



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE SEMILLA DE
HUAUZONTLE (*Chenopodium berlandieri* subsp. *nuttalliae*)
EMPLEANDO MEMBRANAS DE ULTRAFILTRACIÓN Y SU
CARACTERIZACIÓN**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS: PRODUCTOS NATURALES Y
ALIMENTOS**

PRESENTA

I.A. CRISTIAN RICARDO HERNÁNDEZ MARÍN

DIRECTORA

DRA. PAULA CECILIA GUADARRAMA MENDOZA

CODIRECTOR

DR. ROGELIO VALADEZ BLANCO

HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA. MÉXICO. JULIO 2020

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioprocesos en el edificio de Productos Naturales y Alimentos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca con el apoyo de una beca (No. 638980) para el estudio de la Maestría en Ciencias de Productos Naturales y Alimentos provista por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Como parte del programa de movilidad en el extranjero 2018-2019, ofertado por el CONACYT y con el apoyo de una beca mixta (No. 291250), se realizó una estancia de investigación del 01 de septiembre de 2018 al 28 de febrero de 2019, en el Departamento de Ingeniería Química y Química Aplicada de la Universidad de Toronto, 200 College Street, Toronto, Ontario, M5S 3E5, bajo la supervisión del Dr. Levente L. Diosady.

Parte de este proyecto fue presentado el 27 de noviembre de 2019 en el 2019 IEEE International Conference on Applied Science and Advanced Technology (iCASAT 2019) realizado por el Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), en la modalidad de conferencia como autor. Asimismo se aceptó la publicación del artículo correspondiente en la revista del Instituto de Ingeniería Eléctrica y Electrónica (IEEE) (DOI: 10.1109/iCASAT48251.2019.9069519).

A la ciencia y el conocimiento

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Begonia Marín y Daniel Hernández, por su apoyo incondicional en todas mis decisiones y por alentarme a ser mejor cada día.

A Rogelio Valadez y Paula Cecilia Guadarrama, por confiar en mí y por darme la oportunidad de formar parte de su equipo. Por su paciencia, sus consejos y por guiarme a lo largo de este proyecto.

A Levente L. Diosady y Bih-King Chen, por su confianza y apoyo en este proyecto.

A mi comité de evaluación, por su tiempo y sus invaluable aportaciones.

A Iván Valeriano, Mavel Díaz, Izamari Fabela y Luis Ramos, por estar para mí siempre que los necesito.

A la Universidad Tecnológica de la Mixteca y a mis profesores, por compartirme sus conocimientos durante mi formación académica y por mostrarme el camino de la ciencia y la investigación.

Y finalmente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento para poder formar parte de este programa de posgrado a través de su sistema de becas.

RESUMEN

El huauzontle (*Chenopodium berlandieri* subsp. *nuttalliae*) es una especie mexicana a la cual se le atribuyen importantes propiedades nutrimentales de manera tradicional. Asimismo, considerando que el huauzontle comparte una estrecha relación genética con una fuente de proteína vegetal de alta calidad, la quinoa; es probable que el huauzontle comparta estos atributos nutricionales. El objetivo de este estudio fue encontrar las condiciones ideales para el aislamiento de la proteína de semilla de huauzontle empleando técnicas de extracción alcalina, ultrafiltración y diafiltración con membranas, así como caracterizar las proteínas por su contenido de aminoácidos vía HPLC y las fracciones proteicas por electroforesis SDS-PAGE. Se compararon dos diferentes pesos moleculares de corte de la membrana (5 y 10 kDa) y del proceso se obtuvieron dos principales productos: el aislado de proteína precipitada (APP) y el aislado de proteína soluble (APS). El proceso de purificación de proteína con la membrana de 5 kDa tuvo mejores rendimientos y purezas proteicas. Se observó que con el uso de la membrana de 5 kDa se obtuvo un APP con una pureza cercana al 70%, así como una recuperación total de la proteína superior al 90%, mostrando de esta manera la alta eficiencia del proceso. Por otro lado, la proteína de huauzontle resultó con 5 aminoácidos esenciales con contenidos superiores a los niveles de ingesta recomendados por la FAO, destacando el alto contenido de lisina y metionina. Asimismo, en las fracciones proteicas se encontró la presencia de proteínas con pesos moleculares similares a las globulinas 7s y 11s, características del género *Chenopodium*. Se puede concluir que el uso de las técnicas de extracción alcalina y

precipitación isoeléctrica acopladas a la tecnología de ultrafiltración constituyen un proceso adecuado para el aislamiento y la purificación de las proteínas de la semilla de huauzontle. Los resultados de este proyecto pueden contribuir a la revalorización del huauzontle como una fuente alimenticia de alta calidad proteica para la población vulnerable y a despertar el interés científico por el increíble potencial nutricional que tiene esta especie endémica mexicana.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN	V
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABLAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Fuentes de proteína vegetal.....	3
2.2 Clasificación y caracterización de las proteínas vegetales	5
2.3 El género <i>Chenopodium</i>	6
2.4 Huauzontle (<i>Chenopodium berlandieri</i> subsp. <i>nuttalliae</i>).....	7
2.4.1 Origen y descubrimiento.....	7
2.4.2 Características y generalidades	8
2.4.3 Estudios reportados sobre el huauzontle	9
2.5 Relación entre quinoa y huauzontle.....	10
2.6 Quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.)	11
2.6.1 Valor nutricional proteico de la quinoa	12
2.6.2 Índices de calidad proteica en alimentos	12

2.6.3 Calidad proteica de la quinoa.....	14
2.7 Obtención de la proteína vegetal.....	16
2.7.1 Extracción alcalina.....	18
2.7.2 Precipitación isoelectrica	20
2.8 Cuantificación de proteína vegetal.....	22
2.8.1 Método de Kjeldahl.....	22
2.9 Purificación de proteína vegetal	23
2.9.1 Filtración y tecnología de membranas	23
2.9.2 Ultrafiltración.....	31
2.9.3 Diafiltración.....	32
2.10 Aislamiento de proteína vegetal.....	33
2.11 Caracterización de la proteína vegetal.....	36
2.11.1 Electroforesis.....	37
2.11.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio.....	37
2.11.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	40
3. MARCO CONCEPTUAL DE LA TESIS.....	42
3.1 Originalidad.....	42
3.2 Justificación.....	43
3.3 Hipótesis.....	44
3.4 Objetivo	44
3.4.1 Objetivo general.....	44
3.4.2 Objetivos específicos	44

3.5 Metas.....	45
4. METODOLOGÍA.....	46
4.1 Caracterización de la semilla de huauzontle	46
4.1.1 Obtención de la muestra.....	46
4.1.2 Acondicionamiento de la muestra	46
4.1.3 Análisis proximal	47
4.2 Extracción y aislamiento de la proteína de semilla de huauzontle	51
4.2.1 Evaluación del proceso de extracción alcalina y precipitación isoelectrica...51	
4.2.2 Purificación de la proteína usando membranas de ultrafiltración	55
4.2.3 Caracterización de la proteína por electroforesis en SDS-PAGE	58
4.2.4 Análisis de aminoácidos mediante HPLC	60
4.2.5 Análisis estadístico.....	60
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
5.1 Caracterización de la semilla de huauzontle	61
5.2 Evaluación del pH en el proceso de extracción alcalina	63
5.3 Evaluación del pH en el proceso de precipitación isoelectrica	66
5.4 Purificación de la proteína mediante ultrafiltración/diafiltración.....	68
5.4.1 Análisis de la pureza de las fracciones proteicas.....	70
5.4.2. Análisis de la distribución de proteína en el proceso de membranas	74
5.4.3 Análisis global del proceso	76
5.5 Caracterización de la proteína de semilla de huauzontle	78
5.5.1 Análisis de aminoácidos de la proteína de huauzontle.....	78

5.5.2 Electroforesis en SDS-PAGE de los aislados de proteína de huauzontle.....	81
6. CONCLUSIONES.....	84
7. PERSPECTIVAS.....	86
8. REFERENCIAS.....	87
9. ANEXOS	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Inflorescencias de plantas de huauzontle (<i>Chenopodium berlandieri</i> subsp. <i>nuttalliae</i>).....	8
Figura 2.	Inflorescencias de plantas de quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.).....	11
Figura 3.	Solubilización alcalina y precipitación de la proteína de quinoa.....	20
Figura 4.	Tipos de filtración por membrana de acuerdo al tamaño de las partículas separadas.....	25
Figura 5.	Representación esquemática de un sistema de membranas de filtración.....	26
Figura 6.	Métodos de filtración por membranas.....	27
Figura 7.	Diagrama de flujo para el aislamiento de proteína vegetal usando extracción alcalina y tecnologías de membranas.....	35
Figura 8.	Diagrama de flujo del procedimiento para evaluar la extractabilidad de la proteína de semilla de huauzontle.....	51
Figura 9.	Diagrama de flujo para la realización del balance de proteína de semilla de huauzontle en el proceso de extracción alcalina.....	53
Figura 10.	Diagrama de flujo del procedimiento para evaluar la precipitabilidad de la proteína de semilla de huauzontle.....	54
Figura 11.	Diagrama de flujo para la purificación de la proteína de semilla de huauzontle.....	56
Figura 12.	Curva de extractabilidad de la proteína de huauzontle en función del pH.....	63

Figura 13.	Zona alcalina de la curva de extractabilidad de la proteína de huauzontle.....	64
Figura 14.	Curva de precipitabilidad de la proteína de huauzontle en función del pH.....	66
Figura 15.	Aislados de proteína soluble: obtenido de la membrana de 5 kDa y obtenido de la membrana de 10 kDa.....	72
Figura 16.	Permeados obtenidos en el proceso de purificación con membranas de 5 kDa y 10 kDa.....	73
Figura 17.	Distribución de la proteína total de semilla de huauzontle durante el proceso de purificación con membrana de ultrafiltración de 5 kDa.....	77
Figura 18.	Perfil electroforético de los productos del experimento de purificación de proteína de semilla de huauzontle por ultrafiltración.....	81
Figura 19.	Curva de calibración de la movilidad relativa contra el logaritmo de los pesos moleculares del estándar utilizado en la electroforesis.....	82

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Proporción de las fracciones de proteína presentes en las semillas de algunas fuentes vegetales.....	6
Tabla 2.	Comparación de la composición del valor nutritivo de la semilla de quinoa con otros alimentos proteicos.....	12
Tabla 3.	Perfil de aminoácidos de la quinoa y otros granos y sus niveles recomendados por la FAO para niños	15
Tabla 4.	Propiedades de separación de los sistemas de membrana.....	24
Tabla 5.	Análisis proximal de las semillas de huauzontle comparado con datos ya reportados para huauzontle y quinoa.....	61
Tabla 6.	Balance de proteína en el experimento de extractabilidad a pH 11....	65
Tabla 7.	Balance de proteína en el experimento de precipitabilidad a pH 3.5..	68
Tabla 8.	Pureza de los aislados de proteína de semilla de huauzontle.....	70
Tabla 9.	Balance de proteína global del experimento de purificación de la proteína.....	74
Tabla 10.	Perfil de aminoácidos de la proteína de semilla de huauzontle.....	78
Tabla 11.	Perfil de aminoácidos esenciales de diferentes granos y sus niveles recomendados por la FAO para niños de 3 a 10 años.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AACC	American Association of Cereal Chemists
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APP	Aislado de proteína precipitada
APS	Aislado de proteína soluble
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FC	Factor de concentración
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
N/D	No determinado
NOM	Normas Oficiales Mexicanas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAGE	Gel de poliacrilamida
PM	Peso molecular
PMC	Peso molecular de corte
PROFECO	Procuraduría Federal del Consumidor
Rf	Movilidad relativa
SAGARPA	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
SDS	Dodecilsulfato de sodio
USDA	United States Department of Agriculture
VD	Volumen de diafiltración

1. INTRODUCCIÓN

Las proteínas son macronutrientes que al ser consumidos cumplen con funciones esenciales para el organismo, tales como proveer la estructura de los tejidos y participar en su reparación, así como la de crear anticuerpos, producir enzimas metabólicas, entre otras. Las principales fuentes de proteína son aquellas obtenidas a partir de alimentos de origen animal. Sin embargo, estas proteínas se caracterizan por tener precios elevados en el mercado, por lo que actualmente se tiene la necesidad de fuentes proteicas alternativas a las animales, como es el caso de las proteínas de origen vegetal.

Por otra parte, el huauzontle es un pseudocereal del género *Chenopodium* originario de México que guarda una relación genética muy estrecha con la quinoa, la cual actualmente se conoce como una fuente rica en proteína que ha despertado un gran interés científico y tecnológico. Sin embargo, a diferencia de la quinoa, el huauzontle ha sido poco estudiado. El huauzontle es un alimento muy consumido en el centro del país, y al cual se le atribuyen tradicionalmente muchas propiedades tanto nutricionales como médicas; sin embargo, la información científica que sustenta estas afirmaciones es escasa. A pesar de la falta de investigación científica sobre las propiedades nutrimentales y funcionales del huauzontle, es posible que este sea una fuente rica en proteína como lo es la quinoa, considerando la cercanía genética entre estas dos especies.

El uso de la tecnología de membranas de ultrafiltración ha sido utilizada con éxito para el aislamiento y la purificación de proteína vegetal de semillas de canola, mostaza y quinoa. Debido a esto, considerando que las semillas de huauzontle son potencialmente ricas en proteína, la implementación de tecnología de membranas resulta muy atractiva para el aislamiento y la purificación de dichas proteínas.

Asimismo, en este trabajo se busca vislumbrar el valor biológico de la proteína de esta planta mexicana de la cual aún se tiene muy poco conocimiento científico. Considerando esto, la caracterización de la proteína de huauzontle constituye un campo de investigación científica con un gran potencial para ser explorado.

En este estudio no solo se busca demostrar que el huauzontle es una especie vegetal rica en proteína, sino también desarrollar un método para su extracción y purificación. Se espera que los resultados de este trabajo ayuden a la valorización y utilización de una nueva fuente de proteína a partir de un producto autóctono mexicano.

2. ANTECEDENTES

2.1 Fuentes de proteína vegetal

Las proteínas son sustancias nutritivas que se encuentran en los alimentos y que, al ser consumidas, cumplen funciones esenciales para el organismo; por ejemplo, constituyen y reparan tejidos en el cuerpo (músculos, piel, sangre y huesos), crean anticuerpos, y tienen funciones metabólicas como en el caso de las enzimas, que son de gran relevancia para el mantenimiento del organismo. Las funciones que tienen las proteínas son imprescindibles para la salud del ser humano. Tradicionalmente los alimentos de origen animal han sido las principales fuentes de proteína. Sin embargo, las proteínas de origen animal por lo general tienen precios elevados en el mercado, como es el caso del huevo, el pollo, la res y el cerdo (PROFECO, 2019). Por otro lado, productos no derivados de animales pero con altos contenidos de proteína, como es el caso de la soya, no exceden los veinte pesos mexicanos por kg.

Las proteínas son importantes no solo por su relevancia como macronutriente sino también por sus propiedades funcionales tecnológicas, que han sido valoradas cada vez más en la industria de los alimentos. Asimismo, la producción de proteínas de alta calidad adquiere mayor importancia debido al aumento en la población mundial, que de los casi 1000 millones de habitantes que había en 1800 aumentó a más de 6000 millones en el año 2000. En octubre de 2011 se alcanzaron los 7000 millones, y actualmente la población se encuentra alrededor de los 7500 millones de habitantes (Census Bureau, 2020). Es por esto que la búsqueda de fuentes alternativas de

proteína ha cobrado gran interés en la actualidad a nivel mundial, como es el caso de la utilización de cereales, legumbres, algas, hojas, entre otros alimentos. Debido a esto, resulta importante el uso de proteína vegetal para producir alimentos fortificados en proteína de alta calidad, que puedan reducir o reemplazar el aporte de proteína animal en la dieta humana (Day, 2013).

La soya (*Glycine max*) es el ejemplo más importante en la industria de alimentos actual en cuanto al uso de proteínas vegetales para la fabricación de una amplia gama de productos alimenticios, sustituyendo a las proteínas de origen animal en un segmento importante del mercado. El caso de éxito de la soya ha impulsado la búsqueda de granos, legumbres o verduras con alto contenido de proteína (Asgar *et al.*, 2010).

Las semillas de amaranto (*Amaranthum*), la quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) y la chía (*Salvia hispanica* L.) son fuentes de proteína vegetal no convencionales que han sido estudiadas en los últimos años. A estas plantas se les denomina pseudocereales debido a que sus semillas se asemejan a las de los verdaderos cereales (los cuales son pastos pertenecientes a la familia de las gramíneas, a diferencia de los pseudocereales), así como por su composición (carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas, etc.). Los pseudocereales poseen una composición equilibrada de macro y micronutrientes, además de que estos componentes poseen una alta biodisponibilidad; es decir, el organismo humano es capaz de asimilar y aprovechar metabólicamente estas proteínas de forma eficiente al consumirlas (López *et al.*, 2017; Moya, 2003). Asimismo, estos productos son libres de gluten, viéndose favorecidos en el mercado, dado que garantizan una ingesta proteica adecuada libre de gluten a los consumidores con enfermedad celíaca (Alvarez-Jubete *et al.*, 2010), que actualmente en México representan entre el 1.5 y 3.5% de la población (Catassi *et al.*, 2014).

Los aislados de proteína vegetal tienen una amplia gama de aplicaciones en el mercado, como es el caso de las carnes vegetarianas, comidas especiales como el tofu, y otros productos alternativos a la proteína animal. Estos aislados son utilizados como suplementos alimenticios, o adicionados a fórmulas infantiles, bebidas, barras de proteína, entre otros. Incluso estos aislados pueden ser parte de la formulación de alimentos vegetarianos, como hamburguesas y salchichas (Ahmedna *et al.*, 1999). Otro ejemplo de aplicación innovadora de los aislados de proteína vegetal es la proteína aislada de quinoa, utilizada para la producción de películas comestibles (Abugoch *et al.*, 2011). De acuerdo con Segura-Nieto *et al.* (1999) y Gorinstein *et al.* (2002) las proteínas de amaranto, soya, alforfón y quinoa son altamente solubles y aplicables en la formulación de alimentos funcionales.

2.2 Clasificación y caracterización de las proteínas vegetales

Las proteínas vegetales de las semillas pueden clasificarse con base en diferentes criterios, tales como su función, su solubilidad diferencial, entre otros. De acuerdo con Shewry *et al.* (1999), basándose principalmente en la función proteica, las proteínas vegetales de las semillas pueden dividirse en tres grupos: proteínas de almacenamiento, proteínas protectoras y proteínas estructurales y metabólicas.

Por otro lado, Osborne (1916) clasificó por primera vez las proteínas simples en función de la solubilidad diferencial de cada fracción en disolventes acuosos y no acuosos. Esta clasificación es la más utilizada para las proteínas vegetales. La fracción de albúminas se obtiene de una suspensión acuosa, mientras que la fracción de globulinas es soluble en disoluciones salinas. La fracción soluble en alcohol constituye el grupo de las prolaminas. Por otra parte, las glutelinas constituyen la fracción más

difícil de solubilizar, y generalmente son extraíbles con álcalis débiles y ácidos o con disoluciones diluidas de detergente.

El fraccionamiento y la caracterización de los diferentes grupos de proteínas vegetales de semillas como el amaranto, la quinoa y la chía han sido reportados con anterioridad. López *et al.* (2017) reportaron el contenido de fracciones proteicas de algunas variedades de amaranto, quinoa y chía (Tabla 1). Los datos de la Tabla 1 muestran que existe gran variabilidad en las proporciones de cada fracción en las diferentes semillas estudiadas. En la tabla también puede observarse que la quinoa es rica mayoritariamente en globulinas; contrario al amaranto, que es rico en albúminas. Considerando esto, para la extracción de proteínas vegetales de semillas se pueden utilizar diferentes disolventes, sales y agentes desnaturalizantes.

Tabla1. Proporción de las fracciones de proteína presentes en las semillas de algunas fuentes vegetales (g fracción / 100 g de proteína cruda) (López *et al.*, 2017).

Variedad	Amaranto (%)		Quinoa (%)		Chía (%)	
	Azteca	Waxy	Tango	Faro	Chionacalyx	Jalisco
Albúminas	51.0	47.2	13.4	13.2	17.3	3.9
Globulinas	15.9	18.9	51.4	60.2	52.0	7.0
Prolaminas	2.0	0.7	N/D	N/D	12.7	53.8
Glutelinas	31.1	23.8	5.9	3.2	14.5	23.0

N/D: No determinado.

2.3 El género *Chenopodium*

El género *Chenopodium* pertenece a la subfamilia *Chenopodioideae*, y se ha estimado que comprende alrededor de 150 especies diferentes (Kühn, 1993). Estas especies se encuentran distribuidas principalmente en regiones templadas y subtropicales de ambos hemisferios (Aellen, 1960; Kühn, 1993; Welsh *et al.*, 2003). El género

Chenopodium incluye cultivos importantes para la cultura prehispánica de Meso y Sudamérica que se han usado por sus pobladores como alimentos por su aporte de proteínas y energía. Entre las principales especies que han usado estas culturas se encuentran el huauzontle (*Chenopodium berlandieri* subsp. *nuttalliae*), originario de México, así como la quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) y la cañahua (*Chenopodium pallidicaute*), nativas de la región Andina (Mohan *et al.*, 2013).

2.4 Huauzontle (*Chenopodium berlandieri* subsp. *nuttalliae*)

2.4.1 Origen y descubrimiento

Se sabe que los antiguos ciudadanos aztecas durante el México precolombino requerían realizar un pago tributario anual a sus gobernantes. Este pago por lo general se refería a productos de la agricultura. Uno de los tributos más representativos era el pago anual de casi 6000 metros cúbicos de un pseudocereal dicotiledón conocido como "huauthli" o "guautli", lo que en la actualidad se conoce como huauzontle. Además de ser muy valorado como fuente de alimento, este grano jugó un papel significativo en las actividades religiosas mexicanas, incluyendo su uso en el sacrificio humano ceremonial. Sin embargo, el empleo del huauzontle sufrió un drástico declive después de la conquista española (Safford, 1916).

Por otra parte, la quinoa fue descrita por el botánico alemán Carl Ludwig Willdenow en 1797 y publicado en la cuarta edición del libro *Species Plantarum*, y se le consideró como una planta única de la agricultura del Nuevo Mundo. Sin embargo, en 1916 Safford describió al huauzontle, una segunda especie doméstica de *Chenopodium* originaria de México. Después de la descripción del huauzontle, ambas plantas fueron clasificadas como pertenecientes a la misma especie debido a sus grandes similitudes morfológicas (Aellen, 1929). Se pensaba que el huauzontle podría tratarse

de un tipo de quinoa que había migrado a México prematuramente (Simmonds, 1965). Sin embargo, tiempo después, se demostró que tanto la quinoa como el huauzontle, a pesar de ser tan parecidos, son dos especies diferentes del género *Chenopodium* (Pickersgill *et al.*, 1977; Wilson *et al.*, 1979).

2.4.2 Características y generalidades

El huauzontle es una hierba anual, erecta e inodora. Sus flores pediceladas se agrupan en panículas ovoides de glomérulos; son hermafroditas y unisexuales, en su mayoría femeninas en la misma inflorescencia (Bol. Soc. Bot. México, 1993). El huauzontle es una herencia americana nativa de México parecido al cenizo (*Chenopodium album*) pero con hojas más grandes y tallos más tiernos. La palabra huauzontle se refiere también al uso tradicional de los capullos de la planta como fritura (Deppe, 2015). El huauzontle tiene un sabor ligeramente amargo y es consumido en una gran variedad de platillos mexicanos tradicionales, principalmente en el centro de país. Puede ser cocinado, capeado o sin capear en caldillo de jitomate o en mole, relleno de queso, en pay, tacos, con huevo, entre otros (Hernández-Valles, 2017).



Figura 1. Inflorescencias de plantas de huauzontle (*Chenopodium berlandieri* subsp. *nuttalliae*).

El huauzontle es un cultivo importante que sirve como fuente de alimento en zonas de alta marginación en México. El cultivo es resistente a climas fríos y secos, y puede crecer en suelos pobres. México produce 3206 toneladas anuales de huauzontle en aproximadamente 291 hectáreas, de las cuales el estado de Puebla aporta el 95% del total producido. La producción de huauzontle se da principalmente en los municipios de Atlixco, Huaquechula, Santa Isabel Cholula, Tecali de Herrera, Chiautzingo y San Jerónimo Tecuanipan, con un valor aproximado de 2 mil 800 pesos por tonelada (SAGARPA, 2016).

2.4.3 Estudios reportados sobre el huauzontle

Assad-Bustillos *et al.* (2014) caracterizaron el almidón de las semillas del huauzontle en términos de parámetros reológicos, térmicos, funcionales y fisicoquímicos. Estos autores obtuvieron un 50% de rendimiento de almidón extraído con una pureza del 72.5%. Adicionalmente, los autores reportaron los macronutrientes y las propiedades funcionales tecnológicas del huauzontle comparándolo con otros granos de interés nutricional y tecnológico (quinoa, amaranto, maíz y trigo). Cabe resaltar que el porcentaje de proteína de huauzontle asociada al almidón extraído por los autores fue del 11.4%, siendo considerablemente superior al de los demás cereales y pseudocereales reportados, los cuales tuvieron valores por debajo del 0.5%.

En otro estudio, se analizó el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante de las semillas de huauzontle germinadas, reventadas y cocidas (Martinez *et al.*, 2013). Los autores realizaron diferentes extracciones acuosas y metanólicas, y determinaron la capacidad de los extractos para eliminar radicales libres por los métodos de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS). Los autores concluyeron que el extracto acuoso mostró el mayor contenido fenólico total

(hasta 3010 µg equivalentes de ácido gálico/g de semillas secas) y la mejor respuesta antioxidante (hasta 95.41%).

Por otro lado, Lazo-Vélez *et al.* (2016) caracterizaron y cuantificaron la presencia de saponinas en semillas crudas y germinadas de huauzontle sometidas a estrés químico inducido por selenito de sodio. En el estudio, un análisis por cromatografía líquida reveló la presencia de doce saponinas, principalmente ácido oleanólico y ácido fitolaccagénico. La presencia de estas saponinas se redujo entre 90 y 96% en las semillas germinadas gracias al tratamiento realizado.

A partir de los reportes de la literatura, se puede concluir que aunque al huauzontle se le han atribuido de manera tradicional varias propiedades médicas y nutricionales, actualmente la información científica relevante es muy escasa. Considerando la cercanía genética entre el huauzontle y la quinoa (Kolano *et al.*, 2016; Wilson *et al.*, 1979), es probable que exista una similitud importante en la composición nutrimental de las semillas de ambas plantas, especialmente en relación a las proteínas y el perfil de aminoácidos presentes en ellas.

2.5 Relación entre quinoa y huauzontle

Estudios recientes relacionados con la diversidad genética del género *Chenopodium* han corroborado la estrecha relación existente entre la quinoa y el huauzontle. Mohan *et al.* (2013) reportaron mediante estudios de segregación de alelos que tanto la quinoa como el huauzontle tienen un origen tetraploide; es decir, ambas especies tienen el mismo número de juegos cromosómicos completos, por lo que provienen de las mismas especies ancestrales. De igual forma los resultados morfológicos indicaron a su vez una herencia disómica (apareamiento bivalente de cromosomas durante la profase meiótica I). Los datos filogenéticos y citogenéticos moleculares obtenidos por

Kolano *et al.* (2016) comprobaron el origen aloploiploide (más de tres juegos de cromosomas de dos o más especies ancestrales diferentes) tanto de *Chenopodium quinoa* como de *Chenopodium berlandieri*, que implica la hibridación de diploides de dos grupos genómicos diferentes, corroborando la información antes mencionada. De acuerdo a lo anterior, existe una estrecha relación genética entre la quinoa y el huauzontle, por lo que la siguiente sección describirá los aspectos científicos más relevantes de la quinoa en relación a los objetivos del presente trabajo.

2.6 Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)

La quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) es una planta distribuida ampliamente en los países andinos de Bolivia, Perú y Ecuador (Gandarillas, 1979) que fue cultivada y consumida por las civilizaciones prehispánicas hasta su reemplazo por los cereales después de la llegada de los españoles (Mujica-Sanchez *et al.*, 2001). Dada la estrecha relación existente entre las especies de huauzontle y quinoa, a continuación se expondrá la información competente a este trabajo considerando a la quinoa como la especie representativa del género *Chenopodium*.



Figura 2. Inflorescencias de plantas de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.).

2.6.1 Valor nutricional proteico de la quinoa

En la Tabla 2 se observa que la concentración de proteína en la semilla de quinoa es similar con la del huevo y el queso; e incluso superior a la leche. De manera similar, el contenido de hierro de la quinoa supera considerablemente las cantidades presentes en el resto de los alimentos mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2. Comparación de la composición del valor nutritivo de la semilla de quinoa con otros alimentos proteicos (Bojanic, 2011).

Componentes (%)	Quinoa	Carne	Huevo	Queso	Leche vacuna	Leche humana
Proteínas	13.00	30.00	14.00	18.00	3.50	1.80
Grasas	6.10	50.00	3.20		3.50	3.50
Hierro	5.20	2.20	3.20		2.50	
Calorías 100 g	350	431	200	24	60	80

2.6.2 Índices de calidad proteica en alimentos

La calidad nutricional de una proteína se determina por la proporción de los aminoácidos esenciales presentes en ella en relación a las concentraciones recomendadas por los organismos rectores de la nutrición nacional o mundial como la FAO. Los aminoácidos esenciales son aquellos que no pueden ser sintetizados por el organismo humano y por lo tanto tienen que ser ingeridos por medio de la dieta. Sin embargo, también es importante mencionar la biodisponibilidad de estos aminoácidos, lo cual se refiere a la utilidad real de un nutriente en específico. Es decir, cuánta de la proteína consumida se retiene realmente en el organismo para su empleo en el crecimiento y mantenimiento de los tejidos (Bean, 2007). Risi (1991) menciona que el balance de aminoácidos esenciales de la proteína de quinoa es

superior al del trigo, la cebada y la soya, comparándose positivamente incluso con la proteína de la leche.

El método más conocido y utilizado para evaluar la calidad de una proteína es el valor biológico (VB), pero existen algunos otros como la utilización proteica neta (UPN), la tasa de eficiencia proteica (PER) y la puntuación indispensable de aminoácidos de digestibilidad de proteínas (DIAAS).

El VB se calcula mediante el porcentaje de la relación del nitrógeno incorporado al cuerpo entre el nitrógeno absorbido en las proteínas procedentes de la dieta (Chick y Roscoe, 1926). Sin embargo, debido a que es prácticamente imposible determinar el nitrógeno incorporado al cuerpo, este se mide indirectamente mediante el análisis cuantitativo del nitrógeno excretado a través de la orina y las heces (Fixsen, 1930):

$$BV = \frac{N_i - N_{e(f)} - N_{e(u)} - N_b}{N_i - N_{e(f)}} \times 100$$

Donde N_i es el nitrógeno ingerido en las proteínas procedentes de la dieta, $N_{e(f)}$ es el nitrógeno excretado en heces, $N_{e(u)}$ es el nitrógeno excretado en orina y N_b es el nitrógeno excretado en una dieta libre de proteína.

La UPN está dada por la siguiente expresión:

$$UPN = \frac{\text{Nitrógeno absorbido y retenido por el sujeto de prueba}}{\text{Nitrógeno ingerido}}$$

Aunque esta se trata de una forma casi obsoleta para medir la calidad de la proteína. Existen métodos más actuales para esto, como lo es la DIAAS. Siendo de hecho el método preferido por la FDA (Boutrif, 1991), la cual se define como:

$$DIAAS \% = 100 \times \frac{\text{mg de aminoácido esencial en 1 g de proteína dietética}}{\text{mg del mismo aminoácido en 1 g de proteína de referencia}}$$

El PER es la relación entre el peso corporal ganado por el consumidor y los gramos de proteína ingerida:

$$PER = \frac{\text{peso corporal (g)}}{\text{proteína consumida (g)}}$$

De acuerdo con diferentes estudios realizados para evaluar la calidad de la proteína de quinoa, se han reportado valores de PER relativamente altos, que van de 2.11 a 3.32. Estos valores son comparables con los PER reportados para la caseína (2.5) (Montaño *et al.*, 2006).

2.6.3 Calidad proteica de la quinoa

Actualmente ha habido un gran interés en la quinoa a nivel mundial debido a su alto contenido de proteína (14-16%) (Föste *et al.*, 2015; Koziol, 1992; Ranhotra *et al.*, 1993; Wright *et al.*, 2002). La proteína de quinoa está formada por dos fracciones principales: las globulinas y las albúminas (Brinegar y Goundan, 1993; Brinegar y Nwokocha, 1996). La proteína de quinoa tiene un patrón equilibrado de aminoácidos esenciales y es rica en lisina (4.8 g / 100 g de proteína), treonina (3.7 g / 100 g de proteína), histidina, isoleucina y metionina (Brinegar y Goundan, 1993; Repo-Carrasco *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2002). Su alto contenido de lisina es atribuible a las albúminas y globulinas, que constituyen del 44 al 77% de la proteína total (Fairbanks *et al.*, 1990). El balance de aminoácidos de la quinoa se ha comparado con otras especies vegetales ricas en proteína como la soya, la cebada y el trigo, mostrando su superioridad sobre estos dos últimos cereales e incluso comparándose con la calidad de la soya (USDA, 2005).

La Tabla 3 muestra la cantidad recomendada de ingesta de aminoácidos esenciales para niños menores de diez años por la Organización de las Naciones Unidas para la

Alimentación y la Agricultura (FAO), y compara estos valores con el contenido de dichos aminoácidos presentes en la quinoa y otros granos de amplio consumo entre la población. En la tabla puede observarse que la quinoa sobrepasa las cantidades recomendadas de ingesta diaria para infantes, resaltando el caso particular de la lisina, que por lo general se encuentra en concentraciones bajas en los cereales (maíz, arroz, trigo). La proteína de quinoa puede suministrar alrededor del 180% de histidina, 274% de isoleucina, 338% de lisina, 212% de metionina + cisteína, 320% de fenilalanina + tirosina, 331% de treonina, 228% de triptófano y 323% de valina con respecto a los valores recomendados para la nutrición adulta de acuerdo con la FAO, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la organización ONE (Vega-Gálvez *et al.*, 2010). Toda esta información nos ayuda a inferir a que debido a la semejanza genética entre la quinoa y el huauzontle, es probable que este último también cuente con un contenido proteico importante.

Tabla 3. Perfil de aminoácidos de la quinoa y otros granos y sus niveles recomendados por la FAO para niños en g/100 g de proteína (Koziol, 1992).

Aminoácido	FAO*	Quinoa	Maíz	Arroz	Trigo
Fenilalanina	4.1	6.9	8.6	10.5	8.2
Isoleucina	3	4.9	4	4.1	4.2
Leucina	6.1	6.6	12.5	8.2	6.8
Lisina	4.8	6	2.9	3.8	2.6
Metionina	2.3	5.3	4	3.6	3.7
Treonina	2.5	3.7	3.8	3	2.8
Triptófano	0.66	0.9	0.7	1.1	1.2
Valina	4	4.5	5	6.1	4.4

*Ingesta recomendada para niños de 3 a 10 años.

2.7 Obtención de la proteína vegetal

Los aislados de proteína a partir de fuentes vegetales se obtienen mediante la solubilización de la proteína en soluciones salinas y/o en un ambiente donde el pH está muy alejado del punto isoelectrico de la proteína. Posteriormente la proteína se recupera mediante su precipitación modificando el pH hasta su punto isoelectrico (Rodrigues *et al.*, 2012).

Las proteínas son estructuras muy complejas con distintas formas, y con áreas hidrófobas e hidrófilas, que determinan su comportamiento en solución. Debido a esto, para tener éxito en la separación de proteínas es necesario considerar las características fisicoquímicas de estas moléculas. La solubilidad de la proteína depende de las propiedades de los grupos químicos que se encuentran superficialmente en la molécula, del tipo de disolvente, de la temperatura y del pH (Lewis y Gradison, 1996).

Se ha estudiado ampliamente la solubilización de la proteína de especies vegetales; principalmente de semillas oleaginosas y cereales. Cameron y Myers (1983) patentaron un método de extracción de proteína de colza en agua con agitación constante durante 10 a 60 min a una temperatura de 15 a 35 °C, obteniendo de 10 a 15% (p/v) de proteínas con respecto al material inicial. Murray y Mills (1999) extrajeron las proteínas de harinas de semillas oleaginosas con una solución de NaCl 0.5 M, a un pH de 5.3–6.2 y una temperatura entre 5 y 35 °C, con agitación constante durante 10–60 min, obteniendo aislados con un porcentaje de proteína alrededor del 45%, dependiendo de la semilla utilizada. Dentro del mismo rango de pH, temperatura y tiempos de extracción, Milanova *et al.* (2006), registraron una nueva patente para la extracción de proteínas de harina de canola mediante una solución de NaCl con una concentración de 0.15–0.6 M y una relación sólido/solución de 1–3% (p/v), obteniendo una extracción del 20% de proteína de la harina inicial. Quanhong y

Caili (2005) estudiaron la extracción de proteínas en semillas de calabaza y concluyeron que la cantidad de proteína solubilizada alcanzó un punto máximo al utilizar una relación sólido/solución de 3.31% (p/v), en una solución de NaCl 0.73 M, durante 18 min de extracción, alcanzando en dicho punto más del 78% de extracción de proteína. En un estudio similar, Pickardt *et al.* (2009) concluyeron que las mejores condiciones de extracción para la proteína de las semillas de girasol era el uso de soluciones de NaCl de hasta 2.8 M, con un pH entre 5.6 y 7.4, a temperatura ambiente, con una relación sólido/solución del 5% (p/v). Los autores reportaron eficiencias de extracción proteica entre el 76 y el 83%.

Por otra parte, la extracción de la proteína no solo puede llevarse a cabo en soluciones con pH ácidos sino también alcalinos. Bora y Ribeiro (2004) solubilizaron el 83% de las proteínas presentes en nueces de macadamia desengrasadas en una solución con pH 12. En contraste, los autores reportaron que a un pH de 2 alcanzaron solo el 53% de extracción, manteniendo la relación sólido/solución del 20% (p/v) y agitando durante 60 min a temperatura ambiente. En otro estudio, Wani *et al.* (2008), obtuvieron una extracción óptima de las proteínas de semillas de sandía, utilizando una solución de NaOH 1.2%, una relación sólido/solución de 1.4% (p/v) y un período de agitación de 15 min a una temperatura de 50 °C. Asimismo, Durmus y Evranuz (2010) extrajeron las proteínas de las semillas de pimientos rojos y determinaron que la extracción fue más eficiente cuando se empleó una solución con un pH de 8.8 que con el uso de pH ácidos. Los autores utilizaron una relación sólido/solución de 4.8% (p/v) y una temperatura de 31 °C durante 20 min.

Adicionalmente, otro método utilizado para el aislamiento de la proteína de algunos granos es la micelización (Arntfield *et al.*, 1985). Este método se basa en la capacidad de las proteínas para formar aglomerados en estructuras micelares. Para llevar a cabo

la micelización se disminuye la fuerza iónica de la disolución en la que se solubilizan las proteínas.

Cordero-De-Los-Santos *et al.* (2005) compararon el método de micelización con el método de precipitación isoelectrica para el aislamiento de una muestra de proteína de harina de amaranto desengrasada. Primeramente para la micelización se empleó una extracción con NaCl 0.8 M a 35 °C y pH 7 durante 1 h, seguido por una centrifugación. El sobrenadante se concentró por ultrafiltración. Posteriormente el sobrenadante se diluyó con agua destilada fría en una proporción 1:12 y se agitó durante 2 h a 25 °C. La proteína se recuperó por centrifugación y se liofilizó. Por otro lado, se realizó una extracción alcalina con NaOH 0.1 N a 25 °C y pH 9 durante 2 h. Posteriormente el extracto se sometió a precipitación isoelectrica a pH 4.5 para obtener el aislado de proteína, la cual se resuspendió en agua y se ajustó a pH 7 para su posterior liofilización. Los autores reportaron un menor rendimiento de proteína con el método de micelización, así como un menor grado de solubilización de esta con respecto al método que emplea extracción alcalina y precipitación isoelectrica.

2.7.1 Extracción alcalina

Un método para extraer proteína a partir de semillas es el tratamiento de la harina desengrasada con etanol o ácido diluido para solubilizar los carbohidratos presentes y liberar la fracción proteica. Este método se ha usado para la obtención de productos proteicos de soya (Chajuss, 2012), pero no ha sido reportado en quinoa, amaranto o en otros pseudocereales. Para estos últimos se han utilizado diferentes métodos como lo es la extracción alcalina.

La solubilización o extracción alcalina, seguida de la precipitación isoelectrica mediante ácido diluido, es un método clásico y comúnmente utilizado para extraer

proteínas de semillas a partir de harina desengrasada (Tzeng *et al.*, 1990; Xu y Diosady, 2002; Marnoch y Diosady, 2006; Rodrigues *et al.*, 2012). Sin embargo, es sabido que las estructuras de las proteínas son muy sensibles al uso de álcalis y ácidos. El proceso de aislamiento influye directamente en las propiedades funcionales tecnológicas de las proteínas extraídas (Valenzuela *et al.*, 2013; Martínez y Añón, 1996), por lo que el estudio de las condiciones óptimas de extracción es de gran relevancia.

Pedroche *et al.* (2004) y Ghodsvali *et al.* (2005) usaron un método similar para extraer proteínas de colza y canola, utilizando soluciones con un pH entre 9.5 y 12 y una concentración de harina en la solución de extracción de 5 a 10% (p/v). Estas condiciones son idóneas cuando el objetivo de la extracción es también reducir el contenido de fitatos de las proteínas aisladas, debido a que a un pH de 12 la solubilidad de estos compuestos es mínima. La interacción proteína-fitato depende del pH y el contenido de fitatos en términos de iones divalentes. En un pH ácido, las proteínas están cargadas positivamente, mientras que el ácido fítico tiene una carga negativa, lo que resulta en la formación de complejos de fitato-proteína. La presencia de iones de calcio en exceso favorece la disociación de este complejo. Con un pH alcalino, tanto la proteína como el ácido fítico están cargados negativamente, por lo tanto, la interacción proteína-fitato solo ocurre en presencia de iones multivalentes, formando complejos proteína-mineral-fitato. Para evitar la formación de estos complejos, es necesario eliminar estos iones utilizando agentes quelantes, como el EDTA (Tzeng *et al.*, 1990; Serraino y Thompson, 1984).

La Figura 3 muestra el comportamiento de la proteína de quinoa durante los procesos de extracción alcalina y precipitación isoelectrica para su aislamiento.

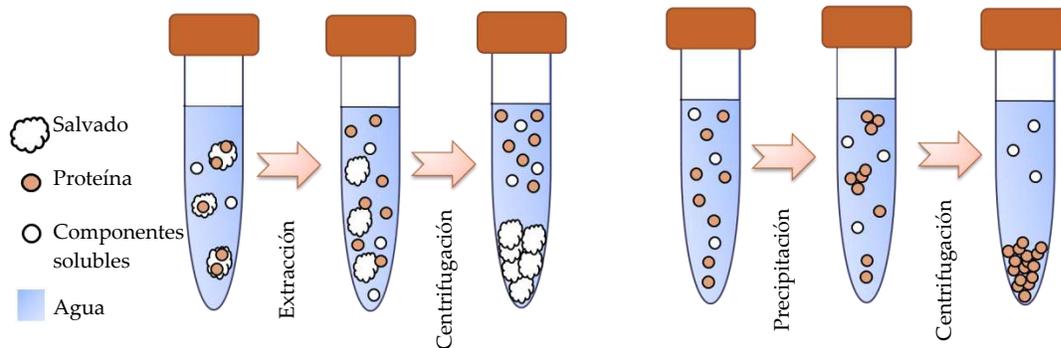


Figura 3. Solubilización alcalina y precipitación de la proteína de quinoa (Föste, 2015).

2.7.2 Precipitación isoelectrica

El punto isoelectrico de la proteína está determinado por la constitución de aminoácidos de la proteína y se refiere al valor de pH en el cual la proteína tiene una carga neta igual a cero y en el cual su solubilidad es casi nula. Si la proteína tiene un alto nivel de aminoácidos básicos (por ejemplo, lisina y arginina), su punto isoelectrico estará por encima de 7.0. Por otra parte, si su constitución de aminoácidos está compuesta predominantemente por aminoácidos con residuos ácidos (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico), su punto isoelectrico será inferior a 7.0 (Rodrigues *et al.*, 2012).

Salcedo-Chávez *et al.* (2002) llevaron a cabo la optimización del aislamiento de la proteína de amaranto. La extracción alcalina se realizó en un intervalo de pH de 7.8 a 9.2, mientras que la precipitación ácida se llevó a cabo en un intervalo de 4.3 a 5.7. Adicionalmente los autores analizaron los aislados de proteína de cada tratamiento: contenido de proteína, evaluación colorimétrica y caracterización térmica. La solubilización óptima de la proteína se logró a un pH de 8.0 a 9.2, y el pH que

permitió la mayor precipitación fue de 5.7. Por su parte, Avanza y Añón (2007) reportaron que la proteína de amaranto se solubilizó mejor en un intervalo de pH de 9 a 11, y se precipitó óptimamente a pH de 5. Asimismo, en ese trabajo se determinó que el producto proteico obtenido a pH 11 fue menos soluble que aquel obtenido a pH 9. Esto podría deberse a que el aislado que obtuvieron los autores al pH 11 estaba enriquecido con globulinas, las cuales después de un tratamiento térmico se desplegaron solo parcialmente, reduciendo su solubilidad.

Aluko y Monu (2003) aislaron la proteína de harina de quinoa usando una disolución de NaOH 0.015 M, seguida por una precipitación ácida a pH 4.5. Por otro lado, Abugoch *et al.* (2008) realizaron la extracción de la proteína de dos muestras diferentes de quinoa. La extracción de una de ellas aumentó a su vez con el aumento del pH, alcanzando la máxima extracción a un pH con valor de 11; mientras que la otra muestra evaluada tuvo un comportamiento singular, ya que alcanzó un punto máximo del porcentaje de extracción a un pH de 8 para posteriormente disminuir al aumentar el pH a 9 y 10; y finalmente volver a aumentar la extracción a un pH de 11. Este particular comportamiento se debe a que la muestra de quinoa que se utilizó cuenta con dos puntos isoeléctricos debido a su característica composición de aminoácidos. Estos autores a su vez determinaron mediante calorimetría diferencial de barrido que las proteínas de la quinoa se desnaturalizaban a pH 11, mientras que a pH 9 conservaban cierto grado de estructura. La desnaturalización de las proteínas puede ser causada por cambios de pH o temperatura, ocasionando alteraciones en sus estructuras secundarias, terciarias o cuaternarias. Adicionalmente la desnaturalización proteica provoca cambios en las propiedades físicas y funcionales de las proteínas (Monge-Nájera, 2002). Sin embargo, la desnaturalización no es un aspecto a evaluar en la presente tesis debido a que el objetivo principal se enfoca en la cuantificación, purificación y caracterización de proteína.

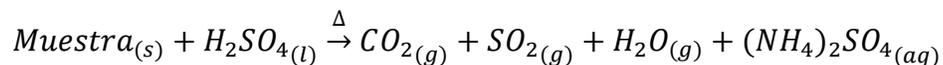
2.8 Cuantificación de proteína vegetal

Los métodos de cuantificación de proteínas se basan en ciertas características fisicoquímicas de las estructuras proteicas: capacidad de reducir algunos iones, propiedades de los enlaces peptídicos, contenido de determinados aminoácidos, etcétera (Hernández, 2010). Para la cuantificación de proteína vegetal se han empleado diferentes métodos, utilizando como referencia más común el método de Kjeldahl (Sandoval-Oliveros *et al.*, 2012).

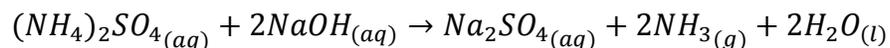
2.8.1 Método de Kjeldahl

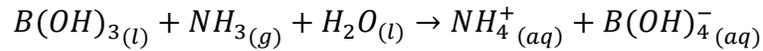
El método de Kjeldahl es un método desarrollado para la cuantificación de nitrógeno total como una forma indirecta de determinar la proteína cruda para diferentes muestras biológicas como carne, cereales y otras fuentes vegetales (Bradstreet, 1954). Esta técnica se ha empleado para determinar la proteína de varias semillas agrícolas como quinoa, arroz (*Oryza sativa*), alforfón (*Fagopyrum esculentum*), chía, maíz morado (*Zea mays* L.), amaranto, entre muchas otras (Kaul *et al.*, 2005; Nascimento *et al.*, 2014; Mota *et al.*, 2016), por lo que su implementación es aplicable para la cuantificación de proteína de semilla de huauzontle.

El método de Kjeldahl se divide básicamente en tres partes: digestión, destilación y titulación. En la etapa de digestión el nitrógeno orgánico de la muestra es convertido a amonio en presencia de un catalizador y calor.

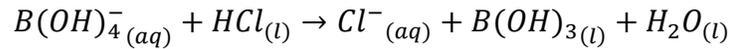


En la destilación, la muestra digerida se alcaliniza y el nitrógeno se destila como NH_3 , el cual se absorbe en una disolución de ácido bórico.





Finalmente el amonio es cuantificado con una titulación con ácido (Bradstreet, 1954; Nielsen, 2003).



Por ser un método estandarizado, y por ser el más utilizado para la cuantificación de nitrógeno total en muestras biológicas, en el presente proyecto se empleó este método a macro y microescala para la determinación de proteína cruda en las semillas de huauzontle.

2.9 Purificación de proteína vegetal

Existe una diversidad de complejas y sofisticadas técnicas y equipos para purificar proteínas, entre los cuales se destacan la filtración, la centrifugación, la cromatografía por columna y en algunos casos la electroforesis (Scopes, 2013). El uso de una técnica u otra depende en gran medida a los objetivos específicos de dicha purificación.

2.9.1 Filtración y tecnología de membranas

La filtración se define como la separación de dos o más componentes de una corriente de fluido basada principalmente en las diferencias de tamaño de los componentes separados. La tecnología de membranas se ha convertido en una de las tecnologías de separación más importantes a nivel industrial desde los años noventa y ha sido aplicada en diferentes campos, principalmente al de los alimentos (Cheryan, 1998). Aunque el término "tecnología de membranas" se refiere a varios procesos de separación con características diferentes, el principio general se basa en la permeabilidad selectiva de una membrana porosa para permitir que ciertas

sustancias penetren a través de ella, mientras que otras sean rechazadas. Existen diferentes métodos para lograr la separación que usan una o varias fuerzas impulsoras, como altas presiones transmembrana, gradientes de concentración y potenciales eléctricos o químicos. Basándose en el tamaño de la sustancia que será separada, las técnicas de separación por membranas principalmente se clasifican en microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa (Laroche *et al.*, 1995).

2.9.1.1 Condiciones de operación de filtración

La Tabla 4 resume el espectro de separación de solutos de acuerdo con su tamaño molecular para diferentes procesos de membrana. Adicionalmente, en la Figura 4 se esquematizan los diferentes tipos de filtración y los solutos en suspensión que son capaces de retener los diferentes procesos de membrana.

Tabla 4. Propiedades de separación de los sistemas de membrana (Wankat y Pozo, 2008).

Concepto	Microfiltración	Ultrafiltración	Nanofiltración	Ósmosis
Separación de materiales	Separación de partículas, bacterias	Separación de macromoléculas	Iones y moléculas	Desalinización de agua
Material de la membrana	Poliacrilamida, cerámica	Poliacrilamida, cerámica	Poliacrilamida	Triacetato de celulosa
Equipo	Placas y marcos con espiral	Fibra hueca espiral, placas y marcos	Fibra hueca espiral	Fibra hueca espiral
Principio de separación	Mecanismo de tamizado	Mecanismo de tamizado	Disolución-Difusión	Disolución-Difusión
Presión	<2 bar	2-10 bar	10-60 bar	10-100 bar
Peso molecular de corte (PMC)	<0.45 μm	5-500 kDa	100-1000 Da	50-100 Da

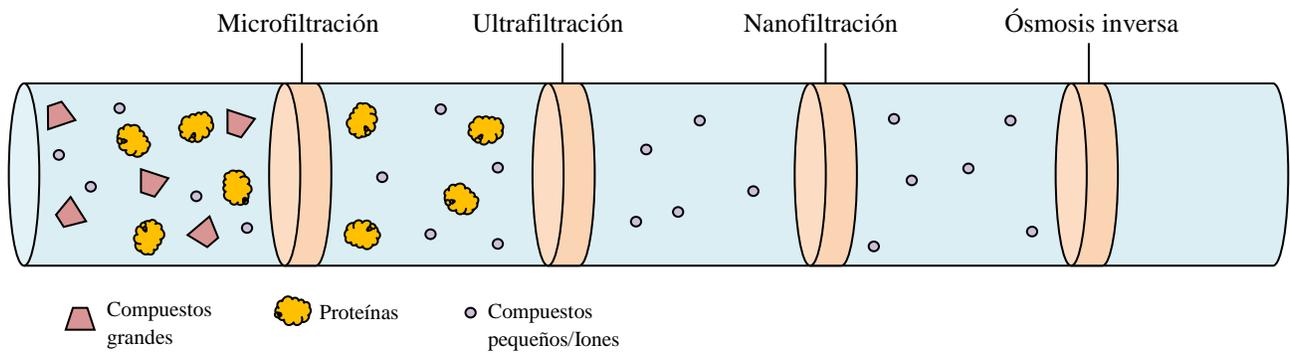


Figura 4. Tipos de filtración por membrana de acuerdo al tamaño de las partículas separadas.

La filtración por membranas se puede emplear también para separar sustancias a nivel molecular, tales como solutos disueltos en corrientes líquidas, iones en disolución acuosa e incluso para la separación de mezclas de gases (Cheryan, 1998). En los procesos de membrana más comunes se utiliza presión hidráulica como fuerza impulsora para el transporte de masa a través de la membrana. Sin embargo, la naturaleza de la membrana misma es el factor principal que controla qué componentes penetran a través de ella y cuáles son retenidos. Las membranas pueden ser fácilmente clasificadas por a) la naturaleza de la membrana (natural o sintética); b) la estructura de la membrana (simétrica o asimétrica); c) la aplicación de la membrana (separación de fases gaseosas, líquida/gaseosa, líquida/líquida, etc.); d) mecanismo de acción de la membrana (adsortiva contra difusiva, intercambio iónico, osmótica, no selectiva) (Cheryan, 1998). Las membranas también pueden ser modificadas física o químicamente para cambiar sus propiedades de permeado.

Desde sus inicios en los años 80 y 90, la tecnología de filtración por membranas ha evolucionado y cobrado un gran interés, siendo actualmente una técnica de amplio uso en procesos de separación. El principio básico que rige el funcionamiento de esta tecnología se basa en el uso de una barrera física entre dos fluidos (uno en el lado de

la alimentación y el otro en el lado del producto), lo que permite el paso de ciertos compuestos de manera selectiva. La alimentación que pasa a través de la membrana se conoce como permeado. Mientras que aquella que permanece en el mismo lado de la alimentación se nombra retenido (Figura 5). Los componentes del sistema mínimos necesarios para llevar a cabo este proceso son: una membrana, un módulo que contenga los dos fluidos, y una bomba que proporcione la diferencia de presión para lograr la separación (Mulder, 2012).

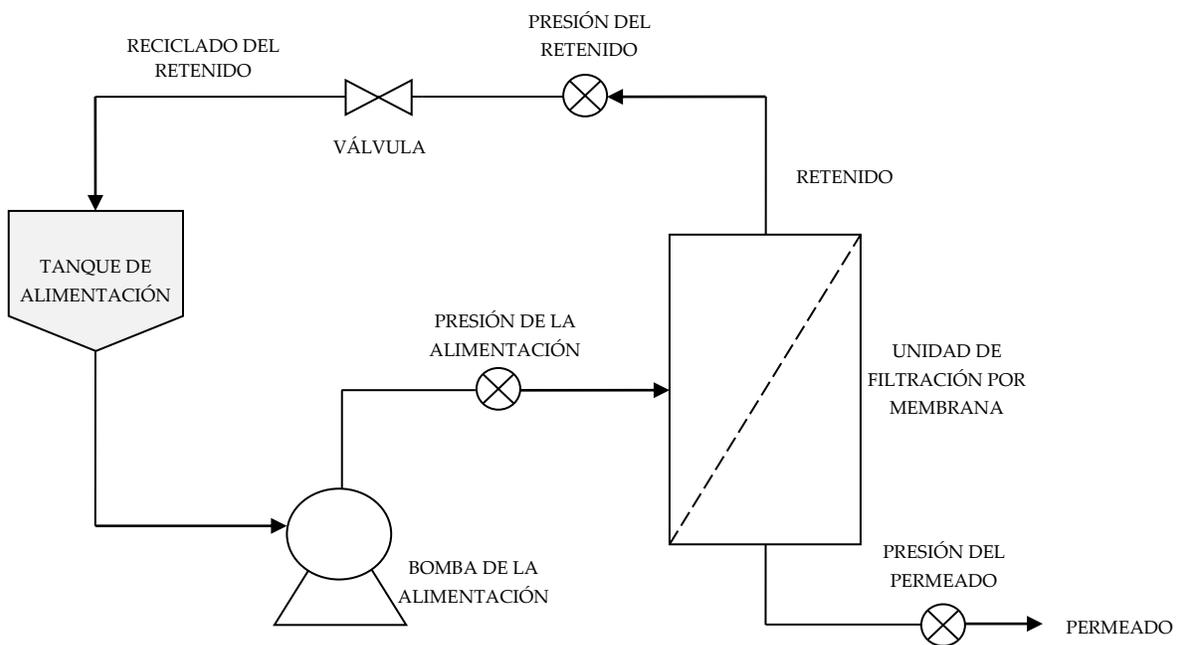


Figura 5. Representación esquemática de un sistema de membranas de filtración.

El proceso de separación por membranas puede operar de dos formas diferentes:

a) Filtración frontal (Figura 6a). El flujo pasa de forma perpendicular a través de la membrana. En este tipo de filtración se forma una película en la superficie de la membrana llamada "gel", que eventualmente tiene que ser removida, por lo que este proceso no puede ser continuo.

b) Filtración tangencial (Figura 6b). El flujo circula de forma tangencial a la membrana. La velocidad de flujo y la presión son los parámetros más importantes en este proceso. En este tipo de filtración el flujo continuo y la turbulencia ejercida en el lado activo de la membrana previenen la acumulación de materia sobre la superficie de esta. De esta manera el modo de flujo tangencial ayuda a prevenir la formación del "gel" y hace posible un proceso continuo, generalmente en modo de recirculación.

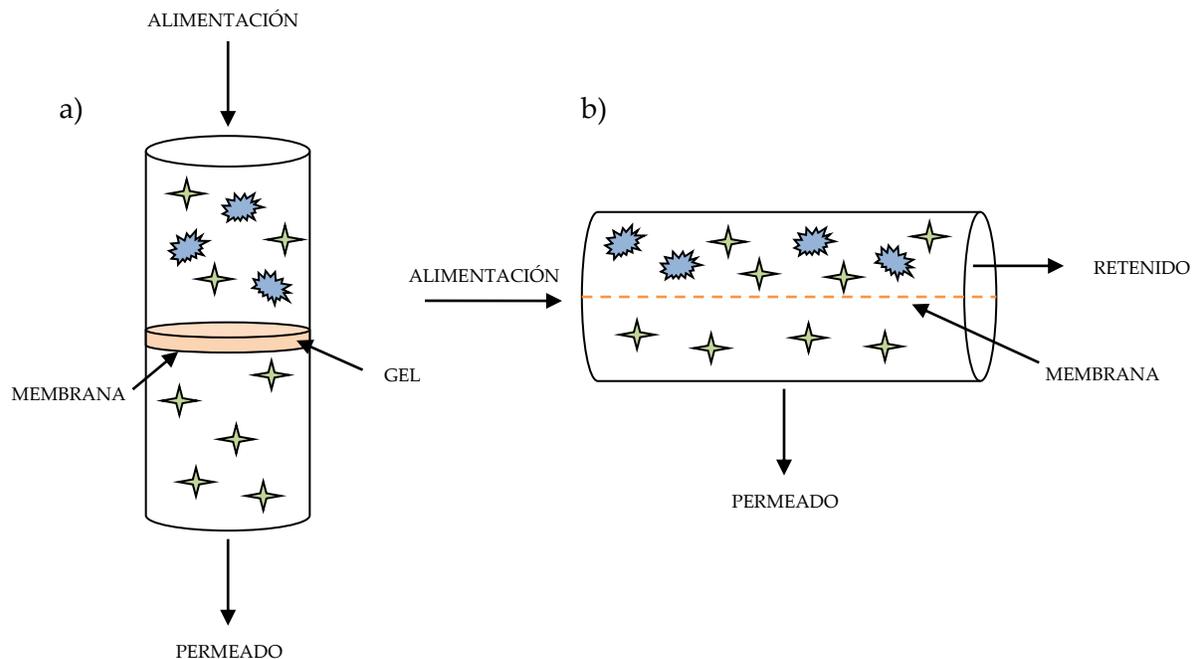


Figura 6. Métodos de filtración por membranas: a) Filtración frontal, b) Filtración tangencial.

El proceso físico de filtración por membranas se describe por ecuaciones basadas en la suposición de que la probabilidad de que una partícula pase a través de la membrana es alta ($p = 1$) para solutos con 0% de rechazo. Por el contrario, la probabilidad es nula ($p = 0$) para solutos que son completamente rechazados por la membrana. Por lo que el coeficiente de rechazo (R) se define como:

$$R = \frac{C_R - C_P}{C_R} = 1 - \frac{C_P}{C_R}$$

donde C_R es la concentración del retenido y C_P la concentración del permeado.

De acuerdo a esto, la concentración es igual en ambos lados de la membrana ($C_P = C_R$) si un soluto pasa libremente a través de esta, por lo tanto, $R = 0$. A medida que se lleva a cabo la filtración y el disolvente pasa a través de la membrana, el volumen de la alimentación se reduce. El factor de concentración del volumen está dado por:

$$CF = \frac{V_0}{V_R}$$

donde V_0 es el volumen inicial de la alimentación y V_R es el volumen del retenido después de la filtración.

2.9.1.2 Tipos de membranas y sus características

En cuanto a su aplicación los procesos de separación por membranas se han utilizado en un gran número de operaciones de ingeniería química: clarificación, concentración, intercambio de tampón, intercambio de disolvente, purificación y esterilización, entre muchas otras.

Existen diferentes tipos de membranas que pueden ser utilizadas en los procesos de filtración, siendo las membranas cerámicas y las poliméricas los grupos más representativos. Las membranas cerámicas han sido elogiadas por las propiedades ventajosas que se les han atribuido en comparación con las membranas poliméricas, algunas de las cuales incluyen: distribución del tamaño de poro relativamente estrecha y una mayor porosidad, lo que resulta en mejores características de separación y mayor flujo de permeado; mayor estabilidad mecánica permitiendo mayores presiones; mayor estabilidad química que da como resultado una vida útil

más larga; y una hidrofiliidad más alta que da como resultado altos flujos a bajas presiones (Oh *et al.*, 2007; Ciora *et al.*, 2001). Sin embargo, la información que sustenta estas afirmaciones es ambigua. Un estudio realizado por Lee *et al.* (2002) compara las distribuciones de tamaño de poro (generalmente medidas en función del rechazo fraccional de las moléculas) de un compuesto en una membrana polimérica y una membrana cerámica de TiO_2 , mostrando que ambas son muy similares. De acuerdo con Zhang *et al.* (2009), citados por Hofs *et al.* (2011), la distribución del tamaño de poro de las membranas cerámicas puede ser muy estrecha, pero lo mismo es cierto para las membranas poliméricas (Barona *et al.*, 2007).

Asimismo, la mayor estabilidad mecánica de las membranas cerámicas se puede observar a partir de las altas presiones de retrolavado (Lerch *et al.*, 2005). Sin embargo, las membranas cerámicas son mucho más frágiles y propensas a la ruptura que las membranas poliméricas. Por otra parte, se ha determinado que el ángulo de contacto con el agua y la superficie, asociado a la hidrofiliidad de las membranas, cubre un amplio rango tanto para membranas poliméricas como para membranas cerámicas, lo que dificulta determinar si las membranas cerámicas son de hecho más hidrófilas que las poliméricas (Barona *et al.*, 2007; Dobrak *et al.*, 2010).

Otro punto importante a considerar es el ensuciamiento de las membranas, que se refiere a la acumulación de material no deseado en la superficie de la membrana. Eventualmente el ensuciamiento puede provocar constricción de los poros y el bloqueo de estos, impidiendo el proceso de separación (Li y Chase, 2010). Mueller *et al.* (2008) compararon el ensuciamiento de una membrana cerámica (capa superior de TiO_2 , soporte de Al_2O_3) con la de una membrana polimérica (polietersulfona), ambas operadas en las mismas condiciones. El ensuciamiento se determinó mediante cromatografía y fluorescencia. Los resultados de la cromatografía muestran que las membranas cerámicas presentaron una menor acumulación de materia orgánica

indeseable en la superficie de la membrana cerámica. Sin embargo se requiere una mayor investigación sobre los mecanismos de ensuciamiento de las membranas para determinar si las membranas poliméricas producen incrustaciones irreversibles o no. Por otro lado, los resultados de la fluorescencia indicaron que la membrana cerámica presentó mayor acumulación de sustancias húmicas que la membrana polimérica. Por lo que las membranas cerámicas no están exentas de problemas de ensuciamiento.

El uso de nuevas técnicas como lo es la tecnología de filtración por membranas ha cobrado recientemente un gran interés en el área científica e industrial, para la concentración, purificación, clarificación y desmineralización de alimentos (Fellows, 2009). Esta tecnología ha sido empleada para la separación de diferentes componentes de origen natural como las semillas de canola, mostaza y quinoa (Tzeng *et al.*, 1990; Marnoch y Diosady, 2006; Navarro-Lisboa, 2017). Esto se debe a las grandes ventajas que esta tecnología proporciona, como la alta eficiencia, el bajo consumo de energía y la simplicidad del equipo. Considerando lo anterior las tecnologías de membranas se usan ampliamente como tratamiento primario o como parte del refinamiento para la obtención de compuestos de interés de alto valor agregado, como es el caso de las proteínas y otros productos naturales a partir fuentes vegetales como plantas, hojas, tallos, flores y semillas (Jing *et al.*, 2010).

2.9.2 Ultrafiltración

La ultrafiltración es un tipo de filtración que sirve para retener moléculas grandes y permear moléculas pequeñas en un intervalo de peso molecular de corte (PMC) de 5 a 500 kDa (Cheryan, 1998). La tecnología de membranas de ultrafiltración es comúnmente empleada para separar componentes de alto peso molecular, como proteínas, polisacáridos, y sólidos en suspensión (Palazolo *et al.*, 2003; Wagner, 2001). Los procesos de ultrafiltración con membranas se caracterizan por su capacidad para alcanzar altas purezas, así como por su menor costo energético. Adicionalmente estos procesos no requieren el uso de aditivos, funcionan bajo condiciones de operación suaves, tienen una alta eficiencia de separación y son fácilmente escalables. A pesar de estas características positivas, una desventaja de esta tecnología es la reducción del flujo por el ensuciamiento de la membrana. Sin embargo se han desarrollado algunas estrategias para prevenir este inconveniente y aumentar la eficiencia de las membranas (Nyström *et al.*, 1995), por ejemplo, comprendiendo y analizando las cargas de los solutos presentes en la sustancia, modificando el pH, adicionando NaCl o vainillina, la cual puede absorberse en la membrana y aumentar el flujo si esta está cargada, entre otras.

Debido a todas las ventajas que presenta, la ultrafiltración ha sido ampliamente utilizada en el área de tecnología de alimentos. Navarro-Lisboa *et al.* (2017) recientemente realizaron experimentos para el fraccionamiento de la proteína de quinoa empleando ultrafiltración con membranas cerámicas. Los autores evaluaron dos diferentes condiciones de ultrafiltración para purificar las fracciones de proteína: un ensayo se realizó a un pH de 7.0 durante 600 min, mientras que el segundo se realizó a un pH de 9.5 durante 300 min (valores de pH por arriba del punto isoelectrico de los extractos de proteína de quinoa). Los autores reportaron un mayor rendimiento de extractabilidad en el concentrado de proteína a pH 9.5 (10.4 ± 0.2

mg/mL) en comparación con el proceso realizado a pH 7.0, en el que solo obtuvieron 7.7 ± 0.1 mg/mL de proteína recuperada. Por otra parte, ambos extractos se sometieron al proceso de ultrafiltración con un factor de concentración (FC) de 3. Una vez obtenidos los extractos concentrados por ultrafiltración se determinó, analizando el potencial zeta y la composición de aminoácidos, que se dañó más la estructura de las proteínas del extracto obtenido a pH 7.0 en comparación con el obtenido a pH 9.5, por lo que el uso de pH alcalinos podría proteger más la estructura de las proteínas durante el proceso de ultrafiltración.

En otro estudio, Das *et al.* (2016) utilizaron membranas de micro, ultra y nanofiltración para recuperar las proteínas y la lactosa del suero lácteo. La microfiltración se usó para ayudar a eliminar las partículas de grasa y la caseína disuelta, y con esto disminuir el grado de ensuciamiento de la membrana. Mientras que en la ultrafiltración se recuperó la fracción de proteínas. Los autores reportan una recuperación de lactosa del 90% y una recuperación de proteína del 80% con respecto a la muestra inicial.

2.9.3 Diafiltración

La diafiltración es el proceso de lavado de especies disueltas a través de una membrana para mejorar la recuperación del material en el permeado, o para incrementar la pureza de la corriente retenida (Scott y Hughes, 2012). Para la realización de esta operación, al proceso normal de concentración por ultrafiltración se le adiciona agua en la alimentación de manera continua o intermitente; cuyo objetivo es eliminar componentes de bajo peso molecular del retenido, ya sean aniones, cationes, azúcares, alcoholes o compuestos antinutricios. Por lo tanto, este modo de operación del proceso de filtración por membranas ofrece una buena

alternativa a otros procesos de separación convencionales como son el intercambio de iones, la electrodiálisis y la diálisis (Grandison, 1996).

En la actualidad se han combinado las técnicas de ultrafiltración y diafiltración para separar proteínas individuales de diferentes tipos de muestras, incluidas muestras vegetales, para producir fracciones razonablemente puras y con factores de concentración considerables. Esto es posible siempre y cuando los pesos moleculares de las proteínas estén bien distribuidos y las membranas tengan una distribución de tamaño de poro estrecho en relación al tamaño nominal de poro (Tzeng *et al.*, 1990; Xu y Diosady, 1994; Marnoch y Diosady, 2006).

2.10 Aislamiento de proteína vegetal

Las técnicas clásicas de extracción alcalina y precipitación isoeléctrica pueden ser utilizadas para la separación de proteínas a partir de materiales sólidos. Sin embargo, durante estos procesos se crean compuestos antinutricios que reducen considerablemente la pureza de los aislados de proteína. Es por esto que el uso de los procesos de ultrafiltración y diafiltración pueden implementarse en el proceso de extracción clásica de proteínas para aumentar la pureza de los aislados. Este procedimiento ha sido reportado por Ghodsvali *et al.* (2005), quienes obtuvieron dos aislados de canola ricos en proteína y bajos en fitatos; siendo estos últimos compuestos antinutricios que dificultan la biodisponibilidad de los aminoácidos y del fósforo, y que pueden generar colores oscuros a los aislados de proteína; así como sabores astringentes desagradables (Marnoch y Diosady, 2006).

En el grupo del Dr. Levente L. Diosady, del Departamento de Ingeniería Química y Química Aplicada de la Universidad de Toronto, se desarrolló un método de aislamiento de proteína utilizando tecnologías de membranas. Originalmente el

proceso se desarrolló para la extracción y purificación de proteínas a partir de semillas de canola. El proceso consiste en cinco principales etapas: extracción alcalina, precipitación isoelectrica, diafiltración, ultrafiltración y secado. Los pasos concernientes al uso de membranas sirven para concentrar y purificar la proteína soluble presente en el extracto una vez realizada la extracción alcalina (Tzeng *et al.*, 1990). Más adelante, este procedimiento fue modificado para aislar la proteína de una especie de canola china con una pureza del 90 al 100% (Xu y Diosady, 1994). Posteriormente, el proceso fue aplicado a semillas de mostaza (Marnoch y Diosady, 2006), obteniendo concentraciones de proteína mayores al 85% y niveles indetectables de glucosinolatos y fitatos.

El método general de extracción mencionado se describe en la Figura 7. Se parte de una extracción alcalina a un pH de 10 a 12 para una posterior separación del sobrenadante por medio de centrifugación; obteniendo por un lado el extracto y por el otro el residuo sólido. Posteriormente por medio de ultrafiltración y diafiltración se concentra y purifica la proteína, y finalmente se realiza la precipitación isoelectrica a pH 5 para obtener los productos proteicos finales. Después de la centrifugación final del extracto, se obtienen dos fracciones proteicas: el aislado de proteína precipitada (APP) y el aislado de proteína soluble (APS), así como el residuo sólido. El APP se refiere a los sólidos precipitados obtenidos después de la precipitación isoelectrica, los cuales son lavados y centrifugados. Mientras que el APS se recupera aplicando una segunda etapa de ultrafiltración y diafiltración a la matriz líquida resultante después de separar el APP. Los productos finales son obtenidos por medio de liofilización de los concentrados de proteína. El grupo de investigación del Dr. Diosady ha implementado y adaptado este método de purificación de proteína vegetal en diferentes semillas desde hace más de una década (Xu y Diosady, 2002; Xu *et al.*, 2003; Prapakornwiriya y Diosady, 2008).

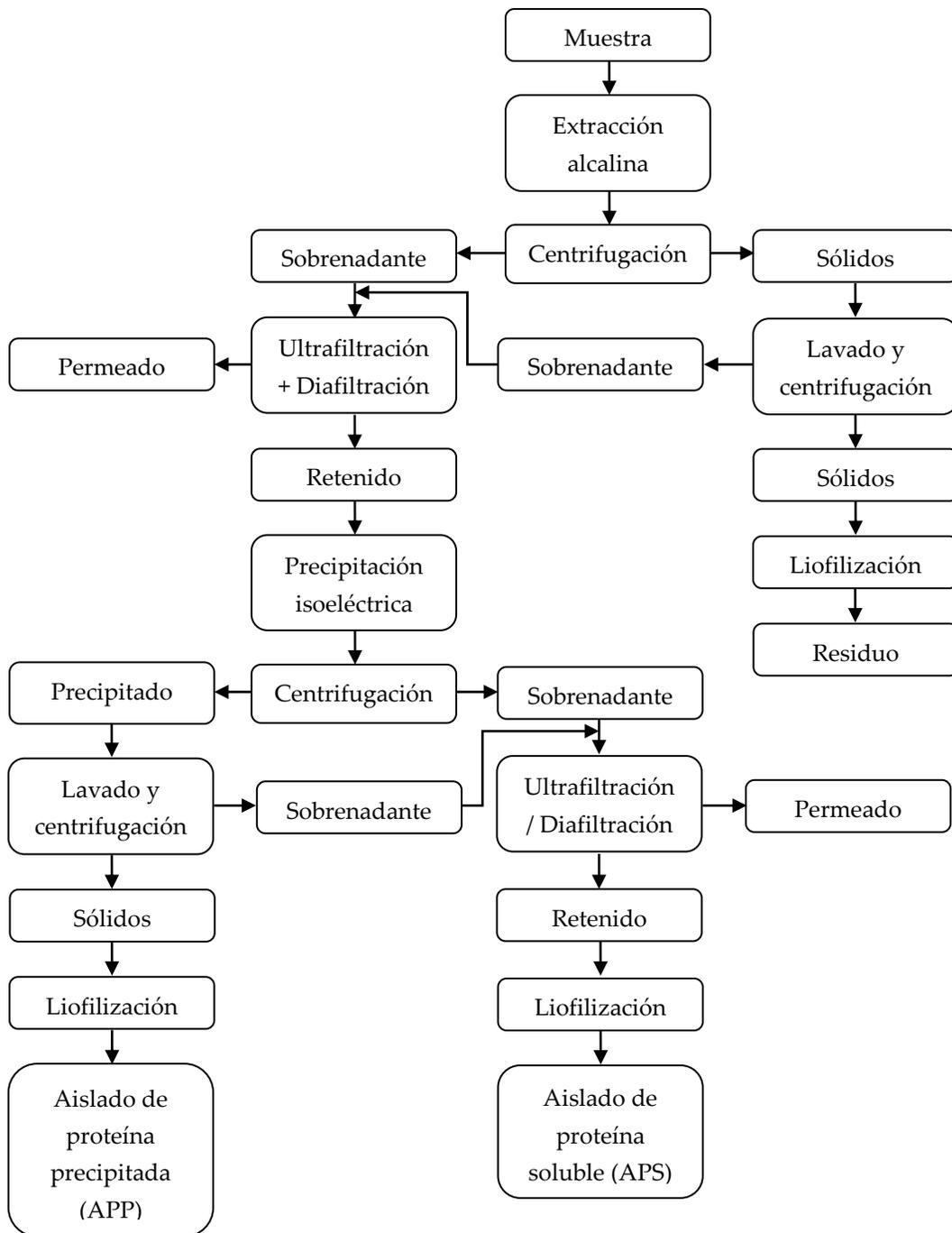


Figura 7. Diagrama de flujo para el aislamiento de proteína vegetal usando extracción alcalina y tecnologías de membranas (Marnoch y Diosady, 2006).

Dendukuri y Diosady (2003) reportaron la evaluación del proceso de extracción de proteína de una muestra de mostaza descascarillada utilizando dos diferentes

procesos de membranas: microfiltración con un tamaño de microporo de 0.1, 0.45 y 0.64 μm para separar partículas de grasa y proteína disuelta; y ultrafiltración con un PMC de 10 kDa para concentrar y purificar la proteína, empleando membranas de fluoruro de polivinilo, polisulfona y cerámica. Los autores obtuvieron purezas superiores al 90% para ambos aislados de proteína (APP y APS). Los aislados proteicos obtenidos contenían bajas concentraciones de glucosinolatos y compuestos fenólicos a niveles indetectables.

Marnoch y Diosady (2006) también trabajaron en la separación de proteínas de semillas de mostaza usando ultrafiltración y diafiltración, empleando una membrana de celulosa con un PMC de 5 kDa. Los autores reportaron una recuperación del 81% de la proteína inicial. El APP obtenido por estos autores contó con una pureza del 96%, mientras que el APS tuvo una pureza del 72%. En un trabajo similar, Xu *et al.* (2003) utilizaron este método para purificar proteínas de harina de mostaza amarilla, reportando purezas del 89 y 98% para el APP y el APS, respectivamente.

2.11 Caracterización de la proteína vegetal

Existe una amplia gama de técnicas que pueden utilizarse para caracterizar fracciones proteicas dependiendo del nivel de análisis que se busca o las características específicas que se desea evaluar. Técnicas espectrométricas como el infrarrojo son útiles para elucidar la estructura secundaria de las proteínas (Kong y Yu, 2007). Mientras que algunas técnicas de análisis utilizadas para conocer los pesos moleculares de las proteínas son la cromatografía de exclusión molecular (Hong *et al.*, 2012) y la espectrometría de masas (Domon y Aebersold, 2006). Sin embargo, las técnicas generalmente más empleadas para la caracterización de fracciones de proteína vegetal son a partir de ensayos colorimétricos como ácido bicinónico

(Segura-Nieto *et al.*, 1992) y electroforesis para elucidar los pesos moleculares de las proteínas con relativa facilidad (Barba de la Rosa *et al.*, 1992; Thanapornpoonpong *et al.*, 2008). Por otra parte, existen técnicas más sofisticadas como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) (Unger *et al.*, 2000) que sirven para cuantificar y elucidar los aminoácidos de las proteínas.

2.11.1 Electroforesis

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas contenidas en una mezcla líquida mediante la aplicación de un campo eléctrico. Las moléculas disueltas se desplazan o migran debido a este campo a una velocidad determinada por su relación masa-carga. Es debido a esto que en caso de que dos moléculas tengan la misma masa y forma, aquella con mayor carga neta se desplazará más rápido hacia un electrodo (Lodish, 2005). Por lo que a su vez puede aprovecharse este mecanismo de acción para cuantificar los pesos moleculares en moléculas con cargas, como es el caso de las proteínas.

2.11.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

Una de las técnicas de electroforesis más empleadas para la caracterización de proteínas es aquella realizada en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). La cual es aplicada a moléculas como proteínas y ácidos nucleicos, ya que estas tienen relaciones masa-carga casi idénticas, lo que dificulta la separación mediante electroforesis convencional en matriz líquida. Por otro lado, estas macromoléculas, en especial las proteínas, tienen diferentes tamaños y formas, por lo que se pueden emplear geles para lograr separaciones en matrices semisólidas, como el gel de poliacrilamida (PAGE). La velocidad a la cual una

proteína se mueve a través del gel dependerá del tamaño del poro del gel y de la fuerza del campo eléctrico. Mediante el ajuste apropiado de los parámetros del proceso, es posible separar proteínas de tamaños muy variables. La técnica más poderosa para separar proteínas involucra la exposición al detergente iónico dodecilsulfato de sodio (SDS) antes y durante la electroforesis. El SDS desnatura las proteínas, haciendo que las proteínas multiméricas se disocien en sus unidades monoméricas, y de esta manera las cadenas polipeptídicas son forzadas a adoptar conformaciones extendidas, con relaciones masa-carga similares. De esta forma el tratamiento con SDS elimina el efecto de las diferencias de forma, por lo que la longitud de la cadena, que involucra indirectamente su masa, es el único factor determinante en la velocidad de migración de las proteínas. Con esta técnica se pueden separar cadenas proteicas cuyo peso molecular difiere incluso en menos del 10%. Adicionalmente, es posible estimar el peso molecular de las proteínas comparando la distancia recorrida en el gel con estándares de peso molecular conocido (Lodish, 2005).

Fairbanks *et al.* (1990) caracterizaron las proteínas contenidas en semillas de quinoa de acuerdo a su solubilidad. La fracción de albúmina se obtuvo por dispersión de la muestra en agua, mientras que las globulinas se extrajeron usando una solución de NaCl 0.5 M. La extracción de la fracción de prolaminas resultó de la suspensión en una disolución de la muestra que contenía 95% de etanol y 0.6% de 2-mercaptoetanol. Para extraer la fracción de glutelinas se utilizó una disolución tampón de reducción desnaturante (0.0625 M Tris pH 8.1 conteniendo 2% de dodecilsulfato de sodio y 5% de 2-mercaptoetanol). A partir de este estudio, empleando la técnica de electroforesis en SDS-PAGE, los autores concluyeron que la mayoría de las proteínas de la quinoa pueden clasificarse como albúminas y globulinas. Para la fracción de albúmina, el perfil electroforético mostró 21 bandas correspondientes a pesos

moleculares inferiores a 20 kDa. La fracción de globulina estuvo compuesta por ocho polipéptidos: tres de ellos correspondieron a pesos moleculares cercanos a 36 kDa, dos eran cercanos a 29 kDa y tres estaban alrededor de 25 kDa. La fracción de prolaminas no mostró bandas y la fracción de glutelinas mostró bandas que correspondieron a fracciones de albúmina y globulina, lo que parece indicar que esta fracción estaba compuesta por polipéptidos de tipo albúmina y globulina con cierto grado de insolubilidad.

Por otro lado, Mäkinen *et al.* (2016) reportaron que la fracción de globulina de la quinoa, también analizada con SDS-PAGE, está constituida por diez polipéptidos con pesos moleculares que van de 20 a 50 kDa. La obtención de los aislados proteicos se llevó a cabo mediante una extracción alcalina a pH 10.5, seguida de una precipitación isoeléctrica y una posterior liofilización. Asimismo, Bhargava *et al.* (2005) evaluaron las proteínas de cuarenta especies diferentes de *Chenopodium*, cultivadas y silvestres, incluyendo al huauzontle, empleando SDS-PAGE. Los autores determinaron que el huauzontle fue la especie que más bandas presentó durante la electroforesis, con alrededor de treinta. Asimismo los autores determinaron que ocho accesiones de quinoa mostraron hasta un 64.5% de similitudes genéticas con el huauzontle, basado en la matriz de similitud de proteínas de acuerdo con el análisis de las bandas presentadas por las muestras analizadas; lo que demuestra cómo ambas especies se encuentran estrechamente relacionadas. Sin embargo, en el estudio se analiza únicamente la comparación entre los perfiles electroforéticos de cuarenta especies de *Chenopodium*, incluido el huauzontle, pero no se realiza la elucidación de los tipos de proteínas que se encuentran presentes en estas especies. Por lo que aún hace falta información que podría ayudar a comprobar dicha similitud genética entre el huauzontle y la quinoa.

Todo lo anterior permite considerar la electroforesis en SDS-PAGE como una técnica viable para caracterizar los pesos moleculares de las principales fracciones de proteína de semilla de huauzontle, ya que se trata de una técnica ampliamente utilizada, y con relativa facilidad, para proteínas vegetales en diferentes estudios.

2.11.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

En la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), una muestra líquida, o una muestra sólida disuelta adecuadamente, se transporta a través de una columna cromatográfica mediante una fase móvil líquida. La columna cromatográfica separará la muestra de acuerdo a las interacciones soluto/fase estacionaria, entre las cuales se encuentran la adsorción líquido/sólido, la partición líquido/líquido, el intercambio iónico y la exclusión por tamaño. Sin embargo, en cada caso la instrumentación básica es esencialmente la misma: reservorio de la fase móvil, válvula dosificadora del disolvente, bomba, amortiguador de impulso, inyector, columna de seguridad, columna cromatográfica y detector (Harvey, 2000).

La técnica de HPLC ha sido ampliamente utilizada para el análisis de aminoácidos de especies vegetales. Mota *et al.* (2016) investigaron el contenido proteico y el perfil de aminoácidos de diferentes pseudocereales como el amaranto, la quinoa y el alforfón. Estos investigadores determinaron que todas sus muestras contuvieron un alto porcentaje de aminoácidos aromáticos como la tirosina y la fenilalanina, siendo esta última uno de los aminoácidos esenciales. Sobresaliendo entre las muestras la quinoa y el alforfón, conteniendo 791.2 mg y 862.1 mg de fenilalanina por cada 100 g de muestra. Asimismo, sobresale el contenido de lisina y leucina, otros dos aminoácidos esenciales, en todas las muestras de pseudocereales siendo los valores iguales o superiores a la base de datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

(USDA). Siendo la quinoa superior al resto de los pseudocereales con un contenido superior a los 700 mg de lisina y los 1000 mg de leucina por cada 100 g de muestra. Es por lo anterior que la técnica de HPLC es una excelente herramienta para elucidar el perfil de aminoácidos de muestras vegetales con una alta sensibilidad, como en el caso de los pseudocereales, por lo que su uso es una opción viable para el análisis del huauzontle.

3. MARCO CONCEPTUAL DE LA TESIS

3.1 Originalidad

El huauzontle (*Chenopodium berlandieri* subsp. *nuttalliae*) es un cultivo autóctono de México que hasta el momento ha sido poco estudiado de manera científica. Esta planta se cita en repetidas ocasiones en la literatura científica como un elemento importante dentro del género *Chenopodium*; sin embargo, prácticamente no existe información sobre la obtención y caracterización de su proteína, su valor nutrimental, ni ningún otro aspecto importante sobre su actividad biológica.

El huauzontle es un alimento mexicano consumido desde hace cientos de años, principalmente en el centro del país, cuyas propiedades benéficas solo se conocen gracias al uso tradicional de la planta sin ningún estudio que soporte estas afirmaciones. Debido a la carencia de investigaciones científicas realizadas sobre esta planta, es natural que hasta el momento no se hayan abordado en la literatura científica métodos modernos para aislar y purificar las proteínas de dicha planta, como es el caso del uso de la tecnología de ultrafiltración.

Considerando lo anterior y que la presente investigación tiene como objetivo la obtención, purificación y caracterización de la proteína de la semilla de huauzontle, algo que hasta el momento no se ha realizado para esta especie vegetal, se puede afirmar que el presente trabajo tiene un alto grado de originalidad.

3.2 Justificación

A partir de la investigación bibliográfica realizada pudo apreciarse que existe poca investigación científica relacionada a la proteína de la semilla del huauzontle. Por otro lado, en contraste, la proteína de la semilla de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) ha sido ampliamente estudiada en la literatura científica reciente. En estos estudios se ha demostrado la calidad de la proteína de quinoa que incluso llevó a la FAO a proponer en el 2013 el consumo de quinoa como un alimento básico y fuente de proteínas de alta calidad para las poblaciones de los países en vías de desarrollo (especialmente para los niños), decretando el año 2013 como el "Año internacional de la quinoa".

Considerando la estrecha relación genética que existe entre las plantas de la quinoa y el huauzontle (*Chenopodium berlandieri* subsp. *nuttalliae*), es posible que las semillas de esta última estén constituidas por una fracción importante de proteínas, como en el caso de las semillas de quinoa, que contienen entre 10 y 14% en base seca. Por lo anterior, en este trabajo se propuso aislar y caracterizar las proteínas de la semilla de huauzontle. Este trabajo pretende, por un lado, incrementar el conocimiento científico de esta planta autóctona mexicana que prácticamente no ha sido estudiada ni valorada, y por otro, evaluar la factibilidad de la aplicación del proceso de extracción asistido por membranas como una posible alternativa para el aprovechamiento de la proteína vegetal del huauzontle. A partir de este estudio, se espera que el uso de tecnologías para la obtención de aislados de proteína de alta pureza, sirva como cimiento para futuras investigaciones enfocadas en la creación de alimentos ricos en proteínas dirigidos a la población vulnerable, especialmente a la población infantil.

3.3 Hipótesis

Considerando la cercanía genética entre las especies de huauzontle (*Chenopodium berlandieri* subsp. *nuttalliae*) y quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), la semilla de huauzontle contiene una fracción de proteínas similar a la semilla de quinoa, la cual puede ser aislada y purificada empleando métodos químicos y tecnologías de ultrafiltración. Asimismo, dicha proteína de huauzontle tiene un buen balance de aminoácidos esenciales, pudiendo considerarse una fuente alternativa viable de proteína de buena calidad.

3.4 Objetivo

3.4.1 Objetivo general

Purificar las proteínas de la semilla del huauzontle (*Chenopodium berlandieri* subsp. *nuttalliae*) empleando extracción alcalina, precipitación isoelectrica y membranas de ultrafiltración; y caracterizarlas mediante HPLC y electroforesis en SDS-PAGE.

3.4.2 Objetivos específicos

1. Realizar el análisis proximal de semilla de huauzontle por métodos estandarizados.
2. Construir las curvas de extractabilidad y precipitabilidad de la proteína de semilla de huauzontle.
3. Purificar la proteína de semilla de huauzontle empleando ultrafiltración y diafiltración.
4. Caracterizar la proteína de semilla de huauzontle por HPLC y por electroforesis en SDS-PAGE.

3.5 Metas

Las metas para cada uno de los objetivos específicos se desglosan a continuación:

Para el Objetivo Específico 1

1.1 Utilizar los métodos estandarizados para la determinación de humedad, proteína cruda, grasa cruda, cenizas totales y fibra cruda de la muestra.

Para el Objetivo Específico 2

2.1 Realizar ensayos de extractabilidad de la proteína de semilla de huauzontle en un intervalo de pH de 2 a 12.

2.2 Realizar ensayos de precipitabilidad de la proteína de semilla de huauzontle en un intervalo de pH de 2 a 5.

2.3 Realizar balances de proteína para las pruebas de extractabilidad y de precipitabilidad.

2.4 Determinar el pH ideal para llevar a cabo la extracción alcalina.

2.5 Determinar el pH ideal para llevar a cabo la precipitación isoelectrica.

Para el Objetivo Específico 3

3.1 Determinar el mejor peso molecular de corte para el sistema de purificación con membranas de ultrafiltración para el caso específico de la proteína de semilla de huauzontle.

Para el Objetivo Específico 4

4.1 Determinar mediante electroforesis en SDS-PAGE los pesos moleculares de las proteínas presentes en los aislados obtenidos en la purificación.

4. METODOLOGÍA

4.1 Caracterización de la semilla de huauzontle

4.1.1 Obtención de la muestra

La muestra de huauzontle fue obtenida de la empresa *La Semillería*, ubicada en el estado de Querétaro, México, en agosto de 2017.

4.1.2 Acondicionamiento de la muestra

La muestra vegetal se acondicionó como se describe a continuación para realizar las pruebas de extractabilidad, precipitabilidad y purificación. Para cada tratamiento se realizaron dos réplicas y los resultados obtenidos fueron expresados como la media de las réplicas \pm su desviación estándar.

4.1.2.1 Secado y reducción de partícula

Los granos de huauzontle fueron secados a 65 °C por 12 h y molidos por medio de un molino ciclónico Cyclotec™ 1093 (FOSS, España), el cual a la salida está provisto de un tamiz No. 20 (apertura de malla de 500 μ m). La muestra fue resguardada en refrigeración hasta su posterior uso.

4.1.2.2 Desengrasado de la muestra

Lotes de 10 g de harina de huauzontle se sometieron a una extracción con hexano por 6 h usando un extractor Soxhlet y una posterior desolvatación en una campana de extracción de humos durante la noche. Finalmente los diferentes lotes desengrasados fueron mezclados en un único lote que se utilizó para realizar los estudios definidos en el proyecto.

4.1.3 Análisis proximal

4.1.3.1 Humedad

La humedad fue determinada utilizando el método 925.5 de la AOAC (2000). Un gramo de harina de huauzontle se colocó en un crisol seco y previamente pesado, posteriormente fue introducido en una estufa de secado a 105 °C por 24 h. Finalmente el crisol se atemperó en un desecador por 20 min para su posterior pesado. La humedad se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{W_h - W_s}{W_h - W_v}$$

donde W_h es el peso del crisol con la muestra húmeda, W_s es el peso del crisol con la muestra seca y W_v es el peso del crisol vacío.

4.1.3.2 Contenido de cenizas totales

Las cenizas totales fueron determinadas por el método gravimétrico de la AOAC 923.03 (2000). Un crisol fue puesto a peso constante en una estufa de secado a 125 °C por 5 h. Posteriormente se dejó enfriar hasta temperatura ambiente en un desecador. La masa del crisol fue medida en una balanza analítica.

Se colocó 2 g de harina de huauzontle seca en un crisol previamente ajustado a peso constante. Seguido de esto, la muestra fue carbonizada en una parrilla de calentamiento hasta que dejó de emitir humos (aproximadamente 1 h). El crisol con los restos carbonizados se colocó en una mufla a 550 °C por 24 h aproximadamente. Finalmente el crisol fue puesto en una estufa de secado a 105 °C por 20 min para su posterior pesado. El contenido de cenizas totales fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de cenizas totales} = \frac{C - B}{B - A} \times 100$$

donde A es el peso del crisol vacío, B es el peso del crisol con la muestra seca y C es el peso del crisol con la muestra calcinada.

4.1.3.3 Contenido de grasa cruda

El contenido de grasa cruda se determinó de acuerdo al método de Soxhlet descrito en la NMX-F-089-S 1978. Un matraz de destilación se colocó en una estufa de secado (105 °C) hasta peso constante. Por otro lado, se cargó un cartucho de celulosa con 2 g de harina de huauzontle y este se colocó en el extractor Soxhlet. Se utilizó hexano para realizar la extracción por aproximadamente 5 h. El disolvente fue removido de la muestra en un rotavapor a 69 °C y 360 mbar. Posteriormente el matraz con la grasa se colocó en una estufa a 105 °C por 20 min para posteriormente ser pesado. El porcentaje de grasa cruda se determinó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de grasa cruda} = \frac{W_2 - W_1}{m}$$

donde W_2 es el peso del matraz con la grasa, W_1 es el peso del matraz vacío y m es el peso de la muestra seca.

4.1.3.4 Contenido de proteína cruda

Para la determinación de proteína cruda se utilizó el método Kjeldahl modificado con ácido bórico No. 46-12 de la American Association of Cereal Chemists (AACC). En un tubo de digestión se colocó 0.2 g de harina de huauzontle en papel libre de nitrógeno junto con cuatro tabletas Kjeldhal (3.5 g K_2SO_4 , 0.1 g $CuSO_4$, 0.1 g TiO_2) (Fisher Chemical, USA). Adicionalmente como blanco se usó un tubo de digestión con papel sin muestra. Se añadió además 50 mL de H_2SO_4 concentrado en cada tubo.

Los tubos fueron colocados en la unidad de digestión. La temperatura para la digestión aumentó progresivamente de la siguiente manera: potencia Nivel 4 por 20 min (o hasta la eliminación de la espuma), potencia Nivel 6 durante 10 min (o hasta la presencia de humo en el tubo) y finalmente en potencia Nivel 10 durante 30 min (o hasta que las paredes del matraz quedaran completamente limpias y la disolución adquiriera un color traslúcido). Después de esto, los tubos se retiraron de la fuente de calor y se dejaron enfriar por media hora.

Posteriormente, se adicionó 50 mL de agua destilada a cada tubo y se mezcló adecuadamente, seguido de lo cual los tubos se colocaron uno por uno en la unidad de destilación Büchi K-350. Para recibir el destilado, en un matraz Erlenmeyer se colocó 60 mL de H_3BO_3 al 4% junto con cuatro gotas de la mezcla de indicadores verde de bromocresol/rojo de metilo (Sigma-Aldrich, USA). Una vez colocado el tubo con la muestra digerida en la unidad de destilación, así como el matraz para recibir el destilado, se adicionó aproximadamente 90 mL de NaOH al 32% y se programó la destilación de las muestras durante 5 min. Finalmente las soluciones fueron valoradas con H_2SO_4 0.10 N hasta observar un cambio de color de verde azulado a gris, con la misma intensidad del blanco. La proteína cruda fue calculada utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ de nitrógeno} = \frac{[\text{H}_2\text{SO}_4\text{muestra} - \text{H}_2\text{SO}_4\text{blanco}]L \times 14 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \text{conc. ácido}}{\text{masa (g)}} \times 100$$

$$\% \text{ de proteína} = 6.25 \times (\% \text{ nitrógeno})$$

donde $\text{H}_2\text{SO}_4\text{muestra}$ y $\text{H}_2\text{SO}_4\text{blanco}$ es la cantidad de ácido sulfúrico gastado en la titulación para la muestra y el blanco, respectivamente.

4.1.3.5 Contenido de fibra cruda

Para determinar el contenido de fibra cruda de las semillas de huauzontle se utilizó el método descrito en la NMX-F-090-S-1978. Se colocó 1 g de muestra en un matraz con 200 mL de ácido sulfúrico 1.25% (v/v) y la mezcla se mantuvo en ebullición por 30 min. Posteriormente la mezcla se filtró al vacío en un embudo Büchner con papel filtro libre de cenizas. A continuación la muestra se arrastró por lavado a un matraz con 200 mL de hidróxido de sodio 1.25% (p/v) y se llevó nuevamente a ebullición por 30 min. La muestra se volvió a filtrar al vacío en el embudo y se lavó sucesivamente con agua hirviendo, etanol y acetona. Después de esto, el papel filtro se colocó en un crisol de porcelana y se secó hasta peso constante a 100 °C, seguido de lo cual la muestra fue incinerada en una mufla a 550 °C. Finalmente el crisol se enfrió en un desecador para su posterior pesado en una balanza analítica. El contenido de fibra cruda se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ fibra} = \frac{(\text{peso}_{\text{crisol y papel con muestra tratada}} - \text{peso}_{\text{crisol con papel}}) - \text{peso}_{\text{cenizas}}}{\text{peso original de la muestra}} \times 100$$

4.2 Extracción y aislamiento de la proteína de semilla de huauzontle

4.2.1 Evaluación del proceso de extracción alcalina y precipitación isoelectrica

Para establecer las condiciones ideales de extracción se trabajó en un intervalo definido de pH tanto para la extracción alcalina como para la precipitación isoelectrica como se describe en las siguientes secciones. Todos los análisis del contenido proteico evaluados en esta sección se realizaron siguiendo la metodología descrita en la sección 4.1.3.4.

4.2.1.1 Evaluación del proceso de extracción alcalina

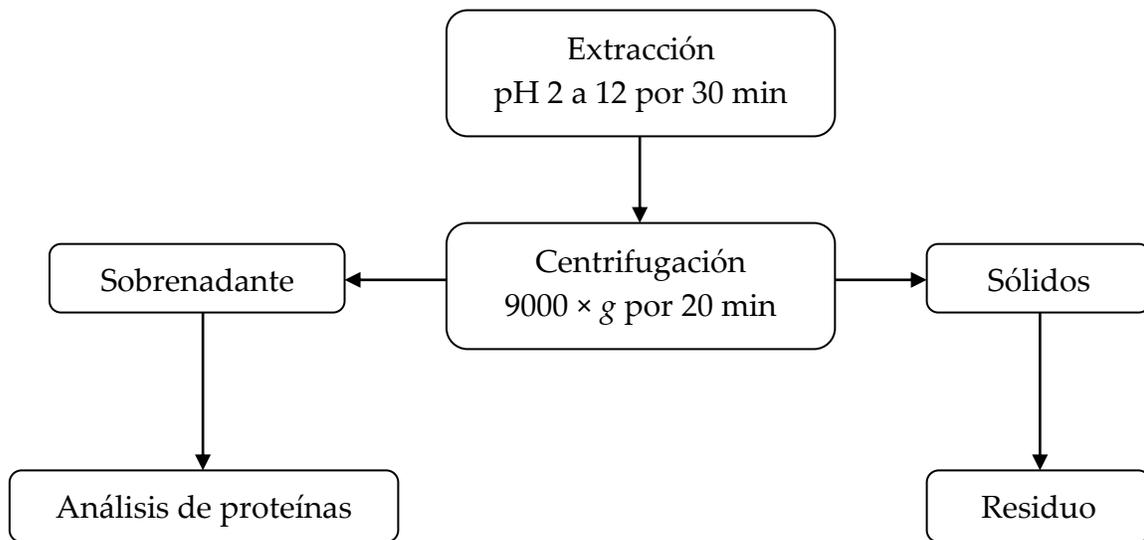


Figura 8. Diagrama de flujo del procedimiento para evaluar la extractabilidad de la proteína de semilla de huauzontle.

Para llevar a cabo las pruebas para evaluar las condiciones de extractabilidad, es decir, el valor de pH en el cual se extrae la mayor cantidad de proteína de la muestra, se utilizó la metodología representada en la Figura 8. Para cada tratamiento, se

adicionó 90 mL de agua a 5 g de harina de huauzontle desengrasada en un vaso de precipitados. Se ajustó el pH de las mezclas en los valores de pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 con disoluciones apropiadas de NaOH 2 M o H₃PO₄ 1 M, según correspondiera el caso. La mezcla se agitó por 30 min, después de lo cual se centrifugó a 9000 × g por 20 min. El sobrenadante fue separado en otro matraz para el posterior análisis de su contenido proteico, modificando la cantidad de muestra a 10 g de extracto, y utilizando agua destilada como blanco. Las pruebas de extractabilidad de los diferentes tratamientos de pH se realizaron una sola vez para cada pH de 2 a 12. Por otra parte, se realizó un duplicado para la zona alcalina (pH de 8 a 12). El porcentaje de extractabilidad se calculó como el cociente de la cantidad de proteína solubilizada en el extracto líquido entre la cantidad de proteína en la muestra inicial multiplicado por 100%.

Por otro lado, una vez seleccionado el pH ideal, en el cual se llevó a cabo la extracción de la proteína de semilla de huauzontle, dados nuestros objetivos, se realizó el balance de proteína del proceso de extracción realizado a este pH como se describe en la Figura 9. Para realizar el balance, los sólidos de la centrifugación se lavaron con 30 mL de agua y subsecuentemente fueron sometidos a una segunda centrifugación. El proceso de lavado y centrifugado se repitió una vez más. Los sobrenadantes obtenidos fueron mezclados en un solo recipiente. Finalmente se realizó el respectivo análisis de proteínas del extracto y de los sólidos para conocer la distribución de la proteína al término del experimento.

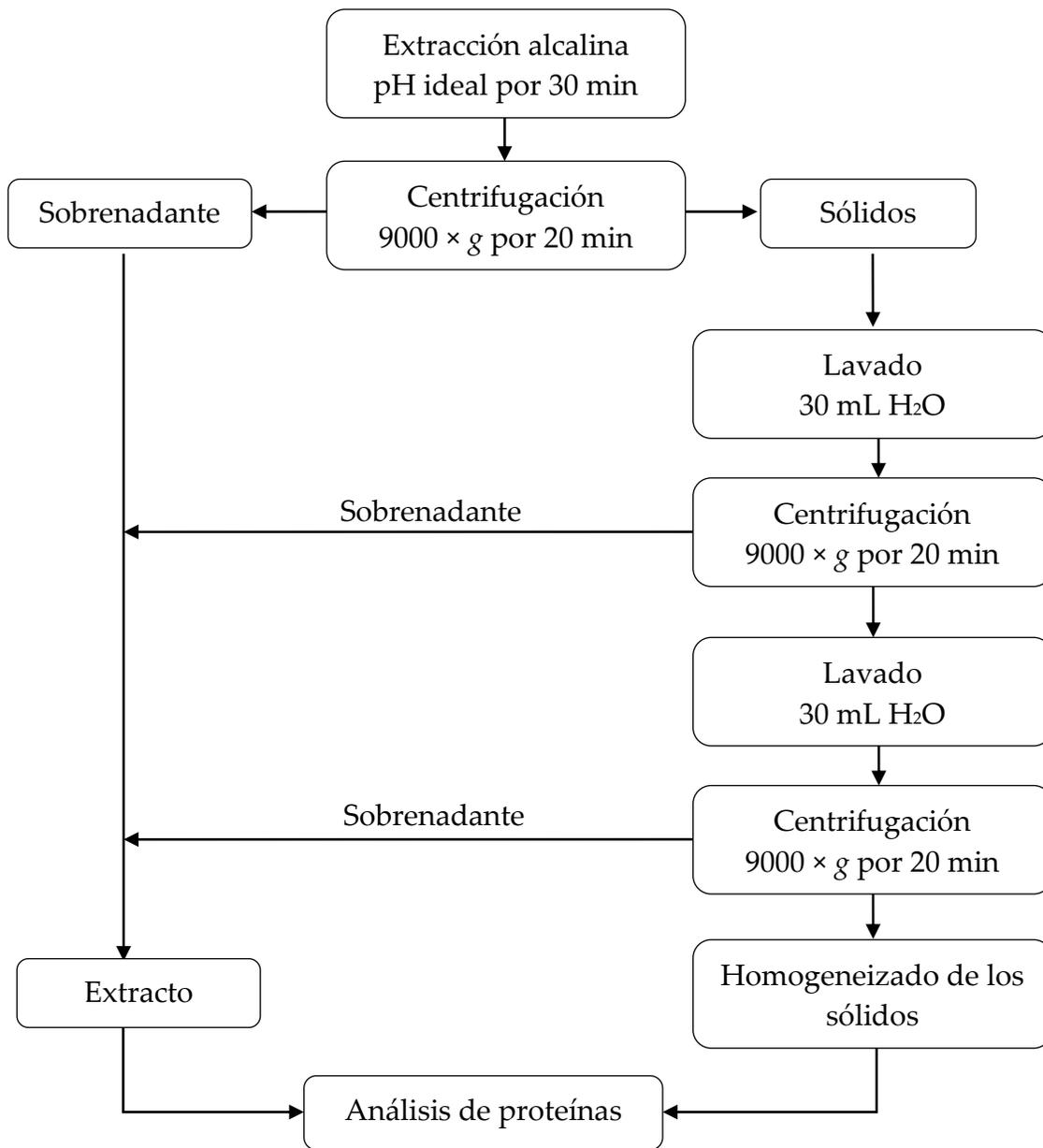


Figura 9. Diagrama de flujo para la realización del balance de proteína de semilla de huauzontle en el proceso de extracción alcalina.

4.2.1.2 Evaluación del proceso de precipitación isoelectrica

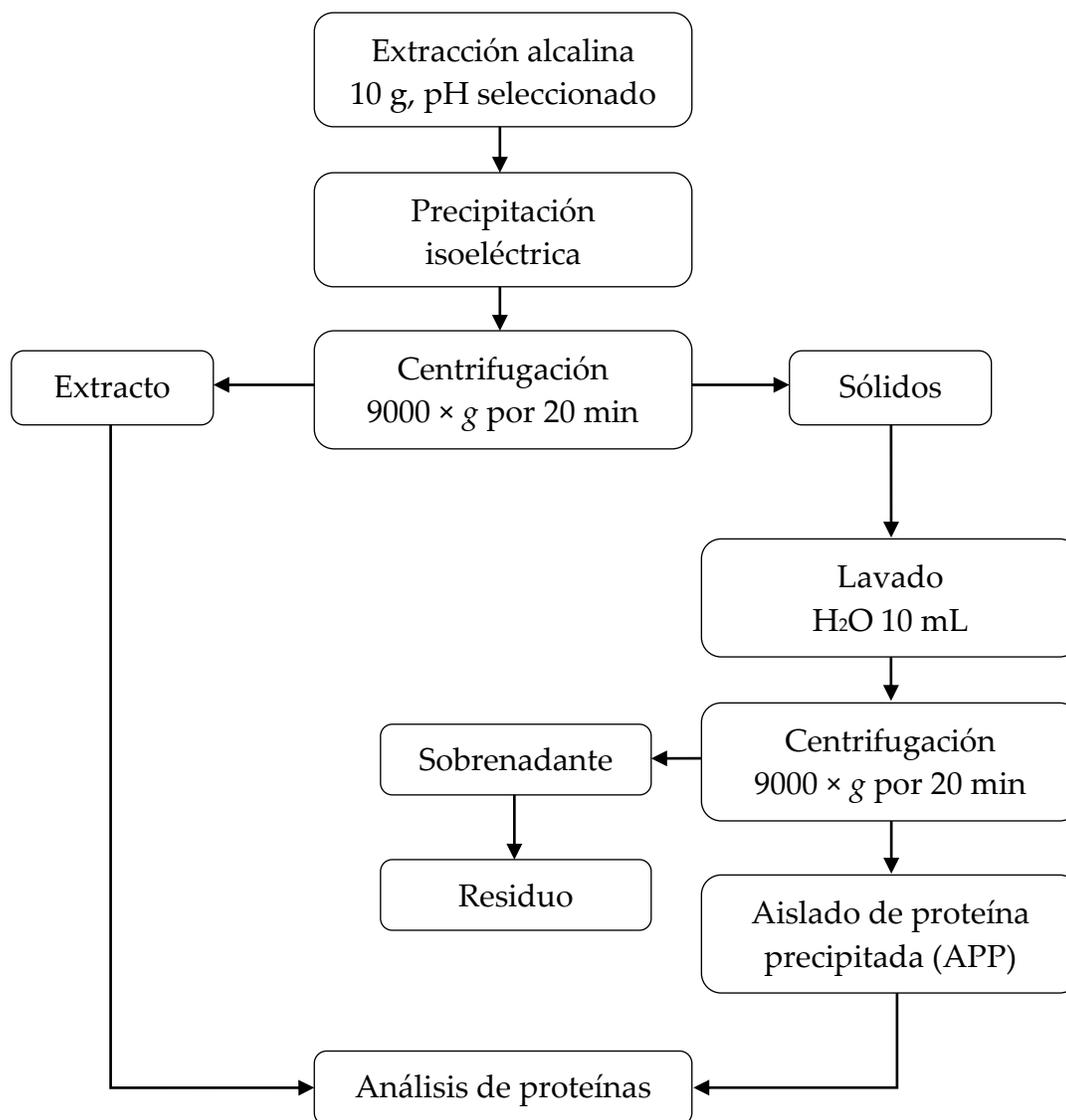


Figura 10. Diagrama de flujo del procedimiento para evaluar la precipitabilidad de la proteína de semilla de huauzontle.

El proceso de precipitación isoelectrica se realizó de acuerdo al procedimiento mostrado en la Figura 10. Una muestra de 10 g de harina de semilla de huauzontle desengrasada fue sometida a extracción alcalina al pH seleccionado en la sección anterior por 30 min para su posterior precipitación isoelectrica. El extracto fue dividido en porciones volumétricas iguales que fueron sometidas a un proceso de

precipitación en los valores de pH 2, 3, 3.5, 4 y 5 por 30 min. El pH de las suspensiones se ajustó usando una solución de H_3PO_4 1 M. Los sólidos precipitados fueron separados de la suspensión por medio de centrifugación a $9000 \times g$ por 20 min, los cuales fueron lavados con agua destilada en un volumen diez veces el peso total de los sólidos húmedos, para después volver a recuperarlos centrifugando la suspensión a $9000 \times g$ por 20 min. Posteriormente se realizó el análisis de proteínas del extracto inicial y de los sólidos obtenidos después de la precipitación isoelectrica. El porcentaje de precipitabilidad se calculó como el cociente de la cantidad de proteína precipitada entre la cantidad de proteína presente en el extracto inicial por 100%. Todos los valores de pH para la precipitación fueron evaluados por duplicado.

Por otra parte, una vez seleccionado el pH ideal para llevar a cabo la precipitación isoelectrica de la proteína de semilla de huauzontle, se realizó un balance de proteína en dicho valor de pH siguiendo la misma metodología descrita en la Figura 10, pero realizando también el análisis proteico correspondiente en el sobrenadante una vez separada la proteína precipitada para conocer con exactitud la distribución de la proteína al finalizar el experimento.

4.2.2 Purificación de la proteína usando membranas de ultrafiltración

Después de llevar a cabo la extracción alcalina, se utilizó el método descrito en la Figura 11 para purificar las proteínas presentes en la matriz líquida obtenida de la extracción, usando ultrafiltración y diafiltración por membranas. El equipo que fue utilizado para realizar los procesos de ultrafiltración y diafiltración fue una unidad Millipore Pellicon™. Asimismo, se utilizaron membranas poliméricas Cassette Pellicon® 2 Mini Biomax-10, hechas de polietersulfona con polipropileno como material separador, con pesos moleculares de corte (PMC) de 5 y 10 kDa.

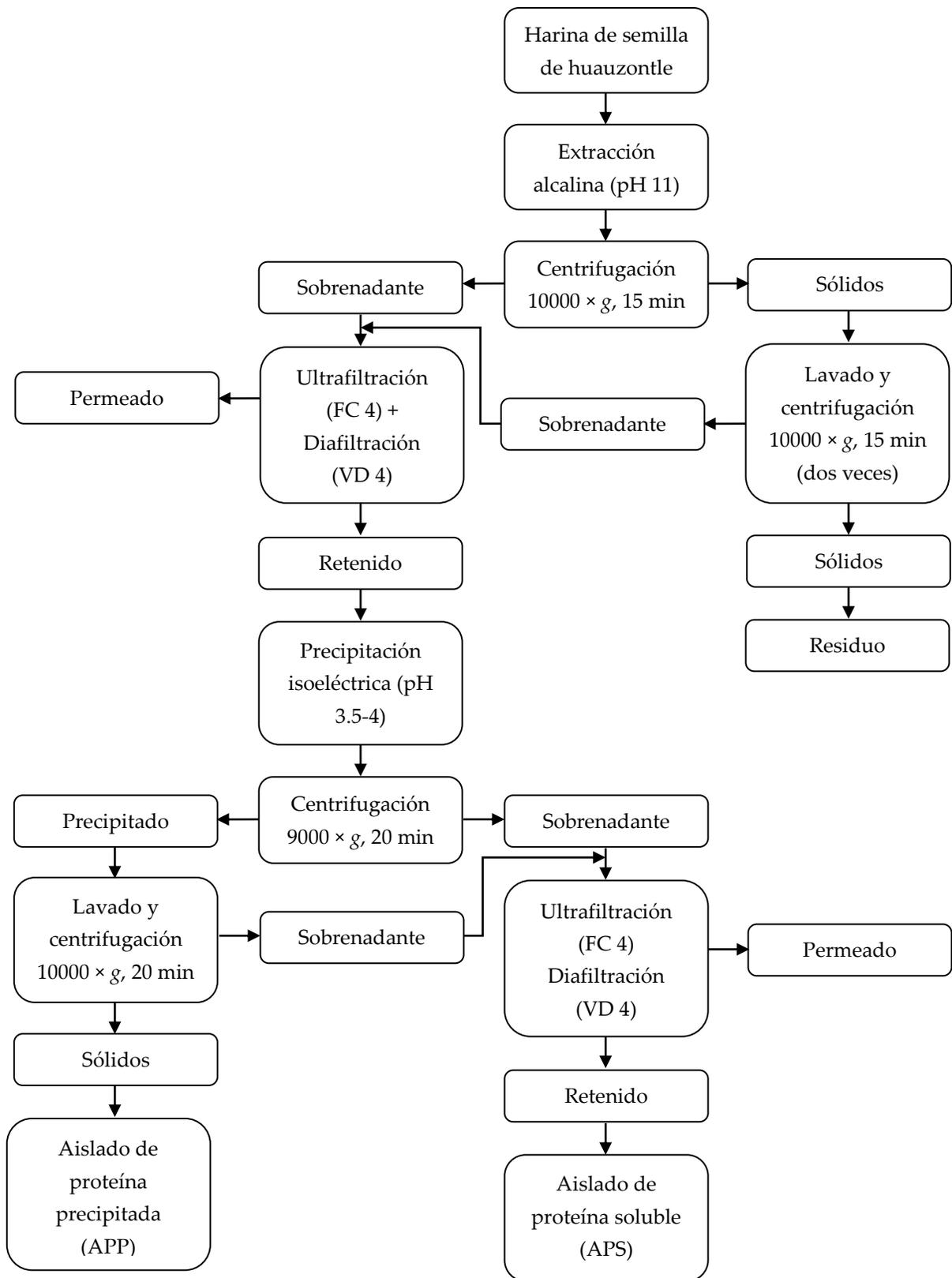


Figura 11. Diagrama de flujo para la purificación de la proteína de semilla de huauzontle.

4.2.2.1 Primera corrida de purificación

Se mezcló 80 g de harina de huauzontle con agua en una relación sólido:solución 1:12. La mezcla se agitó hasta obtener una suspensión homogénea y sin grumos. El pH de la suspensión se ajustó con NaOH 2 M al pH de extractabilidad seleccionado (obtenido en la Sección 4.2.1.1). La extracción alcalina se realizó durante 30 min y posteriormente la mezcla se centrifugó a $10000 \times g$ por 15 min para separar el residuo sólido del extracto. Una vez realizado lo anterior, el residuo fue resuspendido en agua para ser lavado. Esta mezcla volvió a centrifugarse a $10000 \times g$ por 15 min para separar nuevamente el sobrenadante de los sólidos, los cuales fueron a su vez lavados con agua una segunda ocasión y separados por centrifugación. Las fracciones líquidas fueron mezcladas para obtener una sola. Posteriormente se adicionó suficiente NaCl al extracto hasta una concentración de 0.05 M y se calentó a 40°C por 30 min.

Una vez realizada la extracción, el extracto proteico se sometió al proceso de ultrafiltración (UF) usando una membrana de 10 kDa para ser concentrada con un factor de concentración (FC) de 4; es decir, el volumen del extracto se concentró a una cuarta parte del volumen inicial. Posteriormente, para purificar la proteína, el permeado de la UF fue sometido a un proceso de diafiltración con un volumen de diafiltración (VD) de 4; es decir, se hicieron pasar a través de la membrana 4 volúmenes de agua destilada en relación al volumen inicial de la diafiltración.

El retenido obtenido del proceso de diafiltración que contiene la proteína purificada fue sometido a una precipitación isoelectrica, ajustando la suspensión al pH de precipitabilidad ideal (obtenido en la Sección 4.2.1.2) con una solución de H_3PO_4 3 M. Los sólidos obtenidos fueron recuperados por centrifugación y lavados una sola vez con agua destilada. Después de esto se realizó una segunda centrifugación, obteniendo así el aislado de proteína precipitada (APP). Por otra parte, los sobrenadantes de la centrifugación fueron mezclados para obtener un solo volumen,

mismo que se sometió subsecuentemente al proceso de ultrafiltración y diafiltración (DF) para concentrar y purificar el extracto de proteína soluble. A partir de este proceso se obtuvo el producto proteico en la fracción retenida de la diafiltración, al cual se le denominó aislado de proteína soluble (APS). Para los procesos de UF y de DF se usó un FC de 4 y un VD de 4, respectivamente. Finalmente se determinó el contenido de proteína en las fracciones obtenidas de ambos aislados proteicos APP y APS. Esta corrida de extracción y purificación de proteína se realizó por duplicado.

4.2.2.2 Segunda corrida de purificación

Se realizó una segunda corrida de purificación siguiendo la misma metodología descrita anteriormente en la Sección 4.2.2.1 pero realizando un principal cambio, el cual fue el peso molecular de corte (PMC) de la membrana. En este segundo experimento de purificación se empleó una membrana de 5 kDa para observar el comportamiento de la proteína ante este nuevo PMC. El resto de las condiciones se mantuvieron iguales a la primera corrida de purificación. De este segundo experimento se obtuvieron a su vez dos principales aislados proteicos (APP y APS). La corrida experimental de extracción y purificación de proteína se realizó por duplicado.

4.2.3 Caracterización de la proteína por electroforesis en SDS-PAGE

Se seleccionaron cuatro fracciones del proceso de extracción y purificación de proteínas para analizarlas por electroforesis en SDS-PAGE: APP-5 kDa, APS-5 kDa, residuo-5 kDa, permeado-10 kDa.

La electroforesis se realizó empleando un gel de poliacrilamida al 12% (Mini-PROTEAN TGX, Bio-Rad, USA). La cámara se llenó con amortiguador de corrida diluido 10 veces (Tris base 0.2 M, pH 8.3) con glicina 1.9 M y SDS al 10% (p/v). Se elaboró una solución 1:20 del marcador de pesos moleculares de bajo rango (de 14.4 a 97.4 kDa; #161-0304, Bio-Rad, USA) con amortiguador, este último compuesto por Tris-HCl (0.5 M, pH 6.8), glicerol anhidro al 5% (v/v), SDS al 10% (p/v), azul de bromofenol al 0.1% (p/v) y β -mercaptoetanol al 5.3% (v/v). En el primer pozo del gel se agregó 5 μ L de la solución del marcador de pesos moleculares. Asimismo, se prepararon dos diferentes diluciones para cada una de las fracciones a analizar. Para la primera disolución se colocó 100 μ L de cada muestra en microtubos Eppendorf™ de 1.5 mL y se mezcló con 300 μ L de amortiguador para muestra elaborado con Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8), glicerol al 11.1% (v/v), SDS al 10% (p/v), azul de bromofenol al 1% (p/v) y β -mercaptoetanol al 5.5% (v/v). Por otro lado, para la segunda dilución, cada fracción a analizar se diluyó con agua en una relación 1:1, seguido de lo cual de cada muestra se tomó 100 μ L que se mezcló con 300 μ L de amortiguador para muestra. Después de esto, los microtubos se calentaron a 100 °C por 5 min para posteriormente realizar la carga de las muestras en los pozos del gel, colocando 10 μ L en cada pozo. La electroforesis se realizó a 200 V y 0.05 mA. El voltaje se detuvo en el momento en que el azul de bromofenol alcanzó la parte inferior del gel, que se observó aproximadamente a los 40 min de la corrida. El gel se retiró de la cámara y se tiñó con una solución de tinción azul de Coomassie (azul de Coomassie R250 al 0.1% (p/v) con ácido acético al 10% (v/v) y metanol al 40% (v/v)) por 50 min. Finalmente el gel se destiñó con solución decolorante (ácido acético al 10% (v/v) con metanol al 40% (v/v)) hasta que fue posible visualizar las bandas de manera definida a simple vista. Los pesos moleculares de las proteínas se determinaron finalmente con la ayuda de la curva de calibración proporcionada en el manual del estándar de pesos moleculares.

4.2.4 Análisis de aminoácidos mediante HPLC

La muestra original de harina de semilla de huauzontle desengrasada fue enviada al Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) para su análisis de aminoácidos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

4.2.5 Análisis estadístico

Todas las pruebas correspondientes al análisis proximal de la muestra original de harina de semilla de huauzontle seca y desengrasada se realizaron por triplicado. Por otra parte, todas las determinaciones de proteína realizadas en las pruebas de extractabilidad y precipitabilidad fueron realizadas por duplicado. Para determinar la significancia de los resultados se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de diferencia significativa entre medias de Tukey con un nivel p de 0.05 utilizando Microsoft® Office Excel.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización de la semilla de huauzontle

Las semillas de huauzontle utilizadas para este estudio fueron caracterizadas por medio de un análisis proximal. La Tabla 5 muestra los promedios y las desviaciones estándar de las mediciones realizadas en cuanto a humedad, cenizas totales, grasa cruda, proteína cruda y fibra cruda.

Tabla 5. Análisis proximal de las semillas de huauzontle comparado con datos ya reportados para huauzontle y quinoa (% g/100 g de muestra*).

	Resultados (este estudio)	Huauzontle Barrón-Yáñez <i>et al.</i> (2009)	Quinoa Elsohaimy <i>et al.</i> (2015)
Humedad	9.13 ± 0.19	9.71	9.68 ± 0.33
Carbohidratos	67.52 ± 0.90	71.0	72.15 ± 0.28
Proteína cruda	15.92 ± 0.12	17.83	14.03 ± 0.25
Grasa cruda	7.06 ± 0.11	6.21	6.79 ± 0.19
Cenizas totales	5.52 ± 0.04	4.97	2.97 ± 0.02
Fibra cruda	3.98 ± 0.88	6.59	4.06 ± 0.34

Los resultados se muestran como el promedio de tres mediciones ± su desviación estándar.
*peso seco.

De acuerdo con los datos reportados por Barrón-Yáñez *et al.* (2009), quienes determinaron la composición de las semillas y germinados de varias especies vegetales, incluido el huauzontle, reportan valores cercanos a los obtenidos en el

presente estudio en la mayoría de los análisis realizados (Tabla 5). Cabe resaltar que los valores obtenidos por estos investigadores son los únicos datos disponibles actualmente para el huauzontle, por lo que en la Tabla 5 se exponen también los resultados del análisis proximal de la semilla de quinoa reportados por Elsohaimy *et al.* (2015). La proteína cruda es el parámetro de mayor relevancia de acuerdo a los objetivos de esta tesis. En este trabajo se determinó que la concentración de proteína en la semilla de huauzontle fue de 15.92%, valor comparable con el 17.82% obtenido por Barrón-Yáñez *et al.* (2009). Por otra parte, la concentración de proteína obtenida en este trabajo para el huauzontle es también comparable y superior al 14.03% reportado por Elsohaimy *et al.* (2015) para quinoa.

Los valores de proteína de semilla de quinoa reportados por diferentes autores van desde el 8 al 14% (Elsohaimy *et al.*, 2015; Encina-Zelada *et al.*, 2017; Pellegrini *et al.*, 2018). Con base en los resultados de proteína obtenida para el huauzontle y al comparar estos valores con los reportados para quinoa, puede decirse que la hipótesis de este trabajo se cumple parcialmente dada la similitud entre los contenidos de proteína de ambas especies vegetales.

La concentración de los componentes principales de las especies vegetales, como las proteínas, los lípidos y los carbohidratos puede variar debido a un gran número de factores difíciles de controlar. Entre estos factores están el medio ambiente del cultivo, las condiciones climatológicas, las condiciones de estrés, las características del suelo, la irrigación, el uso de agroquímicos, entre otros. Todos estos factores afectan la concentración de los macronutrientes presentes en los cultivos agrícolas, ya sea de forma positiva o negativa (Vega-Gálvez *et al.*, 2010). Es por esto que al comparar los demás parámetros del análisis proximal se hallan algunas diferencias. Los valores para humedad y cenizas totales obtenidos en este estudio son similares a los obtenidos por Barrón-Yáñez *et al.* (2009). Sin embargo, se observa una diferencia

importante entre la grasa cruda y la fibra cruda. Por otra parte, el contenido de cenizas totales para quinoa es considerablemente inferior al del huauzontle, mientras que el resto de los parámetros se asemejan más entre ambas especies.

5.2 Evaluación del pH en el proceso de extracción alcalina

Para determinar el pH al cual se extrae la mayor cantidad de proteína de la muestra de huauzontle, se construyó una curva de extractabilidad desde un pH de 2 hasta un pH de 12 para comprender el comportamiento característico de la proteína de huauzontle. La información obtenida de esta prueba también ayudó a delimitar el intervalo de pH adecuado para las determinaciones de la curva de precipitabilidad de la proteína. La curva de extractabilidad fue construida con una sola réplica para observar el comportamiento general de la proteína (Figura 12). A continuación se seleccionó la zona alcalina y se realizó una segunda determinación de extractabilidad dentro de este intervalo de pH para corroborar los resultados obtenidos y buscar diferencias significativas entre los diferentes valores de pH evaluados.

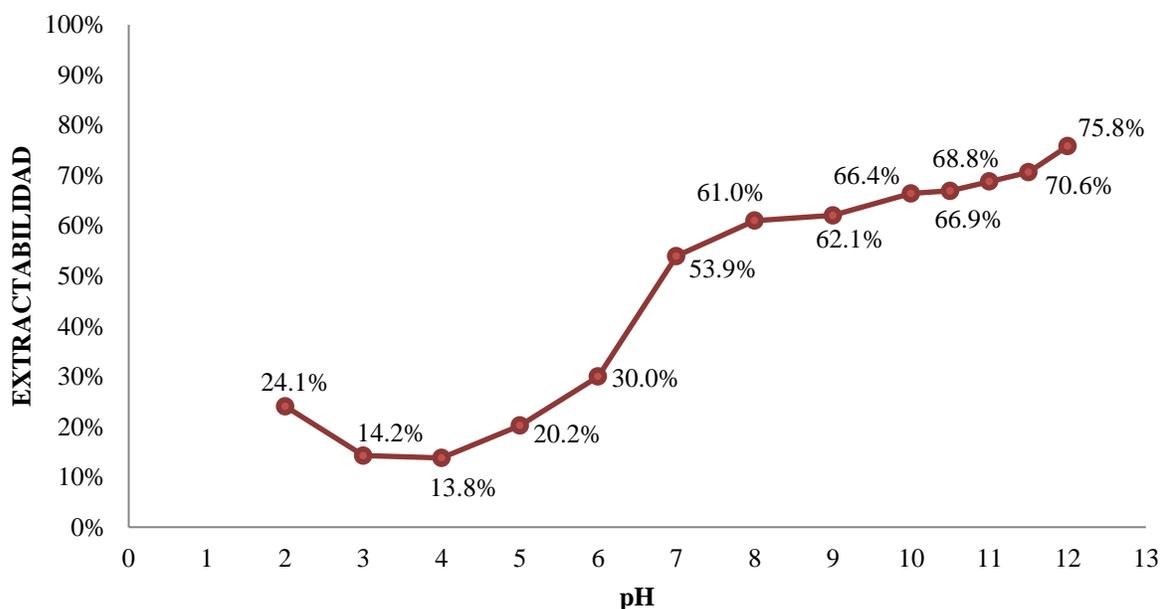


Figura 12. Curva de extractabilidad de la proteína de huauzontle en función del pH.

La Figura 12 muestra que a un aumento en el pH, la extractabilidad de la proteína incrementa a partir del valor de pH igual a 6. La Figura 13 representa la curva de extractabilidad de la proteína de huauzontle en la zona alcalina, en un intervalo de pH de 8 a 12. La solubilidad máxima de proteína se obtuvo a un pH de 12 ($77.19 \pm 1.91\%$), el cual fue el máximo valor de pH probado. Sin embargo, para la etapa posterior del proceso de aislamiento de proteínas se decidió elegir el pH 11, con un porcentaje de extracción de $71.68 \pm 1.19\%$. Esta decisión se tomó debido a que un pH de 12 es un pH demasiado alto considerando que para alcanzar este pH se requiere utilizar mucho mayores cantidades de reactivos que a pH 11 (casi tres veces más reactivo); hecho que compromete drásticamente la seguridad y la sustentabilidad del proceso, e incrementa los costos de producción. Adicionalmente, es importante considerar que el uso de condiciones extremas de pH puede dañar la integridad de las membranas en el proceso de ultrafiltración.

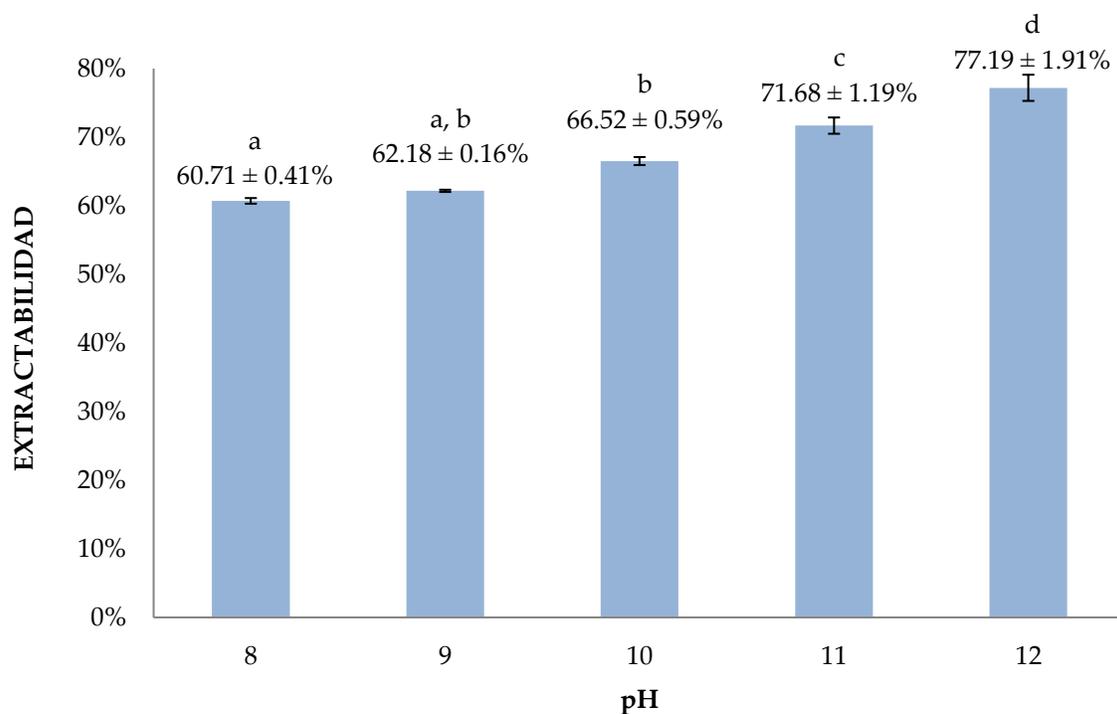


Figura 13. Zona alcalina de la curva de extractabilidad de la proteína de huauzontle. Letras diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Ghodsvali *et al.* (2005) reportaron un máximo de extractabilidad de la proteína de canola del 69.5% a un pH de 12. Considerando que estos autores obtuvieron un máximo porcentaje de extractabilidad a un pH de 12, y que esta extractabilidad fue comparable con la obtenida en este estudio para la proteína de huauzontle a un pH de 11, podemos decir que la eficiencia de extracción de la proteína de semilla de huauzontle es superior a la de semilla de quinoa a valores de pH más bajos. Asimismo, Ortigoza-Reyes (2017) reportó un porcentaje de extractabilidad para semillas de quinoa menor al 50% a un pH de 11, mientras que en este trabajo para la proteína de huauzontle, a ese mismo pH, se obtuvo 20% más de extractabilidad de la proteína. De acuerdo a esto, se puede concluir que el proceso de extracción alcalina de la proteína de huauzontle fue más eficiente en términos de extractabilidad y pH que los reportados en la literatura para canola y quinoa.

Para corroborar los resultados obtenidos en la curva de solubilidad, se realizó un balance de proteína en el proceso de extracción a pH de 11, cuyos resultados se muestran en la Tabla 6. Se usó este pH debido a que este fue el pH elegido como el más adecuado para llevar a cabo los experimentos siguientes en el proceso de extracción alcalina de la proteína de huauzontle.

Tabla 6. Balance de proteína en el experimento de extractabilidad a pH 11.

Determinación	Distribución de la proteína, %
Sólidos	29.38
Extracto	67.20
Total	96.58

Considerando un balance de proteína ideal a 100% para el proceso de extracción alcalina, el balance real obtenido del proceso (96.6%) indica que pudo recuperarse la proteína inicial de manera muy eficiente. El porcentaje faltante del balance se atribuye

a las pérdidas comunes por el manejo de la muestra. Adicionalmente, el hecho de que el balance de proteína dio un valor cercano al 100% indica que los análisis de proteína fueron realizados de manera confiable.

5.3 Evaluación del pH en el proceso de precipitación isoeléctrica

Después de analizar la curva de extractabilidad (Figura 12), se especuló que el punto isoeléctrico de la proteína debía encontrarse entre un pH de 3 y 4, ya que fue a esos pH en los que la extractabilidad alcanzó su punto mínimo. Es decir, de acuerdo con la curva, es en este intervalo de pH donde se solubilizó la menor cantidad de proteína de huauzontle. Con esta consideración, se construyó una curva de precipitabilidad en un intervalo de pH de 2 a 5.

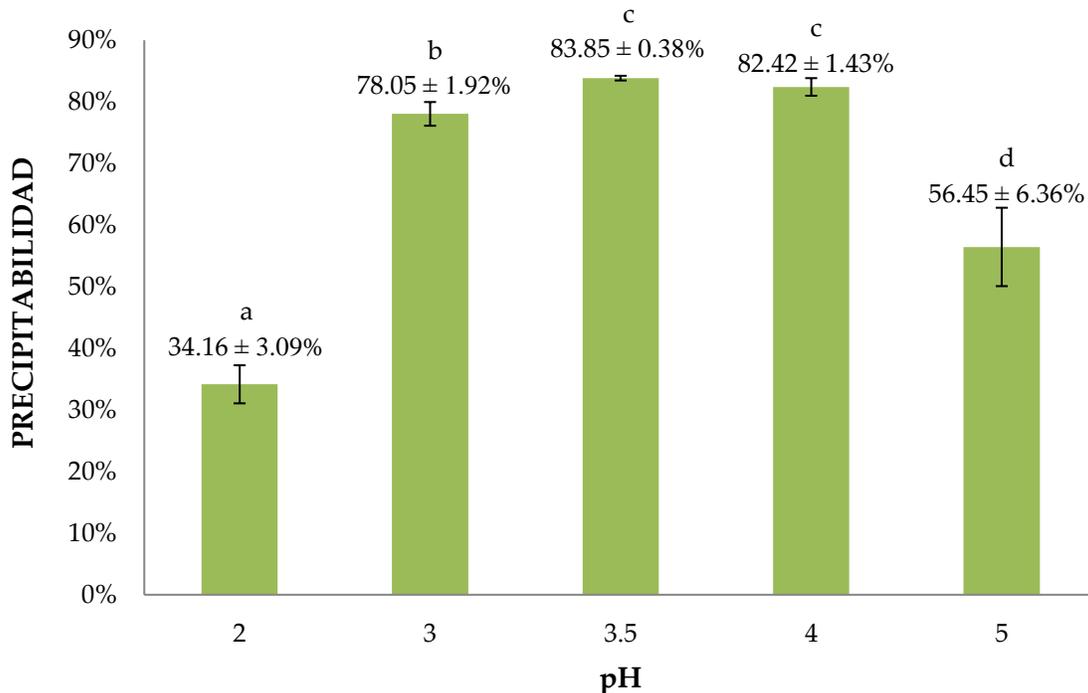


Figura 14. Curva de precipitabilidad de la proteína de huauzontle en función del pH. Letras diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Para construir la curva de precipitabilidad de la proteína de huauzontle se cuantificó el porcentaje de proteína precipitada después de llevar el sobrenadante de la extracción alcalina (pH 11) a diferentes valores de pH ácidos. La Figura 14 representa la curva de precipitabilidad de la proteína de huauzontle en el intervalo de pH de 2 a 5. En la Figura 14 se observa que la mayor precipitabilidad promedio se alcanzó a un pH de 3.5, con un porcentaje de precipitabilidad de $83.85 \pm 0.38\%$. Sin embargo, de acuerdo al análisis estadístico, no existe diferencia significativa en la cantidad de proteína precipitada en los tratamientos de precipitación a pH de 3.5 y a pH de 4 ($82.42 \pm 1.41\%$). Considerando lo anterior, se puede concluir que el intervalo de pH comprendido entre 3.5 y 4 es el ideal para llevar a cabo la precipitación de la proteína de huauzontle.

En estudios similares en los que se aborda la precipitación de proteínas de diferentes especies vegetales se reportan comportamientos análogos a los presentados en este trabajo. Marnoch y Diosady (2006) determinaron el punto ideal de precipitación de la proteína de semilla de mostaza oriental (*Brassica juncea* L.) en el intervalo de pH de 4 a 5.5, con una precipitabilidad del $71 \pm 2\%$. Por otra parte, Ortigoza-Reyes (2017) reportó que el máximo porcentaje de precipitación de la proteína de quinoa fue de $74.42 \pm 7.87\%$ a un pH de 4. Siendo estos valores de pH similares para las proteínas vegetales reportadas, como es el caso del huauzontle. Sin embargo, el porcentaje de precipitabilidad para la semilla de huauzontle obtenida en este estudio es superior a los reportados para otras muestras vegetales.

Se realizó a su vez un balance de proteína en el punto de precipitación a pH de 3.5, que fue el pH en el que se observó la mayor precipitabilidad promedio. Los datos se muestran en la Tabla 7. En la tabla se observa un balance total de la proteína con un valor del 98.66%, muy cercano al valor ideal de 100%. El buen balance de proteína en el proceso se puede atribuir a un buen manejo de los materiales y procesos durante la

realización de los experimentos de precipitabilidad, y a la excelente eficiencia del proceso (bajas pérdidas de proteína).

Tabla 7. Balance de proteína en el experimento de precipitabilidad a pH 3.5.

Determinación	Distribución de la proteína, %
Sólidos	84.12
Extracto	14.54
Total	98.66

5.4 Purificación de la proteína mediante ultrafiltración/diafiltración

Se obtuvieron dos productos finales del proceso de purificación de proteínas con membranas de ultrafiltración acoplado a la extracción alcalina y la precipitación isoelectrica. Por un lado se obtuvo el aislado de proteína precipitada (APP), el cual corresponde a los sólidos resultantes del proceso de precipitación isoelectrica. Mientras que el segundo producto se refiere al aislado de proteína soluble (APS), obtenido mediante la concentración y purificación del sobrenadante de la precipitación isoelectrica usando membranas de ultrafiltración.

A continuación se comparan los resultados de pureza proteica obtenidos en el presente trabajo con otros reportes en la literatura para diversas fuentes de proteína vegetal en los que se emplea extracción alcalina asistida por membranas de ultrafiltración.

En los estudios de extracción alcalina asistida por procesos de UF realizados por el grupo del Dr. Diosady en la Universidad de Toronto, mismos que fueron descritos en la Sección 2.10, se utilizaron principalmente membranas de UF con peso molecular de corte (PMC) de 10 kDa (Xu y Diosady, 2000; Xu y Diosady, 2002; Xu *et al.*, 2003;

Dendukuri y Diosady, 2003; Ghodsvali *et al.*, 2005; Prapakornwiriya y Diosady, 2008). Solo en uno de los estudios se utilizó una membrana con PMC de 5 kDa (Marnoch y Diosady, 2006). Sin embargo, no se encontraron reportes en los que se evaluara comparativamente el desempeño de las membranas de UF con estos PMC.

Debido a lo anterior, en este trabajo se estudió el efecto del uso de membranas de ultrafiltración con dos diferentes PMC (5 y 10 kDa) en el proceso de extracción y purificación de proteínas. Se evaluaron dos indicadores principales del proceso: la pureza de las fracciones proteicas y la eficiencia del proceso en función de la recuperación de proteínas.

Teniendo en consideración que las proteínas vegetales tienen pesos moleculares superiores a los 10 kDa, se propuso el uso de una membrana con PMC de 10 kDa para realizar el proceso de concentración y limpieza de los extractos proteicos. Por otro lado, en este trabajo también se realizaron corridas con la membrana de PMC de 5 kDa, debido a que como se mencionó anteriormente, las membranas con este PMC también han sido ya utilizadas en estos procesos.

Asimismo, cabe señalar que en ambos experimentos se decidió agregar NaCl en el extracto debido a que su adición puede ayudar a romper los complejos fenólicos-proteicos (Xu y Diosady, 2002; Marnoch y Diosady, 2005), los cuales representan hasta el 30% de los ácidos fenólicos totales presentes en el extracto. Por lo que una vez liberados, los ácidos fenólicos libres podrían ser lavados eficientemente durante el proceso de diafiltración. Sin embargo, debe considerarse que una concentración superior a 1 M de NaCl podría disminuir la solubilidad de la proteína en el extracto y afectar la eficiencia del proceso. Asimismo, diferentes investigaciones reportan el uso de una mezcla de disolventes (CH₃OH/NH₃/H₂O-Hexano) como pretratamiento en la harina de colza, canola y mostaza amarilla como una forma de eliminar las

interacciones de las proteínas con glucosinolatos y así aumentar la pureza de los aislados (Diosady *et al.*, 1985; Rubin *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 2003). Sin embargo, el uso de estos disolventes supondría una alteración excesiva de la muestra, dada la toxicidad de estos, por lo que no se consideró su implementación en la harina de semilla de huauzontle.

5.4.1 Análisis de la pureza de las fracciones proteicas

La Tabla 8 muestra los porcentajes de purificación obtenidos para cada uno de los aislados usando membranas con dos diferentes PMC: 10 kDa y 5 kDa.

Tabla 8. Pureza de los aislados de proteína de semilla de huauzontle.

Membrana	Pureza del aislado de proteína, %*	
	Aislado de proteína precipitada (APP)	Aislado de proteína soluble (APS)
10 kDa	73.81 ± 7.06 ^a	1.52 ± 0.18 ^b
5 kDa	69.87 ± 1.88 ^a	39.35 ± 0.86 ^c

Letras diferentes indican diferencia significativa entre las medias ($p < 0.05$). Los resultados se presentan como la media entre las dos mediciones ± su desviación estándar. *g de proteína/100g de aislado.

Marnoch y Diosady (2006) reportan valores de pureza en sus aislados de proteína de mostaza oriental de $96.0 \pm 0.1\%$ para el APP y $72.0 \pm 1.0\%$ para el APS. Por otra parte Xu *et al.* (2003) reportan valores de pureza superiores al 85% para ambos aislados de proteína obtenidos de mostaza amarilla. Asimismo se han reportado valores cercanos al 90% para aislados de canola (Xu y Diosady, 2002). Estos valores podrían sugerir que en el caso de la semilla de huauzontle las proteínas se encuentran asociadas más fuertemente a otro tipo de compuestos no proteicos.

En la Tabla 8 se observa que no existe diferencia significativa en los resultados de pureza proteica de los aislados de proteína precipitada (APP), el cual constituye el principal producto proteico del proceso. De acuerdo a estos resultados obtenidos se puede concluir que considerando la pureza de la fracción APP es indistinto usar cualquiera de las membranas probadas.

Por otro lado, considerando que en el proceso de 5 kDa se obtuvo un porcentaje importante de impurezas (aproximadamente 30%), una posible causa de la retención de impurezas por la membrana es que estas tuvieran un tamaño molecular mayor a 5 kDa. De acuerdo a esto, en el proceso de 10 kDa se podría esperar una mayor pureza, dado que el tamaño de poro de estas membranas es mayor comparado con la membrana de 5 kDa, lo que a su vez podría hacer que las impurezas retenidas con la membrana de 5 kDa pudieran permearse a través de las membranas de 10 kDa. Es decir, en principio las membranas de 10 kDa deberían ayudar a realizar una mejor limpieza durante el proceso de diafiltración, y consecuentemente obtener una mayor pureza del extracto. Sin embargo, esto no se vio reflejado en los resultados obtenidos, en los que se obtuvo un nivel de pureza similar para ambas membranas. A partir de esto, se puede concluir que las impurezas en los aislados proteicos APP pueden ser debidas a moléculas de tamaño mayor al PMC efectivo de la membrana de 10 kDa, por lo que pueden consistir en agregados poliméricos de peso molecular considerable, como polisacáridos o complejos proteína-carbohidrato. El alto contenido de carbohidratos en la harina de semilla de huauzontle y la imposibilidad de eliminarlos con facilidad con el proceso de purificación con UF sugiere una gran cantidad de interacciones proteína-carbohidrato, las cuales principalmente pueden ser puentes de hidrógeno o fuerzas de *Van der Waals* (Vyas, 1991), aunque también existe la posibilidad de que los iones metálicos presentes en algunas proteínas pueden crear fuertes interacciones con carbohidratos cercanos. Por lo que una

alternativa para aumentar la pureza de los aislados de proteína podría ser romper las estructuras de los carbohidratos por medio de enzimas hidrolíticas (Reese, 1977) o desestabilizando las interacciones entre los complejos proteína-carbohidrato.

Por otra parte, en relación a la pureza del aislado de proteína soluble (APS) se observa una gran diferencia en relación al PMC de la membrana utilizada en el proceso de concentración y purificación de la proteína. En la Tabla 8, se puede apreciar que los valores de pureza son muy diferentes entre el aislado obtenido con la membrana de 10 kDa ($1.52 \pm 0.18\%$) y el de la membrana de 5 kDa ($39.35 \pm 0.86\%$), siendo el obtenido con la primera membrana significativamente inferior. Lo anterior puede apreciarse visualmente al comparar ambos aislados solubles (Figura 15); dado que el aislado obtenido con la membrana de 5 kDa tiene un color ámbar opaco mientras que el obtenido con la membrana de 10 kDa tiene un color blancuzco.



Figura 15. Aislados de proteína soluble: obtenido de la membrana de 5 kDa (izquierda) y obtenido de la membrana de 10 kDa (derecha).

Estos resultados sugieren que durante el proceso, una cantidad importante de proteína es fragmentada a péptidos con pesos moleculares inferiores a 10 kDa, provocando a su vez que estos sean permeados durante el proceso de purificación por membranas de UF utilizando la membrana de 10 kDa. En el caso del proceso con

la membrana de 5 kDa, al parecer la reducción del PMC de la membrana ayudó a la mayor retención de péptidos durante el proceso de UF, ya que el porcentaje de pureza del APS obtenido con esta membrana fue significativamente superior que la obtenida con la membrana de 10 kDa. Asimismo es posible visualizar este fenómeno comparando los permeados obtenidos con cada tipo de membrana como se muestra en la Figura 16, donde se observa un color mucho más pálido y translúcido en el permeado obtenido con la membrana de 5 kDa, mientras que el permeado de la membrana de 10 kDa tuvo un color ámbar menos translúcido. Considerando lo anterior, es evidente que el uso de la membrana de 5 kDa fue más eficiente para la recuperación de la proteína en la fracción APS que la membrana de 10 kDa.



Figura 16. Permeados obtenidos en el proceso de purificación con membranas de 5 kDa (izquierda) y 10 kDa (derecha).

Sin embargo, a pesar de que con la membrana de 5 kDa se obtuvo una pureza proteica mayor que con la de 10 kDa, el valor de pureza obtenida con la primera es considerablemente bajo en relación con las purezas obtenidas en otras investigaciones reportadas en la literatura usando el mismo proceso; los cuales se encuentran por arriba del 85% para mostaza amarilla (Xu *et al.*, 2003) o incluso del 90% para canola (Xu y Diosady, 2002); aunque comparables con los valores reportados para quinoa del

80.2% para el APP y 26.2% para el APS (Ortigoza-Reyes, 2017). La baja pureza del proceso con la membrana de 5 kDa parece deberse, de manera similar al caso del APP, a la retención de moléculas poliméricas no proteicas por la membrana de UF y la gran cantidad de carbohidratos disueltos. Por lo que sería conveniente liofilizar el aislado para su análisis proteico. Así como la búsqueda de alternativas para la eliminación de estos como en el caso del APP.

Cabe mencionar que el residuo sólido de la harina de semilla de huauzontle obtenido una vez realizada la extracción alcalina tuvo un porcentaje proteico del 3 al 5%, correspondiente a la proteína que no es posible solubilizar bajo las condiciones de operación del proceso de extracción, por lo que este residuo podría llegar a tener un gran potencial, por ejemplo, en el campo de la producción de alimento para ganado.

5.4.2. Análisis de la distribución de proteína en el proceso de membranas

En la Tabla 9 se muestra el balance global de proteína en los procesos de purificación de proteínas con membranas de UF de 5 y de 10 kDa.

Tabla 9. Balance de proteína global del experimento de purificación de la proteína.

Fracción	Distribución de la proteína, %*	
	Membrana 10 kDa	Membrana 5 kDa
Aislado de proteína precipitada (APP)	26.73 ± 1.49 ^a	51.71 ± 1.54 ^b
Aislado de proteína soluble (APS)	0.10 ± 0.04 ^c	6.83 ± 0.76 ^d
Residuo	16.99 ± 1.93 ^e	17.49 ± 0.04 ^e
Permeados	42.64 ± 0.25 ^f	14.39 ± 0.92 ^g
Total	86.45 ± 0.66 ^h	90.42 ± 1.35 ^h
No recuperado	13.56 ± 0.66 ⁱ	9.59 ± 1.35 ⁱ

*g de proteína/100g de muestra. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Analizando los datos de la Tabla 9 en relación a la proteína recuperada en la fracción precipitada APP, se puede afirmar que a pesar de que no existe diferencia significativa en la pureza obtenida con las membranas de 5 y 10 kDa, la cantidad de proteína precipitada obtenida utilizando la membrana de 5 kDa ($51.71 \pm 1.54\%$) corresponde casi al doble de la proteína obtenida con la membrana de 10 kDa ($26.73 \pm 1.49\%$). Esto puede deberse a que durante el proceso, una gran cantidad de proteína es fragmentada a péptidos con pesos moleculares menores a 10 kDa pero mayores a 5 kDa, por lo que estos son permeados durante el proceso de UF con la membrana de 10 kDa pero no así con la membrana de 5 kDa, aumentando significativamente la eficiencia del proceso utilizando esta última membrana. Asimismo, se ha reportado un porcentaje de recuperación de la proteína de semilla de quinoa del 28.2% para el APP utilizando una membrana de 5 kDa (Ortigoza-Reyes, 2017), valor muy por debajo del obtenido en este estudio para el caso del APP de semilla de huauzontle ($51.71 \pm 1.54\%$).

Por otro lado, la cantidad de proteína del aislado de proteína soluble (APS) obtenida con la membrana de 5 kDa ($6.83 \pm 0.76\%$) es significativamente superior a la obtenida con la membrana de 10 kDa ($0.10 \pm 0.04\%$). Esto podría deberse al mismo fenómeno ocurrido en el caso del APP. La membrana de 5 kDa es capaz de retener más péptidos pequeños que la membrana de 10 kDa, aumentando la eficiencia del proceso bajo las condiciones de operación con la membrana de 5 kDa. Asimismo, para el caso específico de las semillas de quinoa la recuperación reportada para el APS fue de 5.28% (Ortigoza-Reyes, 2017), valor similar al obtenido en este estudio para semillas de huauzontle.

Subsecuentemente, al analizar la proteína no retenida por los procesos de membrana, en la Tabla 9 se aprecia que la cantidad de proteína contenida en el permeado obtenido utilizando la membrana de 10 kDa es significativamente superior al

permeado de la membrana de 5 kDa, lo que significa que más del 40% de la proteína total de la semilla de huauzontle se pierde a través del permeado utilizando la membrana de 10 kDa, lo cual se ve reflejado en la reducción de la proteína obtenida en el APP; en contraste con la membrana de 5 kDa, en la cual se recupera más del 50% de la proteína total en la fracción de proteína precipitada (APP).

Por otra parte, al hacer un análisis de los residuos del proceso se observa en la Tabla 9 que no hay diferencia significativa entre la cantidad de proteína contenida en los residuos de ambos tratamientos. Esto significa que el proceso de extracción alcalina fue igual de efectivo en ambos casos, lo que es de esperarse dado que para la obtención del residuo no intervienen los procesos de membrana.

En cuanto al balance global de proteína se puede afirmar que el balance fue adecuado, cercano al 90% de la proteína inicial. Adicionalmente, el hecho de que no exista diferencia significativa entre los valores totales de proteína para ambas membranas significa que aunque la distribución de la proteína varió significativamente entre los dos diferentes tratamientos, la contabilización de la proteína en ambos procesos fue buena. Las pérdidas observadas se consideran normales debido al número y complejidad de operaciones realizadas en el proceso general.

5.4.3 Análisis global del proceso

De acuerdo a los resultados obtenidos es posible concluir que el proceso de purificación de la proteína de semilla de huauzontle utilizando la membrana con peso molecular de corte de 5 kDa produjo concentrados proteicos APP y APS con mayor pureza y con mayor eficiencia en la recuperación de proteínas que el proceso con la membrana de 10 kDa. En este sentido es de particular relevancia el hecho de que,

como puede observarse en la Figura 17, más del 50% de la proteína total de la semilla de huauzontle se recuperó en la fracción del aislado de proteína precipitada (APP). Estos valores de recuperación son bastante aceptables, considerando que se han reportado valores de recuperación del 47.3% en la fracción APP de semillas de mostaza oriental (Marnoch y Diosady, 2006) y del 28.2% en semillas de quinoa (Ortigoza-Reyes, 2017). Por otra parte, el valor de 17.49% en el residuo supone una alta eficiencia en la extracción de la proteína de huauzontle, ya que en el caso de las semillas de quinoa se reporta un 46.8% de proteína presente en el residuo (Ortigoza-Reyes, 2017); lo que indica que en el caso de la quinoa no es posible extraer un gran porcentaje de proteínas, en contraste con los resultados obtenidos en este trabajo para las semillas de huauzontle.

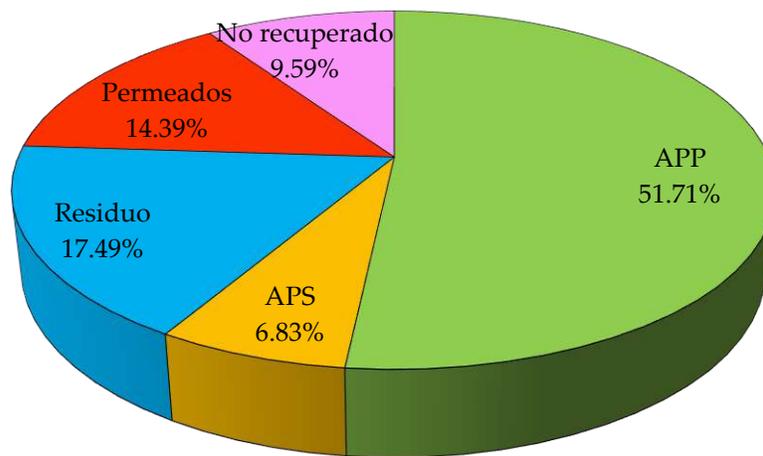


Figura 17. Distribución de la proteína total de semilla de huauzontle durante el proceso de purificación con membrana de ultrafiltración de 5 kDa.

5.5 Caracterización de la proteína de semilla de huauzontle

Para caracterizar la proteína de semilla de huauzontle se realizó el análisis de aminoácidos en la harina mediante HPLC y de las fracciones proteicas por electroforesis en SDS-PAGE.

5.5.1 Análisis de aminoácidos de la proteína de huauzontle

La Tabla 10 muestra el perfil de aminoácidos realizado a la muestra original de harina de semillas de huauzontle. Se observa que los principales aminoácidos en los que es rica la muestra son treonina, lisina, ácido glutámico, alanina, arginina, glicina y leucina; con más de 1 g por cada 100 g de muestra en cada uno. Resaltando el contenido de treonina, lisina y leucina, considerados estos aminoácidos esenciales en la alimentación humana.

Tabla 10. Perfil de aminoácidos de la proteína de semilla de huauzontle.

Aminoácido	g aa/100 g muestra	g aa/100 g proteína
Ácido aspártico	0.99	5.73
Ácido glutámico	1.20	7.00
Alanina	1.10	6.40
Amoniaco	0.05	0.30
Arginina	1.54	8.98
Cisteina	0.07	0.41
Fenilalanina	0.07	0.39
Glicina	1.09	6.37
Histidina	0.21	1.33
Isoleucina	0.74	4.31
Leucina	1.33	7.76

Lisina	1.67	9.73
Metionina	1.10	6.38
Prolina	0.62	3.58
Serina	0.71	4.96
Tirosina	0.93	6.75
Treonina	2.31	15.45
Valina	0.25	1.48
<hr/> Total	15.98	97.21

Cabe señalar que hasta el momento no se han reportado otros datos con respecto al análisis de aminoácidos de la semilla de huauzontle, por lo que a continuación se compararán los datos obtenidos del análisis con otros granos, así como con los niveles de ingesta recomendados por la FAO.

En la Tabla 11 se observa que las semillas de huauzontle superan el contenido de ingesta recomendado por la FAO en al menos cinco de los ocho aminoácidos esenciales (García, 1983), proporcionando más del doble de la lisina diaria recomendada, casi el triple de la metionina, 1.31 g más de la isoleucina diaria recomendada, y seis veces más de la treonina diaria recomendada. Asimismo se observa que el huauzontle supera a todos los cereales mostrados en la tabla en cuanto al porcentaje de lisina contenida, siendo este el principal aminoácido en el que son deficientes los cereales. En el caso específico de la quinoa se observa que la proteína de semilla de huauzontle supera a la de quinoa en el contenido de leucina, lisina, metionina y treonina; conteniendo incluso cinco veces más de esta última.

Tabla 11. Perfil de aminoácidos esenciales de diferentes granos y sus niveles recomendados por la FAO para niños de 3 a 10 años en g/100 g de proteína (Koziol, 1992).

Aminoácido	FAO	Huauzontle*	Quinoa	Maíz	Arroz	Trigo	Soya
Fenilalanina	4.1	0.39	6.9	8.6	10.5	8.2	1.41
Isoleucina	3	4.31	4.9	4	4.1	4.2	0.88
Leucina	6.1	7.76	6.6	12.5	8.2	6.8	1.38
Lisina	4.8	9.73	6	2.9	3.8	2.6	1.17
Metionina	2.3	6.38	5.3	4	3.6	3.7	0.22
Treonina	2.5	15.45	3.7	3.8	3	2.8	1.27
Triptófano	0.66	N/D	0.9	0.7	1.1	1.2	0.46
Valina	4	1.48	4.5	5	6.1	4.4	1.84

*Determinado en este estudio. N/D: No determinado.

Por otra parte, en la actualidad la soya es la principal fuente de proteína vegetal, sin embargo, esta proteína es deficiente en metionina con tan solo 0.22 g por cada 100 g de proteína (Yang *et al.*, 2011), mientras que la proteína de semilla de huauzontle contiene 6.38 g por cada 100 g de proteína de este aminoácido, superando el contenido en la soya casi treinta veces. Asimismo se observa en la Tabla 11 que la proteína de huauzontle supera por mucho a la proteína de soya en cinco aminoácidos esenciales (isoleucina, leucina, lisina, metionina y treonina). Sin embargo, aparentemente la proteína de huauzontle es deficiente en fenilalanina y valina comparándolo con los demás cereales mostrados en la Tabla 11, aunque esto sirve para afirmar que el consumo de semillas de huauzontle podría ser una gran alternativa para complementar el perfil de aminoácidos entre fuentes de proteínas de origen vegetal.

5.5.2 Electroforesis en SDS-PAGE de los aislados de proteína de huauzontle

La Figura 19 muestra las bandas obtenidas en el gel de electroforesis para las diferentes fracciones utilizadas en el experimento. Se realizaron dos diluciones diferentes para la electroforesis; los carriles 1 al 5 corresponden a la primera dilución y los carriles 6 al 10 a la segunda. Los carriles 1 y 6 se cargaron con el marcador de pesos moleculares. A partir de las fracciones del proceso con membranas de 5 kDa, los carriles 2 y 7 se cargaron con la fracción APP (178.5 y 23.3 μg de proteína total, respectivamente), los carriles 3 y 8 corresponden a la fracción APS de la misma membrana (15.8 y 7.9 μg de proteína total, respectivamente) y el residuo corresponde a los carriles 5 y 10 (22.4 y 1.4 μg de proteína total, respectivamente). Por otro lado, los carriles 4 y 9 corresponden al permeado de la membrana de 10 kDa (7.4 y 3.7 μg de proteína total, respectivamente).

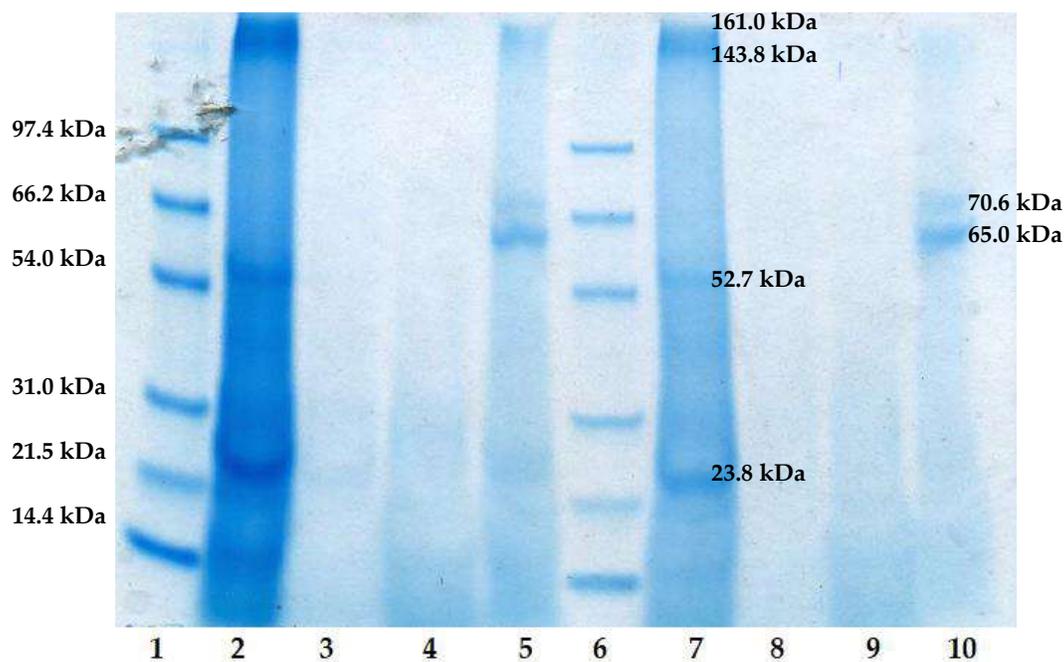


Figura 18. Perfil electroforético de los productos del experimento de purificación de proteína de semilla de huauzontle por ultrafiltración. Carriles 1 y 6: marcador; carriles 2 y 7: APP-5kDa; carriles 3 y 8: APS-5kDa; carriles 4 y 9: permeado-10kDa; carriles 5 y 10: residuo-5kDa.

Las muestras del proceso con membranas de 5 kDa correspondientes al aislado de proteína soluble (APS), carriles 3 y 8, y al permeado final del proceso con membranas de 10 kDa, carriles 4 y 9, no mostraron ninguna banda visible. Considerando que se usó un marcador de bajo rango (de 14.4 a 97.4 kDa) para realizar la electroforesis, era de esperarse que, en el caso del permeado, no se encontraran proteínas con pesos mayores al peso molecular de corte de la membrana utilizada (10 kDa). Por otra parte, en el caso del APS es posible que al tratarse de proteínas solubles imposible de precipitarlas se traten de proteínas o péptidos con pesos moleculares por debajo de 14.4 kDa que fue imposible detectar. En el caso de las muestras del proceso de membrana de 5 kDa correspondientes al aislado de proteína precipitada (APP), carriles 2 y 7, y las correspondientes al residuo del proceso, carriles 5 y 10, mostraron bandas visiblemente claras. Con ayuda de la curva de calibración del estándar de pesos moleculares (Figura 20) fue posible calcular los pesos moleculares de las proteínas que se visualizaron en las muestras del aislado de proteína precipitada (APP) y del residuo del proceso de 5 kDa.

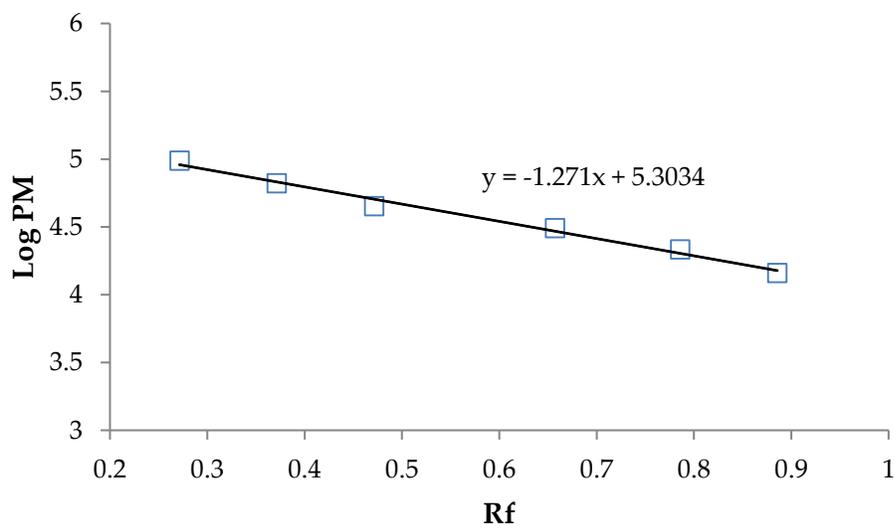


Figura 19. Curva de calibración de la movilidad relativa contra el logaritmo de los pesos moleculares del estándar utilizado en la electroforesis.

Para la muestra de la fracción APP, banda superior del segundo carril, se observó un grupo de proteínas grandes con pesos moleculares de 143 a 160 kDa. Estas proteínas podrían tratarse de globulinas 7s, ya que estas presentan pesos moleculares de los 150 a 190 kDa y se encuentran presentes en un gran número de cereales (Shewry *et al.*, 1995). Asimismo esta podría ser la razón que explique el alto contenido de lisina en las semillas de huauzontle (Fairbanks *et al.*, 1990), ya que por lo general las globulinas son ricas en este aminoácido. Por otra parte, en esta fracción también se observaron dos proteínas con pesos moleculares de 23 y 52 kDa. Proteínas que también han sido encontradas en fracciones precipitadas de proteína de quinoa denominadas globulinas 11s, características del género *Chenopodium* (Brinegar y Goundan, 1993).

Por otra parte, en el caso del residuo, carriles 5 y 10, se aprecian dos proteínas con pesos moleculares de 65 y 70 kDa. Siendo estas proteínas aquellas que no pudieron extraerse de las semillas de huauzontle por medio del proceso de extracción alcalina.

Estos resultados parecen confirmar los datos del balance global de proteína de la Sección 5.4.2, que sugiere que durante el proceso de extracción y purificación una cantidad importante de proteínas fueron fragmentadas a péptidos de bajo peso molecular, por debajo del peso molecular de corte de la membrana de ultrafiltración (5 kDa), lo cual también podría explicar la baja pureza obtenida en el aislado APS. Sin embargo, para corroborar esta teoría hace falta realizar una corrida de electroforesis con un rango molecular menor al ya utilizado.

6. CONCLUSIONES

Se obtuvieron los valores de pH para llevar a cabo la extracción alcalina y la precipitación isoelectrica de las proteínas de semilla de huauzontle de manera ideal, siendo estos valores 11 y 4, respectivamente. El proceso de purificación de la proteína de semilla de huauzontle empleando la membrana de ultrafiltración con peso molecular de corte de 5kDa produjo mejores y más eficientes resultados que aquel utilizando la membrana de 10 kDa. En el caso del proceso con la membrana de 5 kDa se obtuvieron dos principales productos: el aislado de proteína precipitada (APP), conteniendo el 51.71% de la proteína total de las semillas; y el aislado de proteína soluble (APS), conteniendo el 6.83% de la proteína total de las semillas. Adicionalmente el residuo sólido del proceso contuvo cerca del 17% de la proteína total, siendo este subproducto también una potencial fuente de proteína. La pureza de los aislados de proteína obtenidos fue de 69.87% para el APP y 39.35% para el APS, mientras que el residuo conservó un contenido proteico cercano al 4%.

Por otra parte, las semillas de huauzontle tienen un alto contenido de lisina y treonina, los cuales son aminoácidos esenciales. Asimismo el balance de aminoácidos de la semilla de huauzontle muestra que la proteína de huauzontle supera los niveles de ingesta recomendados por la FAO para niños en cinco de los ocho aminoácidos esenciales (isoleucina, leucina, lisina, metionina y treonina). El alto contenido de lisina en el huauzontle le proporciona a esta semilla una gran ventaja sobre los cereales de consumo más importantes como el maíz, el arroz y el trigo. Finalmente, es probable que las semillas de huauzontle contengan una cantidad importante de

globulinas 7s, ya que contienen proteínas con pesos moleculares de 143 a 160 kDa en el APP, así como dos proteínas de 23 y 52 kDa que probablemente se tratan de globulinas 11s, características del género *Chenopodium*. En conjunto, los resultados obtenidos con respecto al aislamiento y a la purificación de la proteína de semilla de huauzontle, acoplados a los obtenidos en el análisis proximal, destacando el contenido de proteína cruda, sustentan y comprueban la hipótesis planteada en este proyecto.

En este trabajo se demostró que el uso de las técnicas de extracción alcalina y precipitación isoelectrica acopladas a la tecnología de ultrafiltración constituyen un proceso adecuado para el aislamiento y la purificación de las proteínas de la semilla de huauzontle. Asimismo, los resultados de este trabajo pueden ayudar a la revalorización del huauzontle como una fuente alimenticia de alta calidad proteica para la población vulnerable, y a despertar el interés científico por el gran potencial nutricional y funcional que tiene esta especie endémica mexicana.

7. PERSPECTIVAS

Considerando los resultados obtenidos en este estudio e investigando más a fondo el comportamiento característico de la proteína de huauzontle, podrían implementarse pasos adicionales en el tratamiento de la muestra para mejorar la pureza en los aislados de proteína obtenidos, principalmente aquellos que puedan eliminar el alto contenido de carbohidratos, como el uso de enzimas hidrolíticas que rompan las interacciones proteína-carbohidrato. Por otra parte, realizar un perfil electroforético de menor rango de peso molecular ayudaría a comprender mejor el comportamiento de la proteína durante el proceso general de purificación de esta, principalmente para comprender la baja pureza obtenida en el APS. Asimismo, podrían analizarse las bandas que se obtengan de este nuevo perfil electroforético con técnicas instrumentales modernas como la espectrometría de masas para determinar con exactitud el tipo de proteínas de las que se trata; así como elucidar la estructura primaria de la proteína de semillas de huauzontle y sus aislados proteicos. Finalmente, este estudio abre la posibilidad de la elaboración de un producto alimenticio de buena calidad, principalmente dirigido a un público infantil, enriquecido con proteína de semilla de huauzontle.

8. REFERENCIAS

- AACC (2000). International Approved Methods of the American Association of Cereal Chemist Method, 46-12.
- Abugoch, L. E., Romero, N., Tapia, C. A., Silva, J., Rivera, M. (2008). Study of some physicochemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4745-4750.
- Abugoch, L. E., Tapia, C., Villamán, M. C., Yazdani-Pedram, M., Díaz-Dosque, M. (2011). Characterization of quinoa protein–chitosan blend edible films. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 879-886.
- Aellen, P. (1929). Beitrag zur Systematik der *Chenopodium*-Arten Amerikas, vorwiegend auf Grund der Sammlung des United States National Museum in Washington, DC II. *Feddes Repertorium*, 26(7-15), 119-160.
- Aellen, P. (1960). *Chenopodiaceae*. En: Rechinger, K.H., *Hegis Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Band 3. 2 Auflage. Berlin and Hamburg, pp. 533–762.
- Ahmedna, M., Prinyawiwatkul, W., Rao, R. M. (1999). Solubilized wheat protein isolate: functional properties and potential food applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1340-1345.
- Aluko, R. E., Monu, E. (2003). Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. *Journal of Food Science*, 68(4), 1254-1258.

- Alvarez-Jubete, L., Arendt, E. K., Gallagher, E. (2010). Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 21(2), 106-113.
- American Association of Cereal Chemist. (1969). Approved Methods of the AACC. Method 46-16, approved April 1691; and Method 46-12, approved October 1976. The Association, St. Paul, MN.
- AOAC (2000). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists.
- Arntfield, S. D., Ismond, M. A. H., Murray, E. D. (1985). The fate of antinutritional factors during the preparation of a fababean protein isolate using a micellization technique. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 18(2), 137-143.
- Asgar, M. A., Fazilah, A., Huda, N., Bhat, R., Karim, A. A. (2010). Nonmeat protein alternatives as meat extenders and meat analogs. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 513-529.
- Assad-Bustillos, M., Ramírez-Gilly, M., Tecante, A., Chaires-Martínez, L. (2014). Physicochemical, functional, thermal and rheological characterization of starch from huauzontle seeds (*Chenopodium berlandieri* spp. *nuttalliae*). *Agrociencia*, 48(8).
- Avanza, M., Añón, M. C. (2007). Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(4), 616-623.
- Barba de la Rosa, A. P., Gueguen, J., Paredes-Lopez, O., Viroben, G. (1992). Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid

- composition of amaranth seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6), 931-936.
- Barona, G. N. B., Cha, B. J., Jung, B. (2007). Negatively charged poly (vinylidene fluoride) microfiltration membranes by sulfonation. *Journal of Membrane Science*, 290(1-2), 46-54.
- Barrón-Yáñez, M. R., Villanueva-Verduzco, C., García-Mateos, M. R., Colinas-León, M. T. (2009). Valor nutricional y contenido de saponinas en germinados de huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.), calabacita (*Cucurbita pepo* L.), canola (*Brassica napus* L.) y amaranto (*Amaranthus leucocarpus* S. Watson *syn. hypoch.*). *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15(3), 237-243.
- Bean, A. (2007). *La guía completa de la nutrición del deportista*. Editorial Paidotribo. México.
- Bhargava, A., Rana, T. S., Shukla, S., Ohri, D. (2005). Seed protein electrophoresis of some cultivated and wild species of *Chenopodium*. *Biologia plantarum*, 49(4), 505-511.
- Bojanic, A. (2011). Quinoa: an ancient crop to contribute to world food security. En 37th FAO conference.
- Bol. Soc. Bot. México. (1993). Sociedad Botánica de México. Números 53-54. Universidad de Michigan, pp. 18.
- Bora, P. S., Ribeiro, D. (2004). Influence of pH on the extraction yield and functional properties of Macadamia (*Macadamia integrifolia*) protein isolates. *Food Science and Technology International*, 10(4), 263-267.

- Boutrif, E. (1991). Recent developments in protein quality evaluation. *Food, nutrition and agriculture*, 1(2-3), 36-40.
- Bradstreet, R. B. (1954). Kjeldahl method for organic nitrogen. *Analytical Chemistry*, 26(1), 185-187.
- Brinegar, C., Goundan, S. (1993). Isolation and characterization of chenopodin, the 11S seed storage protein of quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(2), 182-185.
- Brinegar, C., Sine, B., Nwokocha, L. (1996). High-cysteine 2S seed storage proteins from quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(7), 1621-1623.
- Cameron, J.J., Myers, C.D. (1983). Rapeseed Protein Isolate. Patent Application. Publication US 4 418 013.
- Catassi, C., Gatti, S., Fasano, A. (2014). The new epidemiology of celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 59, S7-S9.
- Census Bureau. United States (2020). U.S. and World Population Clock. <https://www.census.gov/>. Consultado en enero de 2020.
- Chajuss, D. (2012). U.S. Patent No. 0253,015. Soy protein concentrate. Mobile Post Emek Soreq, Illinois: Google Patents.
- Cheryan, M. (1998). *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. CRC Press, pp. 1-3.
- Chick, H., Roscoe, M. H. (1926). Influence of diet and sunlight upon the amount of vitamin A and vitamin D in the milk afforded by a cow. *Biochemical Journal*, 20(3), 632.

- Ciora, R. J., Liu, P. K. (2003). Ceramic membranes for environmental related applications. *Fluid/Particle Separation Journal*, 15(1), 51-60.
- Cordero-De-Los-Santos, M. Y., Osuna-Castro, J. A., Borodanenko, A., Paredes-López, O. (2005). Physicochemical and functional characterisation of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellisation. *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos*, 11(4), 269-280.
- Das, B., Sarkar, S., Sarkar, A., Bhattacharjee, S., Bhattacharjee, C. (2016). Recovery of whey proteins and lactose from dairy waste: A step towards green waste management. *Process Safety and Environmental Protection*, 101, 27-33.
- Day, L. (2013). Proteins from land plants—potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology*, 32(1), 25-42.
- Dendukuri, D., Diosady, L. L. (2003). Oil-free protein isolates from full-fat, dehulled mustard flour by microfiltration. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(3), 287-294.
- Deppe, C. (2015). *The tao of vegetable gardening: cultivating tomatoes, greens, peas, beans, squash, joy, and serenity*. Chelsea Green Publishing, pp. 174.
- Diosady, L. L., Rubin, L. J., Phillips, C. R., Naczki, M. (1985). Effect of alkanol-ammonia-water treatment on the glucosinolate content of rapeseed meal. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 18(4), 311-315.
- Dobrak, A., Verrecht, B., Van den Dungen, H., Buekenhoudt, A., Vankelecom, I. F. J., Van der Bruggen, B. (2010). Solvent flux behavior and rejection characteristics of hydrophilic and hydrophobic mesoporous and microporous TiO₂ and ZrO₂ membranes. *Journal of Membrane Science*, 346(2), 344-352.

- Domon, B., Aebersold, R. (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, 312(5771), 212-217.
- Durmus, E.F., Evranuz, O. (2010). Response surface methodology for protein extraction optimization of red pepper seed (*Capsicum frutescens*). *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie. Food Science and Technology*, 43(2), 226-231.
- Elsohaimy, S. A., Refaay, T. M., Zaytoun, M. A. M. (2015). Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 297-305.
- Encina-Zelada, C., Cadavez, V., Pereda, J., Gómez-Pando, L., Salvá-Ruíz, B., Teixeira, J. A., Ibañez, M., Liland, K. H., Gonzales-Barron, U. (2017). Estimation of composition of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) grains by Near-Infrared Transmission spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 126-134.
- Fairbanks, D. J., Burgener, K. W., Robison, L. R., Andersen, W. R., Ballon, E. (1990). Electrophoretic characterization of quinoa seed proteins. *Plant Breeding*, 104(3), 190-195.
- Fellows, P.J. (2009). *Food processing technology*, Third. CRC Press, Boca Raton.
- Fixsen, M. A. B. (1930). The biological values of proteins: The biological value of purified caseinogen and the influence of vitamin B2 upon biological values, determined by the balance sheet method. *Biochemical Journal*, 24(6), 1794.
- Föste, M., Elgeti, D., Brunner, A. K., Jekle, M., Becker, T. (2015). Isolation of quinoa protein by milling fractionation and solvent extraction. *Food and Bioproducts Processing*, 96, 20-26.

- Gandarillas, H. 1979. Genética y origen. En: M. Tapia (ed). Quinoa y Kañiwa, cultivos andinos. Bogota, Colombia, CIID, Oficina Regional para América Latina. pp. 45-64.
- García, P. (1983). Fundamentos de nutrición. Editorial Universidad Estatal de Costa Rica. San José, Costa Rica.
- Ghodsvali, A., Khodaparast, M. H., Vosoughi, M., Diosady, L. L. (2005). Preparation of canola protein materials using membrane technology and evaluation of meals functional properties. *Food Research International*, 38(2), 223-231.
- Gorinstein, S., Pawelzik, E., Delgado-Licon, E., Haruenkit, R., Weisz, M., Trakhtenberg, S. (2002). Characterisation of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(8), 886-891.
- Grandison, A. S. (1996). Separation processes in the food and biotechnology industries. CRC Press.
- Harvey, D. (2000). Modern analytical chemistry. Boston: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Hernandez, A. G. D. (2010). Tratado de nutrición/Nutrition Treatise: Composición y calidad nutritiva de los alimentos/Composition and nutritional quality of foods (Vol. 2). Editorial Médica Panamericana.
- Hernández-Valles, S. (2017). Huauzontle, planta mexicana nutritiva y curativa, pero poco valorada. *NTX Salud y Ciencia*. Publicad en línea en <http://www.notimex.gob.mx/ntxnotaLibre/452621>. Consultado en diciembre de 2019.

- Hofs, B., Ogier, J., Vries, D., Beerendonk, E. F., Cornelissen, E. R. (2011). Comparison of ceramic and polymeric membrane permeability and fouling using surface water. *Separation and Purification Technology*, 79(3), 365-374.
- Hong, P., Koza, S., Bouvier, E. S. (2012). A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 35(20), 2923-2950.
- Jing, L., Chase, H.A. (2010). Applications of membrane techniques for purification of natural products. *Biotechnology Letters*, 32, pp. 601-608.
- Kaul, H. P., Kruse, M., Aufhammer, W. (2005). Yield and nitrogen utilization efficiency of the pseudocereals amaranth, quinoa, and buckwheat under differing nitrogen fertilization. *European Journal of Agronomy*, 22(1), 95-100.
- Kolano, B., McCann, J., Orzechowska, M., Siwinska, D., Tensch, E., Weiss-Schneeweiss, H. (2016). Molecular and cytogenetic evidence for an allotetraploid origin of *Chenopodium quinoa* and *C. berlandieri* (*Amaranthaceae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 100, 109-123.
- Kong, J., Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 39(8), 549-559.
- Koziół, M. J. (1992). Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 5(1), 35-68.
- Kühn, U. (1993). *Chenopodiaceae*. En: Kubitzki, K. (Ed.), *The families and genera of vascular plants*, vol. 2. Springer, Hamburg, pp. 253–281.

- Laroche, G., Marois, Y., Guidoin, R., King, M. W., Martin, L., How, T., Douville, Y. (1995). Polyvinylidene fluoride (PVDF) as a biomaterial: from polymeric raw material to monofilament vascular suture. *Journal of Biomedical Materials Research*, 29(12), 1525-1536.
- Lazo-Vélez, M. A., Guajardo-Flores, D., Mata-Ramírez, D., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldivar, S. O. (2016). Characterization and quantitation of triterpenoid saponins in raw and sprouted *Chenopodium berlandieri* spp.(Huauzontle) grains subjected to germination with or without selenium stress conditions. *Journal of Food Science*, 81(1).
- Lee, S., Park, G., Amy, G., Hong, S. K., Moon, S. H., Lee, D. H., Cho, J. (2002). Determination of membrane pore size distribution using the fractional rejection of nonionic and charged macromolecules. *Journal of Membrane Science*, 201(1-2), 191-201.
- Lerch, A., Panglisch, S., Buchta, P., Tomita, Y., Yonekawa, H., Hattori, K., Gimbel, R. (2005). Direct river water treatment using coagulation/ceramic membrane microfiltration. *Desalination*, 179(1-3), 41-50.
- Lewis, M.J., Gradison, A.S. (1996). *Separation Process in the Food and Biotechnology Industries: Principles and Applications*. Woodhead Publishing. Ltd., Cambridge.
- Li, J., Chase, H. A. (2010). Applications of membrane techniques for purification of natural products. *Biotechnology letters*, 32(5), 601-608.
- Lodish, H. (2005). Purificación, detección y caracterización de las proteínas. En: *Biología celular y molecular*. Editorial Médica Panamericana.

- López, D. N., Galante, M., Robson, M., Boeris, V., Spelzini, D. (2017). Amaranth, quinoa and chia protein isolates: physicochemical and structural properties. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Mäkinen, O. E., Zannini, E., Koehler, P., Arendt, E. K. (2016). Heat-denaturation and aggregation of quinoa (*Chenopodium quinoa*) globulins as affected by the pH value. *Food Chemistry*, 196, 17-24.
- Marnoch, R., Diosady, L. L. (2006). Production of mustard protein isolates from oriental mustard seed (*Brassica juncea* L.). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(1), 65-69.
- Martínez, E. N., Añón, M. C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2523-2530.
- Martinez, L. C., Vargas, M. P., del Angel, A. C., Bermudez, F. C., Avalos, H. J. (2013). Total phenolic content and antioxidant capacity of germinated, popped, and cooked huauzontle (*Chenopodium berlandieri* spp. *nuttalliae*) seeds. *Cereal Chemistry*, 90(3), 263-268.
- Milanova, R., Murray, E. D., Westdal, P. S. (2006). U.S. Patent No. 6,992,173. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Mohan, J.S., Dutta G.S. (2013). *Biotechnology of Neglected and Underutilized Crops*. Springer Science & Business Media, pp. 4-5.
- Monge-Nájera, J. (2002). Desnaturalización de proteínas. En: *Biología general*. Universidad Estatal a Distancia. Costa Rica.

- Montaño, E. R., Torres, D. Á., Pulido, J. G. (2006). Componente nutricional de diferentes variedades de quinua de la región andina. Av. Investig. En Ing.
- Mota, C., Santos, M., Mauro, R., Samman, N., Matos, A. S., Torres, D., Castanheira, I. (2016). Protein content and amino acids profile of pseudocereals. Food Chemistry, 193, 55-61.
- Mota, C., Santos, M., Mauro, R., Samman, N., Matos, A. S., Torres, D., Castanheira, I. (2016). Protein content and amino acids profile of pseudocereals. Food Chemistry, 193, 55-61.
- Moya, T. F. M. (2003). Incremento de la disponibilidad intestinal de proteína y almidón mediante la manipulación de su degradabilidad en el rumen (Vol. 90). Universidad Almería.
- Mueller, U., Schaefer, R., Witte, M., Boeckle, K., Boesl, M., Eberhagen, I., Hamsch, B. (2008). Techneau Report D 2.3. 2.2. Interim Report Removal of particulate matter by ceramic membranes during surface water treatment in, DVGW Water technology Centre (TZW).
- Mujica-Sanchez, A., Jacobsen, S. E., Izquierdo, J., Marathe, J. P. (2001). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): ancestral cultivo andino, alimento del presente y del futuro. Santiago: FAO.
- Mulder, J. (2012). Basic principles of membrane technology. Springer Science & Business Media.
- Murray, E.D., Mills, E. (1999). Oilseed protein extraction. Patent Application Publication US 6 005 076.

- Nascimento, A. C., Mota, C., Coelho, I., Gueifão, S., Santos, M., Matos, A. S., Castanheira, I. (2014). Characterisation of nutrient profile of quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus caudatus*), and purple corn (*Zea mays* L.) consumed in the North of Argentina: proximates, minerals and trace elements. *Food Chemistry*, 148, 420-426.
- Navarro-Lisboa, R., Herrera, C., Zúñiga, R. N., Enrione, J., Guzmán, F., Matiacevich, S., Astudillo-Castro, C. (2017). Quinoa proteins (*Chenopodium quinoa* Willd.) fractionated by ultrafiltration using ceramic membranes: The role of pH on physicochemical and conformational properties. *Food and Bioproducts Processing*, 102, 20-30.
- Nielsen, S. S. (Ed.). (2003). *Food analysis laboratory manual* (p. 106). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- NMX-F-089-S-1978 (1978). Determinación de extracto etéreo (método Soxhlet) en alimentos. Normas mexicanas. Dirección general de normas, 2-3.
- NMX-F-090-S-1978 (1978). Determinación de fibra cruda en alimentos. Normas mexicanas. Dirección general de normas, 1-3.
- Nyström, M., Kaipia, L., Luque, S. (1995). Fouling and retention of nanofiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 98(3), 249-262.
- Oh, H. K., Takizawa, S., Ohgaki, S., Katayama, H., Oguma, K., Yu, M. J. (2007). Removal of organics and viruses using hybrid ceramic MF system without draining PAC. *Desalination*, 202(1-3), 191-198.
- Ortigoza-Reyes, E. (2017). Obtaining protein isolates and polyphenols from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) through membrane processes (tesis de maestría). Universidad Tecnológica de la Mixteca. Huajuapán de León, Oaxaca. México.

- Osborne, T.B. (1916). *The Vegetable Proteins*, Longmans, Green and Company. New York.
- Palazolo, G. G., Mitidieri, F. E., Wagner, J. R. (2003). Relationship between interfacial behaviour of native and denatured soybean isolates and microstructure and coalescence of oil in water emulsions-effect of salt and protein concentration. *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos*, 9(6), 409-419.
- Park, N., Kwon, B., Kim, I. S., Cho, J. (2005). Biofouling potential of various NF membranes with respect to bacteria and their soluble microbial products (SMP): characterizations, flux decline, and transport parameters. *Journal of Membrane Science*, 258(1-2), 43-54.
- Pedroche, J., Yust, M., Megías, C., Lqari, H., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Millán, F., Vioque, J. (2004). Utilisation of rapeseed protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Grasas y Aceites* 55 (4), 354–358.
- Pellegrini, M., Lucas-Gonzales, R., Ricci, A., Fontecha, J., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., Viuda-Martos, M. (2018). Chemical, fatty acid, polyphenolic profile, techno-functional and antioxidant properties of flours obtained from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) seeds. *Industrial Crops and Products*, 111, 38-46.
- Pickardt, C., Neidhart, S., Griesbach, C., Dube, M., Knauf, U., Kammerer, D. R., Carle, R. (2009). Optimisation of mild-acidic protein extraction from defatted sunflower (*Helianthus annuus* L.) meal. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1966-1973.

- Pickersgill, B., Heiser Jr, C. B. (1977). Origins and distribution of plants domesticated in the New World tropics. *Origins of agriculture*.
- Prapakornwiriya, N., Diosady, L. L. (2008). Recovery of sinapic acid from a waste stream in the processing of yellow mustard protein isolate. *Journal of Food Process Engineering*, 31(2), 173-185.
- PROFECO (2019). Procuraduría Federal del Consumidor. Sondeo de servicio 2019. Canasta básica. Publicado en línea en <https://www.profeco.gob.mx/>. Consultado en enero de 2020.
- Quanhong, L., Caili, F. (2005). Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food Chemistry*, 92(4), 701-706.
- Ranhotra, G. S., Gelroth, J. A., Glaser, B. K., Lorenz, K. J., Johnson, D. L. (1993). Composition and protein nutritional quality of quinoa. *Cereal Chemistry*, 70, 303-303.
- Reese, E. T. (1977). Degradation of polymeric carbohydrates by microbial enzymes. In *The Structure, Biosynthesis, and Degradation of Wood* (pp. 311-367). Springer, Boston, MA.
- Repo-Carrasco, R., Espinoza, C., Jacobsen, S. E. (2003). Nutritional value and use of the Andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). *Food reviews international*, 19(1-2), 179-189.
- Risi, J. (1991). La investigación de la quinua en Puno. En: L. Arguelles y R. Estrada (eds) *Perspectivas de la investigación agropecuaria para el Altiplano*. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. Proyecto de Investigación

- en Sistemas Agropecuarios Andinos. Convenio ACDI-CIID-INIAA. Lima, Perú. pp 209-258.
- Rodrigues, I. M., Coelho, J. F., Carvalho, M. G. V. (2012). Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. *Journal of Food Engineering*, 109(3), 337-346.
- Rosenberg, I. M. (2013). Protein analysis and purification: benchtop techniques. Springer Science & Business Media.
- Rubin, L. J., Diosady, L. L., Naczki, M., Halfani, M. (1986). The alkanol-ammonia-water/hexane treatment of canola. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 19(2), 57-61.
- Safford, W.E. (1916). An economic Amaranthus of ancient America. *Science* 1146: 870.
- SAGARPA (2016). Huauzontle, de hortaliza a pseudo cereal. Publicado en línea en <https://www.gob.mx/sagarpa%7Cpuebla/articulos/54495>. Consultado en diciembre de 2019.
- Salcedo-Chávez, B., Osuna-Castro, J. A., Guevara-Lara, F., Domínguez-Domínguez, J., Paredes-López, O. (2002). Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6515-6520.
- Sandoval-Oliveros, M. R., Paredes-López, O. (2012). Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(1), 193-201.
- Scopes, R. K. (2013). Protein purification: principles and practice. Springer Science & Business Media. USA.

- Scott, K., Hughes, R. (2012). Industrial membrane separation technology. Springer Science & Business Media.
- Segura-Nieto, M., Shewry, P. R., Paredes-López, O. (1999). Globulins of the pseudocereals: Amaranth, quinoa, and buckwheat. In Seed Proteins (pp. 453-475). Springer, Dordrecht.
- Segura-Nieto, M., Vazquez-Sanchez, N., Rubio-Velazquez, H., Olguin-Martinez, L. E., Rodriguez-Nester, C. E., Herrera-Estrella, L. (1992). Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40(9), 1553-1558.
- Serrano, M. R., Thompson, L. U. (1984). Removal of phytic acid and protein-phytic acid interactions in rapeseed. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 32(1), 38-40.
- Shewry, P. R., Casey, R. (1999). Seed proteins. En: Seed proteins (pp. 1-10). Springer Netherlands.
- Shewry, P. R., Napier, J. A., Tatham, A. S. (1995). Seed storage proteins: structures and biosynthesis. The plant cell, 7(7), 945.
- Simmonds, N. W. (1965). The grain chenopods of the tropical American highlands. Economic Botany, 19(3), 223-235.
- Thanapornpoonpong, S. N., Vearasilp, S., Pawelzik, E., Gorinstein, S. (2008). Influence of various nitrogen applications on protein and amino acid profiles of amaranth and quinoa. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(23), 11464-11470.

- Tzeng, Y. M., Diosady, L. L., Rubin, L. J. (1990). Production of canola protein materials by alkaline extraction, precipitation, and membrane processing. *Journal of Food Science*, 55(4), 1147-1151.
- Unger, K. K., Racaityte, K., Wagner, K., Miliotis, T., Edholm, L. E., Bischoff, R., Marko-Varga, G. (2000). Is multidimensional high performance liquid chromatography (HPLC) an alternative in protein analysis to 2D gel electrophoresis? *Journal of High Resolution Chromatography*, 23(3), 259-265.
- USDA U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. (2005). USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18. Nutrient Data Laboratory Home Page, <https://www.usda.gov/>. Consultado en diciembre de 2019.
- Valenzuela, C., Abugoch, L., Tapia, C., Gamboa, A. (2013). Effect of alkaline extraction on the structure of the protein of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and its influence on film formation. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(4), 843-849.
- Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Uribe, E., Puente, L., Martínez, E. A. (2010). Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient Andean grain: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(15), 2541-2547.
- Vyas, N. K. (1991). Atomic features of protein-carbohydrate interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 1(5), 732-740.
- Wagner, J. (2001). *Membrane filtration handbook: practical tips and hints* (Vol. 129). Minnetonka, MN: Osmonics.

- Wani, A. A., Kaur, D., Ahmed, I., Sogi, D. S. (2008). Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie. Food Science and Technology*, 41(8), 1514-1520.
- Wankat, P. C., Pozo, V. G. (2008). Introducción a los procesos de separación con membrana. En: Ingeniería de procesos de separación (No. Sirsi) i9789702612810). Pearson Educación. México.
- Welsh, L.S., Crompton, W.C., Clemants, S.E. (2003). *Chenopodiaceae*. En: Flora of North America: Magnoliophyta: Caryophyllidae Part 1, vol. 4. Oxford University Press, New York, pp. 258–404.
- Wilson, H. D., Heiser Jr, C. B. (1979). The Origin and Evolutionary Relationships of Huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Safford), Domesticated Chenopod of Mexico. *American Journal of Botany*, 198-206.
- Wright, K. H., Pike, O. A., Fairbanks, D. J., Huber, C. S. (2002). Composition of *Atriplex hortensis*, sweet and bitter *Chenopodium quinoa* seeds. *Journal of food science*, 67(4), 1383-1385.
- Xu, L., Diosady, L. L. (1994). The production of Chinese rapeseed protein isolates by membrane processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(9), 935-939.
- Xu, L., Diosady, L. L. (2000). Interactions between canola proteins and phenolic compounds in aqueous media. *Food research international*, 33(9), 725-731.
- Xu, L., Diosady, L. L. (2002). Removal of phenolic compounds in the production of high-quality canola protein isolates. *Food Research International*, 35(1), 23-30.

- Xu, L., Lui, F., Luo, H., Diosady, L. L. (2003). Production of protein isolates from yellow mustard meals by membrane processes. *Food research international*, 36(8), 849-856.
- Yang, B., Yang, H., Li, J., Li, Z., Jiang, Y. (2011). Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. *Food Chemistry*, 124(2), 551-555.
- Zhang, Q., Fan, Y., Xu, N. (2009). Effect of the surface properties on filtration performance of Al₂O₃-TiO₂ composite membrane. *Separation and Purification Technology*, 66(2), 306-312.

9. ANEXOS

A. Análisis proximal de la harina de semilla de huauzontle

A1. Humedad

Muestra	Peso constante de la charola (g)	Peso de la muestra (g)	Peso de la muestra seca + charola (g)	Humedad (%)
1	1.7978	1.0090	2.7161	8.9891
2	1.8359	1.0037	2.7466	9.2657
3	1.7644	1.0055	2.6757	9.3685
4	1.8330	1.0018	2.7435	9.1136
5	1.8914	1.0024	2.8044	8.9186

Promedio	9.1311
Desv. Est.	0.1871

A2. Grasa cruda

Muestra	Matraz (g)	Muestra (g)	Matraz + grasa + perlas (g)	Perlas (g)	Matraz + Grasa (g)	Grasa cruda (%)
B	120.2248	0.0000	120.6888	0.4612	120.2276	0.0000
1	100.2012	2.0055	100.7911	0.4466	100.3445	7.1454
2	121.7873	2.0075	122.3653	0.4387	121.9266	6.9390
3	99.3208	2.0048	99.8887	0.4257	99.463	7.0930

Promedio	7.0591
Desv. Est.	0.1073

A3. Cenizas totales

Muestra	Peso crisoles (g)	Peso constante (g)	Muestra (g)	Muestra + Crisol (g)	Crisol + Cenizas (g)	Cenizas totales (%)
1	41.6120	41.6111	2.0889	43.7000	41.7266	5.5292
2	43.1756	43.1749	2.0264	45.2013	43.2876	5.5616
3	40.7077	40.7069	2.0197	42.7266	40.8176	5.4810

Promedio	5.5239
Desv. Est.	0.0405

A4. Proteína cruda

Muestra	Peso de la muestra (g)	HCl gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
1	0.1527	2.90	0.1	16.0445
2	0.1510	2.85	0.1	15.9354
3	0.1503	2.80	0.1	15.7186

Promedio	15.8270
Desv. Est.	0.1533

A5. Fibra cruda

Muestra	Crisol (g)	Muestra (g)	Papel filtro (g)	Crisol + papel + muestra (g)	Cenizas (g)	Fibra cruda (%)
1	43.1794	1.2124	0.5911	43.8534	0.0226	4.9736
2	41.6151	1.2265	0.6018	42.2742	0.0168	3.3021
3	40.711	1.2111	0.6037	41.3738	0.0147	3.6661

Promedio	3.9806
Desv. Est.	0.8790

B. Curva de extractabilidad

pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extractabilidad (%)
12	5.0	90.1	10.1	7.80	0.1081	0.6757	75.8383
			10.1	7.70	0.1067	0.6671	
			10.4	7.90	0.1063	0.6647	

pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extractabilidad (%)
12	5.1	90.5	10.2	8.75	0.1201	0.7506	78.5425
			10.8	9.10	0.1180	0.7373	
			10.3	8.80	0.1196	0.7476	

pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extractabilidad (%)
11.5	5.1	90.16	10.1	7.30	0.1012	0.6324	70.6374
			10.1	7.30	0.1012	0.6324	
			10.1	7.40	0.1026	0.6411	

pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extractabilidad (%)
11	5.0	90.1	10.0	7.05	0.0987	0.6169	68.79836
			10.0	7.10	0.0994	0.6213	
			10.1	7.15	0.0991	0.6194	

pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extractabilidad (%)
10.5	5.1	90.2	10.2	7.10	0.0975	0.6091	66.93480
			10.1	7.05	0.0977	0.6108	
			10.1	7.00	0.0970	0.6064	

pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extractabilidad (%)
10	5.2	90.2	10.2	7.05	0.0968	0.6048	66.41410
			10.1	7.05	0.0977	0.6108	
			10.1	7.05	0.0977	0.6108	

pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extractabilidad (%)
10	5.1	90.2	10.5	7.50	0.1000	0.6250	66.1038
			10.0	7.25	0.1015	0.6344	
			10.3	7.45	0.1013	0.6329	

pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extractabilidad (%)
9	5.3	90.3	10.1	6.65	0.0922	0.5761	62.06180
			10.2	6.80	0.0933	0.5833	
			10.0	6.60	0.0924	0.5775	

pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extractabilidad (%)
9	5.1	90.4	10.4	7.05	0.0949	0.5931	62.2885
			10.9	7.30	0.0938	0.5860	
			10.3	7.0	0.0951	0.5947	

pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extractabilidad (%)
8	5.0	90.1	10.0	6.10	0.0854	0.5338	61.00021
			10.0	6.20	0.0868	0.5425	
			10.4	6.40	0.0862	0.5385	

pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extractabilidad (%)
8	5.1	90.3	10.3	6.75	0.0917	0.5734	60.4325
			10.1	6.70	0.0929	0.5804	
			10.9	7.10	0.0912	0.5700	

pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extractabilidad (%)
7	5.1	90.6	10.3	5.65	0.0768	0.4800	53.94592
			10.0	5.55	0.0777	0.4856	
			10.6	5.85	0.0773	0.4829	

pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extractabilidad (%)
6	5.0	90.6	10.1	3.05	0.0423	0.2642	29.97756
			10.6	3.20	0.0423	0.2642	
			10.1	3.10	0.0430	0.2686	

pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extractabilidad (%)
5	5.1	90.2	10.0	2.10	0.0294	0.1838	20.20965
			10.0	2.05	0.0287	0.1794	
			10.1	2.10	0.0291	0.1819	

pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extractabilidad (%)
4	5.1	90.1	10.2	1.45	0.0199	0.1244	13.77360
			10.5	1.50	0.0200	0.1250	
			10.0	1.40	0.0196	0.1225	

pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extractabilidad (%)
3	5.1	90.2	10.2	1.50	0.0206	0.1287	14.24712
			10.1	1.45	0.0201	0.1256	
			10.1	1.50	0.0208	0.1300	

pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extractabilidad (%)
2	5.1	90.1	10.3	2.55	0.0347	0.2166	24.06646
			10.1	2.50	0.0347	0.2166	
			10.1	2.50	0.0347	0.2166	

C. Balance de proteína en el pH seleccionado de extracción

Extracto total (g)	Sólidos húmedos totales (g)
146.2	15.7

Sólidos			
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
0.9481	1.5	0.1	1.3843
0.9643	1.7	0.1	1.5426
0.9958	1.85	0.1	1.6256

Proteína total en sólidos	29.3806
---------------------------	---------

Extracto			
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
10.1	4.3	0.1	0.3725
10.1	4.3	0.1	0.3725
10.2	4.35	0.1	0.3732

Proteína total en el extracto	67.2021
-------------------------------	---------

Proteína recuperada	96.5827
---------------------	---------

D. Curva de precipitabilidad

Extracción							
pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extracto total (g)
11	5.1	90.4	10.5	4.10	0.0547	0.3417	156.2
			10.3	4.05	0.0550	0.3441	
			10.1	3.95	0.0548	0.3422	

Precipitación							
pH	Muestra (g)	Extracto total (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Precipitabilidad (%)
5	1.7	124.3	0.3119	4.30	1.9301	12.0632	51.9457
			0.3157	4.85	2.1508	13.4424	
			0.3232	5.00	2.1658	13.5365	

Extracción							
pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extracto total (g)
11	10.1	180.1	10.2	4.30	0.0590	0.3689	295.2
			10.1	4.25	0.0589	0.3682	
			10.0	4.20	0.0588	0.3675	

Precipitación							
pH	Muestra (g)	Extracto total (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Precipitabilidad (%)
4	2.3	130.5	0.3008	5.85	2.7227	17.0171	83.4321
			0.3118	6.60	2.9634	18.5215	
			0.3083	6.00	2.7246	17.0289	

Precipitación							
pH	Muestra (g)	Extracto total (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Precipitabilidad (%)
3	2.4	132.3	0.3015	5.50	2.5539	15.9619	79.4054
			0.3247	6.25	2.6948	16.8425	
			0.3665	6.85	2.6166	16.3540	

Extracción							
pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extracto total (g)
11	10.2	180.2	10.1	4.20	0.0582	0.3639	299.6
			10.2	4.25	0.0583	0.3646	
			10.2	4.30	0.0590	0.3689	

Precipitación							
pH	Muestra (g)	Extracto total (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Precipitabilidad (%)
3.5	2.5	130.5	0.3078	5.70	2.5926	16.2037	83.5752
			0.3460	6.45	2.6098	16.3114	
			0.3441	6.45	2.6242	16.4015	

Precipitación							
pH	Muestra (g)	Extracto total (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Precipitabilidad (%)
2	1.6	134.8	0.3034	3.15	1.4535	9.0845	31.9731
			0.3358	4.05	1.6885	10.5532	
			0.3546	4.15	1.6385	10.2404	

Extracción							
pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extracto total (g)
11	10.2	180.1	10.1	5.10	0.0707	0.4418	283.7
			10.2	5.20	0.0714	0.4461	
			10.1	5.10	0.0707	0.4418	

Precipitación							
pH	Muestra (g)	Extracto total (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Precipitabilidad (%)
4	2.4	125.2	0.3232	6.90	2.9889	18.6804	81.4070
			0.3550	7.35	2.8986	18.1162	
			0.3429	7.30	2.9805	18.6279	

Precipitación							
pH	Muestra (g)	Extracto total (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Precipitabilidad (%)
3	2.5	123.2	0.3717	7.15	2.6930	16.8315	76.6852
			0.3182	6.20	2.7278	17.0490	
			0.3302	6.55	2.7771	17.3569	

Extracción							
pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extracto total (g)
11	10.3	180.0	5.2324	2.20	0.0589	0.3679	259.0
			5.1462	2.15	0.0585	0.3656	
			5.4705	2.35	0.0601	0.3759	

Precipitación							
pH	Muestra (g)	Extracto total (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Precipitabilidad (%)
2	1.4	129.0	0.2223	3.05	1.9208	12.0052	36.3440
			0.2087	2.90	1.9454	12.1586	
			0.2330	3.15	1.8927	11.8294	

Precipitación							
pH	Muestra (g)	Extracto total (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Precipitabilidad (%)
5	2.0	130.0	0.215	3.50	2.2791	14.2442	60.9548
			0.2646	4.45	2.3545	14.7156	
			0.2802	4.60	2.2984	14.3647	

E. Balance de proteína en el pH seleccionado de precipitación

Extracción							
pH	Muestra (g)	Agua (g)	Masa (g)	Ácido gastado (mL)	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Extracto total (g)
11	5.0	90.3	10.0	4.30	0.0602	0.3763	141.6
			10.0	4.30	0.0602	0.3763	
			11.2	4.90	0.0613	0.3828	

Sólidos precipitados (g)	Sobrenadante (g)
2.1	129.7

Sólidos			
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
0.3020	5.70	0.1	16.5149
0.3139	6.10	0.1	17.0038
0.3154	5.90	0.1	16.3681

Proteína total en sólidos	84.1220
---------------------------	---------

Sobrenadante			
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
10.2	0.75	0.1	0.0643
10.1	0.75	0.1	0.0650
10.1	0.75	0.1	0.0650

Proteína total en el sobrenadante	14.5403
-----------------------------------	---------

Proteína recuperada	98.6623
---------------------	---------

F. Corrida de purificación con membrana de 10 kDa

APP		Humedad (%)	80.50
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
0.3042	5.55	0.1	81.8667
0.3478	5.65	0.1	72.8941
0.3106	5.65	0.1	81.6245

APS		Humedad (%)	99.66
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
20.0704	1.10	0.01	1.4105
20.0936	1.10	0.01	1.4088
20.0621	1.05	0.01	1.3469

Residuo		Humedad (%)	70.01
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
0.3537	1.10	0.01	4.4544
0.3015	1.10	0.01	4.4998
0.3140	1.05	0.01	4.5065

Permeados		Humedad (%)	99.45
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
3.0398	4.35	0.01	22.7662
3.1775	4.45	0.01	22.2802
3.1328	4.40	0.01	22.3442

APP		Humedad (%)	80.66
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
0.3652	5.6	0.1	69.3759
0.3237	5.0	0.1	69.8842
0.3030	4.5	0.1	67.1926

APS		Humedad (%)	99.56
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
20.1574	1.65	0.01	1.6278
20.1353	1.65	0.01	1.6296
20.2688	1.70	0.01	1.6679

Residuo		Humedad (%)	71.66
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
0.3803	4.55	0.01	3.6940
0.3422	4.45	0.01	4.0150
0.3448	4.45	0.01	3.9847

Permeados		Humedad (%)	99.36
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
10.2151	1.65	0.1	22.0836
10.1210	1.65	0.1	22.2889
10.6850	1.70	0.1	21.7522

G. Corrida de purificación con membrana de 5 kDa

APP		Humedad (%)	75.82
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
0.3437	6.80	0.1	71.5947
0.3211	6.50	0.1	73.2529
0.3606	6.85	0.1	68.7411

APS		Humedad (%)	98.77
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
10.1401	57.75	0.01	40.5147
10.3158	5.75	0.1	39.6523
10.3049	5.75	0.1	39.6942

Residuo		Humedad (%)	71.52
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
0.3958	5.85	0.01	4.5410
0.4098	5.85	0.01	4.3858
0.4179	5.90	0.01	4.3376

Permeados		Humedad (%)	99.53
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
10.0995	4.80	0.01	8.8481
10.2237	4.90	0.01	8.9227
10.3089	5.15	0.01	9.3005

APP		Humedad (%)	75.05
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
0.3581	6.95	0.1	68.0641
0.3792	7.45	0.1	68.9010
0.3372	6.60	0.1	68.6426

APS		Humedad (%)	98.82
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
10.3339	5.45	0.1	39.1073
10.2849	5.35	0.1	38.5727
10.2920	5.35	0.1	38.5461

Residuo		Humedad (%)	71.31
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
0.3234	4.55	0.01	4.2909
0.3534	5.20	0.01	4.4876
0.3125	4.40	0.01	4.2942

Permeados		Humedad (%)	99.54
Peso de la muestra (g)	Ácido gastado (mL)	Normalidad (N)	Proteína cruda (%)
10.2405	5.45	0.01	10.1234
10.2186	5.35	0.01	9.9589
10.2318	5.40	0.01	10.0390

H. Balance global de proteína en el proceso de purificación

H1. Corrida con membrana de 10 kDa

Proteína total (%)		12.6919				
Fracción	Proteína (%)	Peso húmedo (g)	Humedad (%)	Peso seco (g)	Proteína real (%)	Balance (%)
APP	78.80	19.5	78.80	4.1340	3.2576	25.67
APS	1.39	168	99.62	0.6384	0.0089	0.07
Residuo	4.49	173	70.01	51.8827	2.3295	18.35
Permeados	22.46	4399	99.45	24.1945	5.4341	42.82

Total	86.91
No recuperado	13.09

Proteína total (%)		12.4558				
Fracción	Proteína (%)	Peso húmedo (g)	Humedad (%)	Peso seco (g)	Proteína real (%)	Balance (%)
APP	68.82	26	80.66	5.0284	3.4605	27.78
APS	1.64	202	99.56	0.8888	0.0146	0.12
Residuo	3.90	176	71.66	49.8784	1.9453	15.62
Permeados	22.04	3749	99.36	23.9936	5.2882	42.46

Total	85.97
No recuperado	14.03

H2. Corrida con membrana de 5 kDa

Proteína total (%)		12.4032				
Fracción	Proteína (%)	Peso húmedo (g)	Humedad (%)	Peso seco (g)	Proteína real (%)	Balance (%)
APP	71.20	38.038	75.82	9.1976	6.5487	52.80
APS	39.95	186	98.77	2.2878	0.9140	7.37
Residuo	4.42	172	71.52	48.9856	2.1652	17.46
Permeados	9.02	4021	99.53	18.8987	1.7047	13.74

Total	91.37
No recuperado	8.63

Proteína total (%)		12.5002				
Fracción	Proteína (%)	Peso húmedo (g)	Humedad (%)	Peso seco (g)	Proteína real (%)	Balance (%)
APP	68.54	37	75.05	9.2315	6.3273	50.62
APS	38.74	172	98.82	2.0296	0.7863	6.29
Residuo	4.36	175	71.31	50.2075	2.1890	17.51
Permeados	10.04	4072	99.54	18.7312	1.8806	15.04

Total	89.46
No recuperado	10.54