

CARACTERIZACIÓN MICROESTRUCTURAL DE MEZCLAS DESHIDRATADAS DE POLISACÁRIDOS-PROTEÍNAS POR MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

MICROSTRUCTURAL CHARACTERIZATION OF POLYSACCHARIDES – PROTEINS DRY MIXTURES BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

Carmen Carla Quiroga Ledezma

Centro de Investigaciones Agrícolas y Agroindustriales Andinas – CIAAA

Universidad Privada Boliviana

ccquiroga@upb.edu

(Recibido el 15 enero 2013, aceptado para publicación el 8 julio 2013)

RESUMEN

Las microestructuras de mezclas de amilosa – β -lactoglobulina (AM- β lg) y amilopectina - patatina (AP-PA), formadas a partir de la deshidratación de soluciones de diferentes concentraciones y diferentes relaciones polisacárido:proteína, se estudiaron usando Microscopía de Fuerza Atómica (Atomic Force Microscopy – AFM). Los resultados se confirmaron por Microscopía de Transmisión Electrónica (Transmission Electron Microscopy – TEM). Los compuestos puros mostraron estructuras lisas, aunque entre los polisacáridos, la amilosa tuvo una estructura más rugosa, y entre las proteínas la patatina. Las proteínas naturales mostraron diferentes estructuras en comparación con las proteínas tratadas térmicamente, que mostraron estructuras rugosas, resultado de la agregación de sus moléculas. Los sistemas polisacáridos-proteínas mostraron estructuras que no sufrieron una segregación de fases a relaciones polisacárido:proteína igual a 1:1 para la AM: β lg y mayores a 1:1 para AP:PA, y que sufrieron una segregación de fases a relaciones menores a 1:1 para AM: β -lg e iguales o mayores a 1:1 para AP:PA. Las muestras con segregación de fases presentaron regiones ricas en polisacárido y regiones ricas en proteína. Después del tratamiento térmico las muestras que no mostraron una segregación de fases presentaron algún grado de segregación, el grado de segregación de fases estuvo en función de la concentración de proteína.

ABSTRACT

The microstructure of amylose - β -lactoglobulin (AM- β lg) mixtures and amylopectin - patatin (AP-PA) mixtures formed during drying of solutions from different concentrations and different polysaccharide and protein ratios have been studied using atomic force microscopy (AFM), and the results were confirmed by transmission electron microscopy (TEM). The pure components displayed even structures, although between the polysaccharides, AM had a rougher structure, and between the proteins PA did. The native proteins displayed different structures than the heat-treated proteins which showed uneven structures formed by the aggregation of the protein. The polysaccharide – protein system displayed non-phase-segregated structures at polysaccharide:protein ratios equal to 1:1 for AM: β lg and higher than 1:1 for AP:PA, and phase-segregated structures at polysaccharide:protein ratios lower than 1:1 for AM: β lg and equal or higher than 1:1 for AP:PA. The phase-segregated samples showed regions rich in polysaccharide and regions rich in protein. After heat treatment the non-phase-segregated samples showed some degree of phase segregation, the degree of phase segregation depended on the protein concentration.

Palabras Clave: Separación de Fases, Segregación de Fases, Películas Deshidratadas, Microscopía de Fuerza Atómica, β -Lactoglobulina, Amilopectina, Patatina

Keywords: Phase Separation, Phase Segregation, Dry Films; Atomic Force Microscopy; Amylose; β -Lactoglobulin, Amylopectin, Patatin.

1. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, los sistemas polisacáridos - proteínas han sido estudiados por los científicos del área de Ciencia y Tecnología de Alimentos, no sólo porque son los principales componentes presentes en los alimentos, sino porque también determinan la estructura y por ende las propiedades fisicoquímicas y reológicas de los mismos [1]. El interés creciente en este tipo de sistemas se debe a que el conocimiento acerca de sus interacciones y su comportamiento hacen posible manipular y cambiar las propiedades mecánicas y de textura, de acuerdo a los requerimientos de los desarrolladores de productos, para satisfacer las preferencias de los consumidores. Hasta el momento, los estudios se han centrado en sistemas de dos componentes y usados como modelos simples para los sistemas de multicomponentes.

Cuando se mezclan soluciones de proteína y polisacárido, las macromoléculas pueden: a) segregarse, los dos componentes macromoleculares están principalmente en diferentes fases; b) asociarse, ambos componentes macromoleculares están mayoritariamente en la misma simple fase concentrada; o c) permanecer como una solución de

una simple fase [2], ver la Figura 1. La separación de fases entre el polisacárido y la proteína depende de la concentración, la temperatura y las condiciones del solvente [3]. La incompatibilidad termodinámica es un fenómeno bastante general.

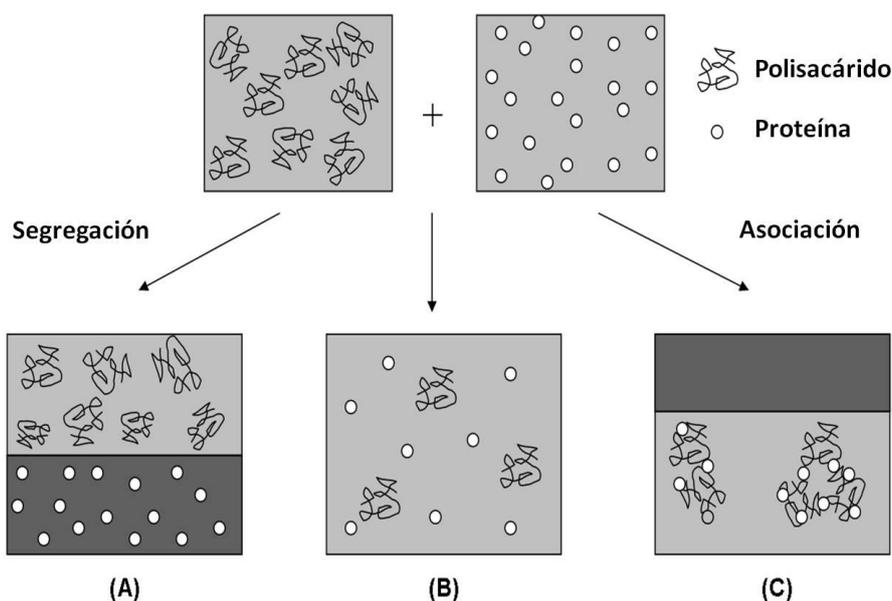


Figura 1 – Ilustración de los diferentes tipos de sistemas que los polisacáridos y proteínas forman después de mezclarlos. **(A)** Incompatible, sistema de dos fases; **(B)** Cosoluble, sistema de una fase; **(C)** Compuesto, sistema de dos fases.

En trabajos anteriores se estudió el equilibrio de fases del sistema amilopectina – β -lactoglobulina – D_2O (agua deuterada), siendo la amilopectina uno de los principales componentes del almidón y usada ampliamente en la industria alimentaria. El sistema se segrega en fases a concentraciones macromoleculares altas (ca. 20 %) en dominios ricos en amilopectina y dominios ricos en β -lactoglobulina, siendo una característica particular la formación de una fase metaestable cuando se tiene una relación ca. 1:1 de amilopectina y β -lactoglobulina [4]. La microestructura de películas deshidratadas, formadas a partir de soluciones de amilopectina- β -lactoglobulina, caracterizadas por microscopia de fuerza atómica, presentan una segregación de fases en casi todas las relaciones amilopectina: β -lactoglobulina. La característica de las estructuras con segregación de fases es la rugosidad, con dominios de gran tamaño (hasta ca. 10 μm) y con una clara característica espinodal cuando las películas pasan a través de una inversión de fases, i.e. desde películas donde la fase continua es la amilopectina hasta películas donde la fase continua es la β -lactoglobulina, en el rango de relaciones amilopectina: β -lactoglobulina de 1:3-1:4 [5]. La característica segregativa de los sistemas amilopectina - β -lactoglobulina se manifiesta con mayor fuerza cuando las soluciones acuosas son tratadas térmicamente. La concentración crítica para la separación se reduce y la fase metaestable se pierde. El carácter espinodal de la separación de fases, a partir de soluciones acuosas, está ausente en ciertos rangos [6].

La amilopectina es un polisacárido ramificado con un peso molecular bastante alto (en el orden de magnitud de $4 \cdot 10^8$ - $5 \cdot 10^8$ Da) a diferencia del otro componente principal del almidón, amilosa, el cual es un polisacárido lineal con un peso molecular mucho menor (en el orden de magnitud de $1,3 \cdot 10^5$ - $4,8 \cdot 10^5$ Da) [7-9]; estas diferencias hacen que se comporten de diferente manera y formen diferentes estructuras con propiedades fisicoquímicas y reológicas diferentes. Por esta razón, información que se puede obtener acerca del sistema amilosa - β -lactoglobulina ayudará no solamente a una mejor comprensión de los sistemas almidón-proteínas sino también a un mejor conocimiento sobre la influencia de cómo las diferencias en su estructura molecular influyen en el sistema.

Otra manera de influir la estructura y las propiedades de un sistema es cambiando alguna característica de la proteína; la β -lactoglobulina es considerablemente mucho más pequeña que el polisacárido y por tanto su cosolubilidad es alta. La cosolubilidad puede reducirse y la segregación de fases mejorarse si el tamaño de la molécula de la proteína se incrementa. Una proteína con un tamaño molecular mayor que la β -lactoglobulina, 18300 Da y 2 nm en diámetro; [10], es la patatina, una glicoproteína soluble de la papa con un peso molecular de 43000 Da [11] y forma cilíndrica con un diámetro y largo de 5 y 9,8 nm [12]. Una segunda diferencia entre estas proteínas es que la β -lactoglobulina se agrega y paulatinamente forma un gel, mientras que la patatina coagula y precipita.

Por tanto, en este trabajo se estudiaron la microestructura de los sistemas: amilosa - β -lactoglobulina y amilopectina - patatina, en películas formadas a partir de la deshidratación de soluciones. Se pretende que estos sistemas sean usados como modelos para estructuras formadas en alimentos solidificados. Los principales objetivos fueron: (i) caracterizar las microestructuras a diferentes concentraciones y relaciones polisacárido-proteína, (ii) identificar las consecuencias de las diferencias en la estructura molecular cuando se usa un polisacárido lineal en vez de uno ramificado, (iii) encontrar la diferencia en la estructura cuando se usa una proteína de mayor tamaño, y (iv) describir la influencia del tratamiento térmico en la estructura de las películas deshidratadas cuando se usa una proteína que tiende a precipitar en vez de una que tiende a formar un gel. Para este propósito, películas deshidratadas delgadas de polisacáridos y proteínas solubilizados fueron preparados, la microestructura se evaluó por microscopía de fuerza atómica (Atomic Force Microscopy – AFM) y los resultados fueron confirmados por microscopía de transmisión electrónica (Transmission Electron Microscopy – TEM) en el caso de la amilosa - β -lactoglobulina. Se escogió la técnica de AFM porque tiene una excelente resolución lateral con un potencial de resolución a nivel atómico y molecular, y las muestras no necesitan ser tratadas antes de realizar la toma de imágenes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

La amilopectina (No. A-7780 extraída de maíz ceroso) y la amilosa (No. A-9262 extraída de la papa) fueron comprados de Sigma-Aldrich. La β -Lactoglobulina fue generosamente provista por Arla Foods (PSDI 2400). La patatina fue extraída y purificada de acuerdo al método de Bahoc [13], el cual es un método modificado del método desarrollado por Racusen y Foote [14], de la variedad de papa “Osprey” comprado del mercado local sueco. La patatina purificada dio un banda fuerte y unas pocas bandas débiles en la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE).

Todos los cálculos en este trabajo se realizaron en base seca, y todos los valores de concentración se expresaron en porcentaje, referido al peso.

2.2 Preparación de las muestras

La amilosa (AM) se mezcló con agua destilada y la dispersión fue calentada por 1 h a 140 °C, el mismo procedimiento de solubilización se aplicó para la amilopectina (AP), pero se calentó a 120 °C. Las soluciones fueron enfriadas a temperatura ambiente, por 0,5 h la de AM y 1 h la de AP, posteriormente se añadió la proteína, β -lactoglobulina (β lg) o patatina (PA). La solución final (polisacárido – proteína – agua) se dejó por 2 h a temperatura ambiente y subsiguientemente se aplicó en hojas de mica recientemente clivadas por inmersión en las soluciones. Finalmente las muestras se dejaron hasta el día siguiente bajo condiciones ambientales. El contenido final de agua en las películas al terminar el proceso de secado fue menor al 5 %, el contenido de humedad se determinó por gravimetría *i.e.* dejando la película a 105 °C hasta peso constante.

Muestras de amilosa - β -lactoglobulina: El espesor de las películas húmedas estaba entre 100 - 300 μ m y el espesor de las películas deshidratadas entre 5 - 30 μ m. Se prepararon muestras a diferentes concentraciones (0,5, 1, 2, 2,5, 3, 5 y 7 % p/p materia seca) y a diferentes relaciones polisacárido-proteína (1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 0:1) siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.

Muestras de amilopectina - patatina: El espesor de las películas húmedas estaba entre 150 - 250 μ m y el espesor de las películas deshidratadas entre 0,5 - 10 μ m. Las muestras fueron preparadas a diferentes concentraciones (0,5, 1 y 3 % p/p materia seca) y a diferentes relaciones polisacárido:proteína (1:0, 4:1, 1:1, 1:4, 0:1).

Para ambos sistemas, 2 grupos de muestras fueron preparados, uno de los grupos fue tratado térmicamente antes de la formación de la película y el otro no. Para las muestras con PA, las mezclas fueron calentadas por 1 h a 90 °C y para las muestras con β lg las mezclas fueron calentadas a 70 °C, también por 1 h.

Para comparar e identificar los componentes en las mezclas, se prepararon muestras con compuestos puros y sus estructuras fueron analizadas. La superficie de las películas expuestas al aire durante la fase de formación de la película fue la que se estudió por AFM.

Para la toma de imágenes con AFM, las muestras no fueron tratadas *i.e.* las mediciones se realizaron directamente después del secado. Sin embargo, las muestras que fueron analizadas por TEM fueron sujetas a un tratamiento específico *e.g.* fijación, incrustación y teñido químico de acuerdo a procedimientos específicos que se describirán más adelante.

2.3 Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

Tres tipos de imágenes (topográficas, de contraste de fases y de amplitud) fueron grabadas en el modo de contacto intermitente o *tapping* usando un instrumento comercial Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Barbara, CA). Las imágenes topográficas fueron usadas para el análisis seccional y las imágenes de contraste de fases y amplitud fueron usadas para validar las imágenes topográficas y obtener información adicional acerca de la superficie, porque la calidad de estas imágenes, por lo general, tenían una mejor resolución; por tanto, en este trabajo se presentan principalmente este tipo de imágenes.

Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. Para la toma de imágenes se usó un escáner JV con una capacidad de barrido en el rango de 125 x 125 (ejes x,y) x 25 (eje z) y una punta de material de silicona adherido a un cantiléver de longitud de 129 μm , con una frecuencia de resonancia entre 282 - 367 kHz y una constante de flexión entre 27 - 62 N/m. Cada muestra se analizó al menos en 5 diferentes lugares, y cada lugar a diferentes ampliaciones (40 μm , 20 μm , 10 μm , 5 μm , 1 μm , 500 nm y 200 nm de tamaño de barrido). La dirección de barrido se cambió a diferentes ángulos, 0°, 45° y 90°, y las líneas de barrido, trazo y retrazo, se analizaron para evitar artefactos. Las imágenes fueron analizadas usando el programa del microscopio (versión 4.22), las imágenes sólo fueron niveladas.

2.4 Microscopia de Transmisión Electrónica (TEM)

Las soluciones de amilosa y β -lactoglobulina fueron congeladas a -20 °C y liofilizadas por 3 d. Posteriormente, las muestras fueron fijadas por 3 h con 2 % p/p de glutaraldehído y 0,1 % p/p de rojo de rutenio en 0,15 M de cacodilato como amortiguador y lavadas 2 veces en el amortiguador por 10 min, seguidamente las muestras fueron fijadas una segunda vez por 2 h con 1 % p/p de tetraóxido de osmio (OsO_4), seguida de un enjuague en la solución amortiguadora de cacodilato, antes de ser deshidratadas en una serie de soluciones de acetona de diferente grado de concentración. Finalmente, las muestras fueron incrustadas en una resina de *Spurr* (versión modifica de un procedimiento descrito por Langton y Hermansson, [15]).

Secciones delgadas (70 nm en espesor) fueron cortadas y colocadas sobre una película de carbón *lacey* fijada en una rejilla de cobre. Las muestras fueron entonces doblemente teñidas con 5 % de acetato de uranilo y 0,3 % de citrato de plomo, para visualizar la fase del polisacárido [16].

Las muestras teñidas fueron transferidas y examinadas en un TEM (Philips CM 120 BioTWIN Cryo) equipado con un filtro de energía de poscolumna (Gatan GIF 100). Las imágenes fueron grabadas con una cámara CCD (Gatan 791) y bajo condiciones de baja dosis, utilizando el pico de pérdida cero (ancho de hendidura de 8 eV). La defocalización fue de aproximadamente 1 μm . Imágenes a diferentes ampliaciones fueron tomadas.

3. RESULTADOS

Para cada sistema, se tomaron fotos de las muestras preparadas, compuestos puros y mezclas, y se analizaron. A simple vista, las películas delgadas parecían ser bastante homogéneas y regulares, sin embargo, mirando al microscopio se observó diferentes microestructuras.

3.1 Amilosa pura y β -lactoglobulina pura

Las superficies de los componentes puros fueron bastante diferentes. La película de AM presentó una estructura granular y rugosa con diferencias de altura de cerca de 70 nm (Figura 2), y el tamaño de los granos estuvieron entre 10 - 30 nm, mientras las películas de βlg natural exhibió una estructura bastante lisa con diferencias en altura de cerca de 3 nm (Figura 3). Cuando la proteína se trató térmicamente, la apariencia de las películas cambiaron considerablemente, desde estructuras bastante regulares a estructuras irregulares con diferencias en altura de cerca de 50 nm; la proteína fue agregada en agregados globulares y el tamaño de estos agregados estuvo entre 50-100 nm.

3.2 Mezclas de amilosa y β -lactoglobulina

Las películas formadas a partir de amilosa y β -lactoglobulina mostraron estructuras uniformes y no uniformes.

A proporciones iguales AM: βlg (1:1), las muestras mostraron una estructura aparentemente regular aunque las diferencias en altura estuvieron entre 70 - 100 nm, Figura 5. A bajas concentraciones las diferencias en altura fueron menores que a altas concentraciones. Las estructuras parecieron ser estructuras intermedias entre la de los componentes puros, Figura 2 y Figura 3.

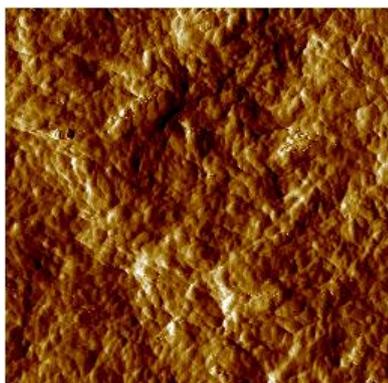


Figura 2 – Imagen AFM de amplitud de AM, 1 % p/p materia seca, tamaño de barrido de 1 μm y rango z de 0.05 V.

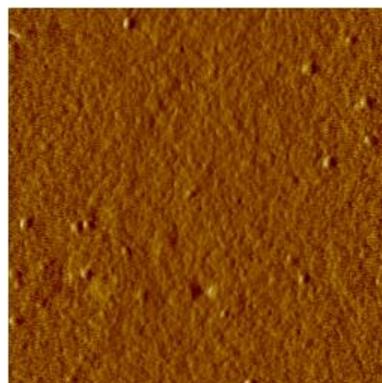


Figura 3 – Imagen AFM de amplitud de βlg , 1 % p/p materia seca, tamaño de barrido de 1 μm y rango z de 0.05 V.

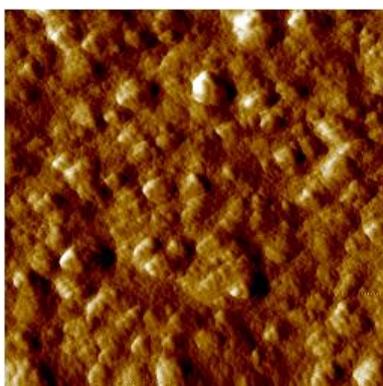


Figura 4 – Imagen AFM de amplitud de βlg , 1 % p/p materia seca, tamaño de barrido de 1 μm y rango z de 0.05 V.

A proporciones bajas AM: βlg (<1:1) *i.e.* muestras ricas en proteína, las muestras sufrieron una segregación de fases con regiones ricas en proteína y regiones ricas en polisacárido, las diferencias en altura fueron bastante significativas, a concentraciones altas las diferencias fueron mayores a 500 nm, Figura 6. A estas concentraciones altas, la proteína se agregó y organizó en estructuras floculares, donde la topografía fue bastante irregular. Este tipo de apariencia permaneció hasta las proporciones más altas investigadas, 1:6 AM: βlg . A bajas concentraciones (0.5 %), se observó una deshumectación de la superficie de las láminas de mica.

Cuando las muestras fueron calentadas la segregación de fases incrementó. Las muestras tratadas (70 °C por 1 h) presentaron estructuras irregulares con diferencias en altura de 200 nm aproximadamente, Figura 7.



Figura 5 – Imagen AFM de amplitud de AM y βlg , 2 % p/p materia seca, proporción AM: βlg 1:1, tamaño de barrido de 10 μm y rango z de 0.5 V.



Figura 6 – Imagen AFM de amplitud de AM y βlg , 2,5 % p/p materia seca, proporción AM: βlg 1:4, tamaño de barrido de 10 μm y rango z de 1 V.

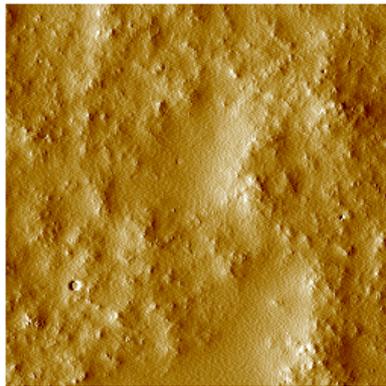


Figura 7 – Imagen AFM de amplitud de AM y β lg, térmicamente tratada a 70 °C por 1 h, 2,5 % p/p materia seca, proporción AM: β lg 1:1, tamaño de barrido de 10 μ m y rango z de 0.5 V.

Las micrografías TEM no solamente facilitaron información complementaria respecto a la microestructura de los sistemas, sino también ayudo a confirmar las micrografías AFM. La estructura de la amilosa pura fue bastante regular, caracterizada por pequeños agregados en forma de gusanos de cerca de 15 – 20 nm de longitud y cerca de 15 nm de ancho, los cuales estaban organizados helicoidalmente (Figura 8). Para las mezclas de AM y β lg, las micrografías mostraron regiones ricas en polisacárido y regiones ricas en proteína. Los dominios ricos en proteína fueron pequeños, con tamaños cerca a los 100 nm. A concentraciones no muy altas de proteína, ésta estaba dispersa en el polisacárido, Figura 9 y Figura 10.

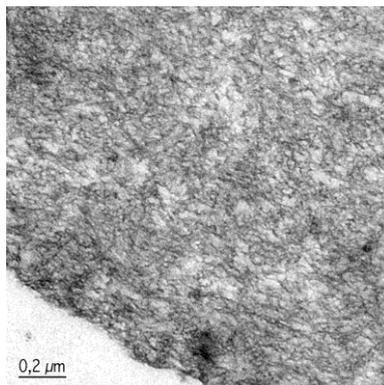


Figura 8 – Imagen TEM de AM pura, 1 % p/p materia seca, la AM fue teñida químicamente.

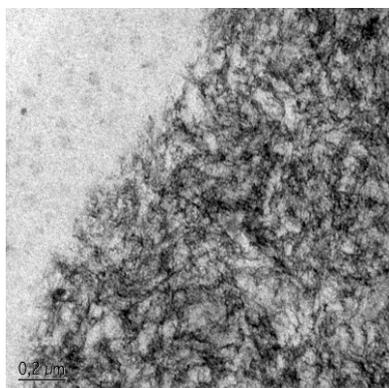


Figura 9 – Imagen TEM de AM y β lg, 3 % p/p materia seca, proporción AM: β lg 1:2, la AM fue teñida químicamente.

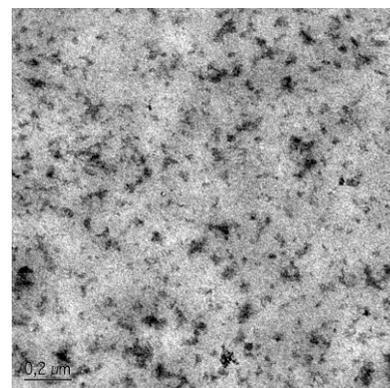


Figura 10 – Imagen TEM de AM y β lg, 3 % p/p materia seca, proporción AM: β lg 1:2, la β lg fue teñida químicamente.

3.3 Amilopectina pura y patatina pura

Se observaron algunas diferencias entre las superficies de los componentes puros. La película de AP fue bastante regular, con diferencias en altura menores a los 2 - 3 nm. Sin embargo, se vieron pequeñas protuberancias de diámetro menores a los 20 nm (Figura 10). Las micrografías AFM de la PA pura mostró superficies granulares regulares, el tamaño de los granos estuvieron en un rango entre 15 - 30 nm y las diferencias en altura entre 2 - 4 nm (Figura 12). Cuando la proteína fue tratada térmicamente a 90 °C por 1 h, la estructura de la película cambio a una superficie más rugosa, la película mostró agregados globulares con tamaños entre 30 - 50 nm y las diferencias en altura incrementaron a 10 nm (Figura 12). Los agregados formados no fueron entidades individuales sino más bien estructuras asociadas con formas cilíndricas (gusanos).

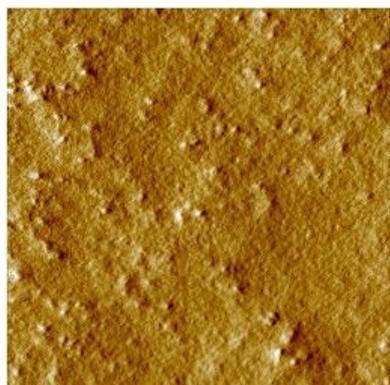


Figura 11 – Imagen AFM de amplitud de AP, 1 % p/p materia seca, tamaño de barrido de 1 μm y rango z de 0,03 V.

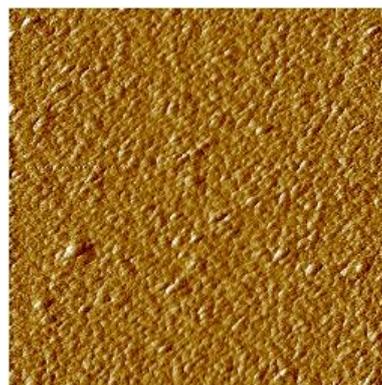


Figura 12 – Imagen AFM de amplitud de PA, 1 % p/p materia seca, tamaño de barrido de 1 μm y rango z de 0,10 V.

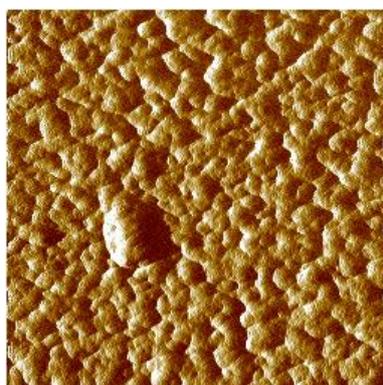


Figura 13 – Imagen AFM de amplitud de PA térmicamente tratada a 90 °C por 1 h, 1 % p/p materia seca, tamaño de barrido de 1 μm y rango z de 0,05 V.

3.4 Mezclas de amilopectina y patatina

Las películas formadas a partir de amilopectina y patatina mostraron estructuras uniformes y no uniformes que sufrieron segregación de fases.

Las muestras ricas en polisacáridos, con relaciones AP:PA $> 1:1$, mostraron estructuras regulares a concentraciones bajas y altas, con diferencias en altura de cerca de 5 nm (Figura 13). La apariencia de la microestructura de las muestras recordó a la muestra de AP pura (Figura 11).

Cuando la relación AP:PA fue de 1:1 las muestras mostraron dominios ricos en polisacárido y dominios ricos en proteína. Los dominios de proteína correspondieron a la fase discontinua y el polisacárido a la fase continua. La forma de los dominios de PA fue esférica, de diversos tamaños comprendidos entre 10 - 150 nm, más o menos, y diferencias en altura de cerca de 40 nm (Figura 16). A bajas concentraciones los dominios fueron menores que a altas concentraciones.

A relaciones AP:PA $< 1:1$, muestras ricas en proteína, las estructuras fueron bastante regulares y diferentes de las estructuras de los componentes puros, Figura 11 y Figura 12, formados principalmente por agregados de proteínas

floculados con pequeñas regiones bastante lisas correspondientes al polisacárido. El tamaño de los agregados fue bastante regular, en el rango entre 30 - 150 nm y diferencias en altura de 40 nm, Figura 17. A un incremento de la concentración, las muestras se volvieron más rugosas.



Figura 14 – Imagen AFM de amplitud de AP y PA, 1 % p/p materia seca, proporción AP:PA 4:1, tamaño de barrido de 1 μm y rango z de 0,10 V.

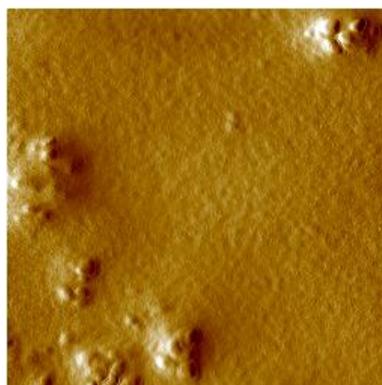


Figura 15 – Imagen AFM de amplitud de AP y PA tratada térmicamente a 90 °C por 1 h, 1 % p/p materia seca, proporción AP:PA 4:1, tamaño de barrido de 1 μm y rango z de 0,10 V.

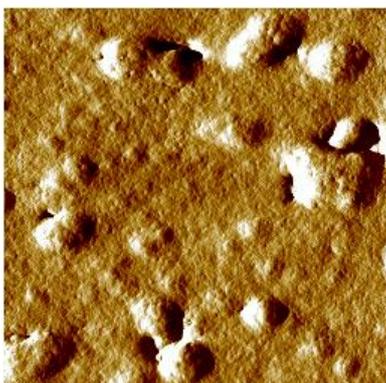


Figura 16 – Imagen AFM de amplitud de AP y PA, 1 % p/p materia seca, proporción AP:PA 1:1, tamaño de barrido de 1 μm y rango z de 0,10 V.

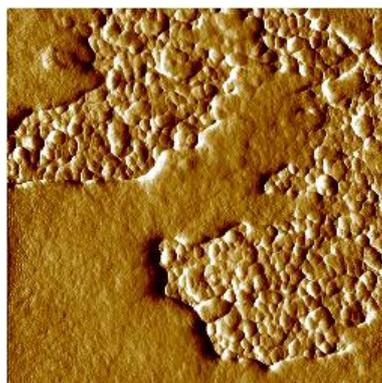


Figura 17 – Imagen AFM de amplitud de AP y PA tratada térmicamente a 90 °C por 1 h, 1 % p/p materia seca, proporción AP:PA 1:1, tamaño de barrido de 1 μm y rango z de 0,10 V.

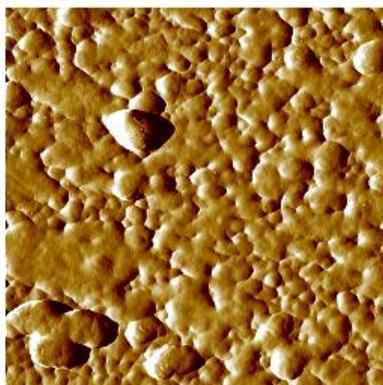


Figura 18 – Imagen AFM de amplitud de AP y PA, 1 % p/p material seca, proporción AP:PA 1:4, tamaño de barrido de 1 μm y rango z de 0,20 V.

Cuando se aplicó tratamiento térmico a las soluciones de AP-PA, calentando a 90 °C por 1 h, la estructura de las muestras cambió *i.e.* se volvieron irregulares (Figura 14 y Figura 15), incluso a proporciones de 4:1 de AP:PA. Sin embargo, el tamaño de los dominios separados estuvo en el rango de 150 nm. Las muestras que sufrieron una

segregación de fases, como 1:1 AP:PA mostraron un crecimiento en el tamaño de los dominios de las proteínas, Figura 16 y Figura 17.

4. DISCUSION

Todas las muestras de almidón – proteína, cuando la proteína no fue tratada térmicamente, antes de la aplicación en las láminas de mica, eran soluciones de una sola fase para ambos sistemas AM- β lg y AP:PA. Pero durante la formación de la película el sistema empezó a segregarse debido a los cambios en la composición del sistema *i.e.* hubo un incremento en la concentración macromolecular de la muestra en función al tiempo. Las diferencias en rugosidad revelaron que las muestras sufrieron diferentes estados de aspereza, con tamaños de dominio que fueron desde los nanómetros hasta los micrómetros [5].

4.1 Polisacáridos y proteínas puros.

El mayor grado de rugosidad de la película de amilosa respecto al de la amilopectina también fue reportado por Rindlav [17]. La aspereza de la AM se debió a la segregación de AM; a concentraciones menores al 1 % la AM tiende a segregarse en entidades de forma cilíndrica y precipitar. El tamaño de los agregados encontrados en este trabajo está en concordancia con lo que se publicó en la literatura, entre 10 y 20 nm [18], [19]. Aunque también la AP tiende a asociarse, la velocidad de asociación de la AP es mucho menor que la de la AM [20] y mucho más lenta que la formación de la película, por tanto, la estructura permanece bastante regular.

Aunque, la película de AP mostró algunas protuberancias pequeñas, las diferencias en altura fueron mínimas, traduciéndose en una superficie bastante regular; estas protuberancias también fueron observadas por otros autores e interpretadas como impurezas [17], [21] o como conglomerados individuales de los lados de la cadena de la amilopectina [22].

Las películas de las proteínas nativas puras mostraron una estructura bastante similar aunque la superficie de las muestras de PA fueron un poco más rugosas que las de β lg. La rugosidad de las muestras se debió a la asociación de las moléculas de proteína y la formación de agregados de varios monómeros. Sin embargo, después del tratamiento térmico las muestras fueron bastante diferentes a las nativas, el tamaño de los dominios de proteína incrementaron y las películas de β lg fueron más rugosas, con agregados mucho más grandes que las de PA. Una razón para tener una estructura de PA más compacta pudo deberse a que la muestra fue calentada por encima de su temperatura de desnaturalización, el cual está en el rango de 40 - 65 °C [12], etapa en la cual las moléculas se desdoblaron y se agregan. Por el contrario, la β lg fue tratada térmicamente por debajo de su temperatura de desnaturalización (78 °C [10]), y aunque la asociación y agregación por debajo de la temperatura de desnaturalización se ha reportado en la literatura [23], se cree que el proceso de desnaturalización fue incompleto a pesar de haber sido calentada por 1 h.

Cuando la proteína comienza a desnaturalizarse, primero se forman agregados primarios a partir de los monómeros, y estos agregados empiezan a asociarse en agregados con mayor peso molecular.

4.2 Mezclas de amilosa y β -lactoglobulina

Para el estudio del comportamiento de fases de la AM - β lg, el contenido de AM en las mezclas no excedió el 1 % en AM porque a mayores concentraciones de AM se formaron geles y fue difícil la aplicación de las soluciones de manera uniforme sobre las láminas de mica. Además, la gelación pudo interferir con la segregación de fases; se ha reportado que la concentración crítica está entre 1-1.5 % [24], [19].

La segregación de fases durante la formación de la película en los sistemas AM - β lg se comparó con la caracterización previamente realizada para el sistema AP - β lg [5]. A contenidos de AM alto y β lg bajo, la superficie de las muestras fueron regulares, *i.e.* no hubo una clara evidencia de una segregación de fases. Otra diferencia entre la segregación de la AP - β lg y AM - β lg fue que las películas con segregación de fases parecieron permanecer con la AM como fase continua hasta concentraciones muy altas de proteína. En el sistema AP - β lg las películas segregadas cambiaron de una fase continua de AP a una fase continua de β lg por debajo de la relación 1:3 de AP: β lg. Cerca de la región de la fase de inversión el sistema AP - β lg mostró la característica de una descomposición espinodal. La causa pudo ser debido a que el poder de solubilización de la matriz de AM es mayor que la de la matriz de AP. Aunque, los estudios de la fase de equilibrio del sistema AP - β lg - D₂O [4] mostró que la AP también tiene un gran poder de solubilización, ya que una fase metaestable uniforme puede ser formada hasta por debajo de aproximadamente una proporción de 1:1 de AP: β lg.

Por otro lado, el retardo en la segregación de fases entre la AM y β lg pudo deberse a la alta viscosidad de la AM, haciendo que la asociación entre las moléculas de proteína tome un mayor tiempo o sea omitida completamente. También, pudo ser que el tiempo requerido para la asociación de la proteína fuera mayor que el tiempo requerido para la

formación de la película y que el tamaño de los agregados de la β lg formada fuera aún muy pequeño para inducir una segregación de fases rápida.

Cuando las soluciones fueron tratadas térmicamente, antes de la formación de la película, la tendencia a la segregación de fases incrementó. Las estructuras regulares se volvieron irregulares cuando fueron tratados térmicamente a 70 °C. A esa temperatura, se esperó que se formen agregados de 100 monómeros de β lg [25], e incluso que algunos de ellos se asocien en estructuras con mayor peso molecular a lo largo del tiempo, fenómeno este dependiente de la concentración de la proteína. A contenidos de β lg alta la muestra se segregó en fases *i.e.* en regiones ricas en polisacárido y regiones ricas en proteína. Las regiones ricas en β lg mostraron una estructura granular.

4.3 Mezclas de amilopectina y patatina

Muestras ricas en AP, con relaciones de AP:PA mayores a 1:1, mostraron estructuras sin segregación de fases. La cosolubilidad de la AP y PA pareció ser alta, lo cual podría ser debido a la gran diferencia en tamaño entre ellos. Aunque el tamaño molecular de la PA es más grande que la β lg, aún sigue siendo mucho más pequeña en comparación con el polisacárido, el tipo de estructura encontrada a estas proporciones y concentraciones en este trabajo estuvo de acuerdo con las estructuras encontradas en películas formadas a partir de soluciones de AP y β lg [5]. La segregación de fases en estas muestras fue inducida por el tratamiento térmico; a baja concentración de proteína la PA formó agregados parecidos a entidades individuales y a altas concentraciones los agregados se asociaron en estructuras mucho más grandes.

A relaciones polisacárido:proteína cerca de 1:1, el sistema exhibió una segregación de fases con dominios ricos en proteína inmersos en la matriz continua del polisacárido; una vez más este tipo de estructuras son muy parecidas a las reportadas en la literatura [5]. Sin embargo, ninguna fase de inversión fue observada en las películas de AP:PA incluso a relaciones por debajo 1:4. Otra diferencia fue el tamaño de los dominios, en el sistema AP: β lg los dominios alcanzaron tamaños razonablemente grandes cuando se estaba muy próximo a la relación de la fase de inversión mientras que en el sistema AP:PA el tamaño de los dominios permaneció en el rango del submicrón.

Después del tratamiento térmico la PA perdió solubilidad y precipitó. Obviamente este proceso incrementó la fase de segregación. Muestras con proteínas nativas con estructuras regulares fueron transformadas en muestras segregadas; a bajas concentraciones de proteína la PA formó agregados individuales y a altas concentraciones los agregados se asociaron en estructuras más grandes. A relaciones AP:PA menores a 1:1 la proteína no solamente formó agregados sino que también se asoció en estructuras más grandes, mostrando dominios ricos en β lg y dominios ricos en AP de formas irregulares.

En las muestras que no fueron tratadas térmicamente pareció ser que el polisacárido controló el sistema, en cambio en las muestras tratadas térmicamente la proteína controló el sistema. En el sistema almidón-proteína la fase de segregación podría acentuarse ya que ambos polisacáridos se segregan también, Kalichevsky y Ring [26].

En alimentos reales, la estructura es obviamente más compleja. La proteína y el almidón son casi siempre calentados juntos. La relación almidón:proteína es usualmente a favor del almidón, aunque la mayoría del almidón podría permanecer en los gránulos hinchados, pareciendo dominios de almidón puro y la relación entre el almidón solubilizado libre en la solución y la proteína podría bien estar cerca a lo que ha sido estudiado en este trabajo. La amilopectina es el componente dominante en casi todos los tipos de alimentos ricos en almidón, pero como la amilosa es liberada primeramente durante el proceso de gelatinización del almidón, podría asumirse que juega un papel importante en la estructura formada en la fase de solución. Además, basados en la observación realizados en este trabajo y otras publicaciones anteriores [5], [6] la segregación de fases podría aparecer en la formulación de alimentos complejos deshidratados y jugar un rol importante en la humidificación, reactividad química, así como en las propiedades mecánicas.

5. CONCLUSIONES

La microestructura de las películas deshidratadas a partir de soluciones acuosas de polisacárido - proteína: amilosa - β -lactoglobulina y amilopectina - patatina, muestran dos tipos de microestructuras; estructuras regulares, uniformes sin segregación de fases y estructuras irregulares con segregación de fases.

Las estructuras sin segregación de fases se forman a relaciones polisacárido:proteína igual a 1:1 para AM: β l y mayores a 1:1 para la AP:PA. Sin embargo, estas muestras sufren una segregación de fases cuando las soluciones son tratadas térmicamente. El grado de segregación de fases después del tratamiento térmico depende de la temperatura de calentamiento y de la concentración de la proteína. Por otro lado, las estructuras con segregación de fases son formadas a relaciones polisacárido:proteína menores a 1:1 para AM: β lg e igual a o mayores a 1:1 para la AP:PA; las muestras

muestran dominios ricos en polisacárido y dominios ricos en proteína. La segregación de fases toma lugar durante la formación de la película debido a los cambios en la composición de la muestra.

6. AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a Hanadi Makie por su colaboración en la extracción y purificación de la patatina. El soporte financiero se obtuvo de la Agencia Sueca para el Desarrollo Internacional (Sida/SAREC).

Este trabajo es parte del trabajo doctoral “Segregación de Fases y Cambios Microestructurales en Sistemas Almidón – Proteína” realizado bajo la supervisión del Profesor Björn Bergenståhl del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Lund en Suecia, en colaboración con el Centro de Alimentos y Productos Naturales de la Universidad Mayor de San Simón en Bolivia.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] V. B. Tolstoguzov. “Functional Properties of Protein-Polysaccharide Mixtures.” *Functional Properties of Food Macromolecules*. J. R. Mitchell and D. A. Ledward. London, UK: Elsevier, 1986, Chapter 9, pp. 385-415.
- [2] V. Ya. Grinberg and V. B. Tolstoguzov. “Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions.” *Food Hydrocolloids*, vol. 11, no. 2, 1997, pp. 145-158.
- [3] E. Dickinson. “Protein-Polysaccharide Interactions in Food Colloids.” In *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties*. E. Dickinson and P. Walstra. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 1993, pp. 77-93.
- [4] C. C. Quiroga and B. Bergenståhl. “Phase segregation of amylopectin and β -lactoglobulin in aqueous system.” *Carbohydrate Polymers*, vol. 72, 2008, pp. 151-159.
- [5] C. C. Quiroga and B. Bergenståhl. “Characterization of the Microstructure of Phase Segregated Amylopectin and β -Lactoglobulin Dry Mixtures.” *Food Biophysics*, vol. 2, 2007, pp. 172-182.
- [6] C. C. Quiroga and B. Bergenståhl. “Effect of Heat Treatment on the Phase Segregation of Amylopectin and β -lactoglobulin Aqueous System.” *Submitted for publication*.
- [7] D. French. “Organization of Starch Granules.” In *Starch: Chemistry and Technology*. R. L. Whistler, J. N. BeMiller and E.F. Paschall. Florida, USA: Academic Press, Inc., 1984, Chapter VII, pp. 183-247.
- [8] J. Swinkels. “Composition and Properties of Commercial Native Starches.” *Starch/Stärke*, vol. 37, no. 1, 1985, pp. 1-5.
- [9] H. F. Zobel. “Molecules to Granules: A Comprehensive Starch Review.” *Starch/Stärke*, vol. 40, no. 2, 1988, pp. 44-50.
- [10] Fox, P.F. (2003). Milk Protein: General and Historical Aspects. In Fox, P. F. and McSweeney, P. L. H. eds. *Advanced Dairy Chemistry, Vol. I: Proteins*. New York, USA: Kluwer Academic/Plenum, 2003, Chapter 1, pp. 1-48.
- [11] A. M. Pots et al. “Isolation and Characterization of Patatin Isoforms.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, no. 11, pp. 4587-4592, 1999a.
- [12] A. M. Pots et al. “Thermal aggregation of patatin studied in situ.” *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 47, no. 11, pp. 4600-4605, 1999b.
- [13] J. R. Bohac. “A modified method to purify patatin from potato tubers.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 39, no. 8, pp. 1411-15, 1991.
- [14] D. Racusen and M. Foote. “A major soluble glycoprotein of potato tubers.” *Journal of Food Biochemistry*, vol. 4, no. 1, pp. 43-52, 1980.
- [15] M. Langton and A.-M. Hermansson. “Fine-stranded and particulate gels of β -lactoglobulin and whey protein at varying pH,” in *Food Hydrocolloids*, vol. 5, no. 6, 1992, pp. 523-539.
- [16] J. -P. Thiéry. “Demonstration of polysaccharides in thin sections by electron microscopy.” *Journal de Microscopie*, vol. 6, no. 7, pp. 987-1018, 1967.
- [17] Å. Rindlav-Westling. “Crystallinity and Morphology of Starch Polymers in Films.” Doctoral Thesis - Chalmers University of Technology, 2002, pp. 19 – 22.
- [18] J-L. Putaux et al. “Network formation in dilute amylose and amylopectin studied by TEM,” *Macromolecules*, vol. 33, no. 17, pp. 6416-6422, 2000.
- [19] M. J. Gidley and P. V. Bulpin. “Aggregation of amylose in aqueous systems: the effect of chain length on phase behavior and aggregation kinetics.” *Macromolecules*, vol. 22, no. 1, pp. 341-346, 1989.
- [20] M. J. Miles et al. “Gelation of amylose.” *Carbohydrate Research*, vol. 135, no. 2, pp. 257-269, 1985.
- [21] N. H. Thomson et al. “Real-time imaging of enzymatic degradation of starch granules by atomic force microscopy.” *Journal of Vacuum Science and Technology, B: Microelectronics and Nanometer Structures*, vol. 12, no. 3, pp. 1565-1568, 1994.

- [22] P. M. Baldwin et al. "High Resolution Imaging of Starch Granule Surfaces by Atomic Force Microscopy." *Journal of Cereal Science*, vol. 27, pp. 255-265, 1998.
- [23] C. Le Bon et al. Growth and structure of aggregates of heat-denatured β -lactoglobulin." *International Journal of Food Science and Technology*, vol. 34, no. 5/6, pp. 451-465, 1999.
- [24] A. M. Vallêra et al. "The structure of amylose gels." *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 6, no. 2, pp. 311-320, 1994.
- [25] T. Nicolai et al. "Iso-scattering points during heat-induced aggregation and gelation of globular proteins indicating micro-phase separation." *Europhysics Letters*, vol. 73, no. 2, pp. 299-305, 2006.
- [26] M. T. Kalichevsky and S. G. Ring. "Incompatibility of amylose and amylopectin in aqueous solution." *Carbohydrate Research*, vol. 162, no. 2, pp. 323-328, 1987.