiste en la agregación de moléculas desnaturalizadas para formar una red proteica ordenada. Hermansson (1979) la considera como un estado intermedio entre el de la proteína en solución y el de la proteína precipitada. Clark y Lee-Tuffnel (1986) entienden la gelificación como la conversión, mediante un proceso de agregación, de una solución viscosa de moléculas de proteína en un sólido blando y viscoelástico.

El mecanismo y las interacciones que intervienen en la formación de la red proteica tridimensional característica de los geles no se conoce en todos sus detalles. No obstante, parece ser que la gelificación se desarrolla en dos etapas, una primera de desnaturalización y desdoblamiento de la proteína y otra segunda de agregación de las moléculas, parcialmente desnaturalizadas, hasta la formación de una red proteica ordenada. Esta red se cree que es el resultado del equilibrio entre las interacciones proteína-proteína, proteína-disolvente y las fuerzas de atracción y repulsión entre las cadenas polipeptídicas próximas (Chelfi y col., 1989).

Debido al proceso de desnaturalización ciertos grupos reactivos se hacen accesibles pudiendo establecerse puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, enlaces disulfuro y uniones iónicas o electrostáticas (Poole y Fry, 1987).



Entre los parámetros más importantes que afectan a la gelificación se encuentran: concentración y tipo de proteína, pH, temperatura, fuerza iónica y composición del solvente (Damodaran, 1989).

Con respecto a las proteínas cármicas, la miosina es la proteína especialmente implicada en el proceso de gelificación. Samejima y col. (1981a) concluyeron que la gelificación de la miosina por el calor incluye dos reacciones:

- 1) agregación de la porción globular de su cabeza mediante la formación de enlaces disulfuro.
- 2) constitución de una red por formación de interacciones no covalentes entre las porciones  $\alpha$ -helicoidales de sus colas.

Se ha observado que al mezclar en ciertas proporciones la actina y la miosina se consigue un efecto sinérgico a juzgar por el aumento de la resistencia del gel (Samejima y col., 1980). El efecto es máximo cuando la relación molar actina/miosina es de 1,5:2,0. También se da sinérgismo en las mezclas de miosina y actomiosina (Yasui y col., 1982). En ambos casos, la mejora de la gelificación se debe a la formación de una cantidad de actomiosina que favorece la agregación de la miosina y el entrecruzamiento de las porciones de la cola.

La actina independientemente da lugar a geles con graves problemas de sinéresis. Las troponinas y la tropomiosina no gelifican en las condiciones industriales habituales e incluso interfieren con el papel

de la miosina. Las proteínas sarcoplásmicas para gelificar requieren altas concentraciones dando lugar a geles que se desintegran bajo la acción de pequeñas fuerzas físicas.

### 1.3.3.- CAPACIDAD EMULSIONANTE Y CAPACIDAD DE LIGAR GRASA

La capacidad de las proteínas de formar y estabilizar las emulsiones es una propiedad funcional crítica en muchos productos alimenticios, como los derivados cárnicos, tanto en lo referente a su proceso de fabricación como en lo que concierne a los atributos de calidad del producto final (Kinsella, 1979).

La capacidad de las proteínas de ligar grasa es una propiedad funcional importante porque refuerza la retención del "flavor" (vocablo inglés que engloba el olor, sabor y otras propiedades mecánico-gustativas) y mejora las cualidades organolépticas del producto (Kinsella, 1976). Además, junto a la capacidad de retención de agua influye mucho en la textura y jugosidad del producto (Brown y Toledo, 1975).

Una emulsión es un sistema heterogéneo formado al dispersarse dos líquidos no miscibles, de los que uno constituye la fase continua dispersante en la que se encuentra el otro líquido (fase dispersa o discontinua) en forma de pequeñas gotas dispersas (Morrissey y col., 1987; Chelal y col., 1989). El sistema permanece estable merced a un agente emulsionante o a una combinación emulsionante-estabilizante

(Hermansson, 1986).

La formación de una emulsión supone la creación de una superficie interfacial importante entre las dos fases líquidas no miscibles. Todo líquido en contacto con otro tiende a disminuir al máximo su superficie de contacto, por lo que la creación de una interfase exige un aporte energético considerable que es proporcional a la superficie y tensión entre las fases (Cheftel y col., 1989) y que se suministra gracias a la acción de mezcladoras, homogeneizadores o ultrasonidos.

La capacidad de ligar grasa de las proteínas se refiere a la aptitud que poseen las proteínas de adsorber dicha sustancia. El conocimiento actual del mecanismo de la adsorción de grasa presenta ciertas lagunas, si bien Wang y Kinsella (1976) lo atribuyen a una ligazón física. Por otra parte, Wolf y Cowan (1975) sugieren que la adsorción de grasa constituye otro aspecto de la emulsión, ya que en los productos cárnicos picados la adsorción o ligazón de grasa implica la formación y estabilización de una emulsión.

La mayoría de los métodos disponibles para determinar tales propiedades funcionales son empíricos y sus resultados dependen de las condiciones utilizadas, lo que da lugar, en muchos casos, a interpretaciones confusas.

La capacidad emulsionante se relaciona con el comportamiento de las proteínas en la interfase. Las proteínas se sitúan en la interfase

orientando sus restos hidrófilos hacia la fase acuosa y sus restos hidrófobos hacia la fase grasa, evitando su contacto con el solvente. Este comportamiento de las proteínas depende de interacciones físicas relacionadas con su composición y conformación (Stainby, 1986). Como macromoléculas presentan un gran número de regiones posibles de interacción que requieren una energía de adsorción alta. Asimismo, las moléculas son flexibles, pudiendo adoptar diferentes configuraciones que permiten su desplegamiento y adaptación a la interfase.

Cuando una proteína entra en contacto con una interfase los restos de los aminoácidos no polares se orientan hacia la fase no acuosa, disminuye la energía libre del sistema y el resto de la molécula se adsorbe exponencialmente (Tanford, 1970). Se ha demostrado que la entalpia en esta fase es positiva y, por tanto, la fuerza conductora de la adsorción de la molécula en la interfase corresponde a un incremento de la entropía del sistema. Este incremento de entropía tiene dos componentes: la entropía conformacional de la proteína y la estructura del agua cerca de los grupos hidrófobos. Cuando los grupos hidrófobos se eliminan del interior de la molécula y se sitúan en otro ambiente no polar aumenta la entropía conformacional de la proteína (MacRitchie, 1978). La unión de grupos hidrófobos en la fase grasa cubrirá el material no polar y permitirá la liberación del solvente que es el responsable del incremento de la entropía del sistema.

Las proteínas son estabilizantes mediocres de las emulsiones debido a su naturaleza fundamentalmente hidrófila, lo que hace que la mayor parte de la molécula proteica adsorbida se encuentre en la zona

acuosa de la interfase (Halling, 1981). Las proteínas fibrilares son estabilizantes más efectivos de la emulsión que las globulares debido a su conformación, salvo que las últimas por un por tratamiento previo pudieran desplegarse sin perder solubilidad (Cheftel y col., 1989).

### 1.3.3.1.- Mecanismo de la adsorción de grasa

Los factores que influyen en la interacción proteína-lípido son: la conformación de la proteína, las interacciones proteína-proteína y la ordenación espacial de la fase lipídica a partir de la interacción lípido-lípido (Hutton y Campbell, 1981). Las fuerzas implicadas en las interacciones lípido-proteína son enlaces no covalentes: interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals.

El enlace de hidrógeno tiene una importancia secundaria en el complejo lípido-proteína, si bien influye indirectamente en la interacción hidrofóbica (Karel, 1973) ya que en un medio acuoso, debido a los enlaces de hidrógeno, las interacciones agua-agua son más fuertes que la interacción entre el agua y los grupos no polares y, por tanto, aumentan las interacciones hidrofóbicas entre grupos no polares.

La atracción electrostática se da entre los grupos fosfato de los fosfolípidos cargados negativamente y los grupos proteicos cargados positivamente o entre los grupos de los fosfolípidos positivamente cargados y las cadenas laterales de los aminoácidos cargadas negativamente.

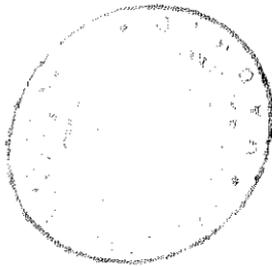
La interacción hidrofóbica juega probablemente el papel más importante en la estabilización de las interacciones entre los lípidos (polares y no polares) y las proteínas (Ryan, 1977).

Las fuerzas de Van der Waals tienen importancia cuando los grupos que interactúan están próximos (Karel, 1973) e intervienen en la atracción entre los grupos no polares de los sistemas en los que la interacción hidrofóbica es improbable por la escasez de agua (Pomeranz, 1973).

Como ocurre con las interacciones proteína-proteína, no se puede atribuir a las interacciones proteína-lípido una clase de fuerza molecular única y específica (Ryan, 1977). Sin embargo, de acuerdo con Wall (1979) los lípidos se unen a las proteínas principalmente asociándose con grupos hidrófobos.

### 1.3.3.2.- Controversia meat emulsion / meat batter

El término "emulsión cárnica" (meat emulsion) se ha utilizado para describir varios sistemas cárnicos picados (Swift y col., 1961; Carpenter y Saffle, 1964; Acton y Saffle, 1972). Hansen (1960) y Saffle (1968) describen la estructura básica de la emulsión cárnica como una mezcla en la cual los constituyentes de la carne, finamente divididos, se dispersan de forma similar a una emulsión de grasa en agua, donde la fase discontinua es la grasa y la fase continua el agua que contiene los componentes proteicos solubilizados. Las proteínas musculares solubles en agua y sal emulsionan los glóbulos grasos formando una matriz



proteica en sus superficies (Hansen, 1960; Swift y col., 1961). Tales proteínas desarrollan su función estabilizante de la emulsión debido a la presencia de grupos reactivos orientados en la interfase grasa/agua (Becher, 1965). Hansen (1960) describió estas proteínas tras su contacto con el glóbulo graso, como denaturalizadas, formando así una membrana relativamente sólida.

Son varios los trabajos que han señalado a la miosina como la principal proteína implicada en recubrir el glóbulo graso (Tsay y col., 1972; Galluzo y Regenstein, 1978). Sin embargo, Gaska y Regenstein (1982) sostienen que las proteínas insolubles en soluciones salinas de elevada concentración juegan un papel importante en la formación de emulsiones. Las propiedades físico-químicas a las que debe la miosina su función como emulsionante son:

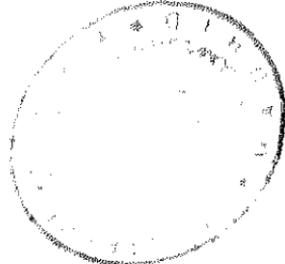
- 1) disponer de una región hidrófoba que se orienta hacia el glóbulo graso,
- 2) contar también con una región hidrófila que se orienta hacia la matriz continua,
- 3) la flexibilidad de la molécula para desplegarse y adsorberse en la interfase (Jones, 1984).

La estabilidad de la emulsión se mantiene gracias a la repulsión electrostática entre las moléculas de miosina con carga neta negativa (Kinsella, 1982).

Varios autores (Lee, 1985; Barbut y Mittal, 1988; Foegeding,

1988b; Hamann, 1988; Regenstein, 1988; Smith, 1988b) han sugerido que los sistemas cárnicos picados no siempre poseen la estructura de una emulsión clásica, esto es, una fase líquida dispersa en otra. Durante el picado las proteínas cubren las partículas sólidas de la grasa y ayudan a su dispersión en la matriz proteica sin que se forme una verdadera emulsión. Para que tuviese lugar la emulsión de la grasa en una mezcla cárnica, debería ser liberada por las células del tejido graso y encontrarse en estado líquido, lo que no ocurre a las temperaturas normalmente utilizadas durante el picado (Brown y Toledo, 1975; Timbergen y Osman, 1979). El examen microscópico de los productos cárnicos tratados por el calor muestra que, bajo condiciones óptimas, la mayoría de las células grasas mantienen su integridad a pesar del intenso picado, después del cual la mayor parte de la grasa se dispersa en la mezcla en forma de células individuales o aglomeradas suspendidas en la matriz cárnica (Oord y Viseer, 1973; Evans y Ranken, 1975a; Timbergen y col., 1977). En consecuencia, Brown y Toledo (1975) proponen el término *MEAT BALLER* (pasta cárnica) en lugar de *meat emulsion* (emulsión cárnica) y Shur (1976) sugiere que el término "capacidad de ligar grasa" es el más adecuado para describir la estabilidad del sistema cárnico picado frente a la separación de la grasa durante el tratamiento térmico. A este respecto, se ha demostrado en ciertos productos cárnicos que el factor determinante de la estabilidad frente al calor son las células grasas íntegras y no la grasa emulsificada (Timbergen y Osman, 1979).

Si bien es cierto que los sistemas cárnicos no poseen todas las propiedades de una emulsión líquido-líquido clásica, cuando se examina



## INTRODUCCION

el producto durante su preparación existen muchas características que lo aproximan a la emulsión, lo que permite a muchos autores utilizar este término. Así, la grasa se dispersa en una fase heterogénea acuosa y durante la fase de picado y homogeneización de los componentes continúa la subdivisión de la grasa en pequeñas partículas. Con el microscopio electrónico se ha observado la existencia de una película proteica interfacial (interfacial protein film) que se deposita alrededor del glóbulo graso (Borchet y col., 1967; Theno y Schmidt, 1978; Jones y Mandingo, 1982; Jones, 1984; Gordon y Barbut, 1990a; 1990b; 1991). Hermansson (1977) indica que cuando se licúa parte de la grasa, durante la última fase de picado, puede ser emulsionada por la proteína muscular. Por tanto, en los productos cárnicos picados, el papel de la emulsión reviste mayor importancia a medida que las células grasas se rompen y la grasa se funde (Girard y col., 1985), mientras que las partículas sólidas de grasa pueden ser estabilizadas por ligazón física en la matriz proteica (Smith, 1988a; 1988b).

Wolf y Cowan (1975) sugieren que en los productos cárnicos picados la adsorción o fijación de la grasa está implicada en la formación y estabilización de las emulsiones. Por tanto, la adsorción de la grasa puede ser simplemente otro aspecto de la emulsión. Asimismo, Hermansson (1986) defiende una teoría intermedia entre la de formación de una película proteica interfacial propia de una emulsión y la de captura física de las gotas lipídicas en la matriz proteica; para este investigador la estructura del producto cárnico dependerá del tipo de grasa y de carne y de las condiciones de procesado. Koolmes y col. (1989) también sostienen que deben tenerse presentes ambas teorías para

explicar el mecanismo de estabilización de los sistemas cárnicos picados.

### 1.3.3.3.- Factores que influyen en la capacidad emulsionante y en el poder ligante de grasa de las proteínas

#### A.- Solubilidad

La solubilidad es una propiedad importante en la formación de emulsiones (Kinsella, 1976; Gillet y col., 1977; Regenstein, 1989). Pearson y col. (1965) indican que sólo la fracción soluble de la proteína puede actuar como emulsionante y Franzen y Kinsella (1976) sugieren que cuando una proteína se va solubilizando forma capas alrededor de las gotas de grasa, facilitando su asociación con la fase acuosa y estabilizando la emulsión frente al tratamiento térmico. Algunos autores consideran que las proteínas sin disolver apenas contribuyen a las emulsiones ya que tienen que disolverse y emigrar a la interfase para que sus propiedades superficiales sean eficaces (Cheftel y col., 1989). De acuerdo con Bull (1972) la actividad de superficie de una proteína es función de la facilidad con que migre, se despliega y se adsorba en la interfase. Por lo tanto, la solubilidad en la fase acuosa se encuentra estrechamente correlacionada con la actividad superficial de las proteínas (Kinsella, 1979). Sin embargo, algunos autores han indicado que las solubilidades altas no se asocian necesariamente con las capacidades emulsionantes máximas (Smith y col., 1973; Aoki y col., 1981). Asimismo, la solubilidad no es el parámetro mejor para predecir las propiedades emulsionantes y varias investigaciones soportan la teoría de que la hidrofobicidad es el parámetro más idóneo para predecir

dichas propiedades (Shimada y Matsushita, 1980b; Li-Chan y col., 1984; 1985; 1987). Li-Chan y col. (1984) indican que cuando la solubilidad de la proteína es alta (>50%) la hidrofobicidad superficial es la principal responsable de la capacidad emulsionante, mientras que a solubilidades menores la cantidad de proteína soluble es el factor más influyente.

Con respecto a la capacidad de ligar grasa son varios los autores que han indicado que existe una correlación negativa con la solubilidad (Torgensen y Toledo, 1977; Voutsinas y Nakai, 1983). Una de las posibles razones del efecto adverso que la solubilidad alta ejerce en la capacidad de ligar grasa de las proteínas es la conformación de las proteínas solubles (principalmente la helicoidal) cuyos sitios de fijación (cadenas laterales hidrófobas) no se encuentran disponibles estéricamente para interactuar con las cadenas hidrocarbonadas del aceite. Por otra parte, la presencia de grupos polares en exceso forma una barrera alrededor de los grupos hidrófobos superficiales de las proteínas, lo que limita el acceso del aceite a los mismos (Voutsinas y Nakai, 1983).

### B.- Concentración

La capacidad emulsionante de las proteínas varía inversamente con su concentración (Swift y col., 1961; Tsai y col., 1972). Este fenómeno se debe posiblemente a que al disminuir la cantidad de proteína aumenta el grado de desdoblamiento de sus polipéptidos, lo que durante la emulsión favorece las interacciones hidrófobas de las cadenas peptídicas con las gotas lipídicas (Kinsella, 1976; Borderías y col.,

1985). Todo ello se traduce en una mayor disponibilidad de las moléculas para actuar como interfase de la emulsión. No obstante, el efecto de la concentración proteica en el poder emulsionante depende del tipo de proteína. En el caso de las proteínas musculares Tsai y col. (1972) observaron que a concentraciones altas tales proteínas presentan capacidades de emulsión semejantes.

Tsutsui y col. (1986) clasificaron a las proteínas en dos grupos de acuerdo con la influencia que su concentración ejerce en la capacidad de ligar grasa. En el primero, donde se incluyen las proteínas cármicas, la capacidad de ligar grasa aumenta linealmente al hacerlo la concentración proteica; en el segundo grupo ( $\beta$ -lactoglobulina, ovoalbúmina), a un incremento inicial de la capacidad de ligar grasa al aumentar la concentración, le sigue una disminución manifiesta.

### C. pH

El pH del medio también afecta a las capacidades emulsionante y de ligar grasa de las proteínas. Cerca del pH que corresponde a su punto isoeléctrico las proteínas presentan una carga neta de cero, por lo que disminuye su aptitud para la formación de emulsiones. Por otra parte, en este estado las proteínas, al no estar cargadas, no contribuyen a la estabilización electrostática de las partículas. Además la proteína adopta una conformación compacta y no tiene la suficiente elasticidad para favorecer la emulsión (Borderías y Montero, 1988; Cheftel y col., 1989). La capacidad de ligar grasa de las proteínas musculares también es menor a pHs cercanos a los del punto isoeléctrico (Li-Chan y col.,

1985). A pHs alejados de los del punto isoeléctrico la molécula está cargada eléctricamente por lo que se favorecen las fuerzas de repulsión electrostática, se evita la coalescencia de las gotas y la emulsión se estabiliza. Esto ocurre con las proteínas miofibrilares, sin embargo, las propiedades óptimas de la gelatina y de las proteínas de la clara de huevo tienen lugar al pH que corresponde a su punto isoeléctrico, porque a este pH se favorecen las interacciones hidrofóbicas, lo que las hace aptas para favorecer la emulsión (Cheftel y col., 1989).

Entre el pH y la concentración salina hay una relación crítica (Swift y col., 1961; Swift y Sulzbacher, 1963). Los aniones favorecen el desdoblamiento de las moléculas, incrementándose así el área efectiva que constituye la membrana de la interfase (Borderías y Montero, 1988). Como el efecto del pH depende de las interacciones electrostáticas, tales efectos deberían ser menos pronunciados al aumentar la fuerza iónica (Halling, 1981).

#### D.- Fuerza iónica

A las concentraciones salinas que se utilizan en los productos cásmicos (entre 0,5 y 1M) se favorece la capacidad emulsionante de las proteínas ya que gracias al efecto salting in las proteínas se solubilizan y aumenta su desdoblamiento y por lo tanto su capacidad de formar la interfase. A concentraciones mayores, las sales compiten por el agua con más efectividad que las proteínas (desalado o salting out) por lo que pierden solubilidad y, en consecuencia, disminuye la capacidad emulsionante (Cheftel y col., 1989).

La capacidad de ligar grasa es más alta a fuerzas iónicas intermedias, disminuyendo a concentraciones mayores (Tsutsui y col., 1986).

#### **E.- Picado**

La estabilidad de los productos cárnicos frente al calor depende, en gran medida, de las condiciones del picado (velocidad, tiempo, temperatura) (Evans y Raken, 1975b).

En los productos cárnicos con grasa de cerdo y vacuno se utilizan temperaturas de 16 a 18°C. A temperaturas mayores de 18°C el sistema pierde rápidamente su capacidad de ligar grasa (Acton y col., 1983) y a 20,5°C comienzan a observarse con cierta frecuencia signos de inestabilidad (Hermansson, 1986).

#### **F.- Grasa**

Plimpton y col. (1972) indican que el tipo de grasa no afecta a la estabilidad de la emulsión cuando este componente se encuentra a baja concentración; sin embargo, a concentraciones altas, las grasas con puntos de fusión altos producen emulsiones más estables y son más fácilmente ligadas por la proteína que aquéllas con puntos de fusión bajos, independientemente de la temperatura que se alcance durante la emulsión (Swift y col., 1968).

## G.- Temperatura

Cuando las proteínas se desnaturalizan por el calor se hacen "superficialmente" más activas (Stainsby, 1986); al desplegarse sus moléculas, los restos hidrófobos quedan expuestos en la superficie y la proteína se torna más anfifílica y capaz de orientarse en la interfase agua-grasa (Morr, 1979). Varios investigadores han demostrado que la desnaturalización limitada, sin acompañamiento de coagulación, aumenta la capacidad emulsionante y el poder de ligar grasa de las proteínas (Kato y col., 1981; Li-Chan y col., 1985). No obstante, el efecto del calentamiento sobre estas propiedades depende, en gran medida, del tipo de proteína (Voutsinas y col., 1983a).

## I.4.- RELACION ESTRUCTURA-FUNCIONALIDAD DE LA PROTEINA

Como nos enseña la Bioquímica, en la estructura de una proteína existen cuatro niveles identificables que se definen como estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. La estructura primaria corresponde a la secuencia aminoacídica; la estructura secundaria se refiere a las conformaciones locales de los segmentos polipeptídicos (hélice- $\alpha$ , hoja plegada- $\beta$  y desorden estadístico o random coil); la estructura terciaria concierne a la organización tridimensional de la cadena polipeptídica y la estructura cuaternaria es el resultado de asociaciones no covalentes de unidades proteicas. Las fuerzas implicadas en mantener la estructura proteica son los enlaces covalentes (enlaces peptídicos y enlaces disulfuro) y las interacciones no covalentes

(interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals y enlaces de hidrógeno). Para que una molécula proteica sea termodinámicamente estable, debe asumir una configuración que conlleve la menor cantidad de energía libre necesaria. Cualquier alteración que provoque incluso una pequeña disminución en la energía libre, afecta profundamente a la estabilidad estructural y consecuentemente a las propiedades funcionales de las proteínas. Para comprender los cambios de estructura y funcionalidad es necesario tener en cuenta la estabilidad termodinámica de las proteínas, la naturaleza de las fuerzas implicadas y su contribución relativa a la estabilidad proteica.

La principal fuerza responsable del plegamiento y mantenimiento de la estructura proteica es la interacción hidrofóbica entre los residuos aminoácídicos no polares (Tanford, 1973). Esta interacción actúa como la fuerza que conduce al plegamiento de la cadena polipeptídica. Durante este proceso, la molécula orienta sus aminoácidos de tal manera que la mayoría de las cadenas laterales apolares están situadas en el interior y los grupos polares están expuestos hacia el exterior.

La secuencia aminoácídica no confiere directamente a la proteína su funcionalidad, sin embargo, en último extremo viene determinada por dicha secuencia, ya que de ella depende la conformación nativa o el estado de plegamiento de la molécula.

Se han desarrollado varios métodos para predecir la estructura secundaria de los polipéptidos a partir de la secuencia aminoácídica

(Anfisen y Scheraga, 1975; Chou y Fasman, 1978). Se basan en el análisis estadístico de la probabilidad de que los aminoácidos se organicen en estructuras helice- $\alpha$ , hoja plegada- $\beta$  o random coil (desorden estadístico) en proteínas cuya estructura cristalográfica se conoce. A partir de estos análisis se han obtenido parámetros estadísticos de probabilidad para un aminoácido determinado; utilizando estos parámetros es posible predecir si un aminoácido va a constituir una u otra estructura. De este modo, a partir de su secuencia aminoacídica, podríamos predecir la estructura secundaria de una proteína aunque no se disponga de su estructura cristalográfica.

No obstante, la estructura terciaria es la verdaderamente importante ya que la organización tridimensional de la proteína le imparte determinadas propiedades físico-químicas y es responsable de las propiedades funcionales. La formación de la estructura tridimensional es el efecto neto de varias interacciones atractivas y repulsivas en el interior de la molécula proteica y de la interacción de la proteína con el solvente. Sin embargo, la interacción hidrofóbica entre los residuos aminoacídicos no polares constituye la principal fuerza responsable del mantenimiento de la estructura proteica (Tanford, 1973).

La funcionalidad proteica constituye la expresión de las propiedades físico-químicas de las proteínas a medida que se modifican por las condiciones del entorno. Estas propiedades físico-químicas derivan de su composición y secuencia aminoacídica, así como de su estructura secundaria, terciaria y cuaternaria (Pour-El, 1981). Las propiedades físico-químicas incluyen carga de superficie, contenido de

grupos sulfhidrilo, hidrofobicidad, peso molecular, estabilidad conformacional y comportamiento asociación-disociación (Kinsella, 1982; Widding y col., 1984). Los factores extrínsecos, como el entorno, las condiciones de procesado y la interacción con otros componentes del alimento alteran las propiedades funcionales de la proteína. Sin embargo, tales alteraciones son simplemente manifestaciones de las alteraciones de las propiedades estructurales de la molécula como consecuencia de factores externos.

Todavía es muy poco lo que se sabe sobre las relaciones fundamentales entre propiedades estructurales de las proteínas de los alimentos y su comportamiento funcional en los sistemas alimentarios. El gran reto para los investigadores de la ciencia de los alimentos es comprender, a nivel fundamental, las bases moleculares que gobiernan la expresión de las propiedades funcionales de las proteínas alimentarias (Kinsella, 1976).

Aunque todas las propiedades estructurales de una proteína determinada actúan simultáneamente para expresar varias propiedades funcionales, ciertas características de la molécula juegan un papel predominante en la expresión de una propiedad funcional concreta (Damodaran, 1989). No obstante, para la determinación precisa de la funcionalidad proteica es preferible un balance óptimo entre varios parámetros físico-químicos que un valor alto de un parámetro considerado individualmente.

Los atributos funcionales de las proteínas alimentarias son manifestaciones de dos importantes propiedades moleculares: las hidrodinámicas y las superficiales. Mientras las propiedades funcionales como viscosidad, gelificación, etc. son manifestaciones de las propiedades hidrodinámicas, las propiedades funcionales como formación de espuma, capacidad emulsionante, capacidad de ligar grasa, etc. son manifestaciones de las propiedades superficiales. Las propiedades hidrodinámicas dependen en gran medida de la forma y tamaño de la molécula, mientras que las propiedades superficiales están más influidas por la composición/distribución aminoacídica y la flexibilidad molecular (Damodaran, 1989).

La mayor dificultad para el estudio de la funcionalidad de las proteínas es el que actualmente no se puede predecir cómo afectará un cambio estructural de la molécula en una determinada propiedad funcional.

Para poder predecir la funcionalidad de las proteínas en los sistemas alimentarios sería imprescindible conocer las propiedades físico-químicas de las moléculas proteicas y las modificaciones que los factores del entorno y las condiciones de procesamiento ejercen en ellas. Para ello es necesario utilizar sistemas experimentales modelo en los que pueda determinarse objetivamente el comportamiento de las proteínas. Posteriormente, los análisis estadísticos de los resultados obtenidos, realizados sistemáticamente, permitirían predecir el comportamiento de las proteínas bajo diferentes condiciones.

## I.5.- DESNATURALIZACION, ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD PROTEICA

Con la esperanza de predecir o modificar el comportamiento de las proteínas, sin la necesidad de realizar muchas pruebas de laboratorio que exigirían un alto coste y un gran consumo de tiempo, varios investigadores han intentado relacionar las alteraciones que se producen en la estructura molecular (a consecuencia de agentes desnaturizantes), con los efectos que dichas alteraciones conllevan en la funcionalidad (Nakai, 1983; Voutsinas y col., 1983a; 1983b; Nakai y col., 1986; Li-Chan y col., 1987)

El tratamiento térmico constituye una etapa primordial en la manufactura de ciertos productos cárnicos, siendo la desnaturización proteica el proceso más importante inducido por el calor en un sistema cárnico, lo que se traduce normalmente en modificaciones estructurales y, en consecuencia, en alteraciones de sus propiedades funcionales (Voutsinas y col., 1983a; Aoki y col., 1981).

El estudio de los efectos de la desnaturización total o parcial en la funcionalidad de las proteínas tiene gran importancia para sus aplicaciones alimentarias y es de gran utilidad en el conocimiento de las condiciones que rigen la labilidad y estabilidad de las proteínas alimentarias.

El término "desnaturización" adquiere un significado diferente según los investigadores que lo utilizan. Así, biólogos y químicos

consideran este fenómeno como "algo que tiene que evitarse" debido a que origina una alteración de las propiedades físico-químicas, particularmente pérdida de la solubilidad, considerada como propiedad crítica que gobierna el comportamiento funcional de las proteínas alimentarias. Sin embargo, los tecnólogos de los alimentos admiten la desnaturalización como una etapa integrante del proceso de preparación de algunos alimentos, entre ellos muchos productos cárnicos, e incluso algunos investigadores han sugerido que una cierta desnaturalización mejora la funcionalidad, señalando que una solubilidad alta no es el único criterio que dicta la funcionalidad proteica (Li-Chan y col., 1984; 1985; Kato y col., 1989; 1990a; 1990b; Parris y col., 1991).

La desnaturalización puede ser reversible o irreversible. La desnaturalización irreversible se debe a las asociaciones entre las moléculas desnaturalizadas, alteraciones en el repliegamiento y modificaciones de los aminoácidos (Ahern y Klibanor, 1985). En el caso de las proteínas alimentarias la desnaturalización se considera generalmente irreversible (Kinsella, 1976).

Los aspectos cinéticos y termodinámicos de la desnaturalización proteica han constituido un área de investigación activa; entre las revisiones más importantes a este respecto se encuentran las de Kauzmann (1959), Tanford (1968; 1970), Privalov (1979; 1982) y Kilara y Sharkasi (1986).

Siempre ha existido una cierta controversia en torno a la definición de desnaturalización. Kauzmann (1959) define la desnatura-

lización como un proceso (o secuencia de procesos) en el que se altera la disposición espacial de las cadenas polipeptídicas que constituyen las moléculas proteicas, que pasan de la estructura típica de la proteína nativa a una disposición más desordenada. Esta definición sugiere que la desnaturalización no es un proceso de "todo o nada", sino un proceso continuo en el que distintas áreas de la molécula de proteína cambian a velocidades diferentes (Paul y Palmer, 1972). La desnaturalización es, por tanto, un proceso "cooperativo" extremadamente complejo (determinados enlaces sólo pueden romperse después de haberse roto otros) y puede considerarse como un fenómeno con numerosos pasos intermedios (frecuentemente efímeros) entre el estado nativo y el estado totalmente desnaturalizado. Estos "microestados" estructurales intermedios corresponden a las diversas fases de destrucción de la conformación proteica y, en medio acuoso, a las distintas distribuciones de las moléculas de agua en las proteínas (Cheftel y col., 1989). Tanford (1968, 1970) puntualizó la definición de Kauzmann (1959) señalando que no debe existir una alteración de la estructura primaria. La desnaturalización se limitaría, según este investigador, a un proceso continuo de cambios estructurales de la proteína nativa que implican a las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria; en estos cambios, las alteraciones de los enlaces hidrógeno, de las interacciones hidrofóbicas y de los enlaces iónicos ocurren durante la transición al estado de desnaturalización (Anglemier y Montgomery, 1976). En definitiva, el proceso de desnaturalización implica una alteración de la estructura ordenada de la proteína y una modificación de su conformación (a nivel de estructuras secundaria, terciaria o cuaternaria), que no va acompañada de la ruptura de los enlaces peptídicos implicados en la

estructura primaria (Cheftel y col., 1989). Este cambio de conformación proteica puede representarse como una transición desde una estructura nativa (plegada) a una estructura desnaturalizada (desplegada, desordenada) (Foegeding, 1988a). Sin embargo, un aumento en el nivel de estructura también debe considerarse como una forma de desnaturalización. Algunas proteínas ya están en su forma natural desplegadas (monómeros de algunas caseínas) lo que explica su estabilidad frente a determinados agentes desnaturalizantes como el calor (Cheftel y col., 1989).

#### **1.5.1.- Parámetros físico-químicos utilizados para predecir la funcionalidad de las proteínas**

Dada la relación estructura-función de las proteínas alimentarias, diversos investigadores (Kato y col., 1981; Voutsinas y col., 1983a; 1983b; Li-Chan y col., 1984, 1985) han utilizado las alteraciones que se producen en las propiedades físico-químicas de estas moléculas a consecuencia de distintos tratamientos desnaturalizantes (calor, etc) para pronosticar las variaciones de funcionalidad proteica. La introducción de parámetros físico-químicos, como la hidrofobicidad y grupos -SH, en las ecuaciones de predicción de las propiedades funcionales de las proteínas mejora su precisión, como ya han demostrado varios autores en distintas proteínas (Voutsinas y col., 1983b; Hayakawa y Nakai, 1985b; Li-Chan y col., 1985; 1987; Wagner y Afion, 1990).

### 1.5.1.1- Hidrofobicidad

Numerosos investigadores han resaltado la importancia de considerar la hidrofobicidad, conjuntamente con otros parámetros físico-químicos, para explicar ciertas propiedades funcionales de las proteínas: capacidad emulsionante y de ligar grasa, capacidad espumante, capacidad gelificante, etc. La determinación de la hidrofobicidad se convierte así en una etapa importante del pronóstico de la funcionalidad proteica (Nakai, 1983; Hayakawa y Nakai, 1985a; 1985b; Nakai y col., 1986; Li-Chan y col., 1987; Wagner y Añón, 1990).

Los primeros estudios concernientes a la hidrofobicidad proteica se refieren a la *hidrofobicidad total* calculada como la suma de las hidrofobicidades de las cadenas laterales de aminoácidos (Tanford, 1962; Bogelov, 1967). Sin embargo, estos valores raramente presentaban correlaciones significativas con las propiedades funcionales de las proteínas, ya que determinaban la hidrofobicidad total y no la de los grupos hidrófobos que alcanzan realmente la superficie proteica, que son los verdaderamente implicados en la funcionalidad de la proteína.

Durante el plegamiento de la proteína los residuos no polares ocupan el interior de la misma para minimizar el contacto con el agua, mientras los residuos polares ocupan la superficie proteica e interaccionan favorablemente con el agua (Anfisen y Scheraga, 1975). No obstante, el exceso de residuos no polares aparece en la superficie proteica en forma de "parches hidrofóbicos" (Schulze y Schirmer, 1979; Bonjido, 1983). Esta *hidrofobicidad de superficie o efectiva*

tiene un importante papel en muchas propiedades funcionales (Kella y col., 1986) ya que los grupos hidrófobos que se encuentran en la superficie de la molécula intervienen en fenómenos de tensión interfacial que explican muchas propiedades funcionales de las proteínas (Keshavarz y Nakai, 1979). La hidrofobicidad de superficie o efectiva constituye una medida cuantitativa de los grupos hidrófobos que se fijan al material lipídico.

Kato y Nakai (1980) demostraron la existencia, en diversas proteínas alimentarias, de correlaciones altamente significativas entre capacidad emulsionante, tensión interfacial e hidrofobicidad de superficie. Sus resultados indican que cuanto más hidrófoba es una proteína, menor es su tensión interfacial y mayor su actividad emulsionante; es decir, las proteínas más hidrófobas orientan más fácilmente sus grupos no polares hacia la fase grasa interaccionando más rápidamente con ella. Nakai y col., (1980) también encontraron buenas correlaciones entre hidrofobicidad y capacidad emulsionante de diversas proteínas vegetales, destacando la importancia de su hidrofobicidad al utilizarlas como emulsionantes. Voutsinas y Nakai (1983) sugirieron que la hidrofobicidad juega un papel importante en la capacidad de ligar grasa y constataron una gran correlación entre ambos parámetros en muchas proteínas alimentarias; de acuerdo con Wahl (1979) los lípidos se ligan a las proteínas principalmente mediante interacciones hidrofóbicas. Varios investigadores utilizan la hidrofobicidad como variable para predecir la capacidad espumante de diversas proteínas de los alimentos (Horiuchi y col., 1978; Townsend y Nakai, 1983).

Hayakawa y Nakai (1985a) sugieren una subclasificación de hidrofobicidad de superficie o efectiva en alifática y aromática, según la contribución a la misma de los residuos alifáticos o aromáticos, respectivamente. Estos autores defienden la existencia de distintos sitios de fijación a la proteína según la diferente estructura alifática o aromática de los ligandos utilizados para determinar la hidrofobicidad.

Generalmente la desnaturalización de las proteínas no es deseable debido a que conlleva una alteración de las propiedades físico-químicas, particularmente una disminución de la solubilidad y, en consecuencia, de las propiedades funcionales. Sin embargo, la desnaturalización parcial, siempre que no se acompañe de coagulación, mejora ciertas propiedades funcionales de las proteínas, especialmente las de superficie. Se ha observado que a medida que la desnaturalización progresa, generalmente aumenta la hidrofobicidad efectiva. Esto se debe a los residuos hidrófobos inmersos en el interior de la molécula proteica (Tanford, 1973) que como resultado del desplegamiento van apareciendo gradualmente en la superficie molecular; la proteína se hace más anfifílica y se orienta con mayor facilidad en la interfase agua-grasa (Morr, 1979). A este respecto son varios los autores que han estudiado la variación que se produce en la hidrofobicidad efectiva como consecuencia del calentamiento, así como su correlación con ciertas propiedades funcionales. Por ejemplo, Shimada y Matsushita (1980b, 1981) señalaron que el mecanismo de la termocoagulación proteica dependía, en gran medida, de las interacciones hidrofóbicas.

Kano y col. (1981) sugirieron que las propiedades emulsionantes

y la formación de espuma de la ovoalbúmina y lisozima mejoraban con la desnaturalización por calor, observándose una correlación alta con el aumento de la hidrofobicidad superficial o efectiva, así como con la disminución de la tensión superficial. Dichos investigadores señalan que tal incremento se aprecia siempre que no haya coagulación ni caída significativa de la solubilidad durante el tratamiento térmico.

Voutsinas y col. (1983a) experimentando con proteínas desnaturalizadas por el calor, estudiaron las relaciones de la hidrofobicidad de superficie con la capacidad de ligar grasa, con el poder emulsionante y con la capacidad de estabilizar la emulsión, observando una correlación alta. En este caso, al considerar conjuntamente hidrofobicidad y solubilidad aumentaban los índices de correlación.

Estos mismos investigadores (Voutsinas y col., 1983b) establecieron correlaciones significativas entre las propiedades gelificantes de las proteínas y la hidrofobicidad determinada cuando las proteínas se encuentran desplegadas así como con el contenido de grupos sulfhidrilo. Las proteínas se despliegan al tratarlas por el calor y muestran en la superficie los residuos hidrofóbicos localizados en el interior de la molécula (Kato y Nakai, 1980; Kato y col., 1981). Por tanto, es razonable que la hidrofobicidad determinada en la molécula desplegada muestre mejores correlaciones que la hidrofobicidad de superficie de la proteína nativa.

Bonomi y col. (1988) evaluaron la desnaturalización por calor de las proteínas del suero de la leche determinando su hidrofobicidad de

superficie y concluyeron que dicho parámetro es realmente significativo para calcular las modificaciones conformacionales de las proteínas lácteas sometidas a tratamiento térmico.

Li-Chan y col. (1984; 1985; 1987) también han estudiado las relaciones de desnaturalización-estructura-función de las proteínas cárnicas.

#### 1.5.1.2.- Grupos sulfhidrilo (-SH)

Los grupos sulfhidrilo (-SH) y puentes disulfuro (SS) son importantes para mantener la estructura de las proteínas nativas (Saxena y Wetlaufer, 1970), influyendo significativamente en las propiedades funcionales de las proteínas de los alimentos, así como en la calidad nutritiva de las mismas, además desarrollan un importante papel en la formación de estructuras relativamente rígidas como los geles (Shimada y Chefnel, 1983). También están implicados en la contracción muscular y participan en los fenómenos de desnaturalización de las proteínas cárnicas y en los mecanismos de agregación de la miosina (Buttkus, 1971). Los cambios en los grupos -SH y puentes SS de las proteínas musculares influyen mucho en el sabor y la textura de los productos cárnicos (Hamm y Hofmann, 1965). Por otro lado, Cantoni y Cattaneo (1974) observaron que la presencia de grandes cantidades de grupos -SH en los alimentos previene la formación de *N*-nitrosaminas en el estómago, debido a que la reacción entre nitritos y grupos -SH en las condiciones del pH del jugo gástrico es 10.000 veces más rápida que la reacción entre nitritos y aminas.

Doi y col. (1989) han estudiado la relación entre grupos -SH y algunas propiedades funcionales, como la formación de espuma de la ovoalbúmina, principal componente proteico del huevo. La ovoalbúmina es una fosfoglicoproteína con una cadena peptídica; cada molécula contiene un puente SS y cuatro grupos -SH situados en las regiones hidrofóbicas. Debido a la simplicidad de su estructura es una proteína muy adecuada para estudiar las relaciones entre grupos -SH y funcionalidad. Las soluciones de ovoalbúmina forman espumas estables, para lo que se necesita un cierto cambio conformacional en la molécula, de tal modo que algunos grupos -SH se vuelven reactivos y forman puentes SS intermoleculares, aunque también intervienen interacciones no covalentes como las hidrofóbicas. Durante la formación de espuma las moléculas se desnaturalizan e interaccionan entre sí estabilizando la espuma (Kitabatake y col., 1982; Kitabatake y Doi, 1987).

La formación de puentes SS en las proteínas ocurre por oxidación de los grupos -SH o por reacciones de intercambio SH-SS. Así se demostró durante el calentamiento de las proteínas de soja (Wolf, 1970; Yamagishi y col., 1984; Utsumi y Kinsella, 1985a; 1985b; Mori y col., 1986; Shimada y Cheftel, 1988), del suero lácteo (Li-Chan, 1983), del huevo (Beveridge y Arntfield, 1979; Shimada y Matsushita, 1980a), del pescado (Itoh y col., 1979a; 1979b; 1980a; 1980b; Opstvedt y col., 1984; Jiang y col., 1986; Synowiecki y Sikorski, 1988) y de la carne (Hamm y Hofmann, 1965; Synowiecki y Shahidi, 1991). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se llevaron a cabo con soluciones muy diluidas de proteína, siendo escaso el conocimiento que se posee acerca de los cambios de los grupos -SH y puentes SS cuando el calentamiento

se efectúa a concentraciones que dan lugar a la gelificación de la proteína

El contenido de grupos -SH en los geles de proteína se ha determinado en las proteínas concentradas del suero de la leche (Beveridge y col., 1984) y en la ovoalbúmina (Hayakawa y Nakai, 1983b). Estos autores han observado una correlación entre el incremento en la firmeza del gel y la disminución de los grupos -SH como resultado del tratamiento térmico. Tales resultados sugieren que los puentes SS se forman durante la gelificación por oxidación de los grupos -SH y por inducción de las reacciones de intercambio SH-SS, influyendo mucho en la estructura reticular del gel y en su fuerza mecánica. Voutsinas y col. (1983b) encontraron en varias proteínas globulares que la fuerza del gel estaba significativamente correlacionada con el contenido inicial de grupos -SH y con la hidrofobicidad. Por el contrario, Hegg (1982) sugiere que no hay correlación entre el contenido de grupos -SH y la capacidad de gelificación de la conalbúmina, de la albúmina del suero y de la  $\beta$ -lactoglobulina. Esta contradicción posiblemente refleja diferencias en la reactividad de los grupos -SH y en los papeles respectivos de los enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, enlaces SS e interacciones hidrofóbicas en la gelificación de diferentes proteínas (Shimada y Matsushita, 1980b).

Shimada y Cheftel (1988) también estudiaron los cambios de los grupos -SH de la proteína de soja durante el calentamiento. Estos autores no encontraron una relación significativa entre la firmeza del gel y el total de grupos -SH y concluyeron que la firmeza del gel constituído

por esta proteína depende menos de la formación de enlaces SS, por oxidación de los grupos -SH, que de otras reacciones (interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, etc.). Estas reacciones pueden aumentarse al hacerlo las temperaturas (hasta 120°C) posiblemente por un mayor desplegamiento de la proteína. A temperaturas más altas (130°C) tienen lugar otras reacciones como rotura de puentes SS con liberación de H<sub>2</sub>S, posible disociación en subunidades y rotura de éstas en compuestos de bajo peso molecular.

Recientemente, Margoshes (1990) ha puesto de manifiesto una gran correlación entre los niveles de grupos -SH de las proteínas de la clara de huevo y la fuerza del gel producido por calentamiento. También Xiong y Kinsella (1990) señalaron la importancia de los grupos -SH en la gelificación de la proteína sérica inducida por urea.

En el caso de las proteínas cármicas, Li-Chan y col. (1985) constatan la disminución de los grupos -SH conforme aumenta la temperatura y sugieren que para una correcta funcionalidad se necesita un balance óptimo entre hidrofobicidad y grupos -SH.

### 1.5.1.3.- Antigenicidad

Kilara y Sharkasi (1986) consideran a la antigenicidad como una propiedad química de la molécula proteica. En la bibliografía consultada, no hemos encontrado autores que introduzcan la antigenicidad como variable para predecir la funcionalidad de las proteínas. Sin embargo, y dada la gran sensibilidad de las técnicas inmunológicas,

parece evidente que la variación de la antigenicidad, a consecuencia del tratamiento térmico, podría ser un parámetro importante a considerar en la predicción de la variación de diversas propiedades funcionales de las proteínas.

Los estudios llevados a cabo con proteínas consideradas como moléculas antigénicas han dividido a los *determinantes antigénicos, epítopes o sitios de fijación del anticuerpo*, es decir, a los fragmentos de la molécula proteica reconocibles por el anticuerpo específico al que se ligan, en dos categorías estructurales (Atassi y Smith, 1978; Benjamin y col., 1984): el determinante antigénico *continuo o secuencial* que corresponde a un segmento de residuos aminoacídicos contiguos en la cadena peptídica y el determinante antigénico *discontinuo o conformacional* que está constituido por residuos adyacentes en el espacio, con respecto a la estructura molecular, pero distantes respecto de su posición secuencial (Benjamin y col., 1984; Berzofsky, 1985).

Estos determinantes antigénicos se identifican, entre otros métodos, por los efectos que la modificación química de residuos específicos ejerce en la actividad antigénica de la proteína, por el aislamiento de fragmentos peptídicos con actividades antigénicas a partir de las moléculas proteicas degradadas química o enzimáticamente y por síntesis directa de péptidos inmunológicamente activos.

Diversos estudios de la estructura antigénica de la proteína han demostrado que los anticuerpos producidos frente a las proteínas nativas se acoplan principalmente a los determinantes antigénicos conforma-

*cionales o discontinuos, mientras que los secuenciales o continuos son de menor relevancia (Otani y Honoso, 1987). Los epitopes continuos ligan asimismo el anticuerpo con mayor afinidad si presentan una conformación determinada (Berzofsky y Schechter, 1981; Hirayama y col., 1985). En este sentido, todos los determinantes antigénicos serían conformacionales, ya que la conformación tridimensional del lugar de combinación del anticuerpo, define la conformación antigénica más complementaria de si mismo (Berzofsky y Schechter, 1981; Benjamin y col., 1984). Consecuentemente, entre las proteínas desnaturalizadas y los anticuerpos frente a estas mismas proteínas en su estructura nativa, sólo se observan pequeñas reacciones cruzadas (Otani y Honoso, 1987). Las cadenas peptídicas desplegadas determinan la formación de anticuerpos específicos frente a las mismas que, en la mayoría de los casos, no provocan reacciones cruzadas con la proteína nativa.*

La pérdida de antigenicidad que sufren las proteínas con el tratamiento térmico se asocia a los cambios estructurales de la molécula proteica y, en consecuencia, a la desnaturalización. Por tanto, las técnicas inmunológicas basadas en la reacción antígeno-anticuerpo suponen un instrumento muy sensible para detectar cambios estructurales de antígenos sometidos a distintos agentes desnaturalizantes.

La reacción antígeno-anticuerpo se ha utilizado con éxito en estudios de desnaturalización por el calor de diversas proteínas. En este sentido, una técnica inmunoenzimática (ELISA indirecto) se utilizó para detectar la antigenicidad residual de las proteínas lácteas sometidas a tratamientos térmicos graduales (Kilshaw y col., 1982; Heppell y col.,

1984; Heppel. 1985). Baer y col. (1976) estudiaron la desnaturalización térmica de la  $\alpha$ -lactalbúmina utilizando el método de fijación de complemento y Kaminogawa y col. (1989) evaluaron la desnaturalización por calor de la  $\beta$ -lactoglobulina utilizando anticuerpos monoclonales. Lo y col. (1989) determinaron mediante electroforesis la intensidad del tratamiento térmico experimentado por la leche.

También se han desarrollado diversas pruebas inmunológicas para estudiar el efecto del calor en las proteínas de soja y, en consecuencia, su desnaturalización y pérdida de antigenicidad asociada a los cambios conformacionales que implican la destrucción de su estructura; por ejemplo, Catsimpoalas y col. (1971) utilizaron con este fin la inmunodifusión radial, la fijación del complemento y la inmunoelectroforesis; Iwabuchi y Shibasaki (1981) la inmunodifusión radial; Hitchcock y col. (1981), Griffiths y col. (1984) y Mifek y Glawischnig (1989) mediante la técnica ELISA detectaron la presencia de proteínas de soja en productos cárnicos tratados por calor.

Varios investigadores han demostrado que la ovoalbúmina, adicionada como coadyuvante de fabricación a ciertos productos alimenticios tratados por el calor, puede detectarse (Janssen y col., 1987) y cuantificarse (Breton y col., 1988) mediante técnicas inmunológicas. Asimismo, Varshney y Paraf (1990) trabajando con setas enlatadas a las que se habían añadido pequeñas cantidades de ovoalbúmina, desarrollaron un test inmunoquímico para determinar el intervalo de tratamiento térmico que el producto había recibido.

Varshney y col. (1991) evaluaron las diferencias entre los epítopes de las ovoalbuminas nativa y desnaturalizada por calor, mediante anticuerpos monoclonales; para determinar la temperatura de calentamiento de esta proteína utilizaron la técnica del ELISA.

La técnica del ELISA también se ha utilizado en estudios de desnaturalización térmica de proteínas cárnicas (Manz, 1985). Sawaya y col. (1990) la emplearon para detectar la presencia de bajas concentraciones de carne de cerdo en las de vaca u oveja calentadas a las mismas temperaturas que las que se utilizan en la industria para tratar térmicamente los productos cárnicos procesados. Mifek y Glawisching (1990) también la utilizaron para establecer las especies de donde procede la carne en los productos cárnicos tratados por el calor. Heer y Goerlich (1988) estudiaron la desnaturalización por el calor de la carne de oveja mediante una técnica de precipitación en geles de agarosa.

## **II. OBJETIVOS**

Las propiedades funcionales de las proteínas musculares hidro-salino-solubles condicionan la calidad de ciertos productos cárnicos. El tratamiento térmico constituye una etapa primordial del proceso de fabricación de tales productos y además el calor ocasiona la denaturalización de las proteínas, lo que se traduce en alteraciones de sus propiedades estructurales y, en consecuencia, funcionales. Todo ello ocasiona dificultades en la formulación y fallos en la calidad del producto final.

Si se pudieran predecir las variaciones de la funcionalidad de las proteínas musculares hidro-salino-solubles cuando se someten a tratamiento térmico, se podría realizar la formulación del producto a fabricar de una forma más exacta, con lo que se reducirían considerablemente el número y coste de los ensayos necesarios para determinar dicha formulación. Además, se podría prevenir la aparición de ciertos defectos indeseables en el producto final.

Dada la relación estructura-función de las proteínas, proponemos:

1.- Estudiar las variaciones que se producen, a consecuencia del tratamiento térmico aplicado, en diversas propiedades físico-químicas y funcionales de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles, en concreto en la hidrofobicidad aromática y alifática, en el contenido de grupos sulfhidrilo, en la antigenicidad y en la capacidad de ligar grasa.

2.- Comprobar la posible relación entre el tratamiento térmico

aplicado y la variación de la propiedad físico-química o funcional considerada.

1.- Establecer los posibles modelos de predicción de la variación de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas hidró-salino-solubles, de acuerdo con el tratamiento térmico aplicado; para ello se utilizarán las variables físico-químicas más idóneas.

### **III.- MATERIALES Y METODOS**

### III.1.- MATERIAL GENERAL

#### III.1.1. MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO

Todas las disoluciones acuosas se prepararon con agua destilada y desionizada. La destilación del agua se realizó en un aparato Afora\* y la desionización se llevó a cabo conectando la salida del agua destilada a un desmineralizador "Seta" mod. R-600.

Las pesadas ordinarias se efectuaron en balanzas mono plato "Sauter" mod. S-1000 y las de precisión en balanzas analíticas "Sartorius" mod. 2443 y "Microwa" mod. 6620.

Los ajustes y determinaciones de pH se llevaron a cabo con pHímetros "Beckman" mod. Expandomatic SS-2 y "Crison" mod. Digit 501.

La trituración de las muestras de carne se realizó mediante el uso de una picadora "Ortega". Las homogeneizaciones se hicieron con un triturador de cuchillas "Sorvall" mod. Omni-mixer 17.016 o con un homogeneizador "Kinematica" mod. Polytron.

Para las centrifugaciones se utilizó una supercentrífuga "Sorvall" mod. RC-5B dotada de refrigeración y equipada con rotores SS-34 y

\* La cita de marcas de aparatos, reactivos, etc., no significa que la autora las mencione con preferencia a otras marcas del mercado.

GSA.

Los tratamientos térmicos se realizaron en baños de agua o de glicerol provistos de termostatos "Braun" mod. Thermomix 1441 o "Selecta" mod. Tectron y un termómetro digital "Crison" mod. 620/3, así como un baño termostatado "Selecta" mod. Unitronic Orbital S-320-OR con agitación.

Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro "Kontron" mod. Uvikon 820, registrándose los resultados en una impresora térmica mod. Uvikon LS-48 y en un registrador mod. Uvikon 21.

Las medidas de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro "Hitachi" mod. F-2000, provisto de impresora.

En los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), se emplearon placas de ELISA marca "Costar" mod. 3590 de 96 pocillos. La agitación de las mismas se realizó en un agitador marca "Wallac" mod. 1296-001 y su lectura en un lector de placas de ELISA "Titertek Multiskan" mod. Plus. Las incubaciones necesarias para el desarrollo de dichos ensayos se efectuaron en una estufa "Heracus" mod. KB-500, termostatada a 37°C.

Las muestras se conservaron en arcones de congelación "Kelvinator" mod. AC-550 y ACK-55, así como en frigoríficos "Kelvinator" AKR-20.

Las pipetas y micropipetas automáticas empleadas fueron de la marca "Gilson" modelos P-5000, P-1000, P-200 y P-20.

El material de vidrio utilizado en todas las experiencias fue de calidad "Pyrex" o similar.

Como material general de laboratorio se utilizaron además: agitadores, mecheros de gas, desecadores de vidrio, termómetros, etc.

### **III.1.2.- MATERIAL BIOLÓGICO**

#### **III.1.2.1.- Origen de las muestras**

Los extractos cárnicos se prepararon a partir de cinco muestras diferentes de carne fresca de vacuno adquiridas en una carnicería local a lo largo de un periodo de 12 meses.

#### **III.1.2.2.- Obtención de los inmunosueros**

Los inmunosueros se obtuvieron por inoculación de los extractos antigénicos (proteínas cárnicas hidro-salino-solubles) en conejos machos de raza Nueva Zelanda, donados por el animalario del Departamento de Cirugía Experimental del Hospital Militar Central "Gomez Ulla" de Madrid.

### III.1.3.- REACTIVOS

Los productos químicos utilizados en las experiencias que se describen en este trabajo fueron de calidad "reactivo" y suministrados por las siguientes firmas : "Sigma", "Merck", "Fluka", "Panreac" y "Probus".

Para las técnicas inmunológicas se emplearon productos suministrados por "Sigma", "Difco" y "Pharmacia".

### III.2.- METODOS

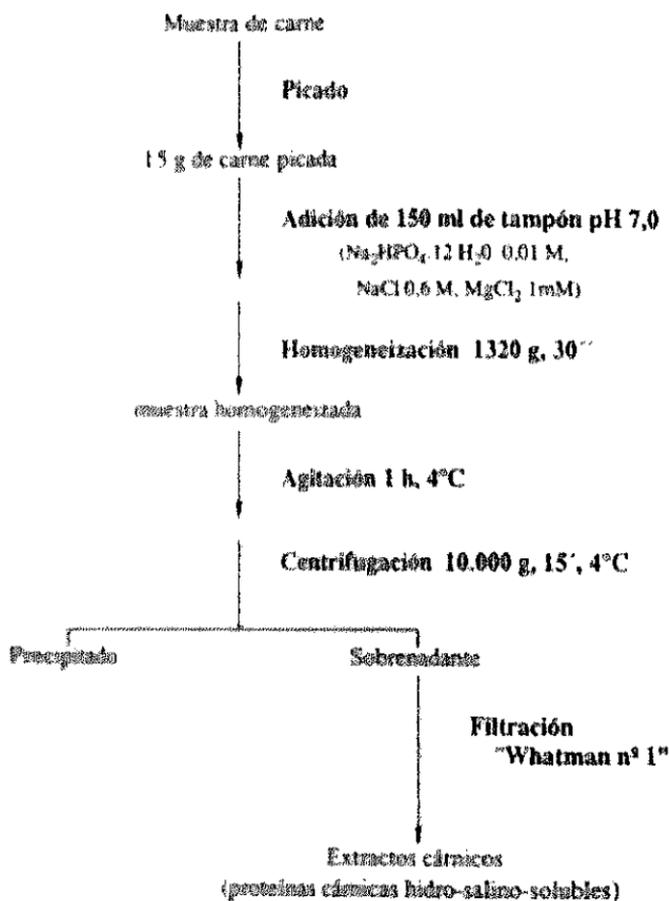
#### III.2.1.- PREPARACION DE LOS EXTRACTOS CARNICOS

La carne utilizada para nuestros ensayos procedía de la babilla, integrada por los músculos de la región femoral anterior: *Ms. rectus femoris*, *Ms. vastus medialis* y *Ms. vastus lateralis*.

Una vez adquirida la carne en un comercio local, se trasladó rápidamente al laboratorio en condiciones de refrigeración y se procedió a disecar los músculos procurando eliminar al máximo los tendones, aponeurosis y grasa.

La extracción de las proteínas musculares se realizó siguiendo el procedimiento previamente descrito por van Eerd (1971) y modificado por Li-Chan y col. (1984).

**Esquema de la técnica utilizada para la preparación  
de los extractos cárnicos**

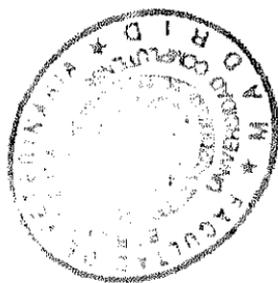


La carne se picó finamente en una picadora provista de placa cuyos orificios tienen un diámetro aproximado de 0,5 cm. A continuación 15 g de carne picada se homogeneizaron 30 segundos con un triturador de cuchillas a 1320 g en 150 ml de un tampón de pH 7.0 constituido por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  0,01 M, NaCl 0,6 M y  $\text{MgCl}_2$  1 mM.

El homogeneizado se mantuvo en agitación constante una hora a 4°C, centrifugándose a continuación a 10.000 g durante 15 minutos a una temperatura de 4°C.

Se desechó el sedimento y el sobrenadante se filtró con papel de filtro "Whatman nº1". Los filtrados de las muestras contenían las proteínas musculares hidro-salino-solubles que utilizamos posteriormente en nuestros experimentos. Dichos filtrados se mantuvieron en refrigeración hasta que se realizaron los ensayos durante un periodo de tiempo no superior a 48 horas.

El contenido proteico de los extractos cármicos se determinó con la técnica de Folin-Ciocalteu, de acuerdo con Lowry y col. (1951). Como técnica alternativa para algunas muestras se utilizó el método del biuret como lo describen Gomall y col. (1949).



### III.2.2.- DETERMINACION DE LA PROTEINA

#### III.2.2.1.- Técnica de Folin-Ciocalteu, según Lowry y col. (1951)

##### *Fundamento*

Para la cuantificación de proteínas Lowry y col. (1951) utilizaron el reactivo de Folin-Ciocalteu, empleado generalmente para detectar grupos fenólicos.

Esta técnica se basa en el desarrollo de color al poner en contacto las proteínas con los reactivos que se detallan más adelante. La aparición de color se debe a la formación de azul de wolframio y azul de molibdeno como consecuencia de una combinación de reacciones:

- 1.- Formación de un complejo entre los enlaces peptídicos de las proteínas y el cobre en medio alcalino (reacción tipo biuret).
- 2.- Reducción por la tirosina y el triptófano de los ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico, principales constituyentes del reactivo de Folin-Ciocalteu.

El color desarrollado es cuantificable por espectrofotometría, siendo necesario extrapolar los resultados a una gráfica patrón elaborada previamente (véase figura 3.1).

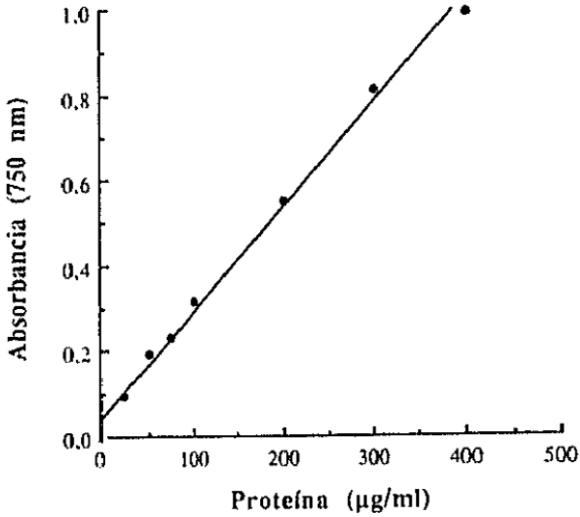
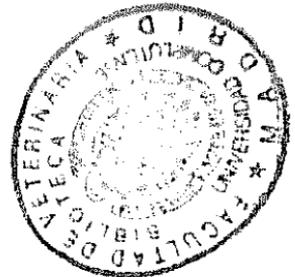


Figura 3.1. Gráfica patrón para la determinación de proteína mediante la técnica de Lowry y col. (1951).



### *Reactivos*

Como proteína estándar para construir la recta patrón se empleó seroalbúmina bovina (fracción V de Cohn, Sigma). Se prepararon las siguientes diluciones:

Solución A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en NaOH 0,1 M. Esta solución se prepara inmediatamente antes de su uso.

Solución B:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  al 0,5 % en tartrato sódico-potásico tetrahidratado ( $\text{NaK C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ) al 1%. Esta solución se prepara inmediatamente antes de su uso.

Solución C: se obtiene mezclando 50 ml de la solución A con 1 ml de la solución B.

Solución D: Reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck) diluido en agua destilada en una proporción 1:2 (v:v).

### *Procedimiento*

Para confeccionar la recta patrón, se depositaron por duplicado en tubos de ensayo alícuotas de 1 ml de soluciones de seroalbúmina bovina en agua destilada cuyo contenido de proteína estaba comprendido entre 25 y 300  $\mu\text{g}$ .

El contenido proteico de los extractos cárnicos se determinó precisamente realizando distintas diluciones de la solución inicial, para garantizar que la cantidad de proteína de las distintas muestras estaba

comprendida dentro del rango de sensibilidad del método, es decir, entre 25 y 500  $\mu\text{g}$  de proteína por ml.

A 1 ml de muestra se le añadieron 5 ml de la solución C; se mezcló todo bien dejando reposar la mezcla 10 minutos como mínimo a temperatura ambiente. A continuación se le añadieron 0.5 ml de la solución D, agitando inmediatamente; se dejó reaccionar a 19-21°C durante 30 minutos, al término de los cuales se midió el incremento de la absorbancia a 750 nm con referencia a un blanco de agua destilada tratado igual que la muestra.

Bensadoun y Weinstein (1976) demostraron que algunos productos interferían con la determinación de proteína por la técnica de Lowry; cuando tales sustancias se encontraban presentes se recurrió a otros métodos.

### III.2.2.2.- Método del biuret

#### *Fundamento*

El biuret da lugar a un complejo de color púrpura al reaccionar con una solución de sulfato de cobre en medio alcalino. Las proteínas reaccionan de modo semejante. Los iones cobre forman un complejo de coordinación con cuatro cuerpos -NH nucleófilos del biuret, que en el caso de las proteínas provienen de los enlaces peptídicos de los aminoácidos.

### *Técnica*

La técnica utilizada fue la descrita por Gornall y col. (1949). La preparación del reactivo se llevó a cabo disolviendo en 500 ml de agua destilada:

- 1.5 g de sulfato de cobre pentahidratado.
- 6 g de tartrato tódico-potásico tetrahidratado.

Posteriormente se añadieron 300 ml de NaOH al 10% y se enrasó la mezcla con agua destilada hasta un litro en un matraz aforado. A continuación se adicionó 1g de ioduro potásico para prevenir la formación y precipitación de óxido de cobre.

A 1 ml de muestra con un contenido en proteína entre 0.5-10 mg, se añadieron 4 ml del reactivo anterior, tras su agitación se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se leyó el incremento de la absorbancia a 550 nm frente a un blanco sin proteína.

Los resultados se extrapolaron a una gráfica patrón confeccionada con concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (véase figura 3.2).

#### **III.2.2.1.- Técnica espectrofotométrica de Layne (1957)**

Esta técnica, aprovecha las distintas extinciones de las proteínas a 260 nm y 280 nm y sus interrelaciones. La fórmula a emplear es la siguiente:

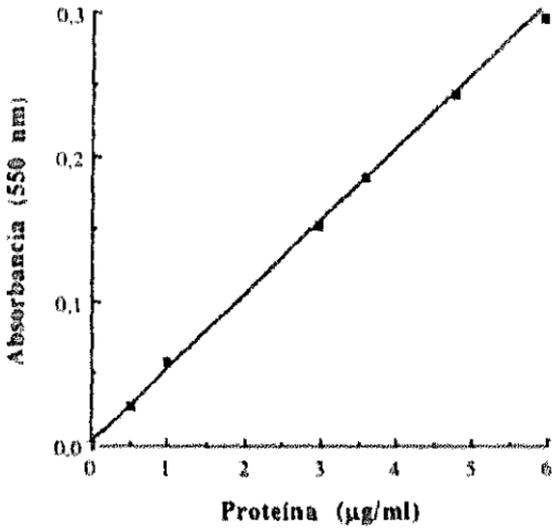


Figura 3.2. Gráfica patrón para la determinación de proteína por el método del biuret.

$$\text{Proteína (mg/ml)} = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}$$

Los resultados obtenidos únicamente son indicativos, ya que esta fórmula sólo es absolutamente fiable en las proteínas cuya solución al 1% presenta una extinción de 8.9 a 280 nm y una relación entre las extinciones a 280 nm y 260 nm de 1.75.

### III.2.1.- TRATAMIENTO TÉRMICO DE LOS EXTRACTOS CÁRNICOS

Los extractos cárnicos, diluidos en tampón de pH 7.0 y envasados en viales perfectamente cerrados, se calentaron, con agitación constante, a temperaturas de 40°C a 100°C (con intervalos de 10°C), durante 30 min, en baños termostáticos de agua o glicerina.

Finalizado el tratamiento térmico, las soluciones se enfriaron rápidamente en un baño de agua-hielo, homogenizándose a continuación a 534 g durante 15 segundos.

En cada experimento, se conservaban como patrones de referencia alícuotas de los extractos cárnicos sin calentar.

### III.2.4.- TECNICAS INMUNOLOGICAS

#### III.2.4.1.- Extractos antigénicos

La obtención de los extractos antigénicos PCHSS (proteínas cárnicas hidro-salino-solubles) se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado III.2.1.

#### III.2.4.2.- Obtencion de los inmunosueros

Los extractos antigénicos PCHSS se inocularon en conejos con el fin de obtener inmunosueros dotados de los correspondientes anticuerpos.

##### A.- Pauta de inmunización

Como animales de experimentación se emplearon conejos machos de 2,5-3 kg de peso, de raza Nueva Zelanda.

Previo depilado y desinfección con alcohol de la zona a inocular, los extractos antigénicos se inyectaron por vía subcutánea a ambos lados de la espina dorsal, comenzando por la zona más próxima a la región cervical.

Se utilizaron dosis de 5 ml de extracto antigénico (0,5 mg proteína/ml). En algunas inoculaciones se inyectó el extracto antigénico junto con 0,5 ml de Adyuvante Completo de Freund (Difco).

Las inoculaciones se sucedieron a lo largo de 60 días, a intervalos de 5 y se observó un periodo de descanso de 10 días a partir de la inyección correspondiente al día 30 (véase tabla III.1).

### B.- Sangrías parciales

Antes de la primera inoculación se realizó una sangría inicial ( $S_0$ ) para comprobar la ausencia de reactividad de los animales frente a los antígenos utilizados. Asimismo, a los 15 y 30 días del proceso de inmunización se realizaron sendas sangrías parciales ( $S_1$  y  $S_2$ ) con el fin de verificar la efectividad de dicho proceso.

En las sangrías parciales la sangre se obtuvo de la vena marginal de la oreja. Para ello, se introducía al animal en una caja que permitiera su inmovilización, dejando libre únicamente la cabeza. La zona de la oreja correspondiente a la vena marginal se friccionó con algodón empapado en xilol, con el fin de producir una vasodilatación que favoreciera la sangría. A continuación se efectuaba una punción con una aguja hipodérmica, o bien, se seccionaba el vaso cuidadosamente con un bisturí, recogién dose por goteo de 5 a 10 ml de sangre.

### C.- Sangría final

El animal se colocaba en decúbito supino sobre la mesa de operaciones, inmovilizándolo por las cuatro extremidades, y se anestesiaba por vía intramuscular con Ketolar (clorhidrato de Ketamina) administrándole una dosis de 10 mg/kg de peso.

**Tabla III. I.** Pauta de inmunización y sangrías de los conejos inoculados subcutáneamente con el extracto antigénico PCHSS (proteínas cármicas hidro-salino-solubles)

Días	Extracto antigénico	Adyuvante completo de Freund	Sangría
1	5 ml	0,5 ml.	S <sub>0</sub>
5	5 ml	0,5 ml.	
10	5 ml	0,5 ml.	
15	5 ml	0,5 ml.	S <sub>1</sub>
20	5 ml	-	
25	5 ml	-	
30	5 ml	0,5 ml.	S <sub>2</sub>
40	5 ml	-	
45	5 ml	-	
50	5 ml	-	
55	5 ml	0,5 ml.	
60	-	-	S <sub>F</sub>

S<sub>0</sub> = Sangría inicial

S<sub>1</sub> = Sangría parcial día 15

S<sub>2</sub> = Sangría parcial día 30

S<sub>F</sub> = Sangría final

Después de depilar y desinfectar perfectamente la zona inferior del cuello, con el material quirúrgico apropiado se practicaban las incisiones cutáneas siguientes:

- a.- longitudinal, a lo largo de la línea media ventral.
- b.- transversal, a nivel de la segunda vértebra cervical.
- c.- transversal, a nivel de la sexta vértebra cervical.

A continuación, se fueron disecando los músculos de la cara inferior del cuello visibles en este área: *Ms. cleidomastoideus* (parte del *Ms. cleidocephalicus* y éste a su vez del *Ms. brachiocephalicus*), *Ms. sternomastoideus* (parte del *Ms. sternocephalicus*), *Ms. sternohyoideus* y *Ms. sternothyroideus*.

Por el borde lateral del *Ms. sternohyoideus* se profundizó, hasta llegar al paquete vásculo-nervioso situado a uno y otro lado de la tráquea (*A. carotis comunis*, *V. jugularis* y *Tronco vago-simpáthicus*). A continuación se disecó la *A. carotis comunis* y con una pinza "tipo mosquito" se fijó el *N. vagus* que continúa unido al tronco vascular. De este modo, al efectuar la sección de la arteria podemos dirigir el flujo sanguíneo a un tubo o recipiente donde se recoge la sangre.

Cuando disminuye el flujo de sangre, se recomienda aplicar un masaje cardíaco con el fin de conseguir el mayor volumen de sangre posible.

De cada animal se recogieron de 120 a 150 ml de sangre cuando la sangría final se realizaba según las normas señaladas.

#### D.- Obtención y conservación del suero

La sangre obtenida se vertía en un tubo de centrifuga lentamente (a fin de evitar en lo posible la hemólisis) y se centrifugaba a 2000 g durante 10 minutos. Los hematíes se depositaban en el fondo del tubo, a la vez que se formaba el correspondiente coágulo que quedaba en parte adherido a las paredes del tubo, de donde se desprendía con una espátula o aguja. El sobrenadante se centrifugaba de nuevo a 2000 g durante 15 minutos. De esta forma se facilitaba la retracción del coágulo y el suero se separaba perfectamente.

Obtenido el suero, con una jeringa o pipeta se distribuían en viales alicuotas de 5 ml, a las que se añadían como agente conservador una o dos gotas de una solución de azida de sodio al 0,01%. Los viales, perfectamente cerrados, se conservaron en congelación a -20°C hasta el momento de su utilización.

#### III.2.4.3.- Comprobación del proceso de inmunización

Para comprobar el proceso de inmunización de los conejos y la correspondencia inmunológica entre los inmunosueros obtenidos y los extractos antigénicos de interés se ha empleado la técnica de inmunodifusión doble descrita por Ouchterlony (1949).

Es una técnica fácil de realizar y básicamente consiste en la difusión del antígeno y del anticuerpo por un medio semisólido, gel de agarosa, cuyo diámetro de poro es suficientemente grande para permitir

que la sustancia que difunde no interaccione, ni física ni químicamente con el agente gelificado. Cuando el antígeno y el anticuerpo se encuentran, forman agregados que exceden del diámetro del poro, lo que impide que difunda el complejo antígeno-anticuerpo. Si existe correspondencia entre ambos se formará una línea de precipitación cuya posición dependerá del coeficiente de difusión de los antígenos y anticuerpos, de sus respectivas concentraciones y del tiempo de reacción.

#### A.- Preparación del gel de agarosa

El gel se preparaba con agarosa (Oxoid) al 1% en una solución de cloruro sódico al 0,85% y con un 0,01% de azida que actuaba como agente conservador. La solución salina de agarosa se calentaba hasta ebullición con agitación constante, y se añadía a continuación la solución de azida de sodio.

#### B.- Preparación de las placas de inmunodifusión

Se utilizaron portaobjetos de vidrio de 7,5 x 5 cm. Previamente se decoloraban hirviéndolos unos 10 minutos en una mezcla crómica diluída (100 g de dicromato potásico, 250 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y 750 ml de agua destilada). Una vez fríos los portaobjetos se decantaba la mezcla crómica y se lavaban con abundante agua destilada. Se conservaban sumergidos totalmente en acetona.

En los portaobjetos debidamente secos con papel de celulosa se

depositaban 6,5 ml de solución de agarosa caliente, procurando que la gelificación se efectuara sobre una superficie perfectamente nivelada.

Una vez solidificada la agarosa se realizaron excavaciones en la misma con la ayuda de moldes metálicos de sección circular. La disposición y tamaño de dichas excavaciones fue la siguiente: una central, de 12 mm de diámetro y 6 periféricas, dispuestas en forma de roseta de 6 mm de diámetro y distantes del pocillo central 7 mm. Esta disposición se dibujaba en un papel milimetrado con el fin de poder disponer en sucesivos ensayos de un modelo patrón de idénticas medidas. A continuación y con la ayuda de una aguja se retiraron cuidadosamente los discos de agarosa sobrantes. Seguidamente se añadía una gota de solución de agarosa fundida en el fondo de los pocillos resultantes para evitar que las distintas soluciones difundieran entre la capa del gel y la superficie de la lámina de vidrio.

### **C.- Llenado de las excavaciones e incubación de las placas**

Una vez preparadas las placas de inmunodifusión, con la ayuda de una micropipeta automática en el pocillo central se depositaron 150  $\mu$ l del suero inmune y en los pocillos periféricos 50  $\mu$ l de los extractos antigénicos. A continuación se colocaron cuidadosamente en los portaplaques de inmunodifusión y se introdujeron en las cajas de incubación que contenían 10 ml de solución de azida de sodio al 1% para inhibir el crecimiento bacteriano y conseguir mantener cierto grado de humedad que evitaba la evaporación del contenido de los

pocillos. Las cajas cerradas se incubaron a 37°C durante 24 horas.

#### D.- Lavado y secado de los geles

Finalizada la incubación, se lavaron los portaobjetos sumergiéndolos en una solución salina (NaCl) al 0,85% durante 48 horas a temperatura ambiente; cada 8 horas se cambiaba la solución salina lavadora. Después se secó cuidadosamente su superficie con una tira de papel de filtro "Whatman n°1" procurando eliminar las burbujas de aire formadas entre el gel y el papel. Cuando el gel se seca, el papel se desprende con facilidad de la superficie del portaobjetos.

Al evaporarse el agua del gel, quedaba adherida a la placa de vidrio una fina película de agarosa con las líneas de precipitación fijadas. En estas condiciones, los portaobjetos se sometían a tinción.

#### E.- Tinción

Tuvo lugar sumergiendo los portaobjetos durante 2 horas en una solución de la siguiente composición: 90 ml de metanol, 10 ml de ácido acético glacial y un 1 g de negro amida 10B (Merck).

Posteriormente se lavaron durante 30 minutos con una solución de ácido acético al 5%, eliminándose este último con lavados repetidos de agua destilada. Los portaobjetos se secaron a 37°C en estufa.

### III.2.4.4.- Técnica inmunoenzimática (ELISA indirecto)

En la técnica del ELISA indirecto, los antígenos se inmovilizan en una superficie inerte mediante adsorción pasiva. Al ser reconocidos por los anticuerpos específicos forman un complejo detectable por un segundo anticuerpo marcado con un enzima (conjugado) que reconoce como antígenos a los anticuerpos anteriores. Al añadir un sustrato adecuado al enzima se produce un compuesto cuantificable colorimétricamente.

#### A.- Extractos antigénicos

En la sección III.2.4.1 se describen los extractos antigénicos utilizados.

#### B.- Anticuerpos

Se utilizaron anticuerpos específicos anti-proteínas hidro-salino-solubles de carne de vaca (anti-PCHSS) obtenidos por inmunización en conejos (ver sección III.2.4.2.)

#### C.- Conjugado

El conjugado estaba constituido por proteína A marcada con peroxidasa de rábano (Nordic).

Un gramo de conjugado se resuspendió en 1 ml de agua destilada

estéril. Se prepararon alícuotas de 20  $\mu$ l que se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

#### D.- Tampones y reactivos

##### a) Tampón carbonato-bicarbonato pH $\approx$ 9,6

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	1,59 g
$\text{NaHCO}_3$	2,93 g
Agua destilada	1000 ml

Debe mantenerse en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de tiempo no superior a dos semanas.

##### b) Tampón PBST pH $\approx$ 7,4

NaCl	8 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	2,9 g
KCl	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
Agua destilada	1000 ml

Debe conservarse en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$ .

##### c) Tampón ácido cítrico-fosfato pH = 3,9

Acido cítrico monohidrato ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	0,1 M
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,2 M

Debe mantenerse en refrigeración a 4°C.

d) Sustrato

Solución al 0,15% de ABTS (ácido 2, 2 dietil bentiazolina del ácido sulfónico)	400 µl
Tampón ácido cítrico-fosfato	10 ml
Agua oxigenada (30%)	2 µl

e) Solución de tapizado

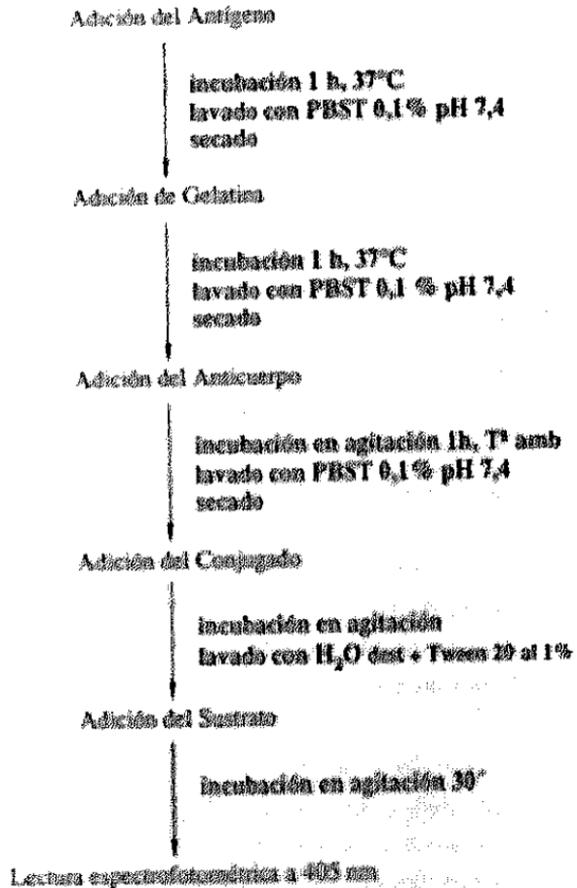
Gelatina al 1% en tampón PBS pH = 7,4 (tampón PBST sin  
adición de Tween)

E.- Metodología

Los pocillos de una placa de ELISA (Costar) se sensibilizaron con 100 µl del extracto antigénico PCHSS (52,2 µg proteína/ml) diluido en tampón carbonato-bicarbonato de pH 9,6 (diluciones 1/1, 1/2, 1/4, 1/8.....1/ 32.768). La placa se incubó durante 1 h a 37°C. Finalizada la incubación, los pocillos se lavaron 5 veces con tampón PBST (0,1%) de pH 7,4 para eliminar el extracto antigénico sin adsorber; seguidamente se secaron al aire.

Con el fin de tapizar las zonas de los pocillos en las que no se hubiere adsorbido el antígeno, a cada uno de ellos se añadieron 200 µl de una solución de gelatina al 1% en tampón PBS de pH 7,4. La placa se incubó a 37°C durante 1 h y los pocillos se lavaron de nuevo 5 veces

**Esquema de la metodología utilizada para la técnica  
inmunoenzimática del ELISA indirecto**



con tampón PBST (0,1%) para eliminar el exceso de gelatina, secándose posteriormente.

A continuación se depositaron en cada pocillo 100 µl de los anticuerpos específicos anti-PCHSS diluidos en tampón PBST de pH 7,4; la placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Los anticuerpos no fijados al antígeno se eliminaron con un nuevo proceso de lavado con tampón PBST (0,1%), secándose la placa al aire.

Una vez seca la placa se añadieron 100 µl del conjugado diluido en tampón PBS de pH 7,4 a cada pocillo y se mantuvo la placa en agitación constante a temperatura ambiente durante 1 h. El conjugado que no se fijó al complejo antígeno-anticuerpo se eliminó mediante 5 lavados consecutivos con Tween 20 al 1%, secándose la placa al aire.

Para visualizar la reacción, se añadieron a cada pocillo 150 µl del sustrato enzimático y la placa se mantuvo 30 minutos a temperatura ambiente en agitación constante. El color verde resultante de la degradación del sustrato por el enzima, se cuantificó midiendo la absorbancia de cada pocillo a 405 nm en un lector espectrofotométrico de placas de ELISA.

#### F.- Construcción de la gráfica patrón

Para la construcción de la gráfica patrón se analizaron 7 extractos antigénicos distintos. La absorbancia a 405 nm se representó

en función del logaritmo decimal de la concentración de extracto antigénico y se obtuvo la ecuación de la recta correspondiente a la parte lineal de la curva (véase apartado IV.5.2.C de Resultados y Discusión).

### G.- Determinación del antígeno original detectable

Después de someter el extracto antigénico a distintos tratamientos térmicos, se eligieron concentraciones cuyos valores de absorbancia a 405 nm estuvieron comprendidos, aproximadamente, en la parte lineal de la curva patrón. La cantidad de antígeno original detectable en las muestras se determinó por referencia a la gráfica patrón y a la ecuación de la recta correspondiente a la parte lineal de la curva.

La cantidad de extracto antigénico que reaccionaba con su correspondiente inmunosuero, después de someterlo a los distintos tratamientos, se expresó como "porcentaje de antígeno original detectable" (% AGD) y se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ AGD} = A/A_0 \times 100$$

donde,

A = concentración de antígeno residual reaccionante después del tratamiento térmico aplicado.

A<sub>0</sub> = concentración de antígeno original reaccionante sin someterlo a ningún tratamiento térmico.

### III.2.5.- DETERMINACION DE LA HIDROFOBICIDAD PROTEICA

Para la determinación de la hidrofobicidad proteica se han utilizado dos marcadores fluorescentes de las regiones hidrófobas de las proteínas: ác. 8-Anilino-1-Naftaleno Sulfónico (ANS) y Retinol (RET).

#### III.2.5.1.- Condiciones de trabajo

##### A.- Componentes del ensayo

##### A.1.- Reactivos

##### a.- Solución de retinol

El retinol empleado fue all-*trans*-retinol (Sigma). La solución madre se realizó diluyendo 1 g de retinol en 40 ml de etanol. A continuación se distribuyó en viales a razón de 1 ml y se conservó a -20°C hasta el momento de su uso. A partir de 1 ml de solución madre se preparaba diariamente una solución  $10^{-4}$  M de retinol en etanol. A su vez, a dicha solución se le añadían distintas cantidades de etanol hasta obtener un rango de concentraciones entre 0,01 µg/ml y 30 µg/ml de retinol.

En los experimentos con retinol, tanto en el etanol como en el tampón de pH 7,0 utilizado para la extracción de las proteínas cármicas, se hacía barbotear nitrógeno para eliminar el oxígeno y evitar

de este modo la oxidación del retinol. También por este motivo el retinol se conservó en todo momento al abrigo de la luz.

#### b. Solución de ANS

El reactivo empleado fue la sal de amonio del ácido 8-Anilino-1-Naftaleno Sulfónico (Sigma). A partir de una disolución  $10^{-3}$  M de ANS en tampón de pH 7,0 (ver apartado III.2.1) se prepararon diariamente soluciones cuyas concentraciones estaban comprendidas entre 1  $\mu\text{g/ml}$  y 100  $\mu\text{g/ml}$ .

#### A.2.- Extractos cárnicos

Los extractos cárnicos obtenidos en tampón de pH 7,0 (ver apartado III.2.1) se disolvieron en este mismo tampón hasta conseguir concentraciones de aproximadamente 14,5  $\mu\text{g/ml}$  de proteína. Esta concentración de proteína permaneció constante en todas las pruebas.

#### B.- Condiciones de la prueba

Al desarrollar una técnica de fluorescencia es necesario realizar un control riguroso del pH y de la temperatura ya que variaciones mínimas de estos parámetros pueden motivar un aumento o disminución de la fluorescencia de las muestras que da lugar a falsos resultados. Para eliminar la posible variación debida a dichos factores la hidrofobicidad proteica se determinó siempre a valores constantes de pH y temperatura

de la muestra, concretamente a pH de 7,0 y la temperatura de 20°C.

Como blanco se utilizaron diluciones de ANS en tampón de pH 7,0 y de retinol en etanol. Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas fueron 370 y 480 nm para el ANS y 330 y 470 nm para el retinol.

### III.2.5.2.- Metodología

Para cada sistema ligando-proteínas cármicas (originales y tratadas por calor) la intensidad de la fluorescencia se midió: 1) frente a distintas concentraciones de ANS y 2) frente a distintas concentraciones de retinol.

En tubos de ensayo se depositaron por duplicado alícuotas de 500 µl de los extractos cármicos con una concentración de proteína constante (14,5 µg/ml). A cada tubo se le adicionaron distintas concentraciones de ligando (ver apartado III.2.5.1.A.1) hasta obtener un volumen final de 3 ml.

El sistema proteína-ligando se mezcló y se dejó reposar de 6-10 minutos antes de registrar la intensidad de la fluorescencia; en análisis preliminares se comprobó que pasado este tiempo y hasta 20 minutos después la intensidad de la fluorescencia del complejo ligando-proteína permanecía estable.

### III.2.5.3.- Determinación de las concentraciones reales

El uso de diluciones altas de los reactivos puede originar ciertos errores mínimos que repercuten en un resultado final falso, por lo que una vez medida la intensidad de la fluorescencia deben determinarse espectrofotométricamente las concentraciones reales de las diluciones de ANS y de retinol utilizadas en cada prueba.

Las concentraciones reales de los ligandos se determinaron de acuerdo con los siguientes coeficientes de absorción molar: 46000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 325 nm para el retinol en etanol (Futterman y Heller, 1972) y 4950 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 350 nm para el ANS diluido en tampón de pH 7,0 (Weber y Young, 1964).

### III.2.5.4.- Determinación del número de sitios de fijación del ligando por unidad de proteína

El análisis de los resultados obtenidos se realizó de acuerdo con el proceder de Cogan y col. (1976).

A partir de la ecuación de la ley de acción de masas:

$$K_d = \frac{nP \times R}{PR} \quad [1]$$

se ha derivado otra ecuación con la cual trabajamos en nuestros ensayos

para la evaluación de las constantes de disociación aparentes.  $P$ ,  $R$  y  $PR$  son las concentraciones de proteína libre, ligando libre y ligando unido a la proteína, respectivamente;  $n$  es el número de sitios donde el ligando puede unirse a la proteína, dichos sitios poseen la misma afinidad de fijación y  $K_d$  es la constante de disociación aparente de un sitio independiente.

Si definimos  $\alpha$  como la fracción de sitios de fijación libres de una molécula de proteína,  $P_0$  como la concentración total de la proteína y expresamos el ligando libre  $R$  en función de la concentración total de ligando  $R_0$  y del ligando unido a la proteína  $PR$ , obtenemos que:

$$R = R_0 - PR = R_0 - nP_0(1 - \alpha)$$

La ecuación de la ley de acción de masas [ 1 ] puede transformarse en la siguiente:

$$K_d = \frac{\alpha}{1 - \alpha} [ R_0 - nP_0 ( 1 - \alpha ) ] \quad [ 2 ]$$

que se reordena de forma conveniente, de tal modo que :

$$P_0\alpha = - K_d/n + 1/n \frac{R_0\alpha}{1 - \alpha} \quad [ 3 ]$$

Representando gráficamente  $P_0\alpha$  frente a  $R_0\alpha/(1 - \alpha)$  se obtiene una recta de pendiente  $1/n$  y cuya ordenada en el origen es  $K_d/n$ . A partir de la ecuación de dicha recta se calcularon  $n$  y  $K_d$ .

La ecuación [ 3 ] es de gran utilidad en estudios en los que no puede valorarse directamente la concentración de ligando libre; se expresa preferiblemente en función del ligando total del sistema.

El valor  $\alpha$  puede obtenerse en cada uno de los puntos de la curva y representa la intensidad de la fluorescencia frente a la concentración de ligando, para ello se hace uso de la relación:

$$\alpha = \frac{IF_{\text{máx}} - IF}{IF_{\text{máx}}}$$

donde  $IF$  representa la intensidad de la fluorescencia para un determinado  $R_0$  y  $IF_{\text{máx}}$  es la intensidad de la fluorescencia cuando todas las moléculas de proteína se encuentran saturadas por el ligando.

### III.2.6.- DETERMINACION DE GRUPOS SULFHIDRILO

El contenido de grupos -SH de los extractos cárnicos se determinó de acuerdo con la técnica descrita por Beveridge y col. (1974), ligeramente modificada por Li-Chan (1983).

### III.2.6.1.- Tampones y reactivos

a) Tampón de pH 8,0 constituido por:

- Tris (hidroximetil)-aminometano	0,086 M
- Acido etilendiamino-tetracético (EDTA)	0,004 M
- Glicina cristalizada	0,09 M
- Urea	8 M

b) Reactivo de Ellman

Se prepara diluyendo 4 mg de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitro-benzóico en 1 ml de agua destilada.

### III.2.6.2.- Procedimiento

A 5 ml del extracto cárnico (2 mg proteína/ml) se añadieron 5 ml de tampón de pH 8,0. A continuación, a una alícuota de 3 ml de esta solución se le adicionaron 0,03 ml del reactivo de Ellman agitando inmediatamente.

Una vez efectuada la mezcla se determinó la absorbancia a 412 nm, transcurridos 0,1,2,3,4 y 5 minutos; como blanco se empleó la solución del extracto cárnico sin reactivo de Ellmans. El desarrollo de color se completaba totalmente en 3 minutos, permaneciendo estable durante 2 horas.

El contenido de grupos -SH se calculó utilizando la siguiente

ecuación:

$$\mu\text{M -SH/g de proteína} = \frac{73,53 A_{412} D}{C}$$

donde  $A_{412}$  es la absorbancia a 412 nm, C la concentración de la muestra (mg de proteína/ml) y D el factor de dilución si lo hubiere. La constante 73,53 proviene de  $10^6/1,36 \times 10^4$ , siendo  $1,36 \times 10^4$  el coeficiente de absorción molar del reactivo de Ellman (Ellman, 1959) y  $10^6$  el factor utilizado para la conversión de M/mg en  $\mu\text{M/g}$ .

### III.2.7.- DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE LIGAR GRASA

La capacidad de ligar grasa de las proteínas hidro-salino-solubles de la carne se determinó utilizando la técnica de Li-Chan y col. (1985). Dicha técnica supone una modificación del método turbidimétrico desarrollado por Voutsinas y Nakai (1983) en los siguientes puntos fundamentales:

- 1.- Utilización de extractos cárnicos en lugar de proteína liofilizada que muestra una funcionalidad inferior.
- 2.- Agitación para mezclar la proteína con el aceite, en lugar de sonicación, ya que la última produce un aumento de la viscosidad de las emulsiones.
- 3.- Incorporación de una centrifugación adicional a 17300 g para

una mayor recuperación de la proteína y eliminación del aceite *no ligado*.

### III.2.7.1.- Reactivos

- |                                |        |
|--------------------------------|--------|
| a.- Acido metafosfórico        | 0,2 N  |
| b.- Medio de digestión:        |        |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 130 ml |
| Agua destilada                 | 120 ml |
| Urea                           | 7 ml   |
| c.- Aceite de maíz             |        |

Todos ellos deben conservarse en refrigeración a 4°C.

### III.2.7.2.- Construcción de la recta patrón

La *recta patrón* (véase figura 3.3) se confeccionó del siguiente modo: se distribuyeron en tubos de ensayo alcuotas de 1 ml de los extractos cárnicos en tampón de pH 7,0 añadiéndose a continuación cantidades de aceite de maíz comprendidas entre 0 y 120 µl.

Los tubos se agitaron con ayuda de un vortex adicionándoles 0,3 ml de agua destilada para facilitar la mezcla.

A continuación se añadieron 20 ml de medio de digestión y se sometieron a homogeneización 30 segundos a una velocidad de 133 g.

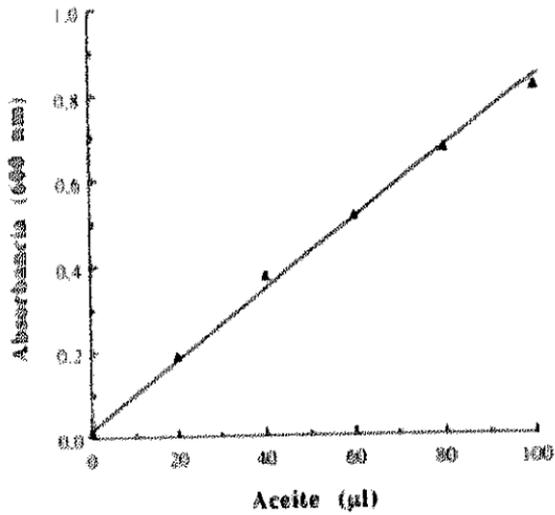


Figura 3.3. Gráfica patrón para la determinación de la capacidad de ligar grasa de la proteína según la técnica de Li-Chan y col. (1985).

Tras la homogeneización, la mezcla se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 600 nm con referencia a un blanco constituido por el medio de digestión.

### III.2.7.3.- Metodología

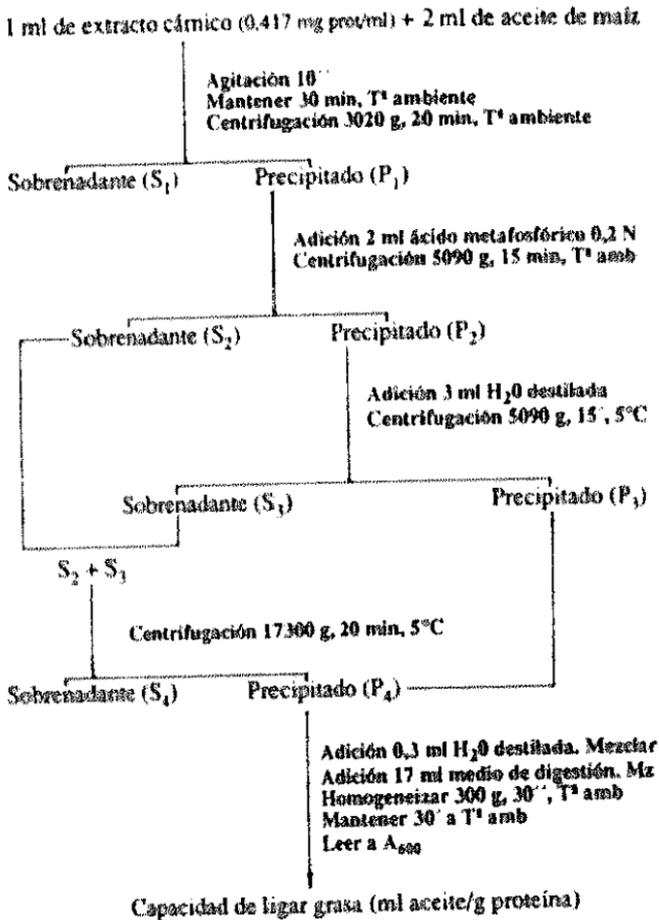
A 1 ml de extracto cárnico (0,417 mg proteína/ml) se añadieron 2 ml de aceite de maíz, agitándose la mezcla durante 10 segundos.

A continuación se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos, centrifugándose posteriormente a 3020 g durante 20 minutos. Eliminando el sobrenadante ( $S_1$ ) constituido únicamente por aceite libre, las paredes del tubo se limpiaron con papel de celulosa para retirar el aceite adherido.

Después se añadieron al precipitado ( $P_1$ ) 2 ml de ácido metafosfórico 0,2 N y la mezcla se centrifugó a 5090 g durante 15 minutos.

El sobrenadante ( $S_2$ ) obtenido en esta segunda centrifugación se trasvasó cuidadosamente con pipeta a un tubo de ensayo. Al precipitado ( $P_2$ ) se le adicionaron 3 ml de agua destilada centrifugándose de nuevo a 5090 g y a 5°C durante 15 minutos. Después de esta centrifugación se obtuvo un sobrenadante ( $S_3$ ) que unido al sobrenadante anterior ( $S_2$ ) se centrifugó de nuevo a 17300 g y a 5°C durante 20 minutos.

Esquema de la técnica utilizada para determinación de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas



El precipitado resultante ( $P_4$ ) se unió al precipitado  $P_3$  añadiéndose 0,3 ml de agua destilada para facilitar la mezcla. Posteriormente se adicionaron 2 ml de medio de digestión y se agitó. El contenido del tubo de ensayo se transfirió al homogeneizador y se añadieron 15 ml de medio de digestión. Esta mezcla se homogeneizó a 300 g durante 30 segundos a temperatura ambiente.

El homogeneizado resultante se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente y finalmente se midió su absorbancia a 600 nm frente al medio de digestión.

La capacidad de ligar grasa (ml aceite/g de proteína) se determina por referencia a la gráfica patrón.

### III.3.- ANALISIS ESTADISTICO

Los ensayos de correlación, regresión bivariada y regresión multivariada se realizaron con la ayuda del programa Statview (Abacus Concepts, Inc.) ejecutados en un ordenador Apple Macintosh Plus.

En los análisis de regresión multivariada se utilizaron dos métodos secuenciales: *Regresión múltiple Forward* (progresiva, ascendente, aditiva o directa) y *Regresión múltiple Stepwise* (iterativa, paso a paso o mixta). Dichos métodos constituyen buenos procedimientos para seleccionar las variables predictoras más apropiadas que formarán parte del modelo de regresión final, es decir, las que demuestren mayor relación con el criterio sin proporcionar información redundante. Estos

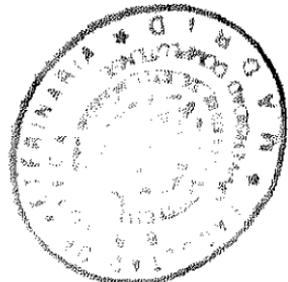
dos métodos se diferencian fundamentalmente respecto de la reversibilidad de las decisiones que se toman sobre la inclusión de predictores.

El procedimiento *FORWARD* comienza calculando la correlación simple entre cada uno de los predictores y el criterio. Se selecciona el predictor con mayor correlación (" $x_j$ "), se efectúa la regresión de " $y$ " sobre " $x_j$ " y se calcula el coeficiente de determinación múltiple ( $R^2_m$ ). A continuación, con dos predictores se obtienen todas las regresiones posibles en las que se incluya la variable seleccionada, se calculan los valores  $R^2_m$  correspondientes y se selecciona el mayor. Posteriormente, se realizan todas las posibles regresiones con tres predictores en las que se incluyan las dos variables seleccionadas en el paso anterior. El procedimiento sigue hasta que se agotan las variables a introducir o cuando la adición de una variable no supone un incremento significativo en  $R^2_m$ . El valor F (estadístico de Fisher) es el que nos indica si hay un aumento significativo entre dos pasos sucesivos (si el incremento de  $R^2_m$  es significativo el valor F obtenido es superior al valor F tabular).

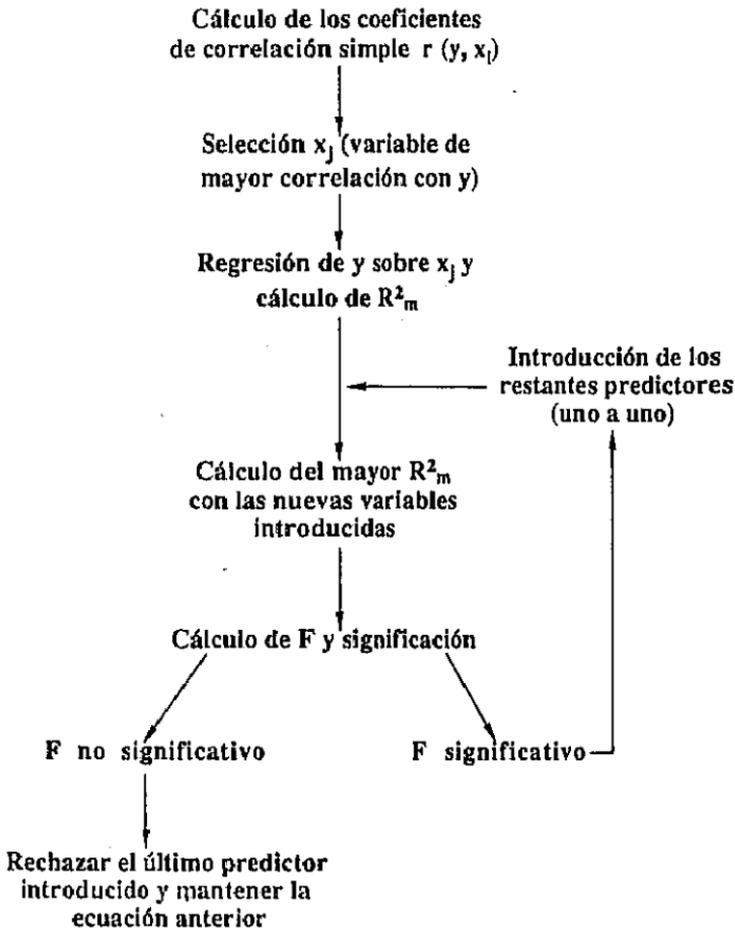
El procedimiento *STEPWISE* es en esencia una regresión *Forward*, pero se diferencia de ésta en que la decisión de incluir un predictor no es irreversible. Como en la selección *Forward*, comienza seleccionando la variable " $x_j$ " que presenta una mayor correlación simple con el criterio (" $y$ "), obteniendo la regresión de " $y$ " sobre " $x_j$ " y reteniendo esta variable predictora, si el valor F concluye que la ecuación de regresión simple es significativa. Posteriormente se

incluyen de forma progresiva y una a una, las variables predictoras remanentes con mayor correlación con el criterio, contrastando en cada paso si el valor F es significativamente más alto que el valor F tabular. La diferencia con la regresión *Forward* es que, cuando se ha introducido la segunda variable, se analiza la primera como si fuese la última variable introducida, para su posible eliminación del modelo. En otras palabras, se inspecciona la contribución de " $x_1$ " si se hubiera introducido " $x_2$ " en primer lugar y se retiene si su valor F es estadísticamente significativo (superior al tabular) o se elimina si no lo es (inferior a F tabular). El proceso continúa de forma similar, analizando en cada paso todas las variables que forman parte del modelo parcial correspondiente. Si se introduce, por ejemplo, un tercer predictor " $x_3$ " y se obtiene la ecuación de regresión que incluya las tres variables predictoras, debemos decidir si " $x_3$ " debería incluirse en la regresión y si " $x_1$ " y " $x_2$ " deben permanecer en el sistema. En caso de eliminar, por ejemplo, el predictor " $x_1$ ", volvería a obtenerse una ecuación con los predictores remanentes " $x_2$ " y " $x_3$ " y deberían analizarse los valores F asociados con estas dos variables para su posible rechazo.

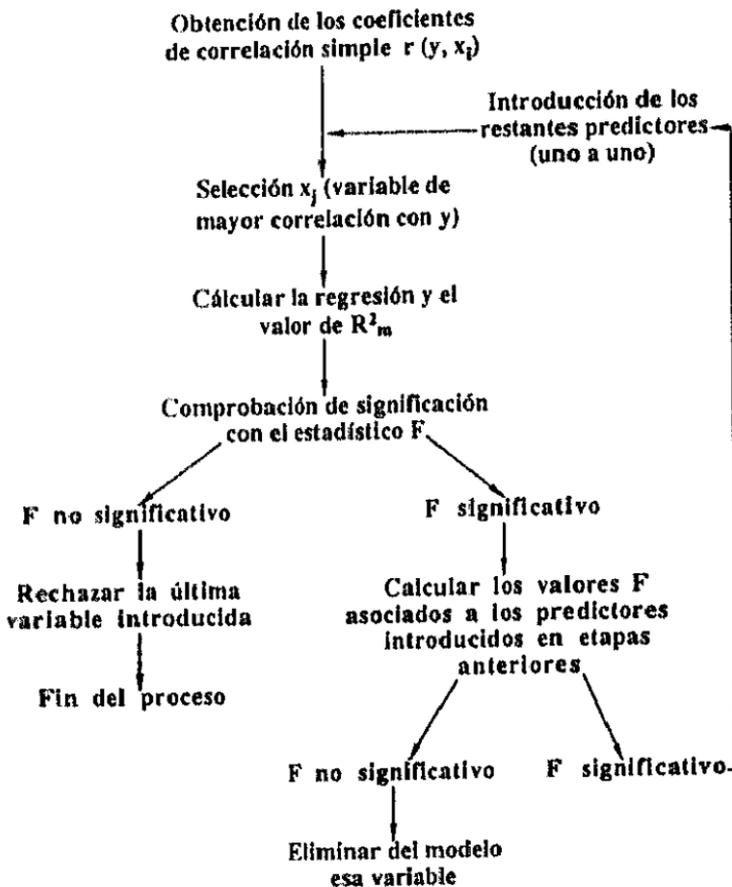
Las secuencias de los procedimientos *Forward* y *Stepwise* se resumen en los esquemas de las páginas 90 y 91, respectivamente.



**REGRESION MULTIPLE FORWARD** (Progresiva,  
ascendente, aditiva o directa)



**REGRESION MULTIPLE *STEPWISE* (Iterativa, paso a paso o mixta)**



## **IV.- RESULTADOS Y DISCUSION**

#### IV.1.- EXTRACCION DE LAS PROTEINAS HIDRO-SALINO-SOLUBLES DE LA CARNE

Como ya se ha mencionado en la introducción (sección I.1) las proteínas musculares se clasifican atendiendo a su solubilidad en miofibrilares, sarcoplásmicas y del estroma. En este trabajo se han utilizado proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas; las primeras se extraen del músculo mediante soluciones salinas de elevada fuerza iónica, en cambio, las proteínas sarcoplásmicas son solubles en agua o en soluciones salinas diluidas. La extracción de dichas proteínas, que se denominaron "proteínas hidro-salino-solubles de la carne", se realizó siguiendo el procedimiento de Li-Chan y col. (1984) que supone una modificación del método de Van Eerd (1971) y cuyo protocolo se describe en la sección III.2.1 (Material y Métodos). Algunas de sus principales características pueden observarse en la Tabla IV.1.

La elaboración de productos cárnicos depende de la formación de una matriz proteica en el seno del producto. Las proteínas miofibrilares, miosina en el músculo en estado de pre-rigor y actomiosina en el músculo en estado de post-rigor, se consideran los contribuyentes fundamentales a la funcionalidad de los productos cárnicos (Acton y col., 1983; Smith, 1988a). Otras proteínas miofibrilares pueden contribuir, en cierto modo, a la función de la actina y la miosina aunque no parecen ser las principales responsables de la funcionalidad de los productos cárnicos (Acton y col., 1983; Asghar y col., 1985; King y MacFarlane, 1987). De diversas investigaciones se desprende que la miosina es la proteína muscular

Tabla IV. 1. Principales características de las proteínas musculares hidro-salino-solubles (proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares)

Propiedad	Proteínas sarcoplásmicas*	Proteínas miofibrilares**
Peso molecular (promedio)	Bajo (80 000)	Alto (400 000 a 800 000)
Solubilidad	Solubles en agua o soluciones salinas diluidas	Insolubles en agua. Solubles en soluciones salinas concentradas
Capacidad de ligar agua	Muy baja	Muy alta
Viscosidad en solución	Poca	Mucha
Interacción con lípidos	Ligera	Fuerte
Capacidad gelificante	Ninguna, forman coágulos	Alta, forman una matriz proteica

Fuente bibliográfica: Acton y col. (1983)

\* Cantidades relativas de las proteínas sarcoplásmicas: enzimas solubles sarcoplásmicas y mitocondriales (90-93%), mioglobina (4.5-5%), hemoglobina (1.5-1.6%), citocromos y flavoproteínas (1.5-1.6%).

\*\* Cantidades relativas de las proteínas miofibrilares: miosina (50-55%), actina (15-20%), tropomiosina (4-6%), tropomiosina (4-6%), proteína M (3-5%), proteína C (2.5-3%),  $\alpha$ -actinina (2-2.5%),  $\beta$ -actinina (1%).

responsable de las propiedades ligantes de los productos cárnicos (Siegel y Schmidt, 1979a; 1979b).

La extracción de miosina del músculo requiere una solución salina de elevada fuerza iónica y de pH ligeramente alcalino. Se purifica mediante ciclos de precipitaciones repetidas por dilución en agua, seguidas de centrifugación y redisolución en soluciones salinas muy concentradas. Si el periodo de extracción es corto se obtiene una miosina bruta que se denomina miosina A; si es más prolongado se consigue una preparación de actomiosina bruta llamada miosina B (Hultin, 1976). Sin embargo, para cumplir con los objetivos de este estudio, la simplicidad y rapidez se consideraron factores prioritarios porque, de este modo, sería factible una aplicación potencial de nuestro trabajo en la industria cárnica, tanto a nivel de control de calidad como para la reducción del coste en la formulación del producto. Por ello, el proceso de purificación se omitió y los extractos cárnicos obtenidos contenían proteínas musculares tanto miofibrilares como sarcoplásmicas.

Otro aspecto a considerar del tema que nos ocupa es el uso de sales de sodio en lugar de sales de potasio como componentes del tampón utilizado para la extracción de las proteínas musculares. Aunque las sales de potasio han sido las más empleadas en la obtención de miosina (Siegel y Schmidt, 1979a; 1979b), las de sodio se utilizan más frecuentemente en la manufactura de productos cárnicos. La presencia de sal aumenta la fuerza iónica del medio y permite la solubilización y extracción de las proteínas miofibrilares. En este sentido, Trautman

(1966) señala la necesidad de que, en la mayoría de los productos cárnicos, una parte de las proteínas musculares miofibrilares fuera solubilizada con cloruro de sodio antes del tratamiento térmico y Sofos (1986) considera a la sal (ClNa) un elemento esencial para la elaboración de productos cárnicos.

#### IV.2.- HIDROFOBICIDAD DE LAS PROTEINAS CARNICAS HIDRO-SALINO-SOLUBLES

La hidrofobicidad es una propiedad físico-química de las proteínas que ha recibido una atención especial en los últimos años ya que numerosos investigadores han destacado el importante papel que juegan las interacciones hidrofóbicas en las propiedades funcionales de las proteínas alimentarias (Voutsinas y col., 1983a, 1983b; Li-Chan y col., 1985; Nakai y col., 1986).

La cuantificación de la hidrofobicidad proteica puede ser un paso esencial para una determinación exacta de la funcionalidad de las proteínas, aunque la estimación de este parámetro no resulta fácil. En este sentido, se han ensayado diferentes métodos; entre ellos, posiblemente los más empleados por su simplicidad y rapidez son los métodos fluorimétricos, sobre todo los que utilizan marcadores fluorescentes que se fijan en los sitios hidrofóbicos de las proteínas (Clark y Nakai, 1972; Horuchi y col., 1978).

#### IV.2.1.- Hidrofobicidad aromática y alifática

La estructura nativa de las proteínas depende del solvente donde se encuentren. Snyder (1978) sugirió que la diferente polaridad entre los radicales alifáticos y aromáticos es esencial para clasificar los solventes y así, los aromáticos se clasificaron en un grupo distinto de los alifáticos. Hofstee y Otilio (1978) observaron que algunas proteínas eran ligadas preferentemente por adsorbentes alifáticos y otras por adsorbentes aromáticos. Mozhaev y Martinek (1984) señalaron que los residuos aromáticos, a diferencia de los alifáticos, no estaban siempre situados en el interior de la molécula proteica debido a su estructura voluminosa.

Hayakawa y Nakai (1985a) basándose en los estudios anteriormente citados, sugieren que la hidrofobicidad de superficie o efectiva de las proteínas puede ser subclasificada en hidrofobicidad alifática y aromática, aportadas por los residuos alifáticos y aromáticos, respectivamente. Estos autores defienden la hipótesis de que los sitios de fijación a la proteína de los compuestos fluorescentes utilizados para determinar la hidrofobicidad proteica, son distintos, dependiendo de que dichos compuestos posean estructura aromática o alifática y advierten de la importancia de determinar por separado ambas hidrofobicidades considerando la contribución de cada una de ellas a la funcionalidad de las proteínas.

En este trabajo se ha empleado como marcador de los restos aromáticos el ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico (ANS) igual que

hicieron los investigadores últimamente citados. Sin embargo, para la determinación de la hidrofobicidad alifática, se ha utilizado *1,6-dimetyl-retinol* (RET) en lugar del tradicional ácido *cis*-parinárico, ya que para mantener su actividad no precisa de la adición de un anti-oxidante. En la figura 4.1 puede apreciarse la estructura química de dichos compuestos. El RET presenta una cadena alifática hidrocarbonada en su estructura mientras el ANS está compuesto por anillos aromáticos.

#### IV.2.2.- Valoración de la hidrofobicidad

De acuerdo con Kaso y Nakai (1980), en varias investigaciones han utilizado como índice de hidrofobicidad, únicamente, la pendiente de la recta obtenida al representar gráficamente la intensidad de la fluorescencia frente a la concentración de proteína (Hayakawa y Nakai, 1985a, 1985b; Haque y Kinsella, 1987; Bonomi y col., 1988; Mangino y col., 1988). Otros autores evaluaron la hidrofobicidad por el número de sitios de fijación a la proteína del ligando fluorescente (O'Neill y Kinsella, 1988; Lalugant y col., 1991). En este trabajo, para valorar la hidrofobicidad, se investigó la pendiente de dicha recta, así como el número de sitios de fijación a la proteína del compuesto fluorescente utilizado ( $N_{ANS}$  y  $N_{RET}$ ).

#### IV.2.3.- Determinación de la hidrofobicidad aromática (Número de sitios de fijación del ANS por unidad de proteína)

La adición de ANS a las proteínas cármicas hidro-salino-

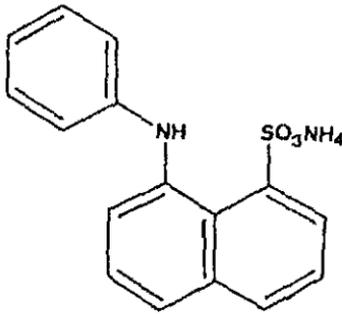
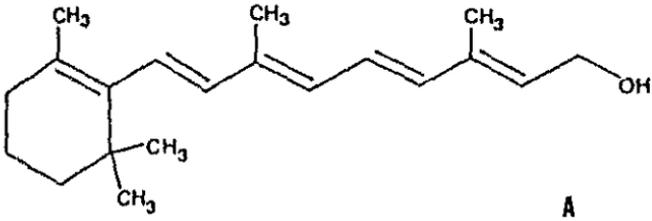


Figura 4.1. Estructura química del all-*trans*-retinol (RET) (A) y de la sal de amonio del ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico (ANS) (B).



solubles se acompaña de un aumento de la intensidad de la fluorescencia (figura 4.2). La curva inferior de la figura 4.2 corresponde a la intensidad de la fluorescencia del ANS en agua destilada, solución que se utilizó como blanco de referencia. En consecuencia, todos los valores se corrigieron respecto de dicho blanco ( $IF_{real} = IF_{ANS-proteína} - IF_{ANS}$ ) (Tabla IV.2).

El número de sitios de fijación del ANS ( $N_{ANS}$ ) por unidad de proteína se obtuvo mediante el análisis de Cogan y col. (1976) (ver apartado III.2.5.4. de Material y Métodos). Representando gráficamente  $Po\alpha$  en función de  $Ro\alpha/1-\alpha$  se obtiene una línea recta de pendiente  $1/n$ , siendo  $n$  igual al número de sitios de fijación del marcador por unidad de proteína. En la tabla IV.3 se recogen los parámetros utilizados en la aplicación del análisis de Cogan y col. (1976) a los valores de intensidad de la fluorescencia obtenidos para el complejo ANS-proteína.

La ecuación de la recta de regresión resultante fue  $y = -1,432 + 1,32x$ , con un coeficiente de correlación de  $r = 0,998$  ( $P < 0,0001$ ) (fig.4.3). A partir de la pendiente de dicha recta se obtuvo la hidrofobicidad aromática o número de sitios de fijación del ANS por unidad de proteína cárnica hidro-salino-soluble, que fue de 0,75 ( $N_{ANS} = 1/pendiente$ ).

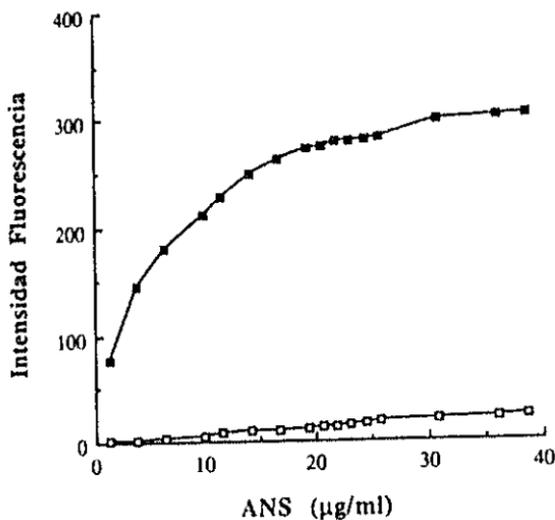


Figura 4.2. Medida de la intensidad de la fluorescencia, en función de varias concentraciones de ANS, del complejo ANS-proteínas cárnicas hidro-salino-solubles ( ■ ) y del ANS en agua destilada ( blanco ) ( □ ).



**Tabla IV. 2.** Valores de la intensidad de fluorescencia del ANS (IFANS) y del complejo ANS-proteína (IFANS-proteína) para diversas concentraciones de ANS

ANS (µg/ml)	IFANS-proteína	IFANS	IFreal*
1,29	77,79	1,32	76,47
3,86	146,49	1,90	144,59
6,43	183,45	3,35	180,11
9,99	215,66	5,26	210,39
11,58	235,12	7,72	227,39
14,15	256,98	8,98	248,01
16,73	272,23	10,23	262,01
19,29	282,95	11,45	271,49
20,59	285,65	13,05	272,59
21,87	291,78	13,78	278,01
23,16	292,73	15,23	277,51
24,45	296,34	16,94	279,39
25,73	299,42	18,52	280,89
30,88	317,53	19,63	297,91
36,03	320,37	20,47	299,89
38,59	323,80	22,50	301,29

\*IFreal = IFANS-proteína - IFANS

Tabla IV. 3. Parámetros utilizados en la aplicación del análisis de Cogan y col. (1976) a los valores de intensidad de la fluorescencia obtenidos para el complejo ANS-proteínas cármicas hidro-salino-solubles

ANS ( $\mu\text{g/ml}$ )	IF	Po $\alpha$	Ro $\alpha / 1 - \alpha$
1,286	76,5	10,801	3,781
3,859	144,6	7,541	4,184
6,433	180,1	5,829	4,329
9,996	210,4	4,379	4,318
11,581	227,4	3,552	3,764
14,153	248,1	2,567	3,043
16,726	262,1	1,885	2,509
19,301	271,5	1,435	2,123
20,586	272,6	1,378	2,162
21,873	278,1	1,116	1,837
23,159	277,5	1,058	1,907
24,446	279,4	0,986	1,879
25,733	280,9	0,159	0,341
30,881	297,9	0,067	0,168
36,026	299,9	0	0
38,601	301,3	0	0

IF = Intensidad de la fluorescencia

Po = Concentración de proteína (14,5  $\mu\text{g/ml}$ )

Ro = Concentración de ANS (ver columna 1)

$\alpha$  =  $\text{IFmáx} - \text{IF} / \text{IFmáx}$

IFmáx = Intensidad de la fluorescencia máxima (a saturación)

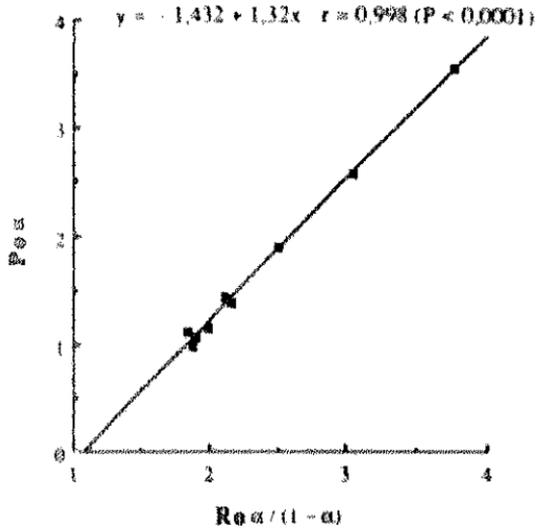


Figura 4.3. Análisis de Cogan y col. (1976) aplicado al sistema ANS-proteínas cármicas hidro-salino-solubles.

#### IV.2.3.- Determinación de la hidrofobicidad alifática (Número de sitios de fijación del RET por unidad de proteína)

La adición de retinol (RET) a las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles se acompaña de un aumento de la intensidad de fluorescencia (IF) (figura 4.4). La curva inferior de la figura 4.4 corresponde a la intensidad de la fluorescencia del RET en etanol absoluto; esta solución se utilizó como blanco de referencia. En consecuencia, todos los valores se corrigieron respecto de dicho blanco ( $IF_{real} = IF_{RET-proteína} - IF_{RET}$ ) (Tabla IV.4).

El número de sitios de fijación del RET por unidad de proteína ( $N_{RET}$ ) se obtuvo del mismo modo señalado en el apartado anterior, a propósito de la obtención del número de sitios de fijación del ANS por unidad de proteína.

La ecuación de la recta de regresión resultante fue  $y = -1,687 + 7,594x$ , con un coeficiente de correlación de  $r = 0,994$  ( $P < 0,0001$ ) (figura 4.5). De la pendiente de dicha recta se obtuvo la hidrofobicidad alifática o número de sitios de fijación del RET por unidad de proteína hidro-salino-soluble que fue de 0,13 ( $N_{RET} = 1/pendiente$ ).

#### IV.2.5.- Tratamiento térmico e hidrofobicidad proteica

Las figuras 4.6 a 4.13 muestran la variación que se produce en

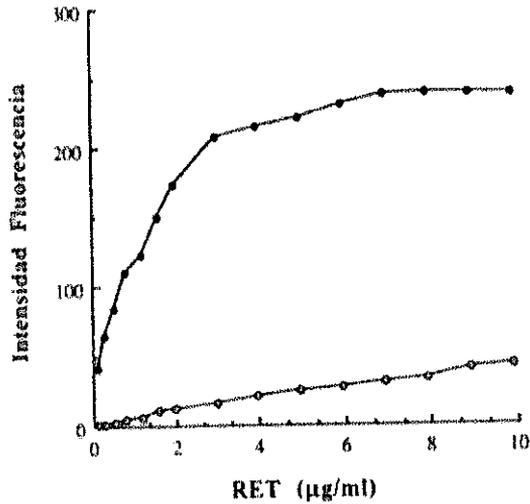


Figura 4.4. Medida de la intensidad de la fluorescencia, en función de varias concentraciones de RET, del complejo RET-proteínas cármicas hidro-salino-solubles (●) y del RET en agua destilada (blanco) (○).

Tabla IV. 4. Valores de la intensidad de fluorescencia del RET (IFRET) y del complejo RET-proteína (IFRET-proteína) para diversas concentraciones de RET

RET ( $\mu\text{g/ml}$ )	IFRET-proteína	IFRET	IFreal*
0,126	42,86	0,63	42,23
0,294	66,66	1,35	65,31
0,504	87,24	2,86	84,38
0,789	114,25	4,55	109,69
1,184	128,77	6,27	122,51
1,579	160,05	10,45	149,59
1,974	184,88	12,58	172,29
2,961	223,15	16,35	206,81
3,948	234,66	20,36	214,29
4,935	245,28	24,68	220,61
5,923	256,35	26,35	230,01
6,909	268,19	30,59	237,59
7,897	271,71	32,61	239,09
8,884	279,46	40,36	239,09
9,871	281,35	42,25	239,09

\*IFreal = IFRET-proteína - IFRET

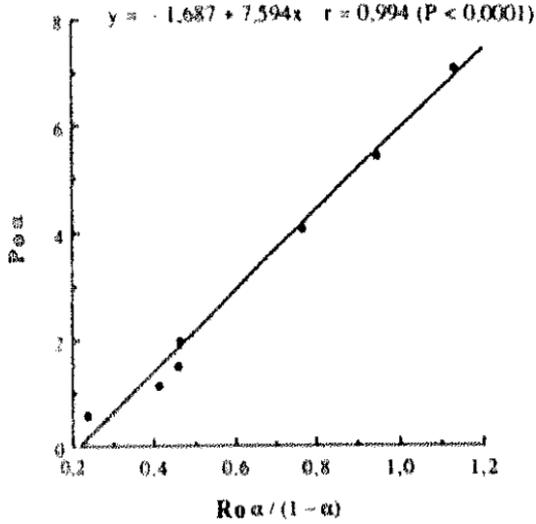


Figura 4.5. Análisis de Cogan y col. (1976) aplicado al sistema RET-proteínas cármicas hidro-salino-solubles.

RESULTADOS Y DISCUSION

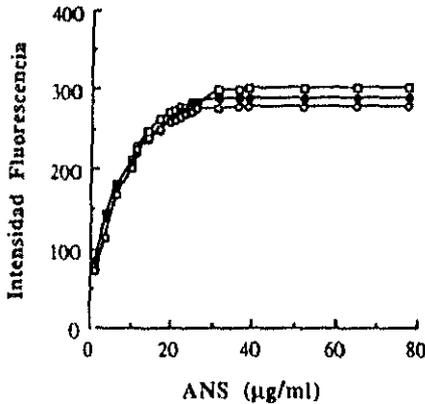


Figura 4.6a. Medida de la intensidad de la fluorescencia, en función de varias concentraciones de ANS, del complejo ANS-proteínas cárnicas hidro-salino-solubles sin tratar ( □ ); tratadas a 40°C durante 30 min ( ● ); tratadas a 50°C durante 30 min ( ⊙ ).

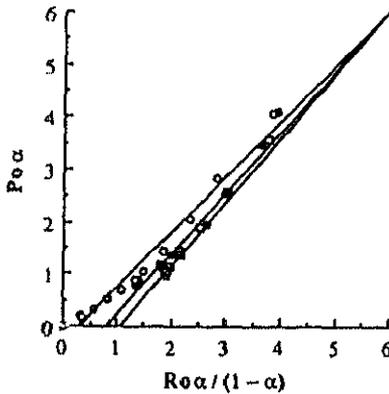


Figura 4.6b. Análisis de Cogan y col. (1976) aplicado al sistema ANS-proteínas cárnicas hidro-salino-solubles sin tratar,  $y = -1,432 + 1,32x$  ( $r = 0,998$   $P < 0,0001$ ) ( □ ); tratadas a 40°C durante 30 min,  $y = -1,0 + 1,228x$  ( $r = 0,989$   $P < 0,0001$ ) ( ● ); tratadas a 50°C durante 30 min,  $y = -0,311 + 1,062x$  ( $r = 0,987$   $P < 0,0001$ ) ( ⊙ ).



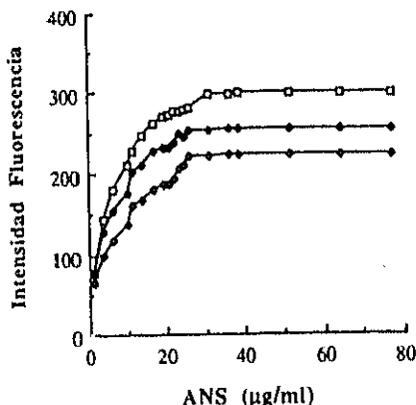


Figura 4.7a. Medida de la intensidad de la fluorescencia, en función de varias concentraciones de ANS, del complejo ANS-proteínas cárnicas hidrosalinosolubles sin tratar ( □ ); tratadas a 60°C durante 30 min ( ▼ ); tratadas a 70°C durante 30 min ( ▲ ).

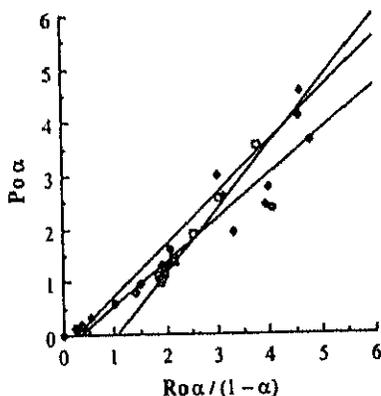


Figura 4.7b. Análisis de Cogan y col. (1976) aplicado al sistema ANS-proteínas cárnicas hidrosalinosolubles sin tratar,  $y = -1,432 + 1,32x$  ( $r = 0,998$   $P < 0,0001$ ) ( □ ); tratadas a 60°C durante 30 min,  $y = -0,285 + 0,979x$  ( $r = 0,982$   $P < 0,0001$ ) ( ▼ ); tratadas a 70°C durante 30 min,  $y = -0,322 + 0,831x$  ( $r = 0,968$   $P < 0,0001$ ) ( ▲ ).

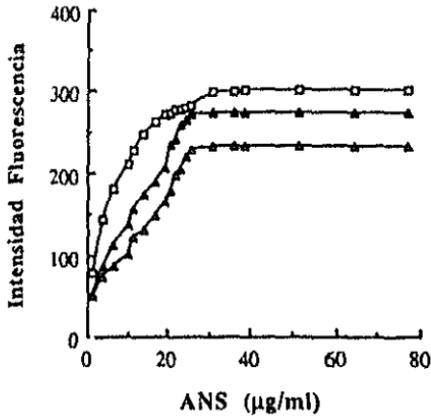


Figura 4.8a. Medida de la intensidad de la fluorescencia, en función de varias concentraciones de ANS, del complejo ANS-proteínas cárnicas hidro-salino-solubles sin tratar ( □ ); tratadas a 80°C durante 30 min ( ▲ ); tratadas a 90°C durante 30 min ( ▲ ).

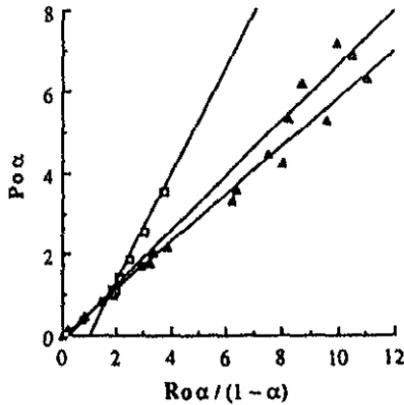


Figura 4.8b. Análisis de Cogan y col. (1976) aplicado al sistema ANS-proteínas cárnicas hidro-salino-solubles sin tratar,  $y = -1,432 + 1,32x$  ( $r = 0,998$   $P < 0,0001$ ) ( □ ); tratadas a 80°C durante 30 min,  $y = -0,182 + 0,688x$  ( $r = 0,991$   $P < 0,0001$ ) ( ▲ ); tratadas a 90°C durante 30 min,  $y = -0,103 + 0,592x$  ( $r = 0,992$   $P < 0,0001$ ) ( ▲ ).

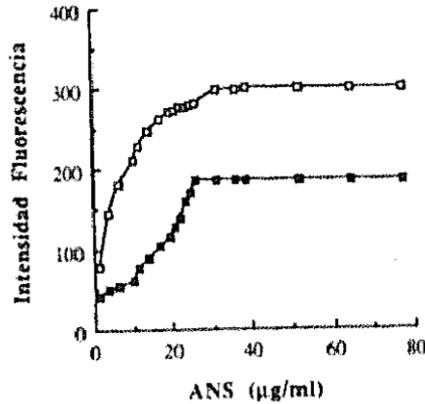


Figura 4.9a. Medida de la intensidad de la fluorescencia, en función de varias concentraciones de ANS, del complejo ANS-proteínas cármicas hidro-salino-solubles sin tratar ( □ ); tratadas a 100°C durante 30 min ( ■ ).

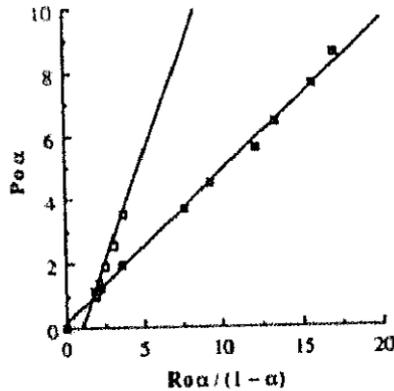


Figura 4.9b. Análisis de Cogan y col. (1976) aplicado al sistema ANS-proteínas cármicas hidro-salino-solubles sin tratar,  $y = -1,432 + 1,32x$  ( $r = 0,998$   $P < 0,0001$ ) ( □ ); tratadas a 100°C durante 30 min,  $y = 0,115 + 0,475x$  ( $r = 0,998$   $P < 0,0001$ ) ( ■ ).

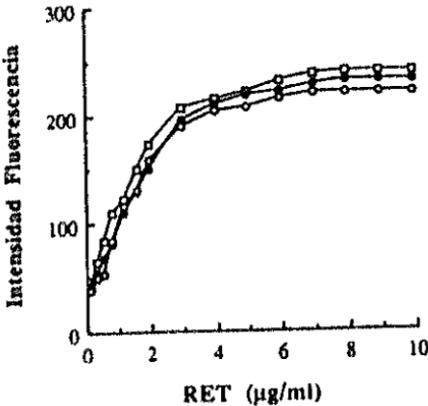


Figura 4.10a. Medida de la intensidad de la fluorescencia, en función de varias concentraciones de RET, del complejo RET-proteínas cármicas hidro-salino-solubles sin tratar ( □ ); tratadas a 40°C durante 30 min ( ● ); tratadas a 50°C durante 30 min ( ○ ).

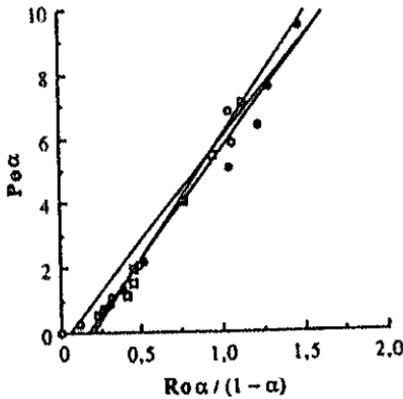


Figura 4.10b. Análisis de Cogan y col. (1976) aplicado al sistema RET-proteínas cármicas hidro-salino-solubles sin tratar,  $y = -1,687 + 7,594x$  ( $r = 0,994$   $P < 0,0001$ ) ( □ ); tratadas a 40°C durante 30 min,  $y = -1,292 + 6,731x$  ( $r = 0,989$   $P < 0,0001$ ) ( ● ); tratadas a 50°C durante 30 min,  $y = -0,636 + 6,355x$  ( $r = 0,982$   $P < 0,0001$ ) ( ○ ).

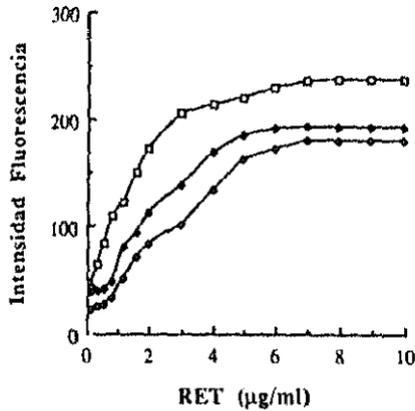


Figura 4.11a. Medida de la intensidad de la fluorescencia, en función de varias concentraciones de RET, del complejo RET-proteínas cármicas hidro-salino-solubles sin tratar ( □ ); tratadas a 60°C durante 30 min ( ▲ ); tratadas a 70°C durante 30 min ( ○ ).

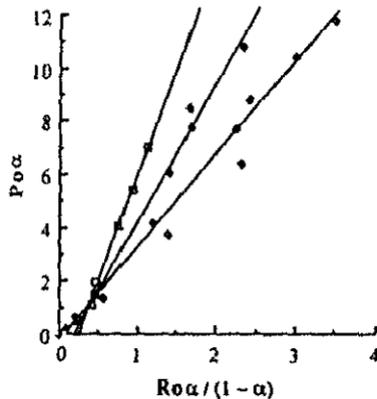


Figura 4.11b. Análisis de Cogan y col. (1976) aplicado al sistema RET-proteínas cármicas hidro-salino-solubles sin tratar,  $y = -1,687 + 7,594x$  ( $r = 0,994$   $P < 0,0001$ ) ( □ ); tratadas a 60°C durante 30 min,  $y = -0,442 + 4,792x$  ( $r = 0,990$   $P < 0,0001$ ) ( ▲ ); tratadas a 70°C durante 30 min,  $y = -0,556 + 3,701x$  ( $r = 0,976$   $P < 0,0001$ ) ( ○ ).

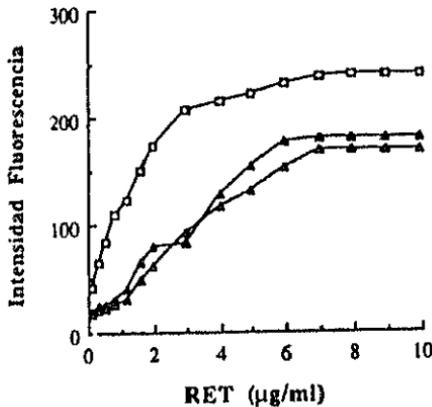


Figura 4.12a. Medida de la intensidad de la fluorescencia, en función de varias concentraciones de RET, del complejo RET-proteínas cárnicas hidro-salino-solubles sin tratar ( □ ); tratadas a 80°C durante 30 min ( ▲ ); tratadas a 90°C durante 30 min ( △ ).

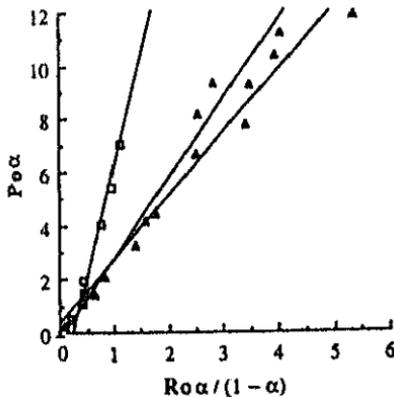


Figura 4.12b. Análisis de Cogan y col. (1976) aplicado al sistema RET-proteínas cárnicas hidro-salino-solubles sin tratar,  $y = -1,687 + 7,594x$  ( $r = 0,994$   $P < 0,0001$ ) ( □ ); tratadas a 80°C durante 30 min,  $y = -0,04 + 2,886x$  ( $r = 0,977$   $P < 0,0001$ ) ( ▲ ); tratadas a 90°C durante 30 min,  $y = 0,19 + 2,397x$  ( $r = 0,989$   $P < 0,0001$ ) ( △ ).

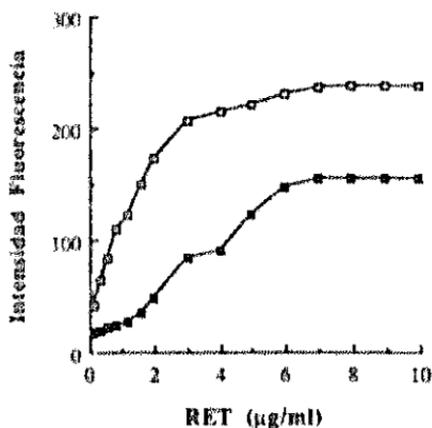


Figura 4.13a. Medida de la intensidad de la fluorescencia, en función de varias concentraciones de RET, del complejo RET-proteínas cármicas hidro-salino-solubles sin tratar ( □ ); tratadas a 100°C durante 30 min ( ■ ).

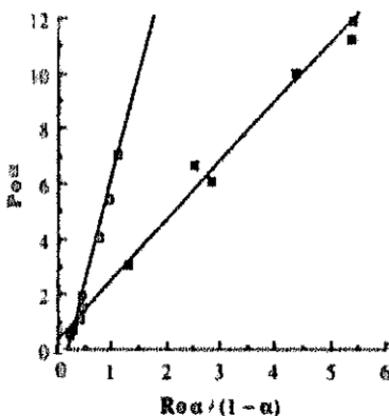


Figura 4.13b. Análisis de Cogan y col. (1976) aplicado al sistema RET-proteínas cármicas hidro-salino-solubles sin tratar,  $y = -1,687 + 7,594x$  ( $r = 0,994$   $P < 0,0001$ ) ( □ ); tratadas a 100°C durante 30 min,  $y = 0,24 + 2,156x$  ( $r = 0,993$   $P < 0,0001$ ) ( ■ ).

la intensidad de la fluorescencia de los complejos ANS-proteína y RET-proteína al someter las proteínas cármicas hidro-salino-solubles a distintos tratamientos térmicos: entre 40°C y 100°C durante 30 minutos. Al aplicar el análisis de Cogan y col. (1976) a los valores de fluorescencia obtenidos, se observa que la pendiente de la recta de regresión, resultante de representar gráficamente  $Po\alpha$  en función de  $Ro\alpha/(1-\alpha)$ , disminuye conforme aumenta el tratamiento térmico; o lo que es lo mismo, el número de sitios de fijación del ANS y del RET por unidad de proteína cármica hidro-salino-soluble aumenta a medida que el tratamiento térmico es más intenso.

Con el marcador ANS, la pendiente de la recta de regresión pasa de 1,32 ( $\pm 0,03$ ) en las proteínas no tratadas, a 0,47 ( $\pm 0,03$ ) en las calentadas a 100°C durante 30 minutos; en consecuencia, el número de sitios de fijación del ANS por unidad de proteína aumenta desde 0,75 a 2,12 (Tabla IV.5).

Si se utiliza como marcador el RET, la pendiente de la recta de regresión pasa de 7,59 ( $\pm 0,02$ ) cuando las proteínas no han sufrido ningún tratamiento, a 2,15 ( $\pm 0,01$ ) cuando han sido calentadas a 100°C durante 30 minutos; por tanto, el número de sitios de fijación del RET por unidad de proteína aumenta desde 0,13 a 0,46 (Tabla IV.6).

Es un hecho demostrado que la mayoría de las proteínas aumentan su hidrofobicidad de superficie debido a los procesos de desnaturalización, ya que los restos hidrófobos localizados en el

**Tabla IV. 5.** Número de sitios de fijación del ANS por unidad de proteína cárnica hidro-salino-soluble en función del tratamiento térmico aplicado

Tratamiento térmico	Pendiente*	N <sub>ANS</sub> **
Ninguno	1,32 ( $\pm$ 0,03)	0,75
40°C · 30 min	1,23 ( $\pm$ 0,05)	0,81
50°C · 30 min	1,06 ( $\pm$ 0,03)	0,94
60°C · 30 min	0,98 ( $\pm$ 0,01)	1,02
70°C · 30 min	0,83 ( $\pm$ 0,07)	1,20
80°C · 30 min	0,69 ( $\pm$ 0,04)	1,45
90°C · 30 min	0,59 ( $\pm$ 0,02)	1,69
100°C · 30 min	0,47 ( $\pm$ 0,03)	2,12

\* Estos datos son una media de 3 ensayos (entre paréntesis se muestran las desviaciones estándar)

\*\* Número de sitios de fijación del ANS por unidad de proteína

Tabla IV. 6. Número de sitios de fijación del RET por unidad de proteína cármica hidro-salino-soluble en función del tratamiento térmico aplicado

Tratamiento térmico	Pendiente*	N <sub>RET</sub> **
Ninguno	7,59 (± 0,02)	0,13
40°C - 30 min	6,73 (± 0,01)	0,15
50°C - 30 min	6,35 (± 0,01)	0,16
60°C - 30 min	4,79 (± 0,08)	0,20
70°C - 30 min	3,70 (± 0,04)	0,27
80°C - 30 min	2,88 (± 0,01)	0,34
90°C - 30 min	2,39 (± 0,03)	0,41
100°C - 30 min	2,15 (± 0,01)	0,46

\* Estos datos son una media de 3 ensayos (entre paréntesis se muestran las desviaciones estándar)

\*\* Número de sitios de fijación del RET por unidad de proteína



interior de las moléculas (Tanford, 1973) se exponen en la superficie cuando éstas se despliegan. Li-Chan y col. (1985) y Xiong y Brekke (1990) constataron este hecho en las proteínas cárnicas sometidas a tratamientos térmicos de hasta 70°C; con temperaturas superiores observaron una caída de la hidrofobicidad. Este descenso parece deberse a la participación de restos hidrófobos en los fenómenos de agregación molecular conducentes a la coagulación, que comienzan a percibirse a dicha temperatura. En el presente trabajo no se ha observado este fenómeno; la hidrofobicidad, tanto aromática como alifática, sigue aumentando incluso con tratamientos térmicos más drásticos (tablas IV.5 y IV.6). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que al desagregarse las partículas coaguladas por homogeneización, con el fin de tomar alícuotas representativas para el análisis, es posible que se produjera la rotura de algunas interacciones hidrófobas y, por ello, los valores de hidrofobicidad continuaban aumentando con el tratamiento térmico.

#### **IV.2.6.- Relación entre porcentaje de aumento de la hidrofobicidad proteica y tratamiento térmico aplicado**

En la Tabla IV.7 se muestran los porcentajes de aumento de la hidrofobicidad aromática y alifática que sufren las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles como consecuencia del tratamiento térmico. Cuando se aplica una temperatura de 50°C durante 30 minutos tanto la hidrofobicidad aromática como la alifática aumentan en un 25% aproximadamente. Con tratamientos térmicos de 70°C durante 30 min,

**Tabla IV. 7.** Efecto del tratamiento térmico en la hidrofobicidad de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles

Tratamiento térmico	Incremento de HAR* (%)	Incremento de HAL** (%)
Ninguno	-	-
40°C - 30 min	8,00	15,38
50°C - 30 min	25,33	23,07
60°C - 30 min	36,00	53,84
70°C - 30 min	60,00	107,69
80°C - 30 min	93,33	161,53
90°C - 30 min	125,11	215,38
100°C - 30 min	182,66	253,84

\* HAR. Hidrofobicidad aromática

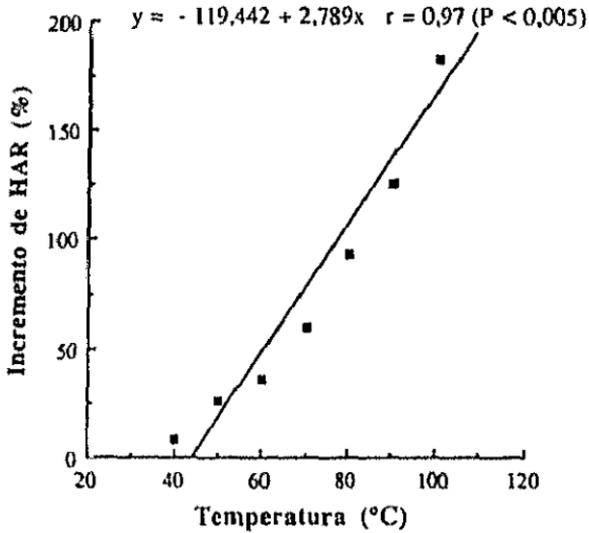
\*\* HAL. Hidrofobicidad alifática



la hidrofobicidad aromática aumenta un 60% mientras que la alifática lo hace en más del 100%. Si el tratamiento térmico es más drástico (100°C, 30 minutos) se alcanzan aumentos de hasta el 182% en la hidrofobicidad aromática y del 253% en la alifática. Mozhaev y Martinek (1984) sugieren que, a diferencia de los restos alifáticos, los restos aromáticos, dada su estructura voluminosa, no siempre se sitúan en el interior de la molécula. En consecuencia, al desplegarse las moléculas por efecto de la desnaturalización, los restos alifáticos de su interior aflorarían a la superficie en mayor proporción que los aromáticos, lo que explicaría el mayor incremento de la hidrofobicidad alifática en relación con la aromática.

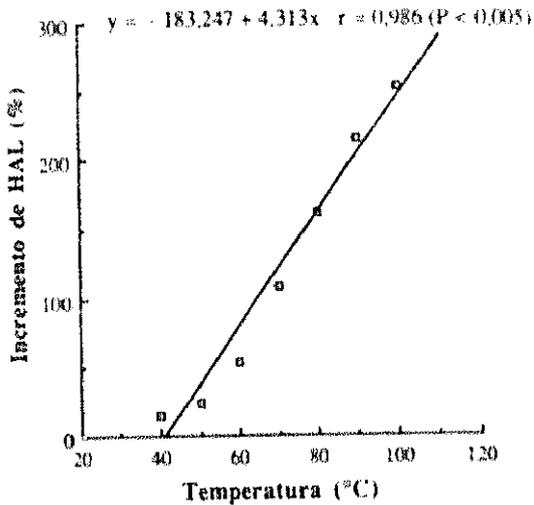
La representación gráfica del porcentaje de aumento de las hidrofobicidades aromática y alifática de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles en función del tratamiento térmico aplicado dió como resultado una línea recta (fig. 4.14 y 4.15). La ecuación de dicha recta en el caso de la hidrofobicidad aromática fue  $y = -119,442 + 2,789x$  y en el de la hidrofobicidad alifática  $y = -183,247 + 4,313x$ .

Los coeficientes de correlación ( $r$ ) obtenidos fueron los suficientemente elevados (0,970 y 0,986 respectivamente) y significativos ( $P < 0,005$ ) como para afirmar que existe una estrecha relación entre el incremento de la hidrofobicidad de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles y la temperatura del tratamiento térmico aplicado.



**Figura 4.14.** Porcentaje de incremento de la hidrofobicidad aromática (HAR) de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles, en función de la temperatura de tratamiento térmico aplicado.





**Figura 4.15.** Porcentaje de incremento de la hidrofobicidad alifática (HAL) de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles, en función de la temperatura del tratamiento térmico aplicado.

#### IV.3.- DETERMINACION DEL CONTENIDO DE GRUPOS SULFHIDRILLO (-SH) DE LAS PROTEINAS CARNICAS HIDRO-SALINO-SOLUBLES

La cantidad de grupos -SH de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles se determinó mediante el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzónico (DTNB), también conocido como "reactivo de Ellman", según la técnica descrita en el apartado III.2.6 de Material y Métodos.

La detección de los grupos -SH con el reactivo de Ellman tiene la ventaja de ser una técnica sencilla, rápida y directa y con ella se obtienen valores comparables a los de otros métodos analíticos (Fernández-Díez y col., 1964).

Sedlak y Lindsay (1968) y posteriormente Kalab (1970), indicaron que uno de los problemas de la determinación de grupos sulfhidrilo mediante esta técnica radicaba en que no todos los grupos -SH presentes reaccionasen con el agente responsable de la coloración (DTNB) debido, probablemente, a que podrían encontrarse enmascarados por la estructura terciaria de la proteína. Por ello, se adicionó urea al tampón de pH 8,0 utilizado en las experiencias ya que, a determinada concentración, altera las estructuras terciaria y secundaria de las proteínas, aumentando la accesibilidad de los grupos sulfhidrilo originariamente ocultos en la molécula proteica (Kella y Kinsella, 1988).

En primer lugar y tras la adición de DTNB a las proteínas cármicas hidro-salino-solubles, se determinó el tiempo necesario para que la reacción colorimétrica se desarrollara en su totalidad, ya que el máximo de absorbancia ( $A_{412}$ ) que indica una unión completa entre los grupos -SH y DTNB varía considerablemente de unas proteínas a otras. Para ello, la absorbancia ( $A_{412}$ ) se leyó a intervalos de un minuto, observándose un desarrollo total del color transcurridos 3 minutos y permaneciendo estable al menos durante 2 horas (figura 4.16). En consecuencia, todas las lecturas se efectuaron a los 10 minutos de haber añadido el reactivo de Ellman a las muestras proteicas.

La cantidad de grupos sulfhidrilo de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles fue de  $61,42 (\pm 0,41) \mu\text{M/g}$  de proteína.

#### **IV.3.1.- Variación del contenido de grupos sulfhidrilo (-SH) de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles según el tratamiento térmico aplicado**

La variación del contenido de grupos -SH de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles por efecto del tratamiento térmico se recoge en la tabla IV.8. Cuando se aplican temperaturas de  $40^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos apenas se observa variación en los grupos -SH (1,01%), pero con tratamientos térmicos de  $50^{\circ}\text{C}$  y  $60^{\circ}\text{C}$ , durante 30 minutos, ya se aprecia una disminución del 4,12 y del 6,36%, respectivamente. Si se aplican  $70^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos el contenido de grupos -SH pasa de  $61,42 (\pm 0,41)$  a  $48,88 (\pm 0,70) \mu\text{M/g}$  proteína; es decir, se reduce en un 20,41%. Este descenso es mucho más acusado

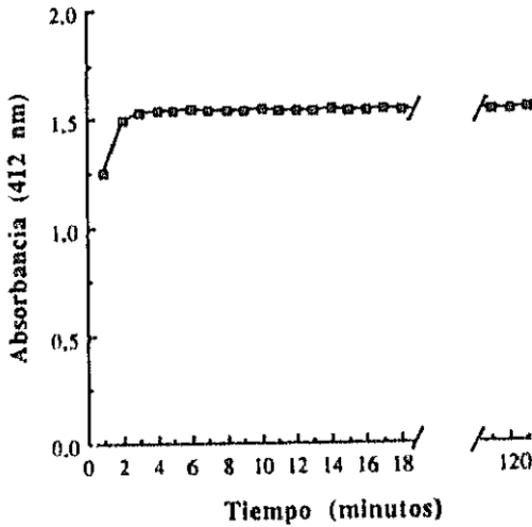


Figura 4.16. Evolución de la absorbancia a 412 nm con el tiempo (minutos) tras la adición a la muestra del reactivo DTNB.

**Tabla IV. 8.** Efecto del tratamiento térmico en el contenido de grupos sulfhidrilo (-SH) de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles

Tratamiento térmico	$\mu\text{M}$ -SH/g prot	% Disminución
Ninguno	61,42 ( $\pm 0,41$ )	-
40°C - 30 min	60,80 ( $\pm 0,53$ )	1,01
50°C - 30 min	58,89 ( $\pm 0,32$ )	4,12
60°C - 30 min	57,51 ( $\pm 0,19$ )	6,36
70°C - 30 min	48,88 ( $\pm 0,70$ )	20,41
80°C - 30 min	41,33 ( $\pm 0,63$ )	32,71
90°C - 30 min	30,05 ( $\pm 0,57$ )	51,07
100°C - 30 min	19,86 ( $\pm 0,51$ )	67,66

\* Estos datos son una media de 7 determinaciones (entre paréntesis se indican las desviaciones estándar)

(51,07%) cuando el tratamiento térmico es de 90°C durante 30 minutos y, si se aplican temperaturas de 100°C durante 30 minutos, la disminución es del 67,66%: el contenido de grupos -SH de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles pasa de 61,42 ( $\pm 0,41$ ) a 19,86 ( $\pm 0,51$ )  $\mu\text{M/g}$  de proteína. En definitiva, a medida que aumenta el tratamiento térmico disminuye el contenido de grupos -SH de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles, disminución que es mucho más acusada cuando se aplican temperaturas de 70°C o superiores durante 30 minutos.

La representación gráfica del porcentaje de disminución del contenido de grupos sulfhidrilo de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles en función del tratamiento térmico aplicado dio como resultado una línea recta (figura 4.17). La ecuación de dicha recta fue  $y = -53,859 + 1,144x$  con un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0,965 ( $P < 0,005$ ), lo suficientemente elevado como para poder afirmar que existe una estrecha relación entre la disminución del contenido de grupos -SH de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles y la magnitud del tratamiento térmico aplicado.

Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por numerosos investigadores que, estudiando la variación de grupos -SH en función del tratamiento térmico en proteínas de soja (Yamagishi y col., 1984), del suero lácteo (Li-Chan, 1983), del pescado (Opstvedt y col., 1984), del huevo (Beveridge y Arntfield, 1979), etc.; constataron una disminución acusada de los grupos sulfhidrilo conforme se incrementaba el tratamiento térmico. En particular, Li-Chan y col. (1985) que trabajaron con proteínas cármicas hidro-salino-solubles, no

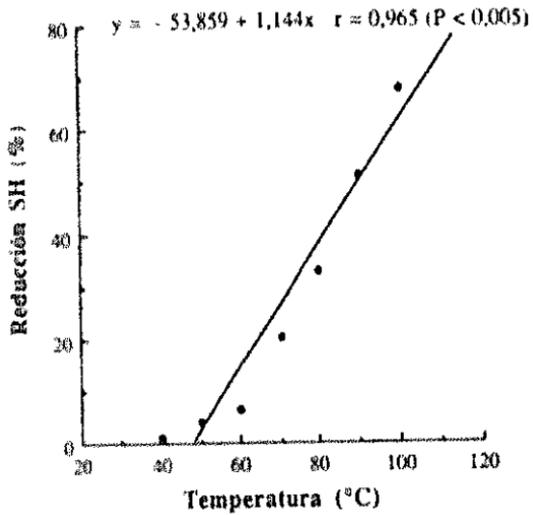


Figura 4.17. Porcentaje de disminución del contenido de sulfhidrido de las proteínas cárnicas hidrosolubles, en función del tratamiento térmico apl

apreciaron variación del contenido de grupos -SH al aplicar temperaturas de 45°C o inferiores, pero con temperaturas mayores de 70°C obtuvieron un descenso similar al que hemos obtenido en el presente trabajo.

La disminución del contenido de grupos -SH de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles podría explicarse por su participación en los mecanismos de desnaturalización y agregación proteicas. En este sentido, Samejima y col. (1981a) postulan que durante el tratamiento térmico de la miosina se produce la agregación de las regiones de la cabeza, lo que se asocia a la oxidación de ciertos grupos sulfhidrilo; así, el calentamiento a 70°C origina una disminución de los grupos -SH de 9,3 a 7,9 moles/10<sup>5</sup> g de proteína. Paralelamente, se producirían también reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro (SH-SS) (Itoh y col., 1979a; 1979b; 1980a; 1980b; Samejima y col., 1981a).

En las proteínas cármicas y a temperaturas más altas (> 80°C), la reacción responsable del descenso de los grupos sulfhidrilo podría ser la formación de H<sub>2</sub>S (Hamm, 1966), fenómeno que también ocurre en otras proteínas alimentarias sometidas a tratamientos térmicos drásticos (Shimada y Cheftel, 1988).

#### IV.4.- DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE LIGAR GRASA DE LAS PROTEINAS CARNICAS HIDRO-SALINO-SOLUBLES

La capacidad de ligar grasa (CLG) es una de las propiedades

funcionales más importantes de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles y probablemente sea la propiedad más sobresaliente en la fabricación de productos cárnicos picados tratados por el calor (Smith, 1988a).

La masa básica de muchos de estos productos está compuesta por diferentes sistemas: solución de proteínas y sales, suspensión de componentes tisulares en el agua existente o añadida, gel de sustancias proteicas del tejido muscular y fijación de células adiposas y grasa libre en el gel de proteínas musculares solubles en agua y sal, en parte en forma de emulsión (Wirth, 1985). En consecuencia, estos productos no necesariamente poseen la forma de una emulsión verdadera: para que se produzca, la grasa debe ser liberada de las células adiposas y encontrarse en estado líquido. Sin embargo, los estudios microscópicos efectuados en productos cárnicos picados tratados por el calor demuestran que, en condiciones óptimas, muchas de las células adiposas mantienen su integridad (Evans y Raken, 1975a; Tinbergen y col., 1977). El calor aplicado induce la formación de una estructura tridimensional (gelificación) y el agua y la grasa quedan atrapadas física o químicamente en la red proteica. Así, las proteínas recubrirían las partículas de grasa y colaborarían en su dispersión a través de la fase continua, sin formar una emulsión verdadera (Lee, 1985; Regenstein, 1989). La integridad de las células adiposas es la responsable de la estabilidad de dichos productos frente al calor, ya que la presencia en la matanza de cantidades crecientes de grasa libre la reducen (Oor y Visser, 1973).

Por lo tanto, a la hora de intentar comprender las relaciones proteína-lípido en los productos cárnicos picados tratados por el calor, el estudio de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas podría resultar más adecuado que el estudio de la capacidad emulsionante.

La capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles se determinó mediante la técnica de Voutsinas y Nakai (1983), modificada por Li-Chan y col. (1985), de acuerdo con la curva patrón de la figura 3.3 (Material y Métodos).

La cantidad de aceite ligado por gramo de proteína fue de 3,54 ( $\pm$  0,14) ml. Esta baja capacidad de ligar grasa podría deberse a la conformación de las proteínas cárnicas hidro-solubles, que no permite a los grupos hidrófobos encontrarse disponibles para interaccionar con las cadenas hidrocarbonadas del aceite (Morr, 1979). Otra razón que explicaría la baja capacidad de ligar grasa, podría radicar en la limitación del acceso del aceite a los grupos hidrófobos de tales proteínas, debido a la presencia de un número excesivo de grupos polares que formarían una barrera protectora alrededor de los grupos hidrófobos de superficie de la proteína (Voutsinas y Nakai, 1983).

#### **IV.4.1.- Variación de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles según el tratamiento térmico aplicado**

La variación de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles por efecto del tratamiento térmico se

recoge en la tabla IV.9 Cuando se aplican temperaturas de 40°C durante 30 min se observa un incremento apreciable de la capacidad de ligar grasa (17,35%), sin embargo, con tratamientos térmicos consecuentes disminuye progresivamente. Así, con temperaturas de 60°C durante 30 min se ligan únicamente 1,77 ( $\pm 0,14$ ) ml de aceite por gramo de proteína, lo que supone un descenso del 49,88% de la capacidad de ligar grasa. Si se aplican tratamientos de 70°C durante 30 min, el aceite ligado pasa de 3,54 ( $\pm 0,14$ ) a 1,54 ( $\pm 0,05$ ) ml por gramo de proteína, es decir, disminuye en un 60,92%.

Este descenso es más acusado (64,13%) cuando el tratamiento térmico es de 90°C durante 30 min, llegando al 79,06% cuando se aplican temperaturas de 100°C: el aceite ligado pasa de 3,54 ( $\pm 0,14$ ) a 0,74 ( $\pm 0,21$ ) ml por gramo de proteína.

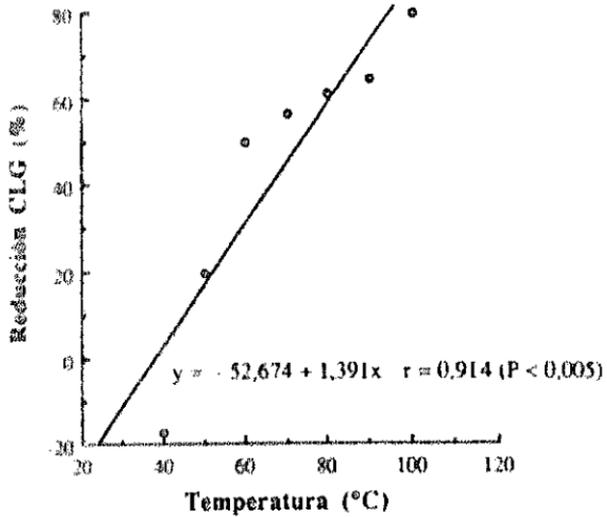
La representación gráfica del porcentaje de disminución de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles en función del tratamiento térmico aplicado dio como resultado una línea recta (figura 4.18) representada por la ecuación:  $y = -52,674 + 1,391x$  cuyo coeficiente de correlación ( $r$ ) fue de 0,914 ( $P < 0,005$ ); esto permite afirmar que existe una estrecha relación entre el porcentaje de disminución de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles y la magnitud del tratamiento térmico aplicado.

Es un hecho demostrado que la desnaturalización por el calor de las proteínas puede traducirse en un descenso o aumento de determinadas propiedades funcionales. En el caso concreto de la capacidad de

**Tabla IV. 9.** Efecto del tratamiento térmico en la capacidad de ligar grasa (CLG) de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles

Tratamiento térmico	ml aceite/ g prot	% Disminución
Ninguno	3,54 ( $\pm 0,14$ )	-
40°C - 30 min	4,15 ( $\pm 0,21$ )	-17,35
50°C - 30 min	2,85 ( $\pm 0,07$ )	19,58
60°C - 30 min	1,77 ( $\pm 0,14$ )	49,88
70°C - 30 min	1,54 ( $\pm 0,05$ )	56,46
80°C - 30 min	1,38 ( $\pm 0,01$ )	60,92
90°C - 30 min	1,27 ( $\pm 0,06$ )	64,13
100°C - 30 min	0,74 ( $\pm 0,21$ )	79,06

\* Estos datos son una media de 7 determinaciones (entre paréntesis se indican las desviaciones estándar)



**Figura 4.18.** Porcentaje de disminución de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles en función del tratamiento térmico aplicado.

ligar grasa de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles, un tratamiento térmico suave produce un aumento debido, probablemente, a la exposición en la superficie de la molécula proteica de numerosos sitios hidrófobos a consecuencia del desplegamiento, lo que permite a la proteína orientarse en la interfase aceite-agua (Morr, 1979). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los señalados por Li-Chan y col. (1985). Estos investigadores observaron un ligero aumento de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles al someterlas a un calentamiento suave y un descenso de un 10-15% con tratamientos térmicos de 50°C durante 30 min; si los tratamientos eran más drásticos (75°C, 30 min), la disminución llegaba hasta el 65%.

#### IV.4.2.- Relación entre propiedades físico-químicas (hidrofobicidad, contenido de grupos sulfhidrilo) y propiedad funcional (capacidad de ligar grasa) de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles

La funcionalidad es la expresión de las propiedades físico-químicas de las proteínas a medida que se modifican por las condiciones del medio. Las propiedades físico-químicas incluyen, entre otras, hidrofobicidad y contenido de grupos sulfhidrilo. Algunos factores extrínsecos, como el calor, influyen en la funcionalidad de las proteínas al alterar sus propiedades moleculares (Wilding y col., 1984).

En la actualidad, la mayor dificultad para estudiar la funcionalidad de las proteínas radica en predecir cómo puede afectar a

la propiedad funcional que se desea estudiar un cambio estructural de la molécula. En el caso de las proteínas alimentarias y, en concreto, en las proteínas cárnicas, debe puntualizarse que el tratamiento térmico, que constituye una etapa primordial en la fabricación de los productos cárnicos picados, da lugar a diversas alteraciones estructurales (y en consecuencia funcionales) de las proteínas cárnicas.

En la primera parte de esta investigación se ha podido comprobar que el tratamiento térmico modifica la hidrofobicidad y el contenido de grupos sulfhidrilo de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles, al aumentar la hidrofobicidad aromática y alifática y disminuir el contenido de grupos sulfhidrilo, conforme aumenta la temperatura del tratamiento térmico aplicado. Se trata ahora de estudiar si existe alguna relación entre la variación de la hidrofobicidad y del contenido de grupos -SH y la variación de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles tratadas térmicamente.

Los coeficientes de correlación ( $r$ ) hallados se muestran en la Tabla IV.10. Cabe destacar, que el coeficiente de correlación más elevado ( $r = 0,836$ ) y, a la vez más significativo ( $P < 0,02$ ), se obtuvo entre la variación de la capacidad de ligar grasa y la de la hidrofobicidad alifática. Por tanto, y dada la relación existente, se efectuaron diversos análisis de *regresión bivariada y multivariada* con el fin de estimar qué parámetros podrían utilizarse para predecir la variación de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles, sometidas a tratamiento térmico.

Tabla IV. 10. Relación entre la capacidad de ligar grasa (CLG) e hidrofobicidad aromática (HAR), alifática (HAL) y contenido de grupos sulfhidrilo (-SH) de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles según el tratamiento térmico aplicado

Variable A	Variable B	r	t
CLG	HAR	0,817*	3,171
CLG	HAL	0,836**	3,407
CLG	-SH	0,785*	2,839

\*  $P < 0,05$

\*\*  $P < 0,02$

r = coeficiente de correlación

t = estadístico de Student

Los resultados del análisis de *regresión bivariada* se detallan en la tabla IV.11. Los coeficientes de determinación obtenidos en todos los supuestos son significativos ( $P < 0.05$  y  $P < 0.025$ ); sin embargo, la variabilidad no expresada por la regresión es bastante alta (p. ej. en el caso del predictor -SH  $\approx 46\%$ ). El coeficiente de determinación más alto ( $R^2 = 0.699$ ), junto con el error estándar más bajo de la estimada ( $SD = 19.735$ ) se obtuvo con la variable "hidrofobicidad alifática". No obstante, y en este caso, la variabilidad no atribuida al predictor también es alta ( $\approx 36\%$ ). Por tanto, ninguno de los parámetros utilizados podría emplearse, por sí sólo, en la predicción de la variación de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles según el tratamiento térmico aplicado.

Los resultados del análisis de *regresión multivariada* se detallan en la tabla IV.12. El mejor coeficiente de determinación múltiple de la variación de la capacidad de ligar grasa ( $R^2_m = 0.776$ ) se obtuvo cuando se emplearon los predictores "variación de la hidrofobicidad alifática" y "variación del contenido de grupos -SH". En los dos primeros supuestos, los coeficientes de determinación múltiple ajustados ( $R^2_{m_2}$ ) disminuyen en relación al obtenido con la variable ática HAL ( $R^2_1 = 0.639$ ) (Tabla IV.11). En el tercer supuesto, en el que se utilizan como predictores HAL y -SH, el coeficiente de determinación ajustado se incrementa de 0.639 a 0.664; sin embargo, los valores t de los coeficientes de regresión parciales no son significativos.

**Tabla IV. 11.** Análisis de regresión bivariada para la predicción de la variación según el tratamiento térmico aplicado de la capacidad de ligar grasa (CLG) de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles

Variable dependiente	Variable independiente	Coefficiente de regresión	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>a</sub>	SD
CLG (n=7)	Constante	11,926	0,668*	0,601	20,726
	HAR	0,432			
CGL (n=7)	Constante	10,203	0,699*	0,639	19,735
	HAL	0,29			
CGL (n=7)	Constante -SH	18,269 1,008	0,617**	0,541	22,253

HAR = % incremento de la hidrofobicidad aromática

HAL = % incremento de la hidrofobicidad alifática

-SH = % disminución del contenido de grupos sulfhidrilo

R<sup>2</sup> = coeficiente de determinación

R<sup>2</sup><sub>a</sub> = coeficiente de determinación ajustado

\*P < 0,025

\*\*P < 0,05

SD = error estándar de la estimada

Tabla IV. 12. Análisis de regresión multivariada para la predicción de la variación según el tratamiento térmico aplicado de la capacidad de ligar grasa (CLG) de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles

Variable dependiente	Variable independiente	Coefficiente de regresión	t	R <sup>2</sup> <sub>ma</sub>	Coefficiente normalizado	F
CLG R <sup>2</sup> <sub>m</sub> = 0,669 P < 0,10 SD = 22,056	Constante	10,173		0,549		
	HAR	-0,041	-0,055		-0,077	0,003
	HAL	0,317	0,644		0,912	0,415
CLG R <sup>2</sup> <sub>m</sub> = 0,724 P < 0,10 SD = 21,125	Constante	-1,209		0,586		
	HAR	1,544	1,244		2,92	1,548
	-SH	-2,714	0,902		-2,115	0,813
CLG R <sup>2</sup> <sub>m</sub> = 0,776 P < 0,10 SD = 19,022	Constante	-3,254		0,664		
	HAL	0,935	1,686		2,691	2,843
	-SH	-2,408	-1,175		-1,876	1,382

HAR, HAL, -SH y SD (ver Tabla IV.11) n = 7 para todos los supuestos

R<sup>2</sup><sub>m</sub> = coeficiente de determinación múltiple

R<sup>2</sup><sub>ma</sub> = coeficiente de determinación múltiple ajustado

t = estadístico de Student

F = estadístico de Fisher

Si se aplica el análisis de *regresión múltiple STEPWISE* (véase pág. 88 de Material y Métodos), el proceso se detiene en la primera etapa; es decir, como mejor modelo de predicción de la variación de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas hidro-salino solubles, se mantiene el que utiliza una única variable, la "variación de la hidrofobicidad alifática".

Varios investigadores (Voutsinas y col., 1983b; Townsend y Nakai, 1983) han constatado la importancia de incluir la hidrofobicidad y el contenido de grupos -SH entre los parámetros predictores de esta propiedad funcional de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles. En este sentido, Li-Chan y col. (1985) incluyen como predictores óptimos de la capacidad de ligar grasa, la interacción hidrofobicidad aromática-alifática y la hidrofobicidad alifática. En su modelo, la variable "hidrofobicidad aromática" también fue de escasa utilidad para pronosticar esta propiedad funcional.

#### **IV.5.- PREDICCIÓN DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO TERMICO EN ALGUNAS PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS Y FUNCIONALES DE LAS PROTEINAS CARNICAS HIDRO-SALINO-SOLUBLES EN FUNCION DE LA VARIACION DE LA ANTIGENICIDAD**

Los estudios de relación estructura-función de las proteínas alimentarias se han llevado a cabo, principalmente, con el fin de predecir la funcionalidad basándose en determinaciones simples y reproducibles de algunas propiedades básicas de las proteínas. Dentro de

estas propiedades, Kilara y Sharkasi (1986) incluyen la antigenicidad como una propiedad química de la molécula proteica que, sin embargo, no se ha utilizado hasta la fecha en el posible pronóstico de la funcionalidad de las proteínas.

Las técnicas inmunológicas se han utilizado en distintos estudios de desnaturalización de las proteínas (ver apartado 1.5.1.3 de Introducción) ya que constituyen métodos muy sensibles para detectar las alteraciones de la estructura proteica ocasionadas por diversos agentes desnaturalizantes.

Por lo tanto, se pretende estudiar si la variación de la antigenicidad debida al tratamiento térmico podría utilizarse como parámetro de la predicción de las posibles modificaciones de algunas propiedades físico-químicas y funcionales de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles. La técnica inmunoenzimática del ELISA indirecto, por su sencillez, precisión, reproductibilidad, bajo coste por ensayo y posibilidad de automatización, ha sido el método analítico que hemos empleado para estimar la variación de la antigenicidad de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles en función del tratamiento térmico aplicado.

#### IV.5.1.- Análisis por inmunodifusión en geles de agarosa, de los inmunosueros obtenidos al inocular en conejos los extractos antigénicos PCHSS (proteínas cárnicas hidro-salino-solubles)

La técnica de inmunodifusión en geles de agarosa ha sido la utilizada para detectar reacciones antígeno-anticuerpo antes, durante y concluido el proceso de inmunización de los conejos. Esta técnica se describe en la sección III.2.4.3. de Material y Métodos.

Antes de inmunizar a los conejos frente a los extractos antigénicos, se les extrajo una muestra de sangre (sangría inicial) y los sueros correspondientes se analizaron frente a los antígenos cárnicos sin que se detectara ninguna reacción antígeno-anticuerpo. En consecuencia, todos los animales se consideraron aptos para el proceso de inmunización.

A lo largo del proceso de inmunización, se realizaron dos sangrías parciales para comprobar si los animales producían anticuerpos frente a las proteínas musculares hidro-salino-solubles que se estaban inoculando.

En la sangría parcial  $S_1$ , efectuada a los 15 días de la primera inoculación, ya se detectaron reacciones de precipitación antígeno-anticuerpo en el suero del conejo nº 1 (Tabla IV.13).

**Tabla IV. 13.** Análisis por inmunodifusión en gel de agarosa de los inmunoseros anti-PCHSS obtenidos en conejos, frente a los extractos antigénicos PCHSS

Sangría	Conejo n° 1	Conejo n° 2	Conejo n° 3	Conejo n° 4
S <sub>0</sub>	-	-	-	-
S <sub>1</sub>	+	-	-	-
S <sub>2</sub>	++	+	+	-
S <sub>F</sub>	+++	++	+++	+

S<sub>0</sub> = Sangría inicial

S<sub>1</sub> = Sangría parcial día 15

S<sub>2</sub> = Sangría parcial día 30

S<sub>F</sub> = Sangría final

(-) = Ausencia de bandas de precipitación

(+) = Presencia de una banda de precipitación

(++) = Presencia de dos bandas de precipitación

(+++)= Presencia de más de dos bandas de precipitación

En los sueros procedentes de la sangría parcial  $S_2$ , realizada a los 30 días de la primera inoculación, aparecieron reacciones de precipitación frente al extracto antigénico en los correspondientes a los conejos nº 2 y nº 3. Paralelamente, en el suero del conejo nº 1 las reacciones de precipitación fueron más intensas pudiendo observarse la aparición de dos bandas.

En la sangría final efectuada a los 60 días de la primera inoculación, todos los sueros obtenidos presentaron reacciones de precipitación frente al extracto antigénico inoculado. Sin embargo, con el suero procedente del conejo nº 4 sólo se evidenció una banda de precipitación en el gel de agarosa, por tanto se desechó, al considerarlo con un nivel de anticuerpos insuficiente frente al extracto antigénico.

#### **IV.5.2.- Condiciones de aplicación de la técnica inmunoenzimática del ELISA indirecto**

##### **A.- Determinación de las concentraciones óptimas de conjugado y anticuerpos a utilizar en las pruebas**

Siguiendo el protocolo experimental descrito en la sección III.2.4.4.E. (Materiales y Métodos), se procedió inicialmente a determinar las concentraciones óptimas de anticuerpos anti-proteínas hidro-salino-solubles de carne de vaca (anti-PCHSS) y de conjugado que intervienen en este ensayo.

La concentración idónea de conjugado se determinó a una

dilución fija de anticuerpos anti-PCHSS de 1/20 y a un rango de concentraciones del extracto antigénico entre 52.200 y 1.59 ng de proteína por ml (Tabla IV.14). La dilución del conjugado 1/5000 es la que permitió una mejor diferenciación de las distintas concentraciones de extracto antigénico PHSSC y la que dio lugar a menor reacción inespecífica en los controles.

A continuación, se determinó la dilución óptima de anticuerpos a una dilución fija de conjugado de 1/5000 y al mismo rango de concentraciones del extracto antigénico (52.000 - 1.59 ng de proteína por ml). La dilución óptima de anticuerpos específicos anti-PCHSS fue la de 1/20 (Tabla IV.15).

### B.- Controles

En todos los ensayos se introdujeron los controles siguientes:

Control A: anticuerpos, conjugado y sustrato, sin antígeno.

Control B: antígeno, conjugado y sustrato, sin anticuerpos.

Control C: antígeno, anticuerpos y sustrato, sin conjugado.

Control D: antígeno, anticuerpos y conjugado, sin sustrato.

En los controles A, sin antígeno, los valores de la densidad óptica a 493 nm oscilaron entre 0.398 y 0.253, lo que indica la existencia de una pequeña adsorción pasiva, en ningún modo representativa, de los anticuerpos a los pocillos de la placa de microtitulación.

Tabla IV. 14. Determinación de la concentración idónea de conjugado a utilizar en las pruebas, a una dilución fija de anticuerpos específicos anti-PCHSS de 1/20 (las cifras que se indican debajo de cada dilución son valores de absorbancia a 405 nm)

Extracto antigénico (ng/ml)	Dilución del conjugado					
	1/500	1/1000	1/2500	1/5000	1/7500	1/10000
52.200,00	2,651	2,636	2,615	2,682	2,405	2,274
26.100,00	2,666	2,575	2,614	2,636	2,073	2,079
13.050,00	2,713	2,641	2,663	2,663	1,842	1,897
6.525,00	2,703	2,609	2,676	2,653	2,341	1,704
3.262,50	2,595	2,574	2,556	2,505	1,735	1,505
1.631,25	2,573	2,576	2,576	2,105	1,283	1,248
815,62	0,865	2,469	2,044	1,181	0,671	0,845
407,81	0,946	2,291	0,917	0,667	0,501	0,606
203,90	0,865	1,313	0,751	0,458	0,486	0,398
101,95	0,868	0,771	0,581	0,392	0,437	0,292
50,97	0,693	0,739	0,429	0,289	0,301	0,279
25,48	0,685	0,634	0,395	0,278	0,261	0,263
12,74	0,581	0,499	0,342	0,264	0,227	0,231
6,37	0,606	0,521	0,321	0,246	0,222	0,282
3,18	0,495	0,462	0,286	0,241	0,228	0,354
1,59	0,516	0,552	0,303	0,236	0,224	0,307

**Tabla IV. 15.** Determinación de la concentración idónea de anticuerpos específicos anti-PCHSS a utilizar en las pruebas, a una dilución fija de conjugado de 1/5000 (las cifras que se indican debajo de cada dilución son valores de absorbancia a 405 nm)

Extracto antigénico (ng/ml)	Diluciones de los anticuerpos específicos anti-PCHSS			
	sin diluir	1/10	1/20	1/40
52.200,00	2,934	2,873	2,634	2,573
26.100,00	2,932	2,864	2,615	2,573
13.050,00	2,855	2,705	2,661	2,618
6.525,00	2,864	2,613	2,607	2,628
3.262,50	2,665	2,555	2,556	2,574
1.631,25	2,507	2,234	2,272	1,765
815,62	1,908	1,704	1,123	0,906
407,81	1,001	1,334	0,917	0,479
203,90	0,621	0,765	0,427	0,345
101,95	0,615	0,627	0,318	0,235
50,97	0,594	0,533	0,275	0,304
25,48	0,601	0,567	0,229	0,222
12,74	0,583	0,498	0,21	0,193
6,37	0,555	0,488	0,209	0,243
3,18	0,634	0,501	0,209	0,221
1,59	0,621	0,49	0,207	0,234

Cuando en los controles se eliminaron los anticuerpos (control B), la absorbancia varió entre 0,390 y 0,241, por lo que la fijación del conjugado al antígeno se consideró prácticamente despreciable.

En los controles en los que no se adicionó el conjugado o el sustrato (controles C y D respectivamente) los valores de la densidad óptica estuvieron comprendidos entre 0,164 y 0,106 y entre 0,048 y 0,047, respectivamente. Es decir, apenas se apreció desarrollo de color indicativo de la reacción.

En consecuencia, el planteamiento de la experiencia era presumiblemente correcto al resultar negativos todos los controles.

### C.- Variación de la concentración de antígeno original detectable según el tratamiento térmico aplicado

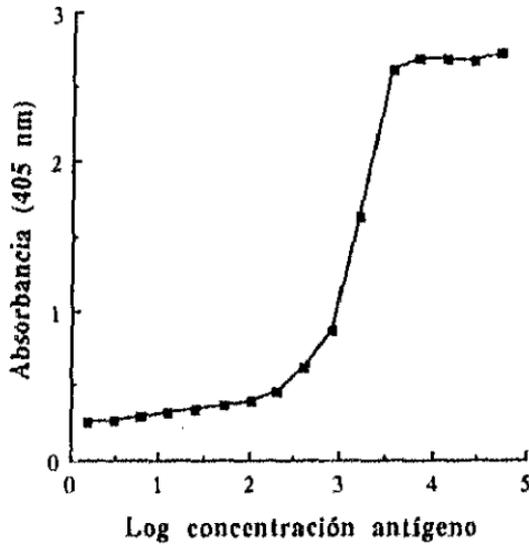
En la tabla IV.16 se muestran los valores de la absorbancia a 405 nm obtenidos al enfrentar siete extractos antigénicos originales (proteínas cármicas hidro-salino-solubles sin tratar por el calor) con el inmunosuero anti-proteínas cármicas hidro-salino-solubles (anti-PCHSS). Con ellos se construyó la gráfica patrón (figura 4.19) y se obtuvo la ecuación de la recta correspondiente a la parte lineal de dicha gráfica, que fue  $y = -7,094 + 2,731x$  ( $r = 0,998$ ) ( $P < 0,0001$ ).

En relación con la gráfica patrón, las figuras 4.20 a 4.23 muestran la variación de los valores de la absorbancia obtenidos al

**Tabla IV. 16.** Valores de absorbancia a 405 nm de diversas concentraciones de antígeno (proteínas cáncero-carbohidro-salino-solubles) (PCHSS) frente al inmunosero anti-PCHSS

Log concentración antígeno	D.O. 405 nm*
4,71	2,734 (± 0,025)
4,41	2,680 (± 0,018)
4,11	2,695 (± 0,017)
3,81	2,700 (± 0,013)
3,55	2,619 (± 0,024)
3,21	1,630 (± 0,017)
2,91	0,874 (± 0,023)
2,60	0,626 (± 0,019)
2,30	0,452 (± 0,015)
2,00	0,395 (± 0,015)
1,70	0,368 (± 0,011)
1,40	0,341 (± 0,009)
1,10	0,312 (± 0,012)
0,80	0,292 (± 0,010)
0,49	0,263 (± 0,013)
0,19	0,250 (± 0,009)

\* Media aritmética de 7 lecturas con su desviación estándar en paréntesis



*Figura 4.19.* Gráfica patrón obtenida al enfrentar las proteínas cármicas hidro-salino-solubles (PCHSS) al inmunosero anti-PCHSS.

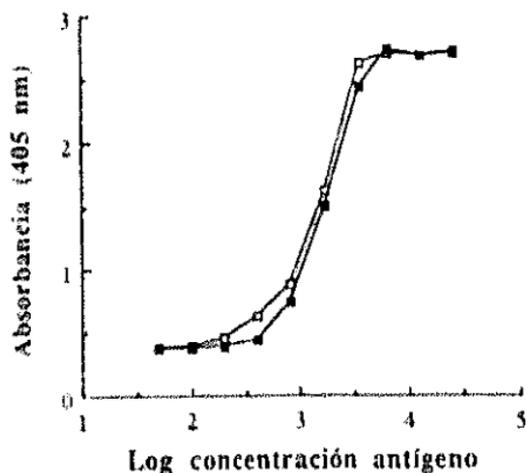


Figura 4.20a. Análisis, mediante la técnica inmunológica del ELISA indirecto, de los extractos cárnicos PCHSS (proteínas cárnicas hidro-salino-solubles) sin tratar ( □ ) y tratadas a 40°C durante 30 min ( ● ).

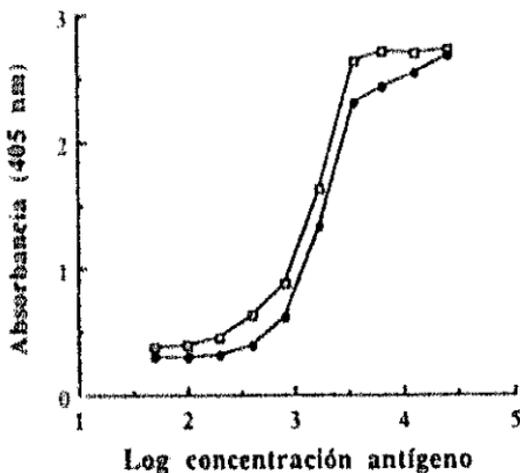


Figura 4.20b. Análisis, mediante la técnica inmunológica del ELISA indirecto, de los extractos cárnicos PCHSS (proteínas cárnicas hidro-salino-solubles) sin tratar ( □ ) y tratadas a 50°C durante 30 min ( ● ).

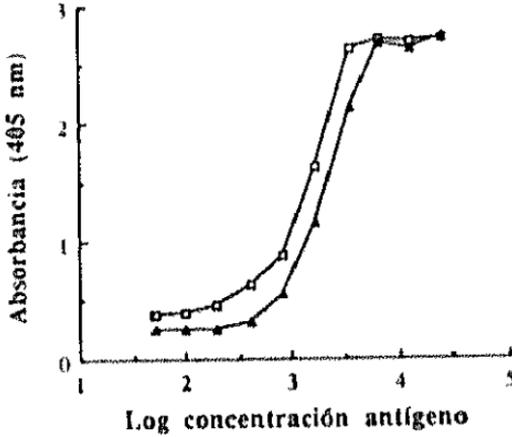


Figura 4.21a. Análisis, mediante la técnica inmunológica del ELISA indirecto, de los extractos cárnicos PCHSS (proteínas cárnicas hidro-salino-solubles) sin tratar ( □ ) y tratadas a 60°C durante 30 min ( ▲ ).

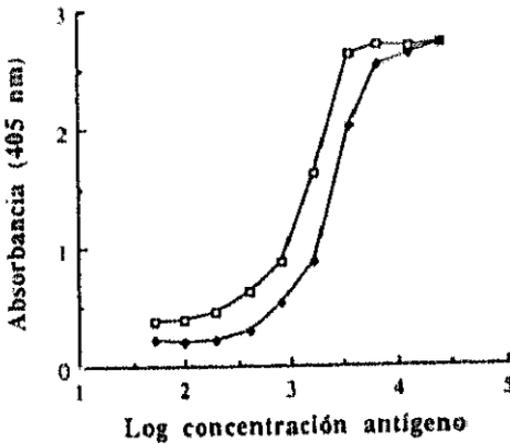


Figura 4.21b. Análisis, mediante la técnica inmunológica del ELISA indirecto, de los extractos cárnicos PCHSS (proteínas cárnicas hidro-salino-solubles) sin tratar ( □ ) y tratadas a 70°C durante 30 min ( ◆ ).

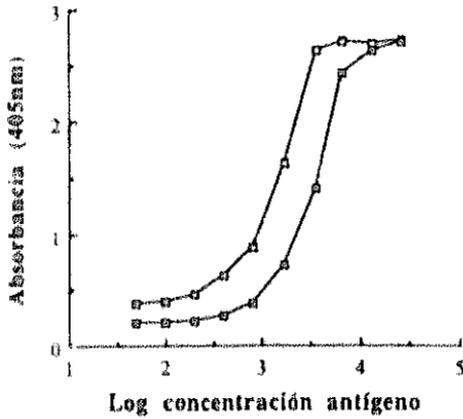


Figura 4.11a. Análisis, mediante la técnica inmunológica del ELISA indirecto, de los extractos cárnicos PCHSS (proteínas cárnicas hidro-salinosolubles) sin tratar ( □ ) y tratadas a 80°C durante 30 min ( △ ).

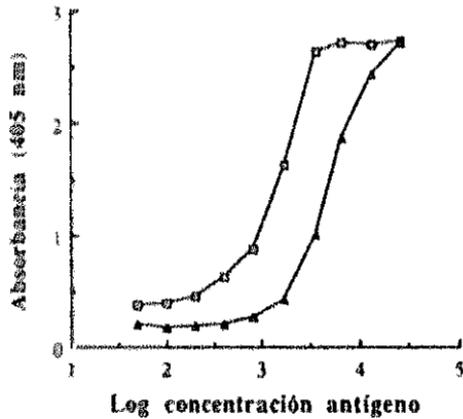


Figura 4.11b. Análisis, mediante la técnica inmunológica del ELISA indirecto, de los extractos cárnicos PCHSS (proteínas cárnicas hidro-salinosolubles) sin tratar ( □ ) y tratadas a 90°C durante 90 min ( △ ).

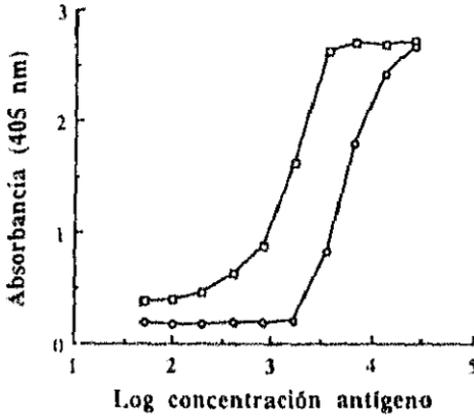


Figura 4.23. Análisis, mediante la técnica inmunológica del ELISA indirecto, de los extractos cárnicos PCHSS (proteínas cárnicas hidro-salino-solubles) sin tratar ( □ ) y tratadas a 100°C durante 30 min ( ○ ).

enfrentar el mismo inmunosuero a proteínas cármicas hidro-salino-solubles sometidas a distintos tratamientos térmicos. La desnaturación de las proteínas por el calor se refleja en el progresivo desplazamiento de la curva a medida que aumenta el tratamiento térmico: entre 40 y 100°C durante 30 minutos; dicho de otra forma, cuanto mayor es el tratamiento térmico aplicado, tanto mayor es la concentración de antígeno necesaria para obtener un valor de absorbancia similar al alcanzado con el antígeno original sin tratar.

En la tabla IV.17 se recogen los porcentajes de disminución del antígeno original detectable a consecuencia del tratamiento térmico. Cuando se aplica una temperatura de 40°C durante 30 minutos se observa una caída del 13,67% en la detección del antígeno original. Con tratamientos térmicos de 50°C durante 30 minutos, sólo reaccionan con su correspondiente inmunosuero 1210,04 ng de los 1621,81 ng de las proteínas cármicas originales, es decir, en torno al 25%. Si se aplicara 70°C durante 30 minutos, la disminución del antígeno original detectable llega aproximadamente al 50% y si el tratamiento térmico es más drástico (100°C-30 min), se alcanza una caída del 71%. En este último caso, únicamente reaccionan con el inmunosuero anti-PCHSS 468,99 ng de los 1621,81 ng originales de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles.

Numerosos investigadores postulan la existencia de antígenos termoestables en el tejido muscular, su poder de reacción no se alteraría a pesar del tratamiento térmico aplicado (Milgrom y col., 1964; Hayden, 1981; Kang'ethe y col., 1985; 1986; Manz, 1985; Kang'ethe y

**Tabla IV. 17.** Variación de la cantidad de antígeno original detectable (proteínas cárnicas hidro-salino-solubles), al aplicarle distintos tratamientos térmicos

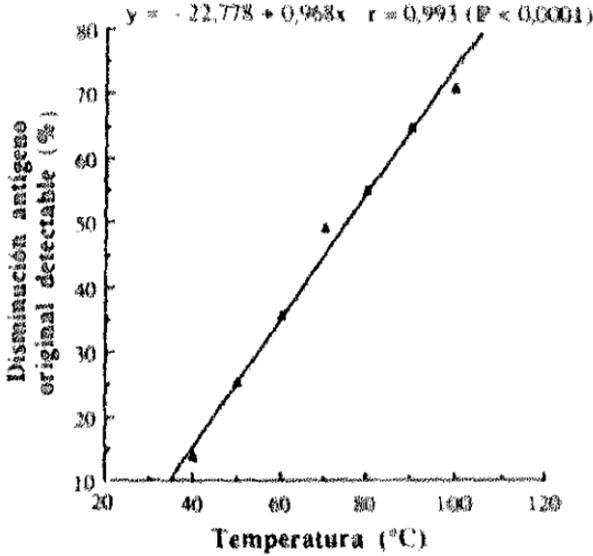
Tratamiento térmico aplicado	Antígeno original detectable (ng /52,2 µg prot)	% Antígeno original detectable	% Disminución del antígeno original detectable
Ninguno	1621,81	100	0
40°C - 30 min	1400,09	86,32	13,67
50°C - 30 min	1210,04	74,61	25,38
60°C - 30 min	1044,91	64,42	35,57
70°C - 30 min	825,85	50,92	49,07
80°C - 30 min	728,96	44,94	55,05
90°C - 30 min	566,98	34,95	65,04
100°C - 30 min	468,99	28,91	71,08

Gathuma, 1987; Sherikar y col., 1988a; Bhilegaonkar y col., 1990). Sin embargo, de acuerdo con Berger y col. (1988) creemos que estos antígenos no presentan estabilidad absoluta frente al calor, ya que cuanto mayor es el tratamiento térmico tanto menor es la intensidad de la reacción antígeno-anticuerpo (ver tabla IV.17).

La disminución del antígeno original detectable debida a la aplicación de calor, es decir, la menor actividad inmunológica a consecuencia de la desnaturalización, implica la destrucción de la estructura cuaternaria de la proteína debido a su subdivisión en subunidades. Sin embargo, se produce simultáneamente una alteración de las estructuras secundaria y terciaria. Ambos cambios conformacionales destruyen los determinantes antigénicos de la proteína (Catsimpoolas y col., 1971), si bien es difícil señalar que tipo de epítopes (secuenciales y/o conformacionales) se destruyen. En conclusión, y de acuerdo con Berger y col. (1988), puede decirse que la caída del antígeno original detectable es un fenómeno dependiente de la temperatura y de la duración del tratamiento térmico aplicado.

Si se representa gráficamente el porcentaje de disminución o caída del antígeno original detectable en función del tratamiento térmico aplicado (Fig. 4.24), se obtiene una línea recta cuya ecuación es  $y = -22,77\% + 0,968x$  ( $r = 0,993$ ) y que posee un coeficiente de correlación muy significativo ( $P < 0,0001$ ), lo que confirma la hipótesis propuesta.

Dada la relación lineal existente entre el antígeno original



**Figura 4.24.** Porcentaje de disminución del antígeno original detectable (proteínas cármicas hidro-salino-solubles), en función del tratamiento térmico aplicado.

detectable y el tratamiento térmico aplicado, la técnica inmunoenzimática ELISA podría tener una aplicación potencial importante en el control de calidad de los productos cárnicos tratados por el calor ya que, podría utilizarse para señalar el tratamiento térmico que hubieran recibido dichos productos.

#### **IV.5.3.- Predicción del efecto del tratamiento térmico en la hidrofobicidad y en el contenido de grupos sulfhidrilo de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles, en función de la variación de la antigenicidad**

Como se ha mencionado anteriormente, la hidrofobicidad y el contenido de grupos sulfhidrilo de las proteínas son, probablemente, los parámetros más utilizados para predecir las propiedades funcionales de las proteínas alimentarias. La hidrofobicidad se ha relacionado con las capacidades emulsionante (Voutsinas y col., 1983a), espumante (Townsend y Nakai, 1983), gelificante (Kato y col., 1981), y de retención de agua (Wood y col., 1984) y el contenido de grupos sulfhidrilo con las capacidades emulsionante (Li-Chan y col., 1985) y gelificante (Voutsinas y col., 1983b) de las proteínas alimentarias.

También se ha señalado que el tratamiento térmico aplicado a las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles modifica su hidrofobicidad, tanto aromática como alifática, y su contenido de grupos sulfhidrilo. Por otra parte, la concentración del antígeno original capaz de reaccionar con su inmunosuero correspondiente anti-PCHSS, detectable

mediante la técnica inmunoenzimática del ELISA indirecto, varía igualmente en función de dicho tratamiento. Se trata por tanto de comprobar si existe alguna relación entre los distintos parámetros considerados; es decir, entre la variación del antígeno original detectable por una parte y las variaciones de la hidrofobicidad y de los grupos -SH de las proteínas cármicas hidro-salino solubles tratadas por el calor por otra.

En los tres supuestos considerados (Tabla IV.18), los coeficientes de correlación ( $r$ ) hallados fueron lo suficientemente elevados (0,941, 0,970 y 0,938) y significativos ( $P < 0,01$  y  $P < 0,001$ ), como para poder afirmar que las variaciones de las hidrofobicidades (aromática y alifática) y del contenido de grupos -SH de las proteínas cármicas hidro-salino solubles, debido al tratamiento térmico aplicado, están estrechamente relacionadas con la variación del antígeno original detectable consecuencia de dicho tratamiento.

A continuación, y dada la relación existente, se investigó la posibilidad de predecir la variación de las hidrofobicidades (aromática y alifática) y del contenido de grupos -SH de las proteínas cármicas hidro-salino solubles tratadas por el calor, en función de la variación del antígeno original detectable. Los resultados de los análisis de regresión bivariada efectuados se muestran en la Tabla IV.19.

El coeficiente de determinación más alto se observa con la variable "variación de la hidrofobicidad alifática" (HAL) ( $R^2 = 0,941$ ;  $P < 0,005$ ) e indica que el 94,1% de la variabilidad de este parámetro

Tabla IV. 18. Relación entre la variación del antígeno original detectable (AG) y las hidrofobicidades aromática (HAR), alifática (HAL) y contenido de grupos sulfhidrilo (-SH) de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles según el tratamiento térmico aplicado

Variable A	Variable B	r	t
AG	HAR	0,941*	6,232
AG	HAL	0,970**	8,953
AG	-SH	0,938*	6,078

\*  $P < 0,01$

\*\*  $P < 0,001$

r = coeficiente de correlación

t = estadístico de Student

**Tabla IV. 19.** Análisis de regresión bivariada para la predicción de la variación, según el tratamiento térmico aplicado, de la hidrofobicidad y del contenido de grupos -SH de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles, en función del antígeno original detectable

Variable dependiente	Variable independiente	Coefficiente de regresión	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>a</sub>	SD
HAR (n=7)	Constante AG	-49,208 2,779	0,886*	0,863	22,972
HAL (n=7)	Constante AG	-77,397 4,359	0,941*	0,93	25,087
-SH (n=7)	Constante AG	-25,164 1,142	0,881*	0,857	9,679

HAR, HAL, -SH y SD (ver Tabla IV.11)

AG = % disminución del antígeno original detectable

\*P < 0,005

R<sup>2</sup> = coeficiente de determinación

R<sup>2</sup><sub>a</sub> = coeficiente de determinación ajustado

puede explicarse en función del porcentaje de reducción del antígeno original detectable. En este sentido, es necesario puntualizar la importancia de las interacciones hidrofóbicas en la unión antígeno-anticuerpo (Eisen, 1979; Berzofsky, 1985) lo que explicaría en parte la relación unión antígeno-anticuerpo e hidrofobicidad. No obstante, en los tres supuestos considerados, los coeficientes de determinación hallados son considerablemente elevados y altamente significativos ( $P < 0.005$ ); en consecuencia, la determinación del porcentaje de reducción del antígeno original detectable mediante la técnica inmunoenzimática del ELISA indirecto, podría emplearse como índice de variación de las hidrofobicidades aromática y alifática y del contenido de grupos sulfhidrilo de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles cuando se someten a distintos tratamientos térmicos.

#### **IV.5.4.- Predicción del efecto del tratamiento térmico en la capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles**

Ya se ha mencionado que la capacidad de ligar grasa (CLG) es una de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles y, quizás, una de las más relacionadas con el mantenimiento de la estructura y estabilidad características de los productos cárnicos picados tratados por el calor. Sin embargo, el calor puede inducir desnaturalización proteica con alteración de determinadas propiedades funcionales; así, se ha comprobado que con tratamientos térmicos de 40°C durante 30 minutos se produce un aumento del 17%

de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles, pero con tratamientos a temperaturas más altas tal capacidad decrece (ver sección IV.4.1). La variación de la capacidad de ligar grasa como consecuencia del tratamiento térmico puede conducir a fallos dramáticos del producto cárnico final que podrían paliarse en gran medida si se pudiera evitar dicha variación.

En el apartado anterior (IV.5.3) se han utilizado los valores del antígeno original detectable por la técnica inmunoenzimática del ELISA indirecto para predecir la variación que sufren algunas propiedades físico-químicas de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles como consecuencia del tratamiento térmico. Se trata ahora de comprobar si se pueden emplear los mismos valores en la predicción de la variación de una propiedad funcional: la capacidad de ligar grasa.

En el análisis de *regresión bivariada* se utilizó como variable dependiente el "porcentaje de reducción de capacidad de ligar grasa" (CLG) y como variable independiente el "porcentaje de reducción del antígeno original detectable" (AG). La ecuación obtenida fue  $CLG = -21,145 + 1,463AG$ . El coeficiente de determinación obtenido ( $R^2 = 0,879$ ) era altamente significativo ( $P < 0,0018$ ) e indica que el 87,9% de la variación de la capacidad de ligar grasa de las proteínas hidro-salino-solubles como consecuencia del tratamiento térmico aplicado podría explicarse en función del porcentaje de reducción del antígeno original detectable mediante la técnica inmunoenzimática ELISA indirecto.

Sin embargo, lo que se pretende conseguir es una ecuación de regresión, con las mejores cualidades predictivas, de la variación de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles, según el tratamiento térmico aplicado. En este sentido, se ha constatado anteriormente (Tabla IV.12) que la variación de la hidrofobicidad alifática y del contenido de grupos -SH de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles sometidas a tratamiento térmico, podrían servir de predictores de la variación de la capacidad de ligar grasa. Por tanto, se trata ahora de comprobar si la inclusión en la ecuación de las variables mencionadas mejora la capacidad predictiva del modelo.

El estudio se realizó mediante dos métodos secuenciales de selección de predictores: a) *Regresión múltiple FORWARD* y b) *Regresión múltiple STEPWISE*.

La *regresión múltiple FORWARD* se desarrolló en dos etapas:

I.- En la primera se añadió una variable única (variación de la hidrofobicidad aromática, o de la alifática o del contenido en grupos -SH) a la ecuación de regresión simple que predice la variación de la capacidad de ligar grasa en función del porcentaje de reducción del antígeno original detectable. En este punto, es necesario recordar que para la ecuación mencionada ( $CLG = -21,145 + 1,463AG$ ) se obtuvieron los datos siguientes (*regresión bivariada*):

$$R^2 = 0,879 \quad (P < 0,0018)$$

$$R^2_a = 0,855$$

$$SD = 12,522$$

Los resultados de la primera etapa del análisis de *regresión múltiple FORWARD* se detallan en la Tabla IV.20. En los tres supuestos considerados, el valor del coeficiente de determinación múltiple ( $R^2_m$ ) aumenta, respecto del simple ( $R^2 = 0.879$ ); sin embargo, este efecto no es siempre significativo.

En el primer supuesto, se observa que:

- a.- El valor t del coeficiente de regresión parcial correspondiente al predictor hidrofobicidad aromática (HAR) no es significativo
- b.- El valor del estadístico F (1,76), indica que la variable HAR no aporta un incremento significativo al coeficiente de determinación múltiple ( $F_{1, 5}$  tabular  $\alpha 0,05 = 6,61$ ).

En el segundo supuesto:

- a.- El valor t del coeficiente de regresión parcial de la variable -SH tampoco es significativo.
- b.- El valor F (6,35) indica que, en este caso, la contribución del predictor -SH al coeficiente de determinación múltiple tampoco es significativa.

De lo dicho se deduce que ninguno de los dos modelos sería adecuado para la predicción de la variación de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles, según el tratamiento térmico aplicado.

**Tabla IV. 20.** Análisis de regresión múltiple FORWARD (1ª etapa) para la predicción de la variación, según el tratamiento térmico aplicado, de la capacidad de ligar grasa (CLG) de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles

Variable dependiente	Variable independiente	Coefficiente de regresión	t	R <sup>2</sup> <sub>ma</sub>	Coefficiente normalizado	F
CLG = 0,916 P < 0,01 SD = 11,658	Constante	-35,997		0,874		
	AG	2,302	3,436**		1,474	11,8
	HAR	-0,302	-1,33		-0,571	1,76
CLG R <sup>2</sup> <sub>m</sub> = 0,953 P < 0,005 SD = 8,702	Constante	-46,647		0,93		
	AG	2,62	5,357***		1,678	28,69
	-SH	-1,013	-2,521		-0,789	6,35
CLG R <sup>2</sup> <sub>m</sub> = 0,971 P < 0,005 SD = 6,878	Constante	-54,795		0,956		
	AG	3,358	6,097***		2,151	37,16
	HAL	-0,435	-3,546***		-1,252	12,57

HAR, HAL, -SH y SD (ver Tabla IV.11) n = 7 para todos los supuestos

AG = % disminución del antígeno original detectable

R<sup>2</sup><sub>m</sub> = R<sup>2</sup><sub>ma</sub> y t (ver Tabla IV.12)

\*\*P < 0,05

\*\*\*P < 0,01

F = estadístico de Fisher

En el tercer supuesto, sin embargo, se observa que:

- a.- El valor t del coeficiente de regresión parcial correspondiente al predictor hidrofobicidad alifática (HAL) es significativo ( $P < 0,05$ ).
- b.- El valor F (12,57) indica que la adición de la variable HAL al modelo, aporta un aumento significativo al coeficiente de determinación múltiple.

Por otra parte, el incremento del coeficiente de determinación ajustado pasa de 0,855 (regresión bivariada CLG/AG, pág. 165) a 0,956 (tabla IV.20) y expresa que la variable adicionada (HAL) tiene una correlación considerable con el criterio (CLG).

En consecuencia, el modelo de predicción de la variación de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles según el tratamiento térmico aplicado (CLG), en función de la variación del antígeno original detectable (AG) y de la variación de la hidrofobicidad alifática (HAL) sería:

$$CLG = -54,795 + 3,358 AG - 0,435 HAL$$

Dicho modelo indicaría que el 95,6% ( $R^2_{ma} = 0,956$ ) de la variación de la capacidad de ligar grasa con el tratamiento térmico, se explica por la combinación de los dos predictores: variación del antígeno original detectable y variación de la hidrofobicidad alifática.

II.- En la segunda etapa del estudio, se añadió otro predictor más al modelo, con el fin de comprobar si se producía una mejora en el nivel de predicción. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla IV.21.

Al añadir como predictor, la variación de la hidrofobicidad aromática (HAR) se observa un aumento del coeficiente de determinación múltiple ( $R^2_m$ ): pasa de 0,971 (tabla IV.20) a 0,982 (tabla IV.21). Sin embargo, este aumento es totalmente artificial ya que el valor t del coeficiente de regresión parcial correspondiente a esta variable no es significativo y, además, el valor F tampoco lo es ( $F_{obtenido} = 1,83 < F_{tabular} = 6,61$ ).

Si se añade como predictor, la variación del contenido de grupos -SH se ve que, además de no ser significativos ni el valor F (0,11), ni el valor t del coeficiente de regresión parcial correspondiente a dicha variable, el coeficiente de determinación múltiple ( $R^2_m$ ), apenas se modifica (de 0,971 a 0,972) y el coeficiente de determinación múltiple ajustado ( $R^2_{ma}$ ) disminuye de 0,956 (tabla IV.20) a 0,944 (tabla IV.21).

Por tanto, la adición de los predictores HAR o -SH al modelo propuesto no se consideró conveniente, dado que no mejoraba su capacidad predictiva. En consecuencia se mantuvo como mejor ecuación predictora de la variación de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles, según el tratamiento térmico aplicado, la que incluía los predictores AG y HAL (pág.171).

Tabla IV. 21. Análisis de regresión múltiple **FORWARD** (2ª etapa) para la predicción de la variación, según el tratamiento térmico aplicado, de la capacidad de ligar grasa (CLG) de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles

Variable dependiente	Variable independiente	Coefficiente de regresión	t	R <sup>2</sup> <sub>ma</sub>	Coefficiente normalizado	F
CLG R <sup>2</sup> <sub>m</sub> = 0,982 P < 0,01 SD = 6,258	Constante	-57,626		0,964		
	AG	3,516	6,833**		2,252	46,68
	HAL	-6,659	-3,229*		1,897	10,88
	HAR	0,295	1,353		0,557	1,83
CLG R <sup>2</sup> <sub>m</sub> = 0,972 P < 0,025 SD = 7,79	Constante	-55,802		0,944		
	AG	3,513	4,566***		2,25	20,85
	HAL	-0,563	-1,411		1,62	1,99
	-SH	0,356	0,344		0,277	0,11

HAR, HAL, -SH y SD (ver Tabla IV.11)

AG = % disminución del antígeno original detectable

R<sup>2</sup><sub>m</sub> = coeficiente de determinación múltiple

R<sup>2</sup><sub>ma</sub> = coeficiente de determinación múltiple ajustado

t = estadístico de Student      F = estadístico de Fisher

\*P < 0,05

\*\*P < 0,01

\*\*\*P < 0,02

El análisis de *regresión múltiple STEPWISE* se llevó a cabo con el fin de evitar la posible multicolinealidad entre los predictores; es decir, permite eliminar las variables que tengan elevadas correlaciones con otros predictores que ya forman parte de un modelo parcial de regresión.

Los resultados de las etapas finales del desarrollo de dicha regresión se muestran en la tabla IV.22. Se observa que cuando se introduce como predictor la variable HAL, se eliminan del modelo final las variables HAR y -SH, alcanzándose la misma ecuación predictora que se obtuvo con el método *FORWARD*. Sin embargo, cuando no se incluye HAL como predictor, también se consigue una ecuación con capacidad predictiva alta ( $R^2_m = 0,994$ ). En otras palabras, existiría colinealidad entre las variables HAL y HAR por una parte, y entre HAL y -SH por otra. En definitiva, los dos modelos que presentan mejor capacidad predictora de la variación según el tratamiento térmico aplicado, de la capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas hidró-salino solubles serían:

$$CLG = -54,795 + 3,358AG - 0,435HAL$$

$$CLG = -53,812 + 2,41AG + 0,98HAR - 3,214SH$$

#### IV.6.- CONSIDERACIONES FINALES

En la actualidad, la mayoría de los estudios que se realizan sobre la relación estructura-función de las proteínas alimentarias, se encaminan a la posible predicción de su funcionalidad basándose en

Tabla IV. 22. Análisis de regresión múltiple STEPWISE para la predicción de la variación, según el tratamiento térmico aplicado, de la capacidad de ligar grasa (CLG) de las proteínas cárnicas hidro-salino-solubles

Variable dependiente	Variable independiente	Predictores finales	Coefficiente de regresión	F parciales	Probabilidad F	Coefficiente normalizado
CLG $R^2_m = 0,971$ $R^2_{ms} = 0,956$ $SD = 6,878$ $P < 0,0009$	Constante	Constante	-54,795			
	AG	AG	3,358	37,168	0,003	2,151
	HAL	HAL	-0,435	12,575	0,023	-1,252
	HAR					
CLG	Constante	Constante	-54,795			
	AG	AG	3,358	37,168	0,003	2,151
	HAL	HAL	-0,435	12,575	0,023	-1,252
	-SH					
CLG	Constante	Constante	-54,795			
	AG	AG	3,358	37,168	0,003	2,151
	HAL	HAL	-0,435	12,575	0,023	-1,252
	HAR					
	-SH					
CLG $R^2_m = 0,994$ $R^2_{ms} = 0,988$ $SD = 3,581$ $P < 0,0008$	Constante	Constante	-53,812			
	AG	AG	2,41	136,224	0,001	1,544
	HAR	HAR	0,98	20,621	0,02	1,853
	-SH	-SH	-3,214	39,401	0,008	-2,505

Misma leyenda tablas anteriores

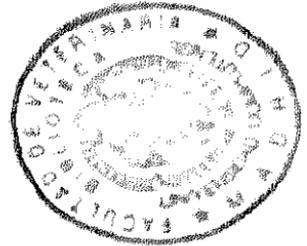
baterías de datos de algunas de sus propiedades físico-químicas (Li-Chan y col., 1987). Sin embargo, debido a la gran variedad de los métodos de selección de predictores hoy existentes, los resultados de los distintos análisis no son comparables; sin embargo, es normal que los diferentes procedimientos de selección lleguen a modelos definitivos integrados por distintas variables predictoras. Así, para predecir la capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas, Li-Chan y col. (1985) utilizaron como variables predictoras las hidrofobicidades aromática y alifática. Más tarde, estos mismos investigadores (Li-Chan y col., 1987) emplearon la solubilidad, la hidrofobicidad alifática y el contenido de grupos -SH. Voutsinas y col. (1983a) incluyen la solubilidad y la hidrofobicidad. Todos ellos, obtienen modelos de elevado poder predictivo aunque las variables empleadas sean distintas.

En el presente trabajo se ha introducido un nuevo predictor antigénico original detectable, habiéndose comprobado que el valor de coeficiente de determinación múltiple aumenta sensiblemente, lo que lo convierte en un parámetro de predicción de primer orden.

En resumen, los valores funcionales pronosticados a partir de las propiedades físico-químicas básicas, son preferibles a la determinación de las propiedades funcionales, dado que las técnicas que miden las propiedades básicas son de más fácil normalización y reproductibilidad. Paradójicamente, la metodología para determinar la funcionalidad con frecuencia está llena de contradicciones por las diferencias de las condiciones o de los aparatos con que se realizan, lo que da lugar a datos con fuertes desviaciones. Una ventaja adicional que tiene el

## RESULTADOS Y DISCUSION

empleo de los valores funcionales pronosticados es que se puede utilizar un juego único con los datos de las propiedades físico-químicas básicas para predecir las diversas propiedades funcionales. En consecuencia, se pueden emplear bancos de datos de las propiedades básicas para conseguir una búsqueda más versátil de los ingredientes adecuados de una mezcla, de acuerdo con la funcionalidad deseada.



## **V. CONCLUSIONES**

1.- Cuando se someten a tratamiento térmico las proteínas cármicas hidro-salino-solubles, se modifican algunas de sus propiedades físico-químicas y funcionales de interés en la elaboración de productos cármicos tratados por el calor.

2.- Al tratar dichas proteínas a temperaturas comprendidas entre 40°C y 100°C, durante 30 minutos, aumentan las hidrofobicidades aromática y alifática, mientras disminuyen su contenido de grupos -SH y su antigenicidad.

3.- La capacidad de ligar grasa de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles aumenta al calentarlas a 40°C durante 30 minutos. Superadas estas temperaturas disminuye tal capacidad.

4.- En las condiciones de los experimentos realizados, la técnica del ELISA indirecto de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles sirve de indicación de la intensidad del tratamiento térmico recibido por los productos cármicos.

5.- Existe una correlación alta y significativa entre la variación de la capacidad de ligar grasa y las variaciones de la hidrofobicidad, del contenido de grupos -SH y de la antigenicidad de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles sometidas a tratamiento térmico.

6.- Todas las variaciones mencionadas sirven de "posibles predictores" en los modelos de regresión bivariada y multivariada (*Forward* y *Stepwise*) empleados en el pronóstico de la variación de la

capacidad de ligar grasa de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles, según el tratamiento térmico aplicado.

7.- Las ecuaciones que mejor pronostican la variación de la capacidad de ligar grasa (CLG) de las proteínas cármicas hidro-salino-solubles según el tratamiento térmico aplicado son:

$$CLG = -21,145 + 1,463AG$$

$$(R^2 = 0,879 \quad P < 0,0018)$$

$$CLG = -54,795 + 3,358AG + 0,435HAL$$

$$(R^2_m = 0,971 \quad P < 0,0009)$$

$$CLG = -53,812 + 2,41AG + 0,98HAR + 3,214SH$$

$$(R^2_m = 0,994 \quad P < 0,0008)$$

donde,

AG = porcentaje de disminución del antígeno original detectable.

HAL = porcentaje de incremento de la hidrofobicidad alifática.

HAR = porcentaje de incremento de la hidrofobicidad aromática.

SH = porcentaje de disminución del contenido de grupos sulfhidrilo.

## VI.- BIBLIOGRAFIA

- ACTON, J. C. y DICK, R. L. (1984). Protein-protein interaction in processed meats. *Proceedings 37th Annual Reciprocal Meat Conference of the American Meat Science Association*. pp. 36-42. June, 17-20. Lubbock, Texas.
- ACTON, J. C. y SAFFLE, R. L. (1972). Emulsifying capacity of muscle protein, phase volumes at emulsion collapse. *J. Food Sci.*, **37**: 904-906.
- ACTON, J. C.; ZIEGLER, G. R. y BURGE, D.L. (1983). Functionality of muscle constituents in the processing of comminuted meat products. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **18**(2): 99-121.
- AHERN, T. J. y KLIBANOV, A. M. (1985). The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100°C. *Science*, **228**(2): 1280-1284.
- ANFISEN, C. B. y SCHERAGA, H. A. (1975). Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Adv. Protein Chem.*, **29**: 205-300.
- ANGLEMIER, A. F. y MONTGOMERY, M. W. (1976). Amino acids, peptides, and proteins. En *Principles of Food Science. Part I: Food Chemistry*. Chapter 5. pp. 205-284. (Fennema, O. R., ed.). Marcel Dekker, Inc., New York.
- AOKI, H.; TANEYAMA, O; ORIMO, N. y KITAGAWA, I. (1981). Effect of lipophilization of soy protein on its emulsion stabilizing properties. *J. Food Sci.*, **46**: 1192-1195.
- ASGHAR, A. y HENRICKSON, R.L. (1982). Chemical, biochemical, functional, and nutritional characteristics of collagen in food systems. *Adv. Food Res.*, **28**: 232-333.
- ASGHAR, A.; SAMEJIMA, K. y YASUI, T. (1985). Functionality of muscle proteins in gelation mechanisms of structured meat products. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **22**(1): 27-106.

- ATASSI, M. Z. y SMITH, J. A. (1978). A proposal for the nomenclature of antigenic sites in peptides and proteins. *Immunochem.*, 15(8): 609-610.
- BAER, A.; OROZ, M. y BLANC, B. (1976). Serological studies on heat-induced interactions of  $\alpha$ -lactalbumin and milk proteins. *J. Dairy Res.*, 43: 419-432.
- BARBUT, S. y MITTAL, G. S. (1988). Rheological and gelation properties of meat batters prepared with three chloride salts. *J. Food Sci.*, 53: 1296-1299, 1311.
- BECHER, P. (1965). En *Emulsions: Theory and Practice*. 2nd ed. p. 2. Reinhold Pub Corp., New York.
- BENJAMIN, D. C.; BERZOFSKY, J. A.; EAST, I. J.; GURD, F. R. N.; HANNUM, C.; LEACH, S. J.; MARGOLIASH, E.; MICHAEL, J. G.; MILLER, A.; PRAGER, E. M.; REICHLIN, M.; SERCARZ, E. E.; SMITH-GILL, S.; TOOD, P. E. y WILSON, A. C. (1984). The antigenic structure of proteins: a reappraisal. *Ann. Rev. Immunol.*, 2: 67-101.
- BENSADOUN, A. y WEINSTEIN, D. (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.*, 70: 241-250.
- BERGER, R. G.; MAGEAU, R. P.; SCHWAB, B. y JOHNSTON, R. W. (1988). Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by Enzyme-linked Immunosorbent Assays. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71: 406-409.
- BERZOFSKY, J. A. (1985). Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. *Science*, 229(9): 932-940.
- BERZOFSKY, J. A. y SCHECHTER, A. N. (1981). The concepts of crossreactivity and specificity in immunology. *Mol. Immunol.*, 18(8): 751-763.

- BEVERIDGE, T. y ARNTFIELD, S. D. (1979). Heat induced changes in sulphhydryl levels in egg white. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **32**: 307-313.
- BEVERIDGE, T.; JONES, L. y TUNG, M. A. (1984). Progel and gel formation and reversibility of gelation of whey, soybean, and albumen protein gels. *J. Agric. Food Chem.*, **32**: 307-313.
- BEVERIDGE, T.; TOMA, S. J. y NAKAI, S. (1974). Determination of SH- and SS- groups in some food proteins using Ellman's reagent. *J. Food Sci.*, **39**: 49-51.
- BHILEGAONKAR, K. N.; SHERIKAR, A. T.; KHOT, J. B. y KARKARE, U. D. (1990). Studies on characterization of thermostable antigens of adrenals and muscle tissues of meat animals. *J. Sci. Food Agric.*, **51**: 545-553.
- BIGELOW, C. C. (1967). On average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. *J. Theoret. Biol.*, **16**: 187-211.
- BONOMI, F.; IAMETTI, S.; PAGLIARINI, E. y PERI, C. (1988). A spectrofluorimetric approach to the estimation of the surface hydrophobicity modifications in milk proteins upon thermal treatment. *Milchwissenschaft.*, **43**: 281-285.
- BORCHET, L.; GREASER, M. L.; BARD, J. C.; CASSENS, R. G. y BRISKEY, E. J. (1967). Electron microscopy of a meat emulsion. *J. Food Sci.*, **32**: 419-421.
- BORDERIAS, A. J.; JIMENEZ-COLMENERO, F. y TEJADA, M. (1985). Viscosity and emulsifying ability of fish and chicken muscle protein. *J. Food Technol.*, **20**: 31-42.
- BORDERIAS, A. J. y MONTERO, P. (1988). Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas en los alimentos. *Rev. Agroquím. Technol. Aliment.*, **28**(2): 159-169.
- BOREJDO, J. (1983). Mapping of hydrophobic sites on the surface of myosin and its fragments. *Biochem.*, **22**: 1182-1187.

- BRETON, C.; PHAN THAN, L. y PARAF, A. (1988). Immunochemical identification and quantification of ovalbumin additive in canned mushrooms. *J. Food Sci.*, 53: 226-230.
- BROWN, D. D. y TOLEDO, R. T. (1975). Relationship between chopping temperatures and fat and water binding in comminuted meat batters. *J. Food Sci.*, 40: 1061-1064.
- BULL, H. B. (1972). Adsorbed surface films of egg albumin. *J. Colloid Interfacial Sci.*, 41(2): 305-310.
- BUTTKUS, H. (1971). The sulfhydryl content of rabbit and trout myosin in relation to protein stability. *Can. J. Biochem.*, 49: 97-107.
- CANTONI, C. y CATTANEO, P. (1974). Reactions between nitrite and SH groups of food during its digestion. *Ind. Aliment.*, 13: 63-68.
- CARPENTER, J. A. y SAFFLE, R. L. (1964). A simple method of estimating the emulsifying capacity of various sausage meats. *J. Food Sci.*, 29: 774-781.
- CATSIMPOOLAS, N.; KENNEY, J. y MEYER, E. W. (1971). The effect of thermal denaturation on the antigenicity of glycinin. *Biochim. Biophys. Acta*, 229: 451-458.
- CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L. y LORIENT, D. (1989). *Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas*. Ed. Acribia, Zaragoza.
- CHOU, P. Y. y FASMAN, G. D. (1978). Empirical prediction of protein conformation. *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 251-276.
- CHOU, D. H. y MORR, C. V. (1979). Protein water interactions and functional properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56(1): 53A-62A.
- CLARK, A. H. y LEE-TUFFNELL, C. D. (1986). Gelation of globular proteins. En *Functional Properties of Food Macromolecules*. pp. 203-272. (Mitchell, J. R. y Ledward, D.

- A., eds.). Elsevier Applied Science Publishers. London & NY.
- CLARKE, R. F. L. y NAKAI, S. (1972). Fluorescent studies of  $\kappa$ -casein with 8-Anilino-naphthalene-1-sulfonate. *Biochim. Biophys. Acta*, **257**: 61-69.
- COGAN, U.; KOPELMAN, M.; MOKADY, S. y SHINITZKY, M. (1976). Binding affinities of retinol and related compounds to retinol binding proteins. *Eur. J. Biochem.*, **65**: 71-78.
- DAMODARAN, S. (1989). Interrelationship of molecular and functional properties of food proteins. En *Food Proteins*. pp. 21-51. (Kinsella, J. E. y Soncie, W. G., eds.). The American Oil Chemists' Society Champaign, IL.
- DOL, E.; KITABATAKE, N.; HATTA, H. y KOSEKI, T. L. (1989). Relationship of SH groups to functionality of ovalbumin. En *Food Proteins*. pp. 252-266. (Kinsella, J. E. y Soncie, W. G., eds.). The American Oil Chemists' Society Champaign, IL.
- EISEN, H. N. (1979). Reacciones antígeno-anticuerpo. En *Inmunología. Introducción a los principios moleculares y celulares de las respuestas inmunitarias*. Capítulo 15. pp. 375-421. Salvat Editores, S.A. Barcelona, España.
- ELLMAN, G. L. (1959). Tissue sulphydryl groups. *Arch. Biol. Biophys.*, **82**: 70-77.
- EVANS, G. G. y RANKEN, M. D. (1975a). Fat cooking losses from non-emulsified meat products. *J. Food Technol.*, **10**: 63-71.
- EVANS, G. G. y RANKEN, M. D. (1975b). Cooking losses in meat products. Part 3. Comminuted mixtures of lean beef and pork fat. B.F.M.I.R.A. Research Report No. 219, Food R. A., Leatherhead, England.
- FERNANDEZ-DIEZ, M. J.; OSUGA, D. T. y FEENEY, R. E. (1964). The sulphydryls of avian ovoalbumin, bovine  $\beta$ -lactoglobulin and bovine serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **107**: 449-458.

- FOEGEDING, E. A. (1988a). Thermally induced changes in muscle proteins. *Food technol.*, 42(6): 58-64.
- FOEGEDING, E. A. (1988b). Gelation in meat batters. *Proceedings 41st Annual Reciprocal Meat Conference of the American Meat Science Association*. pp. 40-43. June, 12-15. Laramie, Wyoming.
- FUTTERMAN, S. y HELLER, J. (1972). The enhancement of fluorescence and the decreased susceptibility to enzymatic oxidation of retinol complexed with bovine serum albumin,  $\beta$ -lactoglobulin, and the retinol-binding protein of human plasma. *J. Biol. Chem.*, 247: 5168-5172.
- FRANZEN, K. L. y KINSELLA, J. E. (1976). Functional properties of succinylated and acetylated leaf protein. *J. Agric. Food Chem.*, 24: 914-919.
- GALLUZO, S. J. y REGENSTEIN, J. M. (1978). Role of chicken breast muscle proteins in meat emulsion formation: myosin, actin and synthetic actomyosin. *J. Food Sci.*, 43: 1761-1765.
- GASKA, M. T. y REGENSTEIN, J. M. (1982). Timed emulsification studies with chicken breast muscle: soluble and insoluble myofibrillar proteins. *J. Food Sci.*, 47: 1438-1443.
- GILLET, T. (1987a). Adipose and connective tissue. En *Advances in Meat Research. Vol. 3. Restructured Meat and Poultry Products*. pp. 73-124. (Pearson, A. M. y Dutson, T. R., eds.). Van Nostrand Reinhold Co., New York.
- GILLET, T. (1987b). Collagen in meat emulsions. En *Advances in Meat Research. Vol. 4. Collagen as a food*. pp. 223-249. (Pearson, A. M. y Dutson, T. R., eds.). Van Nostrand Reinhold Co., New York.
- GILLET, T. A.; MEIBURG, D. E.; BROWN, C. L. y SIMON, S. (1977). Parameters affecting meat protein extraction and interpretation of model system data for meat emulsion formation. *J. Food Sci.*, 42: 1606-1610.

- GIRARD, J.; DANTCHEV, S. y CALDERON, F. (1985). Relationship between temperature and degree of grinding in the cutter and the structure of frankfurter mixtures. *Fleischwirtsch.*, **65**: 811-814.
- GORDON, A. y BARBUT, S. (1990a). The role of the interfacial protein film in meat batter stabilization. *Food Structure*, **9**: 77-83.
- GORDON, A. y BARBUT, S. (1990b). Use of cold stage scanning electron microscopy to study meat batters. *J. Food Sci.*, **55**: 1196-1198.
- GORDON, A. y BARBUT, S. (1991). Raw meat batter stabilization: morphological study of the role of interfacial protein film. *Can. Inst. Sci. Technol. J.*, **24**: 136-142.
- GORNALL, A. C.; BARDAWILL, C. J. y DAVID, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reagent. *J. Biol. Chem.*, **177**: 751-766.
- GRIFFITHS, N. M.; BILLINGTON, M. J.; CRIMES, A. A. y HITCHCOCK, C. H. S. (1984). An assessment of commercially available reagents for an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of soya protein in meat products. *J. Sci. Food Agric.*, **35**: 1255-1260.
- HALLING, P. J. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **15**(2): 155-203.
- HAMANN, D. D. (1988). Rheology as a means of evaluating muscle functionality of processed foods. *Food Technol.*, **42**(6): 66-71.
- HAMM, R. (1966). Heating of muscle systems. En *Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food*. pp. 363-385. (Briskey, E. J.; Caspers, R. G. y Trautman, J. C., eds.). University of Wisconsin Press. Madison.
- HAMM, R. y HOEMANN, K. (1965). Changes in the sulfhydryl and disulphide groups in beef muscle proteins during heating. *Nature*, **207**: 1269-1271.

- HANSEN, L. J. (1960). Emulsions formation in finely comminuted sausage. *Food Technol.*, 14: 565-570.
- HAQUE, Z. y KINSELLA, J. E. (1987). Heat-induced changes in the hydrophobicity of kappa-casein and  $\beta$ -lactoglobulin. *Agric. Biol. Chem.*, 51: 2245-2247.
- HAYAKAWA, S. y NAKAI, S. (1985a). Relationship of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *J. Food Sci.*, 50: 486-491.
- HAYAKAWA, S. y NAKAI, S. (1985b). Contribution of hydrophobicity, net charge and sulfhydryl groups to thermal properties of ovalbumin. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 18: 290-295.
- HAYDEN, A. R. (1981). Use of antisera to heat-stable antigens of adrenals for species identification in thoroughly cooked beef sausages. *J. Food Sci.*, 46: 1810-1813.
- HEER, M. y GOERLICH, R. (1988). Serologische Untersuchungen von hitdenaturiertem Schaffleish. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 39: 78-79.
- HEGG, P. O. (1982). Conditions for the formation of heat-induced gels of some globular proteins. *J. Food Sci.*, 47: 1241-1244.
- HEPPELL, L. M. J. (1985). Determination of milk protein denaturation by an Enzyme-linked immunosorbent assay. En *Immunoassays in Food Analysis*. pp. 115-123. (Morris, B. A. y Clifford, M. N., eds.) Elsevier Applied Science Publishers. NY.
- HEPPELL, L. M. J., CANT, A. J. y KILSHAW, P. J. (1984). Reduction in the antigenicity of whey proteins by heat treatment; a possible strategy for producing a hypoallergenic infant milk formula. *Br. J. Nutr.*, 51: 29-36.
- HERMANSSON, A. M. (1977). Some physico-chemical aspects of the structure formation of proteins. En *Biochemical Aspects of New Protein Food*. p. 99. (Alder-Nissen, J.; Eggum, B. O.; Munck,

- L. y Olson, H. S., eds.). Federation of European Biochemical Societies. Copenhagen. Denmark.
- HERMANSSON, A. M. (1979). Aggregation and denaturation in gel formation. En *Functionality and Protein Structure*. pp. 81-103. (Pour-El, A., ed.). American Chemical Society. Washington, DC.
- HERMANSSON, A. M. (1986). Water- and fat-holding. En *Functional Properties of Food Macromolecules*. pp. 273-314. (Mitchell, J. R. y Ledward, D. A., eds.). Elsevier Applied Science Publishers. London & New York.
- HERMANSSON, A. M.; HARBITZ, O. y LANGTON, M. (1986). Formation of two types of gels from bovine myosin. *J. Sci. Food Agric.* **37**: 69-84.
- HIRAYAMA, A.; TAKAGAKI, Y. y KARUSH, F. (1985). Interaction of monoclonal anti-peptide antibodies with lysozyme. *J. Immunol.*, **134**: 3241-3247.
- HITCHCOCK, C. H. S.; BAILEY, F. J.; CRIMES, A. A.; DEAN, D. A. G. y DAVIS, P. J. (1981). Determination of soya proteins in food using an Enzyme-linked Immunosorbent assay procedure. *J. Sci. Food Agric.* **32**: 157-165.
- HOFSTEE, B. H. J. y OTILLIO, N. F. (1978). Modifying factors in hydrophobicity protein binding by substituted agaroses. *J. Chromatogr.*, **161**: 153-163.
- HORIUCHI, T.; FUKUSHIMA, D.; SUGIMOTO, H. y HATTORI, T. (1978). Studies on enzyme-modified proteins as foaming agents: effects of structure on foam stability. *Food Chem.*, **3**: 35-42.
- HULTIN, H. O. (1976). Characteristics of muscle tissue. En *Principles of Food Science. Part I: Food Chemistry*. Chapter 13. pp. 577- 617. (Fennema, O. R., ed.). Marcel Dekker, Inc., NY.
- HUTTON, C. W. y CAMPBELL, A. M. (1981). Water and fat absorption. En *Protein Functionality in Foods*. pp. 177-200.

- (Cherry, J. P., ed.). ACS Symposium Series n° 147. American Chemical Society. Washington DC.
- ITOH, Y.; YOSHIKAWA, R. e IKEDA, S. (1979a). Behavior of the sulfhydryl groups of carp actomyosin by heating. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 45: 1019-1022.
- ITOH, Y.; YOSHIKAWA, R. e IKEDA, S. (1979b). Effects of cysteine and cystine on the gel formation of formation of fish meat by heating. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 45: 1023-1026.
- ITOH, Y.; YOSHIKAWA, R. e IKEDA, S. (1980a). Changes of higher molecular weight of protein molecules during gel formation of carp actomyosin by heating and participation of SH groups in these changes. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 46: 617-620.
- ITOH, Y.; YOSHIKAWA, R. e IKEDA, S. (1980b). Formation of polymeric molecules of protein resulting from intermolecular SS bonds formed during gel formation of carp actomyosin by heating and participation of SH groups in these changes. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 46: 621-625.
- IWABUCHI, S. y SHIBASAKI, K. (1981). Immunochemical studies of the effect of ionic strength on thermal denaturation of soybean 11S globulin. *Agric. Biol. Chem.*, 45: 285-293.
- JANSSEN, F. W.; WOORTMAN, G. y DE BOAY, J. A. (1987). Detection of wheat gluten, whey protein, casein, ovalbumin and soy protein in heated meat products by electrophoresis, blotting and immunoperoxidase staining. *J. Agric Food Chem.*, 35: 563-567.
- JIANG, S. T.; LAN, C. C. y TSAO, C. Y. (1986). New approach to improve the quality of minced fish products from freeze-thawed cod and mackerel. *J. Food Sci.*, 51: 310-312, 351.
- JONES, K. W. (1984). Protein-lipid interactions in processed meats. *Proceedings 37th Annual Reciprocal Meat Conference of the American Meat Science Association*. pp. 52-56. June, 17-20. Lubbock, Texas.

- JONES, K. W. y MANDINGO, R. W. (1982). Effects of chopping temperature on the microstructure of meat emulsions. *J. Food Sci.*, 47: 1930-1935.
- KALAB, M. (1970). Factors affecting the Ellman determination of sulfhydryl groups in skim milk powder and gels. *J. Dairy Sci.*, 53: 711-718.
- KAMINOGAWA, S.; SHIMIZU, M.; AMETANI, A.; HATTORI, M.; ANDO, O.; HACHIMURA, S.; NAKAMURA, Y.; TOTSUKA, M. y YAMAUCHI, K. (1989). Monoclonal antibodies as probes for monitoring the denaturation process of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochim. Biophys. Acta*, 998: 50-56.
- KANG'ETHE, E. K. y GATHUMA, J. M. (1987). Species identification of autoclaved meat samples using antisera to thermostable muscle antigens in an enzyme immunoassay. *Meat Sci.*, 19: 265-270.
- KANG'ETHE, E. K.; GATHUMA, J. M. y LINDQVIST, K. J. (1986). Identification of the species of origin of fresh, cooked and canned meat and meat products using antisera to thermostable muscle antigens by Ouchterlony's double diffusion test. *J. Sci. Food Agric.*, 37: 157-164.
- KANG'ETHE, E. K.; LINDQVIST, K. J. y GATHUMA, J. M. (1985). Immunological reactions of thermostable muscle antigens and their possible use in speciation of cooked and fresh animal meats. En *Biochemical Identification of Meat Species*. pp.129-144. (Patterson, R.L.S., ed.). Elsevier Applied Science Publishers. London.
- KAREL, M. (1973). Symposium: Protein Interactions in Biosystems. Protein-lipid interactions. *J. Food Sci.*, 38: 756-763.
- KATO, A.; IBRAHIM, H. R.; WATANABE, H.; HONMA, K. y KOBAYASHI, K. (1989). New approach to improve the gelling and surface functional properties of dried egg white by heating in dry state. *J. Agric Food Chem.*, 37: 433-437.

- KATO, A.; IBRAHIM, H. R.; WATANABE, H.; HONMA, K. y KOBAYASHI, K. (1990a). Structural and gelling properties of dry-heating egg white proteins. *J. Agric Food Chem.*, **38**: 32-37.
- KATO, A.; IBRAHIM, H. R.; WATANABE, H.; HONMA, K. y KOBAYASHI, K. (1990b). Enthalpy of denaturation and surface functional properties of heated egg white proteins in the dry state. *J. Food Sci.*, **55**: 1280-1283.
- KATO, A. y NAKAI, S. (1980). Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **624**: 13-20.
- KATO, A.; TSUTSUI, N.; MATSUDOMI, N.; KOBAYASHI, K. y NAKAI, S. (1981). Effects of partial denaturation on surface properties of ovalbumin and lysozyme. *Agr. Biol. Chem.*, **45**(12): 2755-2760.
- KAUZMANN, W. (1959). Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.*, **14**: 1-63.
- KELLA, N. K. D.; BARBEAU, W. E. y KINSELLA, J. E. (1986). Effect of oxidative sulfitolysis of disulfide bonds of glycinin on solubility, surface hydrophobicity, and in vitro digestibility. *J. Agric. Food Chem.*, **34**: 251-256.
- KELLA, N. K. D. y KINSELLA, J. E. (1988). Structural stability of  $\beta$ -lactoglobulin in the presence of kosmotropic salts: a kinetic and thermodynamic study. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **32**: 396-405.
- KESHAVARZ, E. y NAKAI, S. (1979). The relationship between hydrophobicity and interfacial tension of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **576**: 269-279.
- KILARA, A. y SHARKASI, T. Y. (1986). Effects of temperature on food proteins and its implications on functional properties. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **13**(4): 323-395.

- KILSHAW, P. J.; HEPPELL, L. M. J. y FORD, J. E. (1982). Effects of heat treatment of cow's milk and whey on the nutritional quality and antigenic properties. *Arch. Dis. Child.*, **57**: 842-847.
- KING, N. L. y MACFARLANE, J. J. (1987). Muscle proteins. En *Advances in Meat Research-Restructured Meat and Poultry Products*. Vol. 3. pp. 21-72. (Pearson, A. M. y Dutson, T. R., eds.). Van Nostrand Reinhold Co., New York.
- KINSELLA, J. E. (1976). Functional properties of proteins in foods: a survey. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **7**(3): 219-280.
- KINSELLA, J. E. (1979). Functional properties of soy proteins. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **56**: 242-257.
- KINSELLA, J. E. (1982). Relationships between structure and functional properties of food proteins. En *Food Proteins*. (Fox, P. F. y London, J. J., eds.). Applied Science Publishers. London.
- KITABATAKE, N. y DOI, E. (1987). Conformational change of hen egg ovalbumin during foam formation detected by 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid). *J. Agric. Food Chem.*, **35**: 953-957.
- KITABATAKE, N.; SASAKI, H. y DOI, E. (1982). Scanning electron microscopy of freeze-dried protein foams. *Agric. Biol. Chem.*, **46**: 2881-2883.
- KOOLMES, P. A.; MOERMAN, P. C. y ZIJDERVELD, M. H. G. (1989). Image analysis of the fat dispersion in a comminuted meat system. *Food Structure*, **8**: 81-86.
- LALIGANT, A.; DUMAY, E.; CASAS, C.; CUQ, J. L. y CHEFTEL, J. C. (1991). Surface hydrophobicity and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin heated near neutral pH. *J. Agric. Food Chem.*, **39**: 2147-2155.
- LAYNE, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. En *Methods in Enzymology*. Vol. 3. pp. 447-454. (Colowick, S. P. y Kaplan, N. O., eds.). Academic Press. New York.

- LEE, C. (1985). Microstructure of meat emulsions in relation to fat stabilization. *Food Microstructure*, 4: 63-68.
- LI-CHAN, E. (1983). Heat-induced changes in the proteins of whey protein concentrate. *J. Food Sci.*, 48: 47-56.
- LI-CHAN, E.; NAKAI, S. y WOOD, D. F. (1984). Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties. *J. Food Sci.*, 49: 345-350.
- LI-CHAN, E.; NAKAI, S. y WOOD, D. F. (1985). Relationship between functional (fat binding, emulsifying) and physicochemical properties of muscle proteins. Effects of heating, freezing, pH and species. *J. Food Sci.*, 50: 1034-1040.
- LI-CHAN, E.; NAKAI, S. y WOOD, D. F. (1987). Muscle protein structure-function relationships and discrimination of functionality by multivariate analysis. *J. Food Sci.*, 52: 31-41.
- LO, P. R.; DING, H.; LI, C. F. y CHANG, T. C. (1989). Evaluation of the exten of thermal processing of milk by Laurell's rocket immunoelectrophoresis. *J. Chin. Agric. Chem. Soc.*, 27: 379-384.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. y RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- MacRITCHIE, F. (1978). Proteins at interfaces. *Adv. Protein Chem.*, 32: 283-324.
- MANGINO, M. E.; HUFFMAN, L. M. y REGISTER, G. O. (1988). Changes in the hydrophobicity and functionality of whey during the processing of whey protein concentrates. *J. Food Sci.*, 53: 1684-1687.
- MANZ, J. (1985). Nachweis hitzedenaturierter muskelproteine mittels ELISA. *Fleischwirtsch.*, 65: 497-499.

- MARGOSHES, B. A. (1990). Correlation of protein sulfhydryls with the strength of heat-formed egg white gels. *J. Food Sci.*, **55**: 1753, 1756
- MIFEK, K. y GLAWISCHNIG, M. (1989). Nachweis von hitzedenaturiertem Sojaprotein in Fleischwaren mittels Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Ernährung*, **13**: 763-766.
- MIFEK, K. y GLAWISCHNIG, M. (1990). Tierartenspezifierung bei hocherhitzten Fleischwaren mittels Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Ernährung*, **14**: 273-277.
- MILGROM, F.; TUGGAC, Z. M. y WITEBSKY, E. (1964). Studies on species specificity. *J. Immunol.*, **93**: 902-909.
- MORI, T.; NAKAMURA, T. y UTSUMI, S. (1986). Behavior of intermolecular bond formation in the late stage of heat-induced gelation of glycmin. *J. Agric. Food Chem.*, **34**: 33-36.
- MORR, C. V. (1979). Conformation and functionality of milk proteins. En *Functionality and Protein Structure*. (Pour-El, A., ed.). ACS Symposium Series n° 92, pp. 65-79. American Chemical Society, Washington DC.
- MORRISEY, R. A.; MULVIHILL, D. M. y O'NEILL, E. M. (1987). Functional properties of muscle proteins. En *Developments in food proteins-5*. pp. 195-255. (Hudson, B. J. F., ed.) Elsevier Applied Science Publishers. London & New York.
- MOZHAEV, V. V. y MARTINEK, K. (1984). Structure-stability relationships in proteins: new approaches to stabilizing enzymes. *Enzyme Microb. Technol.*, **6**: 50-59.
- NAKAI, S. (1983). Structure-function relationships of food proteins with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity. *J. Agric. Food Chem.*, **31**: 676-683.

- NAKAI, S.; HO, L.; HELBIG, N.; KATO, A. y TUNG, M. A. (1980). Relationship between hydrophobicity and emulsifying properties of some plant proteins. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **13**: 23-27.
- NAKAI, S.; LI-CHAN, E. y HAYAKAWA, S. (1986). Contribution of protein hydrophobicity to its functionality. *Die Nahrung*, **30**: 327-336.
- O'NEIL, T. E. y KINSELLA, J. E. (1988). Effect of heat treatment and modification on conformation and flavor binding by  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Food Sci.*, **53**: 906-909.
- OORD, A. H. A. v. d. y VISSER, P. R. (1973). Beschaffenheit und verteilung von fett in zerkleinerten fleischwaren. *Fleischwirtsch.*, **53**: 1427-1432.
- OPSTVEDT, J.; MILLER, R.; HARDY, R. W. y SPINELLI, J. (1984). Heat-induced changes in sulfhydryl groups and disulfide bonds in fish protein and their effect on protein and aminoacid digestibility in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Agric. Food Chem.*, **32**: 929-935.
- OTANI, H. y HONOSO, A. (1987). Antigenic reactive regions of S-Carboxymethylated  $\beta$ -Lactoglobulin. *Agric. Biol. Chem.*, **51**: 531-536.
- OUCHTERLONY, Ö. (1949). Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **26**: 507.
- PARRIS, N.; PURCELL, J. M. y PTASHKIN, S. M. (1991). Thermal denaturation of whey proteins in skim milk. *J. Agric. Food Chem.*, **39**: 2167-2170.
- PAUL, P. C. y PALMER, H. H. (1972). Colloidal systems in emulsions. En *Food Theory and Applications*. (Paul, P. C. and Palmer, H. H., eds.). Chapter 2. p. 95. John Wiley and Sons, Inc., New York.

- PEARSON, A. M.; SPOONER, M. E.; HEGERTY, G. R. y BRATZLER, L. J. (1965). Emulsifying capacity and stability of soy sodium proteinate, potassium caseinate and non-fat dry milk. *Food Technol.*, 19(12): 1841-1844.
- PLIMPTON, R. F.; OCKERMAN, H. W.; CAHILL, V. R.; POTTER, J. C. y NEER, K. (1972). Emulsion characteristics and processing feasibility of sausage products incorporating unconventional proteins. *Proceedings 18th Annual Meeting European Meat Research Workers*. Part II. pp. 448-456. University of Guelph. Canada.
- POMERANZ, Y. (1973). Interaction between glycolipids and wheat flour macromolecules in bread making. *Adv. Food Res.*, 20: 153-184.
- POOLE, S. y FRY, J. C. (1987). High performance protein foaming and gelation systems. En *Developments in food proteins-5*. pp. 257-297. (Hudson, B. J. F., ed.). Elsevier Applied Science Publishers. London & New York.
- POUR-EL, A. (1981). Protein functionality: classification, definition and methodology. En *Protein Functionality in Foods*. pp. 1- 20. (Cherry, J. P., ed.). ACS Symposium Series n°147. American Chemical Society. Washington DC.
- PRIVALOV, P. I. (1979). Stability of proteins: small globular proteins. *Adv. Protein Chem.*, 33: 167-241.
- PRIVALOV, P. L. (1982). Stability of proteins: proteins wich do not present a single cooperative system. *Adv. Protein Chem.*, 35: 1-104.
- REGENSTEIN, J. M. (1988). Meat batters: why it is not an emulsion. *Proceedings 41st Annual Reciprocal Meat Conference of the American Meat Science Association*. pp. 48-52. June, 12-15. Laramie, Wyoming.
- REGENSTEIN, J. M. (1989). Are comminuted meat products emulsions or a gel matrix?. En *Food proteins*. pp. 178-193.

- (Kinsella, J. E. y Soncie, W. G., eds.). The American Oil Chemists' Society Champaign, IL.
- RYAN, D. S. (1977). Determinants of the functional properties of protein derivatives in foods. En *Food Proteins. Improvement through chemical and enzymatic modifications*. pp. 67-91. (Feeney, R. E. y Whitaker, J. R., eds.). Advances in Chemistry Series n° 160. American Chemical Society. Washington DC.
- SAFFLE, R. L. (1968). Meat emulsions. *Adv. Food Res.*, 16: 105-156.
- SAMEJIMA, K.; ISHIOROSHI, M. y YASUI, T. (1980). Effect of myosin-actin interaction on heat-induced gelation of myosin in the presence of F-actin. *Abstract A-12, 26th Annual Meeting European Meat Research Workers*. August, 31- September, 5. Colorado Springs, CO.
- SAMEJIMA, K.; ISHIOROSHI, M. y YASUI, T. (1981a). Relative roles of the head and tail portions of the molecule in heat-induced gelation of myosin. *J. Food Sci.*, 46: 1412-1418.
- SAWAYA, W. N.; NAMEESH, M. S.; EL-RAYES, E.; HUSAIN, A. y DASHTI, B. (1990). Detection of pork in processed meat by an enzyme-linked immunosorbent assay using antiswine antisera. *J. Food Sci.*, 55: 293-297.
- SAXENA, V. P. y WETLAUFER, D. B. (1970). Formation of three-dimensional structure in proteins. I. Rapid nonenzymatic reactivation of reduced lysozyme. *Biochem.*, 9: 5015-5023.
- SCHMIDT, G. R.; MAWSON, R. F. y SIEGEL, D. G. (1981). Functionality of a protein matrix in comminuted meat products. *Food technol.*, 35(5): 235-237.
- SCHULZE, G. E. y SCHIRMER, R. H. (1979). En *Principles of Protein Structure*. Springer-Verlag. New York.
- SEDLAK, J. y LINDSAY, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, 25: 192-205.

- SHERIKAR, A. T.; KHOT, J. B.; JAYARAO, B. M. y PILLAI, S. R. (1988a). Use of species-specific antisera to adrenal heat-stable antigens for the identification of raw and cooked meats by agar gel diffusion and counter immuno-electrophoretic techniques. *J. Sci. Food Agric.*, **44**: 63-73.
- SHIMADA, K. y CHEFTEL, J. C. (1988). Determination of sulphydryl groups and disulfide bonds in heat-induced gels of soy protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, **36**: 147-153.
- SHIMADA, K. y MATSUSHITA, S. (1980a). Thermal coagulation of egg albumin. *J. Agric. Food Chem.*, **28**: 409-412.
- SHIMADA, K. y MATSUSHITA, S. (1980b). Relationship between thermocoagulation of proteins and amino acid compositions. *J. Agric. Food Chem.*, **28**: 413-417.
- SHIMADA, K. y MATSUSHITA, S. (1981). Effects of salts and denaturants on thermocoagulation of proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **29**: 15-20.
- SHUT, J. (1976). Meat emulsions. En *Food Emulsions*. Chapter 8. (Friberg, S., ed.) Marcel Dekker, Inc., New York.
- SIEGEL, D. G. y SCHMIDT, G. R. (1979a). Crude myosin fractions as meat binders. *J. Food Sci.*, **44**: 1129-1131.
- SIEGEL, D. G. y SCHMIDT, G. R. (1979b). Ionic, pH and temperature effects on the binding ability of myosin. *J. Food Sci.*, **44**: 1686-1689.
- SIKORSKI, Z. E.; SCOTT, D. N. y BUISSON, D. H. (1984). The role of collagen in the quality and processing of fish. *CRC Crit Rev. Food Sci. Nutr.*, **20**(4): 301-343.
- SMITH, D. M. (1988a). Meat proteins: Functional properties in comminuted meat products. *Food technol.*, **42**(4): 116-121.
- SMITH, D. M. (1988b). Factors influencing texture formation in comminuted meats. *Proceedings 41st Annual Reciprocal Meat*

- Conference of the American Meat Science Association*. pp. 44-47. June, 12-15. Laramie, Wyoming.
- SMITH, G. C.; JUNH, H.; CARPENTER, Z. L.; MATTIL, K. F. y CARTER, C. M. (1973). Efficacy of protein additives as emulsion stabilizers in frankfurters. *J. Food Sci.*, **38**: 849-855.
- SNYDER, L. R. (1978). Classification of the solvent properties of common liquids. *J. Chromatogr. Sci.*, **16**: 223-234.
- SOFOS, J. N. (1986). Use of phosphate in low-sodium meat products. *Food Technol.*, **40**(9): 52-68.
- STAINSBY, G. (1986). Foaming and emulsification. En *Functional Properties of Food Macromolecules*. pp. 315-353. (Mitchell, J. R. y Ledward, D. A., eds.). Elsevier Applied Science Publishers. London & New York.
- SWIFT, C. E.; LOCKETT, C. y FRYAR, A. J. (1961). Comminuted meat emulsions: the capacity of meats for emulsifying fat. *Food Technol.*, **15**(11): 468-473.
- SWIFT, C. E.; TOWNSEND, W. E. y WITNAUER, L. P. (1968). Comminuted meat emulsions: relation of the melting characteristics of fat to emulsion stability. *Food Technol.*, **22**(6): 117-120.
- SWIFT, C. E. y SULZBACHER, W. L. (1963). Comminuted meat emulsions: factors affecting meat proteins as emulsion stability. *Food Technol.*, **17**(2): 224-226.
- SYNOWIECKI, J. y SHAHIDI, F. (1991). Heat-induced changes in sulfhydryl groups of harp seal muscle. *J. Agric. Food Chem.*, **39**: 2006-2009.
- SYNOWIECKI, J. y SIKORSKI, Z. E. (1988). Heat induced changes in thiol groups in squid proteins. *J. Food Biochem.*, **12**: 127-135.

- TANFORD, C. (1962). Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of protein. *J. Am. Chem. Soc.*, **84**: 4240-4247.
- TANFORD, C. (1968). Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.*, **23**: 121-282.
- TANFORD, C. (1970). Protein denaturation. *Adv. Protein Chem.*, **24**: 1-95.
- TANFORD, C. (1973). *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*. John Wiley & Sons. New York.
- THENO, D. M. y SCHMIDT, G. R. (1978). Microstructural comparisons of three commercial frankfurters. *J. Food Sci.*, **43**: 845-848.
- TINBERGEN, B. J.; BIERT, M. V. y PFROMMER, G. (1977). Binding en hittestabiliteit bij verkleinde vlees-producten. 3. Aard en voorbereking van het vetweefsel. CIVO-Rapport Nr R 5233 (Januari 1977).
- TINBERGEN, B. J. y OLSMAN, W. J. (1979). Fat cell rupture in a comminuted meat batter as a determinative factor of heat stability. *J. Food Sci.*, **44**: 693-695.
- TORGENSEN, H. y TOLEDO, R. T. (1977). Physical properties of protein preparations related to their functional characteristics in comminuted meat systems. *J. Food Sci.*, **42**: 1615-1620.
- TOWNSEND, A. y NAKAI, S. (1983). Relationships between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins. *J. Food Sci.*, **48**: 588-594.
- TRAUTMAN, J. C. (1966). Effect of temperature and pH on the soluble proteins of ham. *J. Food Sci.*, **31**: 409-418.
- TSAL, R.; CASSENS, R. G. y BRISKEY, E. J. (1972). The emulsifying properties of purified muscle proteins. *J. Food Sci.*, **37**: 286-288.

- TSUTSUI, T.; LI-CHAN, E. y NAKAI, S. (1986). A simple fluorometric method for fat-binding capacity as an index of hydrophobicity of proteins. *J. Food Sci.*, 51: 1268-1272.
- UTSUMI, S. y KINSELLA, J. E. (1985a). Structure-function relationships in foods proteins: subunit interactions in heat-induced gelation of 7S, 11S, and soy isolate proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 33: 297-303.
- UTSUMI, S. y KINSELLA, J. E. (1985b). Forces involved in soy protein gelation: effects of various reagents on the formation, hardness and solubility of heat-induced gels made from 7S, 11S and soy isolate. *J. Food Sci.*, 50: 1278-1282.
- VAN EERD, J. P. (1971). Meat emulsion stability. Influence of hydrophilic lipophilic balance, salt concentration and blending with surfactants. *J. Food Sci.*, 36: 1121-1124.
- VARSHNEY, G. C.; MAHANA, W.; FILLOUX, A. M.; VENIEN, A. y PARAF, A. (1991). Structure of native and heat-denatured ovalbumin as revealed by monoclonal antibodies: epitopic changes during heat treatment. *J. Food Sci.*, 56: 224-227, 233.
- VARSHNEY, G. C. y PARAF, A. (1990). Use of specific polyclonal antibodies to detect heat treatment of ovalbumin in mushrooms. *J. Sci. Food Agric.*, 52: 261-274.
- VOUTSINAS, L. P.; CHEUNG, E. y NAKAI, S. (1983a). Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins. *J. Food Sci.*, 48: 26-32.
- VOUTSINAS, L. P. y NAKAI, S. (1983). A simple turbidimetric method for determining the fat binding capacity of proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 31: 58-63.
- VOUTSINAS, L. P.; NAKAI, S. y HARWALKAR, V. R. (1983b). Relationships between protein hydrophobicity and thermal functional properties of food proteins. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 16: 185-190.

- WAGNER, J. R. y AÑON, M. C. (1990). Influence of denaturation, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates. *J. Food Sci.*, **55**: 765-770.
- WALL, J. S. (1979). Properties of proteins contributing to functionality of cereal foods. *Cereal Foods World*, **24(7)**: 228-292, 313.
- WANG, J. C. y KINSELLA, J. E. (1976). Functional properties of novel proteins: alfalfa leaf protein. *J. Food Sci.*, **41**: 286-292.
- WEBER, G. y YOUNG, L. B. (1964). Fragmentation of bovine serum albumin by pepsin. I. The origin of the acid expansion of the albumin molecule. *J. Biol. Chem.*, **239**: 1415-1423.
- WHITING, R. C. (1988). Ingredients and processing factors that control muscle protein functionality. *Food Technol.*, **42(4)**: 104-114.
- WILDING, P.; LILLFORD, P. J. y REGENSTEIN, J. M. (1984). Functional properties of proteins in foods. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **34B**: 182-189.
- WIRTH, F. (1985). Embutido escaldado. Fijación de agua, fijación de grasa, formación de estructura. *Fleischwirtsch. español*, **2(10)**: 4-14.
- WOLF, W. J. (1970). Soybean proteins: their functional, chemical and physical properties. *J. Agric. Food Chem.*, **18**: 969-976.
- WOLF, W. J. y COWAN, J. C. (1975). *Soybeans as a Food Source*. CRC Press Inc., Cleveland, OH.
- WOOD, D. F.; CAMPBELL, C. A.; LI-CHAN, E. y NAKAI, S. (1984). Hydrophobicity and water-holding capacity of pre- and post-rigor beef neck muscle. *Abstract 38, Canadian Institute of Food Science and Technology 27th Annual Meeting*. Vancouver, Canada.

- XIONG, Y. L. y BREKKE, C. J. (1990). Physicochemical and gelation properties of pre- and postrigor chicken salt-soluble proteins. *J. Food Sci.*, **55**: 1544-1548.
- XIONG, Y. L. y KINSELLA, J. E. (1990). Mechanism of urea-induced whey protein gelation. *J. Agric. Food Chem.*, **38**: 1887-1891.
- YAMAGISHI, T.; TAKAYA, M.; EBINA, F. y YAMAUCHI, F. (1984). Effect of heating temperature on sulfhydryl and disulfide contents and state of aromatic amino acid residues in soybean protein. *Agric. Biol. Chem.*, **48**: 537-539.
- YASUI, T.; ISHIOBOROSHI, M. y SAMEJIMA, K. (1982). Effect of actomyosin on heat-induced gelation of myosin. *Agric. Biol. Chem.*, **46**: 1049-1059.