



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

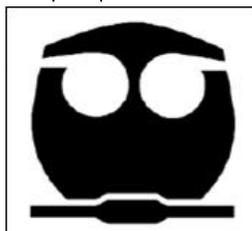
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y ESTUDIO
DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LA FRACCIÓN
DE GLOBULINAS OBTENIDA A PARTIR DE LA SEMILLA DE CHÍA
(*Salvia hispanica*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

NORMA MOLINA TIZO



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente Prof. Marina Gavilanes Ruiz

Vocal Prof. Sobeida Sánchez Nieto

Secretario Prof. Manuel Soriano García

1er suplente Prof. Francisco Javier Plasencia de la Parra

2º suplente Prof. Martha Patricia Coello Coutiño

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de bioquímica estructural 3, Instituto de Química U.N.A.M.

Asesor del tema: Dr. Manuel Soriano García _____

Sustentante : Norma Molina Tizo _____

AGRADECIMIENTOS

Proyecto DGAPA IN223608

“Caracterización Bioquímica y espectroscópica de una o varias Globulinas de la
Salvia hispanica, Chía”

Beca CONACYT

Ayudante de investigador nivel 3, de Enero /07 a Diciembre /07.

Al Doctor Manuel Soriano García, gracias por creer en mí, por su paciencia, apoyo y consejos durante la realización de este trabajo.

A la Doctora Sobeida Sánchez Nieto, por su apoyo incondicional, gracias por permitirme mantener esta amistad contigo, eres una mujer excepcional.

A la Doctora Lina A. Rivillas, por todo su apoyo, su amistad y consejos, durante nuestra estancia en el laboratorio, gracias Linux.

A la Doctora Vanessa Cabra por sus recomendaciones, su amistad y su apoyo, muchas gracias.

A la M.C Edelmira Linares Mazari y al Doctor Robert Bye, por su valiosa colaboración durante la identificación y recolecta de la semilla de chía.

Al Ingeniero Guillermo Orozco de Rosas, por la donación de la semilla de chía para la continuación de este proyecto.

A NUTRER, S.A. DE C.V., por la amable donación del aislado de proteínas de soya.

Sobre todo, muchas gracias a mi Alma Mater, la UNAM y su Facultad de Química, en dónde tuve la oportunidad de crecer como estudiante y como ser humano. Muchas gracias también a todos mis profesores y al personal que labora en esta institución.

A Dios, quien me dio la fortaleza necesaria en esos momentos en que estuve a punto de rendirme, por darme la salud y la esperanza para terminar este trabajo

A las tres mujeres más importantes de mi vida, mi abuelita, mi mami y mi tía, infinitas gracias por todo su apoyo, amor, paciencia y comprensión, si hoy me considero una mujer con valores, tanto éticos como sociales, es por que los he aprendido de ustedes quienes son mi mas grande ejemplo de fortaleza y perseverancia, las amo.

A mis hermanas Beatriz y Marcela, a las que adoro con todo mi corazón y a mis más que primos, hermanos, Eddie (chapistriquis), Cristy, Male, Oscar, Carmen, Lorenzo y Juanito, a mis tíos, Pedro, Gilberto, Juan, Lorenzo e Israel, gracias por todo su apoyo, por que siempre han estado conmigo en los momentos más difíciles y por que sé que siempre podré contar con ustedes. Los quiero muchísimo.

A toda la nueva generación, todos mis niños y no tan niños (Dani), mis sobrinos y sobrinas, quiénes con sus travesuras y su inocencia, hacen surgir esa chispa de alegría que me hace feliz todos los días.

A mi Toña, gracias mi niña por recordarme que tengo que predicar con el ejemplo, te quiero mucho.

A todos mis viejos amigos, Claudia Zúñiga, Armando Cortés, Aída Castañeda Armando Zúñiga, Ernesto Juárez, gracias por compartir conmigo tantos años de esfuerzo, alegrías y penas. Y también gracias a mis nuevos amigos, Verónica, Francisco, Azucena, muchas gracias chicos por hacer tan amenas y controvertidas las horas de la comida. ¡Ah! y por supuesto, muchas gracias a mi incondicional esclavo Eduardo, gracias amigo por hacer de mi estancia en el laboratorio mi espacio de risaterapia.

Nunca se aparte de ti la misericordia y la verdad; átalas a tu cuello, escríbelas en la tabla de tu corazón.....Proverbios 2, 3.

ÍNDICE

Página

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. –MARCO TEÓRICO	5
1.1 USOS DE LA SEMILLA DE CHÍA	5
1.2 BOTÁNICA	7
1.3 COMPOSICIÓN	8
1.4 MUCÍLAGO	10
1.5 PROTEÍNAS	12
1.5.1 GLOBULINAS	12
1.6 PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS	13
1.6.1 SOLUBILIDAD	14
1.6.2 RETENCIÓN DE AGUA	15
1.6.3 RETENCIÓN DE ACEITE	15
1.6.4 PROPIEDADES EMULSIFICANTES	16
1.6.5 PROPIEDADES ESPUMANTES	17
1.7 FACTORES QUE AFECTAN LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS	18
2.– ANTECEDENTES	20
3.- OBJETIVOS E HIPÓTESIS	21
4.- METODOLOGÍA	22
4.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA SEMILLA DE CHÍA (<i>Salvia hispanica</i>)	23
4.1.1 OBTENCIÓN Y DESGRASADO DE LA HARINA DE CHÍA	23
4.1.2 HOMOGENIZACIÓN DE LA HARINA DE CHÍA	23
4.2 COMPOSICIÓN	23
4.3 ELIMINACIÓN DEL MUCÍLAGO	24
4.4 EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN DE GLOBULINAS DE LA SEMILLA DE CHÍA	24
4.4.1 RENDIMIENTO	25
4.5 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL CONCENTRADO DE GLOBULINAS DE CHÍA	25
4.5.1 DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR	25
4.5.2 DETERMINACIÓN DE PUNTO ISOELÉCTRICO	26
4.5.3 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS	27
4.5.4 DETERMINACIÓN DE pH	27
4.6 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LAS GLOBULINAS	27
4.7 ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DEL CONCENTRADO DE GLOBULINAS DE CHÍA	29

4.7.1 SOLUBILIDAD EN FUNCIÓN DEL pH	29
4.7.2 PERFIL ELECTROFORÉTICO EN FUNCIÓN DEL pH	31
4.7.3 CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA	31
4.7.4 CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE ACEITE	32
4.7.5 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES EMULSIFICANTES	32
4.7.6 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ESPUMANTES	35
4.8 INFLUENCIA DEL MUCÍLAGO EN LAS PROPIEDADES FUNCIONALES	37
5.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA DE SEMILLA DE CHÍA	38
5.1.1 IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA	38
5.1.2 DISMINUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA, DESGRASADO Y HOMOGENIZACIÓN DE LA MUESTRA	38
5.2 COMPOSICIÓN	39
5.3 ELIMINACIÓN DEL MUCÍLAGO	40
5.4 EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN DE GLOBULINAS DE LA SEMILLA DE CHÍA	41
5.4.1 RENDIMIENTO	42
5.4.2 COMPOSICIÓN DEL EXTRACTO DE GLOBULINAS Y DEL AISLADO DE PROTEÍNAS DE SOYA	42
5.5 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL CONCENTRADO DE GLOBULINAS DE CHÍA	44
5.5.1 DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR	44
5.5.2 DETERMINACIÓN DE PUNTO ISOELÉCTRICO	46
5.5.3 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS	47
5.5.4 DETERMINACIÓN DE pH	49
5.6 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LAS GLOBULINAS DE CHÍA	50
5.7 ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DEL CONCENTRADO DE GLOBULINAS DE CHÍA	53
5.7.1 SOLUBILIDAD EN FUNCIÓN DEL pH	53
5.7.2 PERFIL ELECTROFORÉTICO EN FUNCIÓN DEL pH	56
5.7.3 CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA	62
5.7.4 CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE ACEITE	64
5.7.5 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES EMULSIFICANTES	66
5.7.6 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ESPUMANTES	78
5.8 INFLUENCIA DEL MUCÍLAGO EN LAS PROPIEDADES FUNCIONALES	85
6.- CONCLUSIONES	86
7.- BIBLIOGRAFÍA	88
ANEXO 1 IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA SEMILLA DE CHÍA	94
ANEXO 2 CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS DE SOYA	95
ANEXO 3 MEDICIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE MEDIANTE EL MÉTODO DEL ACIDO BISINCONÍNICO	96

LISTA DE TABLAS

Tabla	<u>Página</u>
1.1 Variedades de chía, nombre común y nombre científico	7
1.2 Clasificación científica de la chía (<i>Salvia hispanica</i>)	8
1.3 Producción de chía en el estado de Jalisco.	8
1.4 Composición de las semillas de chía (<i>Salvia hispanica</i>) y <i>Salvia polystachya</i> .	9
1.5 Comparación entre la composición de la semilla de chía y la composición de diferentes fuentes vegetales.	9
1.6 Perfil de aminoácidos de la semilla y harina de chía	11
4.1 Métodos utilizados para determinar la capacidad de retención de agua y aceite	31
5.1 Composición proximal de la semilla de chía	39
5.2 Composición proximal del extracto de globulinas de chía y del aislado de proteínas de soya (APPENSOL).	43
5.3 Pesos moleculares de las globulina extraídas de la semilla de chía.	45
5.4 Perfil de aminoácidos de la fracción rica en globulinas obtenida de la semilla de chía.	48
5.5 Composición de aminoácidos de la fracción de globulinas obtenida a partir de diferentes plantas dicotiledóneas	49
5.6 Solubilidad del concentrado de globulinas de chía y del APPENSOL, en función del pH	56
5.7 Peso molecular de las proteínas detectadas durante el seguimiento del perfil electroforético en función del pH del concentrado de globulinas de chía	61
5.8 Peso molecular de las proteínas detectadas durante el seguimiento del perfil electroforético en función del pH del APPENSOL	61
5.9 Capacidad de retención de agua del concentrado de globulinas de chía y del APPENSOL en función del pH	62
5.10 Formación y estabilidad de la emulsión del concentrado de globulinas de chía a pH 5.29 y del APPENSOL a pH 7.22	69
5.11 Formación y estabilidad de la emulsión a pH 4 del concentrado de globulinas de chía y del APPENSOL	71
5.12 Formación y estabilidad de la emulsión a pH 7 del concentrado de globulinas de chía y del APPENSOL.	73

LISTA DE FIGURAS

Figura	<u>Página</u>
1.1 Usos de la semilla de chía en la época prehispánica	6
1.2 Representación de la estructura de una burbuja en el espumado.	17
4.1 Medición de volúmenes para la determinación de la estabilidad de una emulsión	34
5.1 Perfil electroforético del concentrado de globulinas de chía (extracto crudo) extraídas de la semilla de chía	41
5.2 Perfil electroforético y análisis del concentrado de globulinas de chía (extracto crudo) extraídas de la semilla de chía.	44
5.3 Perfil de isoelectroenfoque de las globulinas de chía	46
5.4 Perfil de elución de las proteínas estándar, utilizadas durante la purificación parcial de las globulinas de chía.	50
5.5 Curva de calibración para la columna de Sephacryl S-200.	51
5.6 Perfil cromatográfico de la purificación parcial de las globulinas de chía.	52
5.7 Perfil electroforético de las fracciones obtenidas de la columna de Sephacryl, durante la purificación parcial de las globulinas de chía.	53
5.8 Solubilidad del concentrado de globulinas de chía y del APPENSOL en función del pH.	54
5.9 Perfil electroforético de referencia del concentrado de globulinas de chía y del APPENSOL.	57
5.10 Perfil electroforético del concentrado de globulinas de chía en función del pH	58
5.11 Perfil electroforético del aislado de proteínas de soya APPENSOL en función del pH	59
5.12 Perfil electroforético del concentrado de globulinas de chía, obtenido en el pl de estas proteínas.	60
5.13 Capacidad de retención de aceite del concentrado de globulinas de chía y del APPENSOL.	65
5.14 Formación de emulsión en función del pH y de la concentración de proteína.	70
5.15 Formación de la emulsión a pH 4	72
5.16 Formación de la emulsión a pH 7	74
5.17 Estabilidad de la emulsión del concentrado de globulinas de chía	75
5.18 Índice de actividad emulsificante (IAE), del concentrado de globulinas de chía	77

	<u>Página</u>
5.19 Índice de actividad emulsificante (IAE), del APPENSOL.	77
5.20 Formación de espuma del concentrado de globulinas de chíá	79
5.21 Formación de espuma del APPENSOL	80
5.22 Espumabilidad del concentrado de globulinas de chíá y del APPENSOL a diferentes pHs.	81
5.23 Estabilidad de la espuma del concentrado de globulinas de chíá en función del tiempo y el pH.	83
5.24 Estabilidad de la espuma del APPENSOL en función del tiempo y el pH.	84
5.25 Propiedades espumantes y emulsificantes, realizadas únicamente con mucílago.	85

SIMBOLOGÍA

IAE : Índice de actividad emulsificante.

CRA : Capacidad de retención de agua

CRAC : Capacidad de retención de aceite

pH : Potencial de hidrógeno

pI (s): Punto isoeléctrico (s).

RESUMEN

La fracción proteínica total de la semilla de chía ha presentado algunas propiedades funcionales por lo que se ha propuesto que esta fracción podría ser utilizada como aditivo alimentario, sin embargo, deben estudiarse todas las fracciones proteínicas para poder ampliar este margen de funcionalidad y encontrar un uso comercial.

Se realizó la caracterización bioquímica y la evaluación de las propiedades funcionales de globulinas obtenidas a partir de la semilla de chía (*Salvia hispanica*), para lo cual se efectuó la extracción de estas proteínas en una solución de cloruro de sodio, seguida de una precipitación con sulfato de amonio. El contenido de proteínas en este extracto fue del $62.05 \pm 0.40\%$, lo que permite nombrarlo como un concentrado proteínico de globulinas de chía, seguido de los carbohidratos asimilables, los cuales ocuparon un 35.6% , lípidos y cenizas con un 2.0 ± 0.5 y $0.35 \pm 0.005\%$ respectivamente, mientras que la fracción de carbohidratos no asimilables o fibra cruda, no fue detectada.

Las globulinas que conforman al concentrado de chía tienen pesos moleculares entre 61.1 y 14.2 kDa y la mayoría de estas proteínas tienen carácter ácido. La solubilidad en función del pH de este concentrado fue mínima ($5.5 \pm 0.07\%$) a pH 6 y máxima a pHs 2 y 10, mientras que la capacidad de retención de agua de este concentrado fue de $1.9 \pm 0.09\%$ a pH 4, $1.8 \pm 0.09\%$ a pH 5.29 y de $3.5 \pm 0.09\%$ a pH 7, encontrándose una correlación directa entre la solubilidad y esta propiedad.

La formación y estabilidad de las emulsiones se vieron influenciadas por el pH y la concentración de la proteína. A pH 4 se observó una estabilización del 70.5% de la emulsión a una concentración del 0.125% de proteína, mientras que para las emulsiones a pH 7, la estabilidad se incrementó, a medida que se incrementó la concentración de proteína.

La formación de espuma del concentrado de globulinas de chía, fue mayor a pH 4 (292.6 %) que a pH 7 (280 %), sin embargo, a pH 7 se observó una mejor estabilidad de la espuma.

Se realizó también la comparación de las características del concentrado de globulinas de chía, con las de un producto comercial de proteínas de soya (APPENSOL), obteniéndose mejores resultados para el concentrado de chía en cuanto a la capacidad de retención de aceite y propiedades emulsificantes y espumantes a pH 4 y 7, por lo que el concentrado de globulinas de chía puede utilizarse como sustituto del aislado de soya (APPENSOL) a estos pHs, en productos donde las propiedades emulsificantes son importantes, por ejemplo productos cárnicos.

INTRODUCCIÓN

La preferencia que tenemos de un alimento sobre otro, se basa en los atributos sensoriales que podemos percibir en ellos, tales como apariencia, color y textura. Las proteínas participan como parte funcional en la expresión de estos atributos.

Tradicionalmente, se han utilizado proteínas de origen animal en la fabricación de alimentos, sin embargo, la atención se enfoca cada vez más hacia fuentes no convencionales como en el caso de las proteínas de origen vegetal, en donde la investigación sobre nuevas proteínas funcionales se ha incrementado. Muchas proteínas provenientes de cereales y semillas han demostrado tener propiedades funcionales que actúan de manera importante en la fabricación de alimentos (Damodaran, 1994; Hall, 1996). En esta misma línea de investigación se encuentran las proteínas extraídas de la semilla de *Salvia hispanica* o, también llamada salvia española, Artemisa española, mexicana, o simplemente chía.

Las semillas de chía provenientes de las plantas llamadas *Salvia hispanica* L., *Salvia polystachya* O, *Salviacarduacea* L y otros miembros de la familia Labiatae tuvieron usos alimenticios, medicinales, cosméticos, artísticos, etc., por las diferentes culturas prehispánicas, de tal forma que llegaron a ser junto con el maíz, el frijol y el amaranto, uno de los cultivos más importantes de este periodo, sin embargo las variedades de la chía y sus diferentes usos cayeron en el olvido.

La semilla de esta planta ha sobrevivido más de 500 años lejos de las grandes ciudades y ha tomado relevancia nuevamente, desde que se encontró que posee un elevado contenido en ácidos grasos ω -3, importantes en la alimentación y salud humana; por otro lado, se considera a la chía una fuente de proteína de fácil absorción y digestión (Cachill, 2003; Ayerza y Coates, 2005).

Investigaciones recientes han determinado que su calidad nutrimental como única fuente de proteínas en adultos no está limitada, sin embargo, en niños de edad preescolar es pobre, ya que es deficiente en lisina, una aminoácido esencial para el desarrollo humano.

Por otro lado, el extracto proteínico total (albúminas, globulinas, glutelinas y prolaminas), así como la fracción de glutelinas, presentan propiedades funcionales muy interesantes, como son las altas capacidades de retención de agua y aceite, lo que las hace importantes dentro de la industria de los aditivos alimenticios (Olivos, 2005).

La chía, al ser una fuente no convencional de materia prima para la industria de los alimentos, puede ser importante potencialmente, por lo que es conveniente estudiar sus fracciones proteínicas. La información bibliográfica reportada con relación a las propiedades bioquímicas y de las propiedades funcionales de la fracción de las globulinas es mínima, si bien de acuerdo a Olivos 2005, representan la segunda fracción más importante de las proteínas solubles de la chía.

En estudios previos se han reportado las propiedades funcionales de la fracción de globulinas de algunos vegetales como los chícharos (Koyoro y Powers, 1987), lentejas (Bora, 2002), semilla de colza (Gueguen, y col, 1990), semilla de canola (Gruener e Ismond, 1997), chícharo silvestre (Aluko y Yada,1995) y frijol blanco del norte (Sathe y Salunkhe,1981).

El presente estudio estuvo enfocado a determinar las características bioquímicas y funcionales del extracto de globulinas de la semilla de chía. Ésto permitirá conocer el uso potencial de las globulinas de esta importante semilla, dentro de la industria de los alimentos. Asimismo, esta información contribuirá al retorno de la importancia del cultivo de la chía en México.

1. -MARCO TEÓRICO

En Mesoamérica, la cual es considerada como uno de los principales centros de domesticación de diferentes especies de plantas, hay evidencia de que la agricultura existía en el valle de Tehuacán alrededor de 9000 a. C. En particular, la chía se convirtió en un cultivo básico en el Centro de México entre 1500 y 900 a. C.

Entre los aztecas (de acuerdo a la *Crónica de la Nueva España* escrita en 1554), la chía, el maíz, frijol y amaranto, constituían los granos más importantes de los cuales se derivaban sus dietas básicas; la chía fue tan importante para estas culturas que junto con los granos antes mencionados, formaba parte de los tributos ofrecidos a los aztecas por los pueblos conquistados (Ayerza y Coates, 2005).

Desafortunadamente, el consumo de esta semilla se abandonó, a tal grado que en la actualidad su producción a nivel nacional apenas alcanza las 300 toneladas de semillas producidas anualmente, mientras que en la época prehispánica parece haber sido de alrededor de 10,000 toneladas (Reforma, 2006).

1.1 USOS DE LA SEMILLA DE CHÍA

La literatura reporta 150 formas de uso etnobotánico que se le daba a la chía antes del año 1600 y 79 formas de uso después de este año (Cachill, 2003). La fuente de esta información está incluida en los códices del siglo XVI, escritas por naturalistas, estudios etnográficos e información etnobotánica, la cual identifica 120 especies. Esta información fue dividida en 4 categorías de uso: culinario, medicinal, artístico y religioso/cultural (Cachill, 2003).

1. - **Usos culinarios:** la chía formó parte importante en la alimentación habitual de las culturas prehispánicas, fue utilizada como semilla entera, harina de la semilla, el mucílago de la semilla y su aceite. La semilla era molida y convertida en harina, la cual era incorporada en tortillas, tamales y bebidas. Actualmente la semilla se utiliza comúnmente en la preparación de bebidas.

2. - **Uso medicinal:** Para los aztecas, la chía también tuvo mucha importancia como producto medicinal. Los Códices Florentino y Badianus describen el uso de la chía, sola o con otras hierbas medicinales, para el tratamiento de diferentes enfermedades. La chía era utilizada en infusiones de la semilla entera, formó parte de muchas preparaciones medicinales como cataplasmas para las heridas de bala. El uso de la chía para tratamientos respiratorios y obstétricos era más marcado antes de 1600, posteriormente, su uso se enfocó en el tratamiento de infecciones y obstrucciones oculares.

3. - **Uso artístico:** El aceite de la chía conocido como *chíamatl* fue usado como cosmético. Este aceite era componente de ungüentos debido a sus propiedades emolientes. También era utilizado como una base para pinturas, además de que era un componente básico en la pintura para el cuerpo de los aztecas.

4. - **Uso religioso:** El aceite era utilizado para la pintura de los cuerpos de los guerreros, así como ingrediente básico en la preparación de bebidas durante las ceremonias religiosas o sociales (Ayerza y Coates, 2005; Cachill, 2003).



Fig. 1.1 Usos de la semilla de chía en la época prehispánica. Para inducir el parto en la época prehispánica, las mujeres que estaban por dar a luz bebían una mezcla de agua de chía y carne de cola de tlacuache. Códice florentino, libro XI, f.171v. digitalización, pared LAS CHÍAS SAGRADAS DEL TEMPLO MAYOR DE TENOCHTITLAN.

1.2 BOTÁNICA

La *Salvia hispanica* o chía, es una planta perteneciente a la familia Lamiaceae, nativa del suroeste de California, Texas, México y América Central. Es una planta anual de verano, las formas silvestres se dispersan a través de la Sierra Madre Occidental de Sonora y de Chihuahua. Existen otras variedades que también pertenecen a esta familia como lo muestra la Tabla 1.1 (Romero, 2006; Ayerza, 2005); su clasificación taxonómica puede verse en la Tabla 1.2.

Tabla 1.1 Variedades de chía, nombre común y nombre científico ^a

Nombre común	Nombre científico	Nombre común	Nombre científico
Chía	<i>Salvia hispanica</i> L	Chía cimarrona	<i>S. dugesii</i> F
Chía	<i>S. polystachya</i> O	Chía de campo	<i>S. columbariae</i> B
Chía	<i>S. carducea</i> L	Chía de California	<i>S. columbariae</i> B
Chía	<i>S. lanceolata</i> B	Chían /chiyant	<i>S. hispanica</i> L
Chía Azul grande	<i>S. cyanea</i> B	Chía de Colima	<i>Hyptis suaveolens</i> L.
Chía cimarrona	<i>S. angustifolia</i> C	Chía gorda	<i>Hyptis suaveolens</i> L.
Chía cimarrona	<i>S. privoides</i> B	Chía grande	<i>Hyptis suaveolens</i> L.
Chía cimarrona	<i>S. tiliaefolia</i> V	Chía de chapata	<i>Amaranthus leucocarpus</i> W

^a(Ayerza, 2005)

En México, crece en bosques de juníperos, encino, pino, pino-encino, y otras especies, a una altitud aproximada de 1900 m. La chía crece en condiciones tropicales y subtropicales, su crecimiento anual es de 1 m, es sensible a las heladas y resistente a climas secos; florece de julio a agosto, y sus flores son hermafroditas. Este tipo de plantas crece bien en tierras arenosas húmedas o arcillosas bien drenadas. (UDSA's plants database, 2007; Hortipler Plant Database, 2007; Ayerza y Coates, 2005).

Tabla 1.2 Clasificación científica de la planta *Salvia hispanica* L^b

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta –Planta vascular
Super división	Spermatophyta – Planta de semillas
División	Magnoliophyta – Planta con flores
Clase	Magnoliopsida – Dicotiledónea
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae (familia de la menta)
Género	<i>Salvia</i> L (Sage)
Especie	<i>Salvia hispanica</i> L

^b Hentry y col 1990.

El cultivo de *Salvia hispanica* únicamente se encuentra reportado en el estado de Jalisco, aunque se sabe que otros estados de la Republica mexicana como Puebla, Michoacán y Sinaloa también han tenido producción de ésta y otras especies de chía. La Tabla 1.3 nos muestra como ha variado la producción de chía en el estado de Jalisco desde el año 2001 hasta el año 2006. (SAGARPA, 2007).

Tabla 1.3 Producción de chía en el estado de Jalisco.

	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Superficie sembrada (Ha)	300	300	300	250	---	15
Superficie cosechada(Ha)	300	300	300	250	---	15
Producción (ton)	900	600	900	600	---	37.50
Rendimiento (Ton / Ha)	3.00	2.00	3.00	2.40	---	2.50
Precio Medio Rural (\$/Ton)	4,500	1,450	2,700	3,800	---	7,800
Valor de la Producción (Miles de Pesos)	4,050,000	870,000	2,430,000	2,280,000	---	292,500

Anuarios estadísticos agrícolas; SAGARPA (Delegación Jalisco); SIAP / SIACAPW

1.3 COMPOSICIÓN.

Las semillas de chía tienen ventajas nutritivas únicas. Bushway (Bushway y col., 1981), Ayerza (Ayerza y Coates 2005) y Olivos (Olivos, 2005), reportan el análisis proximal de dos especies distintas de la semilla de chía, el cual se observa en la Tabla 1.4:

Tabla 1.4 Composición de las semillas de chía *Salvia hispanica* y *Salvia polystachya*

Composición	Porcentaje			
	<i>Salvia hispanica</i> ¹	<i>Salvia polystachya</i> ²	<i>Salvia hispanica</i> ³	
			Jalisco	Sinaloa
Humedad		4.31 ±0.116	5.94	5.72
Grasa	30.4	29.80 ± 0.87	32.23 ± 0.08	29.61 ± 0.07
Fibra	27.5	18.00± 0.64	34.59 ± 0.07	45.88 ±0.02
Ceniza	4.61	4.61±0.03	5.96 ± 0.06	4.65 ± 0.47
Proteína	20.7	23.60	24.60 ± 0.25	19.59 ± 0.27
Carbohidratos	40.29	18.70	2.62	0.27
Fósforo		0.69±0.01		
Calcio		0.54± 0.01		

Fuente : 1 Ayerza y Coates, 2003; 2 Bushway y col., 1981; 3 Olivos, 2005

La composición de la chía es comparable con la de los 5 mejores cereales del mundo (Tabla 1.5). Sus componentes son significativamente más altos en proteína, lípidos, fibra y cenizas, al compararlo con los otros cultivos. Cabe mencionar que el contenido de lípidos de la chía es excelente como fuente de ácidos grasos omega-3.

Tabla 1.5 Comparación entre la composición de la semilla de chía y la composición de distintas fuentes vegetales

Fuente ¹	%Proteína	%Lípidos	%Carbohidratos	%Fibra	%Cenizas
Arroz ¹	6.50	0.52	79.15	2.8	0.54
Cebada ¹	12.48	2.30	73.48	17.3	2.29
Avena ¹	16.89	6.90	66.27	10.6	1.72
Trigo ¹	13.68	2.47	71.13	12.2	1.78
Maiz ¹	9.42	4.74	74.26	3.30	1.20
Chía ^{2,3}	20.70	30.4	40.29	27.5	4.61

1 Departamento de agricultura de los Estados Unidos; 2 Weber y col, 1991; 3 Ayerza y Coates, 2003

La fracción proteínica de la semilla de chía varía de un 19 a 24 %, este porcentaje es comparablemente favorable con el de oleaginosas, leguminosas y cereales. Se ha determinado que los aminoácidos de la proteína de chía no tienen factores limitantes en la dieta de las personas adultas (Bushway y col, 1981), sin embargo, recientes investigaciones han determinado que su calidad nutricional como **única fuente** de

proteínas para niños en edad preescolar es pobre, ya que no cumple con los patrones de requerimientos en lisina establecidos por la FAO/WHO/UNU (1985) (Olivos, 2005).

La Tabla 1.6, muestra el análisis de los aminoácidos de la semilla y harina de chía realizada por Ting (Ting y col, 1990) y Olivos (Olivos, 2005), respectivamente.

1.4 MUCÍLAGO

La semilla contiene alrededor del 5 % de fibra soluble, que aparece como mucílago alrededor de la semilla al colocarla en agua. Este polisacárido está compuesto de D-glucosil, D-xilosil y ácido 4-O-metil- α -D-glucopiranosilurónico (Ayerza, 2003; Lin y col., 1994).

1.5 PROTEÍNAS.

Las proteínas son macromoléculas complejas que pueden constituir el 50 % o más del peso seco de las células vivas y tienen un papel fundamental en su estructura y función. Para la mayoría de las proteínas, los aminoácidos constituyentes pertenecen a un grupo de 20 diferentes aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Nueve de estos aminoácidos se obtienen de la dieta y son conocidos como aminoácidos esenciales. Los otros 11 pueden ser producidos por el organismo y no es necesario ingerirlos.

Las proteínas, sobre la base de su composición, se pueden dividir en 2 clases: proteínas simples, que producen únicamente α -aminoácidos después de una degradación hidrolítica completa; proteínas conjugadas, que por degradación producen, además de α -aminoácidos, un grupo no peptídico orgánico o inorgánico llamado grupo prostético.

Las proteínas del primer grupo se pueden subclasificar con base en la solubilidad y composición de los aminoácidos.

Tabla 1.6 Perfil de aminoácidos de la semilla y harina de chía

Aminoácido	Harina desengrasada Variedad Sinaloa¹	a,c (g/16 g. N)	a,d (g/16 g. N)	Patrón de referencia adulto^b (g/16 g. N)
Asp	7.6	7.4	6.50	
Trp				0.5
Thr	3.4	3.2	2.93	0.9
Ser	4.9	4.4	4.20	
Glu	12.4	13.7	13.78	
Gly	4.2	4.0	3.99	
Ala	4.3	4.4	4.12	
Val	5.1	5.3	4.41	0.3
Cys	1.8	1.4	0.33	1.7
Met	1.8	1.4	1.99	
Ile	3.2	3.4	3.66	1.3
Leu	5.9	5.9	5.82	1.9
Tyr	7.5	7.5	1.48	1.9
Phe	7.5	7.5	4.01	
Lys	4.4	3.6	4.14	1.6
His	2.6	2.5	2.16	1.6
Arg	8.9	8.6	8.07	
Pro	4.4	3.9	2.94	
Total	80.6	79.5	74.53	

¹ Olivos, 2005; ^aTing y col,1990 ; ^bFAO/WHO/UNU,1985 ; ^c extracción con disolvente ; ^d extracción con prensa.

Las proteínas presentan cuatro niveles de estructura:

1. - Estructura primaria: se refiere a la identidad, cantidad relativa y secuencia de aminoácidos de la cadena peptídica.
2. - Estructura secundaria: se refiere a la orientación geométrica de la cadena polipeptídica que sirve como esqueleto del polímero indicando las estructuras de hélice alfa, hoja plegada paralela o antiparalela y estructura al azar.
3. - Estructura terciaria: se refiere a la arquitectura tridimensional completa de la proteína, incluyendo la orientación de cualquier grupo prostético.

4. - Estructura cuaternaria: que considera la unión no covalente de dos o más cadenas polipeptídicas idénticas.

Existen fuerzas estabilizadoras que le proporcionan a las proteínas una estructura definida, como son los enlaces peptídicos en la estructura primaria, los puentes de hidrógeno y disulfuro en la estructura secundaria, interacciones covalentes (puentes de disulfuro) y no covalentes (puentes de hidrógeno, fuerzas de atracción electrostática e interacciones hidrofóbicas) en la estructura terciaria y en la cuaternaria en donde la mayoría son interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (puentes salinos entre diferentes especies monoméricas de la proteína) (Bohinski, 1991).

1.5.1 GLOBULINAS

Las proteínas presentes en las semillas usualmente se clasifican en cuatro grupos de acuerdo a su solubilidad en solventes específicos usados sucesivamente para su extracción:

Las albúminas, las cuales son solubles en agua; **las globulinas**, las cuales son extraídas en soluciones de cloruro de sodio (NaCl); las prolaminas, solubles en etanol al 70 % y las glutelinas, las cuales son solubles en soluciones básicas (pH 12) o ácidas (pH 2) (Cheftel, 1998; Branlard y Bancel, 2007).

En granos de cereales, las principales proteínas de almacenamiento usualmente son las prolaminas, mientras que en los granos que no provienen de cereales, tales como las leguminosas, usualmente predominan las globulinas, las cuales llegan a ocupar de un 35 a 72 % del contenido total de proteína, y tienen una propiedad de balance nutricional (Waggle y col., 1989; Utsumi, 1992).

Las globulinas pueden subdividirse en 2 clases, 7 y 11S, basados en sus coeficientes de sedimentación (Wright, 1998), la globulina 11S, es la proteína predominante en plantas dicotiledóneas (Pernollet y Mosseca, 1983).

En su estructura secundaria, las globulinas poseen fracciones con bajo contenido de estructura α - hélice y alto contenido de estructura β - plegada, esto último tiene una importancia relevante en el plegamiento interno de estas macromoléculas.

Sin embargo, las propiedades de superficie (tensión superficial, de emulsificación, retención de aceite y características espumantes de las proteínas, entre otras), son más variables que las propiedades fisicoquímicas (como viscosidad, gelificación, solubilidad, entre otras), entre las globulinas de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. (Marcone, y col., 1998).

1.6.- PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS.

Las propiedades de los productos alimenticios tienen un especial interés en la aceptación del producto por el consumidor. La apariencia, tamaño, forma, textura, consistencia, viscosidad y palatabilidad son algunas de las características externas y fisicoquímicas importantes en todos los productos alimenticios.

El fabricante selecciona sus ingredientes y los procesa para obtener las propiedades deseables en el producto terminado. La habilidad de un ingrediente alimenticio para interactuar con otros e impartir propiedades deseables a un sistema de alimentos es conocida como **funcionalidad**.

Los alimentos son sistemas complejos que están formados por distintos componentes, tales como proteínas, grasas, carbohidratos y sales minerales, los cuales influyen en las propiedades funcionales. La funcionalidad en un alimento es el resultado de la interacción entre estos ingredientes, sin embargo, se considera que las proteínas tienen una función muy importante y quizás mayoritaria en la impartición de estas propiedades (Wijeratne, 2005).

La contribución funcional de una proteína a la calidad sensorial de un alimento no se limita a una sola propiedad fisicoquímica, sino a la manifestación de una compleja interacción de múltiples propiedades (Damodaran, 1994).

Las propiedades funcionales de las proteínas, pueden clasificarse en 3 grupos principales:

- 1) Aquellas que son dependientes de las interacciones proteína – agua, también llamadas propiedades de hidratación, las cuales incluyen absorción y retención de agua, dispersibilidad, solubilidad, entre otras.
- 2) Aquellas que dependen de las interacciones proteína – proteína o hidrodinámicas, tales como, viscosidad, gelificación, texturización, entre otras.
- 3) Y las propiedades de superficie se refieren a la tensión superficial de emulsificación, retención de aceite y características espumantes de las proteínas (Cheftel, y col., 1989).

1.6.1 SOLUBILIDAD

Termodinámicamente la solubilidad de una proteína, bajo condiciones dadas, es la concentración de proteína en el solvente en un sistema único o de dos fases (interacciones proteína – proteína o proteína – solvente) en el estado de equilibrio.

La solubilidad puede determinar las condiciones óptimas de extracción y purificación de las proteínas, así como para la separación de fracciones proteínicas. La solubilidad, bajo distintas condiciones, también da una buena indicación de las aplicaciones potenciales de las proteínas.

El grado de insolubilidad es tal vez, la medida más práctica de la desnaturalización o de la agregación proteínica.

Entre las propiedades funcionales de las proteínas, la determinación de la solubilidad es de primordial importancia, pues influye en otras propiedades de las proteínas tales como espumado, emulsiones y gelificación, ya que en general las proteínas requieren tener alta solubilidad para obtener resultados satisfactorios en dichas determinaciones (Halling, 1981; Vojdani, 1996).

1.6.2 RETENCIÓN DE AGUA

La determinación de la capacidad de retención de agua de una proteína alimentaria, es de gran importancia en la industria de los alimentos. Esta propiedad no solo determina la aceptabilidad de un producto alimenticio dado (textura, jugosidad, etc.), también determina el margen de ganancia.

Muchos alimentos contienen hasta un 90 % de agua, por lo que una buena capacidad de retención de ésta es esencial. Muchos consumidores tienden a elegir productos que no muestren pérdida de líquidos en el empaque.

1.6.3 RETENCIÓN DE ACEITE.

La capacidad de retención de aceite de una proteína está determinada por la estructura de la matriz proteínica, así como por el tipo de grasa y su distribución. Las interacciones entre las proteínas y la grasa también son muy importantes, ya que éstas pueden afectar la estructura del gel (propiedades gelificantes), así como la distribución y/o emulsificación de la grasa.

Una formulación que resulte pobre en la capacidad de retención de agua y aceite puede traducirse directamente a pérdidas de líquidos durante el procesado (cocción, congelamiento, etc.).

1.6.4 PROPIEDADES EMULSIFICANTES

Las emulsiones son dispersiones en dos líquidos no miscibles, de los cuales uno se encuentra bajo la forma de pequeñas gotitas dispersas y el otro bajo la forma de una fase continua dispersante. La mayor parte de las emulsiones alimenticias son del tipo aceite en agua (O/W) por ejemplo, margarinas y mantequillas o bien agua en aceite (W/O), como por ejemplo la leche, pero su estructura es mucho más compleja, ya que en muchos sistemas de alimentos los sólidos son una parte importante de la matriz (por ejemplo en las salchichas) (Cheftel y col., 1989; Hill, 1996).

FORMACIÓN DE EMULSIONES: El agua y el aceite son inmiscibles debido al incremento desfavorable de energía que ocurre cuando la estructura del agua es perturbada por contacto con agentes externos no polares. El nivel mínimo de energía de un sistema se obtiene cuando el área de contacto entre los dos líquidos inmiscibles es minimizada, esto se logra con la adición de agentes emulsificantes, los cuales tienen la función de disminuir la energía asociada con la dispersión final de las gotas de aceite en agua.

Los agentes emulsificantes son moléculas anfipáticas, las cuales tienen una porción soluble en agua y otra porción soluble en solventes no polares. Este tipo de estructuras tiende a maximizar el contacto de los grupos polares y minimizar el contacto de los grupos hidrofóbicos con el agua.

Las proteínas contienen ambos tipos de residuos de aminoácidos, polares y no polares y pueden ser adicionados como agentes emulsificantes. Estas proteínas se adsorben en la interfase agua/ aceite y aportan propiedades físicas y reológicas (espesamiento, viscosidad, elasticidad - rigidez) que determinan la resistencia de las gotitas a la coalescencia.

Así mismo, según el pH de la disolución se produce una ionización de las cadenas laterales de los diferentes residuos de aminoácidos y estos aportan fuerzas electrostáticas favoreciendo la formación e incremento de la estabilidad de la emulsión (Mangino, 1994; Cheftel, 1989).

1.6.5 PROPIEDADES ESPUMANTES

Las espumas tienen un amplio campo de aplicación en la industria alimentaria, en productos como merengues, crema batida, algunas pastas, helados, soufflés, la espuma de la cerveza o incluso el pan.

Las espumas en batidos alimenticios son dispersiones de gas, que se encuentra como burbujas o celdas de aire, en una fase continua líquida o semisólida (ver Fig. 1.2) (Cheftel, 1989).

La interfase gas /líquido creada mecánicamente, al igual que en las emulsiones está formada por delgadas capas líquidas llamadas laminillas, las cuales constituyen una película, formando así, las paredes de las burbujas. La inestabilidad de esta interfase provoca la coalescencia de las burbujas de gas y por lo tanto la eliminación de la espuma. Este hecho hace necesaria la presencia de tensores que disminuyan la tensión de la interfase, evitando así la coalescencia de las burbujas.

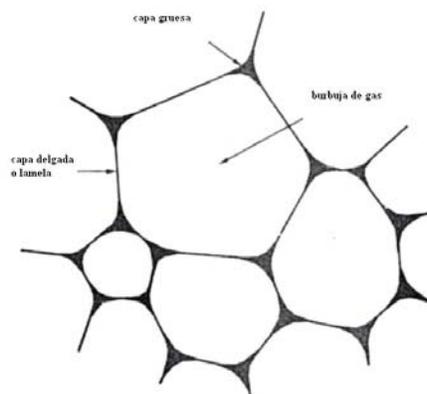


Fig. 1.2 Representación de la estructura de una burbuja en el espumado.

Existen 2 tipos de agentes de superficie utilizados para evitar la coalescencia de la espuma:

Agentes surfactantes o detergentes: son pequeñas moléculas anfipáticas, las cuales generalmente no interactúan con sus vecinos, esto evita el desequilibrio del sistema, difundiéndose rápidamente hacia la región delgada de la película en contra del gradiente en la tensión superficial. Los agentes surfactantes arrastran una capa de líquido interlaminar, asociándola con sus grupos polares dentro de la parte delgada o estrecha de la película. Esto proporciona densidad a la película.

En contraste, las proteínas se adsorben en la interfase e interactúan unas con otras, estableciendo interacciones hidrofóbicas, electroestáticas y puentes de hidrógeno, con el propósito de formar una capa adsorbida viscoelástica y consistente. Las moléculas de proteína que forman la capa adsorbida, pueden sufrir una deformación para mantener estable el sistema.

Existen 2 fases distintas en el espumado de las proteínas; la primera se relaciona con la efectividad que tienen las proteínas en la encapsulación del gas (formación de espuma), y la segunda se relaciona con el tiempo de vida de la espuma creada (estabilidad de la espuma).

Una proteína puede tener una excelente capacidad de formación de espuma, pero ésta puede no ser una espuma estable y viceversa

1.7 FACTORES QUE AFECTAN LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS

Son 3 los factores que afectan las funciones de las proteínas:

1. - FACTORES INTRÍNSECOS DE LAS PROTEÍNAS: que incluyen la conformación, el tamaño, la forma, la composición y la secuencia de residuos de aminoácidos, la carga y distribución de carga, la proporción hidrofílica / hidrofóbica de los residuos de aminoácidos, el contenido de estructura secundaria y su distribución, los arreglos terciarios y cuaternarios de las macromoléculas, las interacciones inter e intra subunidades y la razón de la rigidez/ flexibilidad de la proteína en respuesta a condiciones externas.

2. -TRATAMIENTOS DE PROCESADO DEL MATERIAL CRUDO: tales como cambios de pH y temperatura de precipitación de las proteínas, solventes de extracción utilizados en la extracción de lípidos, adición de álcalis, ácidos o sales, tratamientos enzimáticos, secado y reducción de tamaño de las muestras para la obtención de harinas.

3. - CONDICIONES DE APLICACIÓN: como condiciones iónicas, pH, concentración de proteína, temperatura, métodos y tiempo de mezclado, centrifugado, equipo utilizado, entre otros (Hall, 1996).

La mayoría de las propiedades funcionales de las proteínas, afectan la calidad de textura de un alimento y juegan un importante papel en la determinación de su comportamiento físico durante la preparación, procesamiento y almacenamiento (Damodaran, 1997).

2. -ANTECEDENTES

📖 La globulina 11 S, está formada por múltiples sub- unidades (Derbyshire y col., 1976).

📖 La globulina 11S es la proteína predominante en plantas dicotiledóneas (Pernollet y Mosseca, 1983).

📖 El peso molecular de globulinas solubles en sal, de plantas dicotiledóneas, se encuentra entre 300 y 370 kDa y está compuesta por múltiples subunidades (Marccone y col., 1998).

📖 La mayoría de las subunidades que componen a las globulinas 11 S de plantas dicotiledóneas tienen pesos moleculares entre 20 – 27 kDa y 30- 39 kDa, y corresponden a las subunidades básicas y ácidas respectivamente (Marccone y col., 1998).

📖 Las globulinas presentan una relativa alta estabilidad a la temperatura, ya que sus temperaturas de desnaturalización van de 83.8 a 107.8 ° C. (Marccone y col., 1998).

📖 Las globulinas pueden subdividirse en 2 clases, 7 y 11S, basados en sus coeficientes de sedimentación (Wright, 1998)

📖 Las globulinas son la segunda fracción de proteínas solubles más abundantes extraídas de la semilla de chía (*Salvia hispanica*) (Olivos, 2005).

📖 La temperatura máxima de desnaturalización de la fracción de globulinas de la chía es de 124.98 °C, lo que hace que ésta sea la de mayor estabilidad térmica en comparación con el resto de las fracciones solubles (Olivos, 2005).

📖 No existen más datos reportados acerca de la fracción de globulinas obtenida a partir de la semilla de chía (*Salvia hispanica*).

3. -OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las globulinas de la semilla de chía, *Salvia hispanica*, empleando procedimientos bioquímicos y evaluando las propiedades funcionales de estas proteínas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

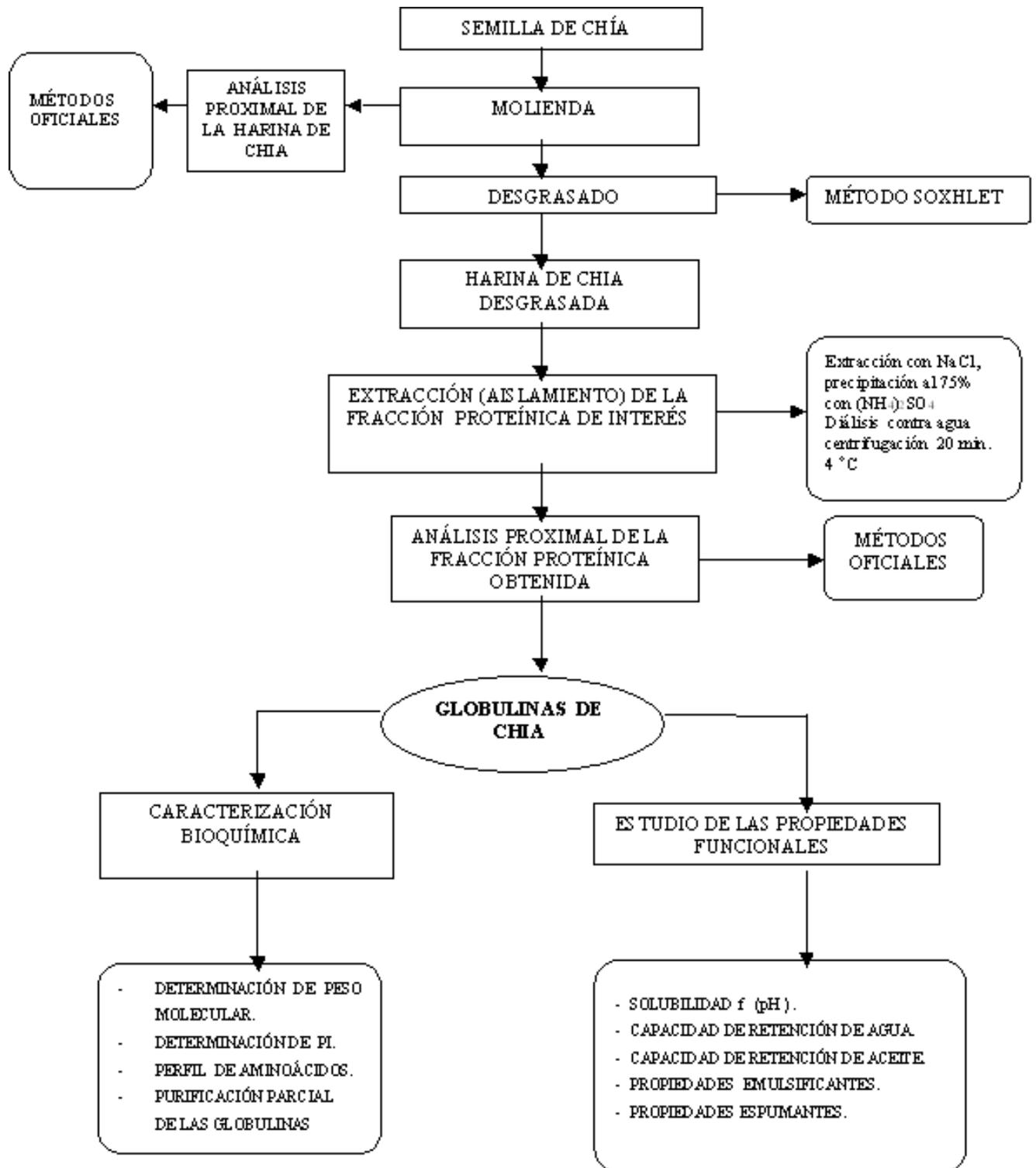
- ✓ Obtener un extracto proteínico rico en globulinas a partir de las semillas de chía.
- ✓ Purificar a la (s) globulina (s) extraídas de la semilla de chía.
- ✓ Determinar propiedades bioquímicas del extracto proteínico tales como peso molecular, punto isoeléctrico y composición de aminoácidos.
- ✓ Determinar la efectividad funcional de las proteínas extraídas mediante pruebas de propiedades funcionales establecidas como solubilidad, capacidad de retención de agua y aceite y propiedades de emulsificado y espumado.
- ✓ Comparar las propiedades funcionales del extracto con un producto comercial de soya.
- ✓ Establecer una posible aplicación de estas proteínas dentro de la industria alimentaria

HIPÓTESIS.

La caracterización bioquímica de la fracción de globulinas de chía, así como la evaluación de sus propiedades funcionales, nos permitirá establecer el uso potencial que pueden tener estas proteínas en la industria alimentaria.

4. -METODOLOGÍA

ESQUEMA GENERAL DE INVESTIGACIÓN



4.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA SEMILLA DE CHÍA (*Salvia hispanica*)

Se utilizó una muestra comercial de la semilla de chía (*Salvia hispanica*), comprada en la central de abastos del Distrito Federal, a la cual se le realizó una inspección visual y limpieza de material extraño y semillas contaminantes. Posteriormente se mandó una muestra para su identificación botánica y anexo al sistema MEXU (Herbario Nacional de México).

Las semillas y la harina desgrasada fueron almacenadas en recipientes de plástico cerrados para su posterior estudio.

4.1.2 OBTENCIÓN DE HARINA Y DESGRASADO

La semilla de chía fue molida en un molino para café (Braun KSM 2, EUA), separando las partículas gruesas, las cuales se molieron nuevamente, repitiendo el proceso dos veces más. La harina obtenida fue desgrasada mediante el método de Soxhlet con diclorometano por 5 horas a 40 °C con 3 recambios de solvente de extracción durante este periodo de tiempo.

4.1.3 HOMOGENIZACIÓN DE LA HARINA

La harina desgrasada fue molida nuevamente y tamizada por una malla de 0.5 mm de diámetro.

4.2 COMPOSICIÓN

Se realizó el análisis de la composición proximal de la harina de chía sin desgrasar, del extracto proteínico de globulinas obtenido a partir de la harina desgrasada, y de la muestra comercial utilizada como patrón de referencia durante las pruebas de propiedades funcionales.

Se determinaron la humedad, cenizas, lípidos (extracto etéreo), proteínas, fibra cruda y carbohidratos (determinados por diferencia) de acuerdo con métodos oficiales descritos por la AOAC (1995). Para determinar la humedad residual del extracto de globulinas, se utilizó el método de secado por estufa al vacío, para evitar dañar a las proteínas. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

4.3 ELIMINACIÓN DEL MUCÍLAGO

No se realizó la eliminación del mucílago previo a la extracción de las globulinas, la eliminación de una cantidad de polisacárido se efectuó durante el proceso de extracción de las globulinas.

4.4 EXTRACCIÓN DE LA FRACCIÓN DE GLOBULINAS DE LA SEMILLA DE CHÍA

La harina desgrasada se utilizó para el aislamiento de las globulinas, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

A 50 g de la harina desgrasada de chía se le adicionaron 800 mL de una solución salina (NaCl 0.5 M), dejándose en agitación durante toda la noche. Posteriormente se realizó una centrifugación. Al sobrenadante obtenido se le realizó una primera precipitación, saturando la solución al 25 % con sulfato de amonio (2 h, 4 °C). Esta solución se centrifugó nuevamente, el sobrenadante se utilizó para una segunda saturación y el precipitado se resuspendió en la solución de cloruro de sodio de extracción y se dializó contra agua destilada (para eliminación de sales) por 48 h a 4 °C, haciendo 5 recambios de agua durante el proceso de diálisis. Transcurrido este tiempo, la solución se centrifugó, el sobrenadante se descartó y el precipitado se liofilizó y guardó a temperatura ambiente para su posterior análisis.

El sobrenadante obtenido después de la primer saturación, se sometió a una segunda precipitación de proteínas, saturando la solución al 75 % durante toda la noche (18 h) y se centrifugó nuevamente.

El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 200 mL de solución de extracción, el cual se dializó contra agua destilada por 48 h a 4 °C (con 5 recambios de agua durante el proceso). Al finalizar el tiempo de diálisis, la mezcla se centrifugó recuperando la pastilla y el sobrenadante, los cuales se guardaron siguiendo el proceso anterior.

Los procesos de centrifugación se llevaron a cabo en la ultracentrífuga Beckman modelo XL-90 a 30,000 rpm por un tiempo de 20 min. a 4 °C. Para los procesos de diálisis se utilizaron membranas de celulosa Spectra/Por con un tamaño de poro de 3500 kDa, Spectrum Laboratories, Rancho Domínguez CA.

4.4.1 RENDIMIENTO

El rendimiento se obtuvo a partir de 50 g de harina y la precipitación directa al 75 %, el extracto obtenido fue liofilizado y pesado.

4.5 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL CONCENTRADO DE GLOBULINAS DE CHÍA

4.5.1 DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR

Se realizaron geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), para verificar la presencia de proteínas en los extractos y en el sobrenadante final obtenidos durante el proceso de extracción.

Se empleó un equipo de electroforesis modelo Mini-PROTEAN II Cell de Bio-Rad. Los geles se hicieron al 12 % de poliacrilamida, de acuerdo al método de Laemmli (1970). Se utilizó un kit estándar de marcadores de peso molecular (Sigma Market Low Range), que incluye las siguientes proteínas: albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina de huevo de pollo (45 kDa), gliceraldehído – 3 – fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), tripsinógeno de

páncreas bovino (24 kDa), inhibidor de tripsina de soya (20 kDa), α -lactoalbúmina de leche bovina (14.2 kDa), aprotinina de pulmones bovinos (6.5 kDa), para estimar el peso molecular de las proteínas problema. El gel fue teñido en azul brillante de Comassie R-250.

4.5.2 DETERMINACIÓN DE PUNTO ISOELÉCTRICO.

Para la determinación del punto isoelectrico se utilizó un gel de agarosa PhastGel (Healthcare IEF 3-9), empleando un equipo PhastSystem™ Pharmacia Biotech. El gel corrió a 15 °C por 2 h. Se utilizó un kit de marcadores de punto isoelectrico estándar (Amersham Biosciences) que contiene las siguientes proteínas: amilogucosidasa (pI 3.50), rojo de metilo (indicador pI 3.75, no aparece en el gel al final de la tinción), inhibidor de tripsina de soya (pI 4.55), β - lactoglobulina A (pI 5.20), anhidrasa carbónica B bovina (pI 5.85), anhidrasa carbónica B humana (pI 6.55), mioglobina de caballo (ácida pI 6.85), mioglobina de caballo (básica pI 7.35), lectina ácida de lenteja (pI 8.15), lectina neutra de lenteja (pI 8.45), lectina básica de lenteja (pI 8.65) y tripsinogeno (pI 9.30), para estimar el PI de las proteínas problema. El gel fue teñido con azul de Coomassie de acuerdo con la técnica número 200 desarrollada por PhastSystem™

Los geles fueron analizados en el programa QUANTITY ONE 4.6.3 de BIORAD para obtener los respectivos pesos moleculares y puntos isoelectricos de las proteínas del concentrado de globulinas de chíá.

Una vez que se analizaron los resultados obtenidos de la caracterización bioquímica, se decidió realizar la precipitación directamente al 75 % de saturación con sulfato de amonio.

4.5.3 COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS

La composición de aminoácidos o perfil de aminoácidos, fue determinado en los laboratorios de Química Biológica en la Universidad de Ciencia y Tecnología de Lille en Francia, mediante una colaboración con el Instituto de Química.

4.5.4 DETERMINACIÓN DE pH

La determinación de pH del concentrado de proteínas de chía y del aislado de proteínas de soya se realizó de acuerdo al método # 943.02 de la AOAC.

Se pesaron 10 g de muestra y se homogenizó con agua destilada pH 7 durante 2 min. a 20000 rpm (POLITRON TISSUE TEAROR modelo 985-370, Biospec Products Inc.). La solución resultante se llevó a un volumen de 100 mL y se agitó con agitador magnético a temperatura ambiente por 30 min. Se registró el pH con un potenciómetro (Conductronic pH 120). La medición se realizó por triplicado.

4.6 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LAS GLOBULINAS.

La purificación parcial de las globulinas se realizó mediante una cromatografía de filtración en gel, la cual se basa en la migración diferencial de las proteínas (aprovechando sus variaciones de tamaño) a través de la fase sólida estacionaria, compuesta de cadenas poliméricas entrecruzadas de dextrano o poliacrilamida entrecruzadas. La estructura polimérica entrecruzada proporciona una malla porosa tridimensional a cada granulo, siendo el tamaño de los poros determinado por el grado de entrecruzamiento.

La facilidad de entrada y el grado de penetración dentro de un gránulo y por lo tanto, la extensión en que el movimiento de los solutos se retarda, será función de las diferencias entre los tamaños de los poros y tamaños moleculares de los solutos, siendo las moléculas chicas retenidas en la columna un tiempo mayor.

Los solutos con dimensiones moleculares mayores que los poros más grandes de los gránulos de gel no penetraran en la fase estacionaria y pasaran directamente a través de la columna disueltos en la fase móvil (Bohinski, 1987).

El extracto liofilizado de globulinas, se solubilizó en la misma solución reguladora utilizada para equilibrar la columna. Muestras de 2.5 mL (lo que corresponde al 1 % del volumen total de la columna) del extracto crudo disuelto de globulinas, fueron colocadas en una columna de cromatografía de filtración en gel (Econo system Fraction collector modelo 2110, Econo Pump modelo EP-1 de Bio-Rad). Se utilizó una resina de Sephacryl S-200 (Pharmacia, Biotech), la cual tiene un rango de fraccionamiento de 1×10^3 a 2×10^5 kDa, para empacar la columna (1.6x 125.2 cm) y se equilibró con una solución reguladora de fosfato de sodio 0.05 M más NaCl 0.15 M a pH 7 la cual contenía EDTA 2 mM y PMSF 1mM.

La columna se calibró haciendo pasar en primer lugar el dextran azul para calcular el volumen muerto de ésta.

Posteriormente se hicieron pasar a las proteínas estándar (Pharmacia Biotech) de bajo peso molecular: albúmina sérica bovina (BSA, 67 kDa), quimotripsinógeno A (25 kDa), ovoalbumina (43 kDa) y ribonucleasa (13.7 kDa), obteniéndose una curva estándar. El proceso de elución de la solución reguladora hacia la columna se hizo a temperatura ambiente a un flujo de 48 mL/ h; se colectaron fracciones de 5 mL y se midió la absorbancia a 280 nm (espectrómetro Spectronic Génesis Milton Roy). De la gráfica de perfil de elución obtenida, se colectaron los picos por separado, después se juntó cada pico, se concentró (Amicon división, Beverly, M.A.), utilizando una membrana de tamaño de poro de 10 kDa. Se centrifugó y el sobrenadante se guardó en fracciones de 1.5 mL a -20 °C hasta su utilización.

Se realizó un gel desnaturalizante de poliacrilamida, para verificar la presencia de proteínas en los picos obtenidos, se utilizaron las mismas condiciones que para los geles realizados anteriormente.

4.7 ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DEL CONCENTRADO DE GLOBULINAS DE CHÍA.

El extracto crudo liofilizado obtenido de la precipitación directa al 75 %, fue utilizado para la evaluación de las propiedades funcionales.

Una muestra comercial de proteínas de soya (APPENSOL), se empleó como patrón de referencia durante las pruebas de propiedades funcionales. Esta muestra fue donada por NUTRER (Industria de Aditivos Alimentarios). Se buscó una muestra comercial de proteínas de soya, ya que la mayor parte de las proteínas de esta fuente vegetal están clasificadas como globulinas (Wijeratne, 2005), lo cual nos permite compararla efectivamente con nuestro extracto.

De acuerdo al fabricante, el aislado fue obtenido por precipitación isoelectrica de las proteínas a pH 7.

4.7.1 SOLUBILIDAD EN FUNCIÓN DEL pH (Popineau y col., 1988 con ligeras modificaciones).^{}**

Existen diferentes métodos para determinar la solubilidad de una proteína y todos se basan en determinar la cantidad de proteína que se solubilizó en agua u otro solvente bajo condiciones definidas, mediante diversas técnicas tales como, el método de

^{**} El volumen total de muestra utilizado en estos ensayos fue de 5 ml, mientras que los utilizados por Popineau y col fueron de 50 mL.

La temperatura de reposo en la metodología original era de 4 °C, durante el presente estudio se realizó a temperatura ambiente, ya que las proteínas de chía se agregan y precipitan a bajas temperaturas

Kjeldahl, Biuret, Bradford, Lowry, etc., y expresada en diferentes unidades de acuerdo a la metodología utilizada (Cheftel y col.,1989; Vojdani, 1996).

Se prepararon soluciones al 1 % (p/v) del concentrado de proteína de chíá en un volumen total de 5 mL, se les ajustó a valores de pH en un intervalo de 2 a 12 con NaOH 0.5 M y HCl 0.5 M. Las soluciones se colocaron en una placa agitadora a 120 rpm por 30 min. a temperatura ambiente.

Después de este tiempo se ajusta nuevamente el pH y se agita por 1 hora más, haciendo el respectivo ajuste de pH cada media hora, inclusive al final del tiempo de agitación. Al terminar el tiempo de solubilización de las proteínas a los diferentes pH's, las muestras se dejaron en reposo toda la noche (15 h) a temperatura ambiente, para asegurar su completa solubilización. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm por 30 min.

El precipitado fue desechado y al sobrenadante se le cuantificó inmediatamente proteína soluble, empleando el método del ácido bisinconínico BSA (albúmina de suero bovino) para microplacas de Pierce (ver anexo 3). En forma paralela se llevaron a cabo las pruebas con el aislado de proteínas de soya a la misma concentración y en las mismas condiciones experimentales, los resultados se reportan como % de proteína soluble. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

4.7.2 PERFIL ELECTROFORÉTICO EN FUNCIÓN DEL pH

A los sobrenadantes obtenidos de cada ajuste de pH, se les realizó geles desnaturizantes de poliacrilamida SDS-PAGE, en un equipo de electroforesis modelo Mini-PROTEAN II Cell de Bio-Rad. Los geles se hicieron al 12 % de poliacrilamida, de acuerdo al método de Laemmli (1970). Se utilizó un kit estándar de marcadores de bajo peso molecular (Bio-Rad), que contenía las siguientes proteínas, Fosforilasa b 97.4 kDa, Albúmina sérica bovina 66.2 kDa, Ovalbúmina 45 kDa, Anhidrasa carbónica 31 kDa, inhibidor de tripsina de soya 21.5 kDa y Lisozima 14.4 kDa, para estimar el peso

molecular de las proteínas problema. Los geles fueron teñidos en azul brillante de Comassie R-250 y analizados con el programa QUANTITY ONE 4.6.3 de BIORAD, para la determinación del peso molecular de las proteínas observadas en cada gel.

4.7.3 CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (Bora, 2002).

Existen diferentes métodos para determinar la capacidad de retención de agua y aceite tales como los que se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1 Métodos utilizados para determinar capacidad de retención de agua y aceite

CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA	CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE ACEITE
Métodos de presión	Métodos de presión
Método de succión capilar	Método de Cocción / procesado
Método de absorción / rehidratación	Pruebas de emulsificado
Métodos ópticos	Métodos ópticos
Microscopia	Método de extracción con solventes
	Microscopia

(Barbut, S, 1996):

Esta determinación se realizó por el método de centrifugación a alta velocidad, el cual se considera un método de presión. Con este método se cuantifica la cantidad de agua que permanece unida a la proteína hidratada después de aplicar una fuerza externa.

Se pesaron 500 miligramos de proteína de chíá y/o soya que se dispersaron en tubos para centrifuga de 15 mL que contenían 5 mL de agua destilada, agitando con una varilla de vidrio. Después de un periodo de reposo de 60 min. (tiempo durante el cual las dispersiones se agitaban ocasionalmente), las dispersiones fueron centrifugadas a 5000 rpm, a temperatura ambiente por 10 min., el volumen del sobrenadante fue decantado y medido en probetas de 10 mL.

La capacidad de retención de agua se expresa como la razón mL de agua retenida / g de proteína.

Se estudió la capacidad de retención de agua a pH 4 y 7, utilizando soluciones reguladoras de acetato de sodio y fosfato de sodio 0.1M, respectivamente. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

4.7.4 CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE ACEITE (Bora, 2002).

Esta determinación se realizó por el método de centrifugación a alta velocidad, el método tiene el mismo principio que la determinación anterior.

Se pesaron 500 miligramos de proteína de chíá y/o soya que se dispersaron en tubos para centrífuga de 15 mL que contenían 5 mL de aceite de maíz, agitando con una varilla de vidrio. Después de un periodo de reposo de 60 min. (tiempo durante el cual las dispersiones se agitaban ocasionalmente), las dispersiones fueron centrifugadas a 5000 rpm, temperatura ambiente, por 10 min., el volumen del sobrenadante fue decantado y medido en probetas de 10 mL.

La capacidad de retención de aceite se expresa como la razón mL de aceite retenido / g de proteína. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

4.7.5 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES EMULSIFICANTES DE LAS GLOBULINAS DE CHÍA.

FORMACIÓN DE LA EMULSIÓN DAGORN Y COL., 1987

Esta técnica que se basa en la estimación de separación de fases, mide la resistencia de una emulsión a la coalescencia ante una fuerza centrífuga, mediante la medición del volumen de la fase de aceite que se separa en relación con el volumen que permanece en la emulsión.

Se prepararon soluciones al 1 % (p/v) de concentrado de proteínas de chíá y soya con agua destilada, en un volumen total de 25 mL, a esta solución se le adicionaron 25 ml de aceite de maíz con bureta a velocidad constante,

las emulsiones se formaron utilizando un homogenizador (POLITRON TISSUE TEAROR modelo 985-370, Biospec products inc.) a velocidad 4 (18000 – 24000 rpm.) por 2 min.

ESTABILIDAD DE LA EMULSIÓN

Las emulsiones se vaciaron en 5 tubos (10 mL por tubo) de centrifuga cónicos graduados de 15 mL y se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min. La determinación de la estabilidad de la emulsión se realizó midiendo los siguientes volúmenes:

Vac = Volumen de aceite coalescido

Vt = Volumen total

Vfpd = Volumen de la fase polar dispersa = Volumen parcial / volumen total = 25 / (25+25) = 0.5 en este caso.

Y utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de aceite coalescido} = \frac{\text{Vac}}{(\text{Vt} \times \text{Vfpd})} \times 100$$

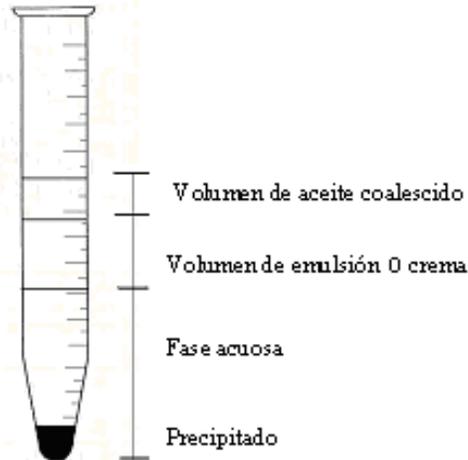


Fig 4.1 Medición de volúmenes para la determinación de la estabilidad de una emulsión.

La determinación se realizó por quintuplicado

ÍNDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE (IAE) (PIERCE Y KINSELLA 1978)

La determinación del índice de actividad emulsificante (IAE), es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para estimar el área interfacial estabilizada por unidad en peso de la proteína. Este método se basa en la premisa de que es posible estimar el área superficial del glóbulo de grasa midiendo la turbidez de la emulsión.

A partir de las emulsiones hechas se tomaron 200 μL y se adicionaron a 50 mL de una solución al 0.1 % de SDS y 0.1 M de NaCl sin ajuste de pH, se agitaron vigorosamente y se leyó la absorbancia de las muestras en celdas de vidrio a 500 nm (Espectrofotómetro Milton Roy modelo spectronic Genesys 2). La determinación se realizó por quintuplicado.

Los valores de IAE se calcularon de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$IAE = \frac{2 T D}{Q C} \quad (m^2 / g)$$

Donde: T= turbidez $2.303 * (\text{densidad óptica}) / 0.01 \text{ m}$
0.01 m = longitud de la celda
Q = fracción volumétrica de la fase dispersa, en este caso 0.5
C = concentración de la solución proteínica (g / m^3)
D = Dilución

Se analizó el efecto del pH (4 y 7) adicionando soluciones reguladoras de acetato y fosfato de sodio 0.1 M en vez de agua destilada y de diferentes concentraciones de proteína en ambos ensayos. También se analizó el efecto de la concentración de proteína, en el caso de las proteínas de chíá, se prepararon soluciones al 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 %, de proteína, en agua destilada y cuando el pH se ajustó a 7; a pH 4 se realizó además una solución al 1.25 % de proteína.

Para el caso de las soluciones de soya, se prepararon soluciones al 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75 y 2 %, cuando el pH se ajustó a 4 y 7. Las soluciones preparadas únicamente con agua destilada, se realizaron a las mismas concentraciones hasta 1.25 % de proteína.

4.7.6 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ESPUMANTES DE LAS GLOBULINAS DE CHÍA

La elección del método para evaluar estas propiedades depende del modo de formación de la espuma, los cuales son, burbujeo, batido, agitación y vertido.

Pueden utilizarse diversas definiciones para describir la capacidad espumante:

- 1) El volumen de la espuma en situación estable (volumen de la espuma / volumen de la fase líquida inicial X 100)

-
-
- 2) El aumento (se define como, la razón entre 100 veces la relación volumen de espuma menos volumen de fluido inicial / volumen de fluido inicial y corresponde al incremento de volumen)
 - 3) El poder espumante (100 veces el volumen de gas en la espuma/ volumen de líquido en la espuma).
 - 4) La relación gas en la espuma / gas inyectado (método de burbujeo).
 - 5) La densidad de la espuma.

La estabilidad de la espuma puede apreciarse midiendo el grado de pérdida de líquido o desaparición de la espuma (reducción de volumen) alcanzado después de cierto tiempo, tiempo necesario para alcanzar la pérdida total o semi-total (o bien la semi-reducción de volumen) o incluso el tiempo en el que comienza la eliminación de la espuma o aparición del líquido.

La firmeza o rigidez de la espuma puede valorarse midiendo la capacidad de una columna de espuma al soportar una masa determinada, o bien, midiendo la viscosidad de la espuma (Cheftel, 1989).

FORMACIÓN DE LA ESPUMA (DOXASTAKIS, 2001 CON LIGERAS VARIACIONES.) **

El batido, involucra movimientos a alta velocidad de las hojas metálicas o cuchillas a través de un líquido, introduciendo aire para formar la espuma.

Se prepararon 50 mL de una solución de proteínas de chía al 1 % (p/v), la cual fue batida a 1000 rpm, durante 3 min. con una batidora Braun multiquick professional modelo MR5550 MBC-HC, EUA. La espuma formada fue transferida cuidadosamente a una probeta de 250 mL donde el volumen de espuma y el volumen de líquido drenado fueron registrados inmediatamente.

La expansión de la espuma se calculó con la siguiente ecuación:

** El volumen de muestra utilizado en el ensayo original, fue de 100 ml

$$\% \text{ FE} = \frac{\text{Volumen de la espuma (mL)}}{\text{Volumen de liquido inicial (mL)}} \times 100$$

ESTABILIDAD DE LA ESPUMA

La estabilidad de la espuma se calculó de la siguiente manera:

FLS = volumen del liquido X 100

Donde, FLS = 100 – % líquido drenado, puesto que 100 % de líquido drenado es equivalente a 0 % de estabilidad de la espuma.

Se analizó el efecto del pH (4 y 7) adicionando soluciones reguladoras de acetato y fosfato de sodio 0.1 M en vez de agua destilada.

Se corrieron a la par pruebas de proteínas de aislado de soya, bajo las mismas condiciones. La determinación se realizó por triplicado.

4.8 INFLUENCIA DEL MUCÍLAGO EN LAS PROPIEDADES FUNCIONALES

Debido a que el mucílago remanente en la muestra, podría afectar los resultados en la evaluación de las propiedades funcionales (CRA, CRAc, propiedades emulsificantes y espumantes) se realizo un ensayo de cada una de estas pruebas utilizando únicamente al mucílago liofilizado.

Se pesaron las cantidades de mucílago correspondientes al 35 % del total del concentrado utilizado en cada prueba y se realizo cada ensayo de la misma forma que con el concentrado de globulinas de chíá.

5. -RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. - CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA DE SEMILLA DE CHÍA (*Salvia hispanica*).

5.1.1 IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

La semilla comprada en la central de abastos de la ciudad de México, fue identificada botánicamente como *Salvia hispanica* por la M.en C. Edelmira Linares del Instituto de Biología de la UNAM y una muestra de esta semilla fue incorporada al sistema MEXU con el número de registro 2519 (anexo 1).

5.1.2 DISMINUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA, DESGRASADO Y HOMOGENIZADO

La molienda y homogenización inicial de la muestra, resultaron ser procesos difíciles, ya que la cantidad de grasa que contiene esta semilla favorecía la formación de una pasta, por lo que se tuvo que realizar el desgrasado antes de la homogenización final de la muestra.

La pasta obtenida se desgraso mediante el método de Soxhlet, utilizando benceno como solvente de extracción y un reflujo de 6 horas, sin embargo la cantidad de lípidos remanentes en la muestra era del 12 %, muy alta para la determinación de las propiedades funcionales, por lo que fue necesario cambiar de solvente de extracción por diclorometano.

Se estableció entonces que, con un tiempo de reflujo de 5 horas y a una temperatura de 40 °C, la cantidad de lípidos remanentes en la muestra, era de un 2 %, por lo que el desgrasado de la harina se realizó con diclorometano durante el resto del estudio.

5.2 COMPOSICIÓN

La composición proximal de la semilla de chía se muestra en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 Composición proximal de la semilla de chía. La muestra fue comprada en la central de abastos de la Ciudad de México.

COMPONENTE	% (g /100g de materia seca)
HUMEDAD	6.04 ± 0.004
CENIZAS	4.10 ± 0.009
LÍPIDOS	34.55 ± 0.5
PROTEÍNAS	26.80 ± 0.40
FIBRA CRUDA	30.49 ± 0.5
CARBOHIDRATOS ASIMILABLES*	4.06

*Obtenido por diferencia

Los valores fueron obtenidos mediante el promedio de 3 determinaciones

La muestra utilizada en este estudio, como se mencionó antes, fue comprada en la central de abastos y no se sabe con certeza de que estado de la república procede, sin embargo, considerando que el único estado de la república reportado como productor es Jalisco, es muy probable que ésta sea su procedencia.

El porcentaje de lípidos determinado en el presente estudio fue ligeramente mayor al obtenido por Olivos (Olivos, 2005) para las variedades de Jalisco y Sinaloa (32.23 y 21.61% contra 34.55% obtenido en el presente estudio) así como el porcentaje obtenido para las proteínas (24.6 y 19.5 % contra 26.80% obtenido en el presente estudio); también hubo variaciones en cuanto al contenido de fibra, la muestra analizada presentó un contenido mucho menor (30.49%) que el reportado por Olivos (34.59 y 45.8 %, Jalisco y Sinaloa respectivamente). En cuanto a carbohidratos, la muestra analizada, presentó un valor ligeramente más alto (4.06 %) que para las variedades Jalisco (2.62) y Sinaloa (0.27 %).

Los datos obtenidos en este estudio son muy similares a los obtenidos por Olivos, (2005), para la variedad Jalisco. Las diferencias entre los valores reportados y los valores obtenidos en el presente estudio, residen además de la procedencia, probablemente en las prácticas de cultivo a las que fueron sometidas y factores ambientales a los cuales estuvieron expuestas durante su cultivo y posteriores a éste.

5.3 ELIMINACIÓN DEL MUCÍLAGO

Las semillas pueden contener diferentes componentes tales como almidón y carbohidratos complejos que pueden reducir seriamente la extracción de proteínas (Branlard y Bancel, 2007), en particular las semillas de chía contienen polisacáridos solubles que al ser hidratados generan un gel mucilaginoso, el cual interfiere con la extracción de proteínas, sobre todo en las proteínas solubles en agua y soluciones salinas (albúminas y globulinas).

Se realizó una prueba para la remoción del mucílago por el método de liofilización y raspado manual (Olivos, 2005). El proceso de liofilización resultó muy lento, por ejemplo, liofilizar 50 g de semilla en 500 mL de agua tomaba entre 2 y 3 días, además de que las cantidades a liofilizar debían ser relativamente pequeñas para lograr un adecuado proceso, al final de las operaciones (incluyendo al raspado), las semillas seguían presentando el mucílago al ser hidratadas nuevamente, por lo que se decidió no eliminar el mucílago, previo a la extracción de las globulinas.

Sin embargo, durante las etapas de centrifugación (ya en el proceso de extracción de las globulinas), posteriores a la precipitación con sulfato de amonio, una cantidad de mucílago pudo ser removida manualmente de la pastilla, ya que este mucílago, por ser de menor densidad se acumulaba en la superficie, haciendo relativamente fácil su eliminación.

5.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS (GLOBULINAS) DE LA SEMILLA DE CHÍA

La extracción de las globulinas de la semilla de chía, se basó en la solubilidad que tienen estas proteínas en soluciones de cloruro de sodio; se realizó la extracción directa, es decir, sin previa extracción de albúminas, considerando que las albúminas que pudieran coextraerse, se eliminarían durante la diálisis.

Al analizar el perfil electroforético de la extracción (véase Fig. 5.1), se observan proteínas de distinto peso molecular, de las cuales, cinco precipitan con la saturación al 25 %, esto nos indica que estas proteínas interactúan débilmente con el agua, es decir, su solubilidad disminuye hasta el punto de su precipitación con la presencia de una concentración relativamente pequeña de sales, en comparación con el resto de las proteínas que precipitan al 75 %, debido a esto, se decidió hacer la precipitación directa de las proteínas extraídas a esta concentración con sales de amonio, pues la saturación al 25 % no era suficiente para precipitar a todas las proteínas en el extracto.

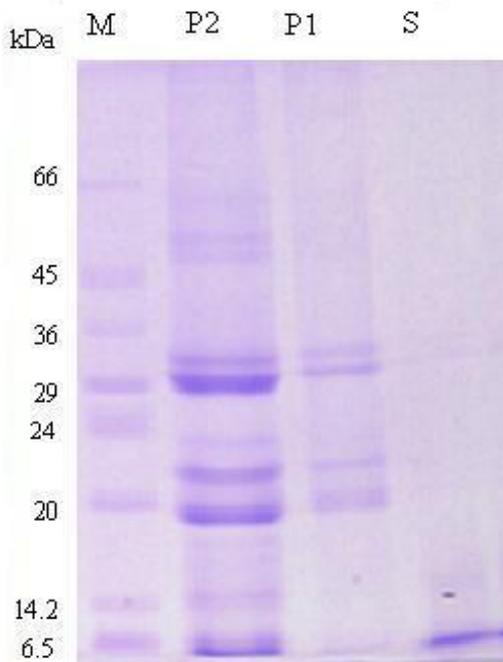


Fig. 5.1 Perfil electroforético del concentrado de globulinas (extracto crudo), extraídas de la semilla de chía. El gel fue teñido con azul de Coomassie. M corresponde a los marcadores de peso molecular, P1 es el precipitado al 25 %, P2 es el precipitado de globulinas al 75 % y S es el sobrenadante final.

Por otro lado, el sobrenadante final, indica que todas las proteínas fueron precipitadas con esa concentración de sulfato de amonio (75%), por lo que no era necesario realizar la precipitación a una mayor concentración de esta sal.

5.4.1 RENDIMIENTO

Por el método de Kjeldhal se determinó el contenido total de proteína, tanto en la harina desgrasada como en el extracto liofilizado rico en globulinas. Se encontró que para la harina desgrasada el contenido de proteínas es del 26.8% y para el extracto liofilizado es de 62.05%.

Para calcular el rendimiento de la extracción, se partió de 50 g de harina desgrasada y se obtuvieron 2.83 g de extracto liofilizado de globulinas. Así, el rendimiento de la extracción sería de 5.7%; sin embargo, sabemos que en el extracto sólo hay un 62.05% de proteína. Por lo tanto, el rendimiento real de la extracción es del 3.5%.

Comparando estos resultados con los obtenidos por Olivos (Olivos, 2005), se puede decir que el proceso de extracción es bastante eficiente, a pesar de no haber removido el mucílago en la etapa inicial del proceso, ya que Olivos obtuvo un 68.7% de globulinas en el extracto y en este trabajo se obtuvo un 62.05%, eliminando un difícil paso en el proceso de extracción, pues es sabido que el mucílago y en general los polisacáridos interfieren con la extracción de proteínas, ya que se forman enlaces entre éstos y las proteínas a extraer (Branlard y Bancel, 2007).

5.4.2 COMPOSICIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE GLOBULINAS DE CHÍA Y DEL AISLADO DE PROTEÍNAS DE SOYA

La Tabla 5.2 muestra la composición proximal del extracto de globulinas de chíá y del aislado de proteínas de soya. Como puede observarse, el principal componente en el extracto de chíá obtenido, es la proteína, con un porcentaje de 62.05 %, lo que nos permite nombrarlo como un concentrado de globulinas de chíá.

La pureza del extracto de chía resultó ligeramente menor al obtenido por Olivos (2005), sin embargo, esta pureza es bastante aceptable considerando que no se realizó la eliminación inicial del mucílago, el cual interfiere directamente con la extracción de las proteínas en la chía.

Tabla 5.2 Composición proximal del extracto de globulinas de chía y del aislado de soya (APPENSOL)

COMPONENTE	% (g/100g de extracto liofilizado de chía)	% (g/100g de proteínas de soya
HUMEDAD	6.04 ± 0.004	6.02 ± 0.001
CENIZAS	0.35 ± 0.005	4.4 ± 0.3
LÍPIDOS	2.0 ± 0.5	0.20 ± 0.001
PROTEÍNAS	62.05 ± 0.40	90.0 ± 0.005
FIBRA CRUDA	ND	-----
CARBOHIDRATOS ASIMILABLES*	35.6	-----

*Obtenido por diferencia

ND no detectado por el método utilizado

El contenido de lípidos en el extracto de globulinas indica que a pesar de que el método y las condiciones de extracción utilizados durante este estudio fueron aceptables, aún permanece una cantidad considerable de ellos que pueden interferir durante el estudio de las propiedades funcionales. Se ha reportado que concentraciones mínimas de lípidos contaminantes alteran fuertemente algunas de estas propiedades funcionales (Cheftel, 1989).

El contenido de fibra cruda fue nulo, es decir no hay carbohidratos insolubles presentes en el extracto. Por otro lado, el contenido de carbohidratos solubles resultó muy alto (35.6 %) y esto se debe a la presencia de mucílago remanente en la muestra.

En cuanto al análisis realizado para el aislado de soya (APPENSOL), los resultados obtenidos, concuerdan con los reportados por el fabricante (véase anexo 2); el contenido de lípidos es mucho menor que para el concentrado proteínico de chía, sin embargo, el contenido de cenizas y proteínas es mucho mayor.

5.5 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

5.5.1 DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR.

El gel de poliacrilamida con el perfil electroforético del extracto crudo fue analizado con el programa Quantity One de Biorad, como lo muestra la Fig. 5.2, para la determinación de los pesos moleculares de las proteínas obtenidas en este gel.

Como se puede observar, se detectaron 5 bandas en la precipitación al 25 % y 12 bandas en el precipitado al 75 %, con los pesos moleculares mostrados en la Tabla 5.3:

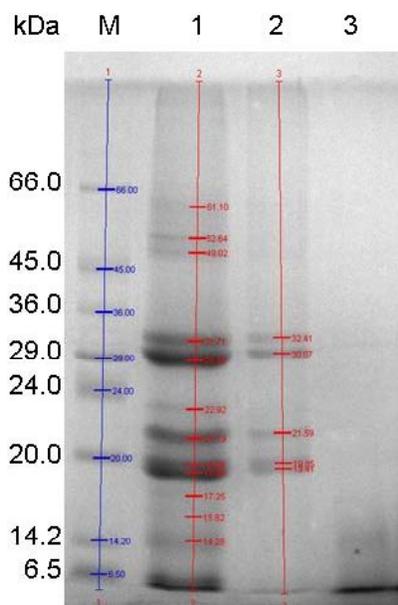


Fig. 5.2 Perfil electroforético y análisis del concentrado de globulinas (extracto crudo), extraídas de la semilla de chíá. El gel fue analizado con el programa Quantity One de Biorad para determinar el peso molecular de las bandas detectadas en el gel. M corresponde a los marcadores, Carril 1 precipitación al 75 %, Carril 2 precipitación al 25 % y Carril 3 sobrenadante final.

Los datos obtenidos mediante el análisis cualitativo y cuantitativo del gel SDS-PAGE, indican que el extracto de globulinas contiene 12 proteínas con diferentes pesos moleculares. Tres de estas proteínas muestran los más altos pesos moleculares, 61.1, 52.6 y 49 kDa, mientras que el resto tiene pesos moleculares más pequeños.

Por otro lado, se aprecia que la intensidad de las bandas de las proteínas de pesos moleculares 31.7, 28.9, 21.1, 19.6 y 18.9 kDa, son más intensas que el resto, lo que indica que se encuentran en una mayor concentración.

Tabla 5.3 Pesos moleculares de las proteínas (globulinas) extraídas de la semilla de chíá. El carril 3 que corresponde a las proteínas detectadas después de la primer saturación con sales de amonio al 25 %; el carril 2, corresponde a las proteínas detectadas después de la saturación al 75 % con sulfato de amonio

Bandas	Peso molecular (kDa)	
	Carril 2	Carril 3
1	61.1	
2	52.6	
3	49.0	
4	31.7	32.4
5	28.9	30.1
6	22.9	
7	21.1	21.6
8	19.6	19.8
9	18.9	19.4
10	17.2	
11	15.8	
12	14.2	

Estos datos sugieren que las proteínas que componen al extracto existen como heterooligómeros, compuestos de cocientes no equimolares de varios monómeros. El patrón electroforético muestra similitud en cuanto a tamaño de las proteínas obtenidas por Marcone (Marcone y col. 1998), donde reportan la existencia de múltiples sub-unidades estructurales de la globulina 11 S de 16 distintas semillas de plantas dicotiledóneas (alfalfa, amaranto, soya, etc.) con pesos moleculares desde 76.5 hasta 11.6 kDa para las diferentes fuentes de globulinas, muy similares a los obtenidos en este estudio (61.6 hasta 14.2 kDa) y con Ching- Yung, y col., 2006, quienes reportan también, la existencia de múltiples sub- unidades de la globulina extraída de la semilla de trigo sarraceno con pesos moleculares que van desde 65 a 17 kDa.

Los resultados obtenidos sugieren que las proteínas extraídas de las semillas de chíá son posiblemente subunidades de la globulina 11 S.

5.5.2 DETERMINACIÓN DE PUNTO ISOELÉCTRICO

El extracto crudo de globulinas fue analizado mediante isoelectroenfoque IEF, para determinar el punto isoeléctrico de las proteínas extraídas, obteniéndose el siguiente resultado:

De acuerdo al perfil de IEF obtenido (ver Fig. 5.3), el carril 3 que corresponde al extracto de globulinas muestra 5 bandas bien definidas con puntos isoeléctricos de 8.22, 6.93, 6.25, 5.86 y 5.63, estos resultados indican que solamente una proteína tiene carácter básico, mientras que el resto tienen carácter ácido.

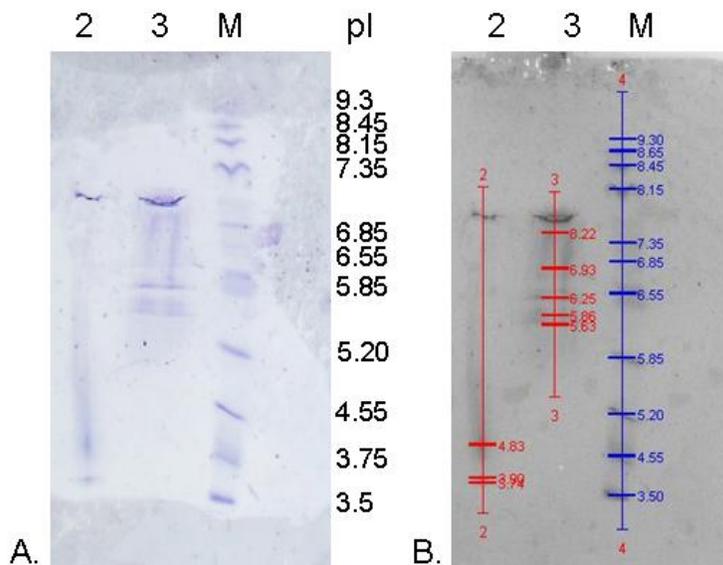


Fig. 5.3. Perfil de isoelectroenfoque de las globulinas de chí. A, teñido con azul de Coomassie, B, analizado con el programa Quantity One de Biorad. En las imágenes M es el carril de los marcadores de isoelectroenfoque de 3-9; S es el carril del sobrenadante; G es el carril del extracto rico en globulinas

Los puntos isoeléctricos detectados en el gel se encuentran muy cercanos entre sí, de hecho se puede apreciar una banda entre 5.63 y 5.86, pero que desafortunadamente no se logró obtener su pI exacto, debido a que la resolución del programa de análisis no lo permitió.

Este resultado está de acuerdo con la distribución de las proteínas reportados por Derbyshire y col (1976), Marcone y col. (1998) y con Ching- Yung y col.(2006), donde describen a las subunidades de la globulina 11 S como ácidas y básicas.

En el carril del sobrenadante, se logran detectar 3 bandas con pI en la región de pH ácido. El resultado es incongruente con el obtenido en el gel SDS-PAGE, ya que en éste, no se logra detectar ninguna banda en el carril correspondiente al sobrenadante, sin embargo, no se observa ninguna de estas bandas en el carril del extracto de globulinas, por lo que seguramente se trata de albúminas, las cuales no se encontraban lo suficientemente concentradas para su detección en perfil electroforético SDS-PAGE.

5.5.3 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS (PERFIL DE AMINOÁCIDOS)

El análisis de la composición de aminoácidos del extracto rico en globulinas (véase Tabla 5.4), revela que el aminoácido más abundante en el extracto es el ácido glutámico con un 16.26 %, seguido de arginina con un 9.24%, glicina con un 8.26 % y, ácido aspártico y alanina con un 8.22 %, el resto de los aminoácidos tiene valores que van de 7.5 a 1.1 %.

El alto contenido de ácido glutámico, ácido aspártico y arginina, indican el posible papel que las globulinas desempeñan en la semilla, como proteínas de almacenamiento (Marcone, 1998). Se sabe que las proteínas 11 S de plantas dicotiledóneas están ampliamente relacionadas a las globulinas 11-12 S localizadas en el endospermo de granos de cereales, donde cumplen con ésta misma función (Shewry, 2002; Casey, 1999).

El perfil de aminoácidos obtenido del extracto rico en globulinas de la semilla de chíá, es totalmente comparable con los obtenidos por Marcone (Marcone y col, 1998) para globulinas de distintas plantas dicotiledóneas (véase Tabla 5.5), las globulinas de chíá muestran la misma tendencia en la composición de aminoácidos que las fuentes antes

mencionadas, es decir, un alto contenido en ácido glutámico, ácido aspártico y arginina, además del alto contenido de glicina.

Se observa también que existen residuos de cistina, lo que indica que entre las proteínas existen enlaces covalentes tipo puentes disulfuro en su estructura molecular.

Tabla 5.4 Composición de aminoácidos (perfil de aminoácidos) de la fracción rica en globulinas obtenida de la semilla de chía.

AMINOÁCIDO	(g de aminoácido / 100 g de extracto de globulinas de chía)
Asp	8.22 ± 0.71
Glu	16.26 ± 0.86
OH-Pro	0.00 ± 0.00
Arg	9.24 ± 0.25
Lys	3.83 ± 0.51
His	2.70 ± 0.40
Ser	7.50 ± 0.42
Thr	4.32 ± 0.45
Tyr	2.83 ± 0.44
Cys *	1.11 ± 0.62
Phe	4.46 ± 0.44
Gly	8.26 ± 0.37
Leu	5.30 ± 0.71
Ile	4.13 ± 1.08
Met	4.08 ± 0.48
Pro	4.54 ± 0.14
Val	5.01 ± 0.25
Ala	8.22 ± 0.31
Trp	ND

*La cisteína fue determinada como residuos de cistina
ND No determinado

Tabla 5.5 Composición de aminoácidos de la fracción de globulinas, obtenidas a partir de diferentes plantas dicotiledóneas.

FUENTE DE GLOBULINAS				
aminoácido	Chía ¹ (<i>Salvia hispanica</i>)	Soya ² (<i>Glycine max Merr.</i>)	Amaranto ² (<i>A.hypochondriacus</i>)	Alfalfa ² (<i>Medicago sativa</i>)
Asp	8.22 ± 0.71	11.5	8.8	13.4
Glu	16.26 ± 0.86	16.4	15.3	20.7
OH-Pro	0.00 ± 0.00	-----	-----	-----
Arg	9.24 ± 0.25	5.4	10.1	8.2
Lys	3.83 ± 0.51	4.5	4.3	4.5
His	2.70 ± 0.40	2.8	2.6	2.4
Ser	7.50 ± 0.42	7.7	6.9	8.2
Thr	4.32 ± 0.45	4.5	4.1	2.5
Tyr	2.83 ± 0.44	2.3	2.1	2.1
Cys *	1.11 ± 0.62	1.1	0.9	2.3
Phe	4.46 ± 0.44	5.7	6.8	5.6
Gly	8.26 ± 0.37	6.6	8.0	5.7
Leu	5.30 ± 0.71	8.6	6.8	9.2
Ile	4.13 ± 1.08	4.3	5.0	4.5
Met	4.08 ± 0.48	1.2	1.8	0.4
Pro	4.54 ± 0.14	6.3	6.1	---
Val	5.01 ± 0.25	5.6	6.3	6.3
Ala	8.22 ± 0.31	5.9	5.7	5.5
Trp	ND	ND	ND	ND

1. Determinado en el presente estudio

2. Determinado por Marccone y col, 1998. Asp + Asn, Glu +Gln

5.5.4 DETERMINACIÓN DE pH

El pH del extracto crudo rico en globulinas fue de 5.29 ± 0.12 , lo que indica que las proteínas están compuestas en su mayoría de proteínas ácidas como lo confirma el gel de perfil de punto isoeléctrico (Fig. 5.3). Por otro lado, se observa una banda con pH ubicado en la región básica, es probable que esta proteína influya en el pH final del extracto crudo, registrando un valor ligeramente más alto que los reportados comúnmente para las globulinas, que es de 4 a 5, sin embargo, varios autores (Marccone, 1998; Bora, 2001; Lawal, 2004; Scilingo, 2006; Ching-Yung, 2006) han reportado los valores de pH de globulinas de diferentes fuentes vegetales ubicándolos entre 4 y 6.95.

El pH del aislado de proteínas de soja (APPENSOL) fue de 7.22 ± 0.1 , muy cercano al reportado por el fabricante (véase anexo 2).

5.6 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LAS GLOBULINAS

Se han caracterizado varias globulinas del tipo 11 S, obtenidas a partir de distintas semillas de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los pesos moleculares de éstas, son de aproximadamente 300 a 370 kDa. Se sabe que estas proteínas constan de varias subunidades ácidas de 20 a 27 kDa, básicas de 30 a 39 kDa y otras no clasificadas de alrededor de 11.2 a 76 kDa (Marcore,1998).

Para obtener alguna o algunas de estas subunidades se trabajó con una columna Sephacryl S-200 equilibrada con buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.0. En la Fig. 3.4 se muestra la curva de calibración obtenida para esta columna.

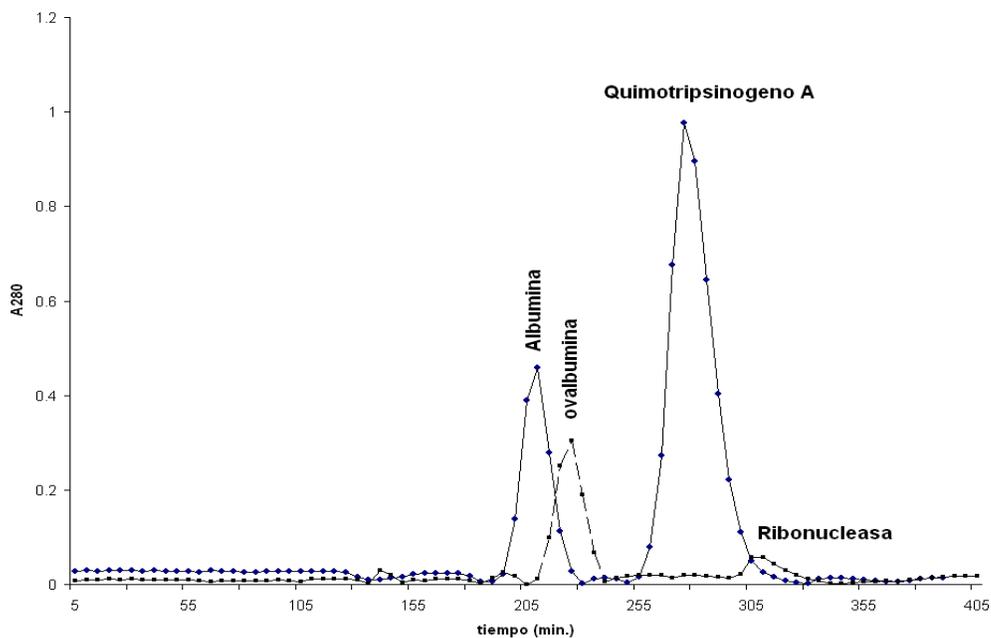


Fig. 5.4 Perfil de elución de las proteínas estándar utilizadas durante la purificación parcial de las globulinas de chíá. La columna tenía una altura de 125.2 cm y un diámetro de 1.6 cm, teniendo así un volumen total de 251.7 mL. La resina utilizada fue Sephacryl S -200 y el volumen de inyección de la muestra fue del 1% del total de la columna a un flujo de 48 mL/ h.

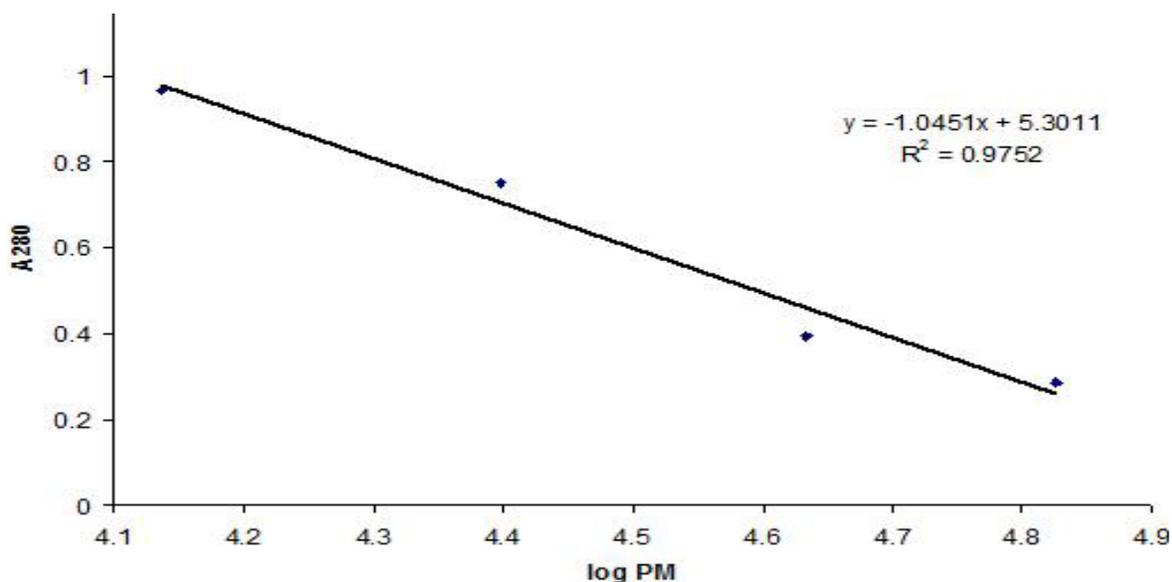


Fig. 5.5. Curva de calibración para la columna Sephacryl S-200.

Luego de la calibración, se eluyó el extracto de globulinas de chíá utilizando el mismo buffer. Se obtuvo un perfil cromatográfico de 10 picos (Fig. 5.6). Cada fracción se analizó por SDS-PAGE (Fig. 3.7) y se observó por comparación con el gel mostrado en la Fig. 3.1, que la fracción cuatro contenía las mismas proteínas que el extracto total, con pesos moleculares en el rango de 14 a 65 kDa. Interpolando el valor de absorbancia obtenido de la fracción 4 con la ecuación de la recta, se obtuvo un peso molecular de 68.7 kDa.

Este valor no concuerda con la suma de los pesos moleculares de las bandas visibles, aunado a esto, el peso molecular obtenido es mucho menor que el de las globulinas reportadas para plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas; esto puede deberse entre otras cosas, a que el rango de separación de la resina utilizada no fue el adecuado, por otro lado, no existió una separación de las proteínas por lo que no se continuó con este procedimiento.

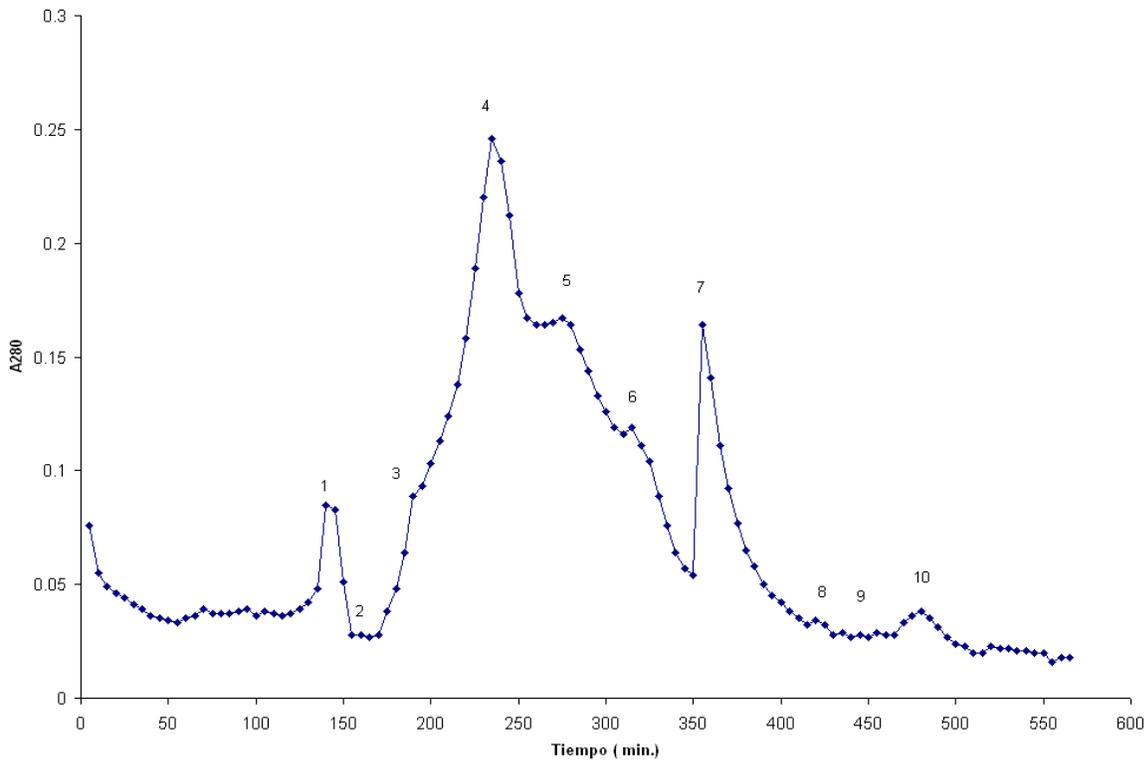


Fig. 5.6. Perfil cromatográfico de la purificación parcial de las globulinas de chíá. Se obtuvieron 10 fracciones distintas, las cuales fueron analizadas posteriormente mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, SDS-PAGE.

A pesar de que la separación por filtración en gel no resultó del todo exitosa, los resultados obtenidos de este ensayo y de los obtenidos durante la caracterización bioquímica nos dan indicios de la identidad de la proteína, es decir, es muy probable que se trate de la proteína 11 S, que se encuentra como agregados macromoleculares heterogéneos en el concentrado de chíá, sin embargo, para confirmarlo se requieren futuras investigaciones.

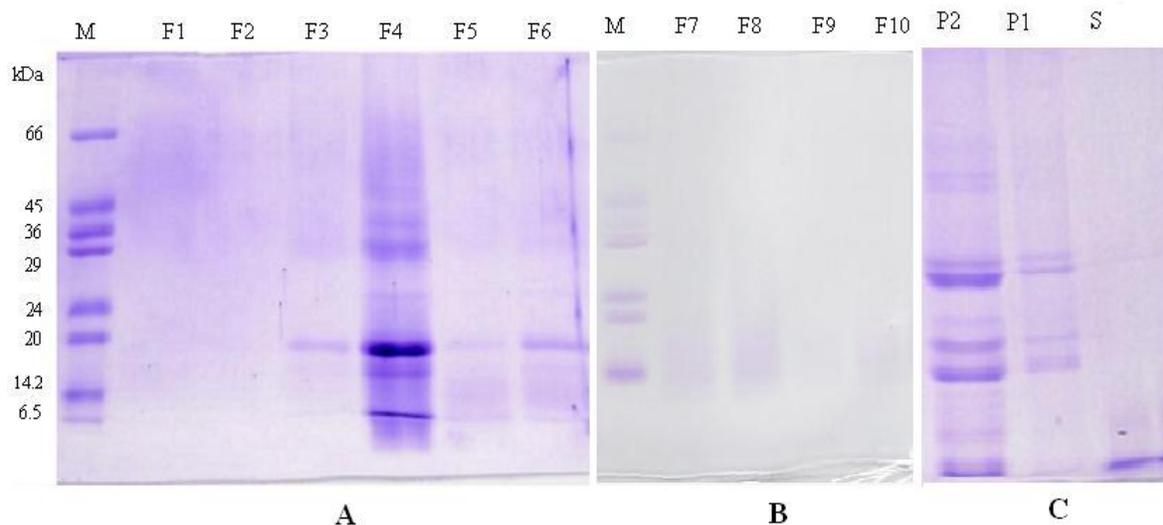


Fig. 5.7 Perfil electroforético de las fracciones obtenidas de la columna de Sephacryl S-200, durante la purificación parcial de las globulinas de chíá. M es el marcador de pesos moleculares, A son las fracciones 1-6, B son las fracciones 7-10 y C es el perfil electroforético del extracto crudo (P2 saturación al 75 %, P1 saturación al 25 % y S sobrenadante final).

5.7 ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DEL CONCENTRADO DE GLOBULINAS DE CHÍA.

5.7.1 SOLUBILIDAD DEL CONCENTRADO DE GLOBULINAS DE CHÍA EN FUNCIÓN DEL pH

En la gráfica de solubilidad en función del pH (Fig.5.8), el concentrado de globulinas de chíá, así como el aislado de proteínas de soya (APPENSOL), muestran una curva en forma de U en cuyos extremos (pH 2, 3, 10, 11 y 12), se registran los valores más altos en comparación con la parte intermedia (pH 4, 5, 6, 7, 8 y 9), donde la solubilidad disminuye en ambas muestras.

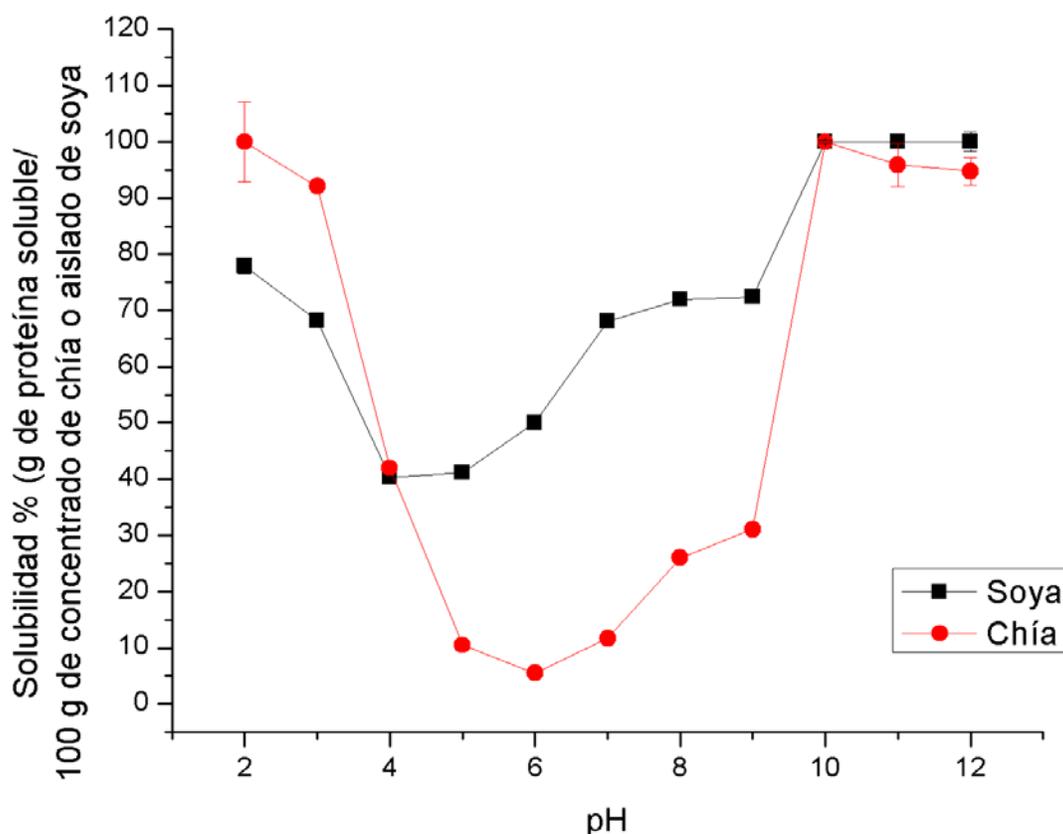


Fig. 5.8 Solubilidad del concentrado de proteínas de chía y del aislado de proteínas de soya (APPENSOL) en función del pH. Las suspensiones fueron elaboradas al 1 % de proteína y la determinación de la proteína soluble fue realizada por el método del ácido bisinconínico.

En estas curvas se puede determinar un aproximado del pI predominante de las proteínas presentes en el concentrado de chía y en el aislado de soya. Este pI se encuentra alrededor de 4 a 5, para las proteínas de soya, ya que a éstos pHs se registró la menor solubilidad, mientras que para las globulinas de chía, la mínima solubilidad se registró a pH 6, lo que indica que el pI de una gran parte de estas proteínas es de 6. Estos resultados coinciden perfectamente con los obtenidos en el perfil de punto isoeléctrico en la sección 5.5.2 (Fig. 5.3), en donde se distinguen 5 puntos isoeléctricos con valores de 5.6, 5.8, 6.2, 6.9 y 8.2.

Específicamente, en el concentrado de globulinas de chíá, al disminuir el pH a 2 y 3, el ácido glutámico (que es el aminoácido de mayor proporción en el concentrado de proteínas, ver Tabla 5.4), el ácido aspártico, la lisina, la histidina y la arginina se encuentran protonados, permitiéndoles interactuar con el agua mediante formación de puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas, lo que conlleva a una muy buena solubilización de las proteínas.

A medida que se incrementa el pH (4-6), el ácido glutámico y el ácido aspártico son desprotonados, por lo que generan carga electrostática al igual que la lisina y la arginina, neutralizando la carga total de la proteína y disminuyendo la solubilidad, sobre todo a pH 5 y 6. Cabe recordar que es en este intervalo de pH (5 y 6) donde se encuentran el punto isoeléctrico de las proteínas extraídas; por otro lado, es probable que la participación de aminoácidos como la serina, la treonina y la tirosina contribuyan a mantener una pequeña cantidad de proteína soluble debido a su capacidad de formar puentes de hidrógeno y de esta forma interactuar con el agua.

A partir de pH 7 y hasta pH 9, la solubilidad aumenta ligeramente, puesto que estamos por encima del pI de estas proteínas, es decir, la neutralización de cargas disminuye debido a la cargas negativas con la que contribuyen aminoácidos como histidina, ácido glutámico y ácido aspártico, lo que permite tener una mayor interacción con el agua, aumentando a su vez la solubilidad de la proteína. Por otro lado, se observa que la solubilidad del concentrado de chíá no se ve afectada por la proteína que tiene su pI en 8.22, pues esta solubilidad sigue aumentando, como se puede apreciar en la gráfica.

A los pHs 10 a 12 se observa un incremento del 70 % en la solubilidad del concentrado de proteínas de chíá, debido nuevamente a la presencia de un alto porcentaje de aminoácidos polares con carga. La solubilidad decrece ligeramente a pHs 11 y 12, posiblemente, debido a que a estos pHs las proteínas tienden a desnaturalizarse, agregarse y precipitar, perdiendo solubilidad (Vojdani, 1996).

El perfil de solubilidad en función del pH de las globulinas de chíá coincide con los reportados por Gruener e Ismond (Gruener e Ismond 1997); Bora (Bora, 2002); Lawal (Lawal, 2005) y Ching-Yung (Ching-Yung, 2006), para fracciones de globulinas obtenidas a partir de diferentes fuentes vegetales, donde a pHs extremos la solubilidad de las proteínas estudiadas es muy alta y sus puntos isoeléctricos se encuentran entre 4 y 6.

Tabla 5.6 Solubilidad del concentrado de globulinas de chíá y del APPENSOL en función del pH.

pH	Porcentaje de proteína soluble de	Porcentaje de proteína soluble de soya
2	100 ± 7.07	77.9 ± 1.4
3	92.1 ± 0.16	68.2 ± 1.12
4	42.0 ± 0.29	40.3 ± 0.15
5	10.5 ± 0.97	41.2 ± 0.09
6	5.5 ± 0.07	50.0 ± 0.26
7	11.7 ± 0.25	68.1 ± 0.43
8	26.0 ± 0.57	72.0 ± 0.29
9	31.1 ± 0.12	72.4 ± 0.68
10	100 ± 0.78	100 ± 0.27
11	95.9 ± 3.84	100 ± 0.05
12	94.8 ± 2.47	100 ± 1.76

Al comparar las solubilidades del aislado de proteínas de soya con el concentrado de proteínas de chíá, se observa que la solubilidad de las proteínas de soya es más alta a pHs entre 5 y 9 (Tabla 5.6), mientras que para la chíá, la solubilidad de sus proteínas es mayor a pH 2 y pH 3; a pHs altos, tienen prácticamente la misma solubilidad.

5.7.2 PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS SOLUBLES DEL CONCENTRADO DE GLOBULINAS DE CHÍA EN FUNCIÓN DEL pH

Para determinar cuales proteínas del concentrado de globulinas de chíá y del aislado de proteínas de soya participaban en la solubilización de estas muestras, se realizó el perfil electroforético de las muestras sin haberlas sometido a ningún tratamiento (Fig. 5.9) y

de las muestras después de haberlas sometido a la solubilización a diferentes pHs (5.9 a 5.12, Fig. 3.10 a 3.13), obteniendo los siguientes resultados:

Proteínas sin ningún tratamiento de pH

Para el concentrado de globulinas de chíá, se observan las mismas 12 bandas del extracto total que se obtuvieron en la sección 5.4; así mismo, el peso molecular de las proteínas obtenido en este gel, es prácticamente el mismo que los obtenidos anteriormente (véase Fig. 5.9).

Para el aislado de proteínas de soya, se obtuvieron 14 bandas con proteínas de pesos moleculares muy parecidos a los de la chíá y 3 de ellos son más altos (69.5, 74.5 y79.9 kDa), cabe recordar que el aislado de soya está constituido por una mezcla de proteínas, de las cuales la mayoría son globulinas.

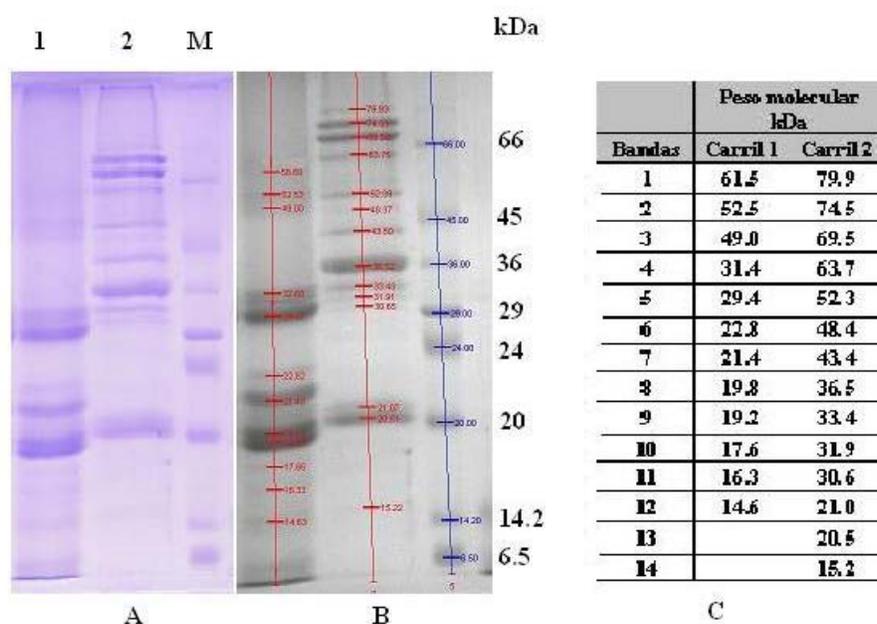


Fig. 5.9 Perfil electroforético de referencia del concentrado de globulinas de chíá y del aislado de proteínas de soya (APPENSOL). Imagen A, gel teñido con azul de Coomassie; imagen B, gel analizado con el programa Quantity one de Biorad, imagen C, pesos moleculares de las proteínas, donde el carril 1 pertenece a las globulinas de la chíá y el carril 2 pertenece a las proteínas de la soya. El perfil electroforético y los pesos moleculares obtenidos en este punto, fueron utilizados como referencia para el análisis de resultados obtenidos tras someter a las proteínas a los diferentes cambios de pH.

Proteínas solubles a pHs ácidos:

A pH 2, 3 y 4 se registró una solubilidad muy alta para las proteínas que conforman el concentrado de chíá, por lo que en el gel de electroforesis se esperaba observar una gran cantidad de proteínas. Sin embargo, solo se observa una banda de aproximadamente 12 kDa (ver Fig. 5.10A y Tabla 5.7). Esto sugiere que en este rango de pH únicamente se solubilizan las proteínas más pequeñas o se forma una sola especie molecular con relativa alta solubilidad.

Al llegar a pHs 5 y 6 (Fig. 5.10A y B), no hay presencia de ninguna banda o barrido, pues la mayoría de las proteínas no estaban en solución ya que el pH es igual al pI.

En cuanto a las proteínas de soya, de las 14 proteínas inicialmente observadas, únicamente 11 se solubilizan a pH's de 2 y 3 (Fig. 5.11 A y Tabla 5.8). A pH 4 solo se observa una banda alrededor de 12 kDa y a pH 5 y 6 ésta desaparece totalmente, resultado que concuerda con los obtenidos durante el perfil de solubilidad, ya que este pH es igual al pI de las proteínas que conforman al aislado de soya.

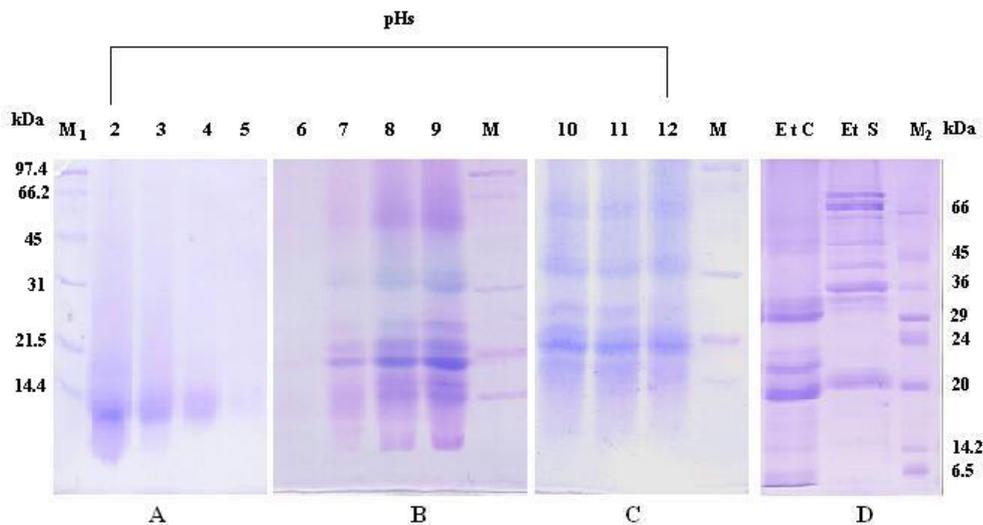


Fig. 5.10 Perfil electroforético del concentrado de globulinas de chíá en función del pH. A, B y C corresponden a los gels del concentrado de globulinas de chíá sometidas a las diferentes condiciones de pH, mientras que D corresponde al gel tomado como referencia. EtC se refiere al extracto total de chíá y EtS al extracto total de soya, sin cambios de pH. M1 corresponde a los marcadores de peso molecular para A, B y C; M2 es el marcador de peso molecular para D.

Proteínas solubles a pH neutro y básico.

Al llegar a pH neutro, la solubilidad del concentrado de globulinas de chíá, aumenta, lo que se ve reflejado en el patrón electroforético, pues comienzan a observarse algunas bandas en el gel.

A pH 8 el aumento en la solubilidad es más pronunciado y se observan 9 de las 12 proteínas originales; de pH 10 a pH 12, la solubilidad aumenta drásticamente, y en el gel se aprecian también, las proteínas de más alto peso molecular, pero las más pequeñas perdieron su solubilidad a estos pHs.

Para las proteínas de soya, al aumentar el pH a 6 y hasta 12, únicamente 8 de las 14 proteínas detectadas originalmente participan en la solubilización del aislado de soya, las proteínas de bajo peso molecular ya no son solubles a estos pH's (Fig. 5.11 B y C y Tabla 5.8)

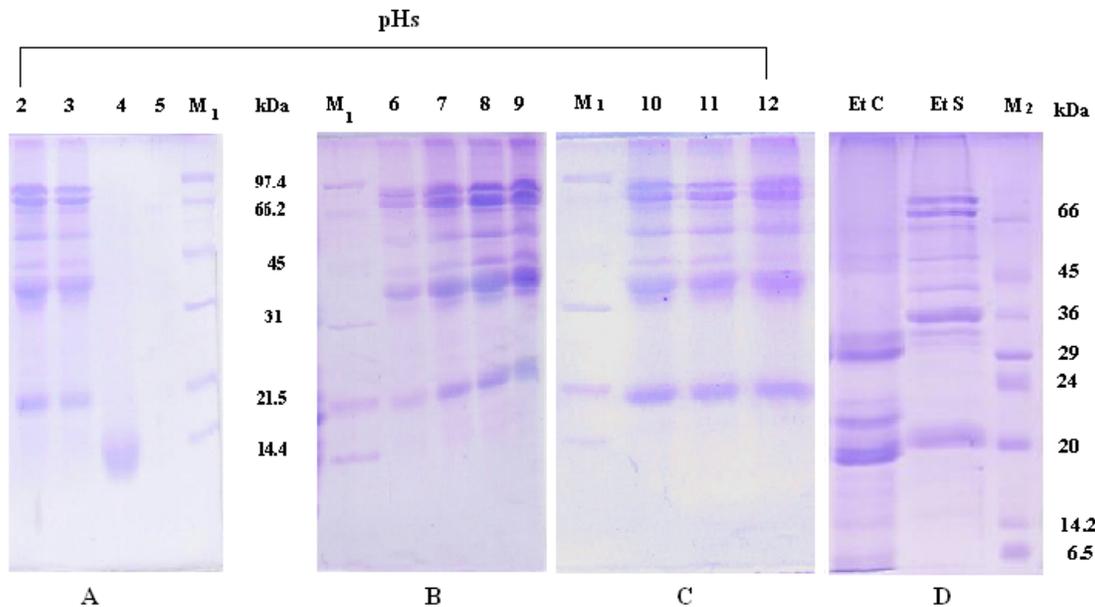


Fig. 5.11 Perfil electroforético del aislado de proteínas de soya en función del pH. A, B y C corresponden a los gels del aislado de proteínas de soya sometidas a las diferentes condiciones de pH, mientras que D corresponde al gel tomado como referencia. EtC se refiere al extracto total de chíá y EtS al extracto total de soya, sin cambios de pH. M1 corresponde a los marcadores de peso molecular para A, B y C; M2 es el marcador de peso molecular para D.

Tabla 5.7 Peso molecular (kDa) de las proteínas detectadas durante el seguimiento del perfil electroforético en función del pH del concentrado de globulinas de chíá. El análisis se realizó con el programa Quantity one de BIORAD. CT es el peso molecular de las proteínas en el concentrado de globulinas sin ningún tratamiento.

pH CT	2	3	4	5	6	6.9	7	8	9	10	11	12
61.5				--	--					62.8	62.8	62.8
52.2				--	--		51.2	51.2	53.7	61.0	61.0	61.0
49.0				--	--			46.7	50.2	36.2	36.2	36.2
31.4				--	--	32.8	29.9	30.7	32.9	31.7	31.7	31.7
29.4				--	--	30.4	28.2	28.3	29.9			
22.8				--	--				24.3	22.2	22.2	22.2
21.4				--	--	22.1		21.8	21.4			
19.8				--	--		20.8					
19.2				--	--	19.2				18.8	18.8	18.8
17.6				--	--	17.5	17.8	18.3	18.3			
16.3				--	--		15.6	16.1	15.7	16.4	16.4	16.4
14.6				--	--	14.1		13.7	14.1			
	11.6	12.0	11.2	--	--	12.8	13.0	12.6				

Tabla 5.8 Peso molecular (kDa) de las proteínas detectadas durante el seguimiento del perfil electroforético en función del pH del aislado de proteínas de soya (APPENSOL). El análisis se realizó con el programa Quantity One de BIORAD. ST es el peso molecular de las proteínas en el aislado de proteínas de soya sin ningún tratamiento, algunas bandas registraron mayor peso molecular debido a la forma en que corrió el gel.

pH ST	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
79.9				---	81.2	86.0	77.7	79.3	86.7	84.5	89.1
74.5	67.3	69.2		---	71.1	73.2					
69.5	60.5	61.4		---			69.0	70.4	69.1	69.9	73.0
63.7	57.2	57.5		---	63.3	65.1			62.8	63.3	64.3
52.3	50.2	49.5		---	51.7	54.2	56.9	57.4	52.5	53.0	53.8
48.4	47.2	47.8		---			47.3	48.8			
43.4	43.3	43.8		---	41.5	44.6	40.4	41.5	42.7	43.8	44.6
36.5	38.1	38.3		---	36.0	37.9	37.4	38.7		36.4	36.7
33.4				---	33.1	35.3			34.8	34.9	34.2
31.9	31.1	31.7		---					31.9		
30.6	29.3	29.7		---							
21.0				---		21.9	23.5	24.3			
20.5				---	20.0				18.9	20.0	20.3
	17.1	17.1		---							
15.2				---							
			12.4								

5.7.3 CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA DEL CONCENTRADO DE GLOBULINAS DE CHÍA.

Se estudió la capacidad de retención de agua (CRA) del concentrado de globulinas de chíá, en función del pH. Se analizó esta propiedad de hidratación a pH de 5.29, por ser el pH que presenta el concentrado de globulinas de chíá al ser colocado en agua destilada; y a pH de 4 y 7, por ser estos dos valores de pH los que normalmente se emplean dentro de la industria de los alimentos.

De acuerdo a los resultados obtenidos previamente, el pI de las proteínas que componen al concentrado de chíá, se ubica entre pH 5 y 6, mientras que para el aislado de soya (APPENSOL) se ubica alrededor de pH 4. A estos pHs, las interacciones proteína - proteína son más fuertes que las interacciones proteína - agua, lo que conlleva a que en este punto la retención de agua sea mínima, por lo que se toma a estos resultados como punto de referencia para el análisis de los resultados obtenidos en esta sección.

Tabla 5.9 Capacidad de retención de agua del concentrado de globulinas de chíá y del aislado de proteínas de soya (APPENSOL) en función del pH.

pH	Muestra	Concentrado de chíá mL agua retenida / g de proteína	Aislado de soya mL agua retenida / g de proteína
4		1.9± 0.09	5.1±0.1
5.29 *		1.8±0.09	-----
7		3.5±0.09	4.4±0.09
7.22 *		-----	6.3±0.09

* pH normal de la proteína en agua destilada

Las desviaciones estándar corresponden a determinaciones realizadas por triplicado

Como puede observarse en la Tabla 5.9, a pH 5.29 la CRA de las globulinas de chíá es la más baja de las tres obtenidas, esto debido a que como se mencionó anteriormente, las interacciones proteína – proteína son máximas por lo que éstas se asocian y repliegan sobre sí mismas manifestando el mínimo de hidratación. Al disminuir el pH a 4, se incrementa ligeramente la CRA, esto se debe a que estamos ligeramente por

debajo del pI de las proteínas, donde las interacciones entre proteínas se han debilitado, por lo que algunos aminoácidos que las componen comienzan a tener carga facilitando su capacidad para asociarse con el agua, sin embargo, no es lo suficiente para que este aumento sea mayor.

Contrario a esto, la CRA registrada a pH 7 aumenta hasta llegar 3.5 veces el peso de la proteína. A este pH los aminoácidos, sobre todo los polares con carga (Glu, Asp, His, Lys y Arg), se encuentran ionizados (desprotonados los 3 primeros y protonados los 2 restantes) de tal forma que las fuerzas electrostáticas entre las proteínas se alteran, permitiendo una mayor interacción agua– proteína lo que se ve reflejado en el aumento de la CRA.

En el caso de las proteínas de la soya, a pH 4 que es en donde se registró el menor porcentaje de solubilidad, la CRA, resultó ligeramente mayor que a pH 7, cabe recordar que de acuerdo al fabricante, este aislado de proteínas se obtuvo por precipitación isoeléctrica a pH 7 y reportan en su certificado de análisis un pH de 7.3 (véase anexo 2), lo que indica que las proteínas en el aislado se encuentran en forma de proteinatos. Esto explica por que a pH 7 se registra una menor CRA en comparación con los pHs 4 y 7.22.

Al comparar los resultados entre el concentrado de globulinas de chía y el aislado de proteínas de soya (véase Tabla 5.9 y Fig. 5.13), podemos observar que la CRA de las globulinas de chía es mucho menor que la CRA de las proteínas de soya aún a pH 7 punto el cual la soya mostró baja capacidad de retención de agua.

En estos resultados se observa claramente la influencia que tiene el pH sobre la capacidad de retención de agua de las proteínas, además de la correlación entre esta propiedad funcional y la solubilidad que mostraron estas proteínas, es decir, a baja solubilidad, baja capacidad de retención de agua.

Al hacer una comparación entre la CRA de las globulinas de chíá a los distintos pHs estudiados y la CRA, de globulinas de lenteja (Bora, 2002) y trigo sarraceno (Ching – Yung, 2006) se encontró que inclusive a pH 5.29, el concentrado de globulinas de chíá retiene una mayor cantidad de agua que las fracciones obtenidas por estos autores (1.1 y 1.3 mL de agua retenida / g de proteína, respectivamente).

5.7.4 CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE ACEITE EN EL CONCENTRADO DE GLOBULINAS DE CHÍA

En comparación con las 2 propiedades funcionales revisadas anteriormente (solubilidad y CRA), la CRAC, está más ampliamente relacionada con las interacciones lípido – proteína (interacciones hidrofóbicas), que permiten que una cantidad de aceite sea retenida en la matriz proteínica del concentrado o aislado de proteínas.

Para ensayo, se utilizó el mismo método de estudio que para la capacidad de retención de agua. Los resultados fueron los siguientes:

La capacidad de retención de aceite del concentrado de globulinas de chíá fue de 3.53 ± 0.08 mL de aceite retenido / g de proteína, mientras que para el aislado de proteínas de soya fue de 2.73 ± 0.25 mL de aceite retenido / g de proteína.

Aparentemente, las proteínas insolubles y las más hidrófobas fijan las mayores cantidades de aceite (Cheftel y col 1989). Esto implica que la alta CRAC del concentrado de globulinas de chíá (0.8 veces mayor en comparación con el aislado de soya), puede deberse básicamente a dos factores, al pH en el cual se encontraban las proteínas al momento de realizar el ensayo, y a la cantidad de aminoácidos hidrófobos presentes en las proteínas de las muestras.

En este caso, el estudio se llevó acabo a pH de 5.29 para el concentrado liofilizado de chíá y a pH de 7.22 para el aislado en polvo de soya, lo que implica que las proteínas de chíá se encontraban en su intervalo de pI, es decir, insolubles y con un alto

contenido de parches (interacciones) hidrofóbicos en la superficie de la proteína que le permitieron actuar en mayor proporción con los lípidos y retenerlos; por otro lado, las proteínas de soya se encontraban como proteinatos, es decir, con sus proteínas cargadas eléctricamente, lo que les limitó la interacción con los lípidos, de ahí que el valor obtenido sea más bajo que en el concentrado de chía.

Aunado a esto, el concentrado de globulinas de chía tiene un 43.9 % de aminoácidos hidrófobos, sin incluir al triptófano (sección 5.5.3) y aunque a las proteínas de soya no se les realizó el perfil de aminoácidos, se puede inferir por su solubilidad (Fig 5.8) que deben tener un porcentaje de aminoácidos hidrófobos menor que el concentrado de chía y por lo tanto fijan una menor cantidad de lípidos.

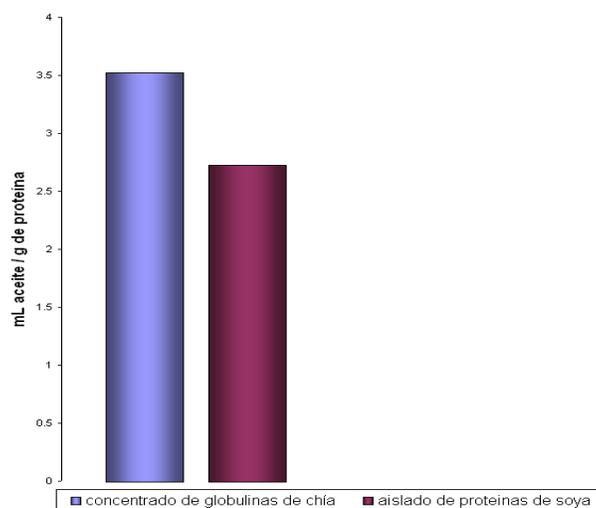


Fig. 5.13 Capacidad de retención de aceite del concentrado de globulinas de chía y del APPENSOL

Bora (Bora,2002), reporta que la CRAc para la fracción de globulinas de lentejas es de 2.6 ± 0.2 mL de aceite retenido/ g de proteína, 0.9 veces menor que la obtenida en el presente estudio, mientras que para la fracción de globulinas de trigo sarraceno, este valor es de 1.73 ± 0.09 mL de aceite retenido/ g de proteína (Ching-Yung,2006), 1.77 veces menor que para el concentrado de globulinas de chía .

Por otro lado, de acuerdo con los resultados obtenidos, podemos establecer una correlación de esta propiedad con la solubilidad, esta relación es inversamente proporcional, es decir, a menor solubilidad, mayor CRAc.

5.7.5 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES EMULSIFICANTES DEL CONCENTRADO DE GLOBULINAS DE CHÍA.

Se estudiaron las propiedades emulsificantes que presenta el concentrado de globulinas de chía a 3 diferentes pHs y a diferentes concentraciones de proteína, también se realizó la comparación con el aislado de proteínas de soya, bajo las mismas condiciones. A continuación se presentan los resultados obtenidos:

FORMACIÓN DE LA EMULSIÓN

Debido a las características fisicoquímicas de los diferentes residuos de aminoácidos que conforman a las proteínas, éstas son utilizadas como agentes emulsificantes, ya que disminuyen la energía del sistema al adsorberse en la interfase agua / aceite evitando así la separación de las fases. Alteración en factores como el pH, provoca cambios en la estructura de la proteína y por lo tanto, habrá cambios en la formación y estabilidad de las emulsiones.

Esta propiedad funcional, implica principalmente 3 tipos de interacciones: proteína-agua, proteína- lípidos y proteína- proteína, los cuales son relevantes en la estructura de la emulsión.

En el pl, las proteínas se encuentran plegadas, evitando toda interacción con el agua lo que evita, la migración y adecuada adsorción de la proteína en la interfase, provocando la separación del agua y el aceite.

Considerando que hay una proporción de aminoácidos hidrofílicos mayor que de aminoácidos hidrofóbicos en el concentrado de chía (ver Tabla 5.4).

A pH 4 la disponibilidad de cargas favorece cambios en la estructura molecular de las globulinas (desplegamiento), permitiendo que éstas se adsorban mejor en la interfase formándose emulsiones mucho más estables que al pl.

A pH 7, el cambio en la estructura molecular (desplegamiento y flexibilidad de las proteínas) es menor que a pH 4, esto se debe a que nos encontramos a un pH muy cercano al pl; algunos aminoácidos ya tiene carga electrostática, lo que permite que las proteínas interactúen con el agua y esto aunado a las interacciones hidrofóbicas favorece la formación de emulsiones estables.

Al observar las figuras 5.16 A y 5.17 A, se puede apreciar una cantidad de proteína precipitada en el fondo de los tubos, esto nos indica que solamente una fracción del total de proteína adicionada fue activa superficialmente a pH 4, inclusive al 1.25 %, en donde la emulsión ya está estabilizada al 100 %. Por otro lado, a pH 7, se observa un pequeño precipitado de proteínas hasta el 0.25 % de concentración lo que indica que hasta este punto, la participación de las proteínas es parcial, de igual forma que a pH 4.

A partir de 0.5 % y hasta el 1 % de concentración se observa un aumento en el color de la fase polar acuosa y una disminución del precipitado, lo que indica que al aumentar la concentración, aumenta la cantidad de proteínas cargadas a ese pH, esto incrementaría a su vez la cantidad de proteína adsorbida en la interfase en comparación con la proteína que se adsorbería a pH 4.

ESTABILIDAD DE LA EMULSIÓN

La estabilidad de la emulsión producida por las globulinas del concentrado de chíá, se ve afectada seriamente a pHs por debajo y por arriba del pl de estas proteínas

A pH 5.29, prácticamente no hay formación de emulsión con el concentrado de globulinas de chíá, el aceite coalescido es de más del 90 % (ver Fig. 5.15 y Tabla 5.10).

En las imágenes se puede observar una capa muy delgada de emulsión que nos indica que si hay proteínas participando en la interfase de la emulsión, mediante interacciones lípido – proteína, seguramente con los aminoácidos hidrófobos de éstas últimas, sin embargo la mayor parte de la fase lipídica está separada.

Esto se debe a que las proteínas a este pH forman agregados insolubles que no migran rápidamente a la interfase, y de hacerlo, están tan compactas por su plegamiento que no se adsorben adecuadamente, minimizando sus interacciones con ambos líquidos, permitiendo la coalescencia de los glóbulos de grasa y la separación de esta última.

Por otro lado, las proteínas de soya muestran una muy buena estabilidad de la emulsión a pH 7.22, debida seguramente, a que las proteínas del aislado se encuentran como proteinatos, es decir, con carga y semi desplegadas, lo que les permite migrar y adsorberse rápidamente hacia la interfase agua / aceite, estabilizando la emulsión.

A 0.25% de concentración de las proteínas de soya, casi un 60 % del aceite se encuentra retenido en la emulsión, mientras que a 1.25 %, las dos fases se encuentran totalmente unidas.

Esto concuerda con las especificaciones del fabricante, donde recomienda usar el producto en una concentración del 1.2 %.

Tabla 5.10 Formación y estabilidad de la emulsión del concentrado de globulinas de chíá a pH 5.29 y del APPENSOL, a pH 7.22. El ensayo se realizó a diferentes concentraciones de proteína

Muestra \ Concentración (%)	Concentración (%)					
	0.125	0.25	0.5	0.75	1.0	1.25
(%) de aceite coalescido de la emulsión de proteínas de chíá	98.3±2.8	98.3±1.1	98.3±2.8	96.6±3.8.	96.6±3.8	---
(%) de aceite coalescido de la emulsión de proteínas de soya	63.3±1.1	41.3±2.3	36.6±3.2	29.6±0.5	18.6±2.3	0

A pH 4, para el concentrado de globulinas de chíá, se observa (Fig. 5.16 y Tabla 5.11) que a la concentración más baja (0.125 %) de proteína, ya hay un 70.5 % de aceite retenido en la emulsión y este porcentaje aumenta al aumentar la concentración de proteína, de tal forma que a 1.2 % de proteína ya no hay aceite coalescido.

A este pH estamos alejados por debajo del pl de las proteínas, por lo que la participación de aminoácidos hidrofílicos, la cual es alta en el concentrado de globulinas de chíá y sobre todo los aminoácidos como Glu, Asp, Hist, Arg, Lys que se encuentran cargados a este pH, generan un cambio en la estructura de las proteínas, permitiéndoles en primer lugar, una migración más rápida hacia la interfase y en segundo lugar, un desplegamiento parcial con una mayor exposición de sus grupos hidrofóbicos, por lo tanto, una mejor alineación en la interfase, mejorando así la formación y estabilización de la emulsión.

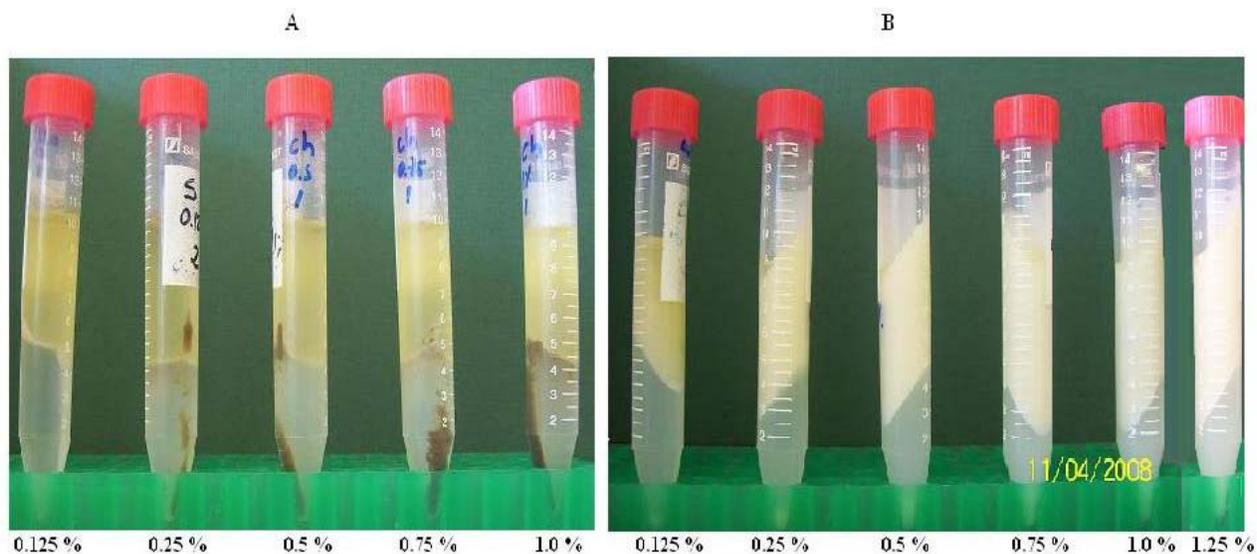


Fig. 5.14 Formación de la emulsión en función del pH y de la concentración de proteína. Imagen A, concentrado de globulinas de chí a pH 5.29. Imagen B, aislado de proteínas de soya a pH 7.22. Se probaron diferentes concentraciones de proteínas, desde 0.125 % hasta 1.0 % en ambos casos

Con respecto a las gotitas de grasa, se sabe que cerca del punto isoeléctrico prácticamente no hay repulsión de cargas entre ellas, lo que favorece la coalescencia. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los aminoácidos hidrofílicos cargados a este pH se sitúan en la superficie de las gotitas de grasa contribuyendo a la repulsión entre ellas, evitando así su coalición.

Tabla 5.11 Formación y estabilidad de la emulsión a pH 4 del concentrado de globulinas de chíá y APPENSOL, a diferentes concentraciones de proteína

Concentración (%) Muestra	0.125	0.25	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5	1.75	2.0
(%) de aceite coalescido de la emulsión de proteínas de chíá	29.5±0.8	26±1.7	16.6±2.8	10.8±1.4	5.6±1.1	0	----	----	----
(%) de aceite coalescido de la emulsión de proteínas de soya	100±1.1	100±2.3	100±2.3	100±1.7	100±1.5	100±1.1	100±2.3	100± 1.1	100±1.3

Por otro lado, para las proteínas del aislado de soya, no hubo formación de emulsión. Las proteínas no fueron capaces de evitar la coalescencia de las gotitas de grasa terminando en una separación de fases. Esto se debe seguramente, a que como lo indica el perfil de solubilidad, las proteínas están situadas en su pl y pierden totalmente su solubilidad haciéndolas incapaces de migrar a la interfase y estabilizar la emulsión. A este pH el comportamiento de las proteínas de soya, es el mismo comportamiento que muestran las proteínas de chíá a pH 5.29, pues ambas se encuentran en valores que corresponde a su intervalo de pls.

A pH 7 se observa que la formación de emulsión con el concentrado de globulinas de chíá es gradual (ver Tabla 5.12 y Fig. 5.17 A), es decir, que a medida que se aumenta la concentración también se aumenta la formación y estabilidad de la emulsión, sin embargo, se requiere de una mayor cantidad de proteína para llegar a un 70 % de aceite retenido en la emulsión en comparación con el pH 4, pero una vez que se llega al 1 % de proteína, la estabilidad es de la emulsión es del 100 %, mientras que para la muestra estudiada a pH 4, es solo del 80 %.

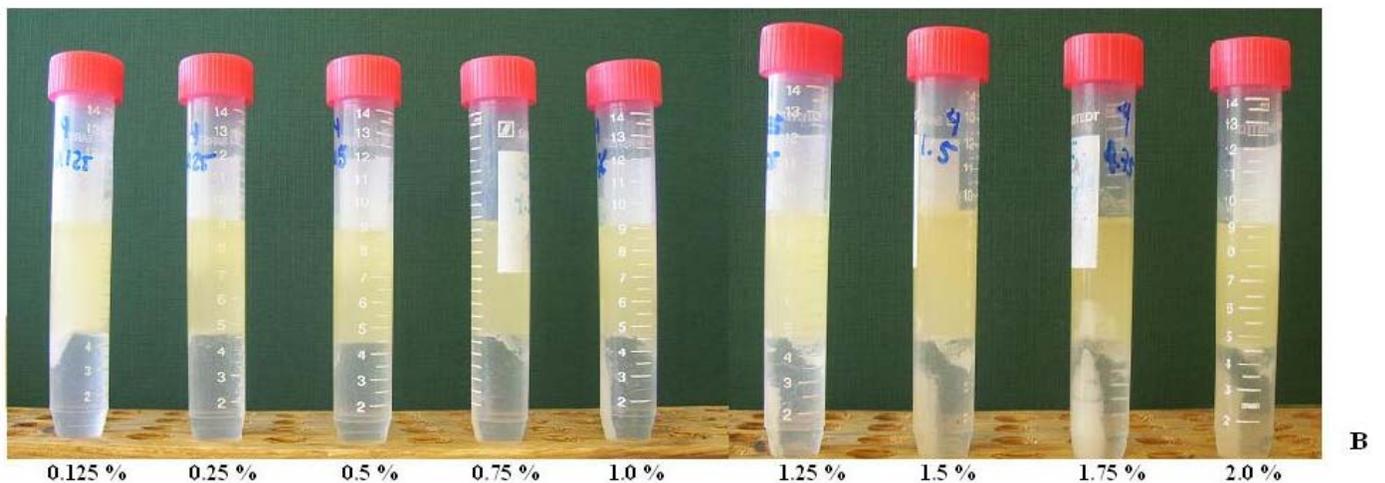
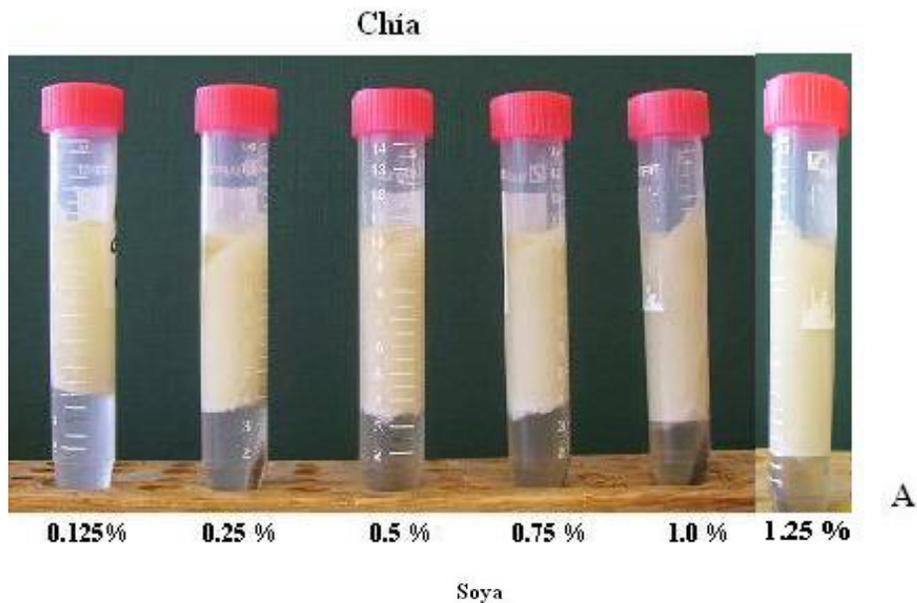


Fig. 5.15 Formación de la emulsión a pH 4. Imagen A, concentrado de globulinas de chíá . Imagen B, aislado de proteínas de soya. Se probaron diferentes concentraciones de proteínas, desde 0.125 % hasta 1.0 % para las globulinas de chíá y desde 0.125 % hasta 2% para las proteínas de soya.

A este pH de 7 nos encontramos ligeramente por encima del pI de la mayoría de las proteínas del concentrado de chíá, en este punto, la solubilidad de las globulinas se ha incrementado ligeramente y su estructura molecular ya no es tan compacta, lo que permite una exposición de grupos hidrofóbicos, aunque en menor proporción que a pH 4.

Debido a esto, la estabilidad de la emulsión no es tan buena a concentraciones bajas de proteína, pues solamente aquellas proteínas que tienen éstas condiciones, son las que migran y se adsorben más rápidamente en la interfase, creando esta estabilidad de forma gradual, que aumenta al aumentar la concentración del concentrado de proteínas. Por otro lado, al estar cerca del pl, se incrementan las interacciones proteína – proteína de aquellas que se adsorbieron rápidamente en la interfase, con las que migraron más lentamente, lo que permite crear una capa más viscosa que estabiliza mejor la emulsión. Debido a esto, hay una mejor estabilización de la emulsión al 1 % de proteína a pH 7 en comparación a pH 4

Tabla 5.12 Formación y estabilidad de la emulsión a pH 7 del concentrado de globulinas de chíá y del aislado de proteínas de soya a diferentes concentraciones de proteína

Concentración (%) Muestra	0.125	0.25	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5	1.75	2.0
Aceite coalescido (%) de la emulsión de proteínas de chíá	96.5±1.5	81.6±1.4	63.5±1.3	23.8±1.2	0	----	----	-----	----
Aceite coalescido (%) de la emulsión de proteínas de soya	100±3.5	100±2.0	100±2.7	98.6±2.3	95.8±3.8	86.3±1.1	84±3.8	82.6±2.3	78.3±2.8

Las proteínas de soya a este pH (7), muestran la misma tendencia que las globulinas de chíá, ya que la capa de emulsión aumenta a la par de la concentración de proteína. Sin embargo, el porcentaje de aceite coalescido es mucho mayor, inclusive al llegar a una concentración relativamente alta, como lo fue en este caso (2 %) y no es hasta que estas proteínas se encuentran totalmente cargadas y desplegadas (pH 7.22), que se llega a una estabilidad de emulsión del 100 % a bajas concentraciones de proteína.

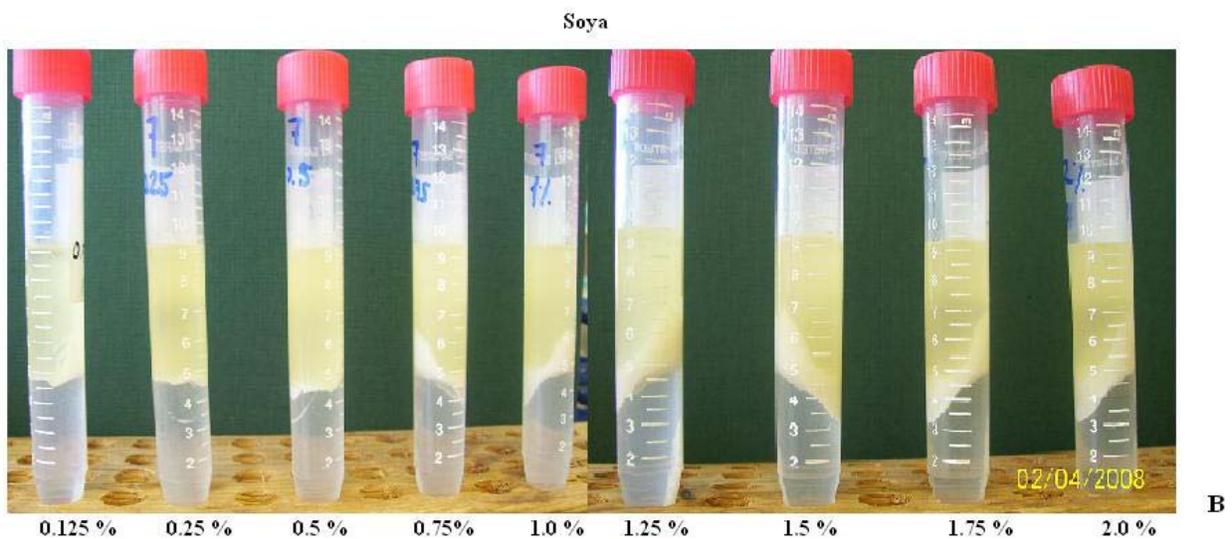
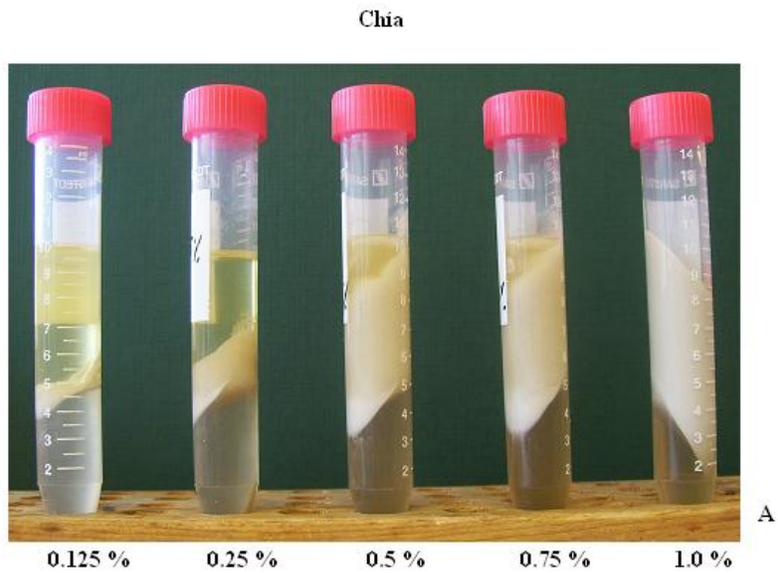


Fig. 5.16 Formación de la emulsión a pH 7. Imagen A, concentrado de globulinas de chía . Imagen B, aislado de proteínas de soya. Se probaron diferentes concentraciones de proteínas, desde 0.125 % hasta 1.0 % para las globulinas de chía y desde 0.125 % hasta 2% para las proteínas de soya.

La Fig.5.18 muestra con claridad la capacidad que tienen las globulinas de chía de estabilizar emulsiones a los diferentes pHs y concentraciones de proteína estudiados.

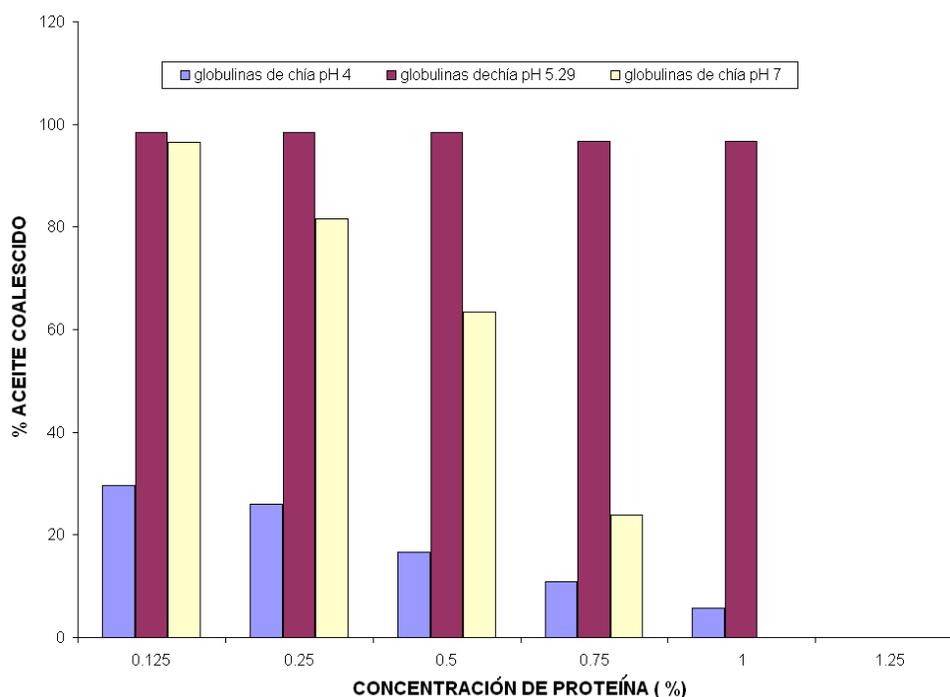


Fig. 5.17 Estabilidad de la emulsión del concentrado de globulinas de chíá. Se estudiaron los efectos del pH, ajustándolos a 4, 5.29 y 7 y la concentración de la proteína desde 0.125 hasta 1.25 %.

Al hacer la comparación entre la capacidad que tiene las proteínas (globulinas) del concentrado de chíá y las proteínas del aislado de soya en la formación y estabilización de emulsiones, se puede decir que a los pHs propuestos, las globulinas de chíá resultaron mejores agentes emulsificantes que las proteínas de soya, mientras que éstas últimas muestran resultados superiores al del concentrado de chíá únicamente a un pH ligeramente básico (7.22).

ÍNDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE (IAE)

El índice de actividad emulsificante (IAE) de las emulsiones fue determinado a los diferentes pHs y a las diferentes concentraciones propuestas.

Para las proteínas de chíá y las de soya, el IAE presenta su valor máximo a la más baja concentración de proteína, disminuyendo a medida que se aumenta la concentración de éstas. Este comportamiento se observa a los tres pHs estudiados.

Los resultados indican que a concentraciones bajas de proteína se logro cubrir la totalidad de la superficie de la gota de aceite y una vez que esta capa de proteína se adsorbió por completo en la interfase, la adición de mayores cantidades de proteína ya no lo hacen de la misma forma, ya que no se favorece su adsorción en la interfase, si no que establecen interacciones proteína – proteína alrededor de las que se encuentran adsorbidas, creando multicapas proteínicas que ayudan a estabilizar la emulsión.

Específicamente para el concentrado de globulinas de chíá a pH 5.29, se registra el mayor valor de IAE ($32.7 \text{ m}^2 / \text{g}$ de proteína), seguido por la proteína a pH 7 ($22 \text{ m}^2 / \text{g}$ de proteína) y por último a pH 4 ($17.5 \text{ m}^2 / \text{g}$ de proteína) (Fig. 5.19). Estos resultados indican que a pH 5.29 se tienen los glóbulos de grasa más grandes en donde la proteína fue capaz de cubrir la superficie total de estos, sin embargo, no fue capaz de estabilizar la emulsión (98.3 % de aceite coalescido, Tabla 5.10) derivando en una separación total de las fases.

A pH 7 los glóbulos de grasa son más grandes que a pH 4, ya que la superficie cubierta por la proteína es ligeramente mayor, aunque en comparación con los resultados obtenidos a pH 5.29, aquí la proteína estabiliza las emulsiones obtenidas en cada pH, obteniéndose los mejores resultados a pH 4, que es precisamente en donde se tienen glóbulos de grasa de menor tamaño.

Para el caso de la soya se obtuvo totalmente lo contrario, ya que a pH 4 se observa el menor IAE ($16.0 \text{ m}^2 / \text{g}$ de proteína), es decir, el menor tamaño de glóbulo graso, sin embargo la estabilidad en éstas condiciones fue nula. A pH 7 y 7.22, se observó un aumento en el área interfacial estabilizada por las proteínas de soya (21.9 y $33.0 \text{ m}^2 / \text{g}$ de proteína, respectivamente), es decir, el tamaño de los glóbulos grasos aumentó (Fig. 5.20).

Estos resultados indican que las proteínas que componen al aislado de soya, son capaces de cubrir un área interfacial grande, y además estabilizarla a bajas concentraciones de proteína (40 % de aceite coalescido a 0.25 % de proteína, Tabla 5.10), pero solo a pH 7.22, ya que a pH 7, la estabilidad resultó muy pobre aún a la concentración máxima experimentada (78.3 % de aceite coalescido al 2 % de proteína).

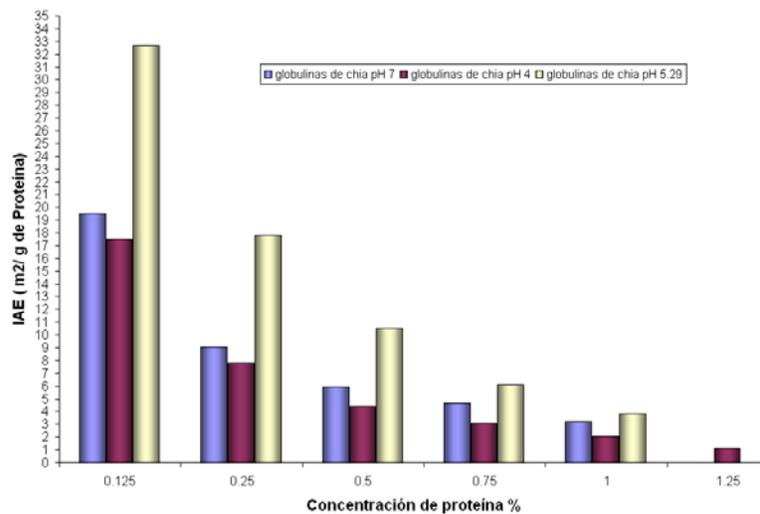


Fig. 5.18 Índice de actividad emulsificante del concentrado de globulinas de chí. El ensayo se realizó a diferentes pHs (4, 5.29 y 7) y a diferentes concentraciones de proteína (0.125, 1.25, 0.5, 0.75, 1.0 y 1.25 %)

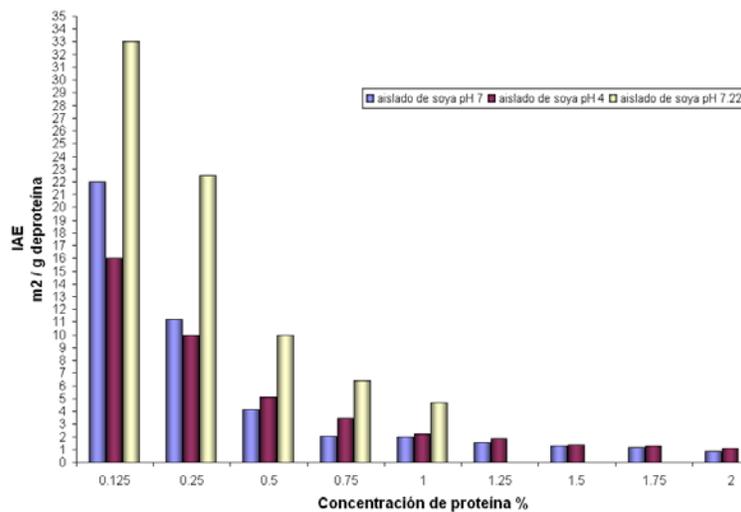


Fig. 5.19 Índice de actividad emulsificante del aislado de proteínas de soya APPENSOL. El ensayo se realizó a 3 diferentes pHs (4, 7, y 7.22) y a diferentes concentraciones de proteína (0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75 y 2.0%)

Ching-Yung (Ching- Yung, 2006), reporta que el IAE para la fracción de globulinas de trigo sarraceno a pH 7 y 0.5 % de concentración, es de 88.4 ± 0.70 (m^2 / g de proteína), los valores obtenidos en este estudio a ese pH fueron mucho menores, pero hay que considerar que también las concentraciones utilizadas lo fueron, quizá por eso los valores sean tan distantes.

5.7.6 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ESPUMANTES DEL CONCENTRADO DE GLOBULINAS DE CHÍA

Se estudiaron las propiedades espumantes del concentrado de globulinas de chía, en soluciones al 1 % de proteína y a los pHs propuestos.

FORMACIÓN DE LA ESPUMA

En esta propiedad funcional de las proteínas, al igual que en la formación y estabilización de emulsiones, los tres tipos de interacciones (proteína – proteína, proteína – agua y proteína- fase dispersa), son importantes, la diferencia es que en esta ocasión, la fase dispersa esta constituida por aire.

Los resultados obtenidos muestran que a pH 5.29, la expansión de la espuma para el concentrado de globulinas de chía fue del 207.3 %, mientras que a pH 4 y pH 7, la expansión de la espuma fue del 292.6 y del 280 % respectivamente (Figuras 5.21 y 5.23).

A pH 5.29 las globulinas se encuentran en su intervalo de pI, las interacciones proteína – proteína son tan fuertes, que éstas tienden a plegarse y perder solubilidad, lo que evita que difundan fácilmente hacia la interfase agua / aire; por otro lado, las proteínas que logran llegar a esta interfase son estructuralmente más rígidas y compactas, por lo que su adsorción y posterior desplegamiento en la interfase es muy difícil, todo esto hace que la expansión de la espuma sea mucho menor que a los dos pHs restantes.

A pH 4 tenemos una mejor expansión de la espuma que a pH 7, esto se debe a que en este pH, estamos alejados del pI , los aminoácidos ácidos y básicos se encuentran cargados, lo que permite por un lado, que la proteína sea más soluble y difunda con mayor rapidez a la interfase y por otro lado, que la estructura de esta cambie haciéndola más flexible, con una mayor exposición de grupos hidrofóbicos y una mejor adsorción en la interfase.

A pH 7 las proteínas del concentrado de chía se encuentran muy cerca de su intervalo de pI s, por lo que las interacciones proteína – proteína aún son fuertes, la estructura es menos compacta que al pI , pero más que a pH 4, esto afecta negativamente su espumabilidad, pero no su capacidad de estabilización de la espuma, como se verá más adelante.

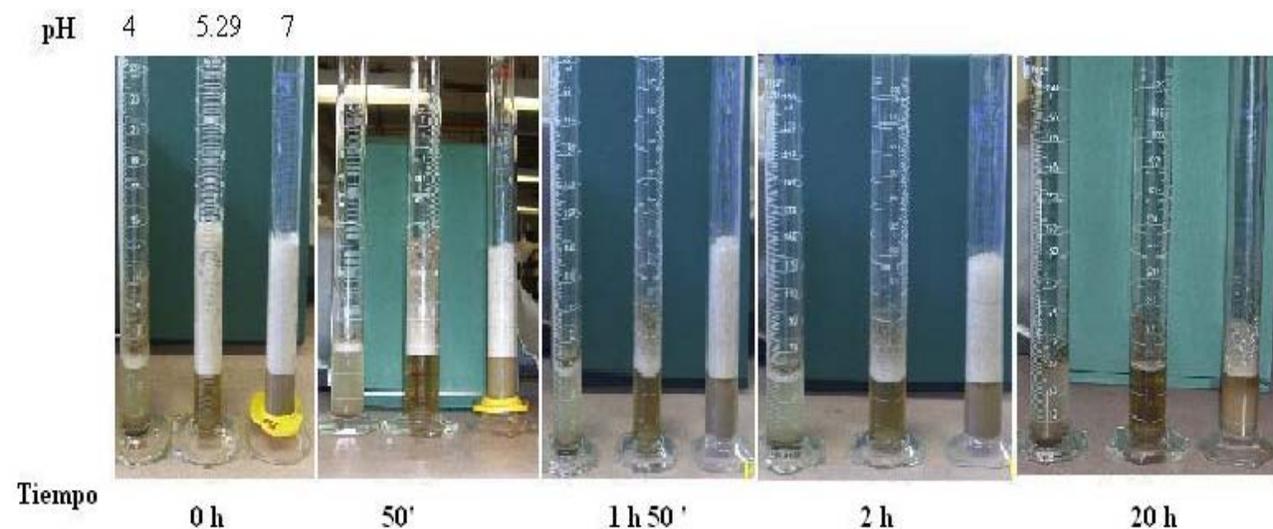


Fig. 5.20 Formación de espuma del concentrado de globulinas de chía. El ensayo se realizó a 3 diferentes pHs, 4, 5.29 y 7, en soluciones al 1 % de proteína. Se observa también la estabilidad de la espuma a través del tiempo, desde las 2:34 p.m., hasta las 9:28 a.m. del siguiente día.

La expansión de la espuma para el aislado de soya a los tres diferentes pHs fue de 114.6 % a pH 4, 275.3 % a pH 7 y 181.3 % a pH 7.22 (véase Fig. 5.22 y 5.23).

El valor más bajo de expansión de la espuma se presentó a pH 4, que es en donde se registro la solubilidad más baja, es decir, en el pl de las proteínas del aislado de soya. Los resultados concuerdan con los obtenidos para las proteínas de chíá en su intervalo de pls.

Teóricamente, a pH 7.22, debería tenerse una mejor expansión de la espuma que a pH 7, ya que a ese pH las proteínas tienen mas cargas eléctricas por encontrarse como proteinatos, mejor solubilidad y mucho mayor flexibilidad, lo que permitiría una mejor y más rápida adsorción en la interfase, sin embargo, esto no fue así. A pH 7 se obtuvo una mayor espumabilidad que a pH 7.22, esto puede deberse a que a este pH, las interacciones proteína-proteína son muy débiles, impidiendo una buena interacción de éstas con la fase no polar (aire).

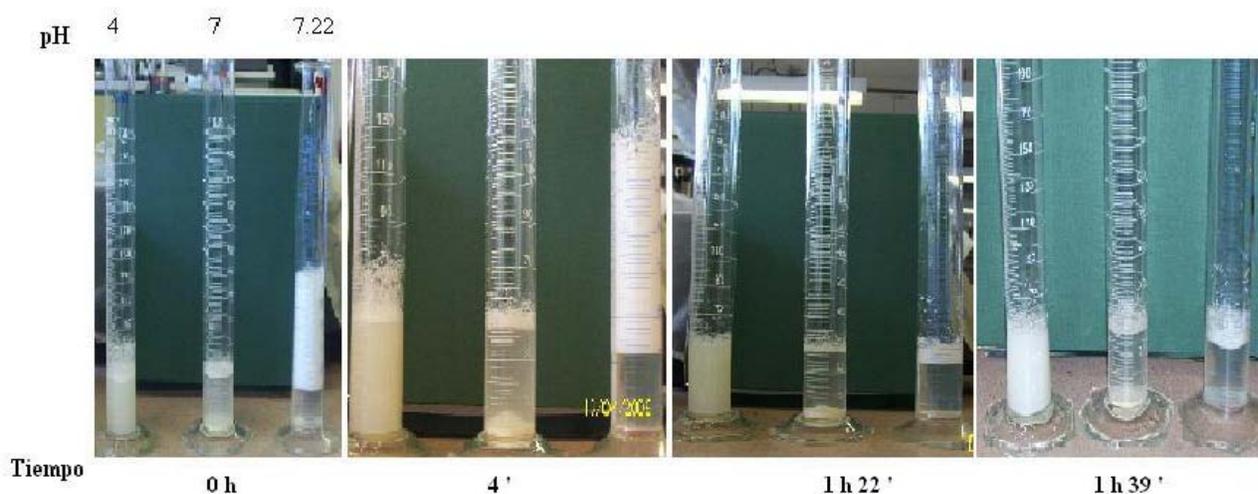


Fig. 5.21 Formación de espuma del aislado de proteínas de soya. El ensayo se realizó a 3 diferentes pHs, 4, 7 y 7.22, en soluciones al 1 % de proteína. Se observa también la estabilidad de la espuma a través del tiempo, desde las 10:35 a.m., hasta las 12 p.m. del mismo día.

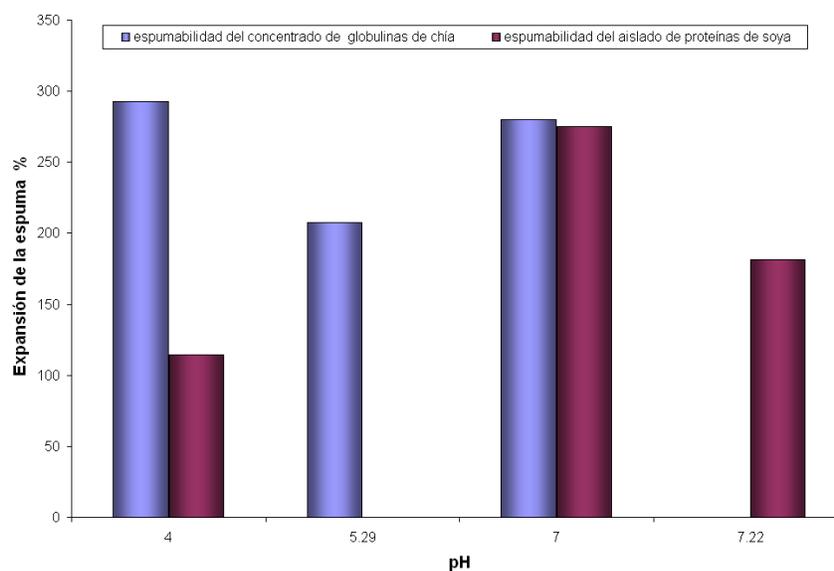


Fig. 5.22 Espumabilidad del concentrado de globulinas de chíá y del aislado de proteínas de soya, APPENSOL a diferentes pHs.

ESTABILIDAD DE LA ESPUMA

El valor más alto de estabilidad de la espuma para el concentrado de globulinas de chíá fue el obtenido a pH 7 (60%), seguido por el obtenido a pH 4 (56%) y por último el obtenido a pH 5.29 (32%) (ver Fig. 5.21 y 5.24).

A medida que transcurrió el tiempo, la estabilidad de las espumas disminuyó drásticamente, hasta llegar a un 4 % para la espuma a pH 5.29, la cual desapareció totalmente después de 3 horas. Para el caso de la espuma a pH 4 y 7, la estabilidad disminuyó hasta un 12 % durante las primeras tres horas, posteriormente la espuma a pH 4 desapareció por completo, mientras que la espuma a pH 7 se mantuvo con esa estabilidad por más de 12 horas, desapareciendo por completo hasta las 26 horas después de su creación.

Diversos estudios han mostrado que a pHs cercanos al pI de las proteínas se obtiene una mejor estabilidad que al resto de los pHs (Kinsella,1981; Kinsella, 1985; Kinsella y Phillips, 1989).

Esto se debe a que en estos pHs, las repulsiones electrostáticas son mínimas en la interfase y las proteínas que se encuentran estructuralmente más compactas (interacciones proteína – proteína) generan capas proteínicas más fuertes y viscosas, lo que imparte estabilidad a la espuma.

Al observar la Fig. 5.21, podemos ver que a pH 7 se distingue una turbidez en la solución. Esta turbidez se debe a que por encontrarnos muy cerca del pI de algunas de las proteínas que forman el concentrado, éstas tienden a agregarse, sin embargo, esta agregación no afecta la estabilidad de la espuma, pero si su espumabilidad, debido probablemente a que la agregación reduce la cantidad de proteína disponible para la formación de la capa interfacial, pero una vez que se forma, ésta es densa, viscosa y muy estable (Phillips y col,1990).

Diversos autores coinciden en que la fracción de globulinas generalmente presenta poca capacidad de espumado y estabilidad de las espumas (Bora,2001; Lawal y col,2005; Ching-Yung,2006), en este caso, a pesar de que no se puede realizar una comparación directa de la capacidad y estabilidad de la espuma con estos autores, se puede observar de acuerdo a los resultados obtenidos, que la capacidad de creación o expansión de la espuma que tiene las globulinas de chíá, es buena, y a pesar de que la estabilidad resulto muy baja, esta se mantiene por mucho tiempo en las soluciones a pH 7.

Los lípidos son considerados contaminantes, pues interfieren en las propiedades espumantes de las proteínas, ya que obstruyen en la creación de las celdas de aire durante la fase de batido, evitando la generación y / o estabilidad de la espuma. En este caso, se observa que los lípidos presentes no afectaron la espumabilidad o estabilidad de la espuma generadas por las proteínas de chíá, puesto que sí logro generarse espuma a los 3 pHs estudiados. La inestabilidad se debió a las características intrínsecas de estas proteínas y no a una interferencia con los lípidos.

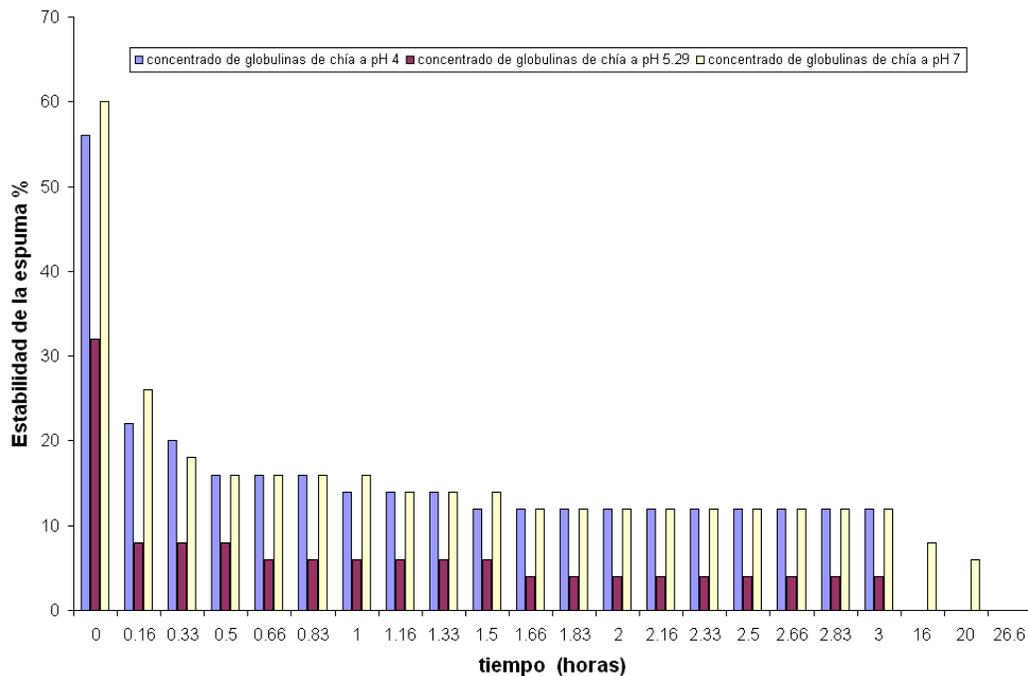


Fig. 5.23 Estabilidad de la espuma del concentrado de globulinas de chíá, en función del tiempo y el pH. Se utilizaron soluciones al 1 % de proteína en todas las variaciones de pH.

Para el aislado de soya, tenemos que a pH 7 se obtuvo la mejor estabilidad de la espuma (40 %), seguido de las proteínas a pH 7.22 (28 %) y por último las proteínas a pH 4 (16 %) (véase Fig. 5.25).

Para el caso de la soya se ha reportado que la cantidad de puentes disulfuro que contiene limita la flexibilidad molecular de las proteínas, por lo que la espumabilidad y la estabilidad de la espuma, se ven seriamente afectadas (German y col, 1985).

Las proteínas de soya resultaron muy pobres como espumantes y estabilizantes de espumas en comparación con las globulinas de chíá.

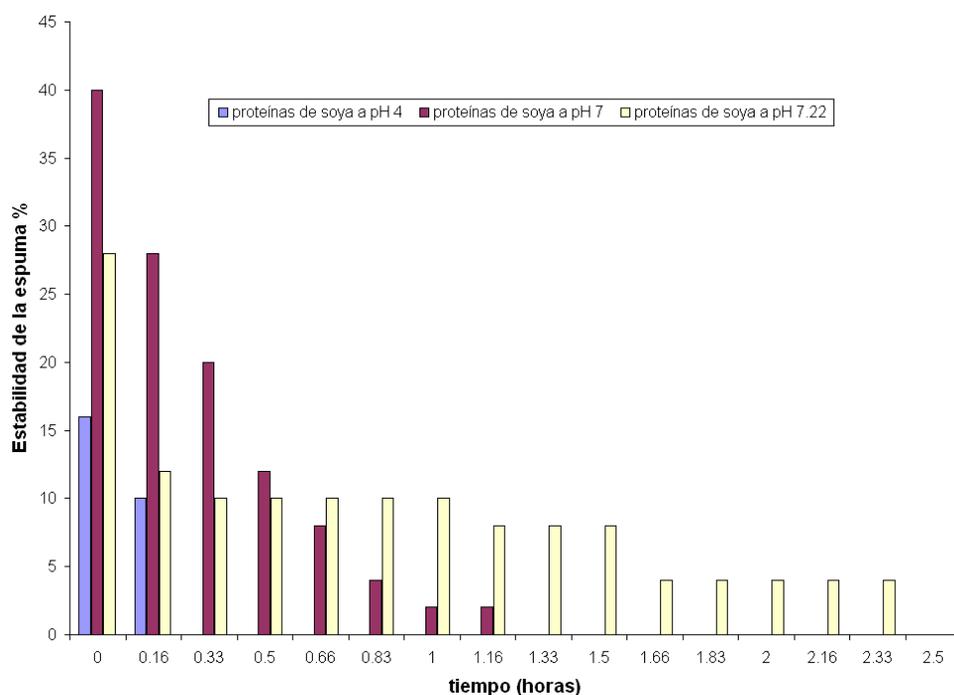


Fig. 5.24 Estabilidad de la espuma del aislado de proteínas de soya (APPENSOL) en función del tiempo y el pH. Se utilizaron soluciones al 1 % de proteína en todas las variaciones de pH.

Los resultados obtenidos hasta este momento, indican que el concentrado de globulina de chíá ha tenido mejores resultados en cuanto a las propiedades funcionales, que el aislado de proteínas de soya a los pHs propuestos, excepto por la capacidad de retención de agua.

5.8 INFLUENCIA DEL MUCÍLAGO EN LAS PROPIEDADES FUNCIONALES.

Se ha reportado que los carbohidratos participan en la estabilización de la emulsión y el espumado, ya que por un lado, interaccionan con las proteínas aumentando sus propiedades superficiales haciéndolas mucho más activas y por otro lado, aumenta la viscosidad de la fase dispersante (Dickinson y Semeanova , 1993; Kato y col., 1993; Cheftel, 1989).

Se realizaron los ensayos para la evaluación de las propiedades funcionales utilizando únicamente al mucílago, para corroborar que los resultados obtenidos en cada una de estas pruebas se debían a la proteína y no al mucílago.

Para CRA, el resultado fue negativo, es decir, el mucílago no influye en la capacidad de retención de agua del concentrado de globulinas de chíá. Para CRAc, se observa que el mucílago retiene un 25 % de aceite. En este caso, si influyó en los resultados obtenidos para esta propiedad funcional, sin embargo, al tener al mucílago liofilizado, éste actúa como un adsorbente de la grasa, no interactúa directamente con el aceite, pues no tiene sitios hidrofóbicos que le permitan hacerlo.

Para las propiedades emulsificantes y espumantes la respuesta también fue negativa, ya que las emulsiones hechas sólo con mucílago, presentaron el 100 % de aceite coalescido, mientras que las emulsiones agua/aire, presentaron muy poca expansión de la espuma y no presentaron estabilidad en ninguna de las condiciones establecidas.

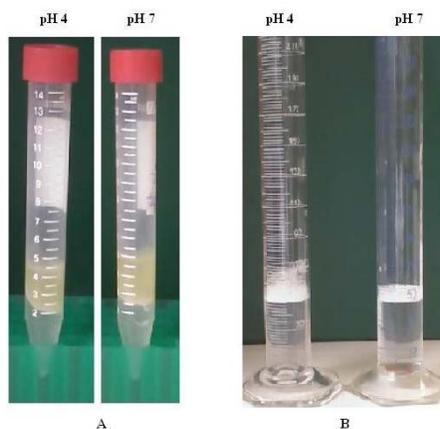


Fig. 5.25 Propiedades espumantes y emulsificantes, realizadas únicamente con mucílago Imagen A, formación y estabilidad de la emulsión. Imagen B, formación y estabilidad de la espuma.

6.- CONCLUSIONES

- El proceso de extracción utilizado en este estudio nos permitió obtener una fracción de globulinas a partir de la semilla de chía con una pureza bastante aceptable, prescindiendo del proceso inicial de eliminación del mucílago.
 - El componente mayoritario en el extracto obtenido a partir de la semilla de chía es la proteína, con un 62.05 % de pureza, lo que permite considerarlo como un concentrado proteínico, en donde los carbohidratos asimilables derivados del mucílago remanente en la muestra ocupan un 35 % del total del concentrado. El tercer y cuarto lugar en el concentrado lo ocupan los lípidos (2%) y las cenizas (0.35 %) respectivamente, mientras que la fibra cruda no forma parte de este concentrado.
 - Las globulinas que conforman al concentrado de chía tienen pesos moleculares entre 61.1 y 14.2 kDa y la mayoría de estas proteínas tienen carácter ácido.
 - Los datos obtenidos durante la purificación parcial sugieren que estas proteínas son subunidades de la globulina 11 S, localizada en plantas dicotiledóneas y se encuentran formando agregados macromoleculares heterogéneos en el concentrado de chía
 - El alto contenido de aminoácidos hidrofílicos (55 %) en las globulinas de chía, así como el contenido de aminoácidos hidrofóbicos (45 %), generan cambios en el comportamiento de estas proteínas influenciadas por el pH, generando a su vez cambios en las propiedades funcionales estudiadas.
 - La solubilidad del concentrado de globulinas de chía es bajo a los pHs de trabajo propuestos (42.0 ± 0.29 % a pH 4 y 11.7 ± 0.25 % a pH 7), sin embargo, los resultados muestran que no es necesaria una alta solubilidad de estas proteínas para obtener buenos resultados en pruebas como CRAc y formación y estabilidad de emulsiones y espumas, mientras que el aumento de la CRA, si está directamente relacionada con el aumento de la solubilidad.
-

-
- ▶ Las globulinas de chíá pueden considerarse buenos agentes emulsificantes a los pHs de trabajo propuestos, ya que estabilizan el 100 % las emulsiones a bajas concentraciones de proteínas (1.25 % a pH 4 y 1 % a pH 7).
 - ▶ La espumabilidad y estabilidad de la espuma que generan las globulinas de chíá resultaron aceptables, considerando que la mayoría de los autores reportan formación y estabilización de espumas pobres cuando se utilizan fracciones de globulinas como agentes espumantes.
 - ▶ El mucílago no influye en la capacidad de retención de agua, propiedades emulsificantes ni propiedades espumantes del concentrado de globulinas de chíá, mientras que para la capacidad de retención de aceite, se observa un 25 % de retención debida al mucílago.
 - ▶ De acuerdo a los resultados obtenidos, el concentrado de globulinas de chíá puede utilizarse como sustituto del aislado de soya (APPENSOL) a pH 4 y pH 7, en productos donde las propiedades emulsificantes son importantes, por ejemplo productos cárnicos.
 - ▶ Por los buenos resultados obtenidos en la capacidad de retención de aceite y propiedades emulsificantes, el concentrado de globulinas de chíá, podría ser utilizado en formulaciones alimenticias tipo emulsión (embutidos, mayonesas, aderezos, etc.) o también para productos de panadería.
 - ▶ Por su buena capacidad de retención de agua y espumabilidad (a pH 7), el concentrado de globulinas de chíá, podría ser utilizado en helados, postres tipo mousse, bombones, productos de panadería como cremas batidas, etcétera.
-

7.- BIBLIOGRAFÍA

- ✍ Aluko, R.E. y Yada, R.Y. (1995). Structure--function relationships of cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin isolate: influence of pH and NaCl on physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*, **53**: 259-265.
- ✍ American Association of cereal Chemists. (1995) Approved Methods of the AACC, 16th ed. Arlington, VA. Métodos 943.02, 960.52, 923.03
- ✍ Ayerza, R. y Coates, W. CHÍA. The University of Arizona Press. Arizona 2005. pag.47,54, 60-73,80-90.
- ✍ Ayerza, R.(2003) Nutrientes de la semilla de chía y su relación con los requerimientos humanos diarios. Office of Arid Lands Studies, The University of Arizona, Tucson Arizona, U.S.A.
- ✍ Barbut, S. (1996). Determining water and fat holding. In Hall,G., *Methods of Testing Protein Functionality*. Blackie Academic and Professional, 186-220.
- ✍ Bohinski, R. *Bioquímica*. Fondo Educativo Interamericano, S.A. Massachussets, E.U.A. 1987. pag.16-21,111-139.
- ✍ Bora,P. (2002). Functional properties of native and succinylated lentil (*Lens culinaris*) globulins. *Food Chemistry*, **77**:171-176.
- ✍ Branlard , G. y Bancel, E.(2007) Protein Extraction from Cereal Sedes. In Thiellement,H. et al, *Plant Proteomics. Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey, 15-20.
- ✍ Bushway, .A.; Belyea, P.; Bushway, R. (1981). Chía seed as a source of oil, polysaccharide, and protein. *Journal of Food Science*. **46**: 1349-1356.
-

-
- ✍ Cachill, J. (2003). Ethnobotany of Chía, *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). *Economic Botany*, **57** (4): 604-618.
- ✍ Casey, R. (1999). Distribution and some properties of seed globulins. In: Shewry PR, Casey R, eds. *Seed proteins*. Kluwer Academic Publishers, 159-169.
- ✍ Cheftel, J., Cuq, J. Y Lorient, D. Proteínas alimentarias. Bioquímica- propiedades funcionales- valor nutricional- modificaciones químicas. Ed. Acribia, S.A. España 1989. pag. 49-96.
- ✍ Chel-Guerrero, I. et al. (2007) Physicochemical and structural characterization of Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) globulins. *LWT*, doi_10_1016/j_lwt2006_11_014.
- ✍ Ching-Yung, M. y Siu-Mei, C. (2006). Extraction, purification and characterization of globulin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. *Food Research International* **39** 974-981.
- ✍ Dagorn, S., Gueguen, J. y Lefebvre, J. (1987) Emulsifying properties of Pea Globulins as related to their adsorption behaviors. *Journal of Food Science*, **31**: 335-341.
- ✍ Damodaran, S. (1994) Structure-Function Relationship of food proteins. In Hettiarachchy, S. y Ziegler, R. *Protein functionality in food Systems*. Marcel Dekker, Inc. New York, 1-11, 18-31.
- ✍ Damodaran, S., (1997). Food proteins: an overview. In *Food Proteins and their applications*. Marcel Dekker Inc. USA, 1-24.
- ✍ Derbyshire, E., Wright, D. y Boulter, D. (1976) Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, **15**: 3-24.
-

-
-
- ✍ -Dickinson , E. y Semeanova, M.(1992) emulsifying properties of covalent protein / dextran híbridos. *Colloids and Surfactants*, **64**: 299-310.

 - ✍ Doxastakis,G. y Fidantsi, A. (2001) Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **21**: 119-124.

 - ✍ German,J.,O'Neill,T. y Kinsella, J.(1985) Film forming and foaming behavior of food proteins. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **62**: 1358

 - ✍ Gruener, L. E Ismond, M. (1997) Effects of acetylation and succinylation on the functional properties of the 12 S globulin. *Food Chemistry*,**60**: 513-520.

 - ✍ Gueguen, J., Bollecker, S., Schwenke, K., y Raab, B. (1990) Effect of succinylation on the physicochemical and functional properties of the 12 S storage protein from rapeseed (*Brassica napus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **38**: 61-69.

 - ✍ Hall, G.(1996) Basic concepts. In Hall,G., *Methods of Testing Protein Functionality*. Blackie Academic and Professional.1-10.

 - ✍ Halling, P.(1981) Protein-stabilized foams and emulsions. *CRC Critical Review of Food Science and Nutrition*. Oct, 155-203.

 - ✍ Hentry, H. S., Mitleman, M., McCrohan, P. R.(1990). Introducción de la chía y la goma de tragacanto en los Estados Unidos. Ediciones J. Janick y J. E. Simon, Avances en cosechas nuevas. Prensa de la madera, Portland, O. Pp.252-256

 - ✍ Hill, S.(1996) Emulsions.In In Hall,G., *Methods of Testing Protein Functionality*. Blackie Academic and Professional.153-181.
-
-

-
-
- ✍ Hortiplex plant database,2007(en línea disponible en <http://hortiplex.gardenweb.com/plants/>)

 - ✍ Kato,A., Minaki, K. Y Kobayashi, K. (1993) Improvement of emulsifying properties of egg white proteins by the attachment of polisaccharide through Maillard reaction in a dry state. *Journal of Agricultural in Food Chemistry*,**41**: 540-543.

 - ✍ Kinsella, J (1981) Functional properties of proteins: possible relationships between structure and function in foams. *Food Chemistry*, **7**: 273-288.

 - ✍ Kinsella, J., y Phillips, L. (1989) Structure function relationships in food proteins: Film and foaming behavior. In Kinsella, J., and Soucie, W.(Eds) *Food Proteins: Structure and Functional Relationships*. American Oil Chemistry Society, Champaing, IL.

 - ✍ Koyoro, H., y Powers, J. (1987) Functional properties of pea globulin fractions. *Cereal Chemistry*, **64**: 97-101.

 - ✍ Lawal, O., Adebowale ,K., Ogunsanwo, B., Sosanwo, O. y Bankole, S. (2005) On the functional properties of globulin and albumin protein fractions and flours of African locust bean (*Parkia biglobossa*) *Food Chemistry*, **92**: 681-691.

 - ✍ Lin, K., Daniel, J. y Whistler, R. (1994) Structure of chia seed polysaccharide exudates. *Carbohydrate Polymers*, **23**: 13-18.

 - ✍ Mangino, E. Protein interaction in Emulsions: Protein-Lipid Interactions. In Hettiarachchy, S. y Ziegler, R. *Protein functionality in food Systems*.Marcel Dekker, Inc.New York, 147-202.

 - ✍ Marcone, M., Kakuda, Y. y Yada, R. (1998) Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants – I. Isolation /purification and characterization. *Food Chemistry*, **62**: 27-47.
-
-

-
- ✍ Olivos, B. (2005) Estudio de las propiedades térmicas, funcionales y nutritivas de la fracción proteínica de la semilla de Chía (*Salvia hispanica*) Tesis de licenciatura, UNAM. México D.F., 2005.
 - ✍ Pernollet, J., Mosseca, J. (1983) Structure and location of legume and cereal seed storage protein. In Daussant, J., Mosseca, J. y Vaughan, J. *Seed proteins*, 155-191.
 - ✍ Phillips, L., Shulman, W. y Kinsella, J (1990) pH and heat treatment effects on foaming of whey protein isolate. *Journal of Food Science*, **55**(4): 1116.
 - ✍ Pearce, K. y Kinsella, J. (1978) Emulsifying properties of proteins: evaluation of turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **26**:716-723.
 - ✍ Popineau, Y., Bollecker, S. y Thebaudin, J. (1988) Caractérisation biochimique et fonctionnelle des protéines de gluten désamidées partiellement en conditions ménagées. *Sciences des aliments*. **8** (4): 411-430.
 - ✍ Exportan la chía a Europa. Periódico Reforma, 2006 (en línea disponible en <http://www.reforma.com>.)
 - ✍ Romero, M. (2006) Evaluación bioquímica y nutricional de las semillas de chía (*Salvia hispanica*) y su incorporación a una barra de cereales. Tesis de maestría IPN. México, D.F., Pp. 2.
 - ✍ SAGARPA, delegación Jalisco SIAP / SIACAPW, 2007. (en línea disponible en <http://www.SAGARPA.gob.mx>)
 - ✍ Sathe, S. y Salunkhe, D. (1981) Functional properties of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: emulsion, foaming, viscosity and gelation properties. *Journal of Food Science*, **46**: 71-81.
-

-
- ✍ Shewry, P. y Halford, N. (2002) Cereal seed storage proteins: Structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, **53**(370): 947-958.
 - ✍ Ting, I., Brown, H., Naqvi, H., Kumamoto, J. y Matsumura, M. (1990) Chía: a potencial oil crop for arid zones. In Naqvi, H., Estilai, A., and Ting, I., *New industrial crops and products: proceedings of the first international conference on new industrial crops and products*, Riverside Calif. Association for the Advancement of Industrial crops, 197-202.
 - ✍ USDA's plants database, 2007 (disponible en línea en <http://plants.usda.gov/>)
 - ✍ Utsumi, S. (1992) Plant food protein engineering. In Kinsella, E. (Ed.), *Advances in food and nutrition research*. Academic Press, San Diego, CA, 89-208.
 - ✍ Vojdani, F. (1996) Solubility. In Hall, G., *Methods of Testing Protein Functionality*. Blackie Academic and Professional. 11-59.
 - ✍ Waggle, D., Steinke, F. y Shen, J. (1989) Isolated soya proteins. In Mathews, R *Legumes: Chemistry, Technology and Human Nutrition*, Marcel Dekker, New York, pp. 99-138.
 - ✍ Weber, C., Gentry, E., Kohlhepp, A. y MacCrohan, P. (1991) The nutritional and chemical evaluation of chía seeds. *Ecology of Food and Nutrition*, **26**: 119-125.
 - ✍ Wijeratne, W. (2005) Propiedades funcionales de las proteínas de soya en un sistema de alimentos. Programa INTSOY (International Soybean Program) universidad de Illinois. Urbana IL61801 (disponible en línea <http://www.alfa-editores.com/archivo.htm>).
-

ANEXO 1

IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA SEMILLA DE CHÍA



Instituto
de Biología



Jardín Botánico

Universidad Nacional
Autónoma de México

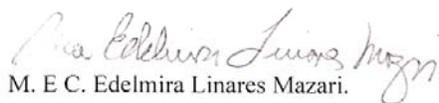
Quím. Norma Molina Tizo
Instituto de Química
Bioquímica 2
Tel 56-22-45-16

En contestación a su solicitud de identificación etnobotánica, me permito adjuntar la identificación de la muestra de semillas de chía que me hizo llegar.

Nombre científico: *Salvia hispanica* L.
Familia Botánica: Lamiaceae

Si usted está estudiando esta especie le sugiero que deposite un ejemplar en la colección Etnobotánica de MEXU ubicada en el jardín Botánico Exterior planta baja, para respaldar sus estudios.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria a 15 de noviembre, 2007.


M. E. C. Edelmira Linares Mazari.

ANEXO 2

CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS DEL AISLADO DE SOYA APPENSOL.



DVA GROUP
JUST WHAT YOU NEED



CERTIFICADO DE ANALISIS

INSUMO: PROTEÍNA DE SOYA AISLADA EMULSIÓN (SIN RECUBRIR) 90%
LOTE: 200627

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	Color		Blanco lechoso
	Olor		Normal y suave
CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS	DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
	Proteína (base seca)	≥ 90,0	91,3
	Humedad	≤ 7,0	6,0
	Índice de Solubilidad de Nitrógeno	≥ 85,0	88,5
	Cenizas	≤ 6,0	4,5
	Tamaño de maza # 100	≥ 95,0	90,6
	Grasa	≤ 0,5	0,21
	pH	6,5 – 7,5	7,30
	Pb	< 1,0	0,30
	Cd	< 1,0	0,40
CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES	Aceite:Agua:Polvo	Buena elasticidad, aceite en agua no puede ser filtrado	Conforme
	Agua:Polvo	Buena elasticidad, buena apariencia	Conforme
CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS	Cuenta estándar en placa	≤10000	1200
	E. coli	< 30	Negativo

Los datos contenidos en este certificado son copia fiel del proporcionado por el fabricante-



ANEXO 3

MEDICIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE MEDIANTE EL MÉTODO DEL ÁCIDO BISINCONÍNICO

Cuantificación de proteína soluble por el método del ácido bisinconínico, se utilizó el kit de ensayo de proteínas BCA de Pierce, número 23225

Curva patrón:

El kit contiene ampollas de albúmina estándar con una concentración de 2 mg /mL en 0.9% de solución salina y 0.05% de azida de sodio, las cuales se diluyeron al realizar la curva patrón para el procedimiento de microplacas, en un rango de trabajo de 20-2000 µg/mL, de acuerdo al siguiente esquema:

Vial	Volumen de diluyente	Volumen y fuente de BSA	Concentración final de BSA
A	0 µL	300 µl de stock	2000 µg/mL
B	125 µL	375 µL de stock	1500 µg/mL
C	325 µL	325 µL de stock	1000 µg/mL
D	175 µL	175 µL del vial B	750 µg/mL
E	325 µL	325 µL del vial C	500 µg/mL
F	325 µL	325 µL del vial E	250 µg/mL
G	325 µL	325 µL del vial F	125 µg/mL
H	400 µL	100 µL del vial G	25 µg/mL
I	400 µL	0	0 = blanco

Reactivos:

Reactivo A, contiene: carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bisinconínico y tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0.1 M.

Reactivo B, contiene: sulfato cúprico al 4 %.

Preparación del reactivo de trabajo (WR)

1.-Determinar el volumen total de reactivo de trabajo (WR), de acuerdo a la siguiente formula:

$(\# \text{ de estándares} + \# \text{ de muestras}) \times (\# \text{ de réplicas}) \times (\text{volumen de WR por muestra}) = \text{volumen total de WR requerido.}$

Nota: El volumen de reactivo WR requerido por muestra en este procedimiento es de 200 µl.

2.- El reactivo de trabajo WR se prepara mezclando 50 partes de reactivo A con una parte de reactivo B (50:1, reactivo A:B).

PROCEDIMIENTO PARA MICROPLACAS.

- 1.-Pipetear 25 μ l de cada uno de los estándares o muestras desconocidas, por duplicado, dentro de los pozos en la microplaca.
- 2.-Adicionar 200 μ l del reactivo de trabajo (WR), a cada uno de los pozos y agitar en un agitador de placas, por 30 seg.
- 3.-Cubrir la placa e incubar a 37 °C por 2 h.
- 4.- Una vez que transcurrió el tiempo, dejar enfriar la placa por unos minutos.
- 5.-Medir la absorbancia a 562 nm.