

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRIA EN CIENCIAS Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA REPUBLICA

(PROPAC)

EXTRACCION Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA FRACCION
11S DE LAS GLOBULINAS DE AMARANTO

TESIS QUE PRESENTA

HILDA ROMERO ZEPEDA

PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

QUERETARÓ, QUERETARO, MEXICO

1995

No. Adq. 55571

No. Título

Clas. 547.752

R 763 e

1995

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE QUIMICA

MAESTRIA EN CIENCIAS Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

EXTRACCION Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA FRACCION
11S DE LAS GLOBULINAS DE AMARANTO

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PRESENTA

HILDA ROMERO ZEPEDA

DIRIGIDA POR:

DR. OCTAVIO PAREDES LOPEZ

SINODALES

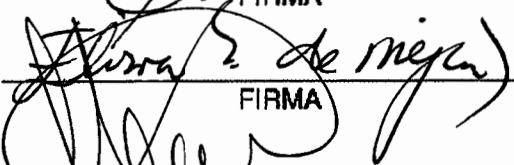
DR. OCTAVIO PAREDES LOPEZ
PRESIDENTE


FIRMA

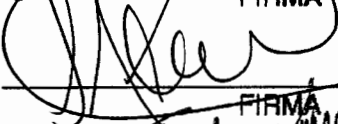
DRA. MAGDALENA SEGURA NIETO
SECRETARIO


FIRMA

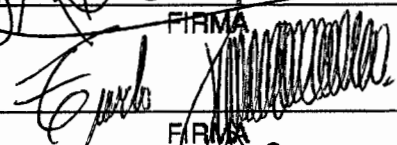
DRA. ELVIRA GONZALEZ DE MEJIA
VOCAL


FIRMA

M. EN C. SALVADOR LECONA URIBE
SUPLENTE


FIRMA

DR. JORGE TORO VAZQUEZ
SUPLENTE


FIRMA


Q.M. JOSE MERCAD ESPARZA GARCIA
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE QUIMICA


M. EN C. CARLOS ISAAC SILVA BARRON
DIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Este trabajo titulado "Extracción y Caracterización Bioquímica de la Fracción 11S de las Globulinas de Amaranto", fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos, Departamento de Biotecnología y Bioquímica de la Unidad Irapuato del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Octavio Paredes López.

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Octavio Paredes López por su valiosa asesoría, y por permitir integrarme a su equipo de trabajo en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos en la Unidad Irapuato del CINVESTAV-IPN.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro (CONACYTEQ) y a la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) por el apoyo que me dieron durante la realización de este trabajo.

Al M. en C. Salvador Lecona Uribe, Secretario Académico de la Universidad Autónoma de Querétaro, por su impulso y facilidades otorgadas a la Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos del PROPAC. Al M en C. Carlos Regalado González por todo el apoyo, confianza y amistad que me brindó durante esta Maestría.

A mis compañeros de laboratorio: Paulina, Horacio, Roberto, Nora, Rosario, Angel, Male, Mayolo, Arturo, Cuauhtémoc, Fidel, Francisco y Paco, y a mis compañeros de generación: Margarita, Carmen, Rosario, Vero, Luciano y Alejandro.

A mis maestros, compañeros y amigos.

Al Ing. Octavio Muñoz Licea y al Arq. Moisés C. Serrano Flores.

Y a todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

A tí papá y a tí mamá

Marce

Jorge y Pepito

Gracias por estar siempre a mi lado.

Gracias por todo su carino y comprensión, por la confianza
que me han depositado y gracias por creer en mí.

Moises, gracias por tu ayuda en la elaboración de
mi trabajo de tesis, y sobre todo
gracias por tu amor.

Con carino y respeto a mis tíos Felipe y Alfredo
y a toda mi familia gracias.

INDICE

1.	RESUMEN	1
	ABSTRACT	2
2.	INTRODUCCION	3
3.	OBJETIVOS	6
	3.1. OBJETIVO GENERAL	6
	3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	6
4.	REVISION DE LA LITERATURA	7
	4.1. INTRODUCCION	7
	4.2. PROTEINAS DE RESERVA DE AMARANTO	18
	4.3. GLOBULINAS DE AMARANTO	24
	4.4. PROTEINAS TIPO 7S Y 11S	24
	4.4.1. Proteínas Tipo 7S	27
	4.4.2. Proteínas Tipo 11S	29
	4.4.2.1. Composición de aminoácidos	31
	4.4.2.2. Enlaces disulfuro	33
	4.4.2.3. Estructura molecular	35
	4.4.2.4. Proteínas 7S y 11S provenientes de dos genes ancestrales	36
	4.4.3. Procedimientos de Obtención, Aislamiento y Purificación de las Fracciones Tipo 11S	42
	4.4.3.1. Carbohidratos y tratamientos enzimáticos	53

4.4.4. Reacciones de Asociación-Disociación	55
4.4.5. Propiedades Funcionales de las Fracciones Tipo 11S	58
4.4.5.1. Solubilidad y desnaturalización	61
4.4.5.2. Absorción de agua y de aceite	62
4.4.5.3. Formación de geles	63
4.5. DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i>	63
5. MATERIALES Y METODOS	64
5.1. GRANO DE AMARANTO	64
5.1.1. Evaluaciones Físicas del Grano	64
5.1.1.1. Tamaño de los granos	64
5.1.1.2. Peso de 1000 granos	64
5.1.1.3. Peso hectolítrico	64
5.2. TRATAMIENTO DEL GRANO	68
5.3. COMPOSICION QUIMICA DE LAS HARINAS	68
5.3.1. Humedad (Método 14.0054 AOAC)	68
5.3.2. Proteína (Método 14.026 AOAC)	68
5.3.3. Cenizas (Método 14.006 AOAC y 8.01 AACC)	69
5.4. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION DE PROTEINAS	69
5.4.1. Extracción de las Globulinas Totales	70
5.4.2. Extracción de la Fracción Rica en Proteína Tipo 11S	70
5.4.2.1. Purificación de la proteína tipo 11S	71
5.4.3. Carbohidratos Solubles	71
5.4.4. Cuantificación de Proteína	71
5.4.5. Prueba Enzimática con Tiempo y Temperatura Constantes	74

5.4.5.1. Combinación de tiempo y temperatura con amiloglucosidasa	76
5.5. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA	78
5.5.1. Electorforesis Desnaturalizante y Nativa	78
5.5.1.1. Tinción de Coomassie	80
5.5.1.2. Tinción PAS	80
5.5.2. Cromatografía de Filtración en Gel	82
5.5.3. Ultracentrigación	83
5.6. CARACTERIZACION FUNCIONAL	83
5.6.1. Solubilidad Proteínica	84
5.6.2. Capacidad de Absorción de Agua y de Aceite	84
5.6.2.1. Capacidad de absorción de agua	84
5.6.2.2. Capacidad de absorción de aceite	87
5.6.3. Capacidad de Formación y Estabilidad de Espuma	87
5.7. DIGESTIBILIDAD IN VITRO	90
6. RESULTADOS Y DISCUSION	91
6.1. EVALUACIONES FISICAS DEL GRANO	91
6.2. COMPOSICION QUIMICA DE LAS HARINAS	91
6.3. EXTRACION Y PURIFICACION DE LA FRACCION 11S	94
6.3.1. Prueba Enzimática	99
6.3.2. Combinación de Tiempo y Temperatura	102
6.4. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA	107
6.4.1. Electroforesis	107
6.4.2. Cromatografía de Filtración en Gel	111
6.4.3. Ultracentrifugación	113

6.5. CARACTERIZACION FUNCIONAL	117
6.5.1. Solubilidad Proteínica	117
6.5.2. Capacidad de Absorción de Agua y de Aceite	120
6.5.3. Capacidad de Formación y Estabilidad de Espuma	126
6.6. DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i>	131
7. CONCLUSIONES	133
8. BIBLIOGRAFIA	134

INDICE DE TABLAS

1.	Composición química del amaranto comparado con otros cultivos convencionales	10
2.	Características nutrimentales de las proteínas de oleaginosas, trigo y amaranto	11
3.	Comparación del contenido de aminoácidos esenciales en proteína total de diversos cultivos	13
4.	Contenidos de taninos, ácido oxálico y ácido fítico de algunas especies de amaranto y otros granos	14
5.	Características generales de algunos cultivos de oleaginosas, quinua y amaranto	17
6.	Tipos de clasificación que reciben las proteínas vegetales	19
7.	Proteínas de reserva y sus agentes extractantes	21
8.	Contenido relativo de las proteínas de reserva en diferentes semillas	23
9.	Caracteres distintivos de las fracciones 7S y 11S de las globulinas en chícharo	25
10.	Tipo de enlace proteínico y energía para su hidrólisis	34
11.	Materiales que presentan las fracciones de glbulinas tipo 7S y/u 11S	38
12.	Composición de los geles separador y concentrador usados en electroforesis desnaturalizante	79
13.	Composición de los geles separador y concentrador usados en electroforesis no desnaturalizante	81

14.	Propiedades físicas del grano de amaranto tipo Mercado	92
15.	Composición química de la harina integral y harina desgrasada de amaranto	93
16.	Efecto de tratamientos enzimáticos sobre la fracción rica en proteína tipo 11S de amaranto	100
17.	Efecto del tiempo de tratamiento enzimático sobre la fracción rica en proteína 11S de amaranto	103
18.	Balance de materia para los extractos proteínicos de la harina de amaranto desgrasada	106
19.	Efecto del pH en la solubilidad de la proteína de harina desgrasada, de la fracción rica en proteína tipo 11S y de la proteína tipo 11S de amaranto	118
20.	Capacidad de absorción de agua y de aceite de la fracción rica en proteína tipo 11S de amaranto	122
21.	Efecto del pH sobre la capacidad de formación de espuma de proteínas de amaranto y un aislado comercial de soya	127
22.	Efecto del pH sobre la estabilidad de espuma de proteínas de amaranto y un aislado comercial de soya	128
23.	Valores de digestibilidad <i>in vitro</i> de la caseína y globulinas tipo 11S de amaranto	132

INDICE DE FIGURAS

1.	Estructura primaria de las proteínas	8
2.	Ilustración de las alegrías	16
3.	Modelo estructural de la fracción 7S	28
4.	Modelo estructural de la fracción 11S	30
5.	Método de extracción para la fracción 7S de soya propuesto por Koshiyama (1972)	45
6.	Método de extracción para la fracción 11S de soya propuesto por Saio y Watanabe (1973)	46
7.	Método de extracción para la fracción 11S de soya propuesto por Okubo (1975)	47
8.	Método de extracción para la fracción 7S de algodón propuesto por Marshall (1990)	50
9.	Método de extracción de las fracciones 7S y 11S por precipitación isoeléctrica	52
10.	Fenómeno de asociación-disociación de la fracción 7S para las globulinas de soya	56
11.	Fenómeno de asociación-disociación de la fracción 11S para las globulinas de soya	57
12.	Diagrama general metodológico de la extracción y purificación de la fracción globulinas 11S de amaranto	65
13.	Ilustración de (A) granos y (B) plantas de amaranto (<i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.) tipo Mercado	66
14.	Dimensiones del grano de amaranto	67
15.	Diagrama de flujo del método de extracción de la fracción rica en globulinas tipo 11S de amaranto	72

16.	Diagrama de flujo de la purificación de la fracción 11S de amaranto	73
17.	Diagrama de flujo del tratamiento de las globulinas tipo 11S de amaranto con varias enzimas a tiempo y temperatura constantes	75
18.	Diagrama de flujo del tratamiento enzimático de las globulinas tipo 11S de amaranto con amiloglucosidasa a diferentes tiempos	77
19.	Diagrama de flujo para el método de determinación de solubilidad proteínica	85
20.	Diagrama de flujo para la determinación de la capacidad de absorción de agua (a) y de aceite (b)	86
21.	Diagrama de flujo para la determinación de capacidad de formación y estabilidad de espuma	88
22.	Cromatograma de filtración en gel (Sephacryl S-300) de la fracción rica en globulinas tipo 11S de amaranto	96
23.	Patrón de filtración en gel de la fracción rica en globulinas tipo 11S de amaranto analizado para proteínas y carbohidratos por métodos colorimétricos	98
24.	Efecto del tiempo de tratamiento enzimático con amiloglucosidasa sobre el contenido de proteína y el rendimiento de la fracción rica en globulinas tipo 11S de amaranto	105
25.	Patrón de electroforesis desnaturalizante de las globulinas tipo 11S de amaranto	108
26.	Patrón de electroforesis no desnaturalizante de las globulinas tipo 11S de amaranto	110

27. Cromatograma de filtración en gel (Sephacryl S-300) de las globulinas tipo 11S de amaranto, obtenido por elución a 15°C 112
28. Cromatograma de filtración en gel (Sephacryl S-300) de las globulinas tipo 11S de amaranto, obtenido por elución a 20°C 114
29. Patrón de ultracentrifugación de las globulinas tipo 11S de amaranto, obtenido en gradientes de sacarosa del 5 al 20% 115
30. Efecto del pH en la solubilidad de la proteína en harina desgrasada, fracción rica en proteína tipo 11S y globulinas tipo 11S de amaranto 121

ABREVIATURAS

A ₂₈₀	Absorbancia a 280 nm
A ₄₉₀	Absorbancia a 490 nm
A ₅₉₅	Absorbancia a 595 nm
α	Alfa
α -Am	Alfa-Amilasa
AACC	American Association of Cereal Chemists
AMG	Amiloglucosidasa
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
β	Beta
β -ME	Beta-Mercaptoetanol
Bis	N, N' metilen bisacrilamida
bs	Base seca
°C	Grado(s) Centígrado(s)
C ₃	Compuesto de 3 carbonos
C ₄	Compuesto de 4 carbonos
Ca	Calcio
CAA	Capacidad de Absorción de Agua
CAAc	Capacidad de Absorción de Aceite
Cal	Calorías
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
Cis	Cisteína
CFE	Capacidad de Formación de Espuma
cm	Centímetro(s)
col.	Colaboradores
Co ₂	Bióxido de carbono

D	Digestibilidad
Da	Dalton(es)
DTT	Ditiotreitol
EE	Estabilidad de Espuma
EDTA	Acido Etilen-Diamino-Tetracético
FAO	Food and Agricultural Organization (Organización de Alimentos y Agricultura)
FRP 11S	Fracción Rica en Proteína 11S
g	Gramo(s)
γ	Gamma
h	Hora(s)
ha	Hectárea(s)
hL	Hectolitro
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HCl	Acido Clorhídrico
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias
kCal	Kilocaloría(s)
kDa	Kilodalton(es)
kg/Ha	Kilogramo(s) por Hectárea
kg/hL	Kilogramo(s) por Hectolitro
L	Litro
Log	Logaritmo Base Diez
M	Molar
mA	Miliampere(s)
min	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)

N	Nitrógeno o Normal
Na	Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
n.r.	No reportado
n.d.	No determinada
NPU	Utilización Neta de Proteína
núm	Número
p.	Página
Pág	Página
PAG	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
PER	Relación de Eficiencia Proteínica
pH	Potencial hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso Molecular
PP	Precipitado
p/v	Peso a volumen
Pul	Pululanasa
rpm	Revoluciones por minuto
S	Coefficiente de sedimentación
seg	Segundo(s)
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
sol.	Solución
T	Temperatura
t	Tiempo
TEMED	N, N, N', N' Tetrametil-etilen-diamina
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano

TCA	Acido Tricloroacético
U	Unidades de actividad
U/mL	Unidades de actividad por mililitro
Vo	Volumen inicial
Vol	Volumen
Vf	Volumen final
v/p	Volumen a peso
v/v	Volumen a volumen
VB	Valor Biológico
Y	Digestibilidad de proteína <i>in vitro</i>
%	Por ciento, porcentaje

ABREVIATURAS

A ₂₈₀	Absorbancia a 280 nm
A ₄₉₀	Absorbancia a 490 nm
A ₅₉₅	Absorbancia a 595 nm
α	Alfa
α -Am	Alfa-Amilasa
AACC	American Association of Cereal Chemists
AMG	Amiloglucosidasa
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
β	Beta
β -ME	Beta-Mercaptoetanol
Bis	N, N' metilen bisacrilamida
bs	Base seca
$^{\circ}$ C	Grado(s) Centígrado(s)
C ₃	Compuesto de 3 carbonos
C ₄	Compuesto de 4 carbonos
Ca	Calcio
CAA	Capacidad de Absorción de Agua
CAA _c	Capacidad de Absorción de Aceite
Cal	Calorías
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
Cis	Cisteína
CFE	Capacidad de Formación de Espuma
cm	Centímetro(s)
col.	Colaboradores
Co ₂	Bióxido de carbono

D	Digestibilidad
Da	Dalton(es)
DTT	Ditiotreitol
EE	Estabilidad de Espuma
EDTA	Acido Etilen-Diamino-Tetracético
FAO	Food and Agricultural Organization (Organización de Alimentos y Agricultura)
FRP 11S	Fracción Rica en Proteína 11S
g	Gramo(s)
γ	Gamma
h	Hora(s)
ha	Hectárea(s)
hL	Hectolitro
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HCl	Acido Clorhídrico
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias
kCal	Kilocaloría(s)
kDa	Kilodalton(es)
kg/Ha	Kilogramo(s) por Hectárea
kg/hL	Kilogramo(s) por Hectolitro
L	Litro
Log	Logaritmo Base Diez
M	Molar
mA	Miliampere(s)
min	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)

N	Nitrógeno o Normal
Na	Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
n.r.	No reportado
n.d.	No determinada
NPU	Utilización Neta de Proteína
núm	Número
P.	Página
Pág	Página
PAG	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
PER	Relación de Eficiencia Proteínica
pH	Potencial hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso Molecular
PP	Precipitado
p/v	Peso a volumen
Pul	Pululanasa
rpm	Revoluciones por minuto
S	Coefficiente de sedimentación
seg	Segundo(s)
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
sol.	Solución
T	Temperatura
t	Tiempo
TEMED	N, N, N', N' Tetrametil-etilen-diamina
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano

TCA	Acido Tricloroacético
U	Unidades de actividad
U/mL	Unidades de actividad por mililitro
Vo	Volumen inicial
Vol	Volumen
Vf	Volumen final
v/p	Volumen a peso
v/v	Volumen a volumen
VB	Valor Biológico
Y	Digestibilidad de proteína <i>in vitro</i>
%	Por ciento, porcentaje

1. RESUMEN

Las globulinas de las proteínas de reserva del grano de amaranto *Amaranthus hypochondriacus* L., fueron extraídas mediante el empleo de cloruro de calcio (CaCl_2) 10 mM, a un pH entre 8-8.5 y modificando la temperaturas a lo largo de método de extracción, empleando temperatura ambiente, 40 °C y posteriormente a 4°C. El porcentaje de proteína 11S en las globulinas de amaranto se vio fuertemente influenciado por las condiciones de extracción. No obstante, bajo el método de extracción desarrollado en el presente trabajo se logró obtener la proteína 11S como la fracción mayoritaria representando un 18 % de las proteína total del grano y un 90.7% del total de globulinas. La proteína 11S fue estudiada por electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) sin y con reducción de los puentes disulfuro, exhibiendo un patrón electroforético similar a las proteínas tipo 11S en otros materiales. La electroforesis nativa mostró una banda única de la fracción 11S en estudio. Esta fracción mostró una masa molecular aparente de 389 kDa mediante cromatografía de filtración en gel. Por ultracentrifugación se determinó una constante de sedimentación de 11S. La solubilidad de la fracción 11S mostró un mínimo a pH 6, la capacidad de absorción de agua fue mínima, de igual manera la formación de espuma a pH cercano a 6 se mostró reducida, en donde no se obtuvo estabilidad de la espuma formada. El valor de digestibilidad de la fracción 11S de 86.6 % se mostró muy cercano al valor correspondiente de la caseína de 89.2 % tomada como parámetro de referencia.

ABSTRACT

The 11S globulin of seed storage protein of *Amaranthus hypochondriacus* termed amarantin was isolated by calcium chloride 10 mM, pH 8.0-8.5, and temperature treatments. This fraction was studied by chromatographic techniques and ultracentrifugation. The 11S globulin was analyzed by sodium dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) without and with prior reduction of disulphide bonds, and by nondenaturing-PAGE. It exhibited an electrophoretic behavior similar to that of 11S-like proteins in other materials. Its apparent relative molecular mass was estimated to be 389 kDa by gel filtration chromatography at low ionic strength. Ultracentrifugation of the freeze-dried extract gave a sedimentation constant of 11S.

2. INTRODUCCION

La biotecnología ha sido definida como una disciplina moderna cuya tecnología implica el uso intensivo de la materia viva y sus derivados -células, tejidos, etc.- para la producción de bienes y servicios (Prentis, 1984a). Esta ha tenido un gran impacto en el sector alimentario y nutrimental. El crecimiento poblacional demanda diversidad de productos alimenticios de buena calidad, abundantes, accesibles y que contribuyan nutricionalmente en la salud humana (Fukushima, 1985). La biotecnología futura podría desempeñar un papel estratégico a través de ofrecer diferentes alternativas para satisfacer parcialmente un sin número de necesidades alimentarias (Dunnill, 1983).

Cabe decir que se ha prestado una atención especial en el mejoramiento de la calidad nutrimental de los granos. Se ha pretendido mejorar la calidad de la proteína, aumentar el contenido proteínico, y en algunos casos como en las leguminosas, eliminar o reducir la presencia de factores antinutrientales (Olguín, 1985; Paredes-López y col., 1985; Deshpande, 1992).

A pesar de que se conoce el potencial alimentario del grano de amaranto debido a sus excelentes características agroalimentarias, no se sabe la razón científica de algunas de ellas.

El grano de amaranto contiene de un 15 a un 18% de proteínas con niveles aceptables de lisina, triptofano y de otros aminoácidos esenciales (Singhal y Kulkarni, 1988; Duarte-Correa y col., 1989b).

Al igual que otras semillas dicotiledóneas, el amaranto presenta dentro de sus proteínas de reserva la fracción globulinas (proteínas solubles en soluciones salinas) como una de las fracciones mayoritarias, estando presentes en un 20% del total de las mismas. Existen estudios relativos a la fracción globulinas de amaranto, los cuales nos llevan al conocimiento de que están constituidas por proteínas oligoméricas que se pueden disociar a su vez en monómeros o bien en dos fracciones cuyos comportamientos son similares a los que presentan otros materiales como la soya y el chícharo (Penollette y Mossé 1983; Gorinstein y col., 1991; Barba de la Rosa y col., 1992; Olguín-Martínez, 1992), y que se han englobado como proteínas tipo 7S y proteínas tipo 11S.

Uno de los problemas principales de las globulinas de amaranto es el comportamiento de solubilidad que presentan las mismas debido a las diferentes soluciones extractantes y de análisis con las que se han trabajado (Wolf, 1980; Miflin y col., 1983; Payne, 1983; Higgins, 1985; Konishi y col., 1985; Teutónico y Knorr, 1985; Duarte-Correa y col., 1986; Paredes-López y col., 1988; Bressani y García-Vela, 1990; Gorinstein y col., 1991; Barba de la Rosa y col., 1992; Olguín-Martínez, 1992; Rodríguez-Nester, 1992).

El presente estudio tomó como modelo la semilla de amaranto resaltando la fracción globulinas de sus proteínas en donde en general existe una falta de conocimiento acerca de las condiciones de extracción y purificación de sus fracciones y subunidades (Marccone y Yada, 1991; Paredes-López y col., 1988; Soriano-Santos y col., 1991; Tena-Flores, 1991).

Debido a su complejidad, el comportamiento de algunas características básicas de las globulinas de amaranto, a través

del desarrollo de un método de extracción de una de las subunidades de la fracción globulinas y así mismo la caracterización parcial fisicoquímica, funcional digestibilidad in vitro de este componente permitirá entender su función en la semilla. La caracterización de la subunidad tipo 11S en las globulinas de amaranto podría sugerir el papel funcional y nutrimental a través de sus características, en el entorno proteínico del amaranto.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Conocer algunas de las características básicas de tipo bioquímico, fisicoquímico y funcional de las globulinas tipo 11S de amaranto.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Desarrollar un método de extracción de la fracción tipo 11S de las globulinas de amaranto.
2. Caracterizar algunas de las propiedades bioquímicas y funcionales de la fracción tipo 11S de las globulinas de amaranto, y determinar su digestibilidad *in vitro* como indicador de tipo nutrimental con lo que respecta a biodisponibilidad proteínica.

4. REVISION DE LA LITERATURA

4.1. INTRODUCCION

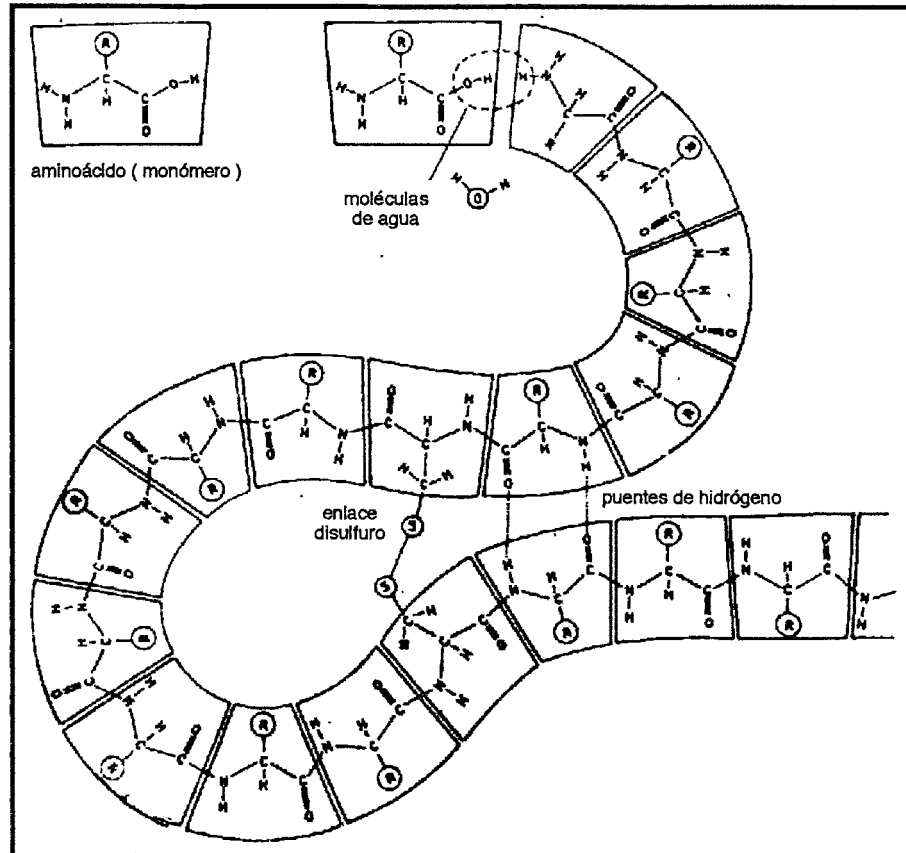
Las proteínas son componentes indispensables de todo organismo vivo, y tienen como función la de participar en procesos enzimáticos inhibitorios, de regulación, de reconocimiento, transporte, almacén y estructura. Todas estas actividades requieren de proteínas específicas tanto en cantidad como en el tipo de la misma. Estas características se deben a la secuencia de aminoácidos que la constituyen, ya que las proteínas son polímeros cuya unidad básica estructural son los aminoácidos, unidos entre sí por medio de enlaces peptídicos (Navarro, 1991).

En las proteínas se pueden distinguir cuatro niveles de organización estructural, que dependen de la secuencia de aminoácidos que la conforman, derivando sus diversas características funcionales: estructura primaria que es la secuencia lineal básica de los aminoácidos, secundaria que implica la organización de estructuras en tercera dimensión de secuencias de aminoácidos (Fig. 1), terciaria que involucra la organización tridimensional en una sola proteína de diferentes secuencias lineales de aminoácidos, cuaternaria que relaciona diversos enlaces intra y extra moleculares entre subunidades proteínicas, oligoméricas o de cadenas múltiples (Lehninger, 1987). Así pues, es claro el percibir que en materiales vegetales diferentes se tendrán generalmente proteínas características (Navarro, 1991).

Debido a su importancia como nutrimento, las proteínas se han convertido actualmente en el principal foco de atención. Los alimentos ricos en proteínas como la carne, leche, huevo, y el

Fig. 1. Estructura primaria y secundaria de las proteínas

Estructura primaria y secundaria de las proteínas



Pernollet
y Mossé, 1983

pescado, son inaccesibles en la mayoría de los países, sobre todo en aquéllos que están en vías de desarrollo, la producción es muy costosa y de difícil adquisición (Lásztity, 1984; Paredes-López y col., 1985; Deshpande, 1992).

En la actualidad se investiga sobre el uso de proteínas no convencionales para consumo humano y de esta forma satisfacer las necesidades de este nutrimento en poblaciones de escasos recursos (Betschart, 1979; Betschart y col., 1981; Bushuk, 1981; Paredes-López y col., 1985; Peschard y Viniegra, 1981). Se estima que en los países de menor desarrollo, los vegetales seguirán siendo la fuente principal de proteínas por lo que existe la necesidad de una mayor producción agrícola de cultivos capaces de suministrar a la población una ingesta balanceada y adecuada de nutrimentos (Paredes-López y col., 1985; Alfaro y col., 1987).

En busca de nuevas alternativas de alimentos nutritivos y económicos, se han revalorado cultivos antiguos aparentemente olvidados y que posiblemente son capaces de cumplir estos requisitos en los países en vías de desarrollo (Irving y col., 1981; Rodriguez-Nester, 1992).

En México se carece de estudios sistemáticos sobre los numerosos recursos vegetales y animales que habitan en el territorio nacional. El conocimiento científico de un cultivo prehispánico como el del amaranto, cuyo contenido proteínico (14.5%) mayor al de los cereales (7.5-12.3%) (Tabla 1), indicadores de tipo nutrimental como su valor biológico (62-87%), digestibilidad (69-90%), etc. (Tabla 2), han atraído la atención de algunos grupos de investigación (Sánchez Marroquín, 1980; Saunders y Becker, 1984; Flores y col., 1986-1987; Bressani y col., 1987; Pedersen y col., 1987ab; Nielsen y col., 1988; Singhal

**Tabla 1. Composición química del amaranto comparado con otros
cultivos convencionales**



Composición química del amaranto comparado con otros cultivos convencionales

	Humedad (%)	Proteína	Grasa	Cenizas	Extracto libre de nitrógeno	Fibra
Amaranto	8.0	15.8b	6.2	3.4	61.7	4.9
Trigo	12.5	12.3c	1.8	1.7	69.1	2.6
Maíz	13.8	10.3d	4.5	1.4	67.7	2.3
Arroz	11.7	8.5d	2.1	1.4	75.4	0.9
Sorgo	11.0	12.3c	3.7	1.9	69.2	1.9
Mijo	11.8	9.9	2.9	2.5	----
Cebada	9.8	11.6	2.0	2.1	----
Centeno	11.0	12.1	1.7	1.8	----
Soya	8.1	47.0	21.2	5.0	----
Frijol	12.0	22.0	1.0	----	35.6
Lenteja	12.2	23.8	1.0	----	53.2
Garbanzo	9.9	20.2	5.7	----	50.0

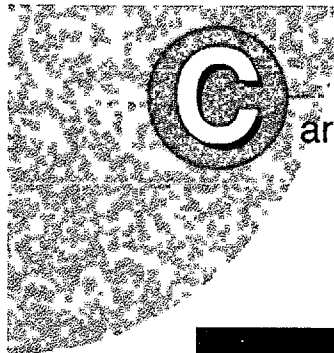
a) g/100g, base seca
b) Nx5.85

c) Nx5.7
d) Nx6.25

e) Nx5.8

Saunders y Becker, 1984; Sánchez - Marroquín, 1980; Singhal y Kulkarni, 1988; Paredes - López y col, 1990

**Tabla 2. Características nutrimentales de las proteínas de
oleaginosas, trigo y amaranto**



Características nutrimentales de las proteínas de algunas oleaginosas, trigo y amaranto

Semilla	BV (%)	D (%)	NPU	PER
Ajonjolí	36 - 42	83 - 86	27 - 36	0.5 - 2
Girasol	60 - 65	73 - 90	47 - 53	2
Trigo	62	91	57	1
Amaranto	62 - 87	69 - 90	42 - 77	1 - 3

BV = Valor biológico

D = Digestibilidad

NPU = Utilización neta proteínica

PER = Relación de eficiencia proteínica

Nielsen y col., 1983; Flores y col., 1986-1987;
Pedersen y col., 1987a; Paredes-López y col., 1989

y Kulkarni, 1988; Paredes-López y col., 1989; Lúquez de Mucciarelli y col., 1990; Anónimo, 1991).

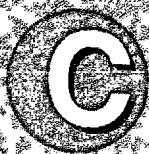
El maíz y el frijol representan las fuentes principales de alimentación y por excelencia de proteínas vegetales de los mexicanos. Desafortunadamente sus proteínas carecen de algunos componentes que son esenciales como los aminoácidos lisina y triptofano (Tabla 3) y en consecuencia hay que ingerirlos mediante los alimentos (Akpapunam y Markakis, 1981; Paredes-López y col., 1985; Pedersen y col., 1987 ab; Singhal y Kulkarni, 1988; Goristein y col., 1991; Deshpande, 1992; Reyes-Moreno, 1992).

Nuestros antepasados consumían tanto la planta como los granos del amaranto, que contiene entre las mejores proteínas vegetales en términos nutrimentales que la naturaleza le ha dado al ser humano (NRC, 1994; Saunders y Becker, 1984; Flores y Teutónico, 1986; Vietmeyer, 1982; Paredes-López y col., 1990).

Por otra parte el amaranto es un grano que debido a sus sobresalientes características nutrimentales, bajo contenido de factores antinutrimientales como taninos (0.04-0.22%), ácido oxálico (0-610 mg/100g) y ácido fítico (0.5-2.24%) (Tabla 4), y a su gran versatilidad como alimento tienen un alto potencial como ingrediente (Betschart y col., 1979; Becker y col., 1981; NCR, 1984; Saunders y Becker, 1984; Calderón de la Barca y col., 1985; Teutónico y Knorr, 1985; Duarte-Correa y col., 1986; Alfaro y col., 1987; Lyon y Becker, 1987; Singhal y Kulkarni, 1988; Barba de la Rosa, 1989; Rodríguez-Nester, 1992).

En México, el cultivo de amaranto se realiza en pequeña escala en algunos estados de la República como: Guerrero, Morelos, Oaxaca, Puebla y Tlaxcala (Anónimo, 1991), y se consume

Tabla 3. Comparación del contenido de aminoácidos esenciales
en proteína total de diversos cultivos



Comparación del contenido de aminoácidos esenciales en
proteína total de diversos cultivos

Aminoácido	(mg / g de proteína)				FAO
	Maíz ^b	Trigo ^c	Frijol ^b	Amaranto ^a	
Arginina	9.3	4.8	6.1	8.1	
Histidina	3.0	2.3	4.8	2.7	1.6
Cisteína	2.3	2.4	6.7	3.9	
Fenilalanina	4.4	4.3	5.4	4.8	
Isoleucina	3.5	3.5	5.4	4.0	4.0
Leucina	12.4	6.7	8.4	6.2	7.0
Serina	4.7	4.8	5.3	8.0	
Lisina	3.0	2.7	7.4	6.1	5.5
Prolina	9.0	10.4	3.8	4.6	
Metionina	2.0	1.6	1.0		
Glicina	3.6	4.2	3.4	8.4	
Tirosina	3.4	2.5	2.6	4.3	
Acido Glutámico	18.9	33.5	17.7	16.6	
Treonina	3.3	2.6	4.3	4.6	4.0
Acido Aspártico	7.0	5.4	9.8	8.1	
Triptofano	0.7	1.3	0.9	1.3	1.0
Alanina	7.9	3.8	2.7	3.9	
Valina	4.9	4.5	5.8	4.4	5.0

a) Nx 5.85

b) Nx 6.25

c) Nx 5.7

FAO, 1986; Pedersen y col., 1987; Singhal y Kulkarni, 1988;
Paredes-López y col., 1990; Gorinstein y col., 1991

Tabla 4. Contenidos de taninos, ácido oxálico y ácido fítico
de algunas especies de amaranto y otros granos



Contenidos de taninos, ácido oxálico y ácido fítico de algunas especies de amaranto y otros granos

Grano	Taninos (%)	Ac. Oxálico (mg/100 g)	Ac. Fítico (%)
<i>Amaranthus cruentus</i>	0.04 - 0.13	610	0.50 - 0.58
<i>Amaranthus edulis</i>	0.22	---	2.24
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	0.05 - 0.06	---	0.54 - 0.62
Maíz	---	6	0.11
Trigo	0.17	8	0.84

Calderón de la Barca y col., 1985; Teutónico y Knorr, 1985;
Duarte - Correa y col., 1986

principalmente en forma de "alegría" (Fig. 2) (amaranto reventado o tostado mezclado con miel o piloncillo) en algunas regiones del país la semilla se usa en la elaboración de alimentos típicos como pinole, tamales y atole (Sánchez-Marroquín, 1980; Becker y col., 1981; Paredes-López y col., 1985; Singhal y Kulkarni, 1988; Rodríguez-Nester, 1992).

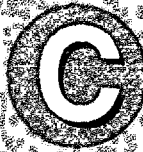
El amaranto pertenece a la familia *Amarantaceae* la cual comprende más de 60 géneros y aproximadamente 800 especies de plantas herbáceas, monoicas o dioicas, anuales o perennes de amplia distribución, aunque no muy abundantes en número, de regiones tropicales, subtropicales y templadas de ambos hemisferios, cuyas características de cultivo se presentan en la Tabla 5. La mayoría de los representantes del género *Amaranthus* son malezas y poseen un rápido desarrollo vegetativo debido a que la ruta fotosintética C₄, cuyo primer producto fotosintético es un compuesto de cuatro carbonos. Este proceso técnicamente llamado la vía C₄ de fijación de carbono, lo emplean sólo un número limitado de plantas de rápido crecimiento como por ejemplo el sorgo, maíz, y caña de azúcar. Las plantas C₄ aprovechan la luz eficientemente y teóricamente exigen sólo la mitad de agua que otras plantas, a su vez, utilizan en forma óptima el dióxido de carbono (CO₂) atmosférico al concentrarlo en células especializadas alrededor del haz vascular, disminuyendo así la pérdida del mismo por fotorrespiración, lo que deviene en una mayor proporción de CO₂ convertido en carbohidrato que en las plantas C₃ ordinarias. La ruta C₄ es particularmente eficiente en condiciones extremas como temperaturas elevadas, luz intensa, baja humedad y tierras secas de 600 a 800 mm de lluvia por año (Becker y col., 1981; Vietmeyer, 1982; Bressani y col., 1987; Singhal y Kulkarni, 1988;

Fig. 2. Ilustración de las alegrías

Ilustración de las alegrías



Tabla 5. Características generales de algunos cultivos de
oleaginosas, quinua y amaranto



Características generales de algunos cultivos de oleaginosas, quinua y amaranto

	Cártamo	Ajonjolí	Girasol	Quinua	Amaranto
Longitud de la planta (m)	0.3 - 2.0	0.6 - 3.0	0.7 - 6.0	0.7 - 3.0	0.8 - 2.8
Tiempo de cosecha (días)	120 - 280	78 - 110	110 - 130	120 - 240	80 - 146
Rendimiento del grano (kg / Ha)	500 - 3000	500 - 2200	1120 - 2500	350 - 1900	600 - 3000
Tiempo de floración (días)	75 - 234	21 - 49	51 - 70	n. r.	26 - 92
Diámetro de la semilla (mm)	6 - 9	0.9 - 2.1	10 - 25	1 - 2.6	0.9 - 1.7
Peso hectolítrico (kg / hL)	n. r.	n. r.	n. r.	64 - 67	76.9
Peso de 1000 semillas (g)	40 - 70	2 - 4	37 - 90	2.5 - 2.6	0.5 - 1.8

n. r. = No Reportado

Becker y col., 1981; NRC, 1984; Saunders y Becker, 1984; Teutónico y Knorr, 1985; Duarte - Correa y col., 1986

Mora-Escobedo y col., 1990; Anónimo, 1991; Rodríguez-Nester, 1992).

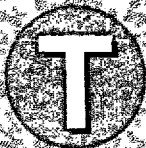
4.2. PROTEÍNAS DE RESERVA DE AMARANTO

Las proteínas vegetales pueden clasificarse dependiendo de su morfología, con base en sus funciones biológicas, de acuerdo a su solubilidad y con base a su composición química (Tabla 6). Desde el punto de vista funcional, las proteínas de las semillas pueden clasificarse en dos categorías: las proteínas de mantenimiento y las de reserva. Las primeras, son esenciales para el metabolismo celular y comprenden a las proteínas estructurales y metabólicas. Las segundas corresponden a una fracción polipeptídica aparentemente inerte y compartamentalizada, con relativamente pocos grupos de proteínas aunque en concentraciones elevadas (Segura-Nieto, 1991; Rodríguez-Nester, 1992).

Las proteínas de reserva se pueden definir como cualquier proteína acumulada en cantidades significativas durante el desarrollo de la semilla, almacenadas en cuerpos proteínicos también denominadas gránulos de proteína o granos de aleurona que son inclusiones celulares en que se depositan hasta un 60 a 80% de estas proteínas en la semilla madura (Restrepo-Osorio, 1979; Pernollet y Mossé, 1983; Schroeder, 1984; Gorinstein, 1993). Durante la germinación estas proteínas se hidrolizan rápidamente para proveer el nitrógeno reducido y el carbón necesario para el crecimiento de la plántula (Segura-Nieto, 1991).

La calidad nutrimental de una cosecha está dada por el tipo y la concentración de la proteína de reserva de los granos. A su vez, la calidad de la proteína de reserva del grano, dependerá

Tabla 6. Tipos de clasificación que reciben las proteínas
vegetales



Tipos de clasificación que reciben las proteínas vegetales

Con base a su morfología	Con base a sus funciones biológicas	De acuerdo a solubilidad	Con base a su composición química
Proteínas del endospermo	Metabólicamente - citoplasmáticas - enzimas	Albuminas Globulinas	Proteínas simples
Proteínas de la membrana de aleurona	- De membranas ribosomales - De regulación	Prolaminas Glutelinas	Proteínas complejas: - Lipoproteínas - Glicoproteínas - Nucleoproteínas - Haloproteínas
Proteínas del embrión	Proteínas de reserva: - De bajo peso molecular - De alto peso molecular		

(Lásztity, 1984)

del contenido y el balance relativo de los aminoácidos esenciales que la constituyen (Bietz, 1979; Segura-Nieto, 1991).

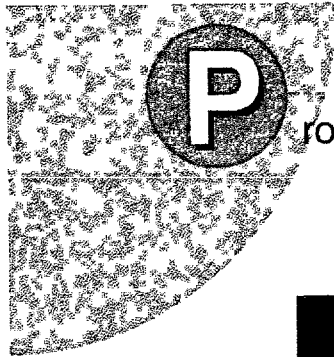
No se ha aclarado el origen de los cuerpos proteínicos. La opinión generalizada es que son de origen dual, parcialmente formados de vacuolas subdivididas y parcialmente por la coalescencia de vesículas que contienen las proteínas, bien derivadas del retículo endoplásmico o vía aparato de Golgi (Boulter, 1983; Gorinstein, 1993). En los cotiledones de las leguminosas, los cuerpos proteínicos están embebidos en los gránulos de almidón y se han descrito como organelos de enlace membranal, de pocos micrómetros de diámetro, compuestos principalmente por proteínas de reserva y fitatos (Wolf, 1980; Pernollet y Mossé, 1983).

Las proteínas vegetales pueden clasificarse de acuerdo a su solubilidad en: Albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas (Tabla 7) (Bietz, 1979).

En los cereales existe una relación inversa generalizada entre el rendimiento de un grano y su contenido de proteína (Payne, 1983). Los granos de trigo y avena son los más ricos en proteína (12.3 y 16.2% respectivamente), mientras que los de maíz y arroz (8.9 y 7.5% respectivamente), son los más pobres en ella (Saunders y Becker, 1984; Sánchez-Marroquín y col., 1986; Signal y Kulkarni, 1988). Las leguminosas y las oleoginosas contienen mucha más proteína que los cereales (Betschart, 1979; Paredes-López y Ordorica-Falomir, 1986), raramente menos del 20%; la soya por otro lado, contiene más del 30% de proteína.

Los cereales se caracterizan por presentar principalmente prolaminas y glutelinas como proteínas de reserva

Tabla 7. Proteínas de reserva y sus agentes extractantes



Proteínas de reserva y sus agentes extractantes

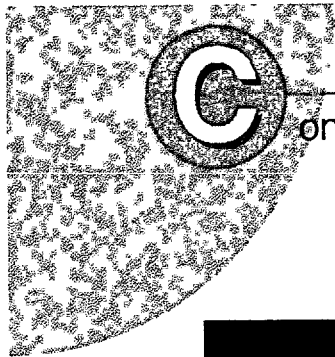
Clasificación	Solubilidad
Albuminas y Globulinas	Soluciones salinas
Prolaminas	Soluciones alcohólicas al 70 %
Glutelinas (de trigo)	1% Acido acético + propanol
Residuo	Agentes reductores

Bietz, 1979; Byers y col., 1983

(Bietz, 1979; Bushuk, 1981; Payne, 1983; Higgins, 1985) En el resto de las angiospermas, las semillas contienen principalmente albúminas y globulinas (Rodríguez-Nester, 1992), predominando las globulinas en las leguminosas (Higgins, 1985) como se muestra en la Tabla 8 (Brooks y Morr, 1985; Fukushima, 1991ab; Saio y Watanabe, 1973; Wolf, 1980). También cabe mencionar que las proteínas de reserva en las leguminosas, aparecen frecuentemente con una composición cercana a la composición del huevo que se toma como estándar, excepto por los aminoácidos azufrados (Pernollet y Mossé, 1983).

Los granos de amaranto contienen del 14.5 al 18% de proteína con un nivel aceptable de lisina, triptofano y aminoácidos azufrados, los cuales se encuentran en proporciones bajas en cereales y leguminosas (Teutónico y Knorr, 1985; Paredes-López y col., 1988; Bressani y col., 1989; Barba de la Rosa y col., 1992). Con respecto a sus proteínas de reserva, en el caso del amaranto existe discrepancia en cuanto a la proporción que presenta de albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas. Algunos autores mencionan que las globulinas son los componentes mayoritarios (Konishi y col., 1985; Gorinstein y col., 1991), otros consideran que la fracción mayoritaria la conforman las glutelinas (Paredes-López y col., 1988; Bressani y García-Vela, 1990) y por último existen reportes indicando que las albúminas son la fracción predominante (Duarte-Correa y col., 1986; Segura-Nieto y col., 1992).

Tabla 8. Contenido relativo de las proteínas de reserva en
diferentes semillas



Contenido relativo de las proteínas de reserva
en diferentes semillas

	% de la proteína total			
	Albúminas	Globulinas	Prolaminas	Glutelinas
Cereales				
Trigo	3-5	10	69	16
Maíz	4	2	55	39
Arroz	5	10	5	80
Cebada	13	12	52	2
Sorgo	8	8	52	32
Avena	1	78	16	5
Leguminosas				
Soya	10	90	---	---
Frijol mungo	4	67	---	29
Chícharo	21	66	---	12
Cacahuete	15	70	---	10
Amaranto	36.4	20.5	1.2 - 3.1	21.3 - 29.4

Bushuk, 1981; Paredes - López y col. 1990

4.3. GLOBULINAS DE AMARANTO

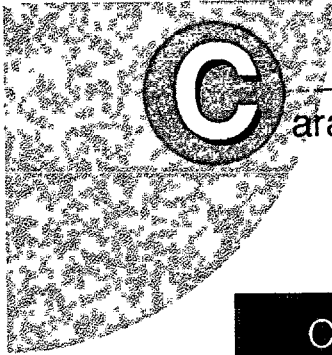
En el amaranto, las globulinas están presentes en un 20% o más en el grano, y han sido el foco de estudio para su caracterización fisicoquímica (Konishi y col., 1985; Paredes-López y col., 1988; Olguín-Martínez, 1992; Paredes-López y col., 1993). Las globulinas de amaranto aparecen como proteínas compuestas de subunidades, las cuales se separan bajo una variedad de condiciones (Wolf, 1980).

En los primeros trabajos al respecto, Konishi y col. (1985) sugirieron que las globulinas de amaranto podrían estar compuestas por proteínas oligoméricas (Marccone y Yada, 1991), que se disocian a su vez en monómeros de pH alcalinos; para esta fracción se reportó una proteína tipo 11S cuyo coeficiente de sedimentación fue de 12.7S. Barba de la Rosa y col. (1992) y Segura-Nieto y col. (1992), por otro lado, sugirieron que las globulinas de amaranto podrían estar compuestas de dos fracciones, una tipo 7S y otra tipo 11S. Debido a la complejidad de la proteína, es necesario fraccionarla antes de llevar a cabo estudios detallados de las mismas.

4.4. PROTEINAS TIPO 7S Y 11S

A finales del siglo pasado y a principios de éste Osborne (1924), propuso la distinción de dos tipos de globulinas en chícharo: la legumina y la vicilina, distinción que se ha extendido a numerosas especies de leguminosas. Los primeros rasgos distintivos de las globulinas de chícharo han servido como parámetro de comparación para otros materiales (Tabla 9) (Pernollet y Mossé, 1983; Lásztity, 1984).

Tabla 9. Caracteres distintivos de las fracciones 7S y 11S
de las globulinas en chícharo



Caracteres distintivos de las fracciones 7S Y 11S
de las globulinas en chícharo

Características	Vicilina	Legumina
Coefficiente de sedimentación	7S	11S
Masa molecular	200 + - 50 kDa	300+ - 400 kDa
Solubilidad en solución salina	más soluble	menos soluble
Temperatura de coagulación	menor menos estable	mayor más estable
Cantidad de nitrógeno y azufre	menor	mayor

Pernollet y Mossé, 1983

Existen dos grupos de proteínas en la fracción globulinas que se distinguen por su tamaño y contenido de azúcares. El primer grupo, lo forman proteínas de menor tamaño, generalmente formado por trímeros de subunidades glicosiladas con coeficientes de sedimentación entre 7S y 9S, y masas moleculares de 150 a 200 kDa, por lo que se conocen como proteínas tipo 7S. El segundo grupo lo forman proteínas hexaméricas de constantes de sedimentación entre 10.5S y 13.0S, sus masas moleculares de 300 a 400 kDa, y generalmente no contienen carbohidratos. Este grupo se denomina como tipo 11S. La mayoría de las leguminosas contienen los dos tipos de globulinas (7S y 11S), aunque existen algunas especies que tienen exclusivamente una de las dos fracciones (Pernollet y Mossé, 1983).

No existe en la actualidad un sistema de nomenclatura aceptado para nombrar a las fracciones de las globulinas tipo 7S y tipo 11S, por lo tanto no se ha alcanzado una decisión final acerca de la terminología de las mismas. El sistema basado en una aproximación del coeficiente de sedimentación, se ha empleado en forma extensa y frecuente, o bien como proteína tipo vicilina y proteína tipo legumina respectivamente (Wolf, 1980).

Algunos autores han utilizado para distinguir las subunidades de la fracción globulinas, los términos α -globulinas y β -globulinas, pero aún así, esta nomenclatura es específica para cada material. Por ejemplo Rajendran y Prakash (1988), denominan α -globulinas a la fracción mayoritaria en el ajonjolí que es una fracción tipo 11S y β -globulinas a la fracción de bajo peso molecular con coeficiente de sedimentación 2S, contrario a las fracciones reportadas en otros materiales, donde α y β globulinas se especifican con diferentes características. Por ejemplo en

soya la clasificación de las globulinas 7S se realiza a través de asignar tres nombres diferentes β -conglucina, β_0 -conglucina y γ -conglucina (Brooks y Morr, 1985).

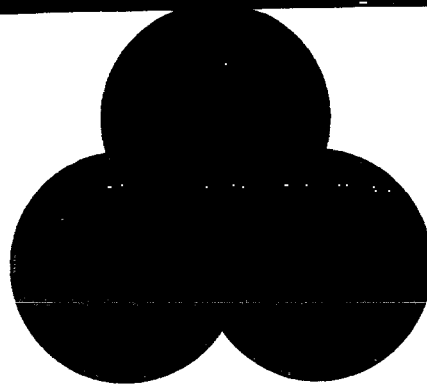
4.4.1. Proteínas Tipo 7S

La estructura de la vicilina ha sido investigada en un pequeño número de especies. Con respecto a su estructura cuaternaria, frecuentemente se presenta como homo o heterotrímero (Fig. 3), algunas veces siendo posible su asociación en hexámeros.

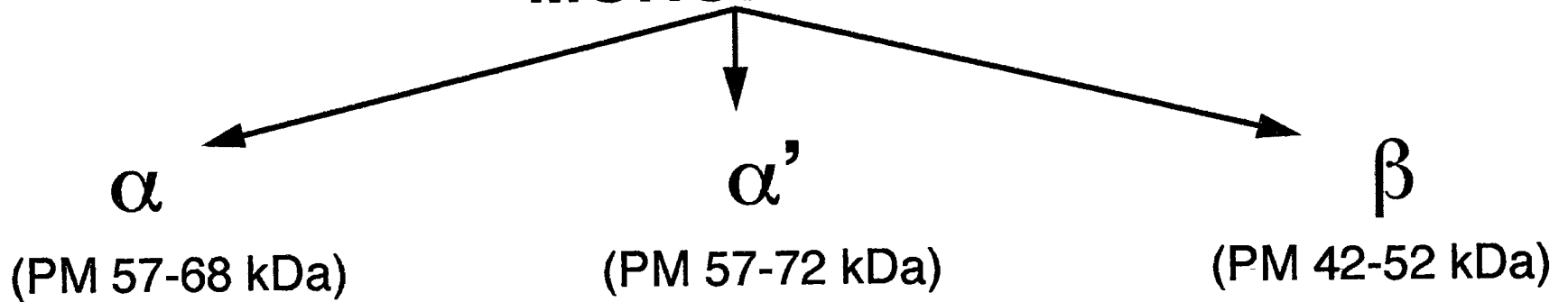
En la semilla de soya, la estructura de β -conglucina la mayor de las tres conglucinas conocidas, ha sido mostrada como una glicoproteína (Fukushima, 1991b). Esta consiste de trímeros de masa molecular que va desde 140 a 175 kDa, formada por tres tipos principales de subunidades denominadas α , α' , y β^* (Pernollet y Mossé, 1983). Cada subunidad tiene uno o dos grupos glicosilados N-enlazados y a su vez están unidas entre sí por medio de enlaces no covalentes (Fukushima, 1991b).

Pernollet y Mossé (1983), sugieren que el comportamiento de la β -conglucina (7S) en soya es similar al frijol con un coeficiente de sedimentación aproximado a 8S asociado en dímeros y trímeros, al igual que otras tres variedades de frijol como el cowpea, mientras que mencionan una última variedad de frijol el cual se compone de al menos tres subunidades diferentes con una asociación posible en heterotrímeros o tetrameros debido a su asociación con carbohidratos y constituyéndose a su vez una glicoproteína (Pernollet y Mossé, 1983).

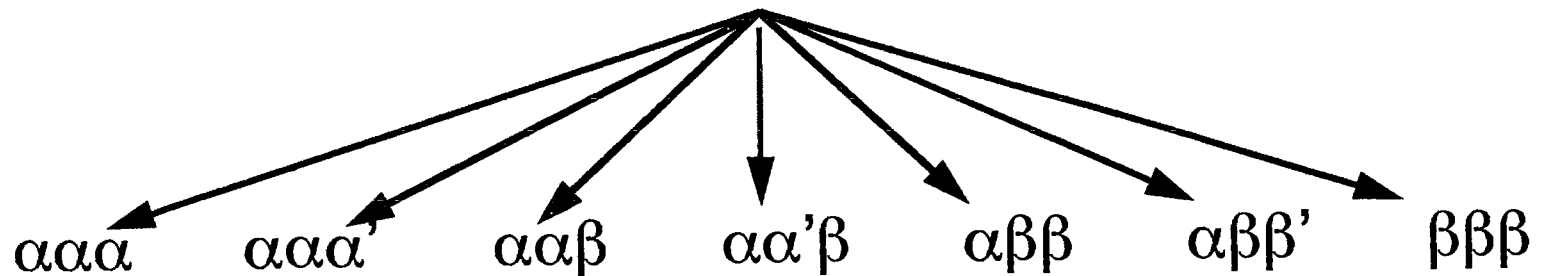
Fig. 3. Modelo estructural de la fracción 7S



MONOMEROS



TRIMERO (UNA MOLECULA)



SIETE TRIMEROS PRINCIPALES DE LA
 β -CONGLICININA DE SOYA (PM 150-200 kDa)

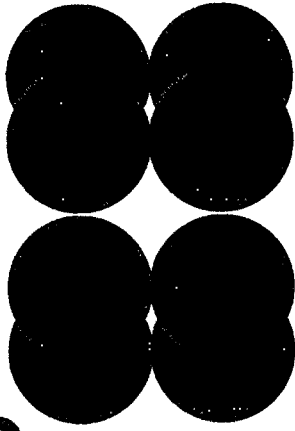
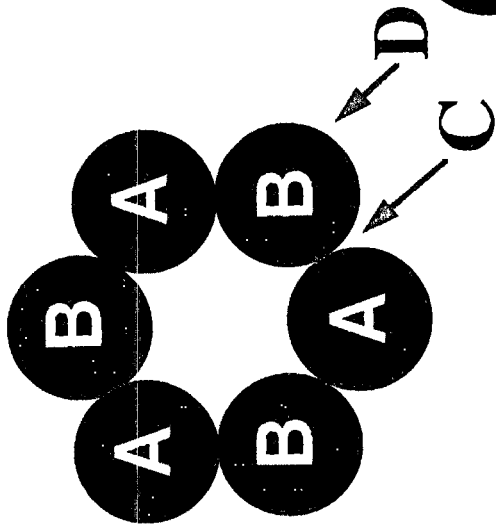
4.4.2. Proteínas Tipo 11S

En contraste con las globulinas tipo 7S, las globulinas tipo 11S carecen de carbohidratos (Pernollet y Mossé, 1983). Las globulinas tipo 11S también son complejos que consisten en seis subunidades no idénticas. Cada subunidad está compuesta de dos componentes polipeptídicos, uno con un punto isoeléctrico básico (18-28 kDa) y otro con un punto isoeléctrico ácido (29-35 kDa) (Robert y col., 1983; Guèguen y col., 1988). Ambos péptidos están unidos por medio de un enlace disulfuro simple representado como ácido-S-S-básico (Fukushima, 1991). Se ha visto que la totalidad de estos péptidos los cuales suman 12 subunidades se han agrupado en dos hexágonos idénticos situados uno sobre otro, de tal forma que cada subunidad ácida está asociada con tres subunidades básicas y viceversa (Fig. 4). En el caso de las globulinas 11S de las leguminosas, de avena, ajonjolí y semilla de colza por nombrar algunas, se tiene un coeficiente de sedimentación de 11-12.3 y un peso molecular de 300-440 kDa (Pernollet y Mossé, 1983; Peng y col., 1984).

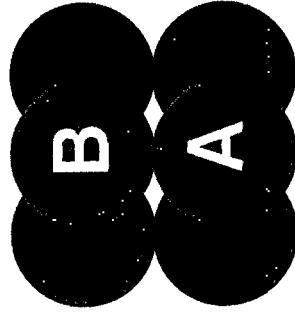
Por otra parte, las globulinas de arroz se presentan como excepción a la estructura de hexágonos opuestos en donde la unidad estructural de la molécula es un dímero (Fukushima, 1991).

Estudios anteriores han mostrado que al estimar la masa molecular de la proteína 11S de soya, a través de coeficiente de sedimentación, difusión y dispersión de la luz, es de 309 a 373 kDa. La variación de masas moleculares reportadas es natural debida a los distintos métodos de estimación, predominando los pesos moleculares superiores o iguales a 350 kDa (Peng y col., 1984).

Fig. 4. Modelo estructural de la fracción 11S



VISTA DESDE C



VISTA DESDE D

Las proteínas de soya han sido estudiadas ampliamente, la fracción 11S llamada glicinina consiste primeramente de una proteína simple y alcanza hasta el 35% del total de la proteína. La glicinina es idéntica a las globulinas 11S en su caracterización fisicoquímica (Peng y col., 1984).

4.4.2.1. Composición de aminoácidos.

Los aminoácidos esenciales son aquellos que los organismos monogástricos no pueden sintetizar y que necesitan incluirse en su dieta diaria: leucina, isoleucina, lisina, treonina, triptofano, fenilalanina, valina, metionina e histidina. Las globulinas presentan la mayor concentración de aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y aromáticos (fenilalanina y tirosina) (Duarte-Correa y col., 1986b; Bressani y García-Vela, 1990).

En general, la composición de aminoácidos en la mayoría de los granos no está balanceada en aminoácidos esenciales. Por ejemplo las leguminosas como frijol común, soya, lenteja, chícharo, tienen un porcentaje adecuado de proteína (22-47%) (Flores y col., 1986-1987), sin embargo, presentan deficiencias en metionina, cisteína y triptofano. De manera similar, cereales como maíz, trigo, arroz y centeno, con un menor contenido de proteína (9-12%), tiene deficiencias en lisina, treonina y triptofano (Higgins, 1984). Una combinación adecuada de estos granos, en la cantidad necesaria, podría satisfacer en parte los requerimientos diarios de proteína de una persona (Segura-Nieto, 1991).

Lásztity, (1984), menciona que las diferencias en la composición de aminoácidos de proteínas citoplásmicas y de

almacenamiento son relativamente grandes e influyen en el valor nutricional de ambos tipos de proteínas. Las proteínas de almacenamiento contienen una gran proporción de ácido glutámico y prolina y sólo una pequeña proporción de lisina, arginina, treonina y triptofano.

Para las fracciones 7S y 11S de soya y chícharo, en relación a los aminoácidos esenciales, se ha reportado que la fracción 11S de las leguminosas es de menor contenido en isoleucina, leucina, lisina y fenilalanina en relación a la fracción 7S, mientras que metionina es mayor en la fracción 11S. Con respecto a aminoácidos no esenciales, 7S y 11S en chícharo son las de mayor contenido en arginina. La fracción 11S de soya es rica en ácido glutámico y prolina y menores contenidos en ácido aspártico, ácido glutámico y serina (Barba de la Rosa, 1991).

Koshiyama (1972) reporta que la proteína 11S de soya es baja en metionina pero alta en lisina. La proporción de aminoácidos hidrofóbicos (alanina, valina, isoleucina, leucina, y fenilalanina) e hidrofílicos (lisina, histidina, arginina, ácido aspártico y ácido glutámico) es de 23.5 a 46.7% respectivamente. El punto isoeléctrico de la proteína 11S fue de 4.64, diferente en otros materiales en donde se encuentra entre 6.5 y 8.0.

Dentro de las fracción 11S cabe mencionar también que las subunidades ácidas que la constituyen son más ricas en ácido glutámico, prolina y cisteína que las subunidades básicas, y estas a su vez tienen mayor contenido de aminoácidos hidrofóbicos, leucina, alanina, valina, tirosina y fenilalanina. Peng y col. (1984) afirman que los aminoácidos ácidos en subunidades básicas se encuentran en sus formas amidas: asparagina y glutamina.

4.4.2.2. Enlaces disulfuro

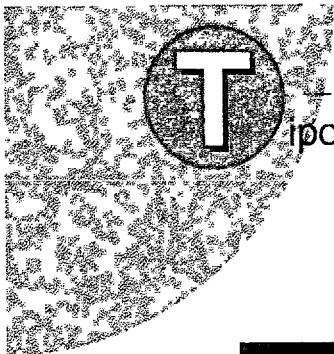
De todas las unidades covalentes, el enlace disulfuro S-S es el más débil ya que requiere de una menor energía para su hidrólisis (Tabla 10), por lo tanto es el más sensible a los diferentes agentes físicos y químicos que lo afectan.

La reacción de intercambio sulfidrilo-disulfuro ha sido encontrada como participe en muchas reacciones involucradas en la proteína 11S de soya, la cual contiene aproximadamente 48 moléculas de cisteína por mol de proteína (Peng y col., 1984). Los enlaces disulfuro de las proteínas provienen de la oxidación de dos moléculas de cisteína y desempeñan un papel muy importante en la estabilidad y funcionalidad de las moléculas de los polipéptidos. Muchas de las propiedades funcionales de las proteínas dependen de gran parte del número y localización de los enlaces disulfuro dentro de la macromolécula, y su ruptura causa grandes cambios conformacionales y la pérdida de dichas propiedades. Los enlaces disulfuro están sujetos a reacciones intermoleculares e intramoleculares de formación y ruptura, siendo las intramoleculares las más fácilmente alteradas.

Peng y col. (1984), reportan que se ha estudiado el rango de puentes disulfuros en la proteína 11S con agentes reductores a varias concentraciones de urea y se encontró que los enlaces disulfuro alcanzaron un máximo de 20 en urea 8M.

La proteína de soya contiene 1.7 grupos sulfidrilo por mol en urea 6M a pH 7.6, y a pH 11.9, esta contiene 9.2 grupos SH por mol, el cual es el máximo alcanzado por tratamiento alcalino. Esto se debe a que los grupos S-S se encuentran generalmente de manera interna en la proteína donde el tratamiento alcalino permite la ruptura S-S susceptibles en grupos SH.

Tabla 10. Tipo de enlace proteínico y energía para su hidrólisis



tipo de enlace proteínico y energía para su hidrólisis

Enlace	Energía de hidrólisis (kCal / mol)
Covalente	30 - 150
S - S	84
C - S	120
C - C	151
C - N	189
Electrostático (iónico)	10 - 20
Puente de hidrógeno	1 - 5
Interacción hidrofóbica	1 - 3

Baldwin y Eisenberg, 1987

4.4.2.3. Estructura molecular

La importancia de la secuenciación de aminoácidos en las proteínas de reserva radica en que permite el desarrollo de nuevos alimentos (Fukushima, 1991b) ya que esta secuenciación proporciona una valiosa información acerca de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas.

En diversos estudios de la estructura secundaria de una molécula de proteína 11S, se cuantificó la estructura ordenada de las globulinas 11S mediante el método de dispersión óptica rotacional, concluyéndose que la proteína 11S tiene 5.2% de α -hélice, 34.8% de estructura β 60% de estructura al azar, porcentajes que varían dependiendo del método de análisis. Lo que es claro es que las globulinas 11S de soya tienen un bajo contenido de estructura ordenada y elevado de estructura al azar (5.2-35 y 55-63%, respectivamente) (Peng y col., 1984).

La estructura ordenada de las globulinas 11S puede ser alterada por varios factores. Los tratamientos alcalinos decrecen la estructura ordenada, especialmente la β -estructura, adicionando etanol a la proteína 11S desnaturalizada alcalinamente, incrementa la estructura ordenada, (particularmente la α -hélice) y decrece el contenido de estructura al azar. Por otra parte la acetilación al 90% de las globulinas 11S decrece la estructura β e incrementa el contenido de estructura al azar (a 24 y 68% respectivamente).

También se ha mostrado que la estructura ordenada, especialmente la α -hélice, está relacionada a la formación de una estructura tridimensional en los geles obtenidos por tratamientos alcohol-alcalinos. La proteína 11S nativa tiene una conformación muy compacta con grupos neutros y básicos en su interior (Peng y col., 1984).

Los factores que afectan la conformación de las globulinas 11S incluyen pH, urea, HCl guanidina, concentración salina, temperatura y alcohol. La titulación con ácido de las globulinas 11S en presencia o ausencia de urea 6M o HCl guanidina 6M a varios valores de pH, mostraron que la desnaturalización ácida de la proteína 11S con su subsecuente disociación en subunidades comienza a pH 3.75 y llega a un máximo a pH 2.0. Entre pH 3.75 y 6.5, la proteína 11S aparece en forma esférica y no disociada. A pH 10 comienzan los cambios conformacionales acompañados de una desnaturalización alcalina, sin embargo éstos proceden rápidamente a valores de pH mayores a pH 11. La desnaturalización inducida por urea 6M difiere en proteína nativa y es más efectiva en la proteína 11S desdoblada que es producto de una desnaturalización alcalina. Por otra parte, la capacidad desnaturalizante de varios alcoholes, depende completamente de la hidrofobicidad del alcohol utilizado. Cuando la proteína 11S se disuelve en solución tampon de baja fuerza iónica ($\mu=0.1$) y se sujeta a un tratamiento ácido, se observan reacciones de disociación y desnaturalización simultánea de las cadenas polipeptídicas, no así cuando la solución tampon es de elevada fuerza iónica ($\mu=0.5$), el tratamiento ácido ocasiona una menor desnaturalización (Koshiyama, 1972; Peng y col., 1984) De aquí que a menor fuerza iónica, mayor será la influencia de un tratamiento ácido sobre la desnaturalización de la proteína.

4.4.2.4. Proteínas 7S y 11S provenientes de dos genes ancestrales.

Las proteínas tipo vicilina (7S) y tipo legumina (11S) son las proteínas de reserva esenciales en plantas dicotiledóneas (Jensen, 1984; Alexenko y col., 1988; Luthe, 1991) o al menos

alguna de ellas domina (Tabla 11); específicamente, las globulinas 7S y 11S que han sido caracterizadas en vegetales se han distinguido por ser las proteínas prevalentes dentro de las semillas tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, además de poseer características comunes en su organización estructural (Jensen, 1984; Alexenko y col., 1988; Luthe, 1991).

Anteriormente se consideraba que las proteínas 11S de reserva, se encontraban en leguminosas o que la estructura primaria común de las globulinas 11S se había identificado en sólo nueve especies de plantas provenientes de cinco familias (Barroto y Dure, 1987); ahora se sabe que estas fracciones han podido detectarse en las familias: *Fagaceae*, *Amaranthaceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Euphorbiaceae*, *Pomaceae*, *Pedaliaceae* y *Ranunculaceae* (Jensen y Berthold, 1989; Collada y col., 1991; Luthe, 1991) donde existen tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Tabla 11).

Lo anterior es notable por la fracción de proteínas de reserva principal en la mayoría de los cereales (monocotiledóneas) es la fracción prolaminas. De cualquier manera los cereales como avena (*Avena sativa L.*) y arroz (*Oriza sativa L.*) han presentado a las proteínas tipo legumina (tipo 11S) como la fracción mayoritaria del total de proteína en la semilla (Luthe, 1991). Cabe hacer notar, que la proteína de reserva mayoritaria del arroz, tiene propiedades de solubilidad de glutelinas, sin embargo tiene propiedades biofísicas similares a 11S (Luthe, 1991), presentando compatibilidad del modelo hexamérico y enlaces difulfuro propios de las mismas.

Se han reportado en el análisis de secuencia por cDNA, una gran homología (cerca del 72%) entre los aminoácidos

Tabla 11. Materiales que presentan las fracciones de globulinas
tipo 7S y/u 11S



Material que presentan las fracciones de globulinas tipo 7S y/u 11S

Material	No. Cotiledones	Fracción tipo 7S	Fracción tipo 11S	Fuente
Amarantaceas		8S, 10S	11.5S, 11.7S,	Konishi, 1985; 1989;
• Amaranto	2		12.7S, 13.0S	Marcone y Yata, 1991;
Cucurbitas				Barba de la Rosa y col., 1992;
• Calabaza	2		11S, 12S	Segura - Nieto y col., 1992
Gramineas				Hara - Nishimura, 1987;
• Avena	1		8.1S, 12.1S	Hara - Nishimura y col., 1985;
Herbáceas				Mimouni y col., 1985
• Amapola			10S	Peterson, 1978; Robert y col., 1983
Leguminosas				Srinivas y Narasinga - Rao, 1986
• Alfalfa	2	7S	11S	Stuart y Nielsen, 1988
• Chícharo	2	7S	12.1S, 12.5S	Deshpande y col., 1989; Gueguen, 1989; Gueguen y col., 1988
• Soya	2	7S	11S	Utsumi y Kinsella, 1985; Fukushima, 1991; Sessa, 1992
Oleaginosas				
• Algodón	2	5S, 7S 7.6S, 9.6S	9S, 11S 12S, 13S	Mohan - Reddy y col., 1989; Marshall, 1990; Zarins y col. 1984
• Canola	2		11S, 12S	Mimouni y col., 1990
• Cártamo	2	7S	12S	Latha y Prakash, 1984

constituyentes de las globulinas de avena y glutelinas de arroz lo cual sugiere la razón de la similitud en propiedades biofísicas de estos materiales (Luthe, 1991; Gorinstein, 1993). Por otra parte el análisis de secuencia por cDNA muestra una gran homología entre los aminoácidos de glicinina de soya y legumina de chícharo. Luthe (1991) observó que pese a que las proteínas 11S de avena, las orizeninas, las glicininas y leguminas tienen comportamientos fisicoquímicos muy similares, en lo que respecta a la secuencia de aminoácidos, la homología entre los cereales (avena y arroz) se encuentra en un solo 35% homóloga a la secuencia de las leguminosas estudiadas (soya y chícharo), por lo cual se ha sugerido que las proteínas de estos cuatro materiales analizados pueden ser producto del mismo gene ancestral.

Por otra parte Borroto y Dure (1987) sugieren que todas las fracciones de las globulinas se derivan de dos genes ancestrales: uno para proteínas tipo vicilina (tipo 7S) y otro para proteínas tipo leguminas (tipo 11S). Por ejemplo Brinegar y Goundan (1992) encontraron que la secuencia de aminoácidos de las subunidades ácidas y básicas de la proteína 11S de la quinua (chenopodina) presentaban bastante homología con las mismas subunidades presentes en otros materiales como proteína 11S y que las proteínas tipo 11S homólogas tienen precursores grandes en el retículo endoplásmico y son igualmente transportadas y almacenadas en cuerpos proteínicos vía complejo de Golgi, formando unidades ácidas y básicas (Gorinstein, 1993).

Alexenco y col., (1988) sugieren también que así como las enzimas han presentado estabilidad en la estructura y la función a partir de un gene evolutivo, así las globulinas tipo 11S u 11S también han permanecido estables en lo que concierne a estructura y función a lo largo de la evolución.

Con respecto a algunas proteínas de amaranto, Gorinstein (1993) encontró también gran homología entre la glicinina de soya (Globulina 12S) y otros materiales que presentan a las globulinas y a las glutelinas con un comportamiento tipo globulina 11S (de igual forma lo indica el trabajo de Vasco-Méndez y Paredes-López, 1995), sin embargo con respecto a las globulinas de amaranto aún no se encuentra dicha homología, aunque si se ha encontrado homología entre las proteínas membranales de todos aquellos materiales que están constituidos de alguna manera por la fracción 11S, con las proteínas membranales de *Amaranthus hybridus* (96-99.7%).

Las proteínas 7S y 11S se han caracterizado en forma similar a otras fracciones en otros materiales, sin embargo esta caracterización no ha sido de forma idéntica tanto en pruebas fisicoquímicas (Jensen, 1984), funcionales, inmunológicas, etc., demostrando la homología de las fracciones mas no la identidad (Breen y Croych, 1992; Brinegar y Goundan, 1993).

Las proteínas tipo 11S o tipo leguminas son producidas y almacenadas en el endospermo, o en los tejidos para almacén (cuerpos proteínicos) de los cotiledones (Jensen y Berthold, 1987). Al parecer, la función sobre los pasos que realiza el precursor de los agregados de globulinas tipo 11S, el mecanismo de transporte y de deposición de las proteínas de reserva son universales para plantas que florecen. Estos mecanismos probablemente determinan la conservación de regiones específicas de las cadenas polipéptidas de las proteínas de reserva (Alexenko, 1988).

Se han analizado nucleótidos y secuencias de aminoácidos de cinco subunidades de la fracción 11S de las globulinas de soya (glicinina), a los cuales se les han representado como A₁B₂,

A1bB1b, A2B1a, A3B4, y A5A4B3, los cuales fueron subdivididos a su vez dentro de dos familias (A1-A2 y A3-A4) de acuerdo a su nivel de homología (Alexenko y col., 1988).

El grupo de Alexenko y col. (1988) propuso que sólo las fracciones con una constante de sedimentación cercana a 11S tenían una reacción inmunológica similar a la obtenida con glicinina de soya, por lo tanto sugirieron una identificación de dichas fracciones, a través de determinantes antigénicos. Esto es, las pruebas inmunológicas se vuelven un método alternativo y exitoso en los estudios de evolución para la clasificación de las proteínas. Jensen (1984) sugirió al respecto que las proteínas tipo 7S (tipo vicilina) y tipo 11S (tipo legumina) deberían seguir denominándose como tales y no con nombres particulares hasta que pudiese demostrarse una homología exacta o diferencia a través del análisis de secuencia de aminoácidos en las proteínas.

Cabe hacer notar que ahora que se ha demostrado la presencia de las proteínas tipo legumina o tipo 11S en semillas, tanto mono como dicotiledóneas, sería interesante el conocer el cuándo y el cómo ocurrió el cambio de proteínas tipo 11S de globulinas a prolaminas en la familia *Pomaceae* (Luthe, 1991); o de globulinas tipo 11S a glutelinas (Collada y col., 1991; Luthe, 1991), en caso de tener un mismo gene ancestral.

Como ya se ha mencionado, a los granos de amaranto se les ha clasificado como pseudo-cereales debido a que producen granos o semillas del tipo de los cereales, plantas monocotiledóneas, y porque su sabor es parecido al de ellos., sin embargo como también ya se hizo observar, el amaranto es una planta dicotiledónea sin ser leguminosa (Saunders y Becker, 1984). La presencia de proteínas tipo 7S y/u 11S como se ha reportado por diversos autores (Konishi y col., 1985; Barba de la Rosa y col.,

1992b; Segura-Nieto y col., 1992), podría referir al amaranto como miembro de la familia que preserva estos genes ancestrales, explicando en un futuro su comportamiento como cereal (monocotiledónea) y sus características fundamentales como dicotiledónea.

4.4.3. Procedimientos de Obtención, Aislamiento y Purificación de las Fracciones Tipo 11S

Se han considerado como los métodos más exitosos de fraccionamiento y caracterización en las proteínas de semillas, a la extracción secuencial, filtración en gel, electroforesis y análisis de secuencia de aminoácidos (Andrews, 1988). Los esquemas de extracción son generalmente empleados para fraccionar por solubilidad las proteínas presentes, lo cual tiene un alto poder de resolución y son preparativas. Osborne (1924) primero demostró que las proteínas de semillas podían dividirse en clases muy simples mediante extracción sucesiva o secuencial con diferentes solventes, de las cuales, posteriores clases distintivas o subclases de proteínas podrían fraccionarse a través de una selección cuidadosa en el manejo de disolventes adicionales. Las técnicas cromatográficas generalmente siguen la extracción para la purificación y caracterización de las proteínas. Las preparaciones cromatográficas se pueden basar en tamaño, peso y carga para facilitar la separación (Bietz, 1979; Lásztity, 1984).

Las soluciones de cloruro de calcio (CaCl_2), cloruro de sodio (NaCl), bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3), los tratamientos con temperatura y las precipitaciones isoeléctricas han sido empleadas ampliamente para la extracción de fracciones ricas en globulinas de tipo 11S de semillas de alfalfa (medicagina) (Staurt

y col., 1988; Koleva y col., 1992; Lai y col., 1992), chícharos y frijol (legumina) (Deshpande y Damodaran, 1989), nuez del Brasil (Weller, 1989). Otras proteínas 11S extraídas por estos métodos incluyen: algodón (Mohan-Reddy y Narasinga-Rao, 1988), ajonjolí (Rivero de Padua, 1983; Prakash, 1986; Rajandram y Prakash, 1988), avena (Peterson, 1978), cacao (Voigh y col., 1993), Cártamo (Latha y Prakash, 1984), coco (Rasyid y col., 1992), frijol broad (legumina) (Pavlovskaya y col., 1992), girasol (Allen y col., 1985), lupino amarillo (Esnault y col., 1991), quinua (chenopodina) (Brinegrar y Goundan, 1993), y soya (Saio y Watanabe, 1973; Wolf, 1980; Brooks y Morr, 1985; Fukushima, 1991ab; Sessa, 1992).

Es importante por lo tanto hacer referencia a los métodos de extracción comunmente utilizados en el fraccionamiento de la fracción globulinas y subunidades de las mismas.

La fracción insoluble en frío o crioprecipitable de la soya, contiene proteínas 2S, 7S, 11S y 15S de las cuales la fracción predominante es 11S (Peng y col., 1984), empleando esta característica y bajo el auxilio de la precipitación con sulfato de amonio se obtiene la proteína 11S con un 91-93% de pureza. En general una vez empleada la crioprecipitación, la purificación cromatográfica ha sido común.

Peng y col. (1984) a su vez reportan el método de extracción propuesto por Koshiyama (1972). Este fraccionamiento de la proteína 11S de soya puede prepararse tomando la ventaja de diferencias significativas en cambios conformacionales inducidos en condiciones ácidas cuando la fuerza iónica en la solución proteínica se altera con cloruro de sodio (NaCl). Las globulinas de soya 11S precipitan completamente en una solución de HCl (pH

2.0) conteniendo cerca de 0.5M de NaCl pero las globulinas 7S precipitan sólo cuando la concentración de NaCl es de 0.8M a mayor (Fig. 5). En la práctica de fracción rica en proteína 11S se prepara mediante este método.

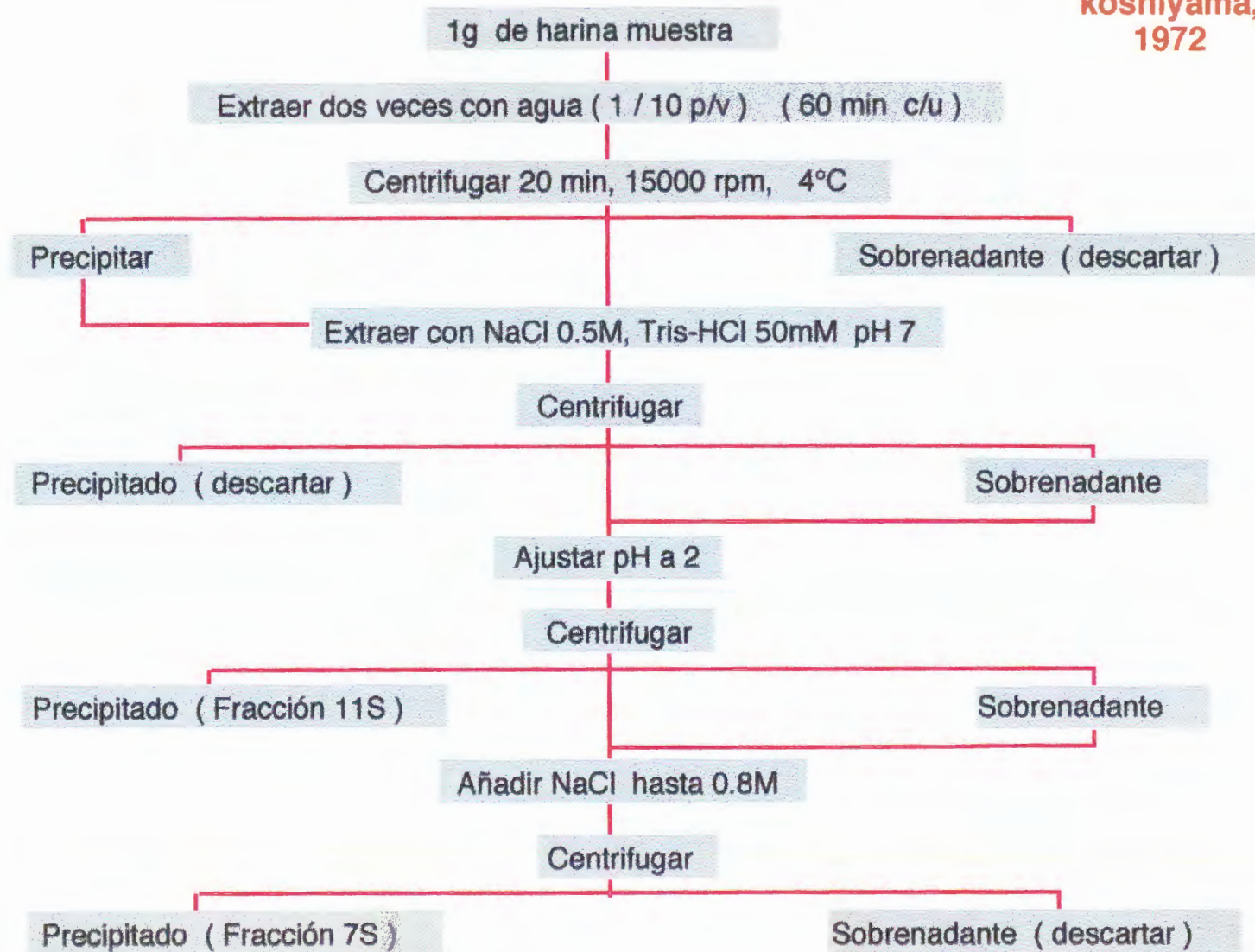
Saio y Watanabe (1973), manejan las diferencias en el comportamiento de precipitación de las proteínas 7S y 11S con sal de calcio que constituye la base para su separación. Ambas proteínas son extraídas con una solución diluida de cloruro de calcio 10mM a temperatura ambiente. El fraccionamiento se logra ajustando pH para alcanzar el punto isoeléctrico de cada proteína y de esta forma lograr su precipitación (Fig. 6).

En el método de extracción de Okubo y col. (1975), la fracción 11S, se extrae a partir de harina de soya desgrasada con una solución muy diluida de NaCl (0.065M) conteniendo un agente reductor como es el β -mercaptoetanol (10mM) y a un pH de 8.0 a 5°C. El extracto se filtra a través de varias capas de gasa y se centrifuga. El sobrenadante se ajusta posteriormente a pH 6.3 con HCl, la solución se agita durante 15 min. a 5 °C y una vez transcurrido este tiempo, se centrifuga. La fracción que precipita es la fracción 11S de las globulinas (Fig. 7).

Peng y col. (1984) también reportan el método de extracción propuesto por Thanh y Shibasaki (1976) basado en la diferencia de solubilidad de las proteínas 11S y 7S la solución tampón diluido de Tris-HCl (0.03M) pH 8.0. Cuando la solución tampón se ajusta a pH 6.4, las globulinas 11S se precipitan. Las globulinas 7S se separan posteriormente por precipitación isoeléctrica ajustando el pH del sobrenadante a 4.8. Este procedimiento es factible para preparaciones a gran escala de la proteína 11S.

Fig. 5. Método de extracción para la fracción 7S de soya
propuesto por Koshiyama (1972)

koshiyama,
1972



**Fig. 6. Método de extracción para la fracción 11S de soya
propuesto por Saio y Watanabe (1973)**

Saio y Watanabe, 1973

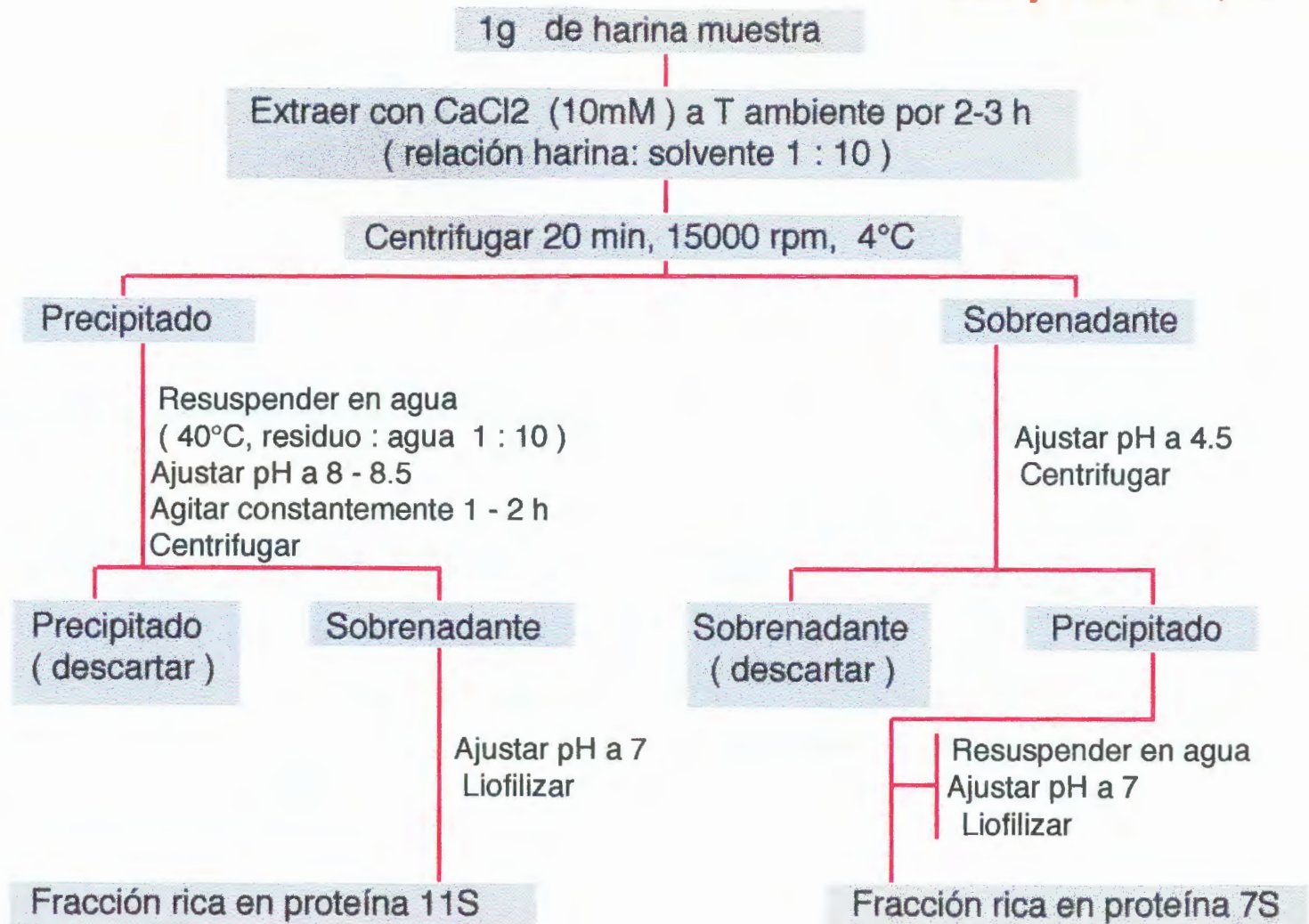


Fig. 7. Método de extracción para la fracción 11S de soya
propuesto por Okubo (1975)

Okubo, 1975

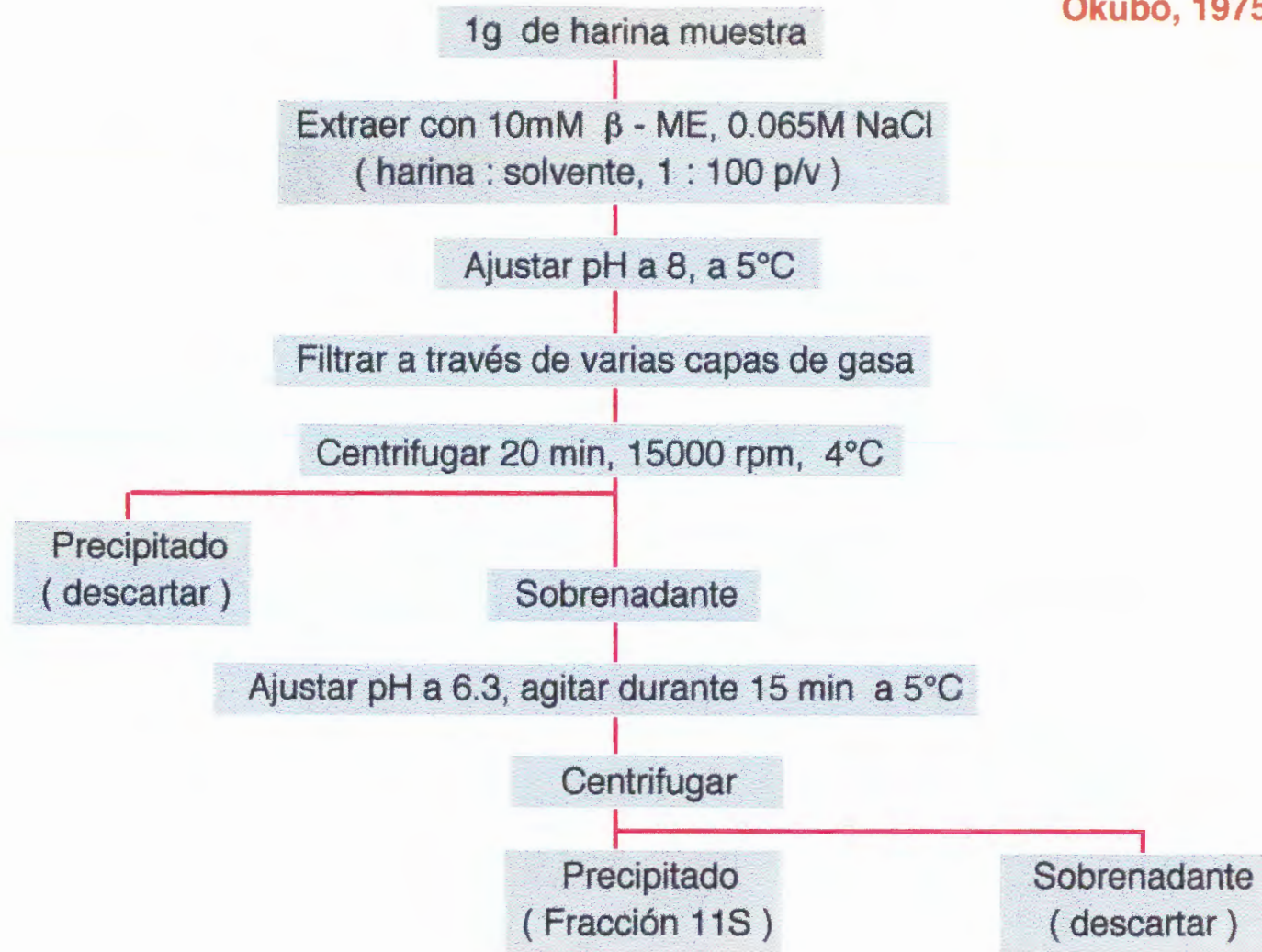


Fig. 7. Método de extracción para la fracción 11S de soya
propuesto por Okubo (1975)

Latha y Prakash (1984) indicaron que en el caso de la extracción de la fracción tipo 11S (12S) de cártamo (la cual constituye alrededor del 65% de sus globulinas) existe un notable decremento en el porcentaje extraído de la misma en ausencia de cloruro de sodio. La proteína total en la semilla de cártamo al ser extraída a pH 7.5 por solución tampón de baja fuerza iónica en presencia de cloruro de sodio mostró que consiste predominantemente de una fracción mayoritaria (65% de las globulinas) con coeficiente de sedimentación de 12S, y otros tres componentes con valores de sedimentación de 2S, 7S y 17S constituyendo las fracciones aproximadamente 26%, 6% y 3% respectivamente.

Rivero de Padua (1983), y Rajendran y Prakash (1988), reportaron que la fracción globulinas de la semilla de ajonjolí consiste principalmente de globulinas 13S obteniéndose a pH alcalino y concentraciones superiores de 2% de NaCl en la solución extractante, mientras que Prakash (1986) sólo maneja la concentración de NaCl de 0.5M o más, obteniendo fracciones proteínicas una de 2S y otra 11S constituyéndose 30 y 60% respectivamente y de igual manera dos fracciones proteínicas con valores de sedimentación de 7S y 16S y constituyendo el 5% de cada uno.

Konishi y col. (1985), extrajeron las globulinas de amaranto empleando solución tampón de fosfatos (con fuerza iónica $\mu=0.5$), conteniendo 0.4M de NaCl y 20mM del agente reductor β -mercaptoetanol, y agitaron esta solución 24 h a 4^o C, se centrifugó y el sobrenadante se dializó contra agua destilada. Las globulinas 11S se purificaron posteriormente por técnicas cromatográficas.

Resultados similares a los reportados por Konishi y col. (1985), los obtuvieron Marccone y Yada (1991), al analizar también la fracción globulinas de amaranto quien empleó una pequeña modificación en los solventes extractantes, temperaturas y técnicas cromatográficas de los empleados por Konishi y col. (1985).

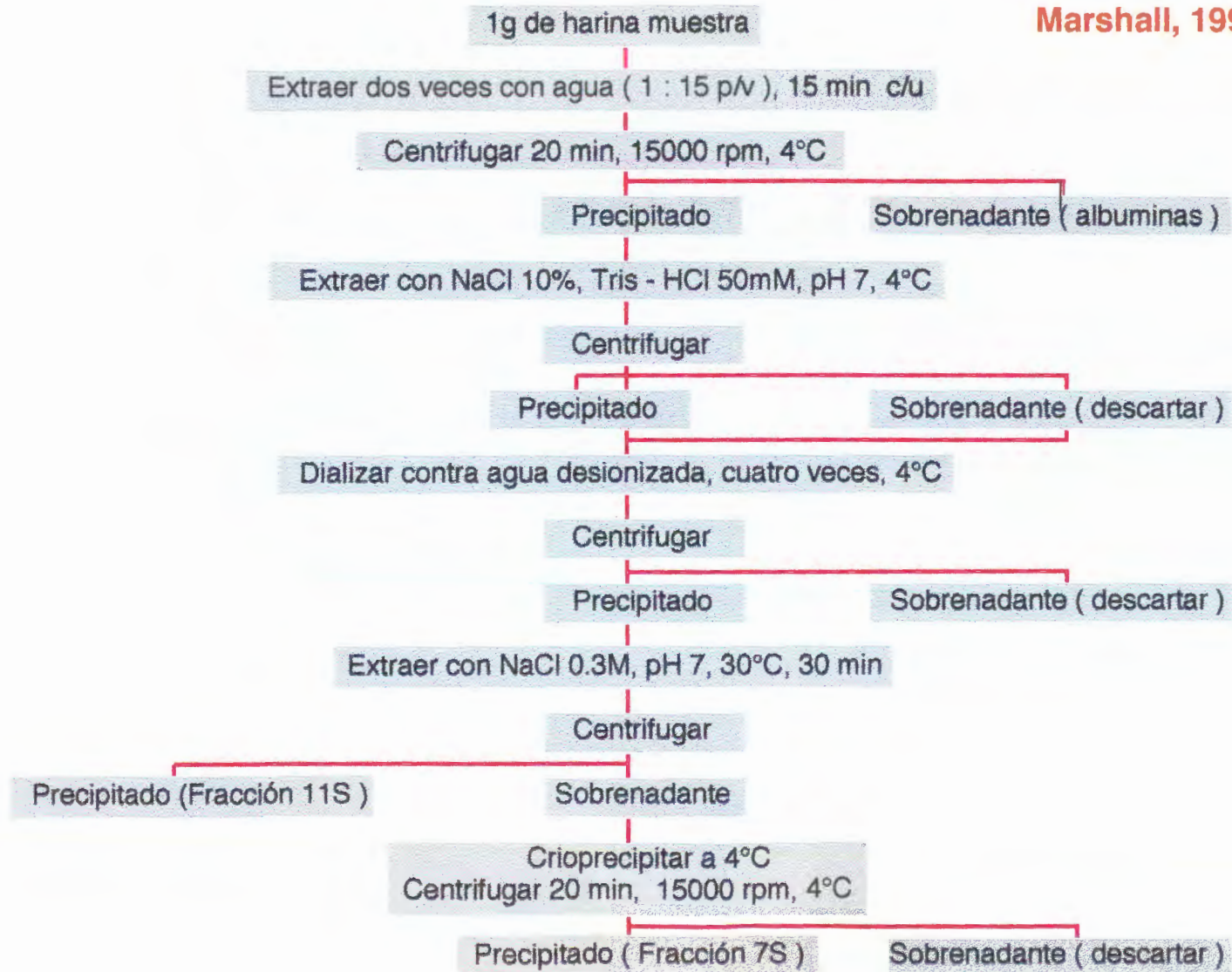
Marshall (1990) desarrolló un método simple y rápido para fraccionar y purificar las globulinas 7S de la semilla de algodón y sus dos subunidades, esto fue mediante el uso de cantidades pequeñas de material inicial. Las extracciones se llevaron a cabo a 4 °C, con una exposición mínima a temperatura ambiente, empleando poco tiempo para la extracción y manejo, y reiterando la pureza de fracciones y subunidades a través de HPLC fase reversa (Cromatografía Líquida de Alta Resolución fase reversa) (Fig. 8).

Recientemente, como ya se había mencionado, Barba de la Rosa y col. (1992ab) empleó una solución de harina de amaranto en solución tampon de Na₂HPO₄, pH 7.0 para extraer la proteína cruda. Después de la extracción, centrifugó durante 20 min a 9000 x g. dializó el sobrenadante durante 5 días a 4 °C contra agua destilada. El precipitado resultante de este tratamiento se denominó extracto crudo de globulinas el cual fue liofilizada y por medio de ultracentrifugación separada en las subunidades 10S y 12.7S que de acuerdo a este estudio a través de técnicas cromatográficas empleadas para su separación, tenían características similares a las fracciones 7S y 11S de otros materiales.

Olguín-Martínez y Segura-Nieto (1991), Segura-Nieto y col. (1992), reportaron también tres subunidades componentes de

Fig. 8. Método de extracción para la fracción 7S de algodón
propuesto por Marshall (1990)

Marshall, 1990



las globulinas de amaranto 1.9S, 8S y 13S, las cuales se lograron una vez que se extrajeron las albúminas con una solución de baja fuerza iónica. Las globulinas se extrajeron de la pastilla remanente con una solución 1.0M de NaCl, una vez obtenidas las globulinas, concentradas por diálisis, fueron después solubilizados y separados en gradientes de sacarosa. La determinación del coeficiente de sedimentación se realizó al comparar su separación contra la de las proteínas de coeficiente de sedimentación conocido.

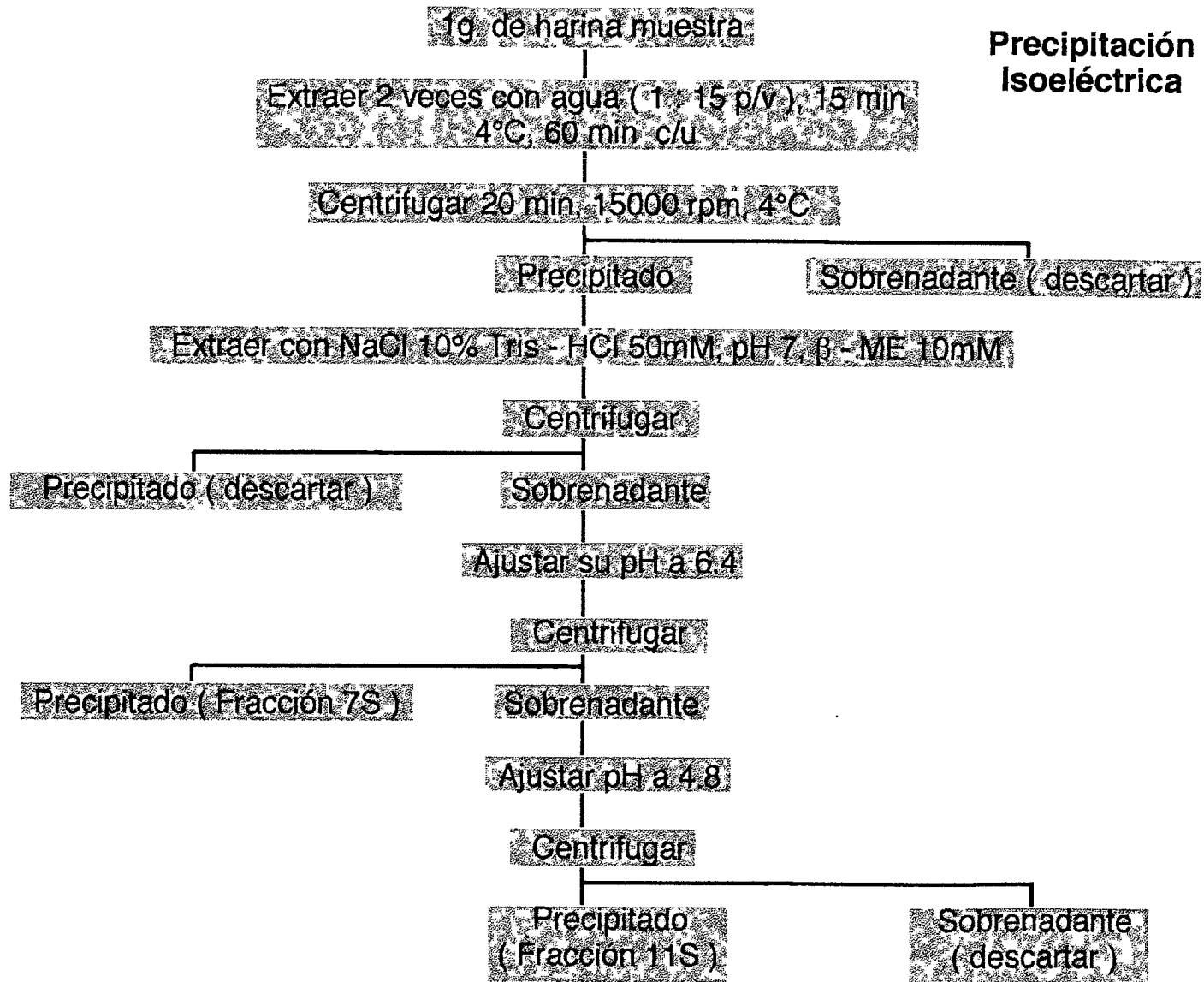
Soriano-Santos y col. (1991 y 1992), postulan que la solubilidad de las globulinas de amaranto están fuertemente afectadas por las soluciones extractantes y sus concentraciones.

En su estudio, las globulinas de amaranto mostraron casi un 100% de solubilización en NaCl 0.4M ($\mu=0.4$) a pH 9.0.

El fraccionamiento por punto isoeléctrico (Fig. 9) considera en primer lugar la extracción de las globulinas totales y posteriormente alcanzan el punto isoeléctrico de cada una de las fracciones.

Bonnerjea y col. (1986), han reportado que los procedimientos de extracción por medio de precipitación de las proteínas, pueden lograr una purificación proteínica adecuada con la ventaja de que estas metodologías pueden ser empleadas en la extracción de grandes cantidades de material y menos afectadas por la presencia de materiales no proteínicos como el procedimientos cromatográficos y de adsorción.

Fig. 9. Método de extracción de las fracciones 7S y 11S por precipitación isoeléctrica



α -(1 \rightarrow 4) y α -(1 \rightarrow 6) y finalmente las del grupo de las amilopectina 1,6-glucosidasas hidrolizan exclusivamente los enlaces α -(1 \rightarrow 6) (Novo, 1986; Paredes-López y col. 1990).

La β -amilasa hidroliza el almidón atacándolo únicamente por su extremo no reductor y produce moléculas de maltosa y dextrinas básicamente. Por otra parte, a la α -amilasa se le designa como enzima licuante ya que al hidrolizar los enlaces químicos del almidón en una forma al azar, reduce rápidamente la viscosidad de las dispersiones de este polímero, el producto de la hidrólisis son dextrinas, maltosa, glucosa y por lo general el poder reductor de las dispersiones de almidón aumenta considerablemente. Las enzimas amilopectina 1-6 glucosidasas hidrolizan el enlace α -(1 \rightarrow 6) del glucógeno y de la amilopectina en una forma al azar con la consecuente producción de cadenas lineales de polisacáridos de diferente longitud. Este grupo de enzimas se puede dividir a su vez en dos clases principales que dependen de su especificidad por el sustrato: pululanasa e isoamilasas. La diferencia estriba en que las pululanasas hidrolizan los enlaces α -(1 \rightarrow 6) de la maltotriosa (pululano), mientras que las isoamilasas no tienen ninguna acción sobre este trisacárido (Novo, 1986; White y Kennedy, 1988; Paredes-López y col. 1990).

En algunos métodos continuos de purificación de proteínas, los tratamientos enzimáticos en la eliminación de carbohidratos presentes en la muestra son una opción viable y eficaz, logrando el rompimiento de polímeros de carbohidratos, lo cual como ya es sabido, permite que el carbohidrato de menor tamaño y menor peso molecular pueda solubilizarse y a su vez

mediante una separación, se puede lograr la purificación proteínica requerida.

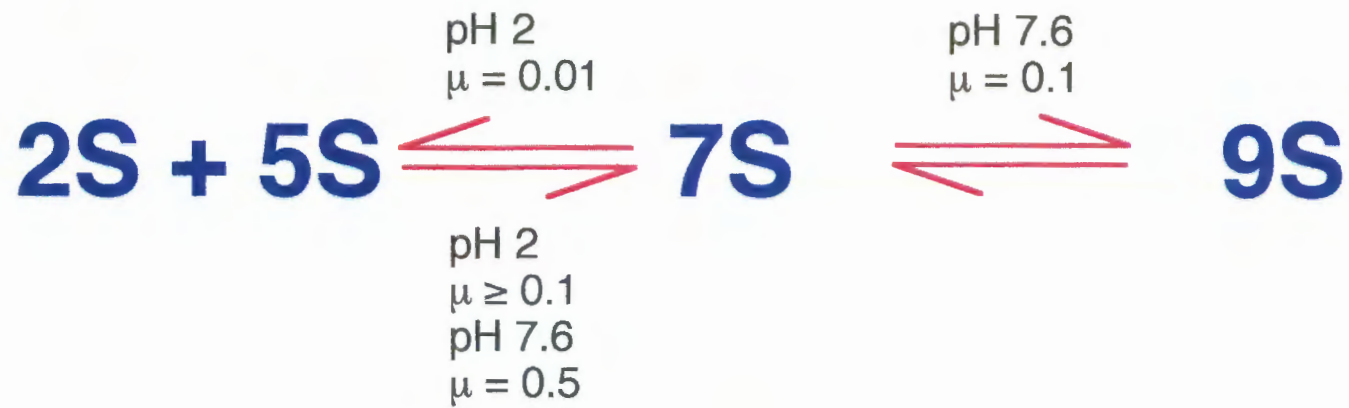
4.4.4. Reacciones de Asociación-Disociación

Wolf (1980) encontró previamente que las propiedades de sedimentación de las globulinas de la soya dependen de las condiciones en que se encuentra la proteína; composición de la solución tampon, pH y otros factores. Por ejemplo, se observó que una porción de la fracción 7S en soya a pH 7.6 y una fuerza iónica de 0.5, dimeriza al cambiar la fuerza iónica a 0.1, formando de esta manera al analizarla por ultracentrifugación, un agregado cuyo coeficiente de sedimentación corresponde a 9S; la misma fracción se disocia a pH 2 y una fuerza iónica de 0.1 (Fig. 10).

En el caso de las proteínas de soya, la subunidad principal 11S de las globulinas tiene un peso molecular entre 200 y 600 kDa en estado nativo, donde estas moléculas en estado nativo pueden formar todavía partículas de mayor o menor tamaño a través de las reacciones de asociación - disociación o mediante la formación de enlaces disulfuro dentro del polímero (Fig. 11) (Wolf, 1980).

Por lo tanto, se puede afirmar que una de las características de las proteínas 7S y 11S, son sus reacciones de asociación - disociación en donde en ambas reacciones, al modificar pH y fuerza iónica de la solución, se obtienen agregados de elevado peso molecular o unidades disociadas reversible o irreversiblemente de menor peso molecular, todo esto con un cambio en el coeficiente de sedimentación correspondiente.

Fig. 10. Fenómeno de asociación-disociación de la fracción 7S
para las globulinas de soya (Wolf, 1980).

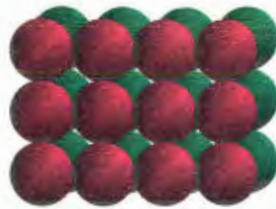


(MONOMERO)

0.01N
 $\mu = 0.1$

0.4S

Fig. 11. Fenómeno de asociación-disolución de la fracción 11S para las globulinas de soya (Wolf, 1980)



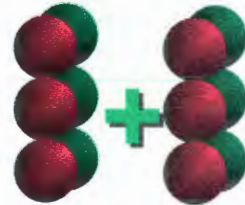
AGREGADOS

pH 7.6
 $\mu = 0.1$ ↓ ↑ $\mu = 0.5$



PROTEINA 11S

$\mu = 0.5$ ↑ ↓ pH 7.6
 $\mu = 0.001$ ↓ UREA ↓ DETERGENTE ↓ pH EXTREMO



7S

↓ pH EXTREMO /
DETERGENTE /
UREA



SUBUNIDADES

4.4.5. Propiedades Funcionales de las Fracciones Tipo 11S

Las propiedades funcionales de las proteínas se han definido como cualquier propiedad fisicoquímica que afecta el comportamiento y las características de un alimento y que contribuye a la calidad final del producto (Kinsella y col., 1985; Morr y Ha, 1993), excepto sus propiedades nutrimentales (Pour-El, 1981).

A pesar de que la calidad nutrimental de una proteína es de gran importancia, las propiedades fisicoquímicas representan un factor fundamental en el mejoramiento y desarrollo de nuevos productos alimenticios. La variedad y versatilidad de las propiedades de las proteínas son de importancia básica en la definición de los parámetros de calidad de alimentos. Por esto, sus características funcionales juegan un papel primordial en la identidad y desarrollo de un producto. De aquí que durante el proceso, almacenamiento y consumo de un alimento, el comportamiento de las proteínas que lo constituyen está definido por sus características físicas, químicas y/o funcionales (Creamer y col. 1988).

Las proteínas vegetales por sí solas no tienen apariencia gastronómica y palatabilidad cuando está en forma de harina. La transformación de esta apariencia en alimentos atractivos, requiere algunos tipos de procesos en los cuales las proteínas se encuentren en dispersiones coloidales (Kinsella y col., 1985).

Las técnicas físicas también son muy empleadas para la caracterización de las proteínas. La forma y estado de las

moléculas proteínicas pueden ser reveladas por estudios de viscosidad, tensión superficial y la estabilidad de espuma, los cuales se pueden emplear en explicar el comportamiento de una proteína en algún producto alimenticio (Bietz, 1979).

En los sistemas de alimentos principales, las propiedades funcionales más importantes son: absorción de agua (por ejemplo en productos de panificación); absorción de lípidos y agua (en emulsiones o extensores en productos cárnicos); textura, color, sabor, olor, sensación al consumirse y dispersabilidad (en sustitutos lácteos), capacidad de emulsión y gelación térmica (en sustitutos de huevo).

El empleo y éxito de las proteínas vegetales para su aplicación en alimentos, consiste además de proveer aminoácidos esenciales, en que debe poseer características funcionales ideales. La capacidad de absorción de agua es una de las propiedades funcionales de mayor importancia. Esta capacidad representa la habilidad de atrapar físicamente moléculas de agua pese a la gravedad. De igual manera la absorción de aceite se atribuye principalmente al atrapamiento físico del mismo (Paredes-López y Ordorica-Falomir, 1986b; Hutton y Campbell, 1981).

Por otra parte, cuando una suspensión proteínica es agitada hasta formar espuma, esta puede capturar aire en pequeñas burbujas rodeadas por una película líquida. La tensión superficial entre aire y agua se obtiene gracias a las proteínas. La capacidad de formación de espuma por las proteínas depende del grado de afinidad de las mismas por la superficie líquido-aire y su habilidad por desnaturalizarse y formar películas cohesivas con

viscosidad y fuerza mecánica suficiente para prevenir las rupturas y uniones de las burbujas de aire, facilitando la interacción entre la superficie hidrofóbica e hidrofílica (Cherry y McWatters, 1981; Paredes-López y Ordorica-Falomir, 1986b; Yuno y col., 1988).

La capacidad de absorción de aceite de los alimentos es también una propiedad funcional importante debido a que mejora las características organolépticas y la retención de aromas y sabores (Hutton y Campbell, 1981).

El impacto que ha tenido la proteína de soya como ingrediente alimenticio se debe a su funcionalidad y bajo costo. Considerando su contribución nutrimental como lo es su elevado contenido proteínico, contenido de lisina, alto nivel de fibra dietética y nivel cero de colesterol (Rivero de Padua, 1983; Peng y col. 1984).

Un ejemplo de la importancia de las propiedades funcionales para la aplicación de sistemas alimenticios es el que presenta Johnson y col. (1979), los cuales reportaron que las proteínas de ajonjolí pese a ser estables ante el calentamiento, de presentar grandes cantidades de metionina y de estar presentes en un 25% peso seco de la semilla, estas proteínas presentan baja solubilidad limitando su aplicación en alimentos cuando éstas se encuentran presentes en forma nativa. Su utilización por tanto es menor que el de la soya, lo cual se debe a que la información acerca de sus propiedades funcionales es insuficiente (Yuno y col. 1988).

Rivero de Padua (1983), propone a las proteínas de ajonjolí como una fuente de proteínas para alimentos alternativos

a los actuales, en donde su uso depende directamente de las propiedades funcionales que están presentes. Estudiando la estructura de la fracción de la globulina de la semilla de ajonjolí, encontraron que la fracción proteínica consiste principalmente de globulina 13S con características del tipo de las proteínas tipo 11S, obteniendo resultados aceptables con respecto a la funcionalidad de la misma.

Tal hecho nos ha impulsado a caracterizar también funcionalmente a la proteína tipo 11S en las globulinas de amaranto, de lo cual no se tiene información y por lo tanto la aplicación de sus proteínas a los diversos sistemas alimenticios, se ve muy restringida.

4.4.5.1. Solubilidad y desnaturalización

Los índices de solubilidad de nitrógeno, curvas de extracción de nitrógeno y curvas de precipitación del mismo son indicadores importantes del daño que han tenido las proteínas durante su obtención, su aplicación potencial en los alimentos y en general de las propiedades funcionales de las proteínas en los alimentos (Morr y col., 1985; Guevara-Lara, 1989).

La desnaturalización implica una modificación en la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la molécula proteínica, la cual es causada generalmente por calentamiento, pH, concentraciones salinas, y solventes orgánicos. Las propiedades funcionales como lo son absorción de agua, capacidad de emulsificación y formación de espuma se ven afectadas con un decremento en la solubilidad debido al fenómeno de desnaturalización, mientras que por este mismo fenómeno se

incrementan la absorción de aceite, viscosidad y capacidad de gelificación en una proteína (Guevara-Lara, 1989).

4.4.5.2. Absorción de agua y de aceite

Las ramificaciones apolares de la proteína, contribuyen a la hidrofobicidad de la misma, por la cual el agua es retenida y absorbida en los productos alimenticios finales. En productos de panificación, la harina de soya puede reemplazar la leche en polvo descremada con el objeto de absorber agua, mejorar el manejo de la masa e incrementar el peso final del producto.

Las proteínas tienen influencia en lo que se refiere al mejoramiento de los productos que requieren retener y/o absorber grasa. Por otra parte las proteínas pueden emplearse como agentes reguladores de la excesiva absorción de grasa. Como en el caso de la harina de soya que se emplea para prevenir la absorción de grasa excesiva durante la fritura de algunos productos de panificación.

Paredes-López y Ordorica-Falomir (1986b) y Ordorica-Falomir (1988), hacen referencia a la importancia de la absorción de grasa en los productos alimenticios debido a que mejoran la retención de aroma y sabor.

Por ejemplo la actividad emulsificante de la fracción 13S de las globulinas del ajonjolí, presentó una actividad intermedia entre aquella mostrada por las fracciones 7S y 11S de las globulinas de soya. Yuno y col. (1988), atribuyen ésta diferencia en la actividad emulsificante e hidrofobicidad de los geles entre 13S de ajonjolí y 11S y 7S de soya a que la hidrofobicidad superficial de 13S fue mayor que 11S y la

colaboración de los carbohidratos presentes en la fracción 7S, produciendo la diferencia en la actividad de emulsión, y siendo la emulsión de 13S menos estable y con una mayor tendencia a la separación de componentes de la emulsión.

4.4.5.3. Formación de geles

La formación del gel provee una matriz capaz de retener agua y lípidos. Las propiedades funcionales de las proteínas de reserva y sus mecanismos son descritos a nivel molecular para la gelificación de las globulinas 7S y 11S de soya y para las propiedades viscoelásticas de las subunidades de alto peso molecular de las glutelinas de trigo. Como generalidad se tiene que en la formación de un gel de las globulinas 7S no participan reacciones de intercambio -SH/S-S, por lo tanto los geles son suaves y transparentes, mientras que en la formación de un gel de las globulinas 11S, participa la reacción de intercambio de grupo -SH/S-S, provocando la formación de geles firmes y turbios (Saio y Watanabe, 1973; Fukushima, 1991b).

4.5. DIGESTIBILIDAD *IN VITRO*

La digestibilidad de las proteínas, implica el análisis de biodisponibilidad de las mismas a través de métodos biológicos, químicos y enzimáticos. Se considera que las proteínas tienen un valor nutritivo intrínseco, sin embargo depende de la presencia de factores antinutrimientales, digestibilidad y absorción de las mismas, en el proceso de biodisponibilidad. Dependiendo de la metodología empleada, la digestibilidad se clasifica como aparente y verdadera., y por otra parte como *in vivo* e *in vitro* en donde Hsu y col. 1977 reportan una metodología que logra la alta correlación de las últimas.

5. MATERIALES Y METODOS

En la Fig. 12 se presenta el diagrama general metodológico de los tratamientos de análisis de la harina y fracciones proteínicas del amaranto.

5.1. GRANO DE AMARANTO

Para este estudio se contó con el material de amaranto *Amaranthus hypochondriacus* tipo mercado, donado por el INIFAP de la cosecha de 1989 (Fig. 13). Este material se conservó en bolsas de polietileno dobles dentro de recipientes plásticos opacos sellados y en refrigeración a 4°C.

5.1.1. Evaluaciones Físicas del Grano

5.1.1.1. Tamaño de granos

El tamaño se determinó midiendo el largo y ancho de los granos de amaranto (Fig. 14).

5.1.1.2. Peso de 1000 granos

Esta propiedad está relacionada con la medida y densidad del grano. El peso de 1000 granos se determinó pesando 100 granos y extrapolando el valor.

5.1.1.3. Peso hectolítrico

El peso por unidad de volumen (kg/hL) es usado como una prueba de control de calidad en granos y fue determinado en la Balanza OHAUS-78-08550 (Seedburo Equipment Co., Chicago, Ill.).

Fig. 12. Diagrama general metodológico de la extracción y purificación de la fracción globulinas 11S de amaranto

HARINA DE AMARANTO INTEGRAL Y DESGRASADA

evaluación física del grano
composición química de las harinas. humedad, % de proteína y cenizas

extracción salina
(T ambiente, 40°C, 4°C)
extracción acuosa
pH (8 - 8.5)

EXTRACTO CRUDO DE LA FRACCION TIPO 11S

pH
temperatura
tiempo

FRACCION TIPO 11S

liofilización

CARACTERIZACION FISICOQUIMICA

Electroforesis
Filtración en gel
Ultracentrifugación

CARACTERIZACION FUNCIONAL

Solubilidad
Absorción de agua
Absorción de aceite
Formación de espuma
Estabilidad de espuma

CARACTERIZACION DE TIPO NUTRICIONAL

Digestibilidad

Fig. 13. Ilustración de (A) granos y (B) plantas de amaranto
(*Amaranthus hypochondriacus* L.) tipo Mercado

Amaranthus hypochondriacus L. tipo mercado



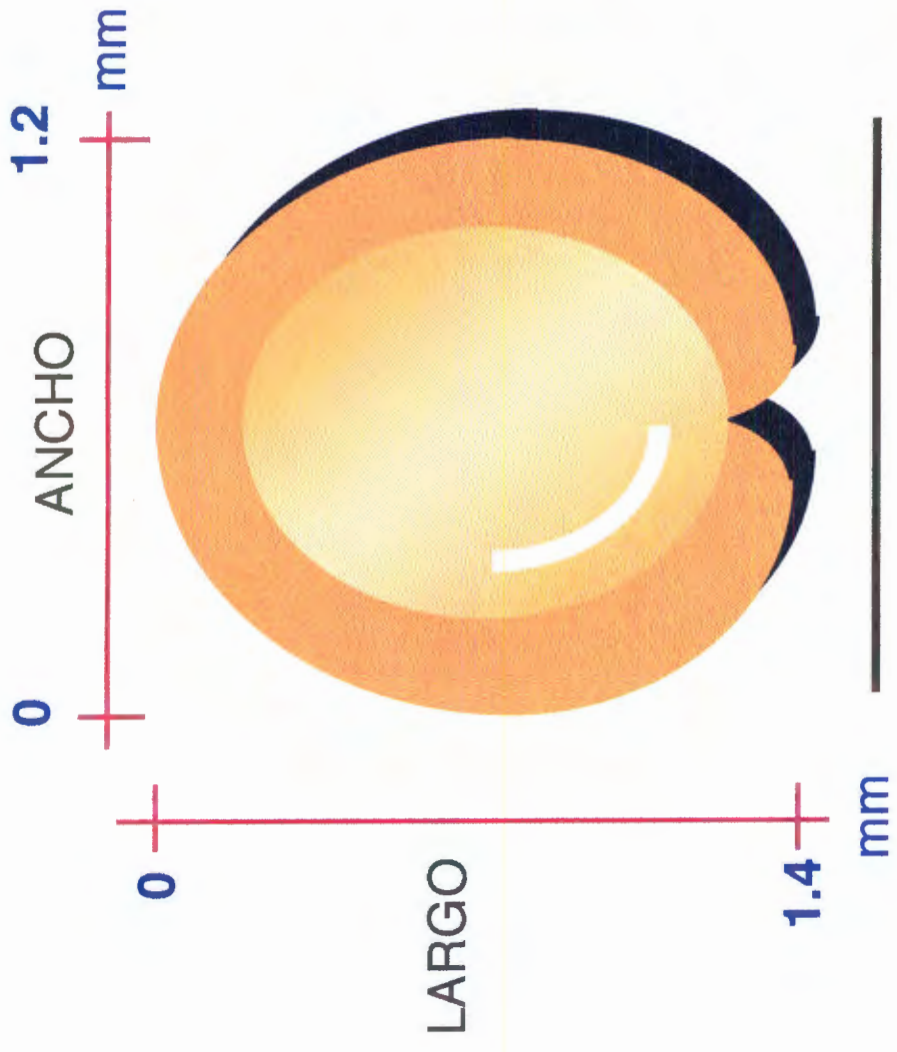
A



B



Fig. 14. Dimensiones del grano de amaranto



Grano de Amarantho

5.2. TRATAMIENTO DEL GRANO

Se procedió a su molienda en un molino analítico preenfriado (Tekmar A-10 S2, West, Germany). La harina obtenida (aproximadamente 180 μm) se desgrasó mediante la agitación con hexano en una proporción 1:10 p/v respectivamente durante 24 h, y posteriormente secada con aire a temperatura ambiente.

Tanto harina de amaranto como harina desgrasada de amaranto fueron almacenadas herméticamente a 4 °C hasta su empleo.

5.3. COMPOSICION QUIMICA DE LAS HARINAS

Para conocer la composición del material de este estudio se realizaron determinaciones de humedad, proteína, y cenizas. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado, siguiendo los métodos oficiales de la AACC (1983) y de la AOAC (1984).

5.3.1. Humedad (Método 14.004 AOAC)

Se pesó 1 g de muestra en una cápsula de aluminio previamente tarada y se calentó en una estufa con circulación de aire a una temperatura de 130 \pm 3°C por 1 h. La sensibilidad de este método fue suficiente para nuestros propósitos. La pérdida de peso se reportó como porcentaje de humedad.

5.3.2. Proteína (Método 14.026 AOAC)

El porcentaje de proteína cruda se calculó a partir del nitrógeno total utilizando un factor de 5.85 (Paredes-López y col. 1990). En la determinación del nitrógeno total se empleó en el método de Micro Kjeldahl (Paredes-López y col. 1989) y se

realizó en las unidades de digestión y destilación del sistema Kjeltec, modelos 1007 y 1028 (TECATOR, Suecia), respectivamente. La digestión se realizó con ácido sulfúrico y en la destilación se empleó hidróxido de sodio al 40%, recibiendo el destilado en una solución de ácido bórico al 4%. Finalmente en la titulación se utilizó una solución valorada de ácido clorhídrico.

5.3.3. Cenizas (Método 14.006 AOAC y 8.01 AACC)

Esta determinación correspondió a las cenizas obtenidas al calcinar una muestra a temperatura de aproximadamente 600°C.

5.4. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION DE PROTEINAS

Previo a la implantación de las siguientes metodologías de extracción y purificación de la fracción 11S se trabajaron con las técnicas de: Saio y Watanabe, (1973); Ishino y Kudo, (1979); Mora-Escobedo y col. (1984); Skoog y West, (1984); Konishi y col. (1985); Ordorica-Falomir, (1988); Marshall, (1990); Soriano-Santos y col. (1991); Barba de la Rosa y col. (1992a,b); empleando las diversas características como solubilidad de las fracciones frente a soluciones de extracción, temperaturas y condiciones en general de las cuales algunas de las técnicas han sido descritas anteriormente con su respectivo diagrama de flujo, adaptándose para analizar a las proteína de amaranto; además de técnicas de caracterización bajo distintas condiciones, de lo cual para nuestros propósitos fueron las siguientes:

5.4.1. Extracción de las Globulinas Totales

En la extracción de las globulinas totales de amaranto para su cuantificación, se empleó el método modificado de Osborne descrito por Mora-Escobedo y col. (1990) en donde 10 g de harina desgrasada se agitaron en 100 mL de 0.5 M de NaCl. La suspensión fue centrifugada y decantada, se almacenó el sobrenadante. Posteriormente la pastilla se puso en contacto con 50 mL de agua desionizada en agitación constante. Nuevamente la suspensión fue centrifugada y decantada. Ambos sobrenadantes se combinaron y se descartó el residuo. Los sobrenadantes se dializaron a 4 °C con agua desionizada durante 5 días con constante cambio de agua. El contenido de los tubos de diálisis fue centrifugado a 10000 x g durante 30 min. El sobrenadante (fracción albúminas) y el precipitado (fracción globulinas) fueron liofilizados. Se empleó el método Kjeldahl para determinar el contenido proteínico de la fracción (N x 5.85).

5.4.2. Extracción de la Fracción Rica en Proteína Tipo 11S

Se extrajo la fracción 11S de las globulinas de amaranto, basándose en el trabajo publicado por Saio y Watanabe, 1973. A un gramo de harina desgrasada se le agregaron 10 mL (1:10) de cloruro de calcio (CaCl_2) 10 mM agitando de 2 a 3 horas a temperatura ambiente. Después de la extracción, la solución fue centrifugada a 11000 x g durante 20 min a 4°C. Se resuspendió el precipitado en agua tibia (40°C) (precipitado:agua 1:10 p/p) ajustando su pH a 8.5. Se agitó durante 2 h a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 11000 x g durante 20 min a 4 °C. El residuo fue descartado y el sobrenadante se ajustó a pH 7.0 y

se almacenó esta fracción en refrigeración a 4°C toda la noche (Fig. 15). Se liofilizó y se cuantificó la proteína presente (Método 14.026 AOAC).

5.4.2.1. Purificación de la proteína tipo 11S

El extracto crudo de la fracción 11S se colocó a baño maría durante 5 h a 37 +/- 1°C. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó a 11000 x g durante 20 min a 4°C, se lavó el precipitado a temperatura ambiente durante 30 min y se centrifugó nuevamente bajo las condiciones señaladas. Nuevamente se lavó el precipitado con agua destilada, ahora mediante agitación constante a 4°C. Finalmente, se centrifugó a 1800 x g a temperatura ambiente durante 20 min, obteniendo en la pastilla la fracción Amaranthin (Fig. 16).

5.4.3. Carbohidratos Solubles

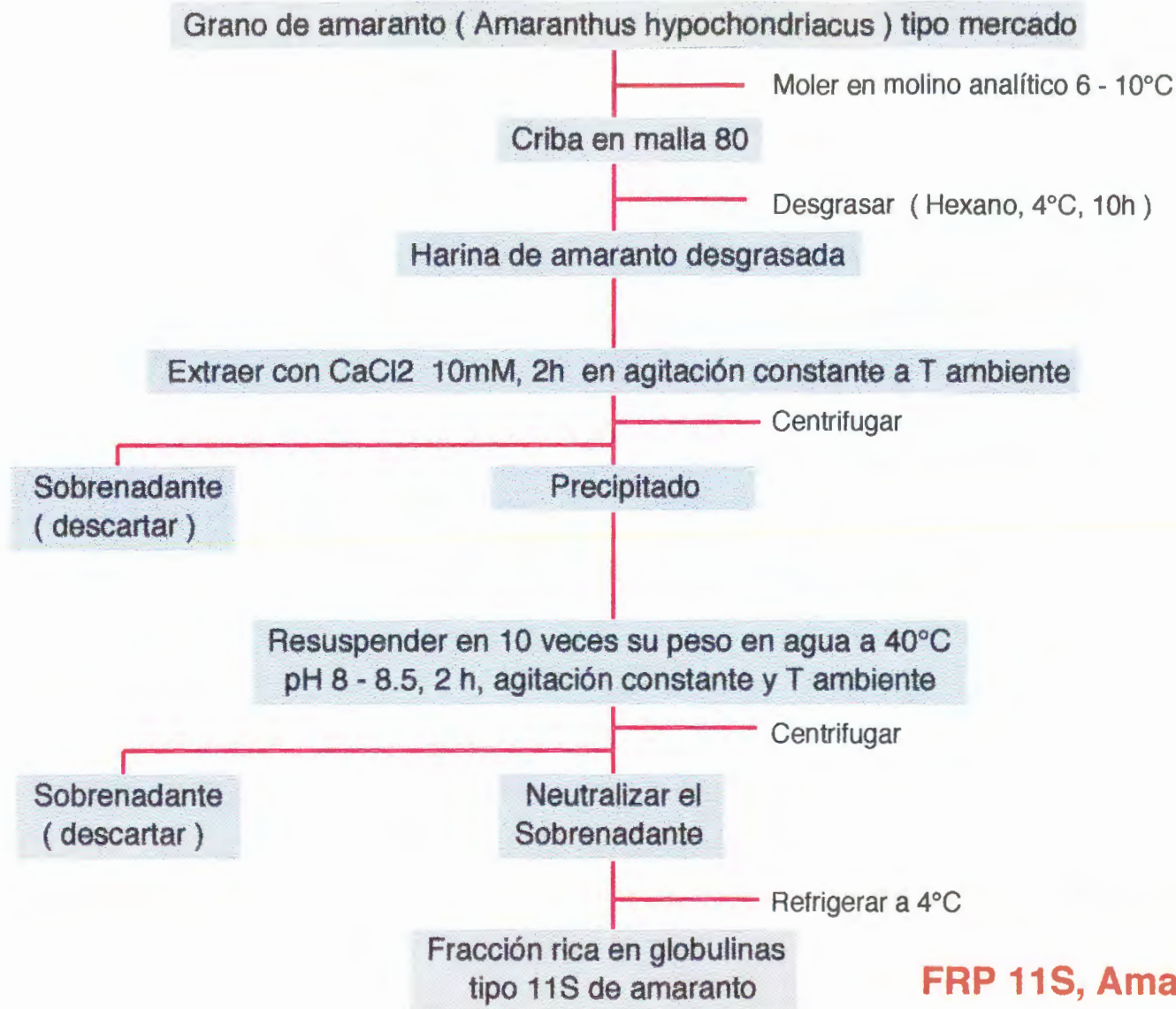
Para la determinación de carbohidratos solubles se empleó el método de Dubois y col. (1956). En este método los carbohidratos se hace reaccionar con fenol al 5% en presencia de ácido sulfúrico concentrado para dar compuestos coloridos que absorben a 490 nm.

La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro SP6-550 UV/VIS (Pye Unicam LTd, Cambridge, England). Como curva estándar se utilizó glucosa en una concentración de 0 a 75 µg/mL.

5.4.4. Cuantificación de Proteína

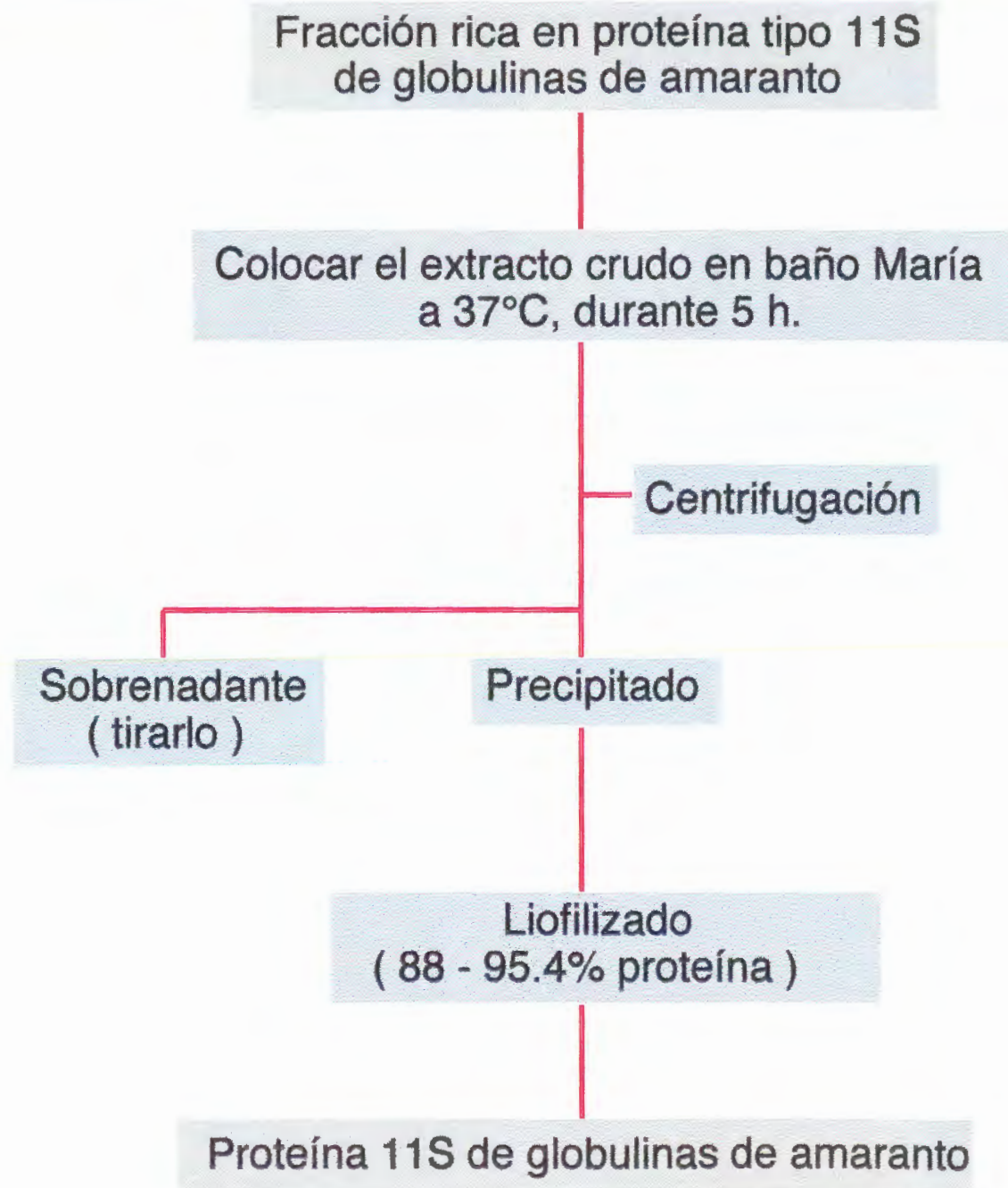
El contenido de proteína en las alícuotas de la cromatografía por filtración en gel de la fracción rica en proteína tipo 11S, se determinó por el método de Bradford (1976), usando una curva tipo de albúmina bovina sérica de 5 a 25 µg/mL y leyendo absorbancia a 595 nm.

Fig. 15. Diagrama de flujo del método de extracción de la fracción rica en globulinas tipo 11S de amaranto



FRP 11S, Amaranto

Fig. 16. Diagrama de flujo de la purificación de la fracción
11S de amaranto



5.4.5. Prueba Enzimática con Tiempo y Temperatura Constantes

Una vez extraída la fracción de extracto crudo de proteína rica en globulina tipo 11S, se eliminaron los carbohidratos presentes, por tratamiento enzimático, el cual consistió en colocar en 8 frascos perfectamente limpios la fracción rica en proteína resultado de haber trabajado su extracción con 1 g de harina de amaranto desgrasada, y agregándoles 2 μ L de solución enzimática al frasco: 1, blanco; 2, α -Amilasa; 3, Amiloglucosidasa; 4, Pululanasa; 5, α -Amilasa y Amiloglucosidasa; 6, α -Amilasa y Pululanasa; 7, Pululanasa y Amiloglucosidasa; y 8, α -Amilasa, Pululanasa, y Amiloglucosidasa.

Las soluciones (2 μ g / mL) (cantidad, tiempo y temperatura basados en trabajos previos en el laboratorio), todas a un tiempo cero y colocándose en baño María a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 16 h (Fig. 17).

Una vez que transcurrió este tiempo, se centrifugaron a $1800 \times g$ durante 20 min a T ambiente. Se realizó un lavado con agua desionizada del precipitado, agitando 30 min a 4°C y centrifugando nuevamente a las mismas condiciones. Se liofilizó el precipitado, se determinó % de proteína por Kjeldahl ($N \times 5.85$) y se analizó por electroforesis SDS-PAGE sin y con agente reductor.

Las preparaciones comerciales de α -Amilasa (Taka-therm II 1130), Amiloglucosidasa (Diazyme L200) y pululanasa (DB-1) fueron proporcionadas por ENMEX S.A. (México, D.F.). El productor reporta que estas enzimas son producidas por *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus sp.*, respectivamente. La presentación del producto incluye cloruro de calcio para facilitar la actividad enzimática. La α -Amilasa tuvo

Fig. 17. Diagrama de flujo del tratamiento de las globulinas tipo 11S de amaranto con varias enzimas a tiempo y temperatura constantes

Fracción rica en globulinas tipo 11S de amaranto (FRP 11S)

Tratar enzimáticamente



+

Blanco



+

α -Aamilasa



+

Amiloglu-cosidasa



+

Pululanasa



+

Combinación de dos enzimas



+

Combinación de tres enzimas

Incubar

Centrifugar

Liofilizar

Determinar % de proteína

una actividad total de 340,000 unidades modificadas Wohlgemuth (UMW/g), siendo una UD la actividad que libera 1 g de azúcares reductores como glucosa por h. La pululanasa presentó una actividad de 200 Unidades (U/mL), definiendo una U como la cantidad de enzima requerida para liberar, a partir de pululano 1 μ mol de azúcar reductor por min (Guzmán-Maldonado, 1992).

5.4.5.1. Combinación de tiempo y temperatura con amiloglucosidasa

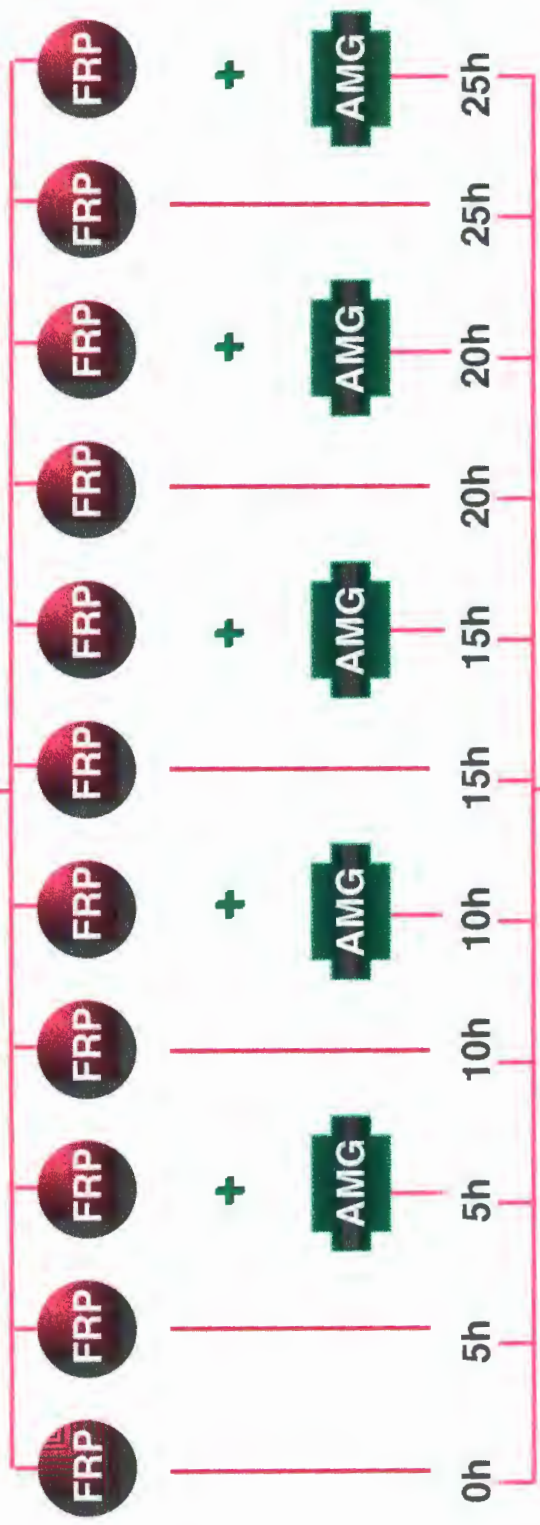
De acuerdo a los resultados obtenidos por el tratamiento enzimático descrito anteriormente, fue necesario trabajar con la muestra blanco y aquella que contenía Amiloglucosidasa a temperatura constante $37 \pm 1^\circ\text{C}$ a distintos tiempos: 0, 5, 10, 15, 20 y 25 h como se muestra en la Fig. 18 con lo que se determinó el efecto del tiempo sobre el tratamiento enzimático a una temperatura constante y manejando un blanco y la enzima.

Nuevamente, una vez que transcurrido el tiempo del tratamiento enzimático para cada muestra, éstas se centrifugaron a 2,000 rpm durante 20 min. Se realizó un lavado con agua desionizada del precipitado, agitando 30 min a 4°C y centrifugando nuevamente a las mismas condiciones. Se liofilizó el precipitado y se determinó % de proteína por Kjeldahl ($N \times 5.85$) y se analizó por electroforesis SDS-PAGE sin y con agente reductor.

Fig. 18. Diagrama de flujo del tratamiento enzimático de las globulinas tipo 11S de amaranto con amiloglucosidasa a diferentes tiempos

Fracción rica en globulinas tipo 11S de amaranto (FRP 11S)

Tratar enzimáticamente



Incubar a 36°C

Centrifugar (1800 xg, 20 min)

Liofilizar

Determinar % de proteína

5.5. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA

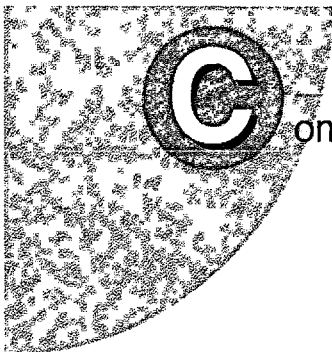
5.5.1. Electroforesis Desnaturalizante y Nativa

Los geles se prepararon utilizando una cámara electroforética vertical (Mini Slabs Hoeffer Scientific Instruments SE200, San Francisco CA), con una fuente de poder Buchler 3-1500 (Buchler Inst. Inc., Fort Lee, NJ). La electroforesis en dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) se llevó a cabo de acuerdo al método de Laemmli (1970) en geles separadores de poliacrilamida al 15%. El gel concentrador se preparó con una solución de poliacrilamida al 2.5%. Las muestras liofilizadas de la proteína tipo 11S de amaranto se disolvieron en una solución (3 mg/ mL), Tris-HCL 0.1M, pH 6.8, 2% (p/v) SDS, 10% (v/v) glicerol y 0.01 mg/mL azul de bromofenol. La reducción de los enlaces disulfuro se obtuvo con el agente reductor β -Mercaptoetanol (β -ME) (5% v/v) a 100°C durante 1 min. La electroforesis se llevó a cabo a una corriente constante de 20 mA por gel (0.75 mm de grosor) durante 2 a 3 h. La composición completa de este gel se presenta en la Tabla 12.

La masa molecular aparente de las proteínas 11S desnaturalizadas se estimó usando los siguientes estándares de peso molecular conocido: anhidrasa carbónica (29 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa) y fosforilasa b (97.4 kDa).

La electroforesis nativa (PAGE) se llevó a cabo de acuerdo al método de Laemmli (1979) en geles separadores de poliacrilamida al 7%. El gel concentrador se preparó con una solución de poliacrilamida al 2.5%. Se formó una solución de las muestras de proteína tipo 11S de amaranto liofilizadas (3 mg/ mL) en Tris-HCl 0.1M, pH 6.8, 10% glicerol y 0.01 mg/mL de azul de

**Tabla 12. Composición de los geles separador y concentrador
usados en electroforesis desnaturalizante**



Composición de los geles separador y concentrador usados
en electroforesis desnaturizante

Componente	Gel separador (15% acrilamida)	Gel concentrador (2.5% acrilamida)
Solución tampon Tris - HCl, pH 8.8, 2M (mL)	1.9	---
Solución tampon Tris - HCl, pH 6.8, 1M (mL)	---	1.25
Solución de acrilamida 37.5% (p / v), bisacrilamida 1.0% (p / v) (mL)	7.5	1.25
Agua (mL)	5.45	7.34
Dodecil sulfato de sodio 10% (p / v) (mL)	0.15	0.10
TEMED (μ L)	10	7
Persulfato de amonio 10% (p / v) (μ L)	20	60

bromofenol. La electroforesis se llevó a cabo en las mismas condiciones que los geles desnaturalizantes. La composición completa de estos geles se presenta en la Tabla 13.

La masa molecular de la proteína tipo 11S se estimó usando los siguientes marcadores de peso molecular: albúmina bovina monómero (66 kDa) y dímero (132 kDa), ureasa: trímero (272 kDa) y hexámero (545 kDa).

5.5.1.1. Tinción de Coomassie

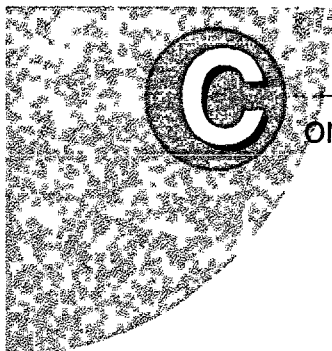
Después de la electroforesis el gel se fijó con ácido tricloroacético (12.5% p/v) por 30 min y se tiñó durante toda la noche con azul brillante o azul de Coomassie a una concentración final de 0.25%. La decoloración se llevó a cabo, 30 min con agua/ácido acético/ metanol (4.5/4.5/1, v/v/v) y luego con ácido acético al 5% (v/v) hasta su completa decoloración (Davis, 1988; Delobette y col. 1991).

La movilidad relativa de los estándares fue graficada contra su correspondiente logaritmo base 10 de su peso molecular (Log PM) mediante un paquete de computación (Cricket Graph., Macintosh, HD). Con ello se obtuvo la ecuación de la curva y el coeficiente de correlación de la misma y así se calculó la masa molecular aparente de las proteínas 11S de amaranto.

5.5.1.2. Tinción PAS

Las proteínas preparadas electroforeticamente se tifieron también para la identificación de glicoproteínas (Figueroa y Khan, 1993). Después de la electroforesis el gel se fijó en una solución metanol/ ácido acético/ agua (40/7/53 %) toda la noche. El gel se

Tabla 13. Composición de los geles separador y concentrador
usados en electroforesis no desnaturizante



Composición de los geles separador y concentrador usados en electroforesis no desnaturalizante

Componente	Gel separador (7% acrilamida)	Gel concentrador (2.5% acrilamida)
Solución tampon Tris - HCl, pH 8.8, 2M (mL)	1.9	---
Solución tampon Tris - HCl, pH 6.8, 1M (mL)	---	1.25
Solución de acrilamida 37.5% (p / v), bisacrilamida 1.0% (p / v) (mL)	3.5	1.25
Agua (mL)	9.45	7.34
TEMED (μ L)	10	7
Persulfato de amonio 10% (p / v) (μ L)	20	60

colocó en ácido tricloroacético al 12.5% por 30 min, seguido de un lavado con agua destilada. Se sumergió en ácido periódico al 1% en 3% de ácido acético durante 50 a 60 min, seguido de un lavado con agua destilada. En obscuridad se lavó tres veces con metabisulfito de sodio al 0.5%. Las glicoproteínas se tifen de color salmón (Gordon, 1975; Davis, 1988).

5.5.2. Cromatografía de Filtración en Gel

Se aplicó una alícuota de 100 mg de proteína en 3.5 mL del extracto de la fracción tipo 11S a una columna 2.5 x 90.0 cm empacada con Sephacryl S-200 ó S-300 (un análisis con cada matriz de filtración) (Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Sweeden) y se eluyeron con 0.1M NaCl., Tris-HCl pH 8.0, 0.02% azida de sodio con un flujo de 42 mL/h. Se colectaron fracciones de 5.0 mL. El perfil de elución se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm. El volumen de exclusión se determinó con azul dextrán (2×10^6 Da) y el volumen total de la columna con metil-tirosina (287 Da). Los marcadores moleculares y sus pesos moleculares correspondientes fueron: S₁, anhidrasa carbónica (29 kDa); S₂, albúmina (66 kDa); S₃, alcohol dehidrogenasa (150 kDa); S₄, β -Amilasa (200 kDa); S₅, apoferritina (443 kDa); S₆, tiroglobulina (669 kDa) y S₇, azul dextrán (2000 kDa).

La ecuación de la curva para la estimación de la masa molecular aparente de la muestra se obtuvo empleando el paquete de computación Cricket Graph (Macintosh, HD) como se mencionó anteriormente.

5.5.3. Ultracentrifugación

La determinación del coeficiente de sedimentación se realizó mediante la técnica adaptada de Martin y Ames (1961), con un gradiente de 5 a 20% de sacarosa en el amortiguador de 0.1 M NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8.0. El volumen del gradiente fue de 12.2 mL y 500 μ L de volumen de muestra aplicada (20 mg de proteína tipo 119 por mL de solución). Las condiciones de ultracentrifugación fueron de 218000 x g, 4^oC durante 35 h en el equipo Beckman L8-M, con el rotor SW-40 (Beckman), empleando tubos de centrifuga de polialómero (Beckman). Una vez transcurrido el tiempo determinado (21 h), las fracciones se extrajeron por la parte superior con un fraccionador de gradientes (Buchler Auto Densi-Flow II) conectado a una bomba peristáltica (Rainin-Rabbit) y un colector de fracciones (LKB Mod. 2212 Helirack). Se colectaron fracciones de aproximadamente 500 μ L leyéndose absorbancia a 280 nm (A₂₈₀) en un espectrofotómetro Beckman DU-6.

Los estándares de coeficiente de sedimentación conocido fueron: lisozima (1.9S), albúmina sérica bovina (4.4.S), γ -globulina (7.0S) y catalasa (11.2S) (Gueguen y Barbot, 1988).

La ecuación de la curva para la estimación del coeficiente de sedimentación de las proteínas se obtuvo empleando el paquete de computación mencionado anteriormente.

5.6. CARACTERIZACION FUNCIONAL

Se conocen muy pocos reportes acerca de las propiedades funcionales de la harina de amaranto y de sus proteínas, y estas propiedades deberán ser completamente estudiadas para determinar el potencial en la elaboración o incorporación a productos alimenticios (Bressani y col., 1987b).

5.6.1. Solubilidad Proteínica

La solubilidad de las fracciones se determinó suspendiendo muestras conteniendo 0.1 g de proteína en 10 mL de agua destilada adicionando HCl 0.1N o NaOH 0.1N, para ajustar el valor específico de pH (2 a 12). Estas suspensiones se agitaron magnéticamente durante 30 min a 25°C. Se centrifugaron a 10,000 x g durante 10 min. La solubilidad se expresó como el porcentaje de proteína cruda a partir del nitrógeno total utilizando un factor de conversión 5.85 (método Kjeldhal) presente en el sobrenadante (Fig. 19) (Paredes-López y Ordorica-Falomir, 1986).

5.6.2. Capacidad de Absorción de Agua y de Aceite

5.6.2.1. Capacidad de absorción de agua

La capacidad de absorción de agua fue determinada por el método de la AACC 88.04 (1983):

En un tubo cónico graduado para centrifuga se colocaron muestras conteniendo 0.5 g de proteína más 5 mL de agua desionizada agitándose en un vortex durante 1 min y se dejó reposar por 30 min. Después se centrifugaron a 600 x g por 25 min y finalmente se midió el volumen inicial de agua libre que resultó al centrifugarse la muestra. La capacidad de absorción de agua se reportó como la cantidad de agua retenida dividida entre los gramos de material (mL H₂O/g muestra) (Fig. 20a).

$$CAA = \frac{V_o \text{ agua} - V_f \text{ agua}}{\text{g proteína}} = \frac{\text{agua absorbida}}{\text{g proteína}}$$

Fig. 19. Diagrama de flujo para el método de determinación de solubilidad proteínica

0.1 g de proteína en 10 ml de agua destilada

Agitar 10 seg en el vortex

Agregar HCl 0.1N o NaOH 0.1N
para ajustar a diferentes pH (2, 4, 6, 8, 10)

Agitar durante 30 min a 25°C

Centrifugar a 11000 x g por 10 min

Medir proteína en el sobrenadante
(Kjeldahl $\cdot N \times 5.85$)

**Solubilidad
Proteínica**

Fig. 20. Diagrama de flujo para la determinación de la capacidad de absorción de agua (a) y de aceite (b)

a) Capacidad de absorción de agua

Colocar 0.5 g de proteína + 5 ml de agua destilada en un tubo cónico para centrifuga graduado

Agitar en vortex 1 min

Dejar reposar 30 min

Centrifugar a 600 x g, 25 min

Medir el volumen de agua libre

b) Capacidad de absorción de aceite

Colocar 0.5 g de proteína + 5 ml de aceite de olivo en un tubo graduado cónico para centrifuga

Agitar en vortex 1 min

Dejar reposar 30 min

Centrifugar a 600 x g, 25 min

Medir el volumen de aceite libre

5.6.2.2. Capacidad de absorción de aceite

La capacidad de absorción de aceite fue determinada por el método modificado de Paredes-López y Ordorica-Falomir, (1986):

En un tubo cónico graduado para centrífuga se colocaron muestras conteniendo 0.5 g de proteína más 5 mL de aceite de olivo y se agitaron durante 1 min en un vortex. Se dejaron reposar durante 30 min, posteriormente se centrifugaron a 600 x g por 25 min midiendo finalmente el volumen de aceite que quedó libre. La capacidad de absorción de aceite se reportó como la cantidad de aceite retenido dividido entre los gramos de material (mL/ g muestra) (Fig. 20b).

$$CAAc = \frac{V_o \text{ aceite} - V_f \text{ aceite}}{\text{g proteína}} = \frac{\text{aceite absorbido}}{\text{g proteína}}$$

5.6.3. Capacidad de Formación y Estabilidad de Espuma

La capacidad de formación y estabilidad de espuma se determinaron según métodos reportados por Paredes-López y Ordorica-Falomir (1986b). En una probeta de 100 mL se prepararon 50 mL de una suspensión al 1% de proteína y se ajustó el pH utilizando HCl 0.1N o NaOH 0.1N en el rango de 2 a 12. La suspensión se agitó durante 1 min a aproximadamente 12,000 rpm utilizando el Ultra Turrax e inmediatamente después de la agitación se midió el volumen de espuma formado, expresándose como la capacidad de formación de espuma en porcentaje (%CFE) (Fig. 21a).

$$\% \text{ CFE} = \frac{\text{Vol total después de agitado} - \text{vol antes de agitado} \times 100}{\text{Vol antes de agitado}}$$

Fig. 21. Diagrama de flujo para la determinación de capacidad de formación y estabilidad de espuma

a) Capacidad de formación de espuma

Colocar 0.5 g de proteína + 50 ml de agua destilada en vaso de precipitado de 100 ml ajustando el pH con HCl o NaOH (2, 4, 6, 8, 10,)

Agitar 1 min a 12000 rpm con ultra - turrax

Medir inmediatamente el volumen de espuma formado

b) Estabilidad de espuma

Después de medir el volumen de espuma formado

Dejar reposar 30 min

Medir el volumen de espuma residual

El material se dejó reposar durante 30 min y nuevamente se midió el volumen de la espuma residual. La estabilidad de espuma se expresó como porcentaje de estabilidad de espuma (% EE) (Fig. 21b).

$$\% \text{ EE} = \frac{\text{Vol espuma después del reposo}}{\text{Vol total de espuma}} \times 100$$

5.7. DIGESTIBILIDAD *IN VITRO*

Las digestibilidades de la proteína *in vitro* se determinaron de acuerdo al procedimiento recomendado por Hsu y col. (1977). La mezcla multienzimática se preparó fresca para cada corrida, pesando las cantidades recomendadas de tripsina (pancreática) porcina tipo IX, quimotripsina (pancreática) bovina tipo II, peptidasa (intestinal) porcina grado II y caseína como control. Todas las enzimas fueron comerciales (Sigma Chemical Co., St. Lois, MI). A esta solución multienzimática se le ajustó el pH a 8.0 y se mantuvo a 4°C antes de ser usada. Por otro lado se prepararon 50 mL de una solución de 6.25 mg de proteína/mL de muestra y se ajustó el pH a 8.0. La suspensión se mantuvo a 37°C utilizando un recipiente de vidrio con chaqueta, el cual se empleó como digestor y un baño de recirculación Forma Scientific Modelo 2095 (Forma Scientific, Marietta, OH). Cuando la temperatura de la suspensión se equilibró se agregaron 5 mL de la solución multienzimática. A los 10 min de acción enzimática se midió el pH de la mezcla. La caída del pH fue registrada con un potenciómetro Conductronic modelo pH15. Con ello se determinó la digestibilidad *in vitro* usando la ecuación de regresión siguiente:

$$Y = 210.46 - 18.103 X$$

Y = digestibilidad *in vitro*, expresada en porciento.

X= valor observado de pH a los 10 min de acción enzimática.

La caseína (Sigma Chemical Co.) se utilizó como proteína de referencia y todas las determinaciones se hicieron por duplicado (Hsu y col. 1977).

6. RESULTADOS Y DISCUSION

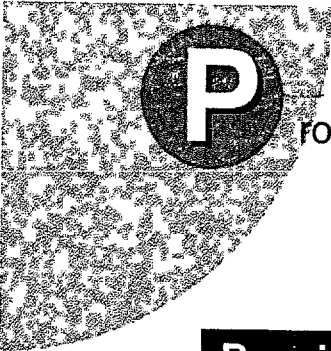
6.1. EVALUACIONES FISICAS DEL GRANO

Las dimensiones del grano de amaranto fueron de 1.0 mm de ancho por 1.4 mm de largo, mientras que el peso de 1000 granos de amaranto fue de 0.8 g /1000 granos (Tabla 14). Ambas propiedades físicas presentan valores mucho menores que las de otros granos, no obstante y a pesar de su tamaño, el peso hectolítrico del amaranto (79.1 kg/hL) presenta valores comparables al peso del frijol común (76.4-84.7 kg/hL) y trigo (76-78 kg/hL) (Barba de la Rosa, 1986; Reyes-Moreno, 1992). En algunos granos como el trigo, el peso hectolítrico se utiliza como un parámetro de calidad en la producción de harina. Esta propiedad está influenciada por la uniformidad y estructura biológica del grano y por su composición química incluyendo la humedad. Mientras que, contrario a lo que se pensaba, el tamaño del grano tiene poca o ninguna influencia en el peso hectolítrico (Shallenberg, 1978).

6.2. COMPOSICION QUIMICA

En la Tabla 15 se presentan los resultados de la composición química de la harina integral y harina desgrasada de amaranto. El contenido de proteína (N x 5.85) del grano de amaranto (harina integral) fue de 15.9%, el cual se encuentra en el intervalo reportado en la literatura 13.9-17.3% (Teutónico y Knorr, 1985; Paredes-López y col., 1990), y que además se encuentra superior al intervalo de proteína cruda que presentan los cereales que oscila del 7 al 14% (Duarte-Correa y col., 1986a; García y col., 1987; Gómez y Pacheco de D., 1991; Ologunde y col., 1992). En la misma tabla (Tabla 15) se observa que el contenido de

Tabla 14. Propiedades físicas del grano de amaranto tipo Mercado



Propiedades físicas del grano de amaranto tipo mercado

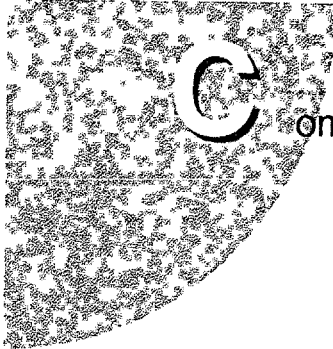
Propiedad

Tamaño (mm) a	ancho	1.0 + / - 0.1
	largo	1.4 + / - 0.1
Peso b		
(g / 1000 granos)		0.8 + / - 0.1
Peso hectolítrico b		
(kg / hL)		79.1 + / - 0.2

a Promedio de 25 repeticiones + / - desviación estándar

b Promedio de 3 repeticiones + / - desviación estándar

Tabla 15. Composición química de la harina integral y
harina desgrasada de amaranto



Composición química de la harina integral y harina desgrasada de amaranto a

Material	Humedad	Proteína b	Cenizas b
Harina integral	8.0 +/- 0.1 c	2.6 +/- 0.1 d	15.9 +/- 0.8 e
Harina desgrasada	7.9 +/- 0.1 c	2.7 +/- 0.2 d	14.7 +/- 0.4 e

a Promedio de tres repeticiones +/- desviación estándar

b Valores expresados en % base seca

Los valores en fila y en columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$), según la prueba de Tukey

proteína de la harina desgrasada presentó un 14.7% de proteína cruda lo cual puede deberse a la pérdida de lipoproteínas en la extracción de aceite con hexano que se llevó a cabo, sin embargo, tanto el porcentaje de proteína de harina integral como la harina desgrasada no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey. Los valores de humedad oscilaron entre 7.9 y 8.0% encontrándose en el intervalo reportado en la literatura de 6.2 a 17.3% (Bressani y col., 1987; Singhal y Kulkarni, 1988), mientras que el contenido de cenizas 2.6 a 2.7% también se encuentra entre los valores reportados de 2.5 a 4.1% (Becker y col., 1981; Pedersen y col., 1987ab; Teutónico y Knorr, 1985; Paredes-López y col., 1990b).

6.3. EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA FRACCION 11S

Se probaron metodologías para las proteínas 11S de otros materiales (Saio y Watanabe, 1973; Ishino y Kudo, 1979; Mora-Escobedo y col., 1990; Barba de la Rosa y col., 1992ab, Soriano-Santos y col., 1992) con el objeto de extraer la proteína tipo 11S de amaranto, fracción que ya ha sido reportada por otros autores (Konishi y col., 1985; Barba de la Rosa y col., 1992b; Segura-Nieto y col., 1992).

Las metodologías anteriormente citadas, pese a utilizar soluciones de cloruro de sodio, cloruro de calcio, bicarbonato de amonio, tratamientos de temperatura y precipitaciones isoeléctricas, no fueron las adecuadas para la globulina 11S de amaranto. Las razones fueron: bien porque las proteínas extraídas no presentaban el patrón electroforético característico de las globulinas 11S o bien porque los procedimientos fueron

complicados, no preparativos, de mucho tiempo para su preparación y extracción, lo cual dificulta su aplicación. Por lo tanto fue necesario encontrar una metodología de extracción adecuada para 11S de amaranto, menos complicada, rápida que manejara grandes volúmenes y a la vez con buenos resultados en la extracción de la globulina tipo 11S para su correspondiente caracterización.

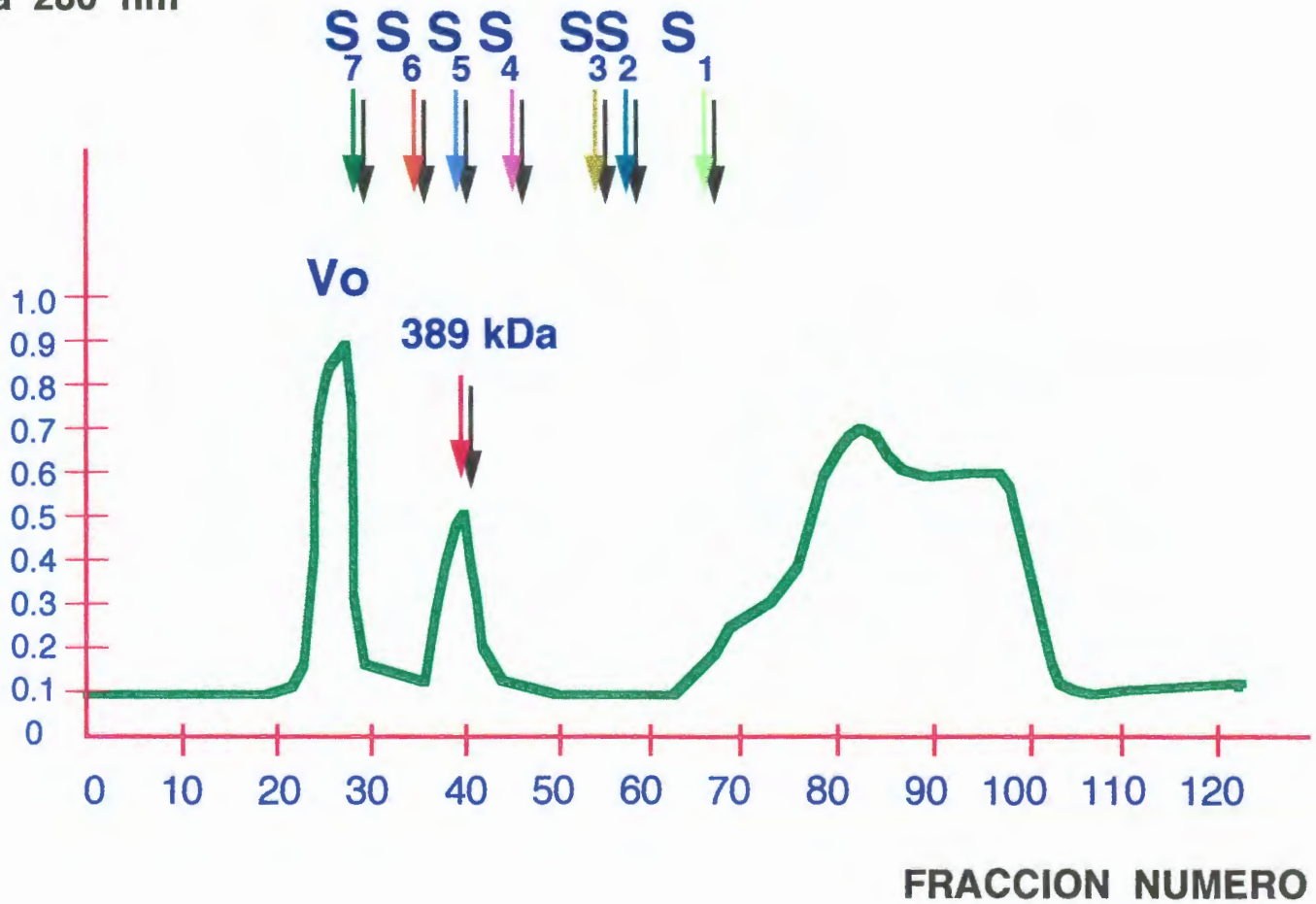
La metodología propuesta por Saio y Watanabe (1973) aplicada a la extracción de las proteínas 11S de amaranto logró los mejores resultados. Todas las fracciones se analizaron por medio de electroforesis desnaturalizante para el reconocimiento del patrón electroforético característico de las proteínas tipo 11S, con lo cual se observó que así como la glicinina de soya mostró un fenómeno de selectividad al precipitar del sobrenadante ante la presencia de cloruro de calcio (Saio y Watanabe, 1973), de efectuarse su extracción a temperatura ambiente (Wolf, 1980) y de solubilizarse nuevamente a 40°C (Saio y Watanabe, 1973; Wolf, 1980), así bajo las mismas características se obtuvo la proteína tipo 11S de amaranto.

Se liofilizó el extracto crudo y se cuantificó la proteína presente ($N \times 5.85$) obteniendo sólo un 40-42% de proteína en la pastilla liofilizada (base seca).

Esta fracción denominada como fracción rica en proteína tipo 11S (FRP 11S) fue analizada mediante la cromatografía de filtración en columna (Fig. 22) observándose en su perfil de elución, un volumen muerto, un pico con masa molecular aproximado de 389 kDa y un tercer perfil de menor masa molecular. Para confirmar la presencia de proteína en las fracciones recolectadas de esta cromatografía, la posible presencia de carbohidratos

Fig. 22. Cromatograma de filtración en gel (Sephacryl S-300) de la fracción rica en globulinas tipo 11S de amaranto. Los marcadores moleculares y su peso molecular correspondiente son: S₁, anhidrasa carbónica (29 kDa); S₂, albúmina (66 kDa); S₃, alcohol dehidrogenasa (150 kDa); S₄, β -Amilasa (200 kDa); S₅, apoferritina (443 kDa); S₆, tiroglobulina (669 kDa) y S₇, azul dextrán (2000 kDa).

ABSORBANCIA
a 280 nm



(Marcone y Yada, 1981), todas las fracciones se analizaron por los métodos colorimétricos de Bradford (1976) y de Dubois y col. (1956) respectivamente.

En la Fig. 23 se observa en las líneas continuas: 1) en la Parte A que la proteína detectada por el método de Bradford (1976), se concentra principalmente en el pico que muestra un masa molecular de 389 kDa, masa molecular que se encuentra en el rango de la proteínas tipo 11S de otros materiales 320-440 (Konishi y col., 1985; Brinegar y Goundan, 1993; Danilenko y col., 1993), además de que una vez liofilizadas las muestras recolectadas de este pico, se realizó su electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS sin y con agente reductor.

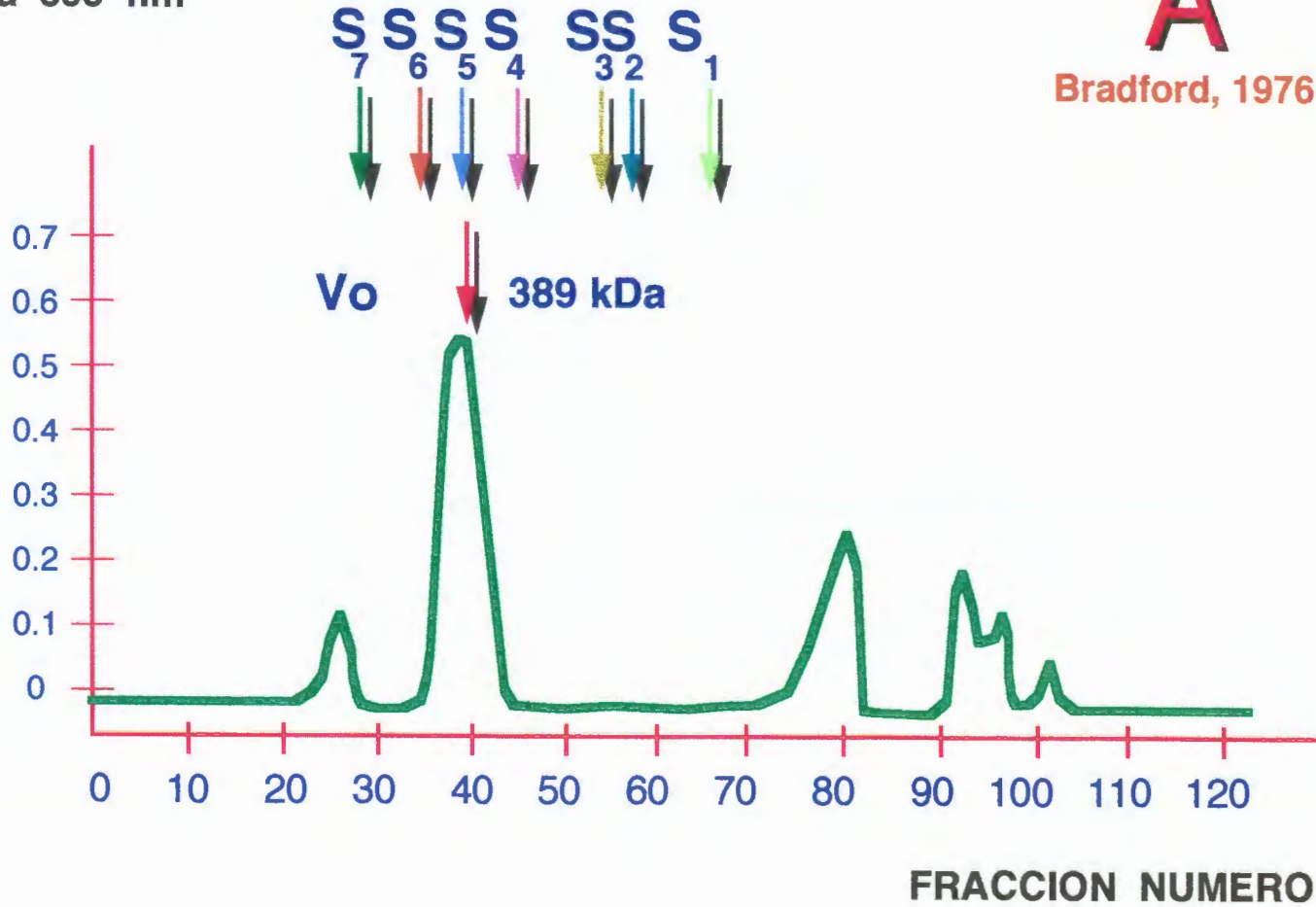
El hecho de que su patrón electroforético fuese modificado en condiciones reductoras, sugiere que realmente se trató de la fracción rica en proteína tipo 11S y al llevar a cabo la tinción PAS para glicoproteínas, esta fue negativa (no se muestran estos resultados)., por otro lado la Parte B muestra por medio del método colorimétrico de Dubois y col. (1956) que existe una mínima concentración de carbohidratos en el volumen muerto, también se identificó su presencia en el pico que contiene principalmente a la proteína y se observó una mayor concentración de los mismos bajo los picos de menor masa molecular.

Burova y col. (1992) han observado que las leguminas de broad beans forman un complejo con polisacáridos a pH 4.2-6.0 y baja fuerza iónica cuando los polisacáridos contenían un grupo carboxilo y un grupo sulfato. También señalan un fenómeno de incompatibilidad entre leguminas y polisacáridos neutros y polisacáridos con un grupo carboxilo a pH 7.6. Por la información

Fig. 23. Patrón de filtración en gel de la fracción rica en globulinas tipo 11S de amaranto analizado para proteínas y carbohidratos por métodos colorimétricos. A) Perfil proteínico (Bradford, 1976), B) Perfil de carbohidratos (Dubois, 1956).

ABSORBANCIA
a 595 nm

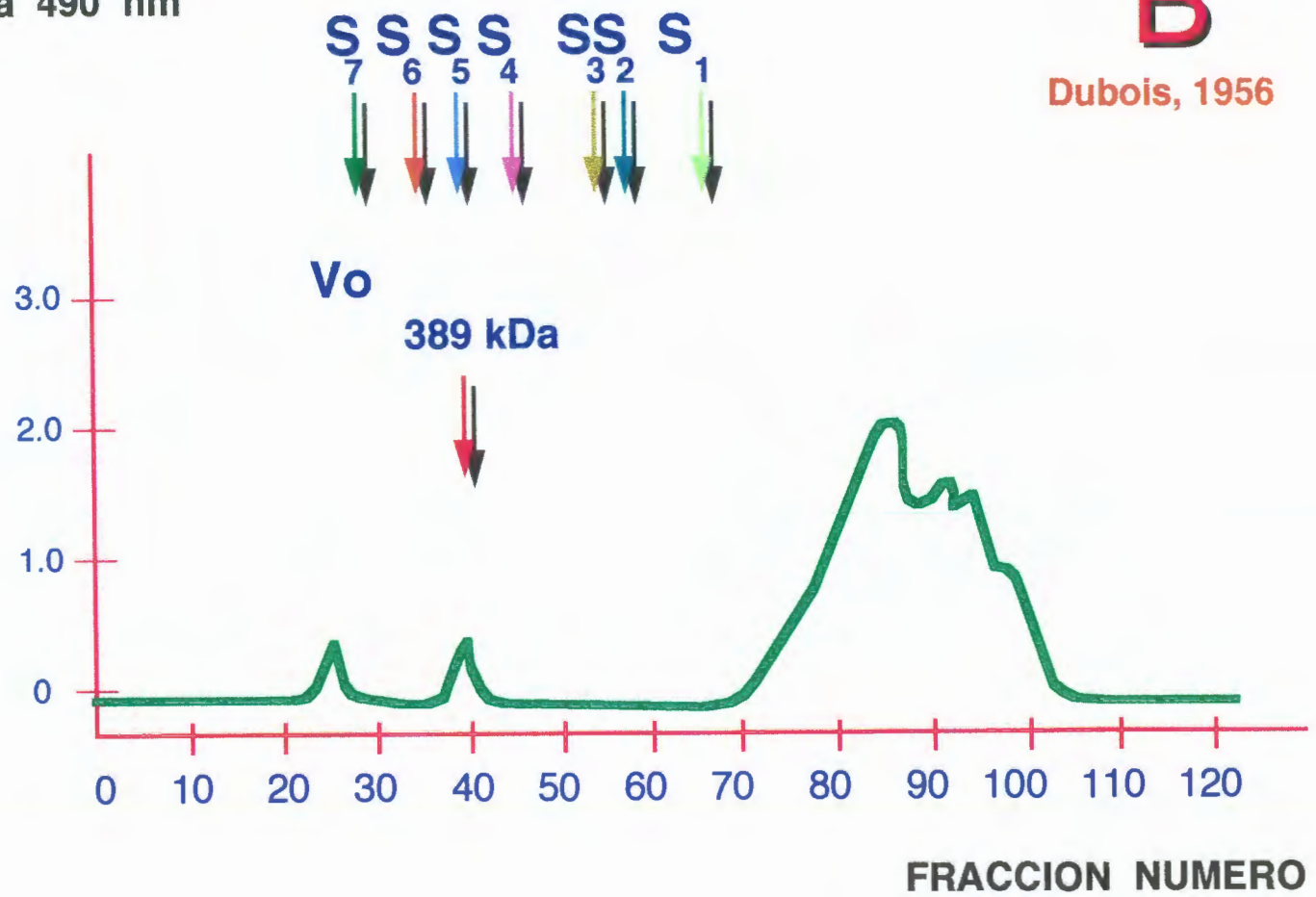
A
Bradford, 1976



ABSORBANCIA
a 490 nm

B

Dubois, 1956



de la Fracción Rica en Proteína FRP 11S de amaranto en cuanto al porcentaje de proteína bajo (40-42%) que presenta la FRP 11S y los patrones de filtración en columna se pudo pensar en un posible complejo de esta con los carbohidratos presentes. Figueroa y Khan (1993) sugieren a su vez, la existencia de este tipo de asociaciones proteína-carbohidrato en ciertas globulinas de trigo sin aún confirmarse la naturaleza del enlace (enlace disulfuro, puente de hidrógeno y/o interacciones hidrofóbicas) que los unen.

Se realizaron diversos tratamientos de temperatura, sedimentación y solubilidad para encontrar cómo separar este complejo. Considerando los carbohidratos de bajo peso molecular, por ende solubles en agua, se lavó 6 veces con agitación constante durante 10 min cada una y posteriormente se centrifugó a $11000 \times g$ y $4^{\circ}C$ (condiciones de crioprecipitación de las fracciones tipo 11S) (Peng y col., 1984) obteniendo un precipitado que después de liofilizar contuvo sólo un 60% de proteína cruda ($N \times 5.85$).

Debido a lo anterior fue considerado un tratamiento enzimático que lograra hidrolizar los carbohidratos de mayor tamaño y así lograr su solubilización, o bien eliminar de esta manera un posible enlace con la proteína en cuestión.

6.3.1. Prueba Enzimática

En la Tabla 16 se muestra el porcentaje de proteína presente en el extracto crudo una vez que se puso en contacto con α -amilasa, amiloglucosidasa, pululanasa y combinaciones entre ellas, incubando a $37 \pm 1^{\circ}C$ y durante 16 h en constante agitación. Se pudo observar que en la mayoría de estos tratamientos, un incremento considerable en el porcentaje de proteína cruda presente

Tabla 16. Efecto de tratamientos enzimáticos sobre la fracción
rica en proteína tipo 11S de amaranto



efecto de tratamientos enzimáticos sobre la fracción rica en
proteína tipo 11S de amaranto

Tratamiento	Proteína (%) a / b /
Blanco sin enzima	81.4 + / - 1.5 c
α - Amilasa	79.0 + / - 0.6 a
Amiloglucosidasa	84.0 + / - 0.7 b
Pululanasa	82.8 + / - 0.0 c
α - Amilasa + Amiloglucosidasa	83.5 + / - 0.1 b
α - Amilasa + Pululanasa	84.1 + / - 0.6 b
Pululanasa + Amiloglucosidasa	84.7 + / - 0.2 b
α - Amilasa + Amiloglucosidasa + Pululanasa	51.3 + / - 9.2 a

a / Promedio de dos repeticiones + / - desviación estándar

b / Valores expresados en % base seca

Las medidas en columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) según la prueba de Tukey

desde un 40-42% hasta un 79-85% (N x 5.85), FRP 11S + α -Am logró solamente un 79% de proteína, el Blanco sin enzima y FRP + Pul no son estadísticamente diferentes, presentando un 81.4-82.8% de proteína y FRP 11S + AMG, FRP + α -Am + AMG, FRP 11S + α -Am + Pul y FRP 11S + Pul + AMG hasta un 84-84.7% de proteína en el liofilizado, a excepción de la FRP 11S tratada con las tres enzimas: α -Am, AMG y Pul, lo cual pudo ser resultado de un efecto de competencia entre enzimas impidiendo una buena hidrólisis de los carbohidratos. Debido a que estas enzimas son hidrosolubles fueron eliminadas en el sobrenadante (Martin y Ames, 1961).

De cualquier forma todas las muestras precipitadas además de haberse liofilizado para cuantificar la proteína presente, se les realizó la electroforesis desnaturalizante para verificar la presencia de algún contaminante, cuestión que fue negativa en los patrones electroforéticos presentados. Todos estos patrones fueron característicos de la fracción sin y con la presencia de un agente reductor.

Cabe hacer notar, que fue sorprendente que la fracción FRP 11S al tener un tratamiento de temperatura y tiempo, lograra una concentración de 42 a 82% de proteína, por lo tanto se hizo necesario un nuevo tratamiento manejando estos dos parámetros. Como el objetivo de la gran mayoría de las extracciones es lograr un método simple, y pese a que la fracción con este tratamiento tuvo un resultado bajo comparado estadísticamente con tratamientos enzimáticos, se intentó nuevamente solo esta fracción y la FRP 11S + AMG por manejar una sola enzima con un buen porcentaje de proteína tipo 11S extraído.

6.3.2. Combinación de Tiempo y Temperatura

La Tabla 17 presenta el efecto de tiempo de tratamiento enzimático sobre la FRP 11S en las globulinas de amaranto, pudiéndose observar que tanto el Blanco (FRP 11S) como la FRP 11S a la cual se le aplicó el tratamiento enzimático (AMG) ambos a 37°C durante 5 h, lograron una máxima concentración de proteína cruda desde un 40-42% hasta un 95-95.8% sin alterar su patrón electroforético en gel de poliacrilamida desnaturalizante sin y con agente reductor.

Por medio del análisis estadístico de los resultados de los distintos tratamientos se observó que en general ($P < 0.05$) el haber incubado la fracción FRP 11S y a la fracción con tratamiento enzimático, cada par con respecto a un tiempo determinado no tuvo diferencias significativas, sin embargo si las hubo entre FRP 11S y FRP 11S + AMG a distintos tiempos. Como se había mencionado anteriormente, la fracción FRP 11S a tiempo 0 h tiene un 40-42% de proteína, a un tiempo 5 h se logró la máxima concentración proteínica (94.8-95.8%) estadísticamente diferentes a los demás tratamientos, y a un tiempo 10 h también se logró hasta un 88.3-88.5% pero siendo inferior estadísticamente al tratamiento tiempo 5 h. Los tratamientos tiempo 15h , 20h y 25h fueron estadísticamente inferiores de tiempo 5 h y 10 h, pero se obtuvo hasta un 83-87% de proteína tipo 11S en el liofilizado.

Cabe hacer mención que se ha reportado que a 40°C la mayoría de las proteínas 11S en soya se solubilizan.

Sin embargo se pudo observar que en las proteínas 11S de amaranto no fue suficiente el haber trabajado esta fracción a 40°C y pH 8-8.5, sino que una vez que fue obtenido el sobrenadante

**Tabla 17. Efecto del tiempo de tratamiento enzimático sobre
la fracción rica en proteína 11S de amaranto**



Efecto del tiempo de tratamiento enzimático sobre la fracción rica en proteína tipo 11S de amaranto

Tiempo (h)	Material	Proteína (%) a / b /
0	FRP 11S	40.5 + / - 0.7 a
5	FRP 11S	94.8 + / - 0.6 c
5	FRP 11S + AMG	95.8 + / - 0.1 c
10	FRP 11S	88.5 + / - 0.8 b
10	FRP 11S + AMG	88.3 + / - 0.6 b
15	FRP 11S	85.8 + / - 3.8 c
15	FRP 11S + AMG	83.1 + / - 0.8 c
20	FRP 11S	83.3 + / - 0.9 c
20	FRP 11S + AMG	87.3 + / - 1.9 c
25	FRP 11S	84.8 + / - 0.4 c
25	FRP 11S + AMG	86.1 + / - 1.4 c

FRP 11S = Fracción Rica en Proteína 11S

AMG = Amiloglucosidasa

a / Promedio de dos repeticiones

b / Valores expresados en % base seca

Las medidas en columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey

con la FRP 11S solubilizada, y después de haberse neutralizado esta solución, fue necesario nuevamente incubar el extracto en baño María a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 h a pH 7.0, obteniendo de esta manera la eliminación de la gran mayoría de los carbohidratos presentes en la muestra y una mayor concentración proteínica de la fracción 11S de las globulinas de amaranto.

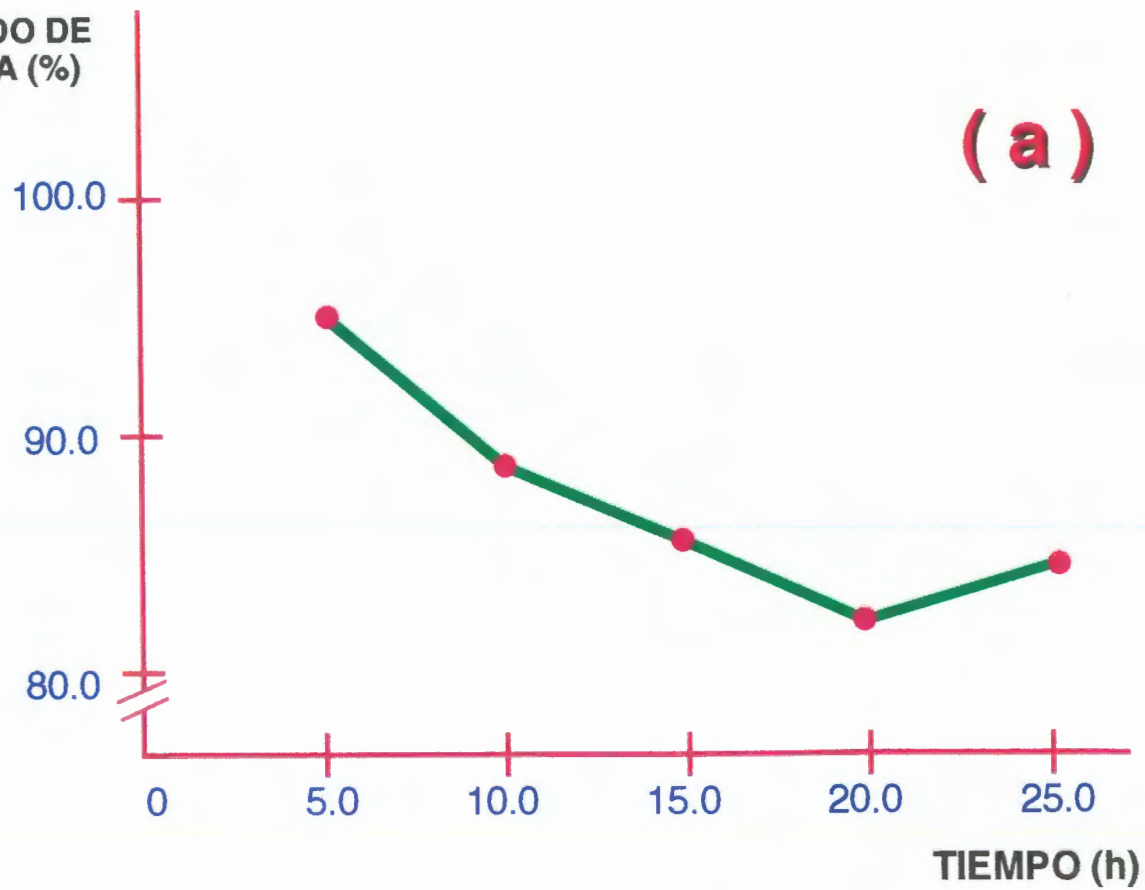
En la Fig.24a se puede observar con mayor claridad en la primera parte cómo el tiempo influyó en el contenido de proteína resultante en el extracto, esto es, se observa un máximo de concentración proteínica en la muestra a las cinco horas que prolongando el tiempo del tratamiento térmico. En la segunda parte b se obtuvo un mayor peso del precipitado conforme transcurrió el tiempo, sin embargo su pureza disminuyó (al comparar con la parte a, del contenido de proteína presente en la muestra), lo cual posiblemente se debió a que al transcurrir el tiempo, moléculas distintas a las proteínas precipitaron.

Por lo tanto, con los resultados anteriormnete expuestos se pudo observar que la máxima concentración proteínica de la fracción FRP 11S se logró colocando esta fracción en un baño María a 37°C durante 5 h, centrifugando posteriormente a $1800 \times g$ durante 20 min. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue resuspendido en agua 1:10 g /mL en agitación constante durante 30 min a 4°C para evitar la solubilización de la proteína tipo 11S de amaranto y con el objeto de eliminar contaminantes en este extracto. Nuevamente se centrifugó esta muestra, eliminando el sobrenadante y liofilizando el precipitado.

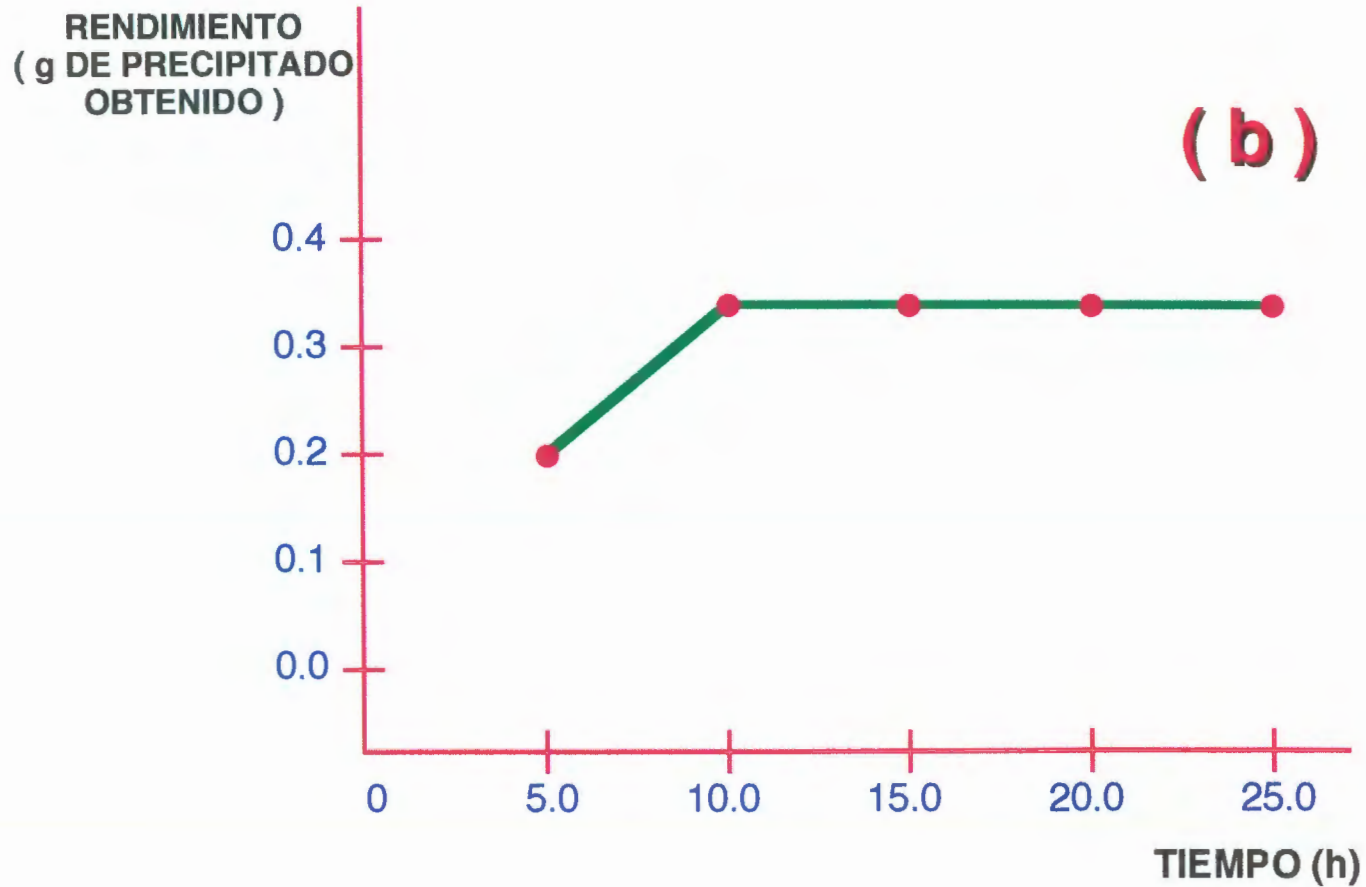
Haciendo un balance de materia a través de la relación de peso y proteína inicial con peso y proteínas finales (Tabla 18), se observa que mediante este método de extracción, las

Fig. 24. Efecto del tiempo de tratamiento enzimático con amiloglucosidasa sobre el contenido de proteína y el rendimiento de la fracción rica en proteína tipo 11S de amaranto. (a) = Efecto del tiempo en la fracción rica en globulina tipo 11S (b) = Efecto del tiempo en los gramos de precipitado obtenidos

CONTENIDO DE
PROTEINA (%)



Efecto del tiempo del tratamiento enzimático en la FRP 11S



Efecto del tiempo en los gramos de precipitado obtenidos

**Tabla 18. Balance de materia para los extractos proteínicos de
la harina de amaranto desgrasada**

B**Balance de materia para los extractos proteínicos de la harina de amaranto desgrasada**

Material / fracción	% Base seca a		
	Peso (g)	Contenido proteínico	% del total de las proteínas
Harina de amaranto desgrasada	100	14.7 + / - 0.40	100
Globulinas totales	3.1 + / - 0.03	97.0 + / - 0.05	20.5 + / - 0.06
Globulinas tipo 11S	2.9 + / - 0.03	94.4 + / - 1.2	18.6 + / - 0.20

a Promedio de tres repeticiones + / - desviación estándar

proteínas 11S de amaranto representan el 18.6% de la proteína total, siendo a su vez un 90-91% de las globulinas totales determinadas por el método de Osborne modificado (Mora-Escobedo y col., 1990) (Tabla 18).

6.4. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA

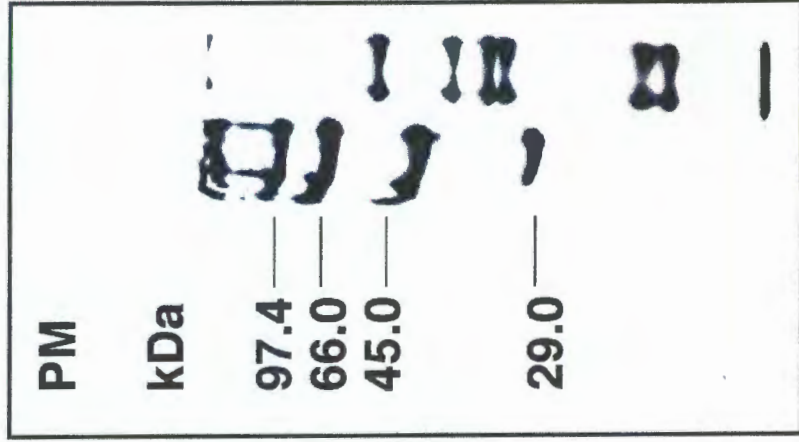
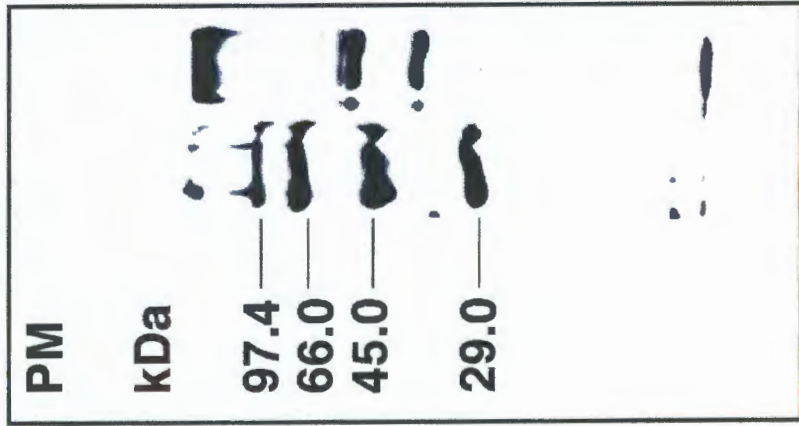
6.4.1. Electroforesis

Mediante la electroforesis en gel desnaturalizante que se presenta en la Figura 25, se pudo observar que: el par (A) que presentó una columna s que contienen los estándares de pesos moleculares y una columna a con las globulinas tipo 11S de amaranto que sin reducción dio cuatro bandas principales a 34, 55 (doblete) y 62 kDa y en forma adicional esta columna que presentó las proteínas sin haber sido reducidas mostró algunos polipéptidos en la parte superior del gel con una consecuente masa molecular superior a los 97.4 kDa., el par (B) por otra parte presentó la columna s con los estándares de pesos moleculares y en la columna b a las globulinas 11S de amaranto previamente tratadas con β -ME como agente reductor de los enlaces disulfuro. Con reducción, las globulinas 11S dieron dos dobletes proteínicos a 16-19 y 33-36 kDa y dos bandas proteínicas a 41 y 55 kDa.

El hecho de que el patrón electroforético de las bandas principales de las globulinas 11S no fuera positiva en la tinción PAS para glicoproteínas y fuera modificado bajo condiciones reductoras, sugiere que esta proteína contiene puentes disulfuro sujetos a una reducción y que corresponde por lo tanto al grupo de proteínas denominadas proteínas tipo 11S (Peng y col., 1984;

Fig. 25. Patrón de electroforesis desnaturalizante de las globulinas tipo 11S de amaranto

Patrón electroforético de las globulinas 11S
de amaranto sin y con β - ME



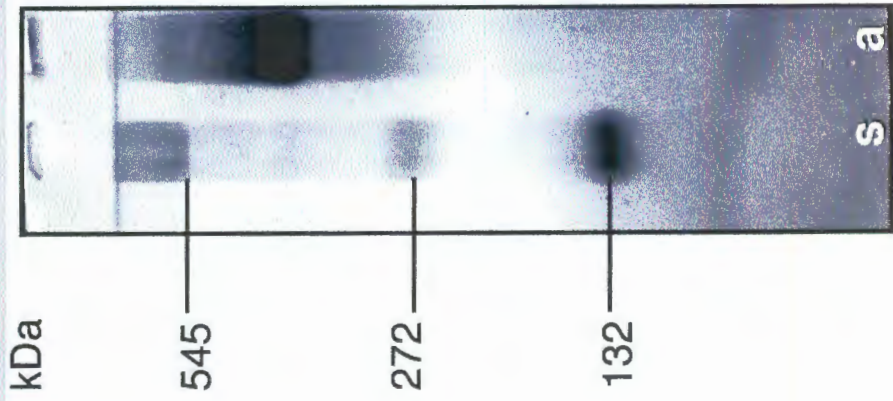
Utsumi y Kinsella, 1985; Gueguen y col., 1988; Chrastil y Zarins, 1992).

También como se observa en esta figura (Fig. 25) los patrones electroforéticos y las masas moleculares aparentes de los polipéptidos que constituyen las globulinas tipo 11S sin y con reducción fueron similares aún en la aparición de dobletes proteínicos a los reportados como subunidades básicas 15-20 kDa y a los reportados como subunidades ácidas 32-33 kDa de proteínas tipo 11S extraídas de *Amaranthus hypochondriacus* descrito por Konishi y col. (1985), Mora-Escobedo y col. (1990), Barba de la Rosa y col. (1992a), y Segura-Nieto y col. (1992). También este tipo de comportamiento ha sido reportado para otros materiales como: legumina de Adzuki bean (Kajiwara e Hirano, 1992), medicagina de alfalfa *Medicago arabica* (Koleva y col., 1992), globulina 11S de coco (Rasyid y col., 1992), legumina de avena (Peterson, 1978; Robert y col., 1983), legumina de chícharo (Gueguen y col., 1988; Chambers y col., 1992), Chenopodina de quinua (Brinegar y Goundan, 1993), glicinina de soya (Peng y col., 1984; Nielsen y col., 1988; Fukushima, 1991ab; Sathe y col., 1992).

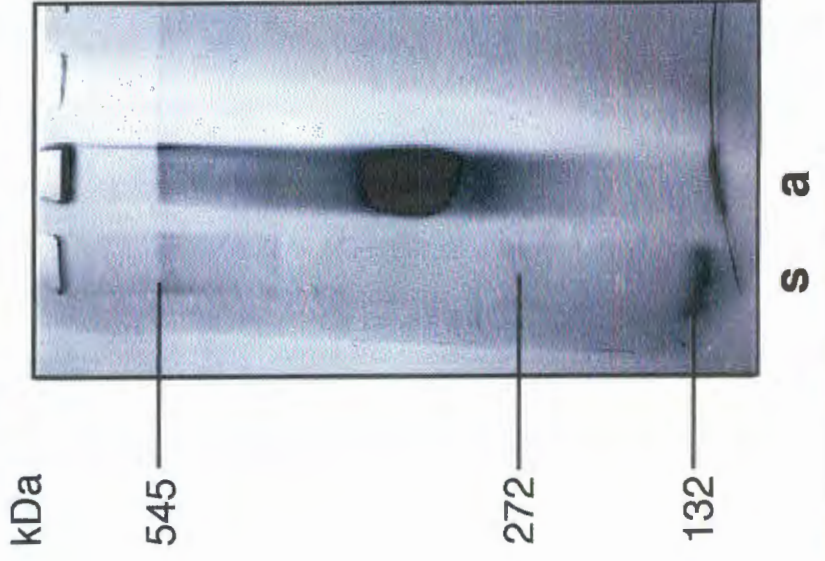
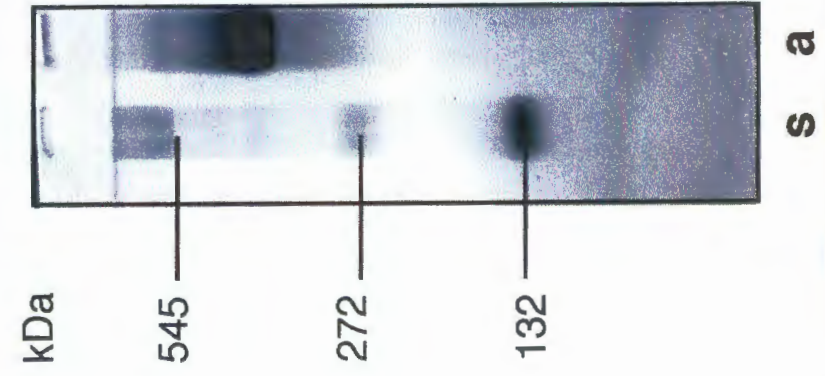
Por otra parte, a pesar de que el cálculo del masa molecular por medio de la electroforesis nativa se considera ficticio debido a que este tipo de geles no permiten una separación fina de los componentes presentes en la muestra, en la Fig. 26 se observa que: la primera columna s presenta los estándares en donde se indicaron sus respectivos pesos moleculares, y en la segunda columna a se tiene una banda de masa molecular aproximada a 390 kDa, que al haber sido teñido con azul

Fig. 26. Patrón de electroforesis no desnaturizante de las globulinas tipo 11S de amaranto

Patrón electroforético de las globulinas 11S
de amaranto en gel no desnaturalizante



Electroforesis no desnaturante de la globulina 11S de amaranto



de Coomassie como colorante para la identificación de proteínas, mostró que en este punto se encuentra una máxima concentración de proteínas. También se llevó a cabo la tinción PAS para glicoproteínas sobre el mismo gel y el resultado de la misma fue negativo.

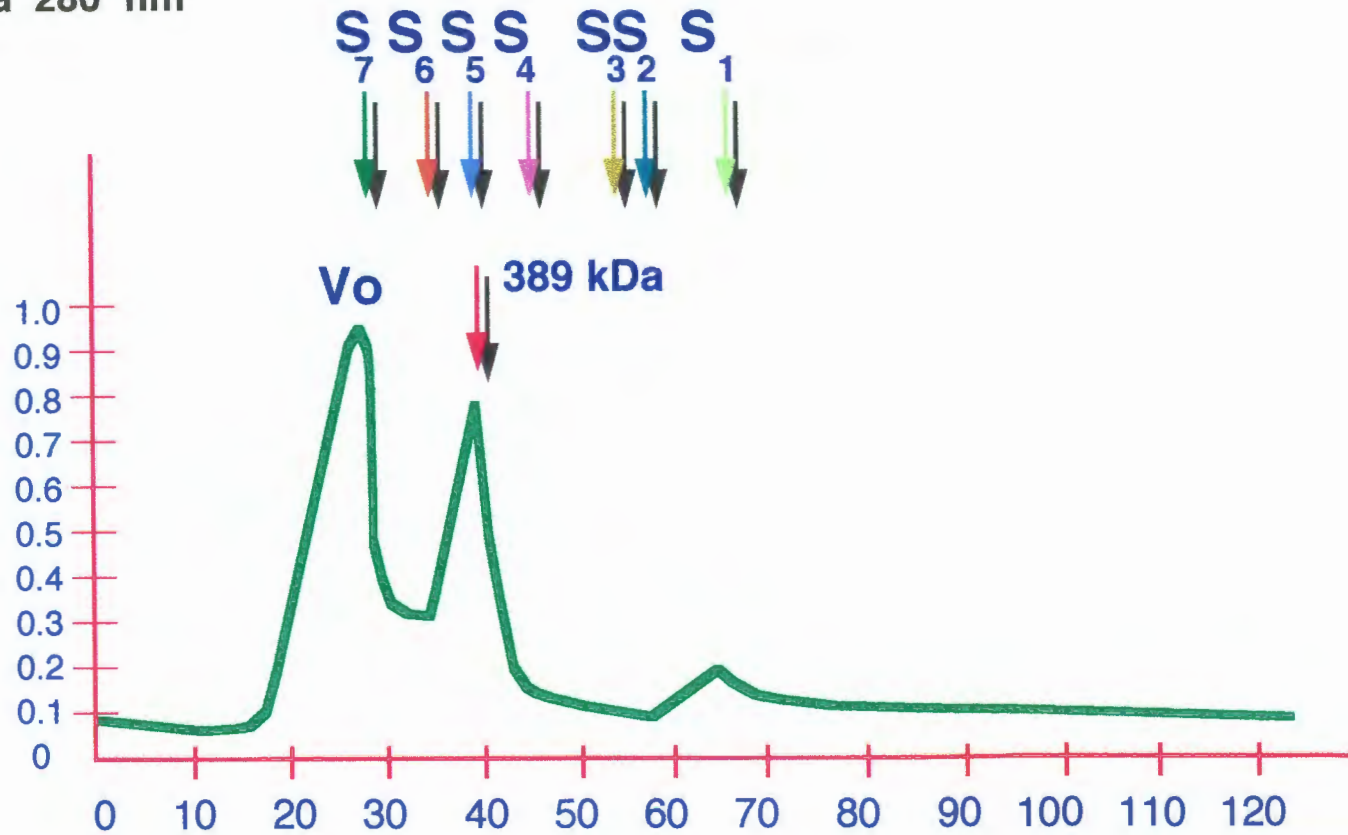
6.4.2. Cromatografía de Filtración en Gel

Una vez obtenida la fracción 11S con un 95 % de proteína presente en la muestra, se analizó nuevamente por medio de filtración en gel en una matriz de filtración de Sephacryl S-300. En la Fig. 27 se observa un cromatograma resultado de la filtración en gel a 15°C el cual presenta 2 picos principales: uno que corresponde al volumen muerto de elución, y un segundo de masa molecular de 389 kDa, el cual concuerda con los resultados obtenidos en la electroforesis no desnaturizante de esta fracción, similar al valor reportado por Marcone y Yada (1991) para globulinas oligoméricas de amaranto y encontrándose dentro de los masas moleculares determinados para otras globulinas tipo 11S (Konishi y col., 1985; Brinegar y Goundan, 1993; Danilenko y col., 1993).

Sin embargo, controlando la temperatura de la columna de filtración en 7 °C (resultados no presentados) y en 15 °C, no se obtuvo una separación nítida entre el pico del volumen muerto y el de la fracción que contenía la proteína tipo 11S de amaranto. Al respecto existen reportes (Wolf, 1980; Peng y col., 1984; Rasyid y col., 1992) en donde se ha encontrado que los perfiles de elución para la glicinina de soya son menos claros cuando la

Fig. 27. Cromatograma de filtración en gel (Sephacryl S-300) de la fracción rica en globulinas tipo 11S de amaranto obtenido por elución a 15°C. Los marcadores moleculares y su peso molecular correspondiente son: S₁, anhidrasa carbónica (29 kDa); S₂, albúmina (66 kDa); S₃, alcohol dehidrogenasa (150 kDa); S₄, β -Amilasa (200 kDa); S₅, apoferritina (443 kDa); S₆, tiroglobulina (669 kDa) y S₇, azul dextrán (2000 kDa).

ABSORBANCIA
a 280 nm



FRACCION NUMERO

Cromatograma de filtración en gel por elución a 15 °C

cromatografía de filtración en gel se corre a 4 °C debido a la crioprecipitación proteínica con tendencia a la aglomeración, aumentando su masa molecular y permitiendo por lo tanto que su elución sea muy cercana al volumen muerto.

En vista de lo anterior, en la Figura 28 se observa que a 20 °C fue observado un mejor perfil de elución para la globulina tipo 11S en la cromatografía de filtración en gel, en la cual nuevamente se presentan dos picos: un pico que corresponde al volumen muerto de elución, con una menor absorbancia a 280 nm que la presentada a 15 °C, y un segundo pico bien definido perteneciente a la globulina tipo 11S de amaranto, donde su masa molecular ha permanecido constante a 389 kDa.

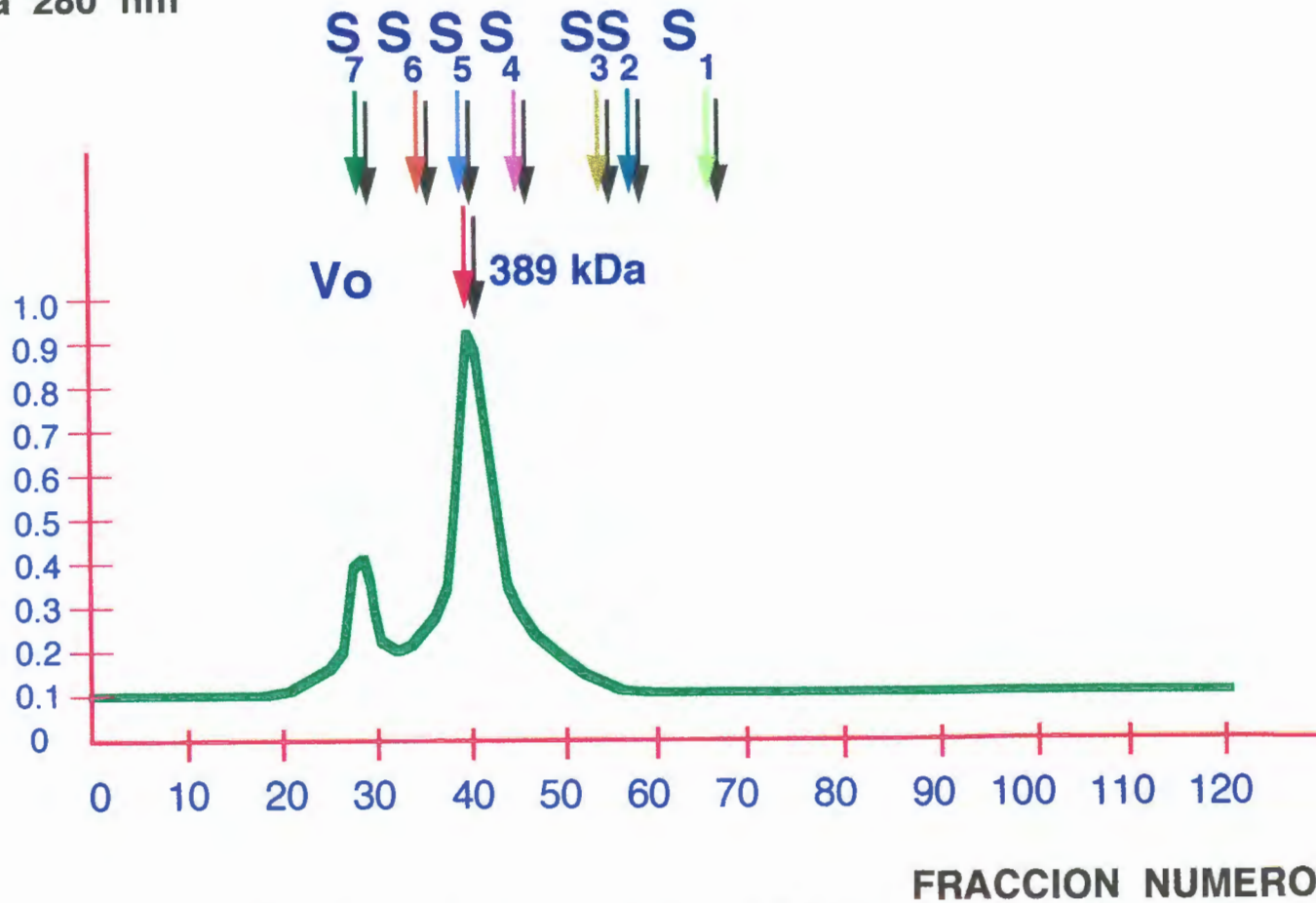
6.4.3. Ultracentrifugación

La ultracentrifugación de la fracción tipo 11S liofilizada de las globulinas de amaranto mostró constantes de sedimentación de 1.4S, 8.5S y 11.0S (Fig. 29). Las proteínas de bajo peso molecular con un coeficiente de sedimentación de 1.4S pudieron corresponder a una contaminación por albúminas. Se ha observado que la gran mayoría de las albúminas consisten de constantes de sedimentación entre 1.2 y 2.0S para albúminas tipo 2.0S (Schroeder, 1984; Konishi y col., 1985; Segura-Nieto y col., 1988; Gorinstein y col., 1991b; Barba de la Rosa y col., 1992b; Segura-Nieto y col., 1992; Rasyid y col., 1992; Dey y Mandal, 1993; Kolivas y Gayler, 1993).

Reportes previos han mostrado que las proteínas precipitadas por iones calcio son principalmente las globulinas 11S (Saio y Watanabe, 1973); de cualquier forma, bajo esas

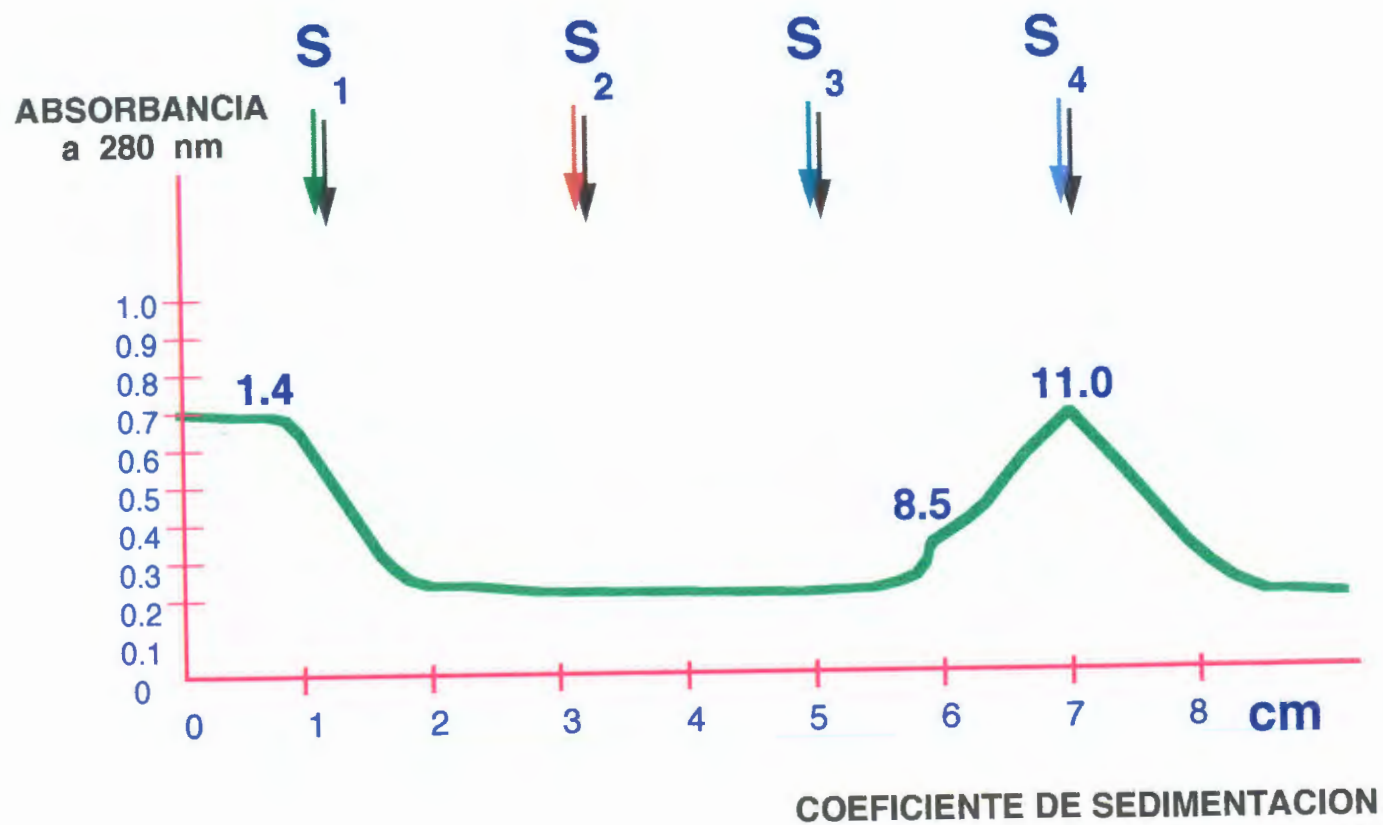
Fig. 28. Cromatograma de filtración en gel (Sephacryl S-300) de la fracción rica en globulinas tipo 11S de amaranto obtenido por elución a 20°C. Los marcadores moleculares y su peso molecular correspondiente son: S₁, anhidrasa carbónica (29 kDa); S₂, albúmina (66 kDa); S₃, alcohol dehidrogenasa (150 kDa); S₄, β -Amilasa (200 kDa); S₅, apoferritina (443 kDa); S₆, tiroglobulina (669 kDa) y S₇, azul dextrán (2000 kDa).

ABSORBANCIA
a 280 nm



Cromatograma de filtración en gel por elución a 20 °C

Fig. 29. Patrón de ultracentrifugación de las globulinas tipo 11S de amaranto obtenido en gradientes de sacarosa del 5 al 20%. Los estándares y sus coeficientes de sedimentación son: S₁, lisozima (1.9S), S₂, seroalbúmina bovina (4.4S), S₃, γ -globulina (7.0S) y S₄, catalasa (11.2S).



Patrón de ultracentrifugación de las globulinas 11S

condiciones, cerca de un tercio de las proteínas 2S y un medio de las proteínas 7S también son precipitadas. En este caso se pudo observar que la fracción principal la compone la proteína tipo 11S, con un pico representando las proteínas de bajo peso molecular a 1.4S y un pequeño pico a 8.5S.

Cabe hacer notar que las proteínas liofilizadas presentaron el patrón electroforético típico de las proteínas 11S y que la presencia de la fracción 8.5S bien pudiera ser una contaminación por las proteínas tipo 7S como han sido reportadas anteriormente (Barba de la Rosa y col., 1992ab; Segura-Nieto y col., 1992) lo cual sería poco probable debido a que en el perfil electroforético tanto en gel no desnaturalizante como en gel desnaturalizante, la tinción PAS propia de las glicoproteínas (proteínas tipo 7S) (Pernollet y Mossé, 1983; Utsumi y Kinsella, 1985; Fukushima, 1991b; Ko y col., 1993; Powell y col., 1993; Voigt y col., 1993) fue negativa., o bien pudiese tratarse del producto de una reacción de disociación de la fracción 11S sugerido anteriormente (Wolf, 1980; Barba de la Rosa y col., 1992b; Utsumi y col., 1993) sin embargo, es necesario realizar más estudios al respecto.

En general estos resultados fueron diferentes a los reportados por Konishi y col. (1985), Barba de la Rosa y col. (1992b) y de Segura-Nieto y col. (1992) con respecto a los coeficientes de sedimentación, pero concuerdan con los de Konishi y col. (1985) y Marcone y Yada (1991) con respecto a que las globulinas tipo 11S se encuentran como fracción mayoritaria. Además de que esta fracción mayoritaria en presencia de un agente reductor cambia drásticamente su patrón electroforético.

6.5. CARACTERIZACION FUNCIONAL

Se determinó en la fracción 11S los factores que conforman a la caracterización funcional proteínica: el efecto de percepción y el de manipulación constituidos por los análisis de solubilidad, capacidad de absorción de agua, capacidad de absorción de aceite, y capacidad y estabilidad de emulsión (Pour-El, 1981).

6.5.1. Solubilidad Proteínica

La solubilidad de acuerdo a su definición termodinámica implica el equilibrio de asociación-disociación de la fracción en estudio (Shen, 1981; Schein, 1990).

En la Tabla 19 se observa el porciento de proteína soluble en las muestras una vez que fueron tratadas con el objeto de verificar el efecto de pH sobre esta propiedad funcional. En la primera columna se muestran los pH a los cuales se trató la solubilidad de la proteína, el harina desgrasada de amaranto muestra un mínimo de solubilidad a pH 4 (16.5 % proteína soluble) mientras que su máximo de solubilidad a pH alcalinos de 10-12 (82 % proteína soluble) similar al comportamiento de solubilidad en la proteína de harina de ajonjolí (Inyang y Nwadimkpa, 1992) y a la solubilidad de la proteína en harina integral de amaranto presentado por Guzmán-Maldonado (1992).

De igual manera la fracción rica en proteína tipo 11S presentó un mínimo de solubilidad a pH 4 (35.5 % proteína soluble), sin embargo, su máximo de solubilidad la tuvo a pH ácido (pH 2) (83.7 % proteína soluble) y nuevamente se incrementó su solubilidad a pH alcalinos (77.1 % proteína soluble); por último

Tabla 19. Efecto del pH en la solubilidad de la proteína de harina desgrasada, de la fracción rica en proteína tipo 11S y de la proteína tipo 11S de amaranto

E

fecto del pH en la solubilidad de la proteína de harina desgrasada, de la fracción rica en proteína tipo 11S y de la proteína tipo 11S de amaranto

pH	% proteína soluble ab		
	Harina desgrasada	Fracción rica en proteína tipo 11S	Proteína tipo 11S
2	29.8 + / - 0.5 b	83.7 + / - 0.9 em	86.8 + / - 0.0 h
4	16.5 + / - 1.3 a	35.5 + / - 0.4 cn	54.7 + / - 1.9 i
6	24.3 + / - 1.7 b	36.2 + / - 2.5 cn	2.5 + / - 0.0 j
8	36.5 + / - 0.9 c	70.2 + / - 1.8 f	47.9 + / - 1.8 k
10	62.0 + / - 0.9 d	77.1 + / - 1.4 g	65.7 + / - 1.9 l
12	82.0 + / - 1.1 e	77.1 + / - 1.9 g	65.9 + / - 0.9 l

a / Promedio de dos repeticiones

b / Valores expresados en % base seca

Las medidas en fila y en columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey

se observa que la proteína 11S se vió influenciada al obtener un máximo de concentración de proteínas (95 % proteína en la muestra), en donde se muestra un máximo de solubilidad a pH 2 (86.7 % proteína soluble) disminuyendo hasta un 2.5 % proteína soluble a pH 6 e incrementándose la solubilidad a pH alcalinos (65.9 % proteína soluble). Lo anterior sugiere la disminución de la solubilidad proteínica por medio de la eliminación de compuestos hidrofílicos presentes. Este comportamiento es similar al que presentan las globulinas del frijol tepary (*Phaseolus acutifolius*) que también presenta un máximo de solubilidad a pH 2, una variante en su mínimo de solubilidad que se presenta desde pH 5 a pH 6 e incrementándose a pH alcalino (Idouraine y col. 1991).

Una actitud similar la presentan las globulinas de avena (Ma, 1983) que se encuentran como fracción mayoritaria de las proteínas de reserva, siendo una situación común en materiales dicotiledoneas, siendo la avena un material monocotiledoneas.

Lo anterior puede representar un dato importante debido a que como se ha mencionado, existen grandes similitudes entre las leguminosas (Fan y Sosulski, 1974) y la semilla de amaranto tanto por pertenecer al grupo de las dicotiledoneas, como por las fracciones mayoritarias que presentan y las subunidades 7S o/y 11S características, siendo interesante comparar las mismas características con granos de monocotiledoneas debido a que la proteína de amaranto en funcionalidad es similar a los mismos, y con lo anterior, el hecho de que la avena presente esta fracción mayoritaria con un comportamiento de solubilidad similar al de los dos materiales mencionados anteriormente, se hace necesario un análisis más profundo acerca de los genes ancestrales (Peterson,

1978; Robert y col., 1983; Jensen, 1984; Borroto y Dure, 1987; Alexenko y col., 1988; Jensen y Berthold, 1989; Mimouni y col., 1990; Collada y col., 1991; Luthe, 1991; Gorinstein, 1993).

Debido a las características de las proteínas de amaranto, se puede sugerir que los compuestos hidrofílicos referidos, se tratan de carbohidratos unidos a las proteínas por medio de puentes hidrógeno (Gorinstein, 1993; Burova y col., 1992) pues bastó un tratamiento de tiempo-temperatura para lograr un incremento desde un 40% de proteína a un precipitado con un 94% de proteína característica de las proteínas tipo 11S (Bietz, 1979; Fukushima, 1980; Bressani y col., 1987a; Guevara-Lara, 1989; Paredes-López y col., 1990).

Por otra parte, se puede observar gráficamente el efecto de pH sobre la solubilidad de la proteína en la Fig. 30.

Por lo tanto, como era de suponerse, al eliminar los carbohidratos de la proteína (Marccone y Yada; Burova y col., 1992), la solubilidad de las globulinas 11S es casi mínima a pH 6 incrementándose antes y después de este punto. De la misma manera, se podría sugerir un punto isoeléctrico de la proteína 11S de las globulinas de amaranto a pH 6. De cualquier forma para aseverar lo anterior se torna necesario un análisis más detallado.

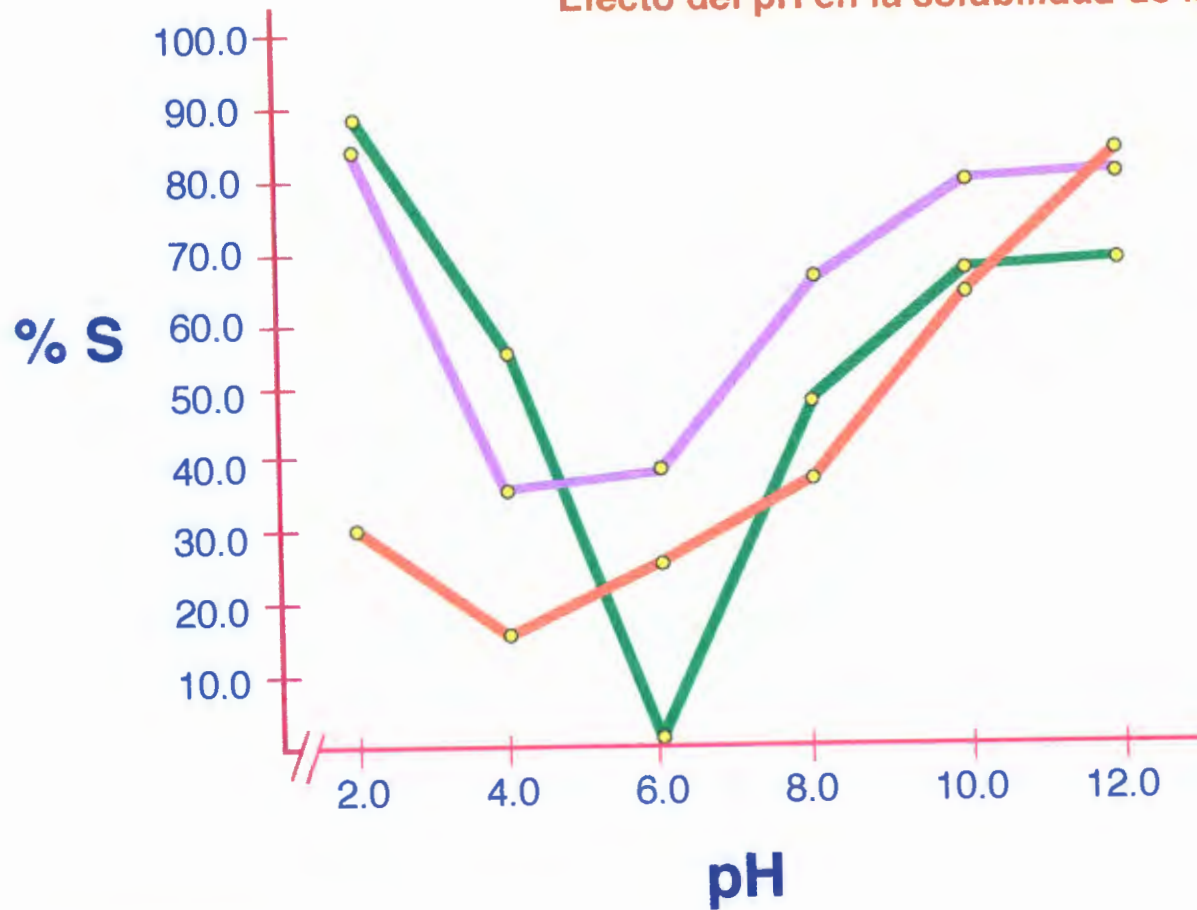
6.5.2. Capacidad de Absorción de Agua y de Aceite

La capacidad de absorción de agua (Tabla 20) para el extracto crudo y para la fracción 11S liofilizados, como era de suponerse por tratarse de una proteína salino soluble fue mínima y estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) (0.13 mL/g FRP 11S y 0.8 mL/ g proteína tipo 11S), lo cual podría representar un problema



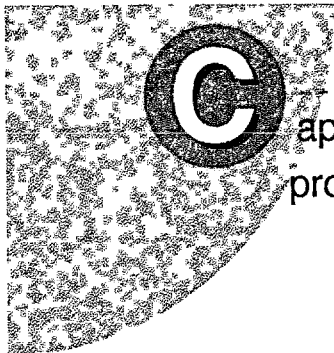
Fig. 30. Efecto del pH en la solubilidad de la proteína en
harina desgrasada, fracción rica en proteína tipo 11S y
globulinas tipo 11S de anaranto

Efecto del pH en la solubilidad de la proteína



- harina desgrasada
- fracción rica en proteína tipo 11S
- globulinas tipo 11S de amaranto

Tabla 20. Capacidad de absorción de agua y de aceite de la fracción rica en proteína tipo 11S y de la proteína tipo 11S de amaranto



Capacidad de absorción de agua y de aceite de la fracción rica en proteína tipo 11S y de la fracción tipo 11S de globulinas de amaranto

Material	Absorción de agua (mL / g de proteína) a/	Absorción de aceite (mL / g de proteína) a/
Fracción rica en proteína tipo 11S	0.13 + / - 0.23 a	2.13 + / - 0.23 c
Proteína tipo 11S	0.80 + / - 0.00 b	2.40 + / - 0.00 d

a / Promedio de tres repeticiones + / - desviación estándar

Las medidas en fila y en columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey

para el empleo de esta fracción dentro de los sistemas alimenticios debido a que la absorción de agua o hidratación es considerada como una de las principales características funcionales para la solubilidad de aditivos, captación de humedad, solubilidad, viscosidad y gelación de las proteínas (Hutton y Campbell, 1981).

Los resultados aquí presentados mostraron una menor capacidad de absorción de agua que los aislados proteínicos de soya (Idouraine y col., 1991) y menores a la capacidad de absorción de agua encontrada por otros investigadores para concentrados proteínicos de materiales de diverso origen vegetal (Bernardi-Don y col., 1991; Inyang y Nwadinmpa, 1992; Sheen, 1991ab; Tasneem y Prakash, 1992; Ordorica-Falomir, 1988; Paredes-López y Ordorica-Falomir, 1986b), en donde la capacidad de absorción de agua generalmente excede al 100% (v/p) de proteína, mientras que la fracción proteínica tipo 11S presentó aún menor capacidad de absorción de agua (0.13 mL / g proteína) que la fracción rica en proteína tipo 11S.

Hutton y Campbell (1981) sugirieron que un factor de gran importancia para la interacción agua y proteína que ocurre en el atrapamiento físico que realiza la proteína sobre el agua en el fenómeno de absorción de agua, incluye a la conformación proteínica, estructura proteínica y peso molecular (Nakai y Li-Chan, 1993; Walstra y De Roos, 1993) y la presencia o ausencia de carbohidratos hidrofílicos expuestos (Idouraine y col., 1991). Todo esto podría explicar el por qué la fracción rica en proteína tipo 11S tuvo muy poca absorción de agua como se observó en la Tabla 20. Esta fracción tuvo un 42% de proteína cruda ($N \times 5.85$) y

al parecer el resto lo constituyen carbohidratos (resultados similares a los reportados por Marcone y Yada en 1991), y por su comportamiento durante la extracción se pudo sugerir un complejo proteína-carbohidrato reportado por Burova y col. (1992). Este complejo limitó el desdoblamiento tanto de los carbohidratos como el de las proteínas (Idouraine y col. 1991; Nakai y Li-Chan, 1993; Walstra y De Roos, 1993), a su vez limitando el atrapamiento de moléculas de agua que en este caso la capacidad de absorción de agua fue de 0.13 mL/ g proteína. Por otra parte se puede observar en la misma Tabla que la proteína tipo 11S incrementó su capacidad de absorción de agua al eliminar los carbohidratos de la fracción rica en proteína tipo 11S. Sin embargo aún este valor (0.80 mL/g proteína) fue bajo. Hutton y Campbell (1981) relacionaron previamente este comportamiento con una estructura molecular globular no desnaturalizada, debido a que la desnaturalización proteínica logra la transición de un dominio globular en la proteína a un sistema de conformación al azar, permitiendo la exposición de cadenas de aminoácidos, interactuando de esta manera con el medio ambiente y permitiendo a su vez una mayor absorción de agua.

Con lo que respecta a la capacidad de absorción de aceite cuyos resultados se presentan en la misma Tabla (Tabla 20), la fracción rica en proteína presentó una capacidad de absorción de aceite menor estadísticamente ($p < 0.05$) que la presentada por la fracción de proteína tipo 11S, lo cual indica una estructura más lipofílica que FRP 11S (Idouraine y col. 1991).

Tanto la fracción rica en proteína como la fracción de proteína tipo 11S tuvieron una mayor capacidad de absorción de

aceite que las globulinas de frijol tepary y que los aislados proteínicos de soya (0.83-1.36 mL/ g proteína y 0.96-1.14 mL/ g proteína, respectivamente) (Idouraine y col. 1991), similares a algunos aislados proteínicos de cártamo (2.27-2.44 mL/ g proteína) (Paredes-López y Ordorica-Falomir, 1986b; Ordorica-Falomir, 1988) y de harina y aislados proteínicos de soya (2.4 mL/ g proteína) y de ajonjolí (2.3 mL/ g proteína) reportados por Bernardi Don y col. (1991) y por Inyang y Nwadiwka (1992) respectivamente, pero inferiores a los resultados de la capacidad de absorción de aceite de las albúminas de diversos materiales (Sathe y Salunkhe, 1981; Canella y col., 1985; Tjahjadi y col., 1988).

Diversos estudios (Idouraine y col., 1991; Morr y Ha, 1993; Nakai y Li-Chan, 1993; Walstra y De Roos, 1993) han demostrado que la diferencia de la capacidad de absorción de aceite con respecto a la capacidad de absorción de agua en globulinas, se debe a la presencia de un gran número de cadenas no polares en la estructura, lo cual facilita la absorción y unión de estas cadenas con los lípidos (Inyang y Nwadiwka, 1992).

Por lo tanto, se ha reportado que al disminuir la viscosidad del aceite, éste puede penetrar en la muestra con mayor facilidad y gracias a las cadenas no polares de las proteínas se logró este incremento, cuestión no similar para la absorción de agua. De igual manera se ha reportado un incremento en la capacidad de absorción de aceite al someter las proteínas a la acción de proteasas de bacterias, no así de hongos ya que al parecer fraccionan las cadenas polipeptídicas liberando los enlaces hidrofóbicos pero en forma no muy drástica (Bernardi Don y col., 1990). Por todo lo anterior, se reiteró la sugerencia de la

naturaleza globular de las proteínas y del complejo proteína globular con carbohidratos (Burova y col., 1992).

6.5.3. Capacidad de Formación y Estabilidad de Espuma

En la Tabla 21 se presentan los valores obtenidos para la capacidad de formación de espuma de la fracción rica en proteína tipo 11S, la proteína 11S y el aislado comercial de soya (Olivares-Vázquez, 1989), en función del pH. Las fracciones proteínicas presentaron valores máximos de formación de espuma a pH 2 y pH 8. Pese a que la fracción rica en proteína 11S de amaranto tuvo valores mínimos de formación de espuma a pH 4 y pH 6, en la fracción proteínica 11S definitivamente hubo un comportamiento distintivo, en donde a pH 4 la capacidad de formación de espuma fue mínima (10%) mientras que a pH 6 hubo un incremento considerable (154%) 16 veces superior al presentado a pH 4. Se puede observar que en el caso del aislado comercial de soya se presenta un comportamiento similar a la fracción rica en proteína tipo 11S en donde se muestra un mínimo de capacidad de formación de espuma a pH 6 y un incremento de la misma a pHs extremos, similar a su vez al comportamiento presentado por el aislado proteínico de soya comercial de Ordorica-Falomir (1988).

El comportamiento de la estabilidad de espuma en función del pH de la fracción rica en proteína 11S con respecto a la proteína tipo 11S fue estadísticamente diferente (Tabla 22). La fracción rica en proteína 11S presentó una mínima estabilidad (19.8) a pH 4 siendo similar estadísticamente ($p < 0.05$) a los valores presentados a pH 6, pH 8 y pH 10, mientras que a pH 2 presentó su máxima estabilidad. Cabe hacer mención que a pH 2

Tabla 21. Efecto del pH sobre la capacidad de formación de espuma de proteínas de amaranto y un aislado comercial de soya

**E**

efecto del pH sobre la capacidad de formación de espuma de proteínas de amaranto y un aislado comercial de soya

pH	Capacidad de formación de espuma (%) a /		
	Fracción rica en proteína tipo 11S	Proteína tipo 11Sb	Aislado comercial de soya b / c /
2	84.0 + / - 0.0 a	98.3 + / - 2.4 e	51.5 + / - 10.2
4	54.7 + / - 2.3 ak	10.0 + / - 2.8 d	51.9 + / - 7.7
6	54.0 + / - 2.0 ak	154.1 + / - 15.8 g	28.8 + / - 2.3
8	67.3 + / - 2.3 b	220.0 + / - 0.0 i	40.9 + / - 7.2
10	63.3 + / - 3.0 b	200.0 + / - 0.0 h	41.8 + / - 2.3
12	n.d.	115.5 + / - 12.2 f	45.5 + / - 4.8

a / Promedio de tres repeticiones + / - desviación estándar

b / Olivares - Vázquez (1989)

n.d. = No determinada

c / Los valores para el aislado comercial de soya no se incluyeron en el análisis estadístico

Las medidas en fila y en columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey

Tabla 22. Efecto del pH sobre la estabilidad de espuma de proteínas de amaranto y un aislado comercial de soya

**E**

efecto del pH sobre la estabilidad de espuma de proteínas de amaranto y un aislado comercial de soya

pH	Estabilidad de espuma (%) a		
	Fracción rica en proteína tipo 11S	Proteína tipo 11S	Aislado comercial de soya b / c /
2	45.9 + / - 1.3 be	60.4 + / - 3.1 f	79.6 + / - 6.9
4	19.8 + / - 2.4 a	0.0 c	54.5 + / - 8.6
6	22.4 + / - 1.8 a	0.0 c	29.5 + / - 7.3
8	21.6 + / - 0.8 a	3.6 + / - 0.6 d	43.5 + / - 7.0
10	22.8 + / - 0.4 a	2.0 + / - 0.7 d	53.2 + / - 2.4
12	n.d.	44.3 + / - 1.7 eb	44.9 + / - 10.5

a / Promedio de tres repeticiones + / - desviación estándar

b / Olivares - Vázquez (1989)

n.d. = No determinada

c / Los valores para el aislado comercial de soya no se incluyeron en el análisis estadístico

Las medidas en fila y en columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey

tanto presentó su máxima capacidad de formación de espuma como su máxima estabilidad.

Por otra parte, la proteína tipo 11S de amaranto presentó su mínima estabilidad a pH 4 y pH 6, seguido por pH 8 y pH 10 con una mínima diferencia estadística ($p < 0.05$), mientras que a pH 2 presentó su máxima estabilidad, aún superior que el valor reportado en la misma tabla (Tabla 22) para la fracción rica en proteína tipo 11S. En este caso, se obtuvo una máxima capacidad de formación de espuma a pH 8 pero con una mínima estabilidad.

En forma general el aislado comercial de soya (Olivares-Vázquez, 1989) tuvo una mayor estabilidad en función de cada pH que las fracciones proteínicas del amaranto.

Al igual que la mayoría de las propiedades funcionales, la capacidad y estabilidad de espuma de un proteína depende de muchos factores (Ordorica-Falomir, 1988), estos incluyen la fuente de proteína (Idouraine y col., 1991; Shen, 1991ab), método de preparación (Paredes-López y Ordorica-Falomir, 1986b; Bernardi Don y col., 1991; Idouraine y col., 1991; Tasneem y Prakash, 1992), composición (Morr y Ha, 1993; Nakai y Li-Chan, 1993; Utsumi y col., 1993; Walstra y De Roos, 1993), solubilidad (Nakai y Li-Chan, 1993; Walstra y De Roos, 1993), concentración, pH y temperatura (Ordorica-Falomir, 1988; Idouraine y col., 1991; Walstra y De Roos, 1993) y presencia de sales, azúcares, lípidos, entre otros (Yuno y col., 1988; Baniel y col., 1992; Tasneem y Prakash, 1992).

Una de las características que deben tener las proteínas para que puedan formar gran cantidad de espuma y con buena

estabilidad, es un cierto grado de desnaturalización superficial con lo cual se favorecen las interacciones proteína-proteína y se aumentan la fuerza de cohesividad entre las proteínas que forman la película de las espumas, sin llegar a una desnaturalización completa con lo cual provoca una película frágil permitiendo que los glóbulos de aire se colapsen (Walstra y De Roos, 1993) y sea mínima la estabilidad. Al respecto, diversos autores procuran una desnaturalización parcial de sus proteínas, impidiendo la asociación de las mismas nuevamente a través de polisacáridos o grupos afines ya sea a través de enlaces hidrofílicos o bien covalentes (S-S), dejando de esta manera una fase hidrofóbica mínima en el interior de las moléculas proteínicas (Yuno y col., 1988; Baniel y col., 1992; Tasneem y Prakash, 1992; Walstra y De Roos, 1993).

Lo anterior a su vez podría explicar el por qué la proteína tiene una gran capacidad de formación de espuma pero una nula estabilidad suponiendo que esto se logra debido a que la proteína vuelve a obtener su forma globular, mientras que la fracción rica en proteína tipo 11S gracias a la presencia de carbohidratos mantiene tanto capacidad de formación de espuma como estabilidad de la misma, casi en forma constante en función de los distintos pHs.

6.6. DIGESTIBILIDAD *IN VITRO*

En la Tabla 23 se detallan los resultados de la digestibilidad *in vitro* de la caseína como proteína de referencia y de la proteína 11S de las globulinas de amaranto, donde las globulinas tipo 11S mostraron un 86.6% de digestibilidad muy cercano al de la caseína con un 89.2% resultado de gran importancia si se considera a las globulinas tipo 11S de amaranto como una proteína potencial en los alimentos.

El análisis químico de una proteína, su funcionalidad y digestibilidad *in vitro* aportan un valor nutritivo intrínseco sin embargo dependen a su vez de una serie de factores como: presencia de factores antinutrimientales, digestibilidad verdadera y aparente y evaluación del balance de nitrógeno para obtener un valor biológico de la proteína en estudio, por lo tanto se hace necesario llevar a cabo una evaluación nutricional de la fracción tipo 11S.

**Tabla 23. Valores de digestibilidad *in vitro* de la caseína
y globulinas tipo 11S de amaranto**

**V**

Valores de digestibilidad *in vitro* de la caseína y globulinas tipo 11S de amaranto a

Material	Digestibilidad (%)
Caseína	89.2 + / - 0.3 b
Globulinas tipo 11S de amaranto	86.6 + / - 0.3 c

a / Promedio de dos repeticiones + / - desviación estándar
Las medidas en columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) según la prueba de Tukey

7. CONCLUSIONES

Como conclusión se tiene que se logró un método simple para la extracción de la fracción tipo 11S de las globulinas de amaranto. El método emplea la solubilidad de las proteínas y de los carbohidratos presentes a través del manejo de pH (8-8.5, 7) y temperatura (Tamb., 40°C, 37°C y 4°C). El tratamiento enzimático no fue efectivo, debido a que los carbohidratos presentes, no estaban enlazados a nuestra fracción. El descenso ligero de la temperatura (de 40°C a 37°C), al igual que el descenso ligero de pH (de 8.5 a 7.0), logró la precipitación de la proteína 11S. También se puede reiterar, que la característica de la solución extractante, determina en forma considerable la estructura, estabilidad y características propias de las globulinas 11S. De los resultados presentados en este trabajo se puede proponer que la fracción extraída en el presente trabajo, denominada globulina tipo 11S, puede ser un miembro altamente conservado de la familia de las globulinas 11S presentes en otros materiales debido al patrón electroforético característico que presentan con y sin reducción de los puentes disulfuro.

8. BIBLIOGRAFIA

- AACC. 1983. Approved Methods, 8a Edición. American Association of Cereal Chemists. St. Paul. MN, EUA.
- Akpapunam, M.A. y Markakis, P. 1981. Protein supplementation of cowpeas with sesame and watermelon seeds. *Journal of Food Science* 46: 960-961.
- Alexenko, A.Y., Nikolaev, I.V. y Vinetski, Yu.P. 1988. Soybean 11S globulin polipeptides have an antigenic homology with 11S globulins from various plants. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 143-147.
- Alfaro, M.A., Martínez, A., Ramírez, R. y Bressani, R. 1987. Yield and chemical composition of the biomass of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) at 3 different stages of development. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 37: 108-121.
- Al-Kahtani, H.A. y Abou-Arab, A.A. 1993. Comparison of physical, chemical, and functional properties of *Moringa peregrina* (Al-Yassar or Al-Ban) and soybean proteins. *Cereal Chemistry* 70: 619-626.
- Allen, R.D., Nessler, C.L. y Thomas, T.L. 1985. Developmental expressions of sunflower 11S storage protein gene. *Plant Molecular Biology* 5: 165-173.
- Andrews, A.T. 1988. Protein analysis by electrophoresis: Recent developments. Cap. 6. En ''Developments in Food Reviews''. Vol. 6. B.J.F. Hudson (Ed.). Elsevier Applied Science.

- Anónimo. 1991. El redescubrimiento del amaranto. Investigación Hoy. 11-12: 6.
- AOAC, 1984. Official Methods of Analysis, 14th ed. Association of official analytical chemists, Washington, D.C.
- Baldwin, R.L. and Eisenberg, D. 1987. Protein stability. Cap. 11. En "'Protein Engineering'". p. 127. Alan R. Liss, Inc.
- Baniel, A., Caer, D., Colas, B. y Guèguen, J. 1992. Functional properties of glycosylated derivatives of the 11S storage protein from pea (*Pisium sativum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 40: 200-205.
- Barba de la Rosa, A.P. 1986. Influencia de la fertilización nitrogenada sobre las propiedades fisico-químicas de trigos cultivadas en El Bajío. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Celaya. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, Gto.
- Barba de la Rosa, A.P. 1989. Procedimiento enzimático para producir harinas de amaranto de alto contenido de proteína y jarabes con potencial edulcorante. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, Gto.
- Barba de la Rosa, A.P. 1991. Bioquímica e ingeniería de las globulinas de amaranto. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, Gto. Propuesta de Tesis Doctoral.

- Barba de la Rosa, A.P., Guèguen, J., Paredes-López, O. y Viroben, G. 1992. Proteins from amaranth seeds: fractionation and chromatographic characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 931-936.
- Barba de la Rosa, A.P., Paredes-López, O. y Guèguen, J. 1992. Globulins fraction from amaranth: Studies on subunit composition by ultracentrifugation and chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 937-940.
- Becker, R., Wheeler, E.L., Lorenz, K., Stafford, A.E., Grosjean, O.K., Betschart, A.A. y Saunders, R.M. 1981. A compositional study of amaranth grain. *Journal of Food Science* 46: 1175-1180.
- Bernardi Don, L.S., Pilosof, A.M.R. y Bartholomai, G.B. 1991. Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 68: 102-105.
- Betschart, A.A. 1979. Development of safflower protein. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 56: 454-457.
- Betschart, A.A., Irving, D.W., Shepherd, A.D. y Saunders, R.M. 1981. *Amaranthus cruentus*: Milling characteristics, distribution of nutrients within seed components, and the effects of temperature on nutritional quality. *Journal of Food Science* 46: 1181-1187.
- Betschart, A.A., Irving, D.W., Shepherd, A.D., Wheeler, E.L., Becker, R., Lorenz, K. Hanamoto, M.M. y Saunders, R.M. 1979. *Amaranthus*: Morphology, nutritional value and food potential. *Cereal Foods World*. 25: 457-460.

- Bietz, J.A. 1979. Recent advances in the isolation and characterization of cereal proteins. *Cereal Foods World* 24: 199-207.
- Bonnerjea, J., Oh, S., Hoare, M., and Dunnill, P. 1986. Protein purification: The right step at the right time. *Bio/Technology* 4: 954-958.
- Borroto, K. y Dure III, L. 1987. The globulin seed storage proteins of flowering plants are derived from two ancestral genes. *Reporter. Plant Molecular Biology* 8: 113-135.
- Boulter, D. 1983. Regulation of storage protein synthesis and deposition in developing legume seeds. Cap. 10. En "Seed proteins". J. Daussant., J. Mossé y J. Vaughzn (Eds.). Academic Press Inc. New York, N.Y.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method of quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-die binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Breen, J.P. y Crouch, M.L. 1992. Molecular analysis of cruciferin storage protein gene family of *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* 19: 1049-1055.
- Bressani, R., Elías, L.G., González, J.M. y Gómez-Brenes, R. 1987a. The chemical composition and protein quality of amaranth grain germoplasm in Guatemala. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 37: 363-377.
- Bressani, R., González, J.M., Zúñiga, J., Breuner, M. and Elías, L.G. 1987b. Yield, selected chemical composition and nutritive value of 14 selections of amaranth grain representing four species. *Journal Science and Food*

Agriculture 38: 347-356.

Bressani, R. y García-Vela, L.A. 1990. Protein fractions in amaranth grain and their chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1205-1209.

Brinegar, C. y Goundan, S. 1993. Isolation and characterization of chenopodin, the 11S seed storage protein of quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 182-185.

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.

Brulé, D. y Savoie, L. 1988. *In vitro* digestibility of protein and amino acids in protein mixtures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 43: 361-372.

Burova, T.V., Grinberg, N.V., Grinberg, V.Ya., Leontiev, A.L., Tolstoguzov, V.B. 1992. Effects of polysaccharides upon the functional properties of 11S globulin of broad beans. *Carbohydrates Polymers* 18: 101-108.

Bushuk, W. 1981. Utilization of cereals proteins. En "Utilization of Protein Resources". D.W. Stanley, E.D. Murray y D.H. Lees (Eds.). Food and Nutrition Press., Westport, Conn. USA. p. 208-226.

Calderón de la Barca, A.M., Zenteno, E., Ochoa, J.L., Valencia, M. y Carvajal, R. 1985. The removal of *Amaranthus leucocarpus* lectins affects the nutritional value of the seed meal. *Journal of Food Science* 50: 1700-1702.

- Canella, M., Castriotta, G., Bernardi, A. y Boni, R. 1985. Functional properties of individual sunflower albumin and globulin. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 18: 288-292.
- Chambers, S.J., Bacon, J.R., Lambert, N. 1992. The quantitative analysis of seed proteins from peas using high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis* 3: 49-54.
- Cherry, J.P. y McWatters, K.H. 1981. Whippability and aeration. Cap. 8. En ''Protein Functionality in Foods''. J.P. Cherry (Ed.). p. 149. American Chemical Society Series 147. Washington, D.C.
- Chrastil, J. y Zarins, A.M. 1992. Influence of storage on peptide subunit composition of rice oryzenin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 927-930.
- Collada, C., Caballero, R.G., Casado, R. y Aragoncillo, C. 1991. Seed storage proteins in fagaceae: similarity between castaneae globulins and quercus glutelins. *Plant Science* 75: 145-154.
- Creamer, L.K., Jimenez-Flores, R. y Richardson, T. 1988. Genetic modification of food proteins. *Trends in Biotechnology* 6: 163-269.
- Danilenko, A.N., Dimitrochenko, A.P., Braudo, E.E., Bogomolov, A.A. y Rozantsev, E.G. 1993. Restricted enzymatic hydrolysis of legumin of broad beans (*Vicia faba* L.) by trypsin in concentrated solutions: Control of hydrolysis process at the expense of change of enzyme-substrate ratio. *Nahrung* 37: 46-52.

- Davis, E.M. 1988. Protein assays: A review of common techniques. American Biotechnology Laboratory July: 28-38.
- Delobette, H., Friry, A., Plewniak, F. y Egly, J.-M. 1991. Le dosage des protéines. Le Technoscope de Biofutur 41: 3-12.
- Deshpande, S.S. 1992. Food legumes in human nutrition: A personal perspective. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 32: 333-363.
- Deshpande, S.S. y Damodaran, S. 1989. Structure-digestibility relationship of legume 7S proteins. Journal of Food Science 54: 108-113.
- Dey, N. y Mandal, R.K. 1993. Characterisation of 2S albumin with nutritionally balanced amino acid composition from the seeds of *Chenopodium* albumin and its antigenic homology with seed proteins of some *Chenopodiaceae* and *Amaranthaceae* species. Biochemistry and Molecular Biology International 30: 149-157.
- Duarte-Correa, A., Jokl, L. y Carlsson, R. 1986a. Chemical constituents, *in vitro* protein digestibility and presence of antinutritional substances in amaranth grains. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 36: 319-326.
- Duarte-Correa, A., Jokl, L. y Carlsson, R. 1986b. Amino acid composition of some *Amaranthus* sp. grain proteins and of its fractions. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 36: 466-476.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28: 350-356.
- Dunnill, P. 1983. The future of biotechnology. Biochemistry Society Symposium 48: 9-11.

- Esnault, M.-A., Merceur, A. y Citharel, J. 1991. Characterization of globulins of yellow lupin seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 29: 573-583.
- Fan, T.Y. and Sosulski, F.W. 1974. Dispersability and isolation of proteins from legume flours. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 7: 256-259.
- FAO, 1985. FAO Yearbook. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Figueroa, J.D.C. y Khan, K. 1993. Albumin fraction from spring winter and soft wheats - Protein and associated carbohydrate identified by gel filtration chromatography and gel electrophoresis. *Cereal Chemistry* 70: 689-695.
- Flores, V.J.J., Santoyo, C.V.H. y Sánchez, P.V. 1986-1987. La integración agricultura-industria en la producción de oleaginosas y aceites en el sur de Sonora. *Revista de Geografía Agrícola. Análisis regional de la agricultura.* Universidad Autónoma de Chapingo. 11-12: 113-142.
- Flores, H.E. y Teutónico, R.A. 1986. Amaranths (*Amaranthus spp.*): Potential grain and vegetable crop. En "Biotechnology in Agriculture and Forestry". Vol 2. Crops I. Y.P.S. Dajaj. (Ed.). Berlin. p. 568-570.
- Fukushima, D. 1980. Deteriorative change of proteins during soybean food processing and the used in foods. Cap. 10. En "Chemical Deterioration of Proteins". J.R. Whitaker, M. Fujimaki (Eds.). p. 211-240. ACS Symposium Series 123. Chemical Society. Washington, D.C.

- Fukushima, D. 1985. Fermented vegetable protein and related foods of Japan and China. *Food Reviews International* 1: 149.
- Fukushima, D. 1991a. Recent progress of soybean protein foods: Chemistry, Technology, and Nutrition. *Food Reviews International* 7: 323-351.
- Fukushima, D. 1991b. Structures of plant storage proteins and their functions. *Food Reviews International* 7: 283-322.
- García, L.A., Alfaro, M.A., and Bressani, R. 1987. Digestibility and protein quality from raw and heat-processed defatted and nondefatted flours prepared with the amaranth species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35: 604-607.
- Gauthier, S.F., Vachon, C., and Savoie, L. 1986. Enzymatic conditions of an *in vitro* method to study protein digestion. *Journal of Food Science* 51: 960-964.
- Gómez, L.V. y Pacheco de Delahaye, E. 1991. Efectos del tratamiento químico y enzimático en la extracción y propiedades funcionales de las proteínas en harina de semillas de amaranto (*Amaranthus cruentus* K-1024). Primer Congreso Internacional del Amaranto. p. 94. Oaxtepec, Mor. Méx.
- Gordon, A.H. 1975. Electrophoresis of proteins in polyacrilamide and starch gels. T.W. Work, E. Work (Eds.). p. 188-191. North Holland Publisher, Amsterdam.
- Gorinstein, S. 1993. Relationships between amino acid sequence and secondary structures of proteins in plants and cereals. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 39: 851-854.

- Gorinstein, S., Moshe, R., Greene, L.J., Arruda, P. 1991. Evaluation of four *Amaranthus* species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 851-854.
- Guèguen, J. y Barbot, J. 1988. Quantitative and qualitative variability of pea (*Pisium sativum* L.) protein composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 43: 209-224.
- Guèguen, J., Chevalier, M., Barbot, J. y Schaeffer, F. 1988. Dissociation and aggregation of pea legumin induced by pH and ionic strength. *Journal of the Science and Food Agriculture* 44: 167-182.
- Guevara-Lara, F. 1989. Nitrogen precipitation curves and preparation of a protein isolate by isoelectric precipitation. *Processing of oilseeds and legumes*. University of Saskatchewan, Canadá. Reporte.
- Guzmán-Maldonado, H. 1992. Optimización de un procedimiento enzimático para la licuefacción y sacarificación del almidón mediante la metodología de superficie de respuesta. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, México.
- Higgins, I.J. 1984. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Annual Review Plant Physiology* 35: 191-221.
- Higgins, I.J. 1985. What is Biotechnology. Cap. 1. En "Biotechnology principles and applications". p. 1-22. Black Well Scientific Publications, UK.
- Holm, E.T. and Breedon, C.H. 1983. Comparison of the whippability of defatted meals from three hybrid varieties of sunflower seed. *Journal of Food Science* 48: 1131-1134.

- Hsu, H.W., Vavak, D.L., Satterlee, L.D. and Miller, G.A. 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science* 42: 1269-1273.
- Hutton, C.W. y Campbell, A.M. 1981. Water and fat absorption. Cap. 9. En ''Protein Functionality in Foods''. J.P. Cherry (Ed.). p. 177. American Chemical Society Series 147. Washington, D.C.
- Idouraine, A., Yensen, S.B., and Weber, C.W. 1991. Tepary bean flour, albumin and globulin fractions functional properties compared with soy protein isolate. *Journal of Food Science* 56: 1316-1326.
- Inyang, U.E. y Nwadiimkpa, C.U. 1992. Functional properties of dehulled sesame (*Sesamun indicum* L.) seed flour. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 69: 819-822.
- Irving, D.W., Betschart, A.A., and Saunders, R.M. 1981. Morphological studies on *Amaranthus cruentus*. *Journal of Food Science* 46: 1170-1174.
- Ishino, K. y Kudo, S. 1979. Relationship between gelation and aggregation of alkali-treated soybean 7S and 11S globulins. *Agriculture, Biology and Chemistry* 43: 1029-1035.
- Jensen, U. 1984. Legumin-like and vicilin-like storage proteins in *nigella damascena* (ranunculaceae) and six other dicotyledoneous species. *Journal of Plant Physiology* 115: 161-170.
- Jensen, U. y Berthold, H. 1989. Legumin-like proteins in gymnosperms. *Phytochemistry* 28: 1389-1394.

- Johnson, L.A., Suleiman, T.M., y Lusas, E.W. 1979. Sesame protein: A review and prospectus. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 56: 463-468.
- Kajiwara, H. e Hirano, H. 1992. Analysis of Adzuki bean seed protein by partial amino acid sequencing of polypeptide separated on two-dimensional gel. *Japanese Journal of Breeding* 42: 727-735.
- Kinsella, J.E., Damodaran, S. y German, B. 1985. Physicochemical and functional properties of oilseed proteins with emphasis in soy protein. En "'New Protein Foods'". Vol.5 Seed proteins. A.M. Altshul y H.L. Wilcke (Eds.). p. 108-172. Academic Press.
- 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.
- Koleva, S.T., Marinova, E.I., Bojadiev, M.I., Samardjieva, K.G. 1992. The globulin storage proteins legumin and alfin in alfalfa. *Seed Science and Technology* 20: 483-488.
- Kolivas, S. y Bayler, K.R. 1993. Structure of the cDNA coding for conglutin gamma, a sulphur-rich protein form *Lupinus angustifolious*. *Plant Molecular Biology* 21: 397-401.
- Konishi, Y., Fumita, Y., Ikeda, K., Okuno, K. y Fuwa, H. 1985. Isolation and characterization of globulin from seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Biological Chemistry* 45: 1453-1459.
- Koshiyama, I. 1972. A new method for isolation of the 7S globulin in soybean seeds. *Agriculture, Biology and Chemistry* 36: 255.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.
- Lai, F.M., Senaratha, T., McKersie, B.D. 1992. Glutamine enhances storage protein synthesis in *Medicago sativa* L. somatic embryos. *Plant Science* 87: 69-77.
- Lásztity, R. 1984. The chemistry of cereal proteins. Caps. 1, 2 y 11. CRC Press, Inc. Florida, U.S.A.
- Latha, T.S. y Prakash, V. 1984. Studies on the proteins from safflower seed (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32: 1412-1416.
- Lehninger, L.A. 1987. Proteínas: conformación tridimensional. En 'Bioquímica'. Págs. 127-158. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 2da. Edición.
- Lúquez de Muciarelli, S.I., Lucas de A., M.A., Cid, J.A., García de L., N.A. y Fernández, S. 1990. Composición química y valor nutritivo de la proteína de *Amaranthus quintensis*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 1: 69-75.
- Luthe, D.S. 1991. Electrophoretic and immunological detection of legumin-like seed proteins in several monocot species including several tribes of the pomaceae. *Plant Science* 78: 185-192.
- Lyon, C.K. and Becker, R. 1987. Extraction and refining of oil from amaranth seed. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 64: 233-236.
- Ma, C.-Y. 1983. Chemical characterization and functionality assessment of protein concentrates from oats. *Cereal Chemistry* 60: 36-42.

- Marcone, M.F. y Yada, R.Y. 1991. Isolation, purification, and characterization of the oligomeric seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus*. *Agriculture, Biology and Chemistry* 55: 2281-2289.
- Marletta, L., Carbonaro, M. and Carnovale, E. 1992. In-vitro protein and sulphur amino acid availability as a measure of bean protein quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 59: 497-504.
- Marshall, H.F. Jr. 1990. Isolation and purification of cottonseed 7S storage globulin and its subunits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1454-1457.
- Martin, R.G. y Ames, B.N. 1961. A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: Application to protein mixtures. *Journal of Biological Chemistry* 236: 1372-1379.
- Mifflin, B.J., Field, J.M. y Shewry, P.R. 1983. Cereal storage proteins and their effect on technological properties. Cap. 12. En ''Seed Proteins''. P.R. Shewry (Ed.). Academic Press Inc. New York, N.Y.
- Mohan-Reddy, I. y Narasinga-Rao, M.S. 1988. Method for the isolation of gossypin (11S protein) and congossypin (7S protein) of glanded cottonseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 237-240.
- Mora-Escobedo, R., Paredes-López, O. y Ordorica-Falomir, C. 1990. Characterization of albumins and globulins from amaranth. *Food Science and Technology* 23: 484-487.

- Morr, C.V., German, B., Kinsella, J.E., Regenstein, J.M., Van Buren, J.P., Kilara, A., Lewis, B.A. y Mangino, M.E. 1985. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science* 50: 1715-1718.
- Morr, C.V. y Ha, E.Y.M. 1993. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33: 431-476.
- Nakai, S. y Li-Chan, E. 1993. Recent advances in structure and function of food proteins: QSAR approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33: 477-499.
- National Research Council 1984. *Amaranth: Modern prospects for an ancient crop*. National Academy Press. Washington, D.C.
- Navarro-Mendoza, F.J. 1991. Aplicación de la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución a la identificación de proteínas. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, Gto.
- Nielsen, S.S., Deshpande, S.S., Harmodson, M.A. y Scott, P. 1988. Comparative digestibility of legume storage proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 896-902.
- Novo 1986. *Novo's handbook of practical biotechnology*. C.O.L. Boyce, Ph. D. (Ed.). 2a. edición. Novo Industri AIS.
- Okubo, K., Waldrop, A.B., Iacobucci, G.A. y Meyers, D.V. 1975. Preparation of low-phytate soybean protein isolate and concentrate by ultracentrifugation. *Cereal Chemistry* 52: 263.

- Olguín, E. 1985. Producción de alimentos no convencionales para consumo animal. En ''Prospectiva de la Biotecnología en México''. R. Quintero (Comp.). p. 149. Fundación Javier Barrios Sierra, A.C. CONACYT.
- Olguín-Martínez, L. 1992. Caracterización de las globulinas de la semilla del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- Olguín-Martínez, L. y Segura-Nieto, M. 1991. Globulinas de la semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). Primer Congreso Internacional del Amaranto. Oaxtepec, Mor. Méx.
- Olivares-Vázquez, M.R. 1989. Obtención de aislados proteicos a partir de garbanzo porquero. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Celaya, Celaya, Gto. Méx.
- Ologunde, M.O., Ayorinde, F.O., Shepard, R.L., Afolabi, O.A. and Oke, O.L. 1992. Sterols of seed oils of *Vernonia galamensis*, *Amaranthus cruentus*, *Amaranthus caudatus*, *Amaranthus hybridus* and *Amaranthus hypochondriacus* grown in the humid tropics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 58: 221-225.
- Ordorica-Falomir, C.A. 1988. Obtención de aislados proteicos por micelización y precipitación isoeléctrica a partir de pastas de cártamo. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Irapuato, Gto.
- Osborne, T.B. 1924. The vegetable proteins. En ''Monographs on Biochemistry''. 2a. Edición. Loongmans y Green (Eds.). Nueva York, N.Y.

- Payne, I. 1983. Breeding for protein quantity and protein quality in seed crops. Cap. 11. En ''Seed Proteins''. Academic Press Inc. New York, N.Y.
- Paredes-López, O., Barba de la Rosa, A.P., Hernández-López, D. y Cárabez-Trejo, A. 1990. Amaranto. Características Alimentarias y Aprovechamiento Agroindustrial. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, D.C.
- Paredes-López, O., Guevara-Lara, F., Schevenin-Pinedo, M.L. y Montes-Rivera, R. 1989. Comparison of procedures to determine protein content of developing bean seeds (*Phaseolus vulgaris*). Plant Foods for Human Nutrition 39: 137-148.
- Paredes-López, O., Mendoza, V. y Mora-Escobedo, R. 1993. Isolation of amaranth flour proteins by fractionation procedures and sonication. Plant Foods for Human Nutrition 43: 37-43.
- Paredes-López, O., Mora-Escobedo, R. y Ordorica-Falomir, C. 1988. Isolation of amaranth proteins. Food Science and Technology 21: 59-61.
- Paredes-López, O. y Ordorica-Falomir, C.A. 1986. Functional properties of safflower protein isolates: Composition, yield and protein quality. Journal of the Science of Food and Agriculture 37: 1097-1103.
- Paredes-López, O. y Ordorica-Falomir, C.A. 1986b. Functional properties of safflower protein isolates: Water absorption, whipping and emulsifying characteristics. Journal of the Science of Food and Agriculture 37: 1104-1108.

- Paredes-López, O., Ordorica-Falomir, C.A., Guevara-Lara, F., Covarrubias, M.M. 1985. Las proteínas vegetales: presente y futuro en la alimentación. En ''Prospectiva de la Biotecnología en México''. R. Quintero (Com.). p. 331-350. Fundación Javier Barrios Sierra, A.C. -CONACYT, México.
- Pavlovskaya, G., McClements, D.J. y Povey, M.J.W. 1992. Ultrasonic investigation of aqueous solutions of a globular protein. *Food Hydrocolloids* 6: 253-262.
- Pedersen, B., Kalinowski, L.S. y Eggum, B.O. 1987a. The nutritive value of amaranth grain (*Amaranthus caudatus*) 1. Protein and minerals of raw and processed grain. *Plant Foods for Human Nutrition* 36: 309-324.
- Pedersen, B., Hallgren, L., Hansen, I. and Eggum, B.O. 1987b. The nutritive value of amaranth grain (*Amaranthus caudatus*) 2. As a supplement to cereals. *Plant Foods for Human Nutrition* 36: 325-329.
- Peng, I.C., Quass, D.W., Dayton, W.R. y Allen, C.E. 1984. The physicochemical and functional properties of soybean 11S globulin. A review. *Cereal Chemistry* 61: 480-490.
- Pernollet, J.-C. y Mossé, J. 1983. Structure and localization of legume and cereal seed storage proteins. Cap.7. En ''Seed proteins''. J. Daussant., J. Mossé y J. Vaughan (Eds.). Academic Press Inc. New York, N.Y.

- Peschard, E. y Viniegra, G. 1981. Análisis de costos de la producción de proteína y ácido ribonucleico (ARN) de levadura por fermentación aeróbica de la melaza de caña. En ''Biotecnología para el Aprovechamiento de los Desperdicios Orgánicos''. O. Monroy y G. Viniegra (Comp.). p. 231. AGT Editor S.A. México.
- Peterson, D.M. 1978. Subunit structure and composition of oat seed globulin. *Plant Physiology* 62: 506-509.
- Pour-El, A. 1981. Protein functionality: Clasificación, definición, and methodology. Cap. 1. En ''Protein Functionality in Foods''. J.P. Cherry (Ed.). p. 1. American Chemical Society Series 147. Washington, D.C.
- Prakash, 1986. Effect of sodium chloride on the extractability of proteins from sesame seed (*Sesamum indicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34: 256-259.
- Prentis, S. 1984a. Biotechnology from farm to supermarket. Cap. 6. En ''Biotechnology (A New Industrial Revolution)'' . S. Prentis. p. 129. Ed. George Braziller, Inc. New York, N.Y.
- Prentis, S. 1984b. Who will benefit from biotechnology?. Cap. 9. En ''Biotechnology (A New Industrial Revolution)'' . S. Prentis. p. 135. Ed. George Braziller, Inc. New York, N.Y.
- Primrose, S.B. 1987. Protein Engineering. Cap. 4. En ''Modern Biotechnology'' . S.B. Primrose. p. 34. Ed. Blackwell Scientific Publications.
- Raina, A. y Datta, A. 1992. Molecular cloning of a gene encoding a seed specific protein with nutritionally balanced amino acid composition from *Amaranthus*. *Proceedings of the National Academic of Science. USA.* 89: 11774-11778.

- Rajendran, S. y Prakash, V. 1988. Isolation and characterization of β -globulin low molecular weight protein fraction from sesame seed (*Sesamun indicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 269-275.
- Rasyid, F., Manullang, M. y Hansen, P.M.T. 1992. Isolation and characterization of coconut protein. *Food Hydrocolloids* 6: 301-314.
- Reyes-Moreno, C. 1992. Endurecimiento del frijol común. Desarrollo de procedimientos para su prevención y cambios fisicoquímicos durante la reversibilidad de este fenómeno. Tesis Doctoral. Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, Irapuato, Gto. Méx.
- Restrepo-Osorio, J. 1979. Aislamiento e identificación de cuerpos proteicos en el frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Tesis de Maestría. Univ. de San Carlos, Guatemala, Guatemala.
- Rivero de Padúa, M. 1983. Some functional and utilization characteristics of sesame flour and proteins. *Journal of Food Science* 48: 1145-1147.
- Robert, L.S., Matlashewski, G.J., Adeli, K., Nozzolillo, C. and Altosaar, I. 1983. Electrophoretic and developmental characterization of oat (*Avena sativa* L.) globulins in cultivars of different protein content. *Cereal Chemistry* 60: 231-234.

- Rodríguez-Nester, C.E. 1992. Caracterización de albúminas del huauhtli (*Amaranthus hypochondriacus* L.) con alto contenido de metionina. Tesis de Licenciatura. Univ. Michoacana de San Nicolás Hidalgo. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, Gto.
- Saio, K. y Watanabe, T. 1973. Food use of soybean 7S and 11S proteins. Extraction and functional properties of their fractions. *Journal of Food Science* 38: 1139-1144.
- Sánchez-Marroquín, 1980. Potencialidad agroindustrial del amaranto. Monografía. Centro de Estudios Económicos y Sociales del Tercer Mundo. México.
- Sathe, S.K., Mason, A.C., Rodibaugh, R. y Weaver, L.M. 1992. Chemical form of selenium in soybean (*Glycine max* L.) lectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 2084-2091.
- Sathe, S.K. y Salunke, D.K. 1981. Functional properties of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: Emulsion, foaming, viscosity, and gelation properties. *Journal of Food Science* 46: 71-74.
- Saunders, R.M. y Becker, R. 1984. Amaranthus: A potential food and feed resource. Cap. 6 En ''Advances in Cereal Science and Technology''. Vol. 6. Y. Pomeranz (Ed.). p 357-397. St. Paul, M.N.
- Schein, C.H. 1990. Review. Solubility as a function of protein structure and solvent component. *Bio/Technology* 8: 308-317.
- Schroeder, H.E. 1984. Major albumins of *Pisium* cotyledons. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 35: 191-198.

- Segura-Nieto, M. 1991. Mejoramiento de la calidad nutricional de las cosechas. Cap. 6. En "Introducción a la Biología Molecular e Ingeniería Genética de Plantas". R.R. Bustamante, I.T. Pacheco, J.A. Garzón-Tiznado, L. Herrera-Estrella (Eds.). 1a. Edición. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Irapuato, Gto.
- Segura-Nieto, M., Vázquez, M.N. y Herrera, L. 1988. Caracterización de albúminas del huautli (*Amaranthus sp.*) y secuenciación parcial de algunas de ellas. X Congreso Internacional del Grupo Iberoamericano de Cristalografía. México, p. MI-18.
- Segura-Nieto, M., Vázquez-Sánchez, N., Rubio-Velázquez, H., Olguín-Martínez, L.E., Rodríguez-Nester, C.E. y Herrera-Estrella, L. 1992. Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 1553-1558.
- Sessa, D.J. 1992. Hydration effects on the thermal stability of proteins in cracked soybeans and defatted soy flour. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 25: 365-370.
- Shallenberger, J.A. 1978. Production and utilization of wheat. En "Wheat Chemistry and Technology". Cap. 1. Y. Promeranz (Ed.). St. Paul. MN.
- Sheen, J.S. 1991a. Comparison of chemical and functional properties of soluble leaf proteins from four plant species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 681-685.

- Sheen, J.S. 1991b. Effect of succinylation on molecular and functional properties of soluble Tobacco leaf proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 1070-1074.
- Shen, J.L. 1981. Solubility and viscosity. En ''Protein Functionality in Foods''. J.P. Cherry (Ed.). p. 89. American Chemical Society Series 147. Washington, D.C.
- Singhal, R.S. y Kulkarni, P.R. 1988. Review. Amaranth- An underutilized resource. *International Journal of Food Science and Technology* 23: 125-139.
- Sosulsky, F.W. e Imafidon, G.I. 1990. Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factor for animal and plant foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1351-1356.
- Sosulski, F.W. y McCurdy, A.R. 1987. Functionality of flours protein fractions, and isolates from field peas and faba beans. *Journal of Food Science* 52: 1010-1015.
- Soriano-Santos, J., Iwabuchi, S. y Fujimoto, K. 1991. Solubility of amaranth seed proteins: The main factor involved in their accurate quantification. 1er. Congreso Internacional del Amaranto. Oaxtepec, Mor.
- Stuart, D.A., Nelsen, J. and Nichol, J. 1988. Expression of 7S and 11S alfalfa seed storage proteins in somatic embryos. *Journal of Plant Physiology* 132: 134-139.
- Tasneem, R. y Prakash, V. 1992. Effect of aqueous ethanol washing on the physicochemical and functional properties of safflower (*Carthamus tinctorius*) seed proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 59: 237-244.

- Thanh, V.H. y Shibasaki, K. 1976. Major proteins of soybean seeds. A straight forward fractionation and their characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24: 1-117.
- Tjahjedi, C., Lin, S., y Breene, W.M. 1988. Isolation and characterization of Adzuki bean (*Virginia angularis* cv Takara) proteins. *Journal of Food Science* 53: 1438-1441.
- Tena-Flores, J.A. 1991. Fraccionamiento de las proteínas del grano de amaranto sometido a diferentes tratamientos. 1er. Congreso Internacional del Amaranto. Oaxtepec, Mor.
- Teutónico, R.A. y Knorr, D. 1985. Amaranth: Composition, properties, and applications of a rediscovered food crop. *Food Technol.* 39(4): 49-60.
- Townsend, A.-A. and Nakai, S. 1983. Relationship between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins. *Journal of Food Science* 48: 588-594.
- Utsumi, S., Gidamis, A.B., Kanamori, J., Jun Kang, I.L. y Kito, M. 1993. Effects of the deletion of disulfide bonds by protein engineering on the conformation and functional properties of soybean proglycinin. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 41: 687-691.
- 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 Agricultural and Food Chemistry* 33: 297-303.
- Vasco-Méndez, N.L. y Paredes-López, O. 1995. Antigenic homology between amaranth glutelins and other storage proteins. *Journal of Food Biochemistry* 18: 227-238.