



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Química

Programa de Posgrado en Alimentos  
del Centro de la República (PROPAC)

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**“Aislamiento y caracterización de las proteínas de  
reserva de chíá (*Salvia hispanica* L.)”**

T E S I S

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

**Q. María Rosa Sandoval Oliveros**

**Director: Dr. Octavio Paredes López**

**Co- Director: Dra. María Elena Valverde González**

Santiago de Querétaro, Qro., Noviembre de 2012.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA DE CHÍA (*Salvia hispánica* L.)**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

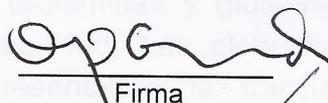
**Presenta:**

María Rosa Sandoval Oliveros

**Director: Dr. Octavio Paredes López**  
**Co-director: Dra. María Elena Valverde González**

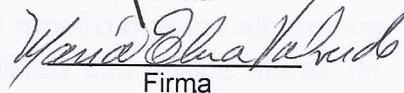
**SINODALES**

Dr. Octavio Paredes López  
Presidente



Firma

Dra. María Elena Valverde González  
Secretario



Firma

Dr. Carlos Regalado González  
Vocal



Firma

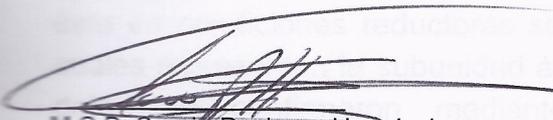
Dra. Alejandra Rojas Molina  
Suplente

Firma

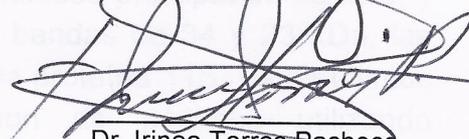
Dra. Alma Leticia Martínez Ayala  
Suplente



Firma



M.S.P. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad



Dr. Irineo Torres Pacheco  
Director de Investigación y  
Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Noviembre de 2012  
México

## Resumen

Las tendencias actuales con respecto a la alimentación indican un marcado interés de los consumidores en ciertos alimentos que además de nutrir aporten beneficios al organismo. Las variaciones en los patrones dietéticos han generado una nueva área de desarrollo en la ciencia alimentaria que se conoce como alimentos nutraceuticos o funcionales; esto ha inducido a la búsqueda de materiales que cubran estas expectativas. Una de las fuentes vegetales con gran potencial es la chía (*Salvia hispanica* L.), esta semilla fue uno de los principales componentes de la dieta de sociedades precolombinas (aztecas y mayas). Es una fuente importante de proteína (19– 23%), fibra (30-36%), aceite (32-39%), con elevado contenido de ácidos grasos omega-3 y antioxidantes; no obstante la información sobre la calidad proteínica es pobre. Por lo que el objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar, las proteínas de reserva presentes en la semilla. El contenido de proteína fue de 22.7%. Las albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas fueron extraídas secuencialmente de acuerdo a la solubilidad. Las globulinas constituyeron el 52% de las proteínas totales, representando la fracción mayoritaria. La caracterización térmica de las fracciones mostro que las albúminas (103.6 °C) y globulinas (104.7 °C) poseen mejor estabilidad con temperaturas de desnaturalización altas, seguidas por las glutelinas (92.2 °C) y las prolaminas (86.3 °C) con valores menores. Los resultados obtenidos de la determinación del coeficiente de sedimentación de las globulinas nos revelaron la presencia de globulinas 11S y 7S. El patrón electroforético de las globulinas comprobó que esta fracción en particular tiene alguna relación estructural con globulinas 11S, ya que en condiciones nativas se observó una banda correspondiente de 383 kDa la cual se resolvió mediante SDS-PAGE (-βME) en una subunidad principal de 55 kDa, y ésta en condiciones reductoras se resolvió en dos bandas de 34 y 23 kDa, las cuales representan la subunidad ácida y básica de la proteína 11S. Estos últimos datos se confirmaron mediante la identificación de péptidos utilizando espectrometría de masas. La proteína mayoritaria 11S se logró aislar mediante electroelución. Finalmente se llevó a cabo una evaluación nutrimental básica, encontrándose que las semillas y las globulinas poseen un buen balance de aminoácidos, además de poseer niveles altos de digestibilidad *in vitro*.

(Palabras clave: chía, *Salvia hispanica*, proteínas, globulinas 11S)

## Summary

Current trends of the society indicate a strong consumer interest in certain foods which provide health benefits for the body. The changes in dietary patterns have led to a new area of development in food science known as nutraceuticals or functional foods, and this has prompted the search for materials that meet these expectations. Chia (*Salvia hispanica* L.) is a plant source with great potential; this seed was one of the main components of the diet of pre-Columbian societies (Aztecs and Mayans). Also is an important source of protein (19 - 23%), fiber (30-36%), oil (32-39%) with high content of omega-3 fatty acids and antioxidants, however, the information on the protein quality is poor. Because of that, the aim of this study was to isolate and characterize the storage proteins present in the seed. The total protein content was 22.7%. Albumin, globulins, prolamins and glutelins were extracted sequentially according to solubility. Globulins constituted 52% of total protein, representing the major fraction. Thermal characterization of the fractions showed that the albumins (103.6 °C) and globulins (104.7 °C) have better stability with high denaturation temperatures, followed by glutelins (92.2 °C) and prolamins (86.3 °C) with minor values; thermal stability higher than all other cereal proteins. The results of the determination of sedimentation coefficient of globulins revealed the presence of globulins 11S (the main component) and 7S. In the electrophoretic pattern of globulin fraction was found that in particular this fraction has a structural relationship with 11S globulin, because it was observed under native conditions a corresponding band of 383 kDa which was resolved by SDS-PAGE (-βME) in a major subunit 55 kDa; and in under reducing conditions it was resolved in two bands of 34 and 23 kDa, which represent the acidic and basic subunits of 11S protein. These data were confirmed by identification of peptides using mass spectrometry. The major protein 11S was isolated by electroelution. Finally, we conducted a basic nutritional assessment, finding that the seeds and globulins have a good balance of amino acids with a higher proportion of the essential ones than other protein seeds; in addition to having high levels of *in vitro* digestibility.

**Keywords:** chía, *Salvia hispanica*, proteins, globulin 11S.

*A mis padres, mi más grande amor, mis guías,  
consejeros y amigos. Este es un logro más que también  
les pertenece, gracias por ser mi mayor ejemplo de  
perseverancia, constancia y fortaleza, porque sin  
ustedes nada de lo que soy sería. Los amo.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante la realización de este trabajo.

Agradezco al Dr. Octavio Paredes López, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, gracias por la confianza que me brindó al dejarme participar en uno de sus proyectos, así como las enseñanzas y el apoyo en todo momento.

Al comité tutorial por la asesoría y los consejos para la mejora de este trabajo: Dr. Carlos Regalado González, Dra. Alma Leticia Martínez Ayala, Dra. Alejandra Rojas Molina y muy en especial a mi Co-directora de tesis Dra. María Elena Valverde González por su constante apoyo y entusiasmo a lo largo de este proyecto.

A lo más importante en mi vida, mi Familia, por su amor incondicional, por siempre estar presente y creer en mí, gracias por el esfuerzo de cada día para apoyarme, aconsejarme y guiarme.

A mis compañeros de Laboratorio en CINVESTAV Irapuato: Paola, Tania, Argel y Talía, por estar siempre presentes y dispuestos para compartir técnicas, consejos, alegrías y tristezas. Fue un gusto conocerlos y trabajar con todos ustedes, gracias por hacer de mi estadía en CINVESTAV un grato recuerdo.

A Dios, por permitirme vivir día a día, por todas las bendiciones y oportunidades que ha dejado en mi camino a lo largo de mi carrera y por darme fuerza para cumplir esta meta.

## ÍNDICE

	Página
Resumen	II
Summary	III
Dedicatoria	IV
Agradecimientos	V
Índice	VI
Índice de Cuadros	IX
Índice de Figuras	X
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
2.1. Chía ( <i>Salvia hispanica</i> )	3
2.1.1. Antecedentes históricos	3
2.1.2. Datos del cultivo	5
2.1.3. Descripción de la planta	6
2.1.4. Importancia de la semilla	6
2.2. Proteínas	10
2.2.1. Proteínas de semilla	11
2.2.2. Proteínas de reserva	11
2.2.2.1. Prolaminas	13
2.2.2.2. Glutelinas	16
2.2.2.3. Albúminas	16
2.2.2.4. Globulinas	17
2.2.2.4.1. Globulinas 7S	19
2.2.2.4.2. Globulinas 11S	20
2.2.2.4.3. Relación estructural 7S-11S	22
2.2.3. Propiedades funcionales de las proteínas	23

2.2.4. Caracterización de proteínas	26
2.2.5. Proteómica	27
2.2.6. Importancia del estudio de las proteínas	29
III. JUSTIFICACIÓN	30
IV. OBJETIVOS	31
4.1. Objetivo General	31
4.2. Objetivos Específicos	31
V. METODOLOGÍA	32
5.1. Lugar donde se desarrolló el proyecto	32
5.2. Materiales biológicos	32
5.3. Métodos	32
5.3.1. Esquema general de trabajo	32
5.3.2. Análisis Proximal	34
5.3.3. Eliminación de mucílago	34
5.3.4. Obtención de harina	34
5.3.5. Fraccionamiento de las proteínas de reserva	35
5.3.6. Cuantificación proteínica	36
5.3.6.1. Método del ácido bicinconínico (BSA)	36
5.3.6.2. Análisis Kjeldahl	36
5.3.7. Calorimetría diferencial de barrido	37
5.3.8. Ultracentrifugación	37
5.3.9. Caracterización bioquímica	38
5.3.9.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida	38
5.3.9.1.1. Electroforesis nativa	38
5.3.9.1.2. Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)	38
5.3.9.1.3. Electroforesis tris-tricina	39
5.3.9.1.4. Electroforesis bidimensional	39
5.3.10. Identificación de proteínas	40

5.3.10.1.	Análisis de péptidos por MS/MS	40
5.3.10.2.	Análisis bioinformático de secuencias	40
5.3.11.	Purificación	41
5.3.11.1.	Filtración en gel	41
5.3.11.2.	Electroelución	41
5.3.12.	Evaluación nutrimental	42
5.3.12.1.	Análisis de aminoácidos	42
5.3.12.2.	Calificación química	42
5.3.12.3.	Digestibilidad <i>in vitro</i>	43
5.3.13.	Análisis estadístico	43
VI.	RESULTADOS	44
6.1.	Análisis Proximal	44
6.2.	Eliminación de mucílago	46
6.3.	Fraccionamiento de las proteínas de reserva	48
6.4.	Cuantificación proteínica	48
6.4.1.	Método del ácido bicinconínico (BCA)	48
6.4.2.	Análisis Kjeldahl	50
6.5.	Calorimetría diferencial de barrido	52
6.6.	Caracterización bioquímica de las fracciones de Osborne	56
6.6.1.	Electroforesis SDS-PAGE	56
6.7.	Caracterización bioquímica de las globulinas de chíá	58
6.7.1.	Determinación del coeficiente de sedimentación	58
6.7.2.	Electroforesis	60
6.7.2.1.	Electroforesis nativa	60
6.7.2.2.	Electroforesis desnaturizante	62
6.7.2.3.	Electroforesis bidimensional	64
6.7.3.	Identificación de proteínas	66
6.7.4.	Purificación de la proteína 11S	70

6.7.4.1. Filtración en gel	70
6.7.4.2. Electroelución	72
6.8. Evaluación nutrimental	74
6.8.1. Análisis de aminoácidos	74
6.8.2. Calificación nutritiva	76
6.8.3. Digestibilidad <i>in vitro</i>	79
VII. CONCLUSIONES	82
VIII. PERSPECTIVAS	85
IX. LITERATURA CITADA	86

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Pág.</b>
<b>1</b>	Clasificación de proteínas de reserva basada en criterios genéticos y moleculares	14
<b>2</b>	Composición proximal de semilla de chía	45
<b>3</b>	Comparación de métodos para retirar mucílago	47
<b>4</b>	Cuantificación proteínica de las fracciones de Osborne	49
<b>5</b>	Porcentaje de las fracciones de Osborne en semilla de chía	51
<b>6</b>	Caracterización térmica de las fracciones proteínicas de semilla de chía	55
<b>7</b>	Identificación de globulinas de semilla de chía mediante LC-MS/MS	69
<b>8</b>	Perfil de aminoácidos de globulinas y semilla de chía	75
<b>9</b>	Calificación nutritiva de semilla de chía en base al patrón de requerimiento de aminoácidos establecido por la FAO (2007) para grupos de diferentes edades	77
<b>10</b>	Calificación nutritiva de globulinas de chía en base al patrón de requerimiento de aminoácidos establecido por la FAO (2007) para grupos de diferentes edades	78
<b>11</b>	Digestibilidad <i>in vitro</i> de globulinas y harina de chía	80

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Pág.</b>
1	Dispersión del cultivo de chía	4
2	Chía ( <i>Salvia hispanica</i> L.)	7
3	Relación estructural entre globulinas 7S-11S	24
4	Esquema de la metodología del proyecto	33
5	Curva estándar de BSA para determinar concentración de proteína	49
6	Termogramas de las fracciones proteínicas de semilla de chía	54
7	Perfil electroforético de las fracciones de Osborne	57
8	Grafico del coeficiente de sedimentación de globulinas de semilla de chía Vs concentración de proteína	59
9	Perfil electroforético de globulinas de chía en condiciones nativas	61
10	Perfil electroforético de globulinas de chía en condiciones desnaturalizantes	63
11	Análisis bidimensional (2-DE) de la fracción globulinas de semilla de chía	65
12	Perfil electroforético de globulinas de chía mediante la técnica tris-tricina	67
13	Perfil de elución de filtración en gel (Sephacryl S-400) de globulinas de chía	71
14	Perfil electroforético de las fracciones colectadas de la cromatografía por filtración en gel de las globulinas de chía	71
15	Perfil electroforético de la purificación de la globulina 11S mediante electroelución	73



## I. INTRODUCCIÓN

La chía (*Salvia hispanica* L.) es una planta anual de verano, considerada uno de los principales cultivos de las sociedades precolombinas de la región, superado sólo por el maíz y el frijol. Por las virtudes que posee fue durante mucho tiempo un elemento básico en la dieta de los Aztecas y Mayas, pero los españoles la persiguieron hasta casi la extinción por considerársela sacrílega (Bueno *et al.*, 2010); logrando que con el paso del tiempo cayera en el olvido (Beltrán-Orozco *et al.*, 2005). Fue hasta finales del siglo pasado que el interés por la chía resurgió, principalmente porque se le considera buena fuente de ácidos grasos omega-3, fibra dietaria, proteína, antioxidantes y además el mucílago de la semilla resulta útil como aditivo alimenticio, entre otras características (Bushway *et al.*, 1981). La ciencia moderna ha llegado a la conclusión de que las dietas precolombinas eran superiores a las actualmente consumidas y la chía, que sobrevivió sólo en pequeñas parcelas en áreas montañosas del sur de México, Guatemala y Nicaragua, vuelve quinientos años más tarde a recobrar un papel protagónico en la nutrición humana (Beltrán-Orozco *et al.*, 2005); principalmente como alimento funcional por la cantidad de compuestos y propiedades benéficas que contiene. Cabe destacar que actualmente *S. hispanica* se encuentra ampliamente distribuida en México, presenta gran diversidad genética y amplio valor alimenticio e industrial, lo que la convierte en un recurso vegetal promisorio, con gran potencial para integrarse a los mercados alimenticios e industriales; lo que generará una excelente oportunidad para crear industrias agrícolas totalmente capaces de ofrecer al mundo un “cultivo nuevo y antiguo a la vez” (Ayerza y Coates, 2010).

La cantidad de trabajos científicos acerca de las ventajas nutricionales de la chía están creciendo rápidamente alrededor del mundo. Se le utiliza como ingrediente para hacer pan, barras energéticas, suplementos dietéticos y en la elaboración de dietas para animales, entre otros usos (Ayerza y Coates, 2005; Muñoz *et al.*, 2012).

En cuanto a la calidad proteica de la semilla de chía es muy poco lo que se conoce ya que los estudios realizados son muy escasos; sin embargo, se sabe

que contiene mayor cantidad de proteínas y mejor balance de aminoácidos que los granos usados tradicionalmente en México, como maíz, trigo y arroz (Ayerza, 2000; Monroy-Torres, 2008). Este dato es de suma importancia ya que, debido al incremento en la población, los científicos se han dado a la tarea de buscar fuentes alternativas de proteínas de alta calidad para la elaboración de concentrados proteicos y fracciones ricas en proteínas. Se estima que en países subdesarrollados lo vegetales son y seguirán siendo la fuente principal de proteínas, por lo que existe la necesidad de incrementar la producción agrícola de cultivos que sean capaces de suministrar a la población una ingesta balanceada y adecuada de nutrientes (Paredes-López *et al.*, 1985).

Las proteínas vegetales pueden fraccionarse de acuerdo a la solubilidad en albúminas, globulinas, glutelinas y prolaminas (Osborne, 1907). Se ha encontrado que dependiendo de la proporción en la que se encuentre cada una de las fracciones proteínicas en la semilla, así será la calidad nutrimental de la proteína total; así como las características fisicoquímicas y funcionales (Chan *et al.*, 1994; Nikokyris y Kandyliis, 1997). La caracterización bioquímica de las semillas permite investigar fuentes alternativas de proteínas, que tengan un buen balance nutricional y puedan ser de utilidad para la industria alimentaria; dichas caracterizaciones generalmente tienen amplias aplicaciones y alternativas de utilización en la alimentación, como mejorar la nutrición humana; o bien, como aditivos, espesantes u otros. La realización de este tipo de estudios fomenta el desarrollo de tecnologías para el aprovechamiento de proteínas vegetales (Muñoz *et al.*, 2012).

Con base en lo anteriormente expuesto, es necesario efectuar trabajos en los que se genere un conocimiento más amplio y preciso acerca de las características bioquímicas y nutrimentales de las proteínas de reserva de chía (*Salvia hispanica*); así como propiedades aún desconocidas; Para lo cual es fundamental el aislamiento y caracterización de las proteínas de almacenamiento que contiene la semilla, para obtener mayores beneficios y mejor aprovechamiento de la chía.

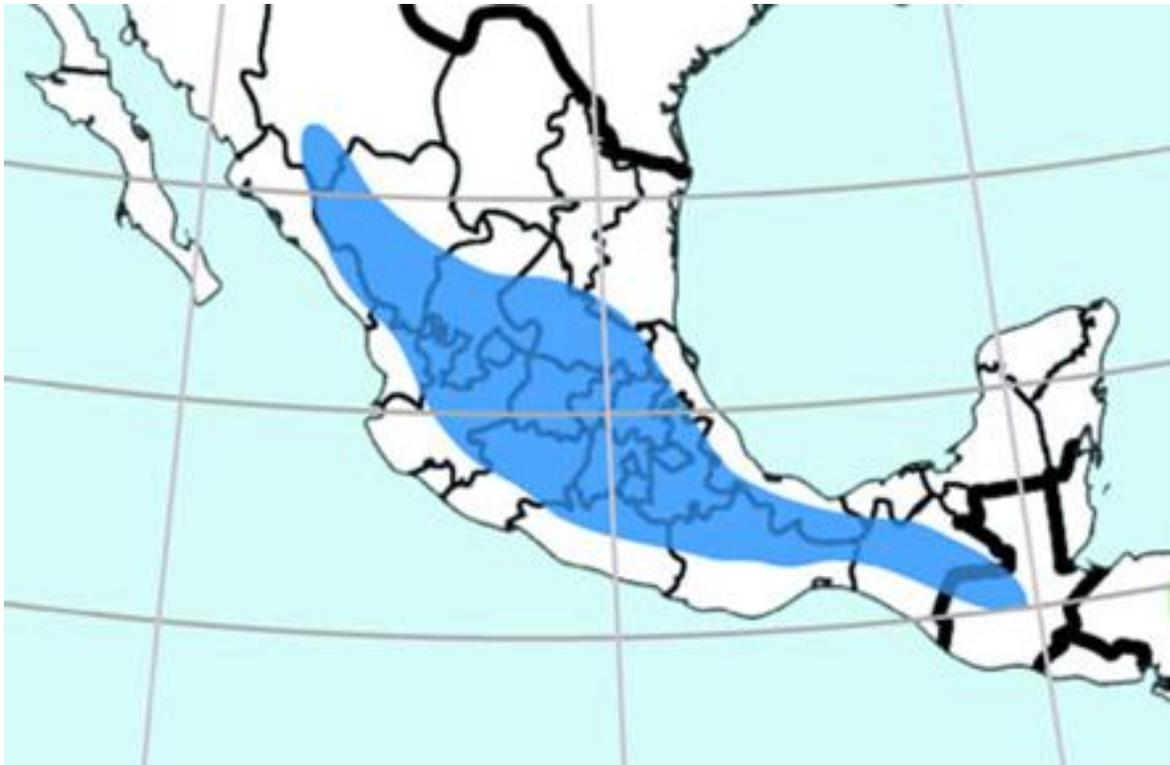
## II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 2.1. Chía (*Salvia hispanica* L.)

La chía es un cereal que pertenece a la familia *Labiatae* que comprende aproximadamente 512 especies en todo el país (Hernández, 1994). Destacan dos géneros: *Hyptis* y por supuesto *Salvia*, de esta última sobresale *Salvia hispanica* L. que es la variedad comercial en el país (Domínguez-Vázquez *et al.*, 2002). Es originaria de Mesoamérica y la mayor diversidad genética se presenta en la vertiente del Océano Pacífico, desde el centro de México hasta el norte de Guatemala (**Figura 1**). En México se encuentra el 88% de las especies de *Salvia*, lo que hace presumir que es el centro de origen de esta planta. (Miranda, 1978; Cahill, 2004).

#### 2.1.1. Antecedentes históricos

La palabra chía viene del Náhuatl, lenguaje de los aztecas, cuyo significado es “aceitoso”. Para los Aztecas y los Mayas fue uno de los cultivos más importantes junto con el maíz, el frijol y el amaranto (Ayerza y Coates, 2005). Las sociedades pre-colombinas la cultivaron en forma rudimentaria hasta lograr la domesticación y el desarrollo de variedades. La semilla era molida para preparar pinole, atole y un aceite llamado chiématl. En el antiguo centro ceremonial de México, Tenochtitlán, se localizaron semillas de chía, por lo que se puede aseverar en un contexto arqueológico que se trata de una prueba fehaciente de la importancia alimenticia y medicinal, entre otras formas de aprovechamiento, que tuvo esta planta en dichas culturas mesoamericanas (Montúfar-López, 2007).



**Figura 1.** Dispersión del cultivo de chíá. El color azul representa el área principal de cultivo de México a Guatemala. (Adaptado de Jamboonsri *et al.*, 2012).

En la época prehispánica fue una planta importante y las semillas, harina o aceite fueron apreciados por los usos medicinales, culinarios, artísticos y religiosos que se le dieron (Cahill, 2003). Era conocida como “el alimento de caminatas” ya que con ella subsistían durante travesías prolongadas. Tiene una larga historia en la interacción planta-humano; se sabe que en Mesoamérica pre-colombina la semilla de chía jugaba un papel importante en la nutrición y uno mayor en la subsistencia, en muchos lugares la semilla de chía eclipsaba al maíz como recurso primario de la dieta (Cahill y Ehdaie, 2005). Era tal la importancia que las semillas se ofrendaban a los Dioses en ceremonias religiosas, fue por eso que tras la conquista los españoles la consideraron cultivo sacrílego y persiguieron el uso hasta prácticamente la extinción, únicamente logro sobrevivir en áreas montañosas escarpadas de México, Guatemala y Nicaragua (Beltrán-Orozco *et al.*, 2005; Bueno *et al.*, 2010).

### 2.1.2. Datos del cultivo

El género *Salvia* es el más diverso de la familia Lamiaceae, con cerca de 1000 especies distribuidas alrededor del mundo (Wester y Claben-Bockhoff, 2007). México es considerado como una de las áreas con mayor diversidad del género (Walker *et al.*, 2004), con aproximadamente 300 especies, de las cuales el 88% son endémicas, *Salvia hispanica* es la especie más abundante. Se encuentra en áreas de bosque de encino o de pino-encino y se distribuye en ambientes semicálidos y templados. La planta se adapta a suelos arcillosos y arenosos que estén bien drenados; sin embargo, bajos niveles de nitrógeno puede constituir una barrera significativa para lograr buenos rendimientos. Es una planta de día corto y no tolera las heladas (Ixtania *et al.*, 2008). Se cosecha en algunos estados de México como: Colima, Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla y Guerrero (Beltrán y Romero, 2003) (**Figura 1**). Actualmente la chía se cultiva a nivel mundial en Argentina, México, Guatemala, Ecuador y Bolivia en temporada de verano-otoño,

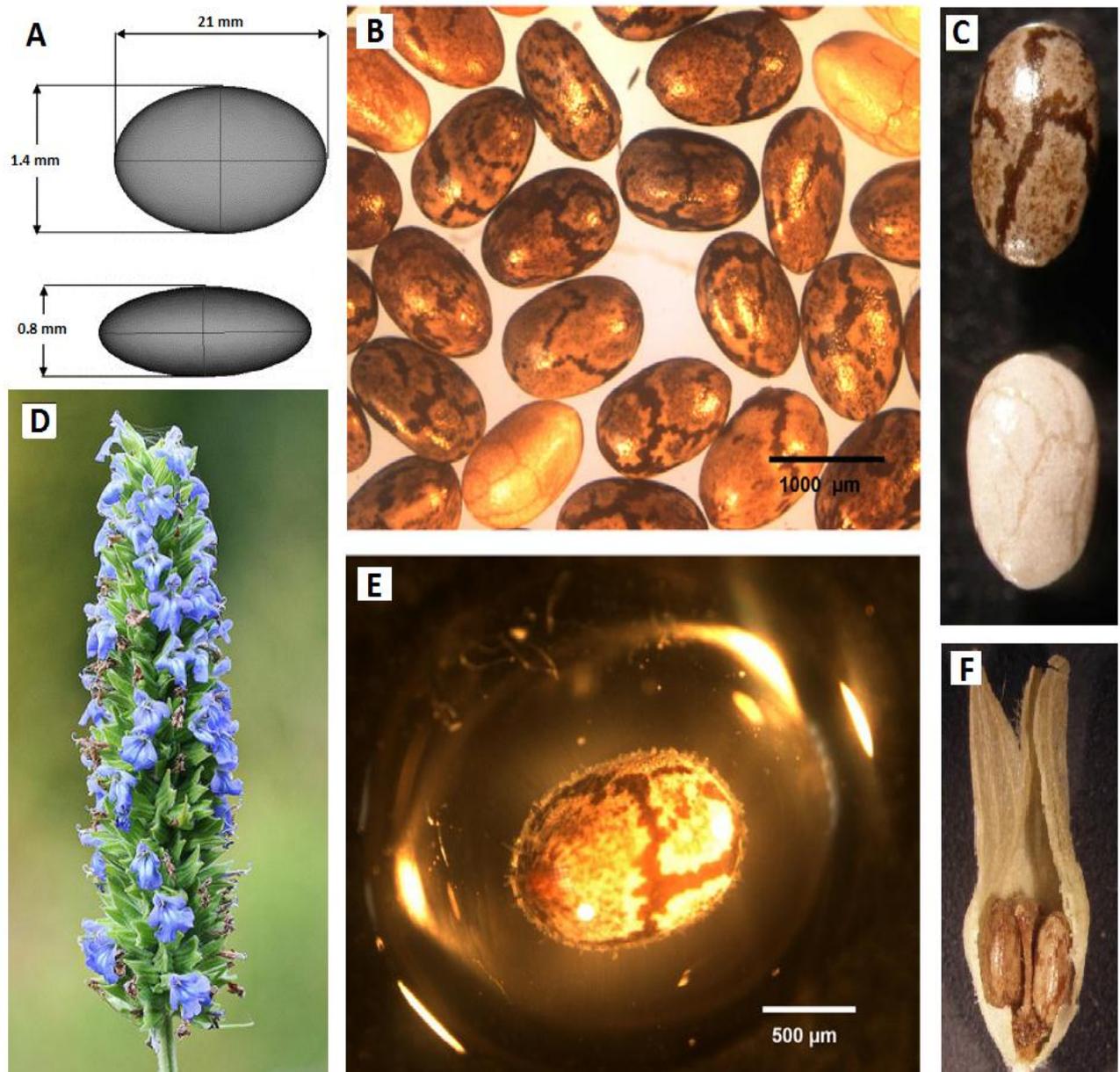
del cual se obtienen hasta 3000 kg de semilla por hectárea (Ayerza y Coates, 2005; Dubois *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de las sobresalientes características de la semilla de chía, son pocos los estudios que ofrecen información actualizada de su producción y distribución en el mundo.

### **2.1.3. Descripción de la planta**

La chía es una planta herbácea, anual, ampliamente distribuida en regiones cálidas y templadas, mide alrededor de 1 a 1.50 metros de altura. Esta planta se caracteriza por presentar tallos cuadrangulares, acanalados y vellosos; hojas opuestas, pecioladas y aserradas, así como flores pediceladas reunidas en grupos de seis o más, parecido a espigas axilares o terminales (**Figura 2C**). Cada fruto lleva cuatro semillas muy pequeñas en forma oval (**Figura 2F**), cuyas dimensiones oscilan entre 21 mm de largo por 1.4 mm de ancho y espesor de 0.8 mm (**Figura 2A**), son lisas, brillantes, de color grisáceo con manchas rojizas irregulares (**Figura 2B**). Las flores son hermafroditas y el color puede ser morado, azul o blanco. Aunque no existe información sobre la herencia del color de la flor en esta especie, en otras especies vegetales se señala que el color de la flor se debe a la acción de un par de genes alelomórficos (Hernández-Gómez *et al.*, 2008; Di Sapio *et al.*, 2012), el color morado o púrpura es completamente dominante sobre el blanco, por lo que en la mayor parte de las variedades las flores son azules (**Figura 2D**). En la chía blanca las flores, así como las semillas son blancas (**Figura 2C**). (Hernández y Miranda, 2008).

### **2.1.4. Importancia de la semilla de chía**

Hoy en día, la semilla de chía es una fuente potencial de nutrientes para las industrias de alimentación humana y animal. Aunque la chía no es un alimento muy conocido, la producción mundial está aumentando debido a sus propiedades;



**Figura 2.** Chía (*Salvia hispanica* L.). A) Dimensiones de la semilla, B) Semilla entera seca, C) Semilla entera blanca y negra, D) Flor, E) Semilla entera hidratada rodeada por una capsula de mucilago F) Semillas incluidas en el cáliz. (Adaptado de Ixtania *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2012 y Di Sapio *et al.*, 2012).

se le conoce como alimento exótico y se le atribuyen cualidades nutricionales y terapéuticas excepcionales. Actualmente, la semilla entera se usa en la preparación de bebidas nutritivas y refrescantes, con el aceite e se elaboran lacas artesanales y en algunos lugares como El Salvador se emplea como tratamiento de enfermedades del hígado (Calderón, 1941). Además, se han comprobado efectos y beneficios en la reducción de tumores como el de mama o el de colon; también en enfermedades que afectan al sistema cardiovascular, es decir al corazón, al cerebro y los vasos sanguíneos (Poudyal *et al.*, 2012).

En años recientes las investigaciones sobre la chía han cobrado relevancia al descubrirse que posee mayor contenido de aceite que otros granos (aproximadamente el 40% del peso total de la semilla), por lo que, es un de alimento muy atractivo para países en desarrollo (Weber *et al.*, 1991). En ese sentido, se han realizados un buen número de estudios sobre la composición de ácidos grasos del aceite y se encontró que la semilla de chía es la fuente natural más rica en ácidos grasos omega-3 (60% del contenido total de aceite); esenciales en la alimentación y efectivos para disminuir afecciones cardiovasculares, colesterol y triglicéridos (Dubois *et al.*, 2007; Ixtaina *et al.*, 2011). También se ha ensayado la inclusión de semillas de chía en alimentación animal; demostrando que los ácidos grasos saturados y el colesterol presentes en el huevo se reducen cuando se adiciona la semilla en la dieta de gallinas, sin afectar el sabor del producto (Ayerza y Coates, 2001). Por otra parte, los aceites esenciales también pueden usarse en la industria de saborizantes y fragancias (Ahmed *et al.*, 1994).

Los antioxidantes naturales del aceite evitan los procesos oxidativos en alimentos (Taga *et al.*, 1984). El aceite obtenido de la semilla de chía no contiene ni produce olor desagradable, como ocurre de forma convencional cuando se aumenta el contenido de ácidos grasos con dos y tres insaturaciones (Ayerza y Coates, 2001); por lo que los productos obtenidos con la semilla de chía no necesitan empaque, ni condiciones de almacenamiento especiales para prevenir cambios ocasionados por el medio ambiente. Los antioxidantes naturales (miricetina, quercetina, kaemperol, ácido clorogénico y ácido cafeíco) que contiene

sustituyen el uso de estabilizadores artificiales (Brown y Coates, 2001; Reyes-Caudillo *et al.*, 2008; Ixtania *et al.*, 2011), además de proteger al consumidor de afecciones cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Por otro lado, se demostró que la chía no contiene compuestos que puedan tener efectos adversos o causar algún tipo de alergia (EFSA, 2005, 2009).

Además, la chía posee un polisacárido con alto contenido de ácido urónico, con una estructura química conformada por una cadena principal de unidades  $\beta$ -xilopiranosil y  $\alpha$ -D-glucopiranosil con ramificaciones de ácido 4-O-metil glucopiranosilurónico (Lin *et al.*, 1994) que se comporta como mucílago con una alta capacidad de retención de agua, útil como fibra soluble y dietética (**Figura 1D**) (Bushway *et al.*, 1984). El mucílago ayuda a conseguir sensación de saciedad, por lo que se puede utilizar para controlar el apetito y debido a que posee alto contenido de fibra, es una buena alternativa para el tratamiento del colon irritable y el mejoramiento del tránsito intestinal, lo que ayuda a prevenir obesidad, cáncer de colon; así como, elevados niveles de colesterol y glucosa en sangre (Almeida, 1997; Singh *et al.*, 2008; Vázquez-Ovando *et al.*, 2009). Aunado a esto, las semillas de chía no contienen gluten, favoreciendo el consumo de pacientes celíacos. De tal forma, esta semilla o cualquiera de los derivados de ésta, son ideales para enriquecer una gran diversidad de productos, gracias a la composición química y el valor nutricional que posee, confiriéndole gran potencial dentro de los mercados alimenticios (Beltrán-Orozco y Romero, 2003).

Más allá del excelente perfil lipídico, las semillas de chía contienen mayor cantidad de proteínas y aminoácidos que los granos usados tradicionalmente en México. La semilla de chía tiene un contenido proteico aproximado de 19-23%, mientras que la concentración de proteína en maíz (14%), trigo (14%), arroz (8.5%), avena (15.3%) y cebada (9.2%) es menor; posee también 18 de los 20 aminoácidos esenciales (Ayerza, 2000; Monroy-Torres *et al.*, 2008).

Además de las características nutrimentales que esta semilla tiene, el estudio realizado por Olivos-Lugo *et al* (2010) destacó que posee características fisicoquímicas importantes. La semilla y el aislado proteico tienen buena

capacidad de retención de agua y una excelente capacidad de retención de aceite, lo cual es relevante para usarla como aditivo funcional en la industria de la panificación y en la producción de emulsiones estables. Por otro lado, el mucílago presente en la semilla le confiere la capacidad de formar hidrocoloides, utilizados en la industria alimentaria como agentes espesantes, gelificantes o para el control de la sinéresis (Phillips y Williams, 2000). Dichas características son ideales para otorgar propiedades reológicas deseables a los alimentos.

En la actualidad la tendencia de los consumidores al elegir productos alimenticios está más asociada a la salud y al bienestar. Esta situación puede verse claramente en el supermercado con el suministro de productos que se distinguen por el alto contenido de ácidos grasos omega-3, antioxidantes, fibra dietaria, proteína y otros componentes que los consumidores reconocen como buenos para la salud (Martínez *et al.*, 2012). Las características mencionadas han incrementado el interés comercial por *Salvia hispanica*, la que se ha introducido a varios países como cultivo promisorio (Coates y Ayerza, 1996) y actualmente en Latinoamérica, Estados Unidos y Australia se han industrializado diferentes productos alimenticios y medicinales preparados con semilla de chía como; barras, cereales para desayuno y galletas (Muñoz *et al.*, 2012).

## **2.2. Proteínas**

Las proteínas son biomoléculas formadas de cadenas largas de aminoácidos, (Smith y Smith, 1992) que pueden constituir 50% o más del peso seco de las células vivas. Desempeñan una enorme variedad de funciones por lo que se les han dado diversas clasificaciones arbitrarias, una de ellas incluye estas tres categorías principales: estructurales, con actividad biológica y metabólicas (Dávila-Ortiz, 1996). En el cuerpo humano existen alrededor de 5,000,000 de proteínas diferentes, constituyen las fibras musculares, el colágeno, pelo, uñas, enzimas, anticuerpos y diversas hormonas; sin embargo, el hombre sólo puede

utilizar el nitrógeno orgánico de proteínas animales y vegetales. Los animales requieren de un consumo directo de proteínas, a diferencia de los vegetales que pueden sintetizarlas a partir de moléculas sencillas, como nitrógeno inorgánico, agua y CO<sub>2</sub> (Badui, 1990). Son la principal fuente exógena de aminoácidos por lo que las proteínas cuyos contenidos de aminoácidos se aproximan al punto óptimo de satisfacción de las necesidades animales, son consideradas de alta calidad. Por lo tanto, la calidad está en función del valor nutricional de una proteína y esté a su vez está definido por el contenido, disponibilidad y balance de aminoácidos esenciales (Aufrère *et al.*, 1992).

En este contexto, las proteínas de origen vegetal presentan ciertas ventajas en comparación con las proteínas de origen animal, por ejemplo el bajo costo de producción, se pueden almacenar durante largos periodos y son fáciles de manejar y transportar (Segura-Nieto *et al.*, 1999). Por otro lado, en términos de balance de aminoácidos esenciales las proteínas de origen animal poseen generalmente mejor calidad nutricional; sin embargo, económicamente son inaccesibles para la mayoría de la población en países en vías de desarrollo, donde los alimentos de origen vegetal presentan la fuente más importante de proteína, principalmente a través del consumo de granos de cereales y leguminosas (Mandal y Mandal, 2000).

### **2.2.1. Proteínas de semilla**

Las semillas son de vital importancia para el hombre ya que, son el principal órgano de propagación y dispersión de las plantas, además de ser uno de los tejidos más cosechados y utilizados directa e indirectamente en la alimentación humana y animal. La importancia de las semillas se debe en gran parte, a la calidad nutritiva aportada por la presencia de proteínas que se acumulan dentro de ellas, dichas proteínas poseen elevado valor alimenticio, tanto que en ocasiones logran sustituir a las proteínas de origen animal (Higgins, 1994; Herman y Larkins, 1999; Gruís *et al.*, 2004; Peralta, 2004).

Las proteínas de las semillas se encuentran en una capa conocida como aleurona y en los cotiledones, se pueden clasificar en tres categorías. 1) proteínas estructurales y metabólicas, necesarias para el crecimiento y desarrollo normal de la planta; 2) proteínas de protección, protegen a la semilla contra diferentes tipos de daño biótico y abiótico y 3) proteínas de reserva, que sirven como almacén de aminoácidos y son metabolizadas durante la germinación para fungir como fuente de nitrógeno, carbono y azufre para las etapas iniciales del desarrollo de la nueva plántula (Casey y Domoney, 1984; Shewry, 2002). Por lo anterior, y dado que las proteínas de reserva generalmente constituyen una gran proporción del total de proteína en semilla, la bioquímica y los mecanismos fisiológicos que regulan la síntesis son de gran interés, tanto práctico como básico.

### **2.2.2. Proteínas de reserva**

Las proteínas de reserva son especialmente importantes en alimentación humana debido a que determinan el contenido de proteína total en las semillas, así como también la calidad nutricional y las propiedades funcionales de los alimentos derivados de estos granos (Argos *et al.*, 1985). La cantidad de proteínas en semillas varía desde un 10% del peso seco en cereales hasta un 40% en leguminosas y oleaginosas (Shewry y Harlfod, 2002). Las proteínas de reserva llegan a representar hasta el 60% del total de proteínas en semillas de soya (Mooney y Thelen, 2004). Se sintetizan y acumulan durante la etapa media del desarrollo del grano y se almacenan en grandes cantidades en forma de agregados subcelulares llamados “cuerpos proteicos” hasta que se hidrolizan durante la maduración, imbibición y germinación de la semilla. Estas proteínas son la principal fuente de nitrógeno y energía para las semillas y el fruto durante el crecimiento reproductivo y la rápida expansión de las estructuras vegetativas después del periodo de dormancia y durante la germinación (Casey y Domoney, 1984).

Debido a la abundancia, importancia económica y alimentaria, las proteínas de reserva fueron las primeras que se estudiaron en semillas y Osborne (1907) las clasificó en cuatro grupos en base a la solubilidad en diferentes agentes extractantes: albúminas, solubles en agua; globulinas, solubles en soluciones salinas (NaCl); prolaminas, solubles en soluciones alcohólicas; y glutelinas, que únicamente se solubilizan en condiciones severas. Esta clasificación debido a la simplicidad es la mayormente utilizada en la actualidad.

Fukushima (1991) por otro lado, propuso otra clasificación basada en criterios genéticos y moleculares. Utilizó la estructura genética, homologías de la estructura primaria y la forma de acumulación dentro de la semilla (**Cuadro 1**). Por lo que, ahora es posible estudiar estas proteínas dividiéndolas solamente en dos grandes grupos: prolaminas, que engloba a las albúminas y globulinas que incluye a las glutelinas. Aunque las glutelinas y las globulinas tienen patrones distintos de solubilidad, las secuencias primarias tienen una identidad del 32 al 37%, ambas se sintetizan a partir de un precursor grande y se procesan proteolíticamente en un polipéptido ácido y otro básico; además, se acumulan y almacenan en vacuolas (Katsube *et al.*, 1999).

#### **2.2.2.1. Prolaminas**

Con excepción de avena y arroz, la principal proteína de reserva almacenada en el endospermo del grano de todos los cereales son prolaminas. Es la fracción proteínica soluble en un rango que va desde el 50 hasta el 90% de etanol. Estas proteínas poseen grandes cantidades de prolina y ácido glutámico; es la principal fracción de proteínas de reserva de cereales como maíz y trigo, mientras que en arroz la principal fracción son las glutelinas (Lásztity, 1984; Shewry *et al.*, 1984; Fukushima, 1991; Moya *et al.*, 2002). Los análisis electroforéticos, ya sea en forma nativa o después de la reducción de los enlaces

**Cuadro 1.** Clasificación de proteínas de reserva basada en criterios genéticos y moleculares.

<b>Criterio</b>	<b>Globulinas</b>	<b>Prolaminas</b>
<b>Mecanismos de acumulación</b>	Vacuola	Directa
<b>Estructura genética</b>	Con intrones	Sin intrones
<b>Secuencia de aminoácidos</b>	Sin estructuras repetidas	Con estructuras repetidas

Adaptado de Fukushima (1991).

disulfuro, muestran que la fracción prolaminas es una mezcla compleja de políptidos de aproximadamente 50 componentes, poseen un peso molecular que varía enormemente desde 10 kDa hasta 100 kDa. Son proteínas monoméricas, por lo general ricas en azufre y las de alto peso molecular aparecen como polímeros unidos por puentes disulfuro intermoleculares. Asimismo, la composición de aminoácidos y secuencias específicas son muy variables, por tal motivo ha sido difícil definir propiedades específicas para todas las proteínas pertenecientes a este grupo (Coleman y Larkis, 1999). La estructura de este tipo de proteínas es mucho más variable que la de cualquier otro tipo de proteína de reserva y, aunque se cree que las prolaminas se acumulan en las semillas de la familia *Triticeae* (trigo, cebada, centeno) y al a familia *Panicoideae* (maíz, sorgo, mijo), tienen un origen evolutivo distinto (Sherwry y Harfor, 2002) pues existe una extensa variación entre diferentes cultivares en el número y propiedades electroforéticas (Shewry *et al.*, 1980).

Un estudio reportado por Shewry *et al* (1999) sugiere que la mayoría de las prolaminas muestran muchas de las siguientes propiedades:

- 1) Todas son solubles en diferentes mezclas alcohol/agua, tanto en forma nativa como en subunidades reducidas.
- 2) La mayoría contiene una alta proporción de prolinas, glicinas y uno o más de otros tipos de aminoácidos, de forma mayoritaria (fenilalanina, histidina, cisteína). En la mayoría de los casos, esta composición inusual resulta de la presencia de dominios estructurales y uno o más de ellos representan secuencias aminoacídicas repetidas.
- 3) Todas se depositan en cuerpos proteicos que pueden originarse de vacuolas o segmentos membranosos del retículo endoplásmatico, asociándose para formar matriz continua.
- 4) No tienen otra función que la de servir de reserva de aminoácidos para la germinación y desarrollo inicial de la planta.

La clasificación actual de las prolaminas se basa en las relaciones estructurales, lo que permite tener diferentes grupos y subgrupos. Las prolaminas

más conocidas son las gliadinas de trigo, son monómeros asociados por enlaces hidrógeno e interacciones hidrofóbicas y se clasifican en base a la movilidad electroforética en cuatro grupos:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\omega$ -gliadinas (Lásztity 1984; Shewry *et al.*, 1984). Algunos autores indican que una clasificación más válida se basa en dos grupos: las  $\omega$ -gliadinas, pobres en azufre y las  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -gliadinas, ricas en azufre (Tatham y Shewry, 1985). Forman una red extensa llamada gluten que le confieren propiedades visco-elásticas a la masa, esto permite que se pueda procesar para la elaboración de pan y otros productos alimenticios (Shewry, 2002).

### **2.2.2.2. Glutelinas**

Las glutelinas son más difíciles de definir y de entender, son insolubles en agua, etanol y en soluciones salinas, sólo se solubilizan en medios ácidos (pH 2) o en álcalis (pH 12). Estas proteínas se pueden encontrar en los cereales, tales como la glutenina en el trigo y el oryzenina en el arroz. Se encuentran agregadas en complejos de muy alto peso molecular que aún en presencia de solventes drásticos son difíciles de disolver (Tatham y Shewry, 1985). Se conocen dos grupos principales de subunidades: las de bajo peso molecular y las de alto peso molecular. Las Glutelinas, al igual que las prolaminas, generalmente son las encargadas de las propiedades reológicas, como conferir viscosidad y elasticidad a los alimentos (Herrera *et al.*, 2003).

### **2.2.2.3. Albúminas**

Las albúminas son solubles en soluciones salinas muy diluidas y en agua, fueron definidas como un grupo cuando Youle y Huang (1981) aislaron y caracterizaron fracciones de albúminas 2S de semillas de 12 especies. Una albúmina 2S está constituida de dos subunidades de aproximadamente 30-40 y

60-90 residuos, respectivamente; con dos enlaces disulfuro intercadena y dos enlaces en la subunidad grande. La presencia de metionina en estas proteínas es de gran interés y las que más se han estudiado son las proteínas de la nuez de Brasil (19 metioninas de 101 residuos) y el girasol (16 metioninas de 103 residuos). Poseen en general pesos moleculares inferiores a 100 000, lo que es relativamente bajo.

La función principal de la albúmina 2S es indudablemente de reserva; sin embargo, algunos componentes han mostrado actividad biológica como inhibidores de proteasas y como proteínas de defensa (Svendsen *et al.*, 1994; Genov *et al.*, 1998). A causa de la solubilidad en agua necesitan elevadas concentraciones de sales neutras para precipitar (Klages, 1968). En cereales como el trigo, las albúminas al igual que las globulinas se derivan de residuos citoplasmáticos y de otras fracciones subcelulares que forman parte del grano (Herrera *et al.*, 2003).

#### **2.2.2.4. Globulinas**

Las globulinas son el grupo de proteínas de reserva más ampliamente distribuido en la naturaleza, conforma la mayor parte de las proteínas en ciertos granos, por lo que han sido ampliamente estudiadas, principalmente en leguminosas como chícharo, soya y frijol (Shewry, 1995). Este grupo de proteínas corresponden a la fracción soluble en soluciones salinas, son las proteínas de reserva más abundantes en especies dicotiledóneas, aunque también se encuentran en menor proporción en algunas monocotiledóneas (incluyendo algunos cereales). De modo que representan alrededor del 10% del total de proteínas en semillas de cereales y más del 85% del total de proteínas en semillas de leguminosas (Branlard y Bacel, 2006). Las globulinas son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso, incluyendo la presencia de un péptido señal y transferidas al lumen donde el péptido señal es cortado co-traduccionalmente,

transportadas mediante las vesículas del aparato de Golgi y depositadas en la vacuola de la semilla en desarrollo, donde son empaquetadas en cuerpos proteínicos (Casey *et al.*, 1986).

Las globulinas se clasifican en base al coeficiente de sedimentación en gradiente de sacarosa en: 7S (7S-8S) o tipo-vicilina y 11S (11S-13S) o tipo-legumina (Sherwry, 2002). En las proteínas 11S se forma un enlace disulfuro, seguido por corte del polipéptido con proteasas específicas, mientras que las globulinas 7S son glicosiladas para luego ser ensambladas; ambos grupos de globulinas muestran diferencias en estructura, lo cual es el resultado del procesamiento postraducciona (Casey *et al.*, 1986).

En general, son deficientes en aminoácidos azufrados metionina y cisteína, aunque en el caso de las 11S se observan mayores niveles de éstos (Sherwry *et al.*, 1995). En leguminosas como frijol las globulinas representan hasta el 60% del contenido de proteína total del grano, mientras que en soya representan hasta el 90% (Duranti y Gius, 1997).

En soya, girasol y cacahuate se obtienen globulinas como un subproducto de la extracción del aceite y son comercializadas como aislados proteicos para suplementar algunos alimentos. Los aislados proteicos se usan principalmente como sustitutos de carne porque reducen el contenido de aceite e incrementan los niveles de proteína, además de aminorar los costos de producción (Lambert y Yarwood, 1992; Fukushima, 1994). Salcedo-Chávez *et al* (2002) reportaron la obtención de aislados proteínicos de amaranto mediante precipitación isoeléctrica. Los autores encontraron que tanto el pH de extracción como el de precipitación tienen un efecto importante sobre los atributos de calidad de los aislados obtenidos (contenido de proteína, índice de blancura, entalpía de transición y temperatura de desnaturalización). Mediante la metodología de superficie respuesta se encontró que valores de pH de 8.0 y 9.2 para la etapa de extracción y pH de 5.7 para la precipitación permiten la obtención de aislados con los mejores atributos de calidad, similar a los aislados de soya.

Las globulinas se han empleado recientemente como ingredientes funcionales y nutracéuticos en virtud de la liberación de péptidos biológicamente activos durante la digestión *in vivo*, encontrándose que tienen efectos positivos para la prevención y tratamiento de la hipercolesterolemia e hipertensión (Kawamura, 1997; Marcone y Yada, 1998).

#### **2.2.2.4.1. Globulinas 7S**

Son proteínas triméricas cuyo peso molecular varía de 150 a 190 kDa, están constituidas por subunidades de 40 a 70 kDa que pueden ser iguales o diferentes (el procesamiento proteolítico puede permitir en algunas especies la generación de polipéptidos más pequeños, mientras que el polimorfismo puede resultar de la glicosilación). No pueden formar enlaces disulfuro debido a que las subunidades que las componen carecen de unidades de cisteína. La subunidad básica inicial tiene un peso molecular de 50 kDa pero, debido a un extensivo procesamiento postraducciona del tipo proteolítico y glicolítico, se convierte en subunidades cuyo tamaño varía considerablemente. Por ejemplo, las subunidades de vicilina de chícharo se sintetizan inicialmente como polipéptidos de 47-50 kDa, aunque después del procesamiento postraducciona se convierten en subunidades de 12.3-33 kDa (Casey *et al.*, 1986; 1993). Estas subunidades son difíciles de purificar y caracterizar; a pesar de ello y como resultado de la clonación y análisis molecular de los genes que codifican algunas de ellas se ha logrado deducir el origen y sitios de rompimiento hidrolítico, así como los sitios de glicosilación (Shewry *et al.*, 1999)

La globulina 7S más ampliamente estudiada es la  $\beta$ -conglucina de soya porque es una de las proteínas de reserva más abundantes en la semilla de este cultivo. Es una proteína trimérica compuesta de tres subunidades:  $\alpha$  (~67 kDa),  $\alpha'$  (~71 kDa), y  $\beta$  (~50 kDa) y como característica importante tiene la capacidad de formar homo y heterotrímeros de las mismas subunidades constituyentes, lo cual

genera un perfil variable en el comportamiento fisicoquímico (Maruyama *et al.*, 2004).

La comparación de las estructuras tridimensionales de  $\beta$ -faseolina (Lawrence *et al.*, 1990) y de canavalina (Ko *et al.*, 1993) muestra que la estructura terciaria en ambas es muy similar, donde cada subunidad está compuesta de dos dominios estructuralmente similares: una lámina  $\beta$ -plegada formada de cadenas  $\beta$ -antiparalelas y un anillo de  $\alpha$ -hélices. Las tres subunidades forman trímeros en forma de disco de 90 Å y un grosor de 30 a 40 Å (Lawrence *et al.*, 1994).

#### **2.2.2.4.2. Globulinas 11S**

Son las proteínas de reserva más ampliamente distribuidas, se encuentran en monocotiledóneas (principalmente leguminosas), dicotiledóneas (básicas, cucúrbitas) y en algunos cereales (cebada y arroz) en los tejidos de reserva, tanto de embrión como de endospermo (Shewry *et al.*, 1999). Son oligómeros hexaméricos cuyas subunidades interaccionen por enlaces no covalentes y tienen un peso molecular de 50-60 kDa (Plietz *et al.*, 1986; Wright, 1987). Cada subunidad es sintetizada como una sola cadena de 55 kDa más la secuencia del péptido señal; luego es cortada proteolíticamente para producir una cadena ácida de 30-40 kDa y una básica de 20-25 kDa enlazada por un puente disulfuro (Nielsen *et al.*, 1995). Las cadenas ácidas son generalmente hidrofílicas y las básicas hidrofóbicas y se ha propuesto que los polipéptidos básicos están ocultos en el complejo 11S y los ácidos están expuestos en la superficie (Gueguen y Azanza, 1985; Fukushima, 1991), como es el caso de la globulina 11S de amaranto o amarantina (Barba de la Rosa *et al.*, 1996). Bajo condiciones desnaturalizantes, los hexámeros se pueden disociar en trímeros y posteriormente en monómeros; además, los polipéptidos constituyentes (ácido y básico) de cada subunidad pueden disociarse bajo condiciones reductoras que permite la disociación del enlace disulfuro que los mantiene unidos covalentemente (Tai *et al.*, 1999).

En general, las globulinas 11S están compuestas de diversas clases de subunidades. Un ejemplo característico de heteroexámero es la glicina de soya que está formada de cinco clases de subunidades, grupo I: A<sub>1a</sub>B<sub>1b</sub>, A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub>, A<sub>1b</sub>B<sub>2</sub>, grupo II: A<sub>5</sub>B<sub>4</sub>B<sub>3</sub>. Cada subunidad está compuesta de un polipéptido ácido de masa molecular aproximada de 32 kDa y un polipéptido básico de tamaño aproximado de 20 kDa, ambos unidos por un enlace disulfuro (Staswick *et al.*, 1984; Adachi *et al.*, 2003). Las estructuras moleculares de las globulinas 11S han sido estudiadas mediante microscopía electrónica y se han propuesto algunos modelos para la glicina (Badley *et al.*, 1975; l'Anson *et al.*, 1987), heliantinina (Plietz *et al.*, 1983), cruciferina (Plietz *et al.*, 1986), legumina de chícharo (Miles *et al.*, 1985) y  $\gamma$ -globulina de ajonjolí (Plietz *et al.*, 1987). De los modelos propuestos el que ha sido más aceptado es la estructura de anti prisma trigonal.

En nuestro laboratorio se logró la caracterización de una globulina 11S de amaranto que se denominó amarantina, proteína mayoritaria presente en la semilla, representa cerca del 18.6% de la proteína total del grano y aproximadamente el 90% del total de las globulinas. Es un homoexámero con peso molecular aparente de 300-400 kDa, constituido por seis monómeros idénticos de aproximadamente 59 kDa, cada una con un polipéptido ácido (36 kDa) y un polipéptido básico (22-24 kDa) unidos por un puente disulfuro. Esta proteína ha sido aislada y estudiada a detalle mostrando buenas características funcionales y nutracéuticas, posee alto contenido de aminoácidos esenciales y la subunidad ácida muestra actividad antihipertensiva (Luna-Suarez *et al.*, 2008; 2010). Así como también se logró purificar y cristalizar la amarantina por primera vez, se mejoró su estructura primaria mediante ingeniería de proteínas y se logró producir en organismos como *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*, así como también se consiguió la expresión de la proteína en maíz. Estos estudios nos abren camino sobre las amplias perspectivas de este trabajo (Barba de la Rosa *et al.*, 1992; 1996; Romero-Zepeda y Paredes-López, 1996; Vasco-Méndez *et al.*, 1999; Osuna-Castro *et al.*, 2000; Rascón-Cruz *et al.*, 2004; Medina-Godoy *et al.*, 2004; 2006).

#### 2.2.2.4.3. Relación estructural 7S-11S

Aunque las subunidades de globulinas 7S y 11S prácticamente no tienen similitud de secuencias, alineamientos y predicciones estructurales, se ha encontrado cierta relación en sus estructuras (Lawrence *et al.*, 1994). Argos *et al* (1985) compararon las secuencias de aminoácidos entre globulinas 7S y 11S y considerando las características conformacionales y tendencias de los aminoácidos, concluyeron que las secuencias de ambas proteínas se pueden alinear y comparten características estructurales. Ellos propusieron la estructura de dominios que se presenta en la **Figura 3A**. El dominio D1 (N-terminal) es diferente en ambas globulinas, el dominio D2 (central) tienen una estructura secundaria común en ambas globulinas y el dominio D3 (C-terminal) es altamente conservado e hidrofóbico. Los autores sugirieron que el dominio D3 está oculto, probablemente dentro de la molécula y juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura, la principal diferencia entre las globulinas 7S y 11S es la existencia de una región hipervariable entre los dominios D2 y D3 en las subunidades de globulinas 11S.

Un ejemplo de ello es la comparación entre legumina 11S y vicilina 7S, tales comparaciones indican que el extremo C-terminal de la subunidad básica de las leguminas 11S presenta una alta similitud al extremo C-terminal de la vicilina 7S; además, al hacer análisis de homología entre estas dos proteínas se observó que existen cuatro sitios en la secuencia de las 11S que se pueden alinear con un alto grado de homología a las 7S (Lawrence, 1999).

La similitud en las estructuras de ambos tipos de globulinas presumiblemente podría facilitar el empaquetamiento regular en cuerpos proteicos, debido a esto ambos grupos de proteínas se encuentran juntas en muchas especies. Esto también sugiere que los dos grupos han evolucionado de un ancestro común. La presencia de dos unidades estructuralmente similares en cada subunidad de globulina 7S/11S indica que un dominio ancestral corto pudo

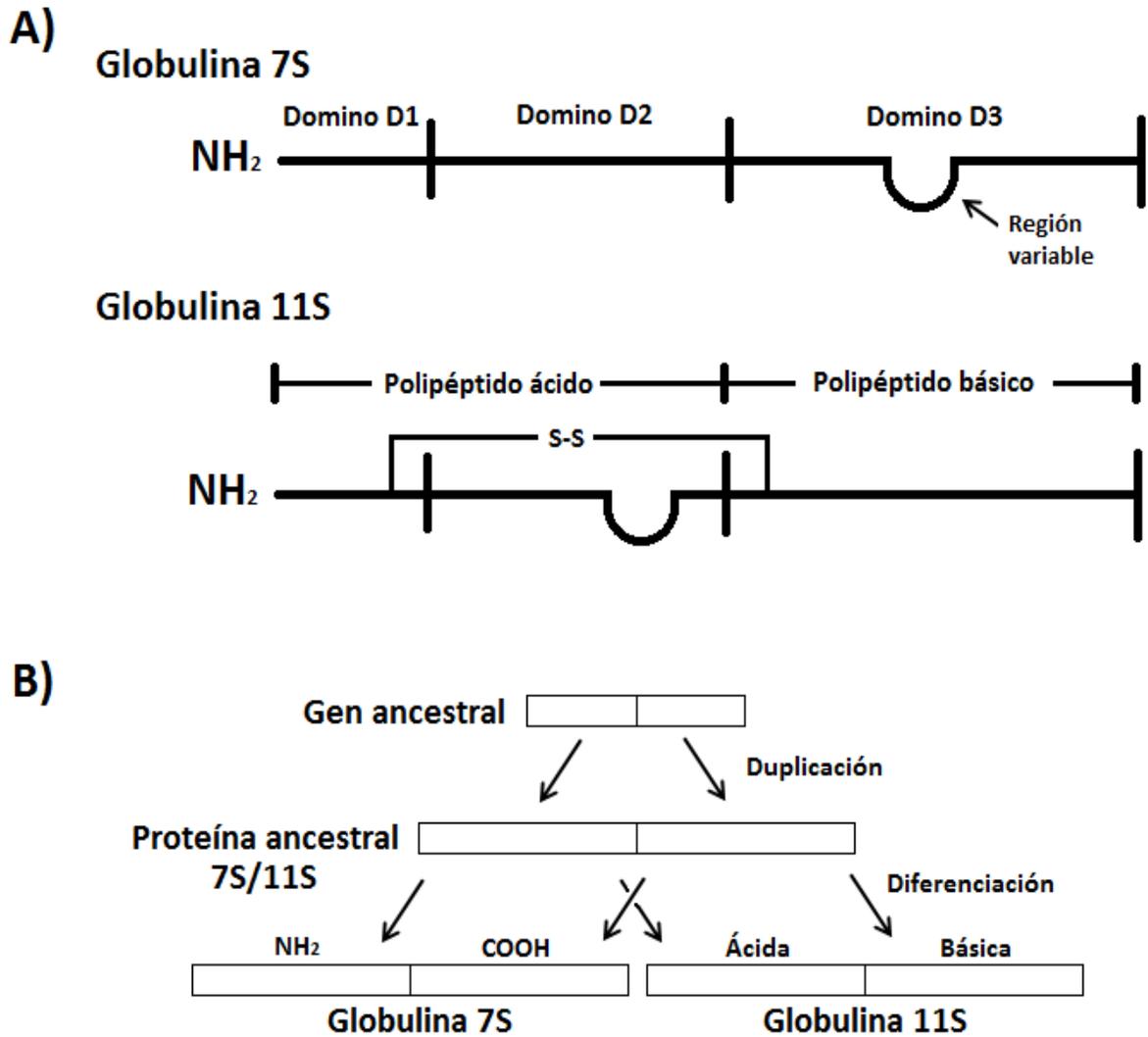
haberse duplicado generando dos dominios que corresponden al 7S N-terminal/11S cadena ácida y 7S C-terminal/11S cadena básica; así, esta proteína ancestral fue entonces duplicada para generar las subunidades ancestrales 7S y 11S como se muestra en la **Figura 3B** (Lawrence, 1999).

### **2.2.3. Propiedades funcionales de las proteínas**

Además del valor nutricional, las proteínas presentan una amplia gama de propiedades funcionales y juegan un papel importante en la expresión de los atributos sensoriales de los alimentos. Estas propiedades funcionales pueden definirse como “aquellas propiedades físicas y químicas que afectan el comportamiento de las proteínas en los alimentos durante el procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo” (Kinsella, 1976; Damodaran, 1989). En particular, las propiedades funcionales de las proteínas pueden clasificarse en tres grupos:

- Dependientes de la interacción proteína-agua.
- Dependientes de las interacciones proteína-proteína.
- De superficie.

Dentro del grupo de las propiedades de hidratación (dependientes de la interacción de proteína-agua) podemos citar: adsorción de agua, absorción de agua, retención de agua, hinchamiento, mojabilidad, solubilidad, dispersabilidad, viscosidad (Pilosof, 2000). Estas propiedades cobrarán importancia de acuerdo al sistema alimentario en estudio. Por otra parte, productos con elevada capacidad de absorción y retención de agua se podrían emplear en embutidos, masas y geles, mientras que productos altamente solubles podrían utilizarse en bebidas y



**Figura 3.** Relación estructural entre globulinas 7S-11S. Modelos propuestos para A) Relación estructural entre las globulinas 7S y 11S; B) Evolución de las globulinas 7S y 11 S a partir de un precursor común.

Argos *et al.*, 1985; Gibbs *et al.*, 1989; Lawrence, 1999.

alimentos espumados o emulsionados. En el segundo grupo se incluyen las propiedades en donde las interacciones proteína-proteína son las más importantes, entre ellas: floculación, coagulación, gelificación y formación de estructuras (fibras, masas, películas, etc.) (Petruccelli, 1993). Los procesos de floculación implican la agregación al azar de proteínas sin cambios estructurales, mientras que las proteínas desnaturalizadas pueden agregarse al azar (coagulación) o de manera ordenada (gelificación). La formación de un gel proteico influye en la calidad de los productos, por ejemplo quesos, yogures, salchichas, etc. Dentro de la formación de estructuras tipo masas se ha estudiado ampliamente la capacidad de panificación de las proteínas de gluten de trigo. También es posible formar estructuras tipo fibras proteicas por extrusión, las que se podrían emplear como extendedores de carne y productos proteicos en botanas. Finalmente, las propiedades de superficie dependen de la capacidad de la proteína de difundir hasta la interfase (agua-aire o agua-aceite) y formar una película estable. A este grupo pertenecen las propiedades espumantes y emulsificantes (Wagner, 2000).

Cabe aclarar que esta clasificación, basada en el tipo de interacción molecular, no implica que se establezca un único tipo de interacción, sino que la misma es predominante para ese grupo de propiedades funcionales (Cheftel, 1989).

En los últimos años ha crecido el interés en la capacidad de las proteínas de formar materiales biodegradables con potenciales aplicaciones en envolturas de alimentos o para la agricultura. En el mercado existen varios alimentos en los que son fundamentales estas propiedades, por ejemplo merengues, mousses, soufflés, bombones, postres, salsas, cremas, aderezos, helados, entre otros.

Como se puede apreciar, la funcionalidad de las proteínas es de gran importancia tecnológica y existe un gran interés por conocer los mecanismos implicados en ella. Para tal fin, es frecuente emplear sistemas modelos sencillos y determinar parámetros que brindan información sobre la capacidad de contribuir a la propiedad de interés. Estas determinaciones no reflejan el comportamiento final

en el alimento, que es una matriz más compleja, pero resultan una primera aproximación, muy importante como paso previo a la formulación de alimentos (Bartholomai y Pilosof, 2000).

Cabe mencionar algunos de los factores más importantes que afectan la funcionalidad de las proteínas: la fuente de la que se extraen, el método empleado para tal objetivo y algunas condiciones del medio ambiente como pH, fuerza iónica, temperatura, etc. (Kinsella, 1984). La importancia de la metodología empleada para la obtención radica en que la mayoría de las veces los tratamientos a los que se somete a las proteínas pueden resultar en la desnaturalización, lo cual modifica por consecuencia las propiedades funcionales (Damodaran, 1997), lo mismo sucede con los tratamientos a los que se someten los alimentos que las contienen.

Tradicionalmente las técnicas como fermentación, germinación e hidrólisis enzimática han sido utilizadas con el objeto de mejorar las propiedades nutritivas de las proteínas vegetales (Mora-Escobedo *et al.*, 1990); mientras que los esfuerzos por mejorar la calidad funcional se han hecho usando métodos químicos (amidación, acetilación, fosforilación); sin embargo, estos tratamientos químicos tienen efectos colaterales que reducen el valor nutritivo o generan contaminantes tóxicos. Actualmente la tendencia del mejoramiento de las propiedades funcionales está enfocada hacia las modificaciones de la estructura primaria mediante la manipulación genética (Ingeniería de Proteínas) (Barba de la Rosa *et al.*, 1996).

#### **2.2.4. Caracterización de proteínas**

Las proteínas están directamente relacionadas con la función; por lo que, la comprensión detallada de éstas es importante para el estudio de células y organismos a nivel molecular (Pandey y Mann, 2000). Para poder comprender y generar información acerca de los procesos químicos en las células y los beneficios nutricionales que los alimentos pueden aportar a nuestro organismo es

preciso aislar, identificar y estudiar las estructuras y las propiedades de las proteínas. El modo de hacerlo es aprovechando las diferencias existentes entre la proteínas, tales como solubilidad, tamaño, masa, carga eléctrica o afinidad por otras moléculas (Mathews, 2002).

El interés por la comprensión del funcionamiento de los organismos ha generado nuevas herramientas de estudio. Todas éstas han logrado una respuesta parcial, en donde algunas pueden complementarse. Las técnicas más utilizadas para el aislamiento y caracterización de proteínas son: electroforesis (SDS-PAGE), que da a conocer el tamaño de las proteínas (PM), la electroforesis 2D, que permite determinar el punto isoeléctrico (pI), ultracentrifugación que permite conocer el coeficiente de sedimentación, cromatografía líquida (HPLC) que determina el contenido de aminoácidos presentes en las proteínas de estudio y la espectrometría de masa para la identificación de péptidos, entre muchas otras técnicas. Todas estas herramientas de análisis han logrado una respuesta parcial, en donde algunas en ocasiones pueden complementarse y dar una caracterización muy detallada y específica sobre las proteínas (Rose *et al.*, 2004).

### **2.2.5. Proteómica**

La implementación, el desarrollo y la integración de métodos rápidos y sensibles para la medición e identificación de proteínas han transformado las técnicas en una herramienta para el análisis funcional de las proteínas, denominada proteómica (Cánovas *et al.*, 2004). Es el análisis sistemático, cualitativo y cuantitativo de las proteínas presentes en un organismo, tejido, célula o compartimiento subcelular bajo ciertas condiciones fisiológicas y ambientales, permitiendo así el estudio de las proteínas a gran escala. Se utilizan métodos bioquímicos para determinar función, separación, concentración, identificación e interacción con otras macromoléculas (Ferguson y Smith, 2003). Actualmente las aplicaciones de la proteómica están diversificadas para analizar varios aspectos funcionales de las proteínas, como por ejemplo las modificaciones post-

traduccionales, las interacciones proteína-proteína, la actividad y la estructura (Park, 2004; Komatsu *et al.*, 2006).

La proteómica es la complementación de la genómica debido a que se enfoca en los productos génicos, siendo el mejoramiento de los datos genómicos una de sus mayores contribuciones, particularmente por la confirmación de intrones, exones y existencia de variantes de corte y edición (Desiere *et al.*, 2004). Las estrategias proteómicas desarrolladas permiten caracterizar las modificaciones de las proteínas que no pueden ser predichas de una secuencia genómica (Mann y Jensen, 2003; Nadal *et al.*, 2011). Esta rama de la ciencia permite conseguir una descripción de las proteínas expresadas en un punto dado en el tiempo y tejido determinado; así como, identificar y caracterizar proteínas individuales de interés y finalmente elucidar su relación y papeles funcionales a nivel bioquímico (Gottlieb *et al.*, 2004), para posteriormente obtener una visión global e integrada de los procesos celulares y su relación a nivel proteínico; por lo que se ha convertido en una herramienta esencial para el estudio de las proteínas a gran escala en varios campos de la biología de plantas (Komatsu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009).

El estudio de la proteómica se inició con el desarrollo de la tecnología de electroforesis en geles de dos dimensiones. En los últimos años, varias técnicas han sido desarrolladas incluyendo los métodos de identificación de proteínas, especialmente métodos de espectrometría de masa, arreglos de proteínas, métodos de localización y estudios de interacción de proteínas que incluyen ensayos de sistemas de dos híbridos y la tecnología de phage display (Natarajan *et al.*, 2006). El análisis de los proteomas genera una gran cantidad de datos, en un simple experimento es posible obtener información de la expresión de cientos o miles de proteínas. Sin embargo, para poder utilizar la identificación de péptidos mediante espectrometría de masas, es deseable la disponibilidad de secuencias en bases de datos de los organismos de interés o de especies estrechamente relacionadas. Para el análisis, el almacenamiento y la recuperación de toda la información son necesarias herramientas bioinformáticas complejas (Larré *et al.*, 2010).

### 2.2.6. Importancia del estudio de las proteínas

El nivel proteínico integra procesamientos postranscripcionales y postraduccionales que modulan la cantidad, localización y eficiencia del producto final en la célula, por lo que, la comprensión detallada de las proteínas es importante para el estudio de células y organismos a nivel molecular. (Faurobert *et al.*, 2007). Las proteínas son sintetizadas por traducción del RNAm a polipéptidos en los ribosomas, el polipéptido traducido comprende algún tipo de modificación antes de asumir su papel funcional en un sistema vivo, lo cual sólo puede observarse a nivel proteínico. La diversidad en el número de proteínas comparado con el número de genes surge de algunos procesos como el corte y edición alternativa y las modificaciones postraduccionales. Este último, involucra glicosilación, fosforilación, sulfatación, modificación lipídica y al menos otras 400 posibles modificaciones químicas que puede sufrir una proteína lo que da como consecuencia función, localización, estabilidad y actividad específica (ParK, 2004; Bolwell *et al.*, 2004). Por lo que, en adición a la secuencia de aminoácidos, otras propiedades de las proteínas como: cantidad relativa, estado de modificación, asociación con otras proteínas o moléculas de diferentes tipos, localización subcelular y estructura tridimensional, representan información de vital importancia para la descripción de sistemas biológicos y para el total aprovechamiento de las proteínas (Faurobert *et al.*, 2007)

### III. JUSTIFICACIÓN

La chía (*Salvia hispanica*, L.) fue uno de los cultivos más importantes en los pueblos Azteca y Maya antes de la conquista. La semilla se ha consumido en México desde la época pre-hispánica como medicamento y complemento alimenticio para proporcionar energía, resistencia y la fuerza necesaria en condiciones extremas, tales como calor, sequía y escases de alimento, por lo que se le consideró “el alimento mejor y más nutritivo para cruzar los desiertos”.

Tradicionalmente se usó en México en la producción de harina y bebidas; los aceites de chía se han empleado para aumentar la calidad de la producción de pintura y en los últimos años, el uso, las propiedades y el posible aprovechamiento de ésta planta se ha revalorado. Se sabe que la semilla de chía es una excelente fuente del ácido graso omega-3, así como también de fibra y carbohidratos complejos. Además, exhibe un buen balance de aminoácidos; sin embargo, las proteínas presentes en semillas de chía forman parte de las proteínas no convencionales de las que aún se desconocen algunas de las características bioquímicas y nutricionales, por cual se plantea la necesidad de extraerlas y caracterizarlas para poder explotar al máximo las proteínas de esta semilla como ingrediente con propiedades funcionales y nutricionales, de este modo podrían ser utilizadas para mejorar la calidad nutritiva de algunos alimentos en la industria.

Por lo anterior y con el propósito de examinar nuevas fuentes alternativas de proteínas de origen vegetal, considerando que la industria alimentaría requiere del acrecentamiento de la misma en los productos alimenticios, el objetivo del presente trabajo será aislar y caracterizar la fracción rica en proteína de la harina desgrasada de Chía (*Salvia hispanica*, L.).

## IV. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Aislar y caracterizar las proteínas de reserva presentes en semillas de chía (*Salvia hispanica*, L.).

### 4.2. Objetivos específicos

- Determinar la composición proximal de la semilla.
- Estandarizar una metodología de extracción de proteínas.
- Aislar y fraccionar las proteínas solubles.
- Identificar y cuantificar las proteínas de reserva.
- Caracterizar térmicamente las proteínas de reserva.
- Seleccionar la fracción proteínica mayoritaria.
- Caracterizar por peso molecular, punto isoeléctrico y coeficiente de sedimentación las proteínas presentes en dicha fracción.
- Evaluar nutrimentalmente la semilla y la fracción mayoritaria (perfil de aminoácidos y digestibilidad *in vitro*).
- Identificar péptidos sobresalientes en la fracción.
- Purificar la proteína mayoritaria.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Lugar donde se desarrolló el proyecto**

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de alimentos, en el Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Unidad Irapuato, Guanajuato.

### **5.2. Materiales biológicos**

El material biológico utilizado fueron semillas maduras de chía (*Salvia hispanica*), cosechadas en Ixtlahuacán, Colima, Méx.

### **5.3. Métodos**

#### **5.3.1. Esquema General de Trabajo**

La metodología que se siguió en el presente trabajo se resume en la **Figura 4.**

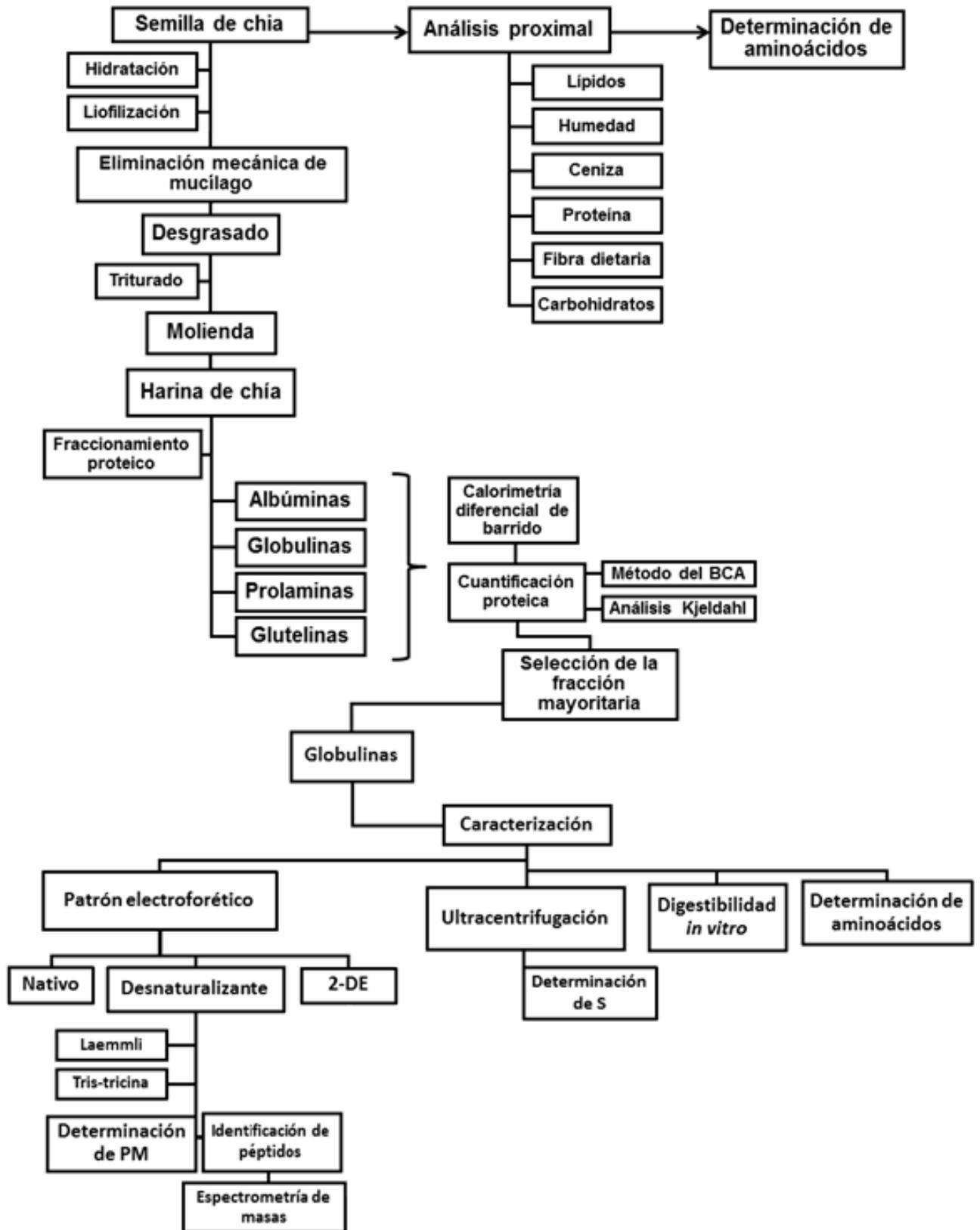


Figura 4. Esquema de la metodología del proyecto.

### **5.3.2. Análisis proximal**

Se determinó el contenido de humedad, grasas, proteínas, fibra y cenizas de las semillas de chía mediante la metodología reportada por la AOAC (1990).

### **5.3.3. Eliminación de mucílago**

Las semillas de chía (*Salvia hispanica*, L.) se hidrataron en agua destilada (1:10 p/v) por 4 h, una vez hinchado el mucílago se congeló a -80 °C durante toda la noche y se liofilizó, posteriormente se retiró el mucílago seco de forma mecánica (Olivos Lugo *et al.*, 2010).

### **5.3.4. Obtención de harina**

Una vez que se obtuvieron las semillas limpias de chía, se eliminó la humedad de la semilla en un horno de secado durante 48 h a 50 °C.

Descartado el mucílago de la semilla se trituró en un molino de cuchillas (Osterizer) hasta obtener un tamaño de partícula de 1 mm.

A la semilla triturada se le retiró la grasa mediante un sistema Soxhelt, empleando hexano como solvente, se realizaron 20 reflujos a cada lote con duración aproximada de 10 min/reflujo (Vázquez-Ovando *et al.*, 2009).

Posterior al desgrasado, se realizó una molienda final en un molino centrífugo (Brinkman) equipado con una malla de 80 mesh, para obtener harina con tamaño de partícula de 0.5 mm.

La harina desgrasada se llevó a refrigeración donde se mantuvo a 4 °C hasta su uso.

### **5.3.5. Fraccionamiento secuencial de las proteínas de reserva de semillas de chía**

La extracción de las diferentes fracciones proteínicas se llevó a cabo en harina desgrasada de semillas de chía sin mucílago. Esta extracción se realizó de acuerdo a la clasificación de Osborne (1924), siguiendo el protocolo descrito por Barba de la Rosa (1996) con algunas modificaciones, como se describe a continuación.

Se realizó una primera extracción suspendiendo harina de chía en H<sub>2</sub>O destilada (1:10 p/v) y se agitó por 1 h a 4 °C, se centrifugó a 14000g durante 20 min, recuperando en el sobrenadante la fracción de Albúminas. Se colectó el sobrenadante y se sometió a diálisis (membrana con peso molecular de 6 kDa, Spectrapor Spectrum, Medical Industries, Inc., Los Angeles, Ca.) a 4 °C contra agua desionizada. El dializado se liofilizó y almacenó a 4 °C hasta su uso.

Posteriormente se realizó una segunda extracción resuspendiendo la pastilla con una solución 50 mM Tris-HCl + 0.5 M NaCl pH 8, se agitó por 1 h a 4 °C, se centrifugó a 14000g durante 20 min, recuperando en el sobrenadante la fracción de Globulinas. Se sometió a diálisis (membrana con peso molecular de 6 kDa, Spectrapor Spectrum, Medical Industries, Inc., Los Angeles, Ca.) a 4 °C contra agua desionizada. El dializado se liofilizó y almacenó a 4 °C hasta su uso.

La tercera extracción se realizó resuspendiendo la pastilla en Isopropanol al 70% y se agitó por 1 h a 4 °C, se centrifugó a 14000g durante 20 min, recuperando en el sobrenadante la fracción de Prolaminas. Se sometió a diálisis (membrana con peso molecular de 6 kDa, Spectrapor Spectrum, Medical Industries, Inc., Los Angeles, Ca.) a 4 °C contra agua desionizada. El dializado se liofilizó y almacenó a 4 °C hasta su uso.

Por último la cuarta extracción se realizó resuspendiendo la pastilla en una solución 0.1 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O pH 10, se agitó por 1 h a 4 °C, se centrifugó a 14000g durante 20 min, recuperando en el sobrenadante la fracción de Glutelinas.

Se sometió a diálisis (membrana con peso molecular de 6 kDa, Spectrapor Spectrum, Medical Industries, Inc., Los Angeles, Ca.) a 4 °C contra una solución 0.01 M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ . El dializado se liofilizó y almacenó a 4 °C hasta su uso.

### **5.3.6. Cuantificación proteínica**

#### **5.3.6.1. Método del ácido bicinconínico (BSA)**

El contenido de proteína de las fracciones aisladas se cuantificó mediante el método del ácido bicinconínico utilizando el Kit BCA Protein Assay (PIERCE, Rockford, Illinois, USA). Este método se basa en la detección de  $\text{Cu}^{+2}$  en presencia de una solución alcalina (reacción de Biuret). El  $\text{Cu}^{+2}$  es entonces quelado por dos moléculas de BCA (ácido bicinconínico) y forma un producto de reacción color púrpura. Los extractos de proteína se dejaron reaccionar 30 min a 37 °C antes de leer la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro Benchmark TM Plus Microplate.

Para la determinación de la concentración de proteína de cada muestra se construyó una curva estándar con soluciones de albúmina de suero bovino (BSA) a diferentes concentraciones (0.01, 0.025, 0.05, 0.1 0.25, 0.5 y 1 mg/mL) y por medio de una regresión lineal se obtuvieron los valores de proteína.

#### **5.3.6.2. Análisis Kjeldahl**

Para conocer el porcentaje de proteína cruda y de las fracciones proteicas se utilizó la técnica para determinación de nitrógeno descrita por la AOAC (1990) utilizando el valor de 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína.

### 5.3.7. Calorimetría diferencial de barrido

Las características térmicas de las cuatro fracciones aisladas mediante solubilidad (Albúminas, Globulinas, Prolaminas y Glutelinas) fueron determinadas por calorimetría diferencial de barrido de acuerdo a la metodología reportada por Martínez y Añón (1996) en un equipo de análisis térmico Perkin Elmer DSC-6 Pyris. Para el análisis se pesaron 3 mg (b.s.) de muestra y se suspendieron en 10  $\mu$ L de agua desionizada (30%). Se emplearon cápsulas herméticas (Perkin-Elmer No. 0219-0062) y se dejaron estabilizar las muestras por lo menos 30 min a temperatura ambiente (25°C), se realizó la corrida con un flujo de calentamiento de 10 °C /min en un intervalo de 35 a 130 °C. Como referencia se utilizó una cápsula vacía. Las calibraciones de temperatura y cápsulas se realizaron usando Indio como patrón. De los termogramas obtenidos se calculó la temperatura de desnaturalización (Td) y la entalpía de transición ( $\Delta H$ ) (Paredes-López *et al.*, 1988). La cinética de desnaturalización térmica se determinó por el método de Borchardt y Daniels (1957).

### 5.3.8. Ultracentrifugación

Los coeficientes de sedimentación de las proteínas fueron determinados mediante ultracentrifugación, en una ultracentrífuga Beckman 15-65B usando un rotor SW 40 Ti (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA). 1 mL de muestra con 3 mg de proteína se separó usando gradientes isocinéticos de sacarosa del 5-20% (p/v) establecidos en solución amortiguadora (50 mM Tris-HCl (pH 8) + 0.3 M NaCl) y centrifugando a 218,000g por 21 h a 4 °C. Los gradientes se monitorearon con un detector UV (Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Sweden) con un filtro de 280 nm. Para la calibración de los gradientes se utilizó un estándar de proteínas de coeficientes de sedimentación conocidos: lisosima (1.9S), albúmina sérico bovina (4.4S),  $\alpha$ -globulinas (7S) y catalasa (11.2S) (Chen y Paredes-López, 1997).

### **5.3.9. Caracterización bioquímica**

#### **5.3.9.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Se utilizó electroforesis en geles de poliacrilamida nativa, desnaturizante (SDS-PAGE), en ausencia y presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (ME) y enfoque Isoeléctrico (IEF). Los diferentes tipos de electroforesis fueron realizados en una cámara de electroforesis vertical (Mini-Protean II electrophoresis cell, Bio-Rad, CA).

##### **5.3.9.1.1. Electroforesis nativa**

Para la electroforesis nativa se utilizaron geles de poliacrilamida al 5%, de acuerdo a la metodología de Laemmli (1970) sin dodecil sulfato de sodio (SDS). El gel nativo fue cargado con 20  $\mu$ g de proteína por carril disuelta en Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 y 20% (p/v) de glicerol. La electroforesis se llevó a cabo a una corriente constante de 120 V durante 130 min.

##### **5.3.9.1.2. Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)**

La electroforesis en dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) se llevó a cabo de acuerdo al método de Laemmli (1970) en geles de poliacrilamida al 12% con y sin reducción de la proteína con 2-ME. Las muestras de proteína se disolvieron en Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 20 % (p/v) de glicerol y 10% (p/v) de SDS. La reducción de puentes disulfuro se realizó con 2-ME (5% v/v) a 95 °C por 10 min. La electroforesis se llevó a cabo a una corriente constante de 120 V durante 130 min.

Los geles se tiñeron con azul brillante Coomassie G250 a una concentración final de 0.25%, para posteriormente ser sometidos a decoloración con agua/ácido acético/metanol (4.5/4.5/1, v/v/v).

#### **5.3.9.1.3. Electroforesis tris-tricina**

Para obtener una mejor resolución en proteínas de pesos moleculares pequeños se realizó la electroforesis en una dimensión de acuerdo al método de Schägger y von Jagon (1987), usando geles de gradiente de acrilamida del 5% al 13%.

#### **5.3.9.1.4. Electroforesis bidimensional (isoelectroenfoque)**

La fracción mayoritaria se analizó en dos dimensiones, se realizó de acuerdo con el método descrito por O'Farrell (1977) que consta de la separación de las proteínas en una dimensión en base a su punto isoeléctrico (pI) (isoelectroenfoque) y una segunda dimensión en base a su peso molecular (PM) en electroforesis SDS-PAGE. Una vez determinada la concentración de proteína se procedió a tomar la cantidad de extracto adecuado para el análisis por electroforesis bidimensional. Para este análisis se realizó una limpieza previa de los extractos proteínicos con la finalidad de eliminar la presencia de sales, lípidos, ácidos fenólicos y nucleicos, utilizando el Kit 2-D Clean-Up (Amersham Biosciences, Nueva York, USA). Para el isoelectroenfoque o primera dimensión se utilizaron tiras de 7 cm con gradiente de pH inmovilizado de 3-10, cargando 75 µg la fracción proteínica. Las proteínas se suspendieron en una solución de rehidratación conteniendo 8 M de Urea y anfolinas al 2% del rango de pH de 3-10. El enfoque se llevó a cabo en un equipo PROTEAN IEF Cell (BIO-RAD Laboratories, 3300 Regatta Boulevard Richmond, Ca. 94804) y consistió primero

en una rehidratación activa a 50 V por 12 h a una temperatura de 20°C, inmediatamente se realizó un paso de acondicionamiento de 250 V por 15 min, posteriormente se incrementó el voltaje de manera lineal hasta un voltaje máximo de 4000 V que se mantuvo hasta llegar a un voltaje total de 40 000 V. Una vez realizado el enfoque se cargó la tira en un gel horizontal SDS-PAGE (segunda dimensión) descrito anteriormente.

### **5.3.10. Identificación de proteínas**

#### **5.3.10.1. Análisis de péptidos por espectrometría de masas**

Las bandas de las proteínas en los geles de una dimensión (tris-tricina) fueron cortadas y sometidas a una digestión con tripsina, proteasa que corta los enlaces peptídicos por el lado carboxilo de lisina y arginina, para posteriormente ser analizadas mediante espectrometría de masas con ESI MS/MS Q-TOF. La cantidad de proteína mínima para el análisis de las proteínas con ESI MS/MS Q-TOF fue mayor a 1 picomol de proteína. Los resultados obtenidos de las secuencias y masas de los péptidos analizados se compararon con la base de datos de secuencias de plantas (Bienvenut *et al.*, 1999).

#### **5.3.10.2. Análisis bioinformático de secuencias**

El análisis de las secuencias se hizo con ESI MS/MS Q-TOF. Las secuencias de las proteínas analizadas fueron comparadas por MS-BLAST (<http://genetics.bwh.harvard.edu/msblast>), utilizando la base de datos de secuencias Swissprot.

### 5.3.11. Purificación

#### 5.3.11.1. Filtración en gel

Para llevar a cabo la purificación mediante filtración en gel se aplicó una alícuota de la fracción proteínica mayoritaria en una columna 2.5x83 cm empacada con Sephacryl-S400, con límite de corte de 20000 a 8000000 (Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Sweden). La columna se equilibró previamente con 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7 a un flujo de 42 mL/h. Se colectaron fracciones de 50 gotas. El perfil de elución se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (Benchmark TM Plus Microplate) (Chen y Paredes-López, 1997).

#### 5.3.11.2. Electroelución

La purificación de la globulina 11S se llevó a cabo utilizando el Modelo 422 de BIO-RAD®. Se cortó la banda correspondiente a la proteína 11S resultado de la electroforesis en condiciones nativas (**Figura 9**), fue electroeluída siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. La elución se corrió a 10 mA/tubo, de 3 a 5 h, el tiempo de elución dependió del porcentaje del gel y peso molecular de la proteína. Después que la electroelución fue completada, se removió el adaptador de silicón del tubo y usando una pipeta se retiró el líquido de la membrana conteniendo la proteína eluída, la cual se concentró y se guardó a 4 °C hasta su uso. El volumen aproximadamente fue de 1.5 mL. El promedio de proteína purificada es de 80 – 100%.

### **5.3.12. Evaluación nutrimental**

#### **5.3.12.1. Análisis de aminoácidos**

La composición de aminoácidos se determinó en semilla de chía, harina desgrasada/sin mucílago y en la fracción de globulinas (mayoritaria). El análisis de aminoácidos se realizó utilizando el cromatógrafo de líquidos de alta resolución en fase reversa (HPLC). La muestra (10 mg) se hidrolizó con HCl 1 N (Suprapur, Merck, Darmstadt, RFA) en la estación Pico-Tag a 110 °C por 24 h. Para la determinación de metionina y cisteína se oxidaron 10 mg de muestra con ácido perfórmico a 0 °C por 16 h y luego se hidrolizaron con HCl. Después de la dilución con el estándar interno se utilizaron 10 mL para la derivación con fenilisotiocianato. Las muestras se analizaron en una columna C-18 Pico-Tag. Los aminoácidos fueron analizados en un integrador modelo 19-740 (Waters Chromatography Division, Bredfor, MA) (Barba de la Rosa *et al.*, 1992).

#### **5.3.12.2. Calificación química**

Se calculó según Friedman (1996), empleando como referencia el patrón FAO / OMS (2008) para grupos de diferentes edades; de acuerdo con la siguiente relación:

$$\frac{\text{mg de aminoácido esencial en 1 g de la proteína evaluada}}{\text{mg de aminoácido en 1 g de la proteína de referencia}}$$

### 5.3.12.3. Digestibilidad *in vitro*

Se llevó a cabo la digestibilidad *in vitro* según Hsu *et al* (1977). Para lo que se prepararon 50 mL de una suspensión acuosa de material proteínico (molido y tamizado por una malla 80 con concentración de 6,25 mg/mL) y se ajustó el pH a 8 con HCl 0,1 N o NaOH 0,1 N con agitación en un baño de agua a 37°C. Se prepararon 50 mL de una solución multienzimática que contenía una mezcla de tripsina (tipo IX Sigma T-0134 con 14.190 unidades BAEE/mg de proteína), quimotripsina (tipo II Sigma C-4129 con 60 unidades/mg de polvo) y peptidasa (grado III Sigma P-75000 con 40 unidades/g de polvo) por mL, se ajustó a pH 8 y esta solución se mantuvo en un baño de hielo. Una vez efectuado lo anterior, se añadieron 5 mL a la suspensión proteínica y se mantuvo en agitación a 37°C. Se midió la caída de pH con un potenciómetro digital después de un período de 10 min. Se calculó la digestibilidad aparente *in vitro* (Y) a partir de la ecuación:

$$Y = 210,464 - 18,103x$$

Dónde: X = pH de la suspensión proteínica inmediatamente después de 10 min de digestión con la solución multienzimática.

### 5.3.13. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como el valor medio  $\pm$  desviación estándar y fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA). Las medias fueron evaluadas por el prueba de Tuckey de las mínimas diferencias significativas para comparación de pares, con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ . Para ello se empleó el programa SigmaPlot, versión 11.0.

## VI. RESULTADOS

### 6.1. Análisis proximal

El **Cuadro 2** muestra la composición proximal en base seca de la semilla de chía, cada análisis se realizó por triplicado de acuerdo a la metodología reportada por la AOAC (1990).

Para la determinación de grasas se utilizó un equipo Soxhelt y hexanos como solvente donde se encontró que el contenido de lípidos fue más alto (32.5%) que el reportado para otras semillas oleaginosas de importancia comercial, como lo es la soya (24%) y la de algodón (22-24%), lo que confirma a la semilla de chía como una fuente importante de lípidos (Ayerza, 1995).

La determinación de proteína total se realizó mediante análisis Kjeldahl utilizando 6.25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína. El resultado del análisis reveló que el contenido de proteína en semillas de chía (22.7%) es similar al de las lentejas (23%) y al del garbanzo (21%) y superior al contenido proteínico de los granos utilizados comúnmente como maíz (10%), trigo (14%), arroz (8%) y avena (15.3%) (Lazcano y Cuellar, 2004). Se han reportado niveles hasta de 28.4% para otras variedades de chía (Monroy-Torres *et al.*, 2008), valores que justifican el uso potencial de la semilla como fuente de proteína para dietas de humanos y animales.

La determinación de fibra se realizó utilizando el Total kit dietary fiber assay de la casa comercial Sigma Aldrich, con el que se pudo determinar el contenido de fibra soluble, insoluble y fibra total por separado. El resultado mostró un contenido total de fibra de 33.6% de los cuales el 8.2% es fibra soluble y el 25.4% corresponde a la fibra insoluble, datos que pueden ser comparados con las fuentes de fibra dietaria que tradicionalmente se utilizan, como la semilla de linaza (22.3%), cebada (17.3%), maíz (13.4%), trigo (12.6%) y soya (15%) (Devinder *et*

**Cuadro 2.** Composición proximal de semilla de chía.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad<sup>a</sup></b>
	<b>(g/100g base seca)</b>
<b>Humedad</b>	4.5 ± 0.0
<b>Lípidos</b>	32.5 ± 2.7
<b>Proteína</b>	22.7 ± 0.7
<b>Ceniza</b>	3.7 ± 0.2
	Soluble 8.2 ± 0.8
<b>Fibra dietaria</b>	Insoluble 25.4 ± 4.2
	Total 33.6 ± 4.6
<b>Carbohidratos (por diferencia)</b>	3.1

<sup>a</sup> Los valores mostrados corresponden a la media ± desviación estándar.

*al.*, 2011). Esto demuestra que la chía puede ser considerada como alimento rico de fibra.

En menor proporción se encontró el contenido de carbohidratos (3.1%), al igual que el contenido de humedad (4.5%) y minerales (3.7%). Los resultados obtenidos del análisis proximal concuerdan con los reportados con anterioridad para otras variedades de chía (Reyes-Caudillo *et al.*, 2008; Olivos-Lugo *et al.*, 2009).

## **6.2. Eliminación de mucílago**

Debido a la alta capacidad de retención de agua que posee el mucílago de esta semilla y con la finalidad de mejorar y estandarizar el protocolo de extracción de proteína, se planteó retirar el mucílago. Se propusieron dos metodologías de secado de mucílago: la eliminación se realizó mediante hidratación y secado por horno, e hidratación y secado por liofilización, para después retirar de manera mecánica el mucílago seco.

A partir de las semillas sin mucílago, se preparó harina para la extracción proteínica, se comparó el contenido proteínico de harina desgrasada de semillas con mucílago y harina desgrasada de semillas sin mucílago mediante los dos métodos propuestos. Se encontró que no hay diferencia significativa entre no retirar el mucílago y retirar el mucílago secado por horno; sin embargo, al retirar el mucílago secado por liofilización hubo mayor rendimiento en la extracción proteínica (**Cuadro 3**). Por lo que se sugiere que el mucílago puede causar interferencia en la extracción proteínica. En adelante se trabajó con harina de semillas desgrasadas sin mucílago.

**Cuadro 3.** Comparación de métodos para retirar mucílago.

	<b>Contenido de proteína<sup>a</sup></b> <b>(g proteína/kg semilla b.s.)</b>
<b>Con mucílago</b>	2.3 <sup>b</sup> ± 0.15
<b>Sin mucílago mediante horno</b>	2.7 <sup>b</sup> ± 0.11
<b>Sin mucílago mediante liofilizado</b>	3.1 <sup>c</sup> ± 0.22

<sup>a</sup> Los valores mostrados corresponden a la media ± desviación estándar.

<sup>b,c</sup> Se realizó un ANOVA y comparación de medias por prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Valores marcados con la misma letra en la misma columna NO presentan diferencia significativa.

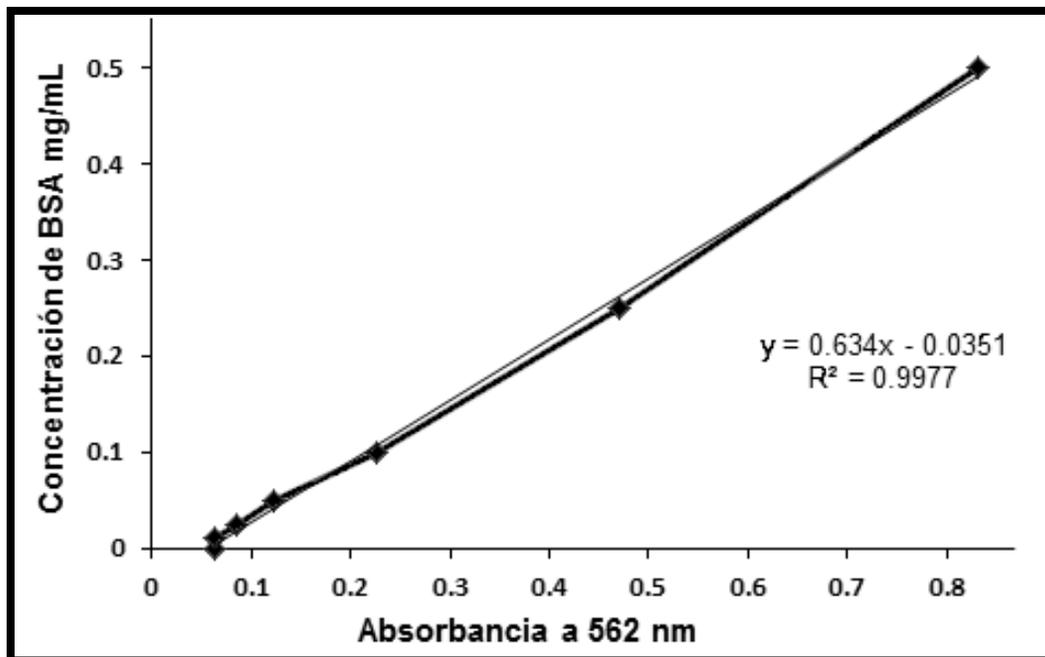
### **6.3. Fraccionamiento secuencial de las proteínas de reserva de semillas de chía**

Para facilitar el estudio de las proteínas de reserva, una estrategia comúnmente utilizada es el fraccionamiento por solubilidad. Por lo que las proteínas presentes en semilla de chía se fraccionaron de acuerdo a la metodología reportada por Osborne (1924) y Barba de la Rosa *et al* (1996) con algunas modificaciones. Se utilizaron diferentes agentes extractantes, esto mejora la resolución de mezclas complejas y permite la obtención de patrones electroforéticos más claros y fáciles de analizar. En esta etapa fue importante estandarizar diferentes condiciones como temperatura, tiempo, pH y fuerza iónica, que influyen en el rendimiento y en la estructura de las proteínas que integran cada fracción. Una vez estandarizadas las condiciones de extracción, el fraccionamiento se realizó por triplicado en cuarto frío cuidando que la temperatura fuera siempre constante a 4°C.

### **6.4. Cuantificación proteínica**

#### **6.4.1. Método del ácido bicinconínico (BCA)**

Realizada la extracción proteínica, se cuantificaron las fracciones globulinas, albúminas, prolaminas y glutelinas mediante el método del ácido bicinconínico, utilizando una curva estándar de BSA (**Figura 5**) para determinar la cantidad de proteína presente en cada fracción; esta curva se preparó cada vez que se cuantificó alguna de las muestras. Para determinar la concentración de proteína en cada fracción se consideraron las tres réplicas de extracción y las lecturas de absorbancia se realizaron por duplicado. En la **Cuadro 4** se muestran los resultados de rendimiento de extracción de las diferentes fracciones de proteínas de reserva de semilla de chía. Se puede ver claramente que las



**Figura 5.** Curva estándar de BSA para determinar concentración de proteína. Albúmina de suero bovina (BSA) a una concentración de 0.0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mg/mL, a una longitud de onda de 562 nm.

**Cuadro 4.** Cuantificación proteínica de las fracciones de Osborne.

Fracción	Proteína <sup>a</sup> (g proteína/kg semilla b.s.)
Albúminas	0.68 ± 0.02
Globulinas	1.70 ± 0.23
Prolaminas	0.18 ± 0.02
Glutelinas	0.57 ± 0.06

Los valores mostrados corresponden a la media ± desviación estándar.

globulinas representan la fracción más abundante, con un rendimiento de extracción por encima de las demás fracciones. Este patrón se observa por lo general en granos de leguminosas, la mayor proporción se encuentra en forma de globulinas, seguida por albúminas y en menor cantidad glutelinas y prolaminas (Nikokyris y Kandyliis, 1997).

#### 6.4.2. Análisis Kjeldahl

Mediante análisis Kjeldahl se obtuvo el contenido de nitrógeno con el cual se calculó el porcentaje de proteína total en harina de semilla de chía deslipidizada y sin mucílago, así como también se determinó el porcentaje en el que se encontraron las fracciones proteínicas aisladas (**Cuadro 5**). El resultado obtenido para la harina fue de 35.5%; el cual es mayor al contenido de proteína de la semilla entera debido a que se extrajo el aceite y el mucílago para hacer la harina. A partir de este dato se calculó la proporción en la que se encontraban las fracciones aisladas. La fracción mayoritaria corresponde a las globulinas con un 52%, seguido por las albúminas con un 17.3%, y en menor proporción las glutelinas 14.5% y las prolaminas con un 12.7%. Se determinó también el contenido de proteína en la pastilla resultante de la extracción secuencial de proteínas, esto para determinar la cantidad de proteínas insolubles y saber si la extracción fue correcta, el valor fue muy bajo (3.4%), por lo que se concluye que la metodología de extracción se realizó correctamente logrando solubilizar la mayoría de las proteínas.

La proporción en la que se encuentran las fracciones de Osborne concuerda en algunos de los datos encontrados por Vázquez-Ovando *et al* (2010), reportaron a las globulinas (64.8%) como fracción mayoritaria, en segundo lugar las glutelinas (20.2%), seguida por las albúminas (10.9%) y por último las prolaminas (4.04%). Los autores obtuvieron menor proporción en la fracción de albúminas; esto se debe principalmente a que no retiraron el mucílago, lo que

**Cuadro 5.** Porcentaje de las fracciones de Osborne en semilla de chía.

<b>Muestra</b>	<b>Proteína<sup>a</sup></b> <b>(g/100g base seca)</b>
<b>Harina desgrasada sin mucílago</b>	35.5 ± 0.6
<b>Albúminas</b>	17.3 ± 0.8
<b>Globulinas</b>	52.0 ± 1.0
<b>Prolaminas</b>	12.7 ± 0.2
<b>Glutelinas</b>	14.5 ± 0.2
<b>Pastilla</b>	3.4 ± 0.6

<sup>a</sup> Los valores mostrados corresponden a la media ± desviación estándar.

causa interferencia en la extracción debido a que el mucílago de la semilla tiende a absorber el agua, impidiendo la solubilización de esta fracción, es por eso que en nuestro estudio las albúminas tienen una mayor proporción ya que se retiró el mucílago.

El patrón de fraccionamiento que observamos en la chía se asemeja a los resultados reportados para semillas de chicharos (globulinas ~44.8%, albúminas ~15.4%, glutelinas ~1.3%, prolaminas ~0%), lupinus (globulinas ~45.4%, albúminas ~15.5%, glutelinas ~8.4%, prolaminas ~2.4%) y semillas de algodón (globulinas ~38.1%, albúminas ~6.3%, glutelinas ~2.4%, prolaminas ~0%), entre otras (Nikokyris y Kandyliis, 1997). La proporción depende siempre de la fuente botánica, aunque también pueden interferir los tratamientos a los que la semilla se someta, ya que puede haber diferencias entre semillas de la misma especie que pueden deberse a los procedimientos de extracción y la preparación de las harinas, por lo que si se desea realizar una comparación veraz, los pretratamientos a los que se sometan las semillas deben ser los mismos (Betancur-Ancona et al., 2004).

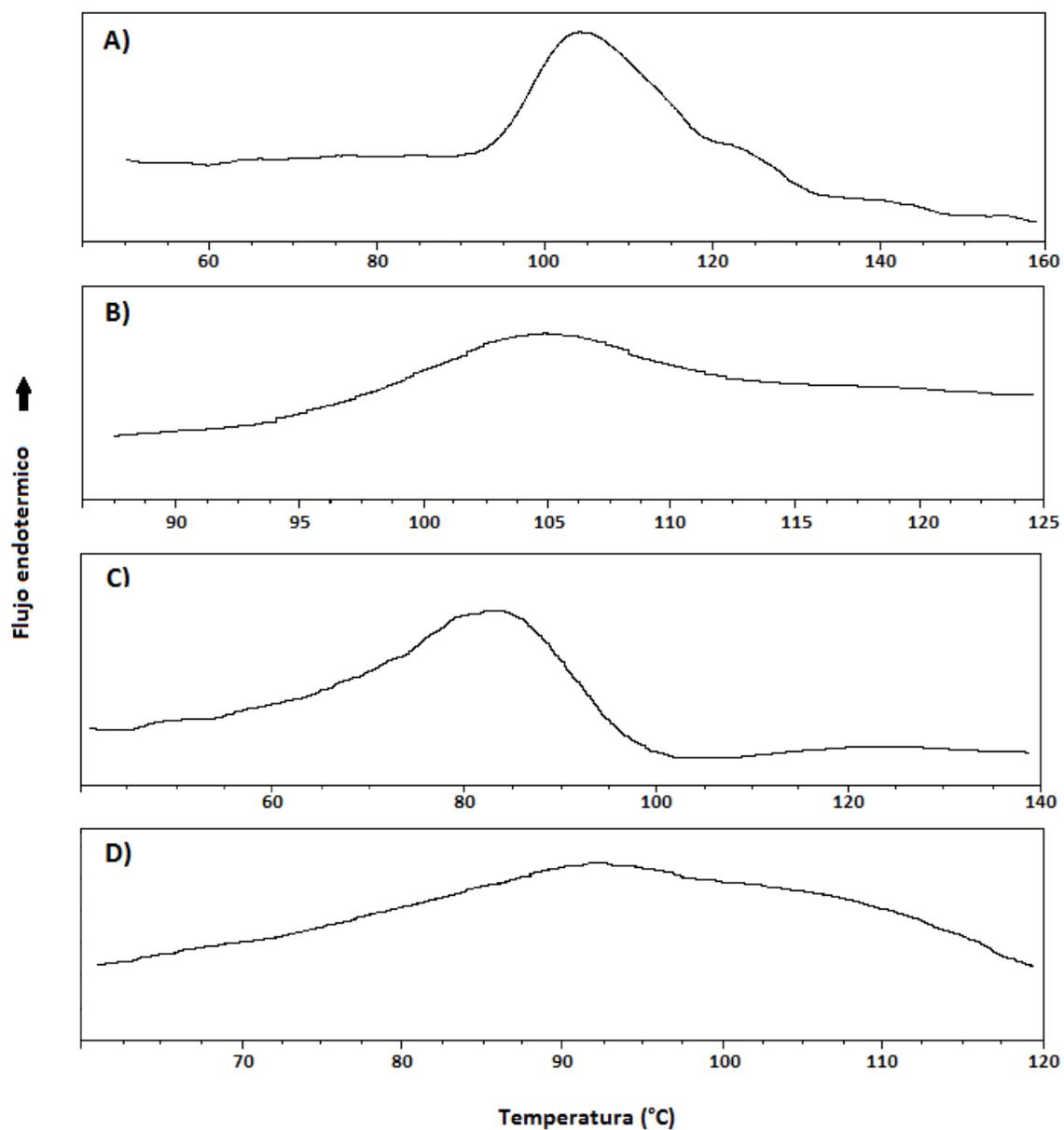
## **6.5. Calorimetría diferencial de barrido**

Las propiedades térmicas de las fracciones de proteína de la semilla de chía nos dan información acerca de los cambios en el comportamiento de las proteínas durante procesos de calentamiento y son útiles en el diseño de estrategias para procesamiento de alimentos. En esta prueba las proteínas fueron inducidas a un proceso térmico usando un calorímetro diferencial de barrido, mediante el cual se detectaron los cambios que sufrieron las moléculas y de este modo se registraron las temperaturas y las entalpías de desnaturalización.

Los termogramas de las fracciones se muestran en la **Figura 6**. En todas las fracciones se observa un solo pico de desnaturalización, es más notorio en

albúminas y prolaminas. Aunque cada fracción mostró temperaturas de desnaturalización diferentes (albúminas (103.6 °C), globulinas (104.7 °C), prolaminas (85.6 °C) y glutelinas (91.3 °C) (**Cuadro 6**), se pueden considerar altas con respecto a las reportadas para otras proteínas de fuentes vegetales como leguminosas y cereales, que generalmente están por debajo de los 100 °C. Por ejemplo las temperaturas de desnaturalización para proteínas de centeno y cebada van de los 84 °C a los 96 °C (Harwalkar y Ma, 1987), en el arroz están por debajo de los 100 °C (albúminas ~73.3 °C, globulinas ~78.9 °C y glutelinas ~82.2 °C) (Ju *et al.*, 2001), al igual que las temperaturas de las fracciones presentes en semilla de amaranto (albúminas ~64 °C, globulinas ~94 °C y glutelinas ~86 °C) (Salcedo-Chávez *et al.*, 2002). Las temperaturas de desnaturalización altas se pueden deber a la formación de intermediarios de alto peso molecular (moléculas asociadas) con estructura ordenada y compacta que pueden tener mayor estabilidad térmica que las proteínas no asociadas susceptibles a la desnaturalización (Harwalkar y Ma, 1987)

Por otro lado, las entalpías de desnaturalización para las albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas fueron de 12.6 J/g, 4.7 J/g, 2.3 J/g y 6.2 J/g, respectivamente. Estos valores dan información sobre la energía que requieren dichas proteínas para cambiar o desnaturalizar las estructuras proteínicas. Estos resultados demuestran como diferentes fuerzas iónicas afectan la estabilidad de las proteínas de chíá. La estabilidad térmica está controlada por el balance de residuos polares o no polares en la estructura de una proteína y a mayor contenido de residuos no polares es mayor la estabilidad térmica, por lo que la información que proporciona este análisis ayuda a dar una idea sobre la conformación que tienen estas proteínas (Chen y Paredes-López, 1997). Las proteínas termoestables son de incalculable valor para la biotecnología, en especial en el área de alimentos debido a que soportan elevadas temperaturas sin perder su estructura tridimensional nativa, ni su función o actividad biológica; lo que tiene aplicaciones prácticas en la industria alimentaria. La acción del calor es la base para la cocción de la mayoría de los alimentos, un ejemplo es la sustitución de proteínas cárnicas por otras no cárnicas de menor costo (proteínas



**Figura 6.** Termogramas de las fracciones proteínicas de semilla de chía. Análisis por calorimetría diferencial de barrido. A) Albúminas, B) Globulinas, C) Prolaminas y D) Glutelinas.

**Cuadro 6.** Caracterización térmica de las fracciones proteínicas de semilla de chíá.

Fracción	$\Delta T_d$ (°C) <sup>*</sup>	$T_d$ (°C) <sup>**</sup>	$\Delta H_d$ (J/g) <sup>***</sup>
Albúminas	96.0-118.8	103.6 ± 0.72	12.6 ± 0.82
Globulinas	94.3-116.6	104.7 ± 0.24	4.7 ± 0.93
Prolaminas	72.1-93.2	85.6 ± 0.60	2.3 ± 0.15
Glutelinas	76.0-104.9	91.3 ± 0.85	6.2 ± 0.13

Los valores mostrados corresponden a la media ± desviación estándar.

\*  $\Delta T_d$  = Rango de temperatura de desnaturalización,

\*\*  $T_d$  = Temperatura de desnaturalización y

\*\*\*  $\Delta H_d$  = Entalpia de desnaturalización.

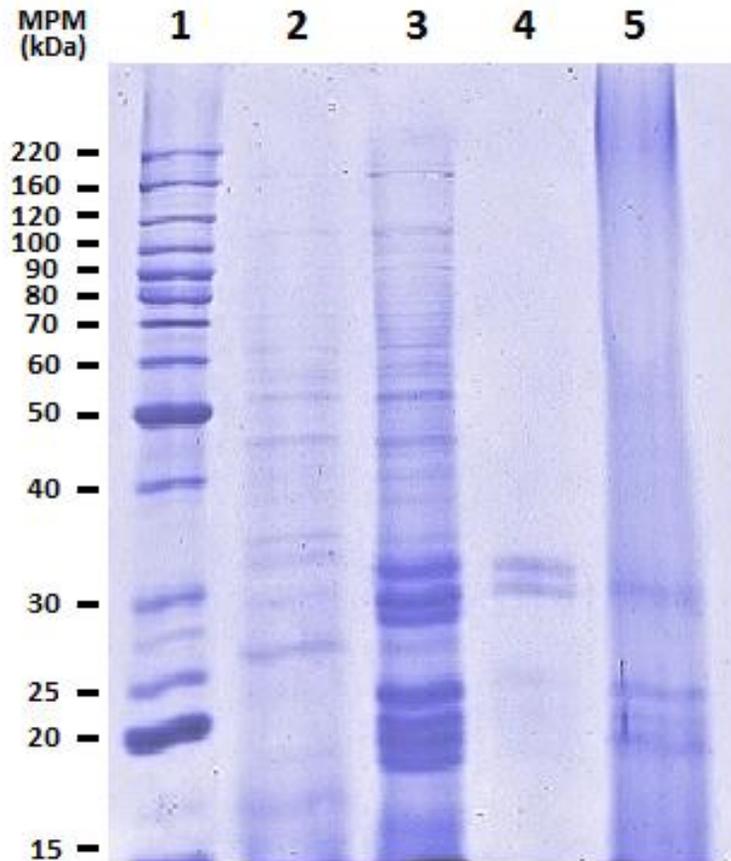
de soya) que tiene como consecuencia la obtención de ventajas económicas en la comercialización de productos cárnicos (Petruccelli, 1993).

En base a los resultados se puede asegurar que las proteínas presentes en semilla de chía muestran buena estabilidad térmica y se pueden utilizar para enriquecer productos específicos donde las estructuras nativas deban de ser mantenidas bajo procesos alimenticios que requieran elevadas temperaturas.

## **6.6. Caracterización bioquímica de las fracciones de Osborne**

### **6.6.1. Electroforesis SDS-PAGE**

En la **Figura 7** se muestra el patrón electroforético desnaturizante en condiciones reductoras (+  $\beta$ -ME) de las proteínas de reserva de semilla de chía, el perfil electroforético corresponde a las cuatro fracciones de Osborne: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas. Las albúminas son la segunda fracción en abundancia con respecto al contenido proteínico total de la semilla; sin embargo, a pesar de que se observan gran cantidad de bandas en un amplio rango de pesos moleculares, no se distinguen bandas en concentración relevante. Al contrario, en la fracción de globulinas (fracción mayoritaria) también hay una gran cantidad de bandas de pesos moleculares diversos, pero se pueden apreciar claramente ocho bandas en concentración elevada con pesos moleculares entre 18 kDa y 35 kDa, sugiriendo la presencia de una posible proteína mayoritaria. También se aprecia una serie de bandas de menor concentración que van desde los 35 kDa a los 160 kDa de peso molecular, evidencia que respalda la elevada concentración de globulinas en la semilla. Por otra parte y debido a que las prolaminas se encuentran en muy baja proporción dentro de las semillas, fue necesario concentrar mediante precipitación con ácido tricloroacético (TCA) y de esta forma se logró ver 3 bandas tenues entre 25-35 kDa. Por último la fracción de glutelinas



**Figura 7.** Perfil electroforético de las fracciones de Osborne. Análisis SDS-PAGE de proteínas de reserva de semilla de chía. Gel de acrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. Se cargó 20  $\mu$ g de proteína por carril y 5  $\mu$ L de marcador de PM; Carril 1) Marcador de peso molecular 220 kDa (BenchMark, Life Technologies), carril 2) Albúminas, carril 3) Globulinas, carril 4) Prolaminas y carril 5) Glutelinas.

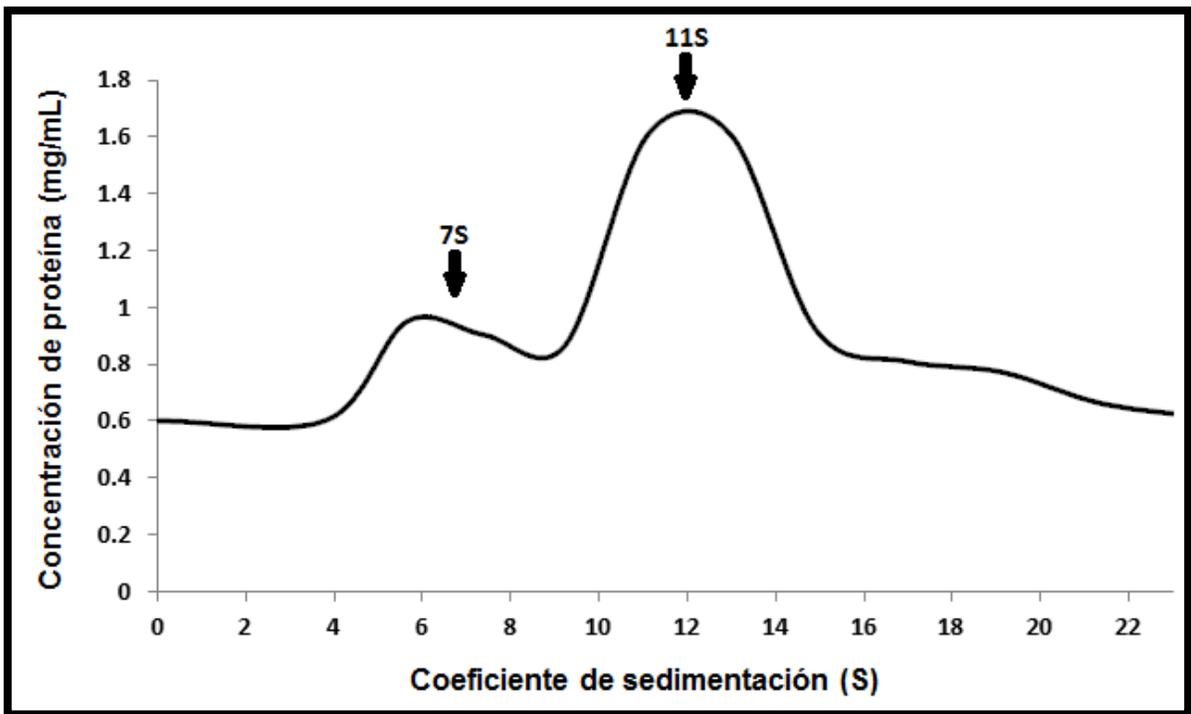
mostró pocas bandas en el perfil electroforético, con un patrón muy similar al de las globulinas de alrededor de 20 kDa y 30 KDa. Esta similitud entre globulinas y glutelinas es normal según la clasificación propuesta por Fukushima (1991), la cual engloba estas dos fracciones proteínicas en un solo grupo teniendo como criterios la homología de estructuras primarias, la presencia de estructuras repetitivas que influyen en la estructura secundaria y la ruta biosintética.

Este perfil electroforético aunado a los resultados obtenidos de la cuantificación proteínica, señala que la fracción de globulinas posee mayor cantidad de proteínas, así como también la posible presencia de una proteína mayoritaria, por lo que en adelante se decidió continuar trabajando en la caracterización de la fracción de globulinas.

## **6.7. Caracterización bioquímica de las globulinas de chíá**

### **6.7.1. Determinación del coeficiente de sedimentación**

Para comenzar con la caracterización más detallada de las globulinas de semilla de chíá se realizó el perfil de sedimentación, utilizando un gradiente de sacarosa del 5 al 20%, para ultracentrifugación, como se describe con anterioridad, posterior a esto se colectaron fracciones de 1 mL a las cuales se les determinó el porcentaje de sacarosa y la cantidad de proteína. Con base a estos resultados se realizó la construcción de la gráfica que se muestra en la **Figura 8**, en la cual se observa la presencia abundante de proteínas de tipo 11S y en menor proporción proteínas de tipo 7S, resultado que era de esperarse por ser una semilla dicotiledónea. Esta es la primera vez que se caracterizan las globulinas de semilla de chíá en base al coeficiente de sedimentación, por lo que no es posible hacer comparaciones con otros estudios, sin embargo, el patrón de sedimentación obtenido es similar al que se observa en globulinas de amaranto, ajonjolí y



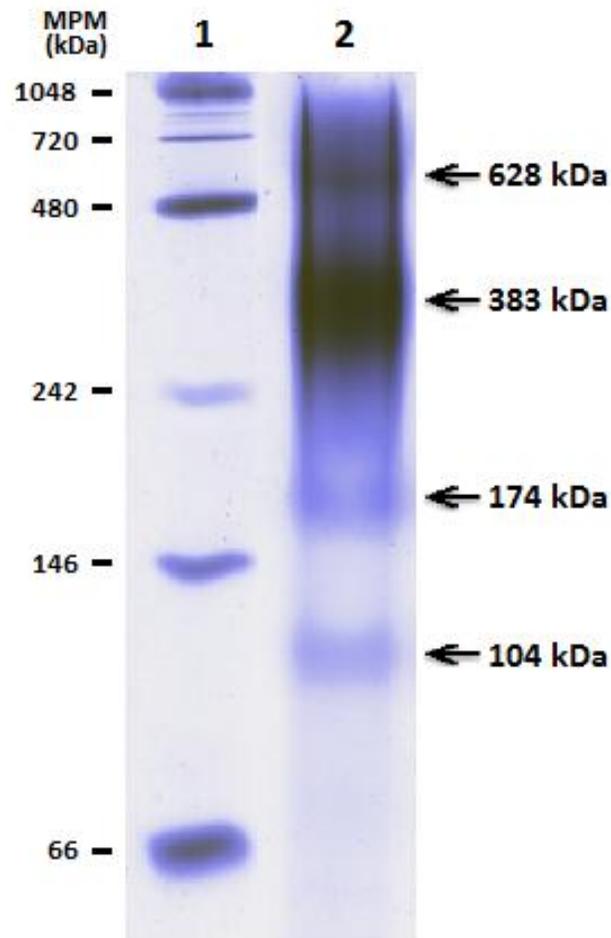
**Figura 8.** Grafico del coeficiente de sedimentación de globulinas de semilla de chía Vs concentración de proteína.

cebada, entre muchas otras semillas (Casey *et al.*, 1993; Romero-Zepeda y Paredes-López, 1995; Plietz *et al.*, 1986.). El gráfico también reveló la presencia, en muy baja proporción, de proteínas con coeficientes de sedimentación inusuales como 6S y 19S, esto se puede deber a que las globulinas 11S en ocasiones llegan a formar diferentes intermediarios de subunidades de alto peso molecular (Mori y Utsumi, 1979). Dichas proteínas también se observan en el patrón electroforético en condiciones nativas en la **Figura 9**, representadas por las bandas de 104 kDa (6S) y 628 kDa (19S). El desplazamiento de las constantes de sedimentación se pueden deber a diversos fenómenos de agregación durante el procedimiento de preparación de las globulinas (temperatura, pH, diálisis, liofilizado, etc.) (Brooks y Morr, 1985).

## **6.7.2. Electroforesis**

### **6.7.2.1. Electroforesis nativa**

En la **Figura 9** se puede observar el patrón electroforético de las globulinas en condiciones nativas, se muestran 4 bandas con pesos moleculares entre 104- 628 kDa. La mayor concentración de proteína se observa en la banda de peso molecular de 383 kDa que representa una proteína de tipo 11S, lo que además de confirmar los resultados obtenidos en la determinación del coeficiente de sedimentación, concuerda con lo reportado en la literatura donde se menciona que las proteínas de este tipo tienen una conformación hexamérica, con pesos moleculares que van de los 300 a los 400 kDa (Plietz *et al.*, 1987; Wright, 1987). Un ejemplo de ello son las globulinas 11S de semillas de amaranto, soya y lupino, las cuales en condiciones nativas tienen pesos moleculares de 390 kDa, 355 kDa y 360 kDa, respectivamente (Barba de la Rosa *et al.*, 1996). En el perfil electroforético se observa también la presencia de otro tipo de proteína que



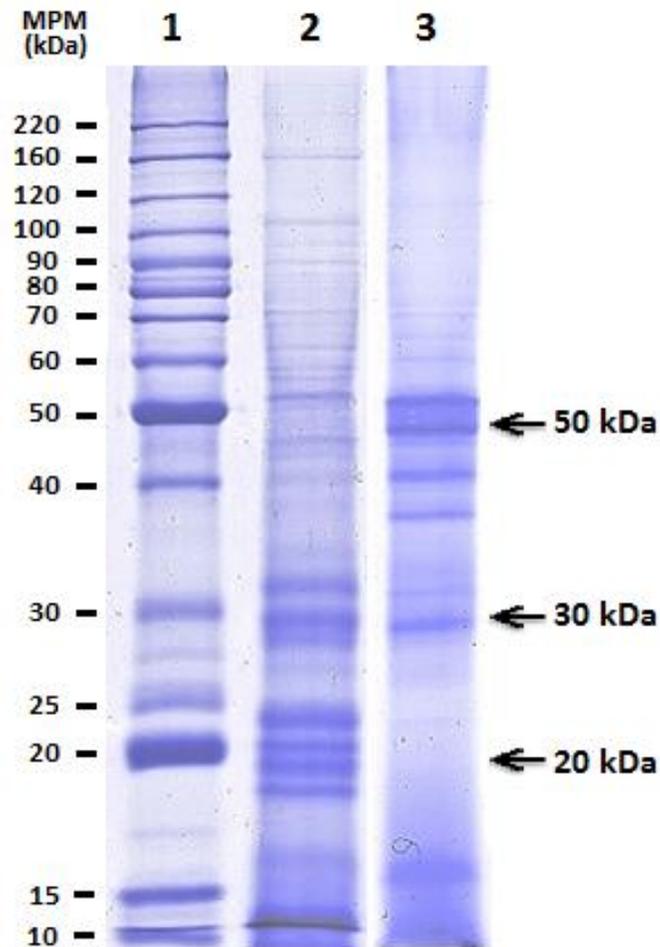
**Figura 9.** Perfil electroforético de globulinas de chíá. Análisis en condiciones nativas. Gel de acrilamida al 5% teñido con azul de Coomassie. Se cargó 20µg de proteína por carril y 5 µL de marcador de PM; Carril 1) Marcador de peso molecular 1,236 kDa (NativeMark, Life Technologies), carril 2) Globulinas nativas.

corresponde a una globulina 7S con un peso molecular de 174 kDa; lo cual concuerda con lo reportado para la estructura trimérica de algunas proteínas tipo 7S que van de los 150 a los 190 kDa, que resulta similar a la globulina 7S de semilla de lupino (180 kDa) y a la globulina 7S de soya (150 kDa), entre otras (Casey *et al.*, 1986; 1993; Shewry *et al.*, 1995).

#### **6.7.2.2. Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE)**

La fracción de globulinas fue resuelta en sus subunidades constituyentes en SDS-PAGE. Los patrones electroforéticos analizados en presencia y ausencia de agente reductor sugieren similitud con proteínas de tipo 11S. El perfil de electroforesis en condiciones reductoras (+ $\beta$ -ME) presenta subunidades de tamaño aproximado de 50 kDa que corresponden al tamaño reportado para los monómeros que componen el hexámero de una proteína 11S y en condiciones reductoras, estos monómeros se resuelven en subunidades ácidas y básicas de tamaño aproximado de 30 kDa (ácida) y 20 kDa (básica) (Nielsen *et al.*, 1995; Tai *et al.*, 1999), como se observa en el patrón electroforético de la **Figura 10**. Este comportamiento en presencia y ausencia de  $\beta$ -ME comprueba la presencia de puentes disulfuro que son de suma importancia para mantener la estructura hexamérica que caracteriza a las globulinas de tipo 11S, lo que corrobora aún más la presencia abundante de esta proteína en semilla de chíá.

Por otro lado, el patrón electroforético de las globulinas de chíá es similar al presentado por globulinas de semillas de chan (*Hyptis suaveolens* L.) que en condiciones no reductoras muestra una banda intensa de aproximadamente 50 kDa y en condiciones reductoras (+ $\beta$ -ME) se resuelve en 2 bandas intensas de 20 y 30 kDa (Aguirre *et al.*, 2011). Esta similitud se puede deber a que las dos semillas (chíá y chan) pertenecen a la misma familia (Lamiaceae) y aunque la semilla de chan aun no haya sido caracterizada mediante ultracentrifugación para

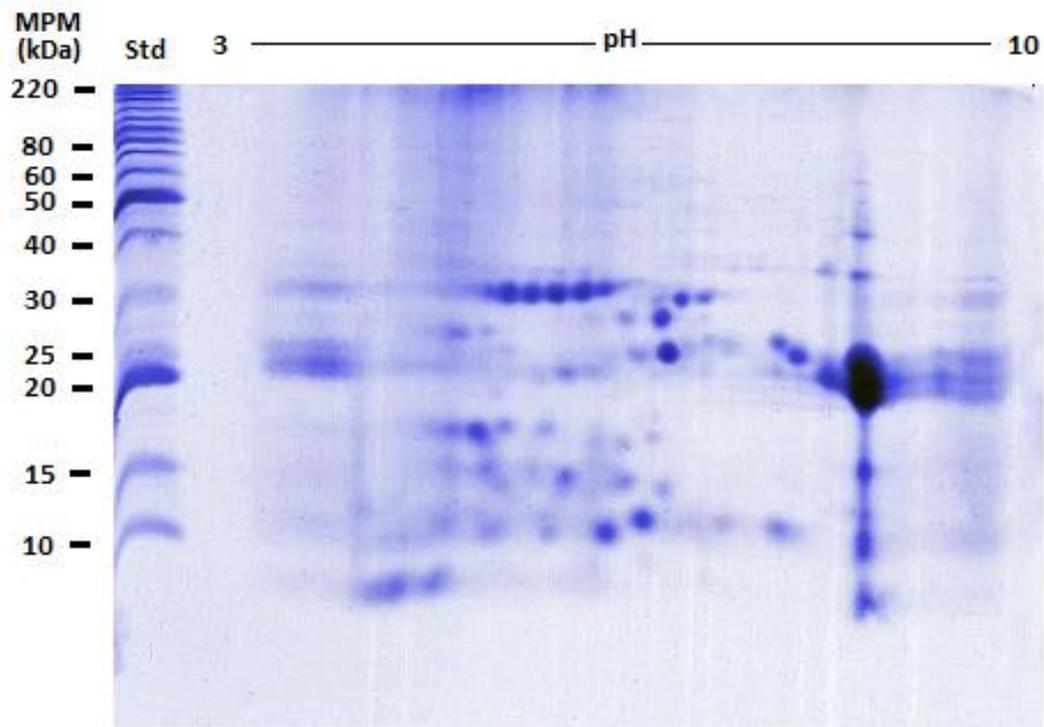


**Figura 10.** Perfil electroforético de globulinas de chíá. Análisis SDS-PAGE de globulinas de semilla de chíá, en condiciones reductoras con  $\beta$ -ME y no reductoras sin  $\beta$ -ME. Gel de acrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. Se cargó 20 $\mu$ g de proteína por carril y 5  $\mu$ L de marcador de PM; Carril 1) Marcador de peso molecular 220 kDa (BenchMark, Life Technologies), carril 2) con  $\beta$ -ME 3) Sin  $\beta$ -ME.

determinar los coeficientes de sedimentación de las globulinas, este patrón es representativo de globulinas 11S, como lo han demostrado diversos estudios en semillas de amaranto, lupinus, soya, chícharo, ajonjolí, entre otras, en lo que se han observado bandas de tamaños moleculares similares a los mencionados (Plietz *et al.*, 1987; Brooks y Morr, 1990; Barba de la Rosa *et al.*, 1996) .

### **6.7.2.3. Electroforesis bidimensional**

La fracción de globulinas fue sometida a estudios electroforéticos en dos dimensiones. El mapa proteómico de las globulinas de chíá se muestra en la **Figura 11**. En esta imagen se puede observar elevada heterogeneidad de proteínas, así como la presencia de proteínas de aproximadamente 30 kDa con tendencia a pH ácidos, lo cual indica la presencia de la subunidad ácida de la proteína 11S; por otro lado, las proteínas cuyos pesos moleculares oscilan entre los 20 kDa tienen tendencia marcada a pH básico, lo que concuerda con la presencia de la subunidad básica de la proteína 11S. Esto corrobora la teoría de la presencia mayoritaria de la globulina tipo 11S. En este patrón electroforético en dos dimensiones se puede observar mayor cantidad de péptidos que en los patrones en una dimensión mostrados con anterioridad, esto se debe a que aunque los péptidos posean masas moleculares similares, los puntos isoeléctricos son diferentes. Los numerosos spots observados en este análisis enfatizan la microheterogeneidad de estas proteínas, existe una gran variedad de series heterogéneas de moléculas semejantes aunque no idénticas en las globulinas de chíá. Por otro lado, muchas proteínas con diferentes puntos isoeléctricos sugieren modificaciones postraduccionales que pueden estar ligadas a la actividad de la proteína, localización, recambio o degradación e interacciones con otras proteínas. (Wan *et al.*, 2007; Larré *et al.*, 2010). Otra posible explicación de la microheterogeneidad observada es que puede ser ocasionada por variaciones de



**Figura 11.** Análisis bidimensional (2-DE) de la fracción globulinas de semilla de chí. Se analizaron 250  $\mu\text{g}$  de proteína en tiras de 7 cm de pH 3-10, en minigeles de acrilamida al 15%, se colocaron 6  $\mu\text{L}$  de marcador de PM. Carril (std) Marcador de peso molecular 220 kDa (BenchMark, Life Technologies).

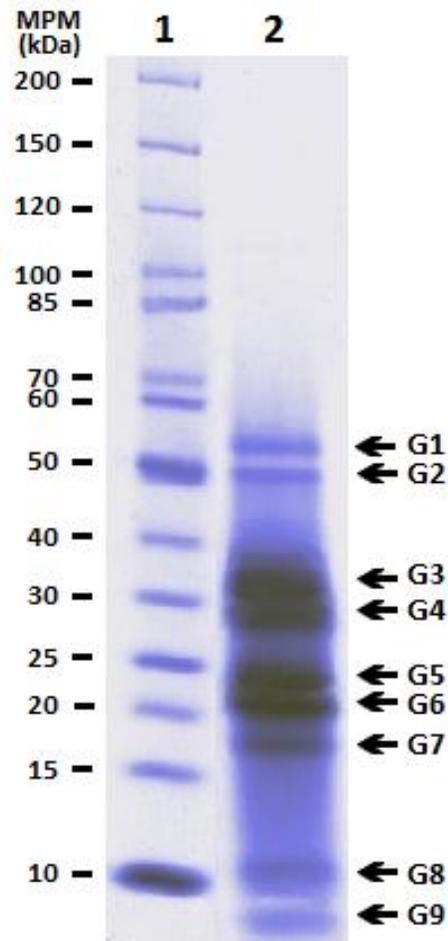
carga relacionadas al grado de amidación de los ácidos glutámicos y aspárticos y/o a la existencia de una familia de genes que codifican para estas proteínas (Komatsu *et al.*, 1993).

Es complicado hacer un análisis detallado de este mapa proteómico debido a la gran cantidad de spots obtenidos; sin embargo, observar este tipo de patrones en globulinas es común. Existen reportes de globulinas como la glicina de soya que está compuesta de al menos 13 subunidades ácidas y 11 subunidades básicas (Lei *et al.*, 1983); esta heterogeneidad también se ha observado en proteínas de alfalfa (Krocko y Bewley, 1988). Sin embargo, para detallar esta información es necesario realizar estudios más específicos sobre la síntesis y estructura de estas proteínas, además de realizar el análisis bidimensional de especies individuales purificadas.

### **6.7.3. Identificación de proteínas**

La identificación de proteínas mediante el estudio de secuencias homólogas o comparación de masas se puede llevar a cabo basándose en el hecho de que muchas proteínas de plantas, en este caso semillas, se encuentran altamente conservadas. Así, proteínas que comparten secuencias similares, es probable que desempeñen la misma función. Por esta razón, las bases de datos suelen identificar secuencias homólogas en diferentes especies que pueden facilitar la identificación y asignación de su función (Komatsu *et al.*, 2006).

A partir del patrón electroforético de las globulinas obtenido mediante la técnica Tris-Tricina (Schägger y Von Jagow, 1987)(**Figura 12**) se identificaron nueve bandas que sobresalieron ya que se expresaron con mayor intensidad, las cuales se seleccionaron y cortaron para su posterior análisis. En el **Cuadro 7** se muestran los resultados de este análisis, se puede apreciar la presencia de dos tipos de globulinas en semilla de chía: 11 y 7S. Únicamente se lograron identificar



**Figura 12.** Perfil electroforético de globulinas de chía mediante la técnica tris-tricina. Análisis SDS-PAGE de globulinas de semilla de chía, en condiciones reductoras con  $\beta$ -ME. Gel de acrilamida en gradiente del 5-13% teñido con azul de Coomassie. Se cargó 20 $\mu$ g de proteína por carril y 5  $\mu$ L de marcador de PM; Carril 1) Marcador de peso molecular 220 kDa (BenchMark, Life Technologies), carril 2) con  $\beta$ -ME.

seis péptidos, dos de ellos se identificaron como globulinas 7S y los otros cuatro péptidos dieron homología con proteínas de tipo 11S; no obstante, estos resultados nos corroboran que la proteína más abundante en semilla de chía pertenece al grupo de proteínas de reserva altamente conservadas de tipo 11S.

Los datos disponibles de secuencias de genes que codifican para proteínas o secuencias de aminoácidos de proteínas de chía está limitado por la carencia de estos, es por ello que la identificación de las proteínas descritas en este trabajo fue muy complicada y corresponde a especies vegetales diferentes a *Salvia hispanica*. El porcentaje de homología (cobertura) resultó muy bajo; sin embargo, esto es común en la identificación de proteínas de especies cuyo genoma no ha sido secuenciado, incluso es difícil obtener homologías en estas circunstancias (Nadal *et al.*, 2011). Afortunadamente los péptidos de globulinas de chía mostraron secuencias de proteínas de reserva altamente conservadas, por lo que se pudieron identificar proteínas de tipo 11S y 7S, respaldando los resultados obtenidos mediante ultracentrifugación y patrones electroforéticos.

Cabe destacar que para obtener mejores resultados es necesario contar con el genoma completo de esta semilla, aunque el uso de especies modelos secuenciadas ayuda a acelerar la caracterización. Las comparaciones de estas secuencias con el banco de datos revelan que las globulinas de chía comparten homologías con proteínas tipo 11S y 7S de semillas de ajonjolí (*Sesamum indicum*), hecho que permite crear una idea sobre la constitución y comportamiento de las proteínas de semilla de chía. El ajonjolí es muy similar a la semilla de chía ya que posee alto contenido de aceite (50%), así como también ha demostrado efectos benéficos en la disminución de la presión arterial y en el mejoramiento de los perfiles de colesterol; además, de la presencia de antioxidantes (Ogawa *et al.*, 1995; Malavé y Méndez, 2005),

La semilla de ajonjolí al igual que la chía contiene alrededor del 20% de proteína total, ha sido reconocida como buena fuente de proteína debido a que cumple con los requisitos de aminoácidos esenciales estipulados por la FAO en especial los de aminoácidos azufrados, teniendo únicamente a la lisina como

**Cuadro 7.** Identificación de globulinas de semilla de chía mediante LC-MS/MS.

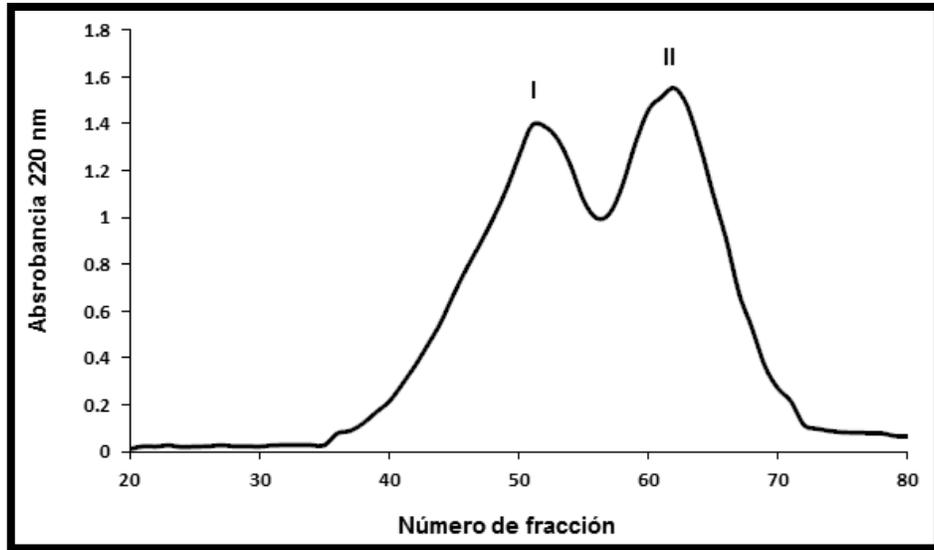
<b>Banda</b>	<b>PM/pl Teórico</b>	<b>Proteína identificada</b>	<b>Organismo</b>	<b>Coincidencia de péptidos</b>	<b>Homología (%)</b>	<b>Score</b>	<b>NCBI no.</b>
<b>G1</b>	67027/ 7.55	Globulina 7S	<i>Sesamum indicum</i>	5	4	71	gi 13183177
<b>G2</b>	67027/ 7.55	Globulina 7S	<i>Sesamum indicum</i>	6	8	66	gi 13183177
<b>G3</b>	56553/ 8.57	Globulina 11S	<i>Sesamum indicum</i>	4	5	110	gi 13183173
<b>G4</b>	56553/ 8.57	Globulina 11S	<i>Sesamum indicum</i>	4	8	112	gi 13183173
<b>G5</b>	56553/ 8.57	Globulina 11S	<i>Sesamum indicum</i>	6	10	139	gi 13183173
<b>G6</b>	56553/ 8.57	Globulina 11S	<i>Sesamum indicum</i>	5	10	134	gi 13183173
<b>G7</b>			No identificada				
<b>G8</b>			No identificada				
<b>G9</b>			No identificada				

aminoácido limitante. La proteína mayoritaria en ajonjolí es una globulina 11S que constituye aproximadamente el 60-70% de la proteína total (Sorgan *et al.*, 1999). En estado nativo posee una estructura hexamérica de tamaño molecular entre 300-350 kDa, tiene subunidades ácidas (30-40 kDa) y básicas (20-25 kDa) enlazadas por un único puente disulfuro; además, se logró aislar el gen que codifica para esta proteína, así como la expresión de ésta en sistemas heterólogos como *E. coli* (Plietz *et al.*, 1986; Tai *et al.*, 1999). Estas enormes coincidencias pueden ser de utilidad para tomar a la semilla de ajonjolí como modelo de comparación y podría ser clave para la planeación de estrategias de estudio para la caracterización y mejor aprovechamiento de la globulina 11S de semilla de chíá.

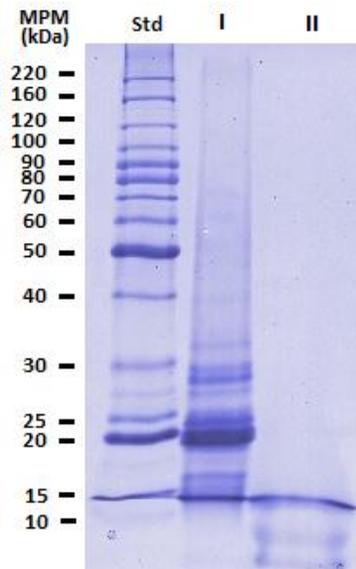
#### **6.7.4. Purificación de la proteína 11S**

##### **6.7.4.1. Filtración en gel**

Con la finalidad de purificar las especies moleculares de globulinas aisladas de semilla de chíá, se sometió esta fracción a purificación mediante filtración en gel a través de una columna de Sephacryl S-400. En la **Figura 13** se muestra el patrón de elución de las globulinas totales; se puede observar que se lograron resolver en dos grupos de diferentes tamaños moleculares; sin embargo, el resultado no fue el esperado ya que únicamente se separaron proteínas muy pequeñas, como lo muestra el patrón electroforético de los dos picos resultantes de la elución (**Figura 14**). El pico I corresponde a las proteínas de mayor tamaño (>15 kDa) y sí se compara con el patrón electroforético de las globulinas sin purificar (**Figura 10**) no se observan diferencias significativas y en el pico II únicamente existen proteínas de pesos moleculares por debajo de 15 kDa, lo que indica que esta metodología de separación no fue la adecuada para separar las especies moleculares deseadas. Esto se pudo deber a que las proteínas 11S,



**Figura 13.** Perfil de elución de filtración en gel (Sephacryl S-400) de globulinas de chí. a.



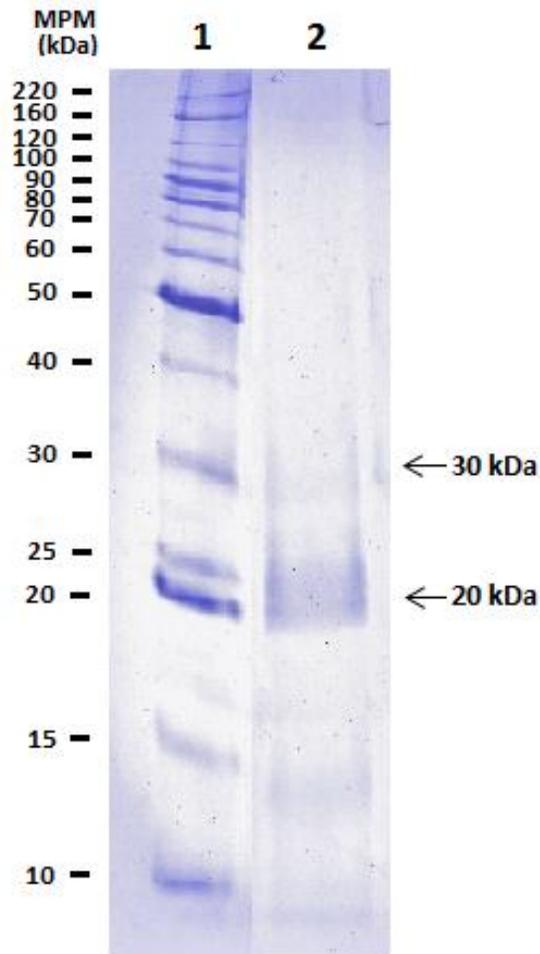
**Figura 14.** Perfil electroforético de las fracciones colectadas de la cromatografía por filtración en gel de las globulinas de chí. a. Análisis SDS-PAGE de globulinas de chí. a purificadas mediante columna de exclusión molecular. Resina Sephacryl S-400 ( $2 \times 10^4$ - $8 \times 10^6$  kDa). Gel de acrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. Se cargó 20  $\mu$ g de proteína por carril y 5  $\mu$ L de marcador de PM; Carril (std) Marcador de peso molecular 220 kDa (BenchMark, Life Technologies), carril I) Fracción I y carril II) Fracción II.

dependiendo de las condiciones de fuerza iónica y pH, sufren disociaciones que pueden reducir considerablemente su estado de agregación y eluir de formas que no son las esperadas; en el caso de las globulinas 7S se ha reportado que son capaces de formar agregados 9S y eluir primero que la fracción 11S. Además las condiciones de elución provocan la formación de complejos solubles de subunidades 7S con subunidades básicas de la fracción 11S, estos complejos dependen en gran parte de las condiciones electrostáticas del medio (Utsumi y Kinsella, 1985; Iwabuchi *et al.*, 1991), para poder predecir el patrón de elución de las globulinas de semilla de chíá es necesario realizar estudios más a fondo sobre los fenómenos de asociación/disociación de estas proteínas.

#### 6.7.4.2. Electroelución

Debido a los resultados poco favorables de la purificación mediante exclusión molecular, se planteó purificar la proteína más sobresaliente de las globulinas de chíá mediante electroelución, por lo que se seleccionó la globulina 11S. A partir de los patrones electroforéticos de las globulinas en condiciones nativas se identificó la globulina 11S como la banda de peso molecular alrededor de 383 kDa. Se cortó dicha banda y se colocó en el equipo de electroelución, una vez terminada la elución se recuperó y se concentró la proteína para poder analizarla mediante electroforesis SDS-PAGE. Los resultados de este análisis se muestran en la **Figura 15**, se aprecia claramente que se aisló satisfactoriamente la globulina 11S ya que, existen únicamente las bandas correspondientes a las subunidades ácidas (30 kDa) y básicas (20 kDa) esperadas, como ya se mencionó con anterioridad, este patrón es común en globulinas 11S de semilla (Nielsen *et al.*, 1995).

La purificación es de vital importancia para el estudio de las características de una proteína; no es fácil y muchas veces es necesario combinar varias técnicas para lograrlo; sin embargo, el hecho de tener la globulina



**Figura 15.** Perfil electroforético de la purificación de la globulina 11S mediante electroelución. Análisis SDS-PAGE de globulinas 11S. Gel de acrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie. Se cargó 20 $\mu$ g de proteína por carril y 5  $\mu$ L de marcador de PM; carril 1) Marcador de peso molecular 220 kDa (BenchMark, Life Technologies), carril 3) globulina 11S purificada en condiciones reductoras + $\beta$ -ME.

11S purificada facilita y permite el estudio detallado de la estructura, para entender mejor su función y poder predecir el comportamiento fisicoquímico en diferentes formulaciones; así como, también permite evaluar la actividad que esta pudiera poseer, aislar el gen correspondiente y mejorar genéticamente la proteína mediante ingeniería de proteínas. Existe una amplia gama de posibilidades que se plantean con la finalidad de aprovechar al máximo las cualidades y obtener el mayor beneficio nutricional de esta globulina.

## **6.8. Evaluación nutrimental**

### **6.8.1. Análisis de aminoácidos**

La composición de aminoácidos, tanto de la semilla de chía como de la fracción proteínica mayoritaria (globulinas), se muestra en el **Cuadro 8**. Se utilizó harina entera de chía y globulinas liofilizadas para este estudio. En ambas muestras se observó una elevada proporción de ácido glutámico, arginina y asparagina. El alto contenido de ácidos glutámico y aspártico es una característica común en las proteínas de reserva de semillas que tienen de manera mayoritaria la fracción de globulinas (Casey y Domoney, 1984). Esto es de suma importancia ya que los alimentos con altos niveles de ácido glutámico resultan de interés en la industria alimentaria debido al fortalecimiento del sistema inmune, a la estimulación del sistema nervioso central y al mejoramiento de la condición en deportistas (Blenford, 1996); además, las fuentes ricas en arginina colaboran en la prevención de enfermedades cardíacas (Pszczola, 2000) y, el alto contenido de ácido aspártico interviene en la regulación hormonal para el buen funcionamiento del sistema nervioso, características muy favorables para el consumo de esta semilla. Por otro lado, tanto la semilla de chía como la fracción de globulinas

**Cuadro 8.** Perfil de aminoácidos de globulinas y semilla de chía.

<b>AA</b>	<b>Semilla de chía (mg/g)</b>	<b>Globulinas (mg/g)</b>
<b>Alanina</b>	26.8 ± 0.3	39.4 ± 0.55
<b>Arginina</b>	42.3 ± 0.4	94.2 ± 1.66
<b>Asparagina</b>	47.3 ± 0.9	72.9 ± 0.4
<b>Cisteína</b>	12.0 ± 0.4	17.8 ± 0.4
<b>Glutamina</b>	70.8 ± 1.1	243.0 ± 1.3
<b>Glicina</b>	22.8 ± 0.7	73.6 ± 0.65
<b>Histidina</b>	13.7 ± 0.1	40.0 ± 0.64
<b>Isoleucina</b>	24.2 ± 0.4	30.1 ± 1.2
<b>Leucina</b>	41.5 ± 0.6	44.4 ± 1.7
<b>Lisina</b>	29.9 ± 0.5	15.4 ± 0.6
<b>Metionina</b>	15.8 ± 0.6	39.7 ± 0.5
<b>Fenilalanina</b>	23.5 ± 0.6	57.6 ± 1.1
<b>Prolina</b>	19.9 ± 0.7	106.4 ± 1.00
<b>Serina</b>	26.2 ± 0.3	69.3 ± 0.75
<b>Treonina</b>	18.0 ± 0.2	62.9 ± 1.79
<b>Tirosina</b>	15.3 ± 0.4	51.7 ± 0.74
<b>Valina</b>	28.5 ± 0.4	35.9 ± 0.6

- Los valores mostrados corresponden a la media ± desviación estándar.

mostraron buena cantidad de aminoácidos azufrados, evidencia que confirma la presencia de estructuras terciarias y cuaternarias en las proteínas, como se señaló con anterioridad en el presente trabajo.

La composición de la semilla de chía ha sido reportada por Ayerza y Coates (2005), los valores concuerdan con los reportados en este estudio, lo que señala que el perfil de aminoácidos se realizó de manera correcta. Además, queda demostrado que la chía posee un buen balance de aminoácidos y una calidad proteínica mejor a la de algunos cereales y semillas oleaginosas (Ayerza, 2010); cabe destacar que gran parte del balance de aminoácidos que presenta esta semilla es aportado por la abundante presencia de las globulinas, por lo que podemos asegurar que el uso de la semilla de chía, como de la fracción aislada de globulinas, pueden significar un gran aporte nutracéutico al ser adicionadas a cualquier producto alimenticio.

### **6.8.2. Calificación nutritiva**

La calificación nutritiva de los aminoácidos esenciales presentes en semilla de chía se muestra en el **Cuadro 9**. Se puede decir que la chía tiene un buen balance nutricional ya que en general satisface por arriba del 50% los requerimientos establecidos por la FAO (2008) para todas las edades, no obstante, el contenido de cada aminoácido respecto al patrón nutrimental se mostró entre 70-86% y para algunos aminoácidos superior al 100%. Cabe destacar que es una buena fuente aminoácidos azufrados (Met-Cis) debido a que sobrepasan los patrones establecidos, cumpliendo con más del 100% del requerimiento. La lisina es el aminoácido en menor proporción y representa el porcentaje más bajo (52-66%) seguido por treonina (58-78%) y leucina (63-70%). Por otro lado, el aislado de globulinas de chía (**Cuadro 10**) satisface por arriba del 200% los requerimientos nutricionales de aminoácidos aromáticos y azufrados para todos los grupos de diferentes edades, lo que representa beneficios a la

**Cuadro 9.** Calificación nutritiva de semilla de chía en base al patrón de requerimiento de aminoácidos establecido por la FAO (2008) para grupos de diferentes edades.

<b>Porcentaje del patrón de requerimiento (FAO 2007)</b>													
<b>AA</b>	<b>mg/g proteína</b>	<b>Niños (años)</b>										<b>Adultos</b>	
		<b>.5 a 1</b>		<b>1 a 2</b>		<b>3 a 10</b>		<b>11 a 14</b>		<b>15 a 18</b>		<b>&gt;18</b>	
		PR	%PR	PR	%PR	PR	%PR	PR	%PR	PR	%PR	PR	%PR
<b>His</b>	13.7	<b>20</b>	69	<b>18</b>	76	<b>16</b>	86	<b>16</b>	86	<b>16</b>	86	<b>15</b>	91
<b>Tre</b>	18	<b>31</b>	58	<b>27</b>	67	<b>25</b>	72	<b>25</b>	72	<b>24</b>	75	<b>23</b>	78
<b>Val</b>	28.5	<b>43</b>	66	<b>42</b>	68	<b>40</b>	71	<b>40</b>	71	<b>40</b>	71	<b>39</b>	73
<b>Met+Cis</b>	27.8	<b>28</b>	99	<b>26</b>	107	<b>24</b>	116	<b>23</b>	121	<b>23</b>	121	<b>22</b>	126
<b>Ile</b>	24.2	<b>32</b>	76	<b>31</b>	78	<b>31</b>	78	<b>30</b>	81	<b>30</b>	81	<b>30</b>	81
<b>Leu</b>	41.5	<b>66</b>	63	<b>63</b>	66	<b>61</b>	68	<b>60</b>	69	<b>60</b>	69	<b>59</b>	70
<b>Fen+Tir</b>	38.8	<b>52</b>	75	<b>46</b>	84	<b>41</b>	95	<b>41</b>	95	<b>40</b>	97	<b>38</b>	102
<b>Lis</b>	29.9	<b>57</b>	52	<b>52</b>	58	<b>48</b>	62	<b>48</b>	62	<b>47</b>	64	<b>45</b>	66

- PR= Patrón de requerimiento de aminoácidos establecido por la FAO (2007) para grupos de diferentes edades (miligramo de aminoácido por gramo de proteína).
- %PR=Porcentaje del requerimiento cumplido.

**Cuadro 10.** Calificación nutritiva de globulinas de chíá en base al patrón de requerimiento de aminoácidos establecido por la FAO (2008) para grupos de diferentes edades.

<b>Porcentaje del patrón de requerimiento (FAO 2007)</b>													
<b>AA</b>	<b>mg/g proteína</b>	<b>Niños (años)</b>										<b>Adultos</b>	
		<b>.5 a 1</b>		<b>1 a 2</b>		<b>3 a 10</b>		<b>11 a 14</b>		<b>15 a 18</b>		<b>&gt;18</b>	
		<b>PR</b>	<b>%PR</b>	<b>PR</b>	<b>%PR</b>	<b>PR</b>	<b>%PR</b>	<b>PR</b>	<b>%PR</b>	<b>PR</b>	<b>%PR</b>	<b>PR</b>	<b>%PR</b>
<b>His</b>	40.0	<b>20</b>	200	<b>18</b>	222	<b>16</b>	250	<b>16</b>	250	<b>16</b>	250	<b>15</b>	267
<b>Tre</b>	62.3	<b>31</b>	201	<b>27</b>	231	<b>25</b>	249	<b>25</b>	249	<b>24</b>	260	<b>23</b>	271
<b>Val</b>	35.9	<b>43</b>	83	<b>42</b>	85	<b>40</b>	90	<b>40</b>	90	<b>40</b>	90	<b>39</b>	92
<b>Met+Cis</b>	57.5	<b>28</b>	205	<b>26</b>	221	<b>24</b>	240	<b>23</b>	250	<b>23</b>	250	<b>22</b>	261
<b>Ile</b>	30.1	<b>32</b>	94	<b>31</b>	97	<b>31</b>	97	<b>30</b>	100	<b>30</b>	100	<b>30</b>	100
<b>Leu</b>	44.4	<b>66</b>	67	<b>63</b>	70	<b>61</b>	73	<b>60</b>	74	<b>60</b>	74	<b>59</b>	75
<b>Fen+Tir</b>	109.3	<b>52</b>	210	<b>46</b>	238	<b>41</b>	267	<b>41</b>	267	<b>40</b>	273	<b>38</b>	288
<b>Lis</b>	15.4	<b>57</b>	27	<b>52</b>	30	<b>48</b>	32	<b>48</b>	32	<b>47</b>	33	<b>45</b>	34

- PR= Patrón de requerimiento de aminoácidos establecido por la FAO (2007) para grupos de diferentes edades (miligramo de aminoácido por gramo de proteína).
- %PR=Porcentaje del requerimiento cumplido

salud debido a que los alimentos ricos en aminoácidos azufrados contribuyen en la formación de colágeno y queratina para una buena salud de la piel y cabello, mejora las funciones inmunitarias del organismo y el rendimiento físico. Por otro lado los alimentos ricos en aminoácidos aromáticos son de interés debido a que ayudan a regular los niveles adecuados de serotonina en el cerebro, intervienen en la regulación hormonal y del sistema nervioso (Blenford, 1996); las globulinas de chíá cumple también con los requerimientos de los demás aminoácidos esenciales por encima del 65%, con excepción de la lisina que se encuentra en muy baja proporción ya que es el aminoácido limitante de esta fracción y de la semilla entera.

Esta información es de utilidad para la formulación de dietas que cumplan con las necesidades nutritivas en las diferentes etapas del crecimiento humano, por lo que, acorde a los resultados obtenidos podemos aseverar que la chíá o la fracción aislada de globulinas pueden ser utilizadas en formulaciones de dietas para adultos, y para el caso de las dietas de niños debe ser complementada por algunas leguminosas u otro alimento rico en lisina.

### **6.8.3. Digestibilidad *in vitro***

Los resultados del estudio de digestibilidad *in vitro* se muestran en el Cuatro 11, este análisis reveló que la harina deslipidizada de chíá presenta una digestibilidad *in vitro* de 78.9%, superior a las reportadas para harinas de garbanzo (75.2%) (Sánchez-Vioque *et al.*, 1999), frijol negro (73.8%) (*Phaseolus vulgaris*) (Carbonaro *et al.*, 1997) y frijol lima (72,4%) (*P. lunatus*) (Betancur-Ancona *et al.*, 2004), lo que muestra un alto nivel de digestibilidad. No se tienen reportes de factores anti-nutricios en la chíá, con lo cual se podría descartar la presencia de inhibidores de proteasas que pudieran retardar la digestibilidad *in vitro*, aunque hay reportes de la presencia de compuestos fenólicos antioxidantes, los cuales pueden disminuir el aprovechamiento de las proteínas (Siddhuraju y Becker, 2001;

**Cuadro 11.** Digestibilidad *in vitro* de globulinas y harina de chíá.

<b>Muestra</b>	<b>Porcentaje de digestibilidad <sup>a</sup></b>
<b>Globulinas</b>	82.5 ± 1.05
<b>Harina sin mucílago</b>	80.7 ± 1.05
<b>Harina con mucílago</b>	78.9 ± 1.05
<b>Caseína</b>	88.6 ± 1.05

<sup>a</sup> Los valores mostrados corresponden a la media ± desviación estándar.

Ixtania *et al.*, 2011). Este valor de digestibilidad es un indicador de la calidad nutrimental de las proteínas de semilla de chía y puede estar asociado a la estructura de las estas, al tener diferencias en estructura terciaria y cuaternaria presentan diferente susceptibilidad a las enzimas proteolíticas (Deshpande y Damodaran, 1990). Por otro lado la metodología que se siguió para desgrasar la semilla requiere de calentamiento del hexano para retirar la grasa, el efecto de este calentamiento puede incrementar la digestibilidad de las proteínas ya que el tratamiento térmico puede destruir la pared celular y permitir el ataque enzimático (Finot, 1997). La harina de chía desgrasada y sin mucílago mostró mayor digestibilidad *in vitro* que la semilla con mucílago, lo cual era de esperarse ya que el mucílago es parte de la fibra presente en la semilla y al retirarla la digestión se facilita. Por último, se determinó la digestibilidad *in vitro* de las globulinas aisladas de semilla de chía que resulto elevada (82.5%), el valor está ligeramente por debajo de la digestibilidad *in vitro* determinada para la caseína (88.6%) usada como control. Sin embargo, la determinación de la digestibilidad *in vivo* es necesaria.

## VII. CONCLUSIONES

Acorde a los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que la chía es una buena fuente de ácidos grasos, fibra y sobre todo de proteína, ya que el contenido de proteína es mayor al de los granos que se consumen normalmente.

La fracción con mayor presencia en esta semilla fue por mucho la de globulinas además de que mostró en el perfil electroforético una mayor cantidad de bandas de las cuales destacaron nueve mayoritarias con pesos entre 19 y 35 kDa.

En el análisis térmico de las cuatro fracciones se observó en general buena estabilidad térmica, los termogramas mostraron un pico único de desnaturalización para las cuatro fracciones; sin embargo, las fracciones de albúminas y globulinas destacaron por las temperaturas de desnaturalización arriba de los 100 °C lo cual se considera alto con respecto a lo reportado para proteínas de fuentes vegetales como leguminosas y cereales. En base a esto podemos asegurar que las proteínas presentes en semilla de chía, en especial albúminas y globulinas, pueden ser utilizadas para enriquecer productos específicos donde las estructuras nativas deban de ser mantenidas bajo procesos alimenticios que requieran elevadas temperaturas.

Se encontró que las globulinas de semilla de chía son principalmente de dos tipos: 7S y 11S, esto acorde a los resultados de la determinación del coeficiente de sedimentación mediante ultracentrifugación, no obstante estos resultados se corroboraron mediante espectrometría de masas donde se lograron identificar 6 péptidos de los cuales dos correspondieron a proteínas de tipo 7S y cuatro péptidos dieron homología con globulinas de tipo 11S; además los perfiles electroforéticos de las globulinas en condiciones nativas, desnaturalizantes no reductoras y reductoras revelaron la abundante presencia de la proteína 11S en esta semilla, ya que en condiciones nativas se observa mayormente una proteína

de 383 kDa que se resuelve en condiciones desnaturalizantes no reductoras, en una banda de peso aproximado de 50 kDa y en condiciones reductoras esta última se descompone en dos grupos de 20 kDa y 30 kDa.

El análisis bidimensional de las globulinas de semilla de chía permitió ver la gran diversidad de péptidos presentes, lo que confirma una alta actividad traduccional dinámica de estas semillas, así como también se distinguieron los péptidos de las subunidades ácidas (30 kDa) y básicas (20 kDa) de la globulina 11S.

En cuanto a la evaluación nutrimental en general tanto la semilla de chía entera como la fracción de globulinas aisladas mostraron un buen balance de aminoácidos esenciales, siendo una fuente rica en aminoácidos azufrados, de tal manera que el requerimiento de azufrados sugerido por la FAO quedo cubierto por ambas, por su parte las globulinas aisladas presentaron altos contenido de aminoácidos aromáticos; sin embargo, tiene como aminoácido limitante a la lisina, por lo que la recomendación de consumo debe de ir acompañada de fuentes ricas en este aminoácido.

La fracción de globulinas de chía mostró rasgos estructurales muy similares a globulinas tipo 11S con la ventaja adicional de que posee un alto contenido de aminoácidos esenciales, cabe destacar que gran parte del balance de aminoácidos que presenta esta semilla es aportado por la abundante presencia de las globulinas, por lo que podemos asegurar que el uso tanto de la semilla de chía como de la fracción aislada de globulinas, significarían un gran aporte nutraceutico al ser adicionadas a cualquier producto alimenticio, así como también pueden ser utilizadas para proporcionar a la gente una dieta nutricionalmente mejor balanceada con una influencia potencialmente positiva sobre la salud.

La digestibilidad *in vitro* en la fracción de globulinas resultó mayor comparada con la harina cruda y la haría sin mucílago de semilla de chía, que a su vez presentaron valores ligeramente por debajo del valor de digestibilidad calculado para la caseína, lo cual se considera como buena digestibilidad que se

considera como un indicador de buena calidad nutrimental de las proteínas de semilla de chía.

Este estudio prevé la base para una comparación más específica con otros tipos de granos de interés agroalimentario y justifican el uso potencial de la semilla de chía como fuente de proteínas de origen vegetal, lo cual amplía las posibilidades de esta semilla para integrarse a la industria alimenticia como un alimento nutracéutico. Por otro lado el hecho de que la proteína mayoritaria de esta semilla sea una globulina 11S amplía un área de estudio sumamente interesante para el sector alimenticio.

## VIII. PERSPECTIVAS

Con base a los resultados de este trabajo, se puede afirmar que existen perspectivas amplias, en relación al estudio estructural de la globulina 11S de semilla de chía y el gen que la codifica, con esta información se tendrán las bases necesarias para intentar modificar las propiedades nutricionales y funcionales de esta proteína.

Para lograrlo es necesario realizar la caracterización molecular y funcional más detallada de esta proteína para facilitar el entendimiento de los mecanismos de regulación y la biogénesis del cDNA.

Así como también el hecho de aislar y secuenciar el cDNA de la proteína 11S permitirá verificar mediante herramientas de bioinformática la presencia de péptidos con algún tipo de actividad biológica.

Posteriormente una estrategia a seguir es la expresión de esta proteína en sistemas heterólogos como *Escherichia coli* ó *Pichia pastoris* y entender la biogénesis de la proteína desde un punto de vista biológico.

Una vez caracterizada y entendida la función de la proteína, un posible objetivo sería la expresión del cDNA de la proteína 11S en plantas de interés agronómico y de consumo tradicional, con el fin de mejorar el balance de aminoácidos esenciales de productos alimentarios.

Por otro lado mediante proteómica la idea sería llegar a asignar la función específica a cada péptido. Los estudios proteómicos conducirán a la definición del perfil dinámico de repertorio de proteínas de plantas, ayudando a la comprensión del metabolismo de semillas; además, una vez que se concluyera la identificación de los péptidos, se podrían comprender los puntos de control clave en la regulación global del metabolismo o entre procesos específicos y finalmente esto podría permitir la manipulación de las características de nutricionales y funcionales de la proteína.

## IX. LITERATURA CITADA

- Adachi, M., Kanamori, J., Masuda, T., Yagasaki, K. y Kitamura, K. 2003. Crystal structure of soybean 11S globulin: glycinin A3B4 homohexamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:7395–400.
- Aguirre, C., Torres, I., Mendoza-Hernández, G., García-Gasca, T., y Blanco-Labra, A. 2011. Analysis of protein fractions and some minerals present in chan (*Hypstys suaveolens* L.) seeds. *Journal of Food Science* 71:15-19.
- Ahmed M, I.P., Ting R.W y Scora. 1994. Leaf oil composition of *Salvia hispanica* L. from three geographical areas. *Journal of Esentials Oil Research* 6:223-228.
- Almeida, G. 1997. “Dieta y salud”. Kellogg’s América Latina Vol.7, No.1.
- Argos, P., Narayana, S.V.L. y Nielsen, N.C. 1985. Structural similarity between legumin and vicilin storage proteins from legumes. *Plant Molelular Biology*. 5:165-173.
- Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.) 1990. Official methods of analysis. 15 th Ed. Washington D.C. 684.
- Aufrère, J.L., Graviou, D., Demarquilly, C., Andrieu, J., Emile, J.L., Giovanni, R. y Maupetit, P. 1992. Estimation of organic matter digestibility of whole maize plant by laboratory method. *Animal Feed Science and Technology* 36:187-204.
- Ayerza, R. 1995. Oil content and fatty acid composition of oil of chia (*Salvia hispanica* L.) from five locations in Northwestern Argentina. *Journal of American Oil Chemist’s Society* 72:1079-1081.
- Ayerza, R. 2000. Dietary levels of chia: Influence in yolk cholesterol, lipid content and fatty acid composition for two strains of hens. *Poultry Science* 79:724-739.
- Ayerza, R. y Coates, W. 2001. The omega-3 enriched eggs: the influence of dietary linolenic fatty acid source combination on egg production and composition. *Journal of Animal Science* 81:355-362.
- Ayerza, R. y Coates, W. 2005. Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutrition Research* 25:995-1003.
- Ayerza, R. y Coates, W. 2010. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Industrial Crops and Products* 21:5582-5588.

- Badley, R.A., Atkinson, D., Jauser, H., Oldani, D., Green, J.P. y Stubbs, J.M. 1975. The structure, physical and chemical properties of soybean protein glycinin. *Biochemical et Biophysical Acta* 412:214-228.
- Badui, D.S. 1990. *Química de los alimentos*. Editorial Alhambra Universidad. 2da edición.
- Barba de la Rosa, A.P., Gueguen J., Paredes-López, O. y Viroben, G. 1992. Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid of Amaranth seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40:931-936.
- Barba de la Rosa, A. P., Herrera, A., Utsumi, S. y Paredes-López, O. 1996. Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *Journal of Plant Physiology* 149:527-532.
- Bartholomai, G.B. y Pilosof, A.M. 2000. *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. 2000. EUDEBA. CYTED. Buenos Aires, Argentina.
- Beltrán-Orozco, M.C. y Romero, M.R. 2003. Chía, alimento milenario. *Revista Industria Alimentaria* Septiembre/Octubre:20-29.
- Beltrán-Orozco, M.C., Salgado-Cruz, M.P. y Cedillo-López, D. 2005. Estudio de las propiedades funcionales de la semilla de chía (*Salvia hispanica*) y de la fibra dietaria obtenida de la misma. *Memorias del VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. p.358-366. Guanajuato, Gto.
- Betancur-Ancona, D., Gallegos-Tintoré, S. y Chel-Gerrero, L. 2004. Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: Partial characterization of starch and protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84:1193-1201.
- Bienvenut, W.V., Sanchez, J. C., Karmime, A., Rougue, V., Rose, K., Binz, P.A., Hochstrasser, D.F. 1999. Toward a clinical molecular scanner for proteome research: parallel protein chemical processing before and during western blot. *Anal. Chem.* 71:4800-4807.
- Blenford D.E. 1996. Use of amino acids and peptides in sport nutrition. *International Foods Ingredients* 3:20-23.
- Bolwell, G.P., Slabas, A.R. y Whitelgge J.P. 2004. Proteomics: empowering systems biology in plants. *Phytochemistry* 65(12):1665-1669.
- Borchardt, H. y Daniels, F. 1957. The Application of Differential Thermal Analysis to the Study of Reaction Kinetics. *Journal of the American Chemical society* 79 (1):41-46.

- Branlard, G. y Bacel, E. 2006. Plant Proteomics: methods and protocols. *Methods in Molecular Biology* 335:15- 25.
- Brooks, J.R. y Morr, C.V. 1985. Current aspects of soy protein fractionation and nomenclature. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 62:1347-1353.
- Brown, G. y Coates. 2001. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *Journal of Medicine* 345(22):1584-1592.
- Bueno, M., Di Sapio, O., Barolo, M., Busilacchi, H., Quiroga, M. y Severin, C. 2010. Análisis de la calidad de los fruto de *Salvia hispanica* L. (*Lamiaceae*) comercializados en la ciudad de Rosario (Santa Fe, Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 9(3):221-227.
- Bushway A.A., Belya P.R. y Bushway R.J. 1981. Chia seed as a source of oil, polysaccharide and protein. *Journal of Food Science* 46:1349-1356.
- Bushway, A. A., Wilson, A.M., Houton, L. y Buhway R.J. 1984. Selected proprieties of the lipid and protein from chia seed. *Journal of Food Science* 49:555-557.
- Cahill, J.P. 2003. Ethnobotany of chia, *Salvia hispanica* L. *Economic Botany* 57:604-618.
- Cahill, J.P. 2004. Genetic diversity among varieties of chia (*Salvia hispanica* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution* 51:773-781.
- Cahill, J.P. y Ehdaie, B. 2005. Variation and heritability of seed mass in chia (*Salvia hispanica* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution* 52:201-207.
- Calderón, S. 1941. Flora salvadoreña. Lista preliminar de plantas de El Salvador. 2da ed., corregida y aumentada. Imprenta Nacional, San Salvador, El Salvador, C.A. p. 442.
- Cánovas F.M., Dumas-Gaudot, E., Recobert, G., Jorin, J., Mock, H.P. y Rossignol, M. 2004. Plant proteome analysis. *Proteomics* 4:285-298.
- Carbonaro, M., Cappelloni, M., Nicoli, S., Lucarini, M. y Carnovale, E. 1997. Solubility-digestibility relationship of legume proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:3387-3394.
- Casey, R. y Domoney, C. 1984. The genetics of legume storage proteins. *Philosophical Transaction of the Royal Society London B* 304:349-358.

- Casey, R. Domoney, C. y Ellis, N. 1986. Legume storage proteins and their genes. En: Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology (Ed. B.J. Mifflin) 1-95. Oxford university Press, Oxford.
- Casey, R., Domoney, C., y Smith, A.M. 1993. Biochemistry and molecular biology of seed products. En Peas: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology. eds Casey, R., Davies, D.R. (CAB International, Wallingford, UK), p.121–163.
- Chan, Chi-Wa y Philips, R.D. 1994. Amino acid composition and subunit constitution of protein fractions from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). Journal of Agricultural and Food Chemistry 42:1857-1860.
- Cheftel, J. C. 1989. En Proteínas Alimentarias; Ed. Acribia, Zaragoza, A. S. A. Capítulo 4:49-100.
- Chen, S. y Paredes-López, O. 1997. Isolation and characterization of the 11S globulin from amaranth seeds. Journal of Food Biochemistry 22:53-65.
- Coates, W. y Ayerza, R. 1996. Production potential of chia in northwestern Argentina. Industrial Crops and Products 5:229-233.
- Coleman, C.E. y Larkis, B.A. 1999. The prolamins of maize. En: PR Shewry, R Case, eds. Seed Proteins. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p.109–139.
- Damodaran, S. 1989. Interrelationship of molecular and functional properties of food proteins. In Food Proteins; Kinsella, J. E., Soucie, W. G., Eds.; American Oil Chemists' Society: Champaign, IL. Capítulo 3:21-51.
- Damodaran S. 1997. Protein-stabilized foams and emulsions. In: Damodaran S, Paraf A, editors. Food proteins and their applications. New York: Marcel Dekker. p.57–110.
- Dávila-Ortiz, G. 1996. Métodos para el estudio bioquímico de proteínas. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Apuntes. Morelos Méx.
- Deshpande, S.S. y Damodaran, S. 1990. Conformational characteristics of legume 7S globulins as revealed by circular dichroic, derivative U.V. absorption and fluorescence techniques. International Journal of Peptide and Protein Research 35:25-34.
- Desiere, F., Deutsh, E.W., Nesvizhskii, A.I., Millick, P., King, N.L., Eng, J.K., Aderem, A., Boyle, R., Brunner, E., Donohoe, S., Fausto, N., Hafen, E., Hood, L., Katze, M.G., Kennedy, K.A., Kregenow, F., Lee, H., Lin, B., Martin, D., Ranish, J.A., Rawling, D.J., Samelson, L.E., Shio, Y., Watts, J.D., Wollscheid, B., Wright, M.E., Yan, W., Yang, L., Yi, E.C., Zhang, H. y

- Aebersold, R. 2004. Integration with the human genome of peptide sequences obtained by high-throughput mass spectrometry. *Genome Biology* 6(1):R9.
- Devinder, D., Mona, M., Hradesh, R. y Patil, R. 2011. Dietary fiber in foods: a review. *Journal of Food Science and Technology* 49(3):63-69.
- Di Sapia, O., Bueno, M., Busilacchi, H., Quiroga, M. y Severin, S. 2012. Caracterización morfoanatómica de hoja, tallo, fruto y semilla de *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 11(3):249–268.
- Domínguez-Vázquez, G., Berlin, B., Ramírez-Castro, A. y Estrada-Lugo, E. 2002. Revisión de la diversidad y patrones de distribución de *Labiatae* en Chiapas. *Anales del Instituto de Biología* Vol.73.
- Duranti, M. y Gius, C. 1997. Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field Crops Research* 53:31-45.
- Dubois, V., Brenton, S., Linder, M., Fanni, J. y Parmentier, M. 2007. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109:710-732.
- EFSA 2005. Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the Commission related to the safety of chia (*Salvia hispanica* L.) seed and ground whole chia seed as a novel food ingredient intended for use in bread. *The EFSA Journal* 278:1–12.
- EFSA 2009. Scientific opinion of the panel on dietetic products nutrition and allergies on a request from the European Commission on the safety of chia seed (*Salvia hispanica*) and ground whole chia seed' as a food ingredient. *The EFSA Journal* 996:1–2.
- FAO/WHO/UNU. 2008. Protein and amino acids requirements in human nutrition. *WHO Technical Report Series* 935:135-183, 247- 248.
- Faurobert, M., Mihir, C., Bertin, N., Pawlowski, T., Negroni, L., Sommerer, N. y Causse, M. 2007. *Plant Physiology* 143:1327-1346.
- Ferguson, P.L. y Smith, R.D. 2003. Proteome analysis by mass spectrometry. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 32:399-424.
- Finot, P.A. 1997. Effects of processing and storage on the nutritional value of food proteins. En Damodaran S. y Paraf A. (eds), *Food Proteins and their Applications*. New York: Marcel Dekker Inc. p.551-577.
- Friedman, M. 1996. Nutritional value of proteins from different food sources: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44:6-29.

- Fukushima, D. 1991. Structures of plant storage proteins and their function. *Food Reviews International* 7:353-381.
- Fukushima, D. 1994. Recent progress on biotechnology of soybean protein and soybean protein food products. *Food Biotechnology* 8:83-135.
- Genov, N., Goshev, I., Nikolova, D., Georgieva, D.N., Filippi, B. y Svendsen I. 1998. A novel thermostable inhibitor of trypsin and subtilisin from the seeds of *Brassica nigra*: amino acid sequence; inhibitory and spectroscopic properties and thermostability. *Biochemical et Biophysical Acta* 1341:157-164.
- Gibbs, P.E.M., Strongin, K.B. y McPherson, A. 1989. Evolution of legume seed storage proteins. A domain Common to legumins and vicilins is duplicate in vicilins. *Molecular Biology and Evolution* 6:614-623.
- Gottlieb, D.M., Schultz, J., Bruun, S.W., Jacobsen, S. y Sondergaard. 2004. Multivariate approaches in plant science. *Phytochemistry* 65:1531-1548.
- Gruís, D.F., Schulze, J. y Jung, R. 2004. Storage protein accumulation in the absence of the vacuolar precession enzyme family of cysteine proteases. *The Plant Cell* 16:270-290.
- Gueguen, J., y Azanza, A. 1985. Propiétés biochimiques et physichimiques des protéines végétales. En *Protéines Vegetales* (Ed. M.B. Godon) 135-160. Lavoiser, Tech and Doc Pans France.
- Harwalkar, V.R. y Ma, C. 1987. Study of thermal properties of oat globulin by differential scanning calorimetry. *Journal of Food Science* 52, 394- 398.
- Herman, E.M. y Larkins, B.A. 1999. Protein storage bodies and vacuoles. *The Plant Cell* 11:601-613.
- Hernández, L. 1994. La flora endémica de la Sierra de Manantlán, Jalisco-Colima. *Observaciones Preliminares*.
- Hernández, J.A. y Miranda, S. 2008. Caracterización morfológica de chia (*Salvia hispanica* L.). *Revista fitotecnia Mexicana* 31:105-113.
- Hernández-Gómez, J.A., Miranda-Colín, S. y Peña-Lomelí, A. 2008. Cruzamiento natural de chía (*Salvia hispanica* L.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(3): 331-337.
- Herrera, C.F., Bolaños, N. y Lutz, G. 2003. *Química de alimentos: manual de laboratorio*. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 1er edición p.37.
- Higgins, T.J.V. 1994. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Annual Review of Plant Physiology* 35:191-221.

- Hsu, H., Vavak, D., Satterlee, L. y Miller, G.A. 1977. Multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science* 42:1269-1279.
- l'Anson, K.J., Bacon, J.R., Lambert, N., Miles, M.J., Morris, V.J., Wright, D.J. y Nave, C.A. 1987. Synchrotron radiation wide angle X-ray scattering studies of glycinin solutions. *International Journal of Biological Macromolecules* 9:368-370.
- Iwabuchi, S., Watanabe, H., y Tamuachi, F. 1991. Observations on the dissociation of  $\beta$ -conglycin into subunits by heat treatment. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 39:34-40.
- Ixtaina, V.Y., Nolasco, S.M. y Tomás, M.C. 2008. Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Industrial Crops and Products* 28(3):286–293.
- Ixtania, V., Martínez, M., Sportorno, V., Mateo, M., Maestri, D., Diehl, B., Nolasco, S., y Tomás, M. 2011. Characterization of chia seed oils by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis* 24:166-174.
- Jamboonsri, W., Phillips, T., Geneve, R. y Cahill, J. 2012. Extending the range of an ancient crop, *Salvia hispanica* L. a new omega3 source. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59:171-178.
- Ju, Z.Y., Hettiarachchy, N.S. y Rath, N. 2001. Extraction, denaturation, and hydrophobic properties of rice flour proteins. *Journal of Food Science* 66:229-232.
- Katsube, T., Kurisaka, N., Ogawa, M., Maruyama, N., Ohtsuka, R., Utsumi, S. y Takaiwa, F. 1999. Accumulation of soybean glycinin and its assembly with the glutelins in rice. *Plant Physiology* 120:1063-1073.
- Kawamura, Y. 1997. Food protein and antihypertensive peptides. *Farming Japan* 31:14-19.
- Kinsella, J.E. 1976. Functional properties of food proteins: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 7:219.
- Kinsella, J. E. 1984. Milk proteins: Physicochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 21:197-262.
- Klages, F. 1968. *Tratado de Química Orgánica*. Editorial Reverté. Tomo II, p. 482.
- Ko, T.P., Ng, J.D. y McPherson, A. 1993. The three-dimensional structure of canavalin from jack bean (*Canavalia ensiformis*). *Plant Physiology* 101:729-744.
- Komatsu, S., Kajiwara, H., Hirano, H. 1993. A rice protein library: a data-file of rice proteins separated by tow-dimensional electrophoresis. *TAG* 86:935-942.

- Komatsu, S., Zang, X. y Tanaka. 2006. Comparison of two proteomics technique used to identify proteins regulated by gibberelin in rice. *Journal of Proteome Research* 5:270-276.
- Krocko, J.E. y Bewley, K.D. 1988. Use of electrophoretic techniques in determining the composition of seed storage proteins in alfalfa. *Electrophoresis* 9:751-763.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 217:680-685.
- Lambert, W. y Yarwood. J. N. 1992. Engineering legume seed storage proteins. En *Plant Protein*. Shewry, P.R. y Guteridge, S. (eds.). Cambridge University Press. Londres. p.167-187.
- Larré, C., Penninck, S., Boucht, B., Lollier, V., Tranquet, O., Denery-Papini, S., Guillon, F. y Rogniaux, H. 2010. *Brachypodium distachyon* grain: identification and subcellular localization of storage proteins. *Journal of Experimental Botany* 61:1771-1783.
- Lásztity, R. 1984. Maize protein. The chemistry of cereal proteins. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Lawrence, M.C., Suzuki, E., Varghese, J.N., Davis, P.C., VanDonkelaar, A., Tulloch, P.A. y Colman, P.M. 1990. The three-dimensional structure of the seed storage protein phaseolin at 3 Å resolution. *EMBO Journal* 9:9-15.
- Lawrence, M.C., Izard, T., Beuchat, M., Blagrove, R.J. y Colman, P.M. 1994. Structure of phaseolin at 2.2 Å resolution. *Journal of Molecular Biologist* 238:748-776.
- Lawrence, M.C. 1999. Structural relationships of 7S and 11S globulins. En: *Seed Proteins* (Eds. Shewry, P. y Casey, R.) Kluwer, Dordecht, The Netherlands 517-544.
- Lazcano, M. y Cuellar, D. 2004. Caracterización de una glosina amaranto-avena-miel. *Memorias VI Congreso de Ciencias de los Alimentos. Revista Salud Pública y Nutrición Edición Especial No.6.*
- Lei, M.G., Tyrell, D., Bassette, R. y Reeck, G.R. 1983. Two-dimensional electrophoretic analysis of soybean proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 21:963.
- Lin, K., Daniel, J. y Whistler, R. 1994. Structure of chia seed polysaccharide exudates. *Carbohydrate Polymers* 23:13-18.

- Liu, H., Liu, Y., Yang, M. y Shen, S. 2009. A comparative analysis of embryo and endosperm proteome from seeds of *Jatropha curcas*. Journal of Integrative Plant Biology doi: 10.1111/j. 1744-7909.2009.00839.x.
- Luna-Suárez, S., Medina-Godoy, S., Cruz-Hernández, A. y Paredes-López, O. 2008. Expression and characterization of the acidic subunit from 11S Amaranth seed protein. Biotechnology Journal 3:209–219.
- Luna-Suarez, S., Medina-Godoy, S., Cruz-Hernández, A. y Paredes-López, O. 2010. Modification of the amaranth 11S globulin storage protein to produce an inhibitory peptide of the angiotensin converting enzyme, and its expression in *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology 10:1016.
- Malavé, A.A. y Méndez, J.R. 2005. Comparación de la composición lipídica de ajonjolí (*Sesamun indicum*) técnicas multivariadas. Revista UDO Agrícola 5(1):48-53.
- Mandal, R.K. y Mandal, S. 2000. Seed storage proteins and approaches improvement of their nutritional quality by genetic engineering. Current Science 79(5):576-589.
- Mann, M. y Jensen, O.N. 2003. Proteomic analysis of post-translational modifications. Nature Biotechnology 21:255-261.
- Marcone, M.F. y Yada, R.Y. 1998. Structural analysis of globulins isolated from genetically different Amaranthus Hybrid lines. Food Chemistry 61:319-326.
- Martínez, E.N. y Añon, M.C. 1996. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. Journal of Agricultural Food and Chemistry 44:2523-2530.
- Martínez, L., Marín, M., Salgado, C., Revol, J., Penci, M. y Ribotta, P. 2012. Chia (*Salvia hispanica* L.) oil extraction: Study of processing parameters. Food Science and Technology 47:78-82.
- Maruyama, N. y Prak, K. 2004. Structure-physicochemical function relationships of soybean glycinin at subunit levels assessed by using mutant lines. Journal of Agricultural and Food and Chemistry 52(26):8197-8201.
- Mathews, C.K., Van Holde, K.E. y Ahern, K.G. 2002. Bioquímica. PEARSON 3ra ed.
- Medina-Godoy, S., Niels, C. y Paredes-López. 2004. Expression and characterization of a His-tagged 11S seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus* in *Escherichia coli*. Biotechnology Program. 20:1749-1756.

- Medina-Godoy, S., Valdez-Ortiz, A., Valverde, M.E. y Paredes-López, O. 2006. Endoplasmic reticulum-retention C-terminal sequence enhances production of an 11S seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. J.* 1:1085-1092.
- Miles, M.J., Morris, V.J., Carroll, V., Wright, D.J. y Newby, V. 1985. Small-angle X-ray scattering studies of 7S and 11S globulins from pea (*Pisum sativum*). *International Journal Biological Macromolecules* 7:125-126.
- Miranda, C.S. 1978. Evolución de cultivares nativos de México. *Ciencia y Desarrollo* 3:130-131.
- Monroy-Torres, R., Mancilla-Escobar, M.L., Gallaga-Solórzano, J.C., Medina-Godoy, S., Santiago-García, E.J. 2008. Protein digestibility of chia seed *Salvia hispanica* L. *Revista de Salud Pública y Nutrición* 9:1-9.
- Mori, T. y Utsumi, S. 1979. Purification and properties of storage proteins of broad bean. *Journal of Agricultural Biology and Chemistry* 43:577-583.
- Mooney, B.P., y Thelen, J.J. 2004. High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification. *Phytochemistry* 65:1733-1744.
- Montúfar-López, A. 2007. Las chías sagradas del templo mayor de Tenochtitlán. *Arqueología Mexicana* 84:82-85.
- Mora-Escobedo, O., Paredes-López, O. y Ordorica-Falomir, C. 1990. Characterization of albumins and globulins from amaranth. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 23:484-487.
- Moya, M.E., Galussi, A.D., Reinoso, P. y Soldá, G.I. 2002. Caracterización varietal de *Avena Santiva* L. y *Avena Byzantina* C. por electroforesis de aveninas y proteínas totales en semillas. *Revista Científica Agropecuaria* 6:41-47.
- Muñoz, L.A., Cobos, A., Díaz, O., y Aguilera, J.M. 2012. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *Journal of Food Engineering* 108:216-224.
- Nadal, P., Canela, N., Katakis, I. y O'Sullivan. 2011. Extraction, isolation, and characterization of globulin proteins from *Lupinus albus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:2752-2753.
- Natarajan, S., Xu, C., Bae, H., Caperna, T. y Garrett, M. 2006. Characterization of storage proteins in wild (*Glycine soja*) and cultivated (*Glycine max*) soybean seeds using proteomic analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:3114-3120.

- Nielsen, N.C., Jung, R., Nam, Y., Beaman, T.W., Oliveira, L.O. y Bassuner, R.B. 1995. Synthesis and assembly of 11S globulins. *Journal of Plant Physiology* **145**:641-647.
- Nikokyris, P.N., y Kandyliis, K. 1997. Feed protein fractions in various solvents of ruminant feedstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **75**:198-204.
- O'Farrel, P.Z., Goodman, H.M. y O'Farrel, P.H. 1977. High resolution of two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Journal of Biological Chemistry* **12**:113-142.
- Ogawa, H., Sasagawa, S., Murukami, T. y Yoshizumi, H. 1995. Sesame lignans modulate cholesterol metabolism in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **1**:310-312.
- Olivos-Lugo, B.L., Valdivia-López, M.Á. y Tecante, A. 2010. Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). *Food Science and Technology International* **1**:1-8.
- Osborne, T. B. 1907. The proteins of the wheat kernel. Publication of the Carnegie Institution, Washington, Washington, D.C.
- Osborne, T.B. 1924. The vegetable proteins, En: Monographs in Biochemistry, 2<sup>nd</sup> ed., Longmans, Green and Co., New York.
- Osuna-Castro, J.A., Rascón-Cruz, Q., Napier, J., Fido, R.J., Shewry, P.R. y Paredes-López, O. 2000. Overexpression, purification, and *in vitro* refolding of the 11S globulin from amaranth seed in *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**:5249-5255.
- Pandey, A. y Mann, M. 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**:837-846.
- Paredes-López, O., Ordorica-Falomir, C., Guevara-Lara, F. y Covarrubias, M.M. 1985. Las proteínas vegetales: presente y futuro de la alimentación. *Perspectiva de la Biotecnología en México*. R. Quintero (Ed.) Fundación Javier Barrios Sierra. A.C. CONACYT, México. p.331-350.
- Paredes-López, O., Mora-Escobedo, R., Ordorica-Falomir, C. 1988. Isolation of amaranth proteins. *Lebensm. Wiss, Technol.* **21**:59-61.
- Park, O.K. 2004. Proteomic studies in plants. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **37**:133-138.

- Peralta, M. E. 2004. Caracterización bioquímica de las proteínas de las semillas de *Jatropha Curcas* L. Tesis Maestro en ciencias, Instituto Politécnico Nacional, Yautepec Morelos.
- Petrucelli, S. 1993. Modificaciones estructurales de aislados proteicos de soja producidas por tratamientos reductores y térmicos y su relación con propiedades funcionales. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Phillips, G.O. y Williams, P.A. 2000. Introduction to food hydrocolloids. En: Phillips, G.O., Williams, P.A. (Eds.), Handbook of Hydrocolloids. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- Pilosof, A.M.R. 2000. Propiedades de hidratación. En A.M.R. Pilosof & G. B. Bartholomai. Caracterización funcional y estructural de proteínas, cap. 1 p.17–28. Eudeba. CYTED. Buenos Aires, Argentina.
- Plietz, P., Damaschun, G., Müller, J.J. y Schlesier, B. 1983. Comparison of structure of the 7S globulin from *Phaseolus vulgaris* in solution with the crystal structure of 7S globulin from *Canavalia ensiformis* by small angle X-ray scattering. FEBS 162:43-46.
- Plietz, P., Damaschun, G., Zirwer, D., Gast, K., Schwenke, K.D. y Prakash, V. 1986. Shape and quaternary structure of  $\alpha$ -globulin from sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds as revealed by small angle X-ray scattering and quasi-elastic light scattering. Journal of Biological Chemistry 261:12686-12691.
- Plietz, P., Drescher, B. y Damaschun, G. 1987. Relationship between the amino acid sequence and the domain structure of the subunits of the 11S seed globulins. International Journal of Biological Macromolecules 9:161-165.
- Poudyal, H., Panchal, S., Waanders, J., Ward, L., Brown, L. 2012. Lipid redistribution by  $\alpha$ -linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet induced obese rats. Journal of Nutritional Biochemistry 23:153-162.
- Pszczola, D.E. 2000. Genes and diet: the specialized role ingredients may play. Food Technology 54:82-84.
- Rascón-Cruz, Q., Sinagawa-García, S., Osuna-Castro, J.A., Bohorova, N. y Paredes-López, O. 2004. Accumulation, assembly, and digestibility of amarantin expressed in transgenic tropical maize. Theoretical and Applied Genetics 108:335-342.
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., Valdivia-López, M.A., 2008. Dietary fiber content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. Food Chemistry 107(2):656–663.

- Romero-Zepeda, H. y Paredes-López, O. (1996). Isolation and characterization of amarantin, the 11S amaranth seed globulin. *Journal of Food Biochemistry*, 19:329-339.
- Rose, J.C.K., Bashir, S., Giovannoni, J.J., Molly, M.J. y Saravanan, R.S. 2004. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant Journal* 39:715-733.
- Salcedo-Chávez, B., Osuna-Castro, J.A., Guevara-Lara, F., Domínguez-Domínguez, J. y Paredes-López, O. 2002. Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:6515-6520.
- Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Vioque, J., Bautista, J. y Millan, S. 1999. Protein isolates from chickpea (*Cicer aritinum* L.): Chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry* 64:237-243.
- Segura-Nieto, M., Barba de la Rosa, A.P. y Paredes-López, O. 1999. Biochemistry of amaranth proteins. En *Amaranth-Biology, Chemistry and Technology*. Paredes-López, O. (ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. p.76-95.
- Shägger y Von Jagow G. 1987. Tricin-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of protein in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166:368-379.
- Shewry, P.R. 1995. Plant storage proteins. *Biology Review* 70:375-426.
- Shewry, P.R. 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53:947-958.
- Shewry, P.R., Field, J.M. y Kirkman, M.A. 1980. The extraction, solubility and characterization of two groups of barley storage polypeptides. *Journal of Experiment Botany* 31:393-407.
- Shewry, P.R., Mifflin, B.J. y Kasarda, D.D. 1984. The structural and evolutionary relationship of the prolamin storage of barley rye and wheat. *Philosophical Transaction of the Royal Society* 304:297-308.
- Shewry, P.R., Tatham, A. S., Forde, J., Kreis, M., y Mifflin, B. J. 1999. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. *Journal of Cereal Science* 4:97-106.
- Shewry, P.R y Halford, N.G. 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53(370):947-958.

- Siddhuraju, P. y Becker, K. 2001. Effect of various domestic processing methods on antinutrients and *in vitro* protein and starch digestibility of two indigenous varieties of Indian tribal pulse, *Mucuna Pruriens* val. *utilis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49:3058-3067.
- Singh, N., Makharia, G. y Joshi, K. 2008. Dietary survey and total dietary fiber intake in patients with irritable bowel syndrome attending a tertiary referral hospital. Indian Journal of Gastroenterology 27:66-70.
- Smith, J.S.C. y Smith, O.S. 1992. Fingerprinting crop varieties. Advances in Agronomy 46:85-128.
- Sorgan, S.K., Tai, Lawrence, S.H., Wu, Emily, C.F., Chen, y Jason, T.C. Tzen 1999. Molecular Cloning of 11S Globulin and 2S Albumin, the Two Major Seed Storage Proteins in Sesame. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47(12):4932-4938
- Staswick, P.E., Hermodson, M.A. y Nielsen, N.C. 1984. The amino acid sequence of the A2B1a subunit of glycinin. Journal of Biological Chemistry 259:13431-13435.
- Svendsen, I., Nicolova, D., Goshev, I. y Genov, N. 1994. Primary structure, spectroscopic and inhibitory properties of a two-chain trypsin inhibitor from the seeds of charlock (*Sinapsis arvensis* L.), a member of the napin protein family. International Journal of Peptide and Protein Research 43:425-430.
- Taga, M.S., Miller, E.E. y Pratt, D.E. 1984. Chia seed as a source of natural lipid antioxidants. Journal of the American Oil Chemistry Society 61:928-931.
- Tai, S.S., Wu, L.S., Chen, E.C., Tzen, J.T. 1999. Molecular cloning of 11S globulin and 2S albumin, the two major seed storage proteins in sesame. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47:4932-8.
- Tatham, A.S. y Shewry, P.R. 1985. The conformation of wheat gluten proteins. The secondary structures and thermal stabilities of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\omega$ -gliadins. Journal of Cereal Science 3:103-113.
- Utsumi, S. y Kinsella, J.E. 1985. Structure-function relationship in food proteins, subunit interactions in heat-induced gelation of 7S, 11S and soy isolate proteins. Journal of Agriculture and Food Chemistry 33:297-303.
- Vasco-Méndez, N., Soriano-García, M., Moreno, A., Castellano-Molina, R. y Paredes-López, O. 1999. Purification, crystallization, and preliminary X-ray characterization of 36 kDa Amaranth globulin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47:862-866.

- Vázquez-Ovando, A., Rosado-Rubio, G., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., 2009. Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (*Salvia hispanica* L.). *Food Science and Technology* 42(1):168–173.
- Wagner, J. 2000. Propiedades superficiales. En *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. Bartholomai, G., Pilosof, A. Editores, Cytel, Editorial Universitaria de Buenos Aires, p.55-70.
- Walker, J.B., Sytsma, K.J., Treutlein, J. y WinK, M. 2004. *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. *American Journal of Botany* 91:1115-1125.
- Wan, L., Ross, A.R., Yang, J., Hegedus, D.D. y Kermode, A.R. 2007. Phosphorylation of the 12S globulin-2 gene. *Plant Physiology* 95:973-975.
- Weber, C.W., Gentry, H.S., Kohlhepp, E.A. y Mc Crohan, P.R. 1991. The nutritional and chemical evaluation of chia seeds. *Ecology of Food and Nutrition* 26:119-125.
- Wester, P., y Claben-Bockhoff. 2001. Floral diversity and pollen transfer mechanisms in bir-pollinates *Salvia* species. *Annals of Botany* 100:1-21.
- Wright, D.J. 1987. The seed globulins. En: *Developments in Food Proteins-5* (Ed. B.J.F. Hudson) 119-178. Elsevier, London.
- Youle, R. y Huang, A. 1981. Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species. *American Journal of Botany* 68:44-48.