

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE POSTGRADO

67



**EXTRACCION Y CARACTERIZACION QUIMICA, NUTRICIONAL
Y FUNCIONAL DE PROTEINAS DE
LA SEMILLA DE *Brassica campestris* L.**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO ACADEMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN ALIMENTOS**

P R E S E N T A

MA. GUADALUPE DE JESUS ALANIS GUZMAN

MONTERREY N.L.

FEBRERO DE 1993

TD
SB1
A4
c.1



1080073233



TRACCION Y CARACTERIZACION QUIMICA, NUTRICIONAL Y FUNCIONAL DE
PROTEINAS DE LA SEMILLA DE Brassica campestris L.

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER

EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN ALIMENTOS

PRESENTA

MA. GUADALUPE DE JESUS ALANIS GUZMAN

MONTERREY N.L.

FEBRERO 1993

TD
SB193
A-4



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE POSTGRADO

TRACCION Y CARACTERIZACION QUIMICA, NUTRICIONAL Y FUNCIONAL DE
PROTEINAS DE LA SEMILLA DE *Brassica campestris* L.

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER

EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN ALIMENTOS

PRESENTA

MA. GUADALUPE DE JESUS ALANIS GUZMAN

COMISION DE TESIS

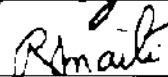
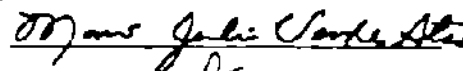
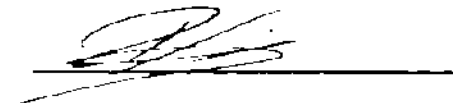
Aprobada

DR. PEDRO WESCHE EBELING
(Director)

DRA. MA. JULIA VERDE STAR

DR. RATIKANTA MAITI

DR. SERGIO O. SERNA SALDIVAR
(Asesor Externo)



MONTERREY, N.L. MEXICO

FEBRERO DE 1993

RESUMEN

En este trabajo se planteó el objetivo de conocer el potencial de la semilla de *Brassica campestris* silvestre, como materia prima en la obtención de aislados proteínicos, para lo cual se realizó la caracterización química, nutricional y toxicológica de la semilla y harina desgrasada de *B. campestris* silvestre, encontrándose en la semilla un contenido de aceite de 33%, de fibra 13%, 4% de ceniza y de proteína 26%. Los glucosinolatos se encontraron en relativamente baja concentración 0.92%, así como los fitatos 32 mg/100g. La inactivación de la enzima tioglucosidasa, se realizó por calentamiento a 90°C por 18', comprobándose la inactivación de la enzima con sinigrina como sustrato y cuantificando glucosa como producto formado. Con la extracción del aceite, por un mínimo de 2 hrs. la enzima también perdió su actividad. Las semillas trituradas y decorticadas con tamizado y aire, se desgrasaron con éter y la harina así obtenida tuvo un contenido de fibra cruda de 3.8%, 7% de ceniza, 48% de proteína, con una digestibilidad de 92.8% y un valor nutritivo con *Tetrahymena thermophila*, relativo a caseína de 98%. Los glucosinolatos aumentaron aquí a 2.3% y los fitatos a 67 mg/100g. Los minerales presentes tanto en la semilla como en la harina fueron Zn, Fe, Mn, P, Ca y Mg. Utilizando la harina se realizaron extracciones de proteína a diferente pH (6, 6.5, 7, 7.5, 8 y 10.8), determinándose la proteína disuelta espectrofotométricamente y el fósforo fítico, encontrándose la máxima extracción de proteína (82, 80 y 74%) coincidente con mínima de fitatos (70%) a pH 7, 7.5 y 8. Los extractos obtenidos fueron resueltos electroforéticamente con SDS, en gels de poliacrilamida (5 y 7.5%) encontrándose en todos ellos, 12 bandas con pesos moleculares de 10 a 74 kDa. Extractos a pH 7 y 8, fueron precipitados a pH 3.5, 4, 4.5, 5 y 5.5, obteniendo el máximo rendimiento proteico (53%) en el Extracto pH7 a 3.5, consideraciones nutricionales fueron la base para seleccionar el pH de precipitación de 4 con un rendimiento de 36% y 1.93% de los fitatos iniciales en el extracto pH7. El aislado obtenido contenía 93% de proteína, con un valor nutritivo relativo a caseína de 91%. No se detectaron glucosinolatos, ni fitatos. El contenido de aminoácidos azufrados y lisina es superior a cereales y leguminosas. Las mejores características funcionales fueron: capacidad espumante, estabilidad de la espuma y absorción de aceite, siendo superiores a un aislado de soya

ABSTRACT

The objective of this research was to determine the potential of the wild *Brassica campestris* seed, as raw material in the obtention of protein isolates, the chemical, nutritional and toxicological characterization of the seed and defatted flour, finding in the seed a content of 33% oil, 13% fiber, 4% ash and 26% protein. The glucosinolates were found at a low concentration of 0.92% as well as the phytates of 32 mg/100 g. The inactivation of the thioglucosidase enzyme was made by heating at 90°C for 18 seconds, it was verified with sinigrin as substrate and determining glucose as a final product. With the extraction of oil during a minimum period of 2 hours, the enzyme also lost its activity. The seeds flaked and dehulled with sieve and air, were defatted with ether, and the flour obtained had 3.8% crude fiber, 7% ash and 48% protein with a digestibility of 92.8%, and a nutritive value with *Tetrahymena thermophila* (relative to casein), of 98%. The glucosinolates in the flour were elevated to 2.3% and the phytates to 67 mg/10 g. The minerals contained in the seed as well as in the flour were Zn, Fe, Mn, P, Ca and Mg. Protein extraction was made from the flour at different pH (9, 6.5, 7, 7.5, 8 and 10.8) determining the dissolved protein and the phytic phosphorus in the spectrophotometer, finding the maximum protein extraction (82, 80 y 74%) coinciding with a minimum quantity of phytates (70%) at pH 7, 7.5 and 8. The extracts obtained were analysed electroforetically in gels of polyacrilamide with SDS (5 and 7.5%) finding in each one of them 12 bands with a molecular weight of 10 to 74 KDa. Extracts at pH 7 and 8, were precipitated at pH 3.5, 4, 4.5, 5 and 5.5, obtaining the maximum protein yield (53%) in the extract pH 7 at pH 3.5. Based on nutritional considerations in order to select the pH of precipitation 4, with a yield of 36% and 1.93% of the initial phytates in the extract pH7. The isolate obtained had 93% protein, with a nutritive value relative to casein of 91%. neither glucosinolates nor phytates were detected. The content of sulphur aminoacids and lysine were greater than cereal and leguminous seeds. The best functional properties were: whipping capacity and foam stability, and oil absorption being greater than soy isolate. In conclusion the seed evaluated had good chemical composition and that its proteinic potential is very high nutritionally.

INDICE.

<i>Contenido</i>	<i>Página</i>
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	iii
RECONOCIMIENTO	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
INDICE	vii
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS	x
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
HIPOTESIS DE TRABAJO	3
ORIGINALIDAD	3
ANTECEDENTES	5
I. <i>Brassica campestris</i> .	5
Ia. Origen y distribución geográfica:	5
Ib. Origen citogenético:	6
Ic. Estructura:	6
Id. Composición química:	6
Ie. Aspectos toxicológicos:	9
II. CONCENTRADOS Y AISLADOS PROTEINICOS.	11
IIa. Usos:	11
IIb. Potencialidad de la proteína de <i>Brassica</i> en tecnología alimentaria:	12
IIc. Funcionalidad de las proteínas y aplicaciones en alimentos:	15

METODOLOGIA:	17
I. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LA SEMILLA DE <i>Brassica campestris</i> .	17
II. INACTIVACION DE LA MIROSINASA.	18
IIa. Experimento 1	18
IIb. Experimento 2.	19
III. TRITURADO Y DESCASCARILLADO.	19
IV. EXTRACCION DEL ACEITE Y DESOLVETIZADO.	19
V. SOLUBILIZACION DE LAS PROTEINAS.	20
Va. Obtención de las proteínas.	20
VI. DETERMINACIONES QUIMICAS Y ELECTROFORETICAS DE LOS EXTRACTOS.	21
VII. PRECIPITACION DE LAS PROTEINAS. Selección de pH adecuado	21
VIII. LIOFILIZACION.	22
IX. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA Y NUTRICIONAL DEL AISLADO OBTENIDO.	22
RESULTADOS.	24
I. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LA SEMILLA Y PASTA.	24
II. INACTIVACION DE LA MIROSINASA.	28
III. EXTRACCION DEL ACEITE Y DESOLVETIZADO.	28
IV. SOLUBILIZACION DE LAS PROTEINAS.	29
V. ELECTROFORESIS DE LOS EXTRACTOS.	30
VI. PRECIPITACION DE LAS PROTEINAS.	32
VII. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA Y NUTRICIONAL DEL AISLADO OBTENIDO:	34
DISCUSIONES.	37
I. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LA SEMILLA Y HARINA.	37
II. INACTIVACION DE LA MIROSINASA.	43
III. TRITURADO Y DESCASCARILLADO.	45
IV. EXTRACCION DEL ACEITE Y DESOLVETIZADO.	45
V. SOLUBILIZACION DE LAS PROTEINAS.	46
VI. ELECTROFORESIS DE LOS EXTRACTOS.	47
VII. PRECIPITACION DE LAS PROTEINAS.	48
VIII. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA Y NUTRICIONAL DEL AISLADO OBTENIDO:	50

CONCLUSIONES	54
LITERATURA CITADA:	55

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS.

	Página
CUADRO I	
CARACTERIZACION DE LA SEMILLA DE <i>B. campestris</i>	26
CUADRO II	
CARACTERIZACION DE LA HARINA DESGRASADA DE <i>B. campestris</i>	27
GRAFICA 1	
Proteína y Fitatos Solubles a Diferente pH	29
FOTOGRAFIA 1	
ELECTROFORESIS DE PROTEINAS NATIVAS EXTRAIDAS A DIFERENTE pH.	30
FOTOGRAFIA 2	
ELECTROFORESIS DE PROTEINAS DESNATU- RALIZADAS, EXTRAIDAS A DIFERENTE pH.	31
CUADRO III.	
PESOS MOLECULARES (KDa) DE LAS PROTEINAS EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS	32
GRAFICA 2	
Precipitación de Proteínas a Diferentes pH.	33
GRAFICA 3	
Proteína y Fitatos Precipitados a pH 4.	34
CUADRO IV	
CARACTERIZACION QUIMICA-NUTRICIONAL DEL AISLADO	35
CUADRO V	
PROPIEDADES FUNCIONALES DE AISLADO DE <i>B. campestris</i> Y DE SOYA	36

INTRODUCCION

En años recientes ha existido una intensa actividad en preparar proteínas de origen vegetal para el uso posterior en alimentos, como alternativa a las proteínas de origen animal, especialmente de carne y leche. Las proteínas vegetales que han recibido más atención son las provenientes de leguminosas y oleaginosas, siendo la soya la que hasta el momento se industrializa en una escala importante.

La Academia Nacional de Ciencias en Estados Unidos (Bates, 1983) incluye en el listado de problemas relevantes sin resolver en el campo de la tecnología de alimentos, el incrementar el uso adecuado de pastas de oleaginosas no convencionales.

Esta línea de investigación se considera de actualidad y con futuro tanto en los países desarrollados, como en los que tienen problemas de subdesarrollo, aunque por distintos motivos. En el caso de los primeros que no tienen problemas de carencia de proteína animal es principalmente para diversificar sus dietas, así como, introducir productos con sabor a carne, leche etc. pero sin los inconvenientes de colesterol y ácido úrico, problemáticos para el grupo poblacional con alto riesgo de cardiopatías, enfermedades vasculares, y articulares.

En México el 67% de la población tiene bajo consumo de proteína animal, y sólo un 12% tiene el consumo adecuado de 20 a 40 g/día, por lo que el 57.3% de los niños menores de 4 años en el medio rural presentan desnutrición (Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, 1984). Por todo esto, en nuestro país el principal problema alimentario es proveer de alimentos de buena calidad y bajo costo a la población, así como también tener alimentos alternativos para casos especiales, como las épocas de baja producción de alimentos cárnicos y lácteos.

Por otro lado las proteínas vegetales, para ser incorporadas en alimentos, deben tener un valor nutricional bueno, así como, sabor, color y propiedades funcionales aceptables.

Para lograr bajo costo se deben utilizar materias primas apropiadas y de producción local; esto implica domesticar plantas silvestres y/o introducir nuevos cultivos adaptadas a las condiciones climáticas y de suelo en la región.

Una materia prima potencial para éste propósito en nuestro estado es la nabina o mostaza silvestre (*Brassica campestris*) ya que en este laboratorio se encontró que la semilla

contiene 28% de proteína, con una digestibilidad de 80%; contiene además 34% de extracto etéreo que produce una buena cantidad de aceite. Añadido a esta composición química favorable, agronómicamente su producción en nuestra región es posible ya que ésta planta se produce en forma semicultivada en Escobedo, N.L. en época de invierno, pudiéndose cosechar en los meses de Marzo o Abril, por lo que su domesticación no sería problemática.

El cultivo del nabo se menciona por Landaverde (1942) como un cultivo de importancia en México, que producía un aceite muy fino, utilizado para condimentos culinarios, en la industria peletera, en alumbrado, como lubricante fino y en la industria jabonera. El mismo autor señala a *Brassica campestris silvestre* o *semicultivada* utilizada con los mismos fines, llegándose a consumir en México 1,300 toneladas.

En la actualidad y a partir de los años cincuenta (Altschul y Wileke, 1985; Dale, 1982; Metcalfe y Elkins, 1980), este cultivo adquiere importancia a nivel mundial y así en Europa es una de las fuentes más importantes de aceite comestible (Lockhart y Wiseman, 1975; Nash, 1978). Sólo en el Reino Unido y Francia se obtienen 140,000 toneladas anuales (Slaughter y Duffus, 1980). En India y China se utiliza el aceite comestible, la semilla y la planta como hortaliza. Sin embargo es en Canadá donde el cultivo ha crecido después de su introducción en los años cincuenta; y para 1979 un tercio de la superficie cultivada fué *Brassica campestris*, *Brassica napus* y la nueva variedad mejorada llamada canola. México en 1980 importó de Canadá el 2% (23,000 ton.), de la producción de canola y las importaciones han aumentado con el uso de la torta en la alimentación de aves y del aceite en usos alimentarios (Comunicación de la Embajada de Canadá en México).

En *Brassica campestris* las posibilidades de una utilización variada e integral son interesantes; la planta tierna como hortaliza en la alimentación humana, o como forraje para cerdos, caprinos y bovinos en la alimentación animal. El aceite si no es posible en alimentación humana puede ser con fines industriales, y la torta producto de la extracción del aceite puede ser fuente de proteínas para la nutrición humana o animal.

Considerando lo anterior y el hecho de que *Brassica campestris* crece abundantemente en forma silvestre y como maleza (semicultivada) en cultivos de avena durante el invierno en nuestra región (Flores, 1989), se estima beneficioso conocer la composición química, toxicológica y nutricional de las semillas de *Brassica campestris* silvestre, así como el

potencial tecnológico de sus proteínas, que pudieran posteriormente utilizarse para elaborar productos texturizados, enriquecer atoles, pastas, tortillas, etc.

OBJETIVOS

I. GENERAL:

Conocer el potencial de la semilla de *Brassica campestris* silvestre, como materia prima en la obtención de aislados proteínicos.

II. PARTICULARES:

Caracterización química, nutricional y toxicológica de la semilla y harina desgrasada de *B. campestris*, silvestre

Determinar las condiciones adecuadas para obtener la proteína mediante tratamientos fisicoquímicos, libre de compuestos tóxicos.

Valorar el aislado proteínico obtenido, fisicoquímica, nutricional y funcionalmente.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Es posible utilizar como materia prima la semilla de *Brassica campestris* en la elaboración de un aislado proteínico de calidad nutricional aceptable .

ORIGINALIDAD

El cultivo de semillas de *B. napus* y *B. campestris* es muy importante, ocupando entre

las oleaginosas el quinto lugar mundial (Sosulski *et al.* 1976; Ohlson y Anjou, 1979). Recientemente las variedades mejoradas con bajo contenido de glucosinolatos (glucósidos goitrogénicos tóxicos y de ácido erúico (ácido graso potencialmente tóxico), están desplazando rápidamente a las variedades tradicionales, sobre todo en Canadá, con su variedad "Canola" y en Europa con las variedades "Doble cero" (Daun y Declercq, 1988; Ohlson, 1985). Por lo anterior, parte de la originalidad del presente trabajo radica en conocer la especie de *B. campestris* adaptada a la región, la cuál crece en forma silvestre en orillas de caminos y ríes, así como semicultivada como maleza en cultivos de avena durante los meses de invierno. Obteniéndose la semilla madura en el mês de Marzo. La especie descrita puede ser la base en la obtención de variedades mejoradas. Otro aspecto importante, es que no se produce, ni utiliza a nivel comercial, el aislado proteínico de ninguna variedad del género *Brassica* (Ohlson, 1985; Paulson y Tung, 1988). Esto es debido a que en la producción a nivel de laboratorio de aislados de variedades mejoradas de *B. campestris*, *B. napus* y Canola, aún quedan problemas sin resolver como la remoción de la fibra y fitatos así como en el rendimiento de los procesos, ya que contrario a otras fuentes proteínicas, las semillas de éste género tienen una gran variedad de proteínas de diferentes pesos moleculares y puntos isoeléctricos, por lo que las condiciones para extraer una tracción no necesariamente extraerán la totalidad, la mayor parte o nutricionalmente la mejor proteína presente. En la originalidad de este trabajo se incluye la obtención de un aislado proteínico de semilla de *B. campestris* con posible bajo contenido de fitatos y glucosinolatos, empleando como materia prima semillas de la especie silvestre colectada en Escobedo, N. L., lo que facilitará el conocimiento de sus proteínas, así como de su potencial para estos fines.

ANTECEDENTES

I. *Brassica campestris*.

Ia. Origen y distribución geográfica:

La mayoría de las crucíferas incluyendo la colza y el nabo, se originaron en las regiones montañosas del suroeste de Asia (Vavilov, 1951). Singh (1958) hace referencia a escritos antiguos que mencionan dos oleaginosas, la mostaza y la colza o nabo aceitero en el siglo trece. Por otra parte González (1974) cita que el nabo aceitero no tiene definido su origen siendo cultivado inicialmente en la India, posteriormente en Japón y China; y que la producción a nivel comercial ocurrió hasta el siglo XIII en Europa y finalmente llegó a Norte y Sudamérica. Lo anterior se complementa con la información de Kipps (1970) que enfatiza que el nabo se encontraba en Inglaterra en el siglo XVI y de ahí fué distribuido al resto de Europa, Asia, Canadá y Estados Unidos.

En 1942, *Brassica napus* era ya un cultivo de importancia en México y *Brassica campestris* silvestre o semicultivada también era importante cubriendo los mismos usos (Landaverde, 1942).

En la actualidad y a partir de los años cincuenta la mostaza o nabina comestible adquiere importancia a nivel mundial (Alschul y Wileke, 1985; Dale, 1982; Metcalfe y Elkins, 1980)

Mc. Gregor y Downey (1975) ubican el uso de las especies aceiteras del género *Brassica* de la siguiente manera: *B. juncea* utilizada en la India y China, *B. napus* en Europa y *B. campestris* usada en Canadá y Estados Unidos. Dietz et al. (1991) reportan que las variedades asiáticas son *B. campestris* o nabo y las europeas *B. napus*.

La distribución en México, en forma silvestre o semicultivada es amplia, ya que se encuentra en todo el país con excepción de los estados de Baja California, Sinaloa, Nayarit, Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Guerrero, Oaxaca, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Rzedowski, 1978). En forma cultivada la distribución es limitada ya que sólo se cultivan actualmente en el país aproximadamente 6,000 Ha. (Robles, 1982) encontrándose

principalmente en los estados de Puebla, Hidalgo y Tlaxcala.

lb. Origen citogenético:

En el caso de esta planta es difícil determinar su origen citogenético por que presenta gran facilidad de cruzamiento entre especies.

Poehlman (1979) explica la formación de especies tetraploides como son *B. juncea* con 36 cromosomas a partir de *B. campestris* de 20 y *B. nigra* de 16 cromosomas, y la formación de *B. napus* con 38 cromosomas partiendo de *B. campestris* y *B. oleracea* de 18. Lo anterior demuestra la alta capacidad de cruzamiento de estas plantas así como el hecho de que las tres especies originales o iniciales son *B. campestris*, *B. nigra*, y *B. oleracea*.

lc. Estructura:

Las semillas de *Brassica campestris* varían en color desde amarillo hasta café oscuro (Daun y DeClerck, 1988). Difieren de otras semillas económicamente importantes, ya que tienen un endospermo pequeño y la cubierta de la semilla ocupa de 12 a 20% del peso de la semilla (Appelqvist, 1972). El interior consiste principalmente en los cotiledones, los cuales contienen el aceite y gránulos ricos en proteína, en las células de aleurona que se encuentran bajo la cascarrilla. Cada célula está rodeada por una membrana celular compuesta en gran medida por celulosa. Los esferosomas están dispersos en el citoplasma. Los granos de aleurona miden de 2 a 10 μ m de diámetro (Ohlson, 1985).

ld. Composición química:

En las distintas variedades o cultivares de *Brassica* la composición química fluctúa aún dentro de una especie: para el aceite de 36 a 48%, de 23 a 27% la proteína, y de 10 a 11%

los carbohidratos (Ohlson, 1985).

La concentración de **carbohidratos** de bajo peso molecular es aproximadamente el 6% del peso seco de la harina desgrasada, correspondiendo al 20% del material hidrofílico (Anjou *et al.* 1979, citado por Ohlson, 1985). Åman y Gillberg (1977) mencionan que los carbohidratos de bajo peso molecular ocupan en la harina desgrasada aproximadamente el 10% y que de ellos los más abundantes son glucosa, arabinosa, xilosa y galactosa.

De los carbohidratos de bajo peso molecular predominan la sacarosa y la estaquiosa con 3 y 2% respectivamente. En menores concentraciones se encuentran la rafinosa, galactinol, digalactosilglicerol, glucosa, fructosa y mioinositol.

Los polisacáridos se encuentran en mayor cantidad en las cascarillas, principalmente la celulosa y la lignina que varía de 2 a 5.5% dependiendo del cultivar y del color de la cascarilla; entre más claro menor concentración de lignina. En los hidrolizados de polímeros de cascarillas se encuentra hasta 5% de ácidos urónicos (Aspinall y Jiang, 1974; Ohlson, 1985).

Los carbohidratos, polifenoles y lignina de las cascarillas han sido estudiadas por Theander *et al.* (1977).

Las pectinas de las cascarillas han sido caracterizadas por Aspinall y Jiang (1974).

Weber *et al.* (1974) han estudiado los mucílagos presentes en las cascarillas de las variedades oleíferas del género *Brassica*.

Siddiqui y Wood, aislaron y caracterizaron un aniloide soluble en agua (1971), reportan un arabinogalactano ácido en 1972 y un arabinano en 1973, todos de la harina de *B. campestris*.

Los polisacáridos de las harinas contienen grandes cantidades de arabinosa, glucosa, xilosa y galactosa (Ohlson, 1985).

El **aceite** se encuentra de 42 a 50% en la semilla de colza de invierno, de 37 a 47% en la de verano, en el nabo de invierno es de 40 a 48% y en el de verano de 36 a 46% en base seca (Ohlson, 1985). Dependiendo de la variedad de que sea extraído, está constituido por los siguientes ácidos grasos: erúcido (22:1) de 24 a 61%, oleico (18:1) de 11 a 31%, linoleico (18:2) de 11 a 31%, linoléico (18:3) de 6 a 14%, eicosenoico (20:1) de 0 a 12%

y palmítico (16:1) de 2 a 7%. En las variedades genéticamente mejoradas, con bajos niveles de ácido erúico, el ácido oleico se incrementa en la proporción en que disminuye el ácido erúico, por lo que los ácidos de 18 carbonos llegan a constituir hasta el 95% del aceite (Maheshwari et al. 1981).

Robles (1982) reporta un coeficiente de digestibilidad para el aceite de 98% en el humano y de 77% en ratas experimentales.

El contenido de proteína en la semilla silvestre colectada en Escobedo, N.L., es de 26% y en la harina desgrasada de la misma semilla es de 47%. La digestibilidad de la proteína desgrasada sin caseína es de 93% con pepsina (resultados de análisis preliminar realizados en el Lab. de Ciencia de Alimentos, F.C.B., U.A.N.L.)

La proteína es considerada de buena calidad evaluando su balance de aminoácidos esenciales, siendo rica principalmente en aminoácidos azufrados (Gillberg y Törnell, 1976). Jones (1979) cita la composición de aminoácidos esenciales de la proteína de *B.campestris* comparada muy favorablemente con el patrón de FAO/OMS, con un cómputo de 95, con isoleucina como primer aminoácido limitante para el humano.

Las proteínas del género *Brassica* tienen un valor nutritivo más alto que ninguna otra proteína vegetal (Ohlson y Anjou, 1979), debido a su contenido de lisina, metionina y cisteína.

Ohlson (1985) cita los niveles de lisina en *Brassica* similares a los de soya y mayor nivel de aminoácidos azufrados que los de esa leguminosa.

La proteína de *Brassica napus* y *Brassica campestris* tiene un buen balance de aminoácidos, especialmente rica en aminoácidos azufrados.

La cantidad de esta proteína se confirma con el reporte de Jones (1979) con un valor de índice de eficiencia proteínica (PER) de 2.50 para la harina detoxificada, igual al obtenido con caseína.

La composición de proteínas de estas semillas es compleja e involucra proteínas de bajo peso molecular (13 kDa) y puntos isoeléctricos cercanos a 11 en el 20 a 45% de la proteína total (Lönnerdal y Janson, 1972). También se encuentran proteínas ácidas con puntos isoeléctricos de 4 a 7 y de pesos moleculares elevados de hasta 320 kDa y proteínas neutras con puntos isoeléctricos de 6 a 8 y pesos moleculares intermedios y bajos de hasta

150 KDa (Lönnerdal et al., 1977)

La composición de aminoácidos también varía en cada fracción proteínica, pues Lönnerdal et al. (1977) preparó tres aislados proteínicos extraídos a pH 11 y precipitados a pH 6.6, 5.0 y 4.9, presentando cada uno diferente cómputo al comparar su composición de aminoácidos con el patrón FAO/OMS, siendo éste de 100 para el primero y último y de 69 para el segundo aislado, con la lisina como el primer limitante para el humano.

De lo anterior se resume que se pueden presentar pesos moleculares desde 13 KDa hasta 320 KDa y puntos isoeléctricos de 4 a 11 en las proteínas de ésta oleaginosa. Así mismo, la calidad nutricional y composición aminoacídica del aislado proteínico puede variar dependiendo de las condiciones de obtención del mismo y la fracción que sea extraída.

le. Aspectos toxicológicos:

Los principales problemas de toxicidad que pueden ocasionar las semillas del género *Brassica* se deben principalmente a la presencia de altos niveles del ácido erúico (ác. Cis-13-docosaenoico), éste al ingerirse en cantidades superiores al 10% de las calorías totales de la dieta causa acumulación rápida de grasa en el miocardio, inflamación del mismo y cambios similares en el músculo esquelético, fibrosis del miocardio, cirrosis hepática, y anemia hemolítica. Lo anterior observado en hamsters, ratas, monos, etc. (Mc. Gregor y Downey, 1974; Altschul y Wileke, 1985; Mattson, 1973).

Algunos autores discrepan en cuanto a la toxicidad de este ácido; Kramer et al. (1983) reportan valor nutricional similar para variedades tradicionales con alto contenido de ac. erúico y las variedades "canola" y "doble cero".

En el caso de la harina desgrasada uno de los principales problemas es la presencia de glucosinolatos, que al hidrolizarse con la tioglucosidasa presente en la misma semilla forman sulfato inorgánico, glucosa, y, dependiendo de las condiciones de hidrólisis, isotiocianatos, tiocianatos y nitrilos en varias proporciones. Estos compuestos causan agrandamiento de tiroides y los nitrilos específicamente ocasionan hepatomegalia, lesiones en hígado y riñones, así como pérdida de peso. En *B. campestris* el glucosinolato reportado

como el más abundante es gluconapina o 3-butenil-glucosinolato, que se puede encontrar hasta 10 a 12 mg/g en la torta de esta oleaginosa (VanEtten y Wolff, 1973; Ohlson, 1985; Campbell, 1987).

Para resolver el problema de los glucosinolatos se han realizado trabajos que proponen: la inactivación de la enzima tioglucosidasa con calor, autoclave, amoníaco, etc. (Jones, 1979; Lönnerdal, 1976; Eapen *et al.*, 1968; Dahlen y Goude, 1973, citado por Ohlson, 1985); extracción de los glucosinolatos con agua, metanol, etanol o acetona (Mattson, 1973; VanEtten *et al.*, 1969 y Shahidi y Gabon, 1990); tratamientos bioquímicos como germinación, descascarillado con celulasas y fermentación (Mustakas, 1963; Staron, 1970; Poznanski *et al.*, 1973, citados por Ohlson, 1985).

Sin embargo lo que ha tenido más impacto a nivel económico ha sido la introducción de variedades mejoradas con niveles muy bajos tanto de glucosinolatos, máximo 3 mg/g en la torta; como de ac. erúcido, máximo 5% en el aceite. Estas variedades se les llama "doble cero" en Europa y "canola" en Canadá (Dale, 1982; Canola Council of Canada, 1983).

El segundo factor que limita el uso de la harina de semillas del género *Brassica*, en la alimentación humana, es su alto contenido de fibra, debido a la cascarilla que permanece en buena medida en la torta y la cuál posee además polifenoles condensados que limitan la utilización de la proteína. En algunas variedades de *B. napus* y *B. campestris* la harina presenta de 13 a 16% de fibra (Jones, 1979), valor superior al de la harina de soya, ya que al ser la semilla más pequeña la proporción de cascarilla a cotiledones aumenta (Appelqvist, 1972).

Para resolver este último problema se han propuesto descascarillados por abrasión, lo cuál se dificulta por el tamaño de la semilla, así como por su fragilidad; descascarillado por enzimas lo que eleva los costos de producción; separación mecánica de las cascarillas en la harina utilizando tamizado y aire, lo que es suficiente para utilizar la harina en alimentación animal más no en humanos; y la preparación de concentrados o aislados proteínicos. En el caso de los concentrados el problema permanece pues aún contiene entre 6 y 8% de fibra en su composición, por lo que los aislados parecen ser la mejor opción.

Después de mantener durante muchos años la prioridad en investigación, los glucosinolatos empiezan a pasar a un segundo término, principalmente con la obtención de

las variedades canola y doble cero, siendo en años recientes el principal problema toxicológico investigado el ác. fítico (hexafosfoinositol). Este es el compuesto con fósforo en su molécula que se encuentra en mayor concentración en muchos vegetales importantes, como legumbres, cereales y oleaginosas (Posternak, 1903, citado por Graf y Dintzis, 1982). El ác. fítico forma complejos insolubles con cationes polivalentes, ocasionando que esos minerales no sean utilizados o absorbidos en el intestino y por lo mismo se presenten problemas de deficiencias de calcio, hierro y zinc. Además de lo anterior forman complejos también con proteínas disminuyendo su digestibilidad (Badui, 1990; Graf y Dintzis, 1982).

Es importante señalar que la soya mundialmente utilizada, contiene fitatos y que principalmente en los aislados proteicos que se utilizan como extensores o sustitutos de carne, esto llega a ser problema. Champagne y Phillippy (1989) utilizan un aislado de soya (Purina) conteniendo 1.30% de ác. fítico. Lease (1967) citado por Badui (1990) reporta que, ratas alimentadas con un aislado de soya, absorben el 44% del zinc ingerido, mientras que si la proteína es caseína la absorción es de 84%. Los autores mencionan que suplementar la dieta o el producto de soya con zinc, es la solución sugerida.

II. CONCENTRADOS Y AISLADOS PROTEINICOS.

Ila. Usos:

En años recientes ha habido una intensa actividad en la búsqueda de proteínas vegetales que puedan ser incorporadas a la alimentación humana, principalmente como alternativas de carne y leche (Jones, 1979).

Las proteínas para ser utilizadas en la industria alimentaria pueden prepararse como concentrados, o como aislados proteínicos. Los primeros son productos preparados a partir de materia prima de alta calidad, por remoción de la mayor parte del aceite y componentes no proteínicos solubles en agua. Los concentrados tienen aproximadamente 60% de proteína y los aislados proteínicos son productos que contienen aproximadamente 90% de proteína y por consiguiente, una mínima cantidad de compuestos no proteínicos (Ohlson, 1985). Los

estándares de identidad de Estados Unidos, marcan un mínimo de 70% de proteína para concentrados y 90% para aislados.

Proteínas de soya y en particular aislados proteínicos de ésta leguminosa, han sido usados como cremas para café, crema batida, yogurt, embutidos, productos texturizados sustitutos de carne, etc. Todo esto, debido a que las proteínas de la soya tienen muchas de las características químicas y físicas requeridas para los usos antes mencionados y poseen propiedades funcionales no disponibles en otras fuentes de proteína vegetal (Kolar et al., 1979).

Se han estudiado diversas fuentes vegetales para la obtención de concentrados y aislados proteínicos, y así se han propuesto aislados y concentrados proteínicos de lupino (*Lupinus albus* y *Lupinus angustifolius*), de semilla de jojoba (*Simmondsia chinensis*), de girasol (*Helianthus annuus*), de garbanzo y diversos concentrados foliares (King et al., 1985; Millan et al., 1984; Paredes-López et al., 1991; Millan et al., 1987).

Ib. Potencialidad de la proteína de *Brassica* en tecnología alimentaria:

La semilla de mostaza es una fuente potencial de proteína para elaboración de alimentos, basándose en la capacidad de producción de este cultivo y en el valor nutricional de su proteína. El interés de esta semilla como una fuente de proteína se materializa en los sesentas cuando empieza a ser apreciada (Jones, 1979).

La elaboración de concentrados proteínicos de *B. napus*, *B. campestris* y *B. juicea* principalmente se ha desarrollado en Canadá, Polonia y Suecia. La preparación de éstos se basa en la limpieza y descascarillado de la semilla, inactivación de la mirosinasa, remoción de los glucosinolatos con agua, secado del material y degasado con hexano. El material restante es el concentrado. Theander y Åman (1977, citados por Ohlson y Anjou, 1979) obtienen un concentrado con 65% de proteína en base seca, con un residuo de glucosinolatos muy bajo, habiéndose removido aproximadamente el 99% de la cantidad inicial. Sin embargo contienen relativamente altos niveles de ácido fítico, así como de carbohidratos insolubles en agua, como son los polisacáridos de las paredes celulares o fibra.

La composición típica de un concentrado proteínico de *Brassica* es la siguiente: proteína (nitrógeno x 6.25) 65%, grasa 1%, carbohidratos (excluyendo fibra) 28%, fibra cruda 7%, cenizas totales 7%, ac. fítico 6%, humedad 7.5%, y glucosinolatos menos de 0.03% (Ohlson, 1979 y 1985).

El inconveniente de los concentrados proteínicos es principalmente el alto contenido de fibra y de fitatos los cuáles intervienen en la utilización del zinc y otros minerales en los organismos, ya que en estudios hechos con ratas éstas presentaron signos de deficiencia y al analizar el contenido de éste elemento en hueso se encontró depleción en el mismo. El problema se revierte con la ingestión de mayores niveles de zinc en la dieta (Gorill *et al.*, 1974).

Además del problema antinutricional de la fibra y los fitatos en los concentrados, éstos tienen el inconveniente del color y sabor no atractivo para su uso en alimentos (Thompson *et al.*, 1982). Lo y Hill (1972) sugieren que el color presentado en estos aislados es debido a la presencia de ácido clorogénico y de ácido caféico.

Un aislado proteínico generalmente es preparado por la dispersión inicial del material crudo en una solución alcalina. Después de remover el material insoluble, las proteínas disueltas son recuperadas por precipitación ácida, debido a ésto el aislado contiene menos impurezas y su calidad funcional es más aceptable que la de los concentrados.

Los aislados proteínicos de *Brassica* aún no son manufacturados a nivel comercial (Ohlson, 1985), principalmente porque no se ha establecido una tecnología costeable con buenos rendimientos de producción, la cual elimine a la vez el problema de los fitatos y glucosinolatos.

Los rendimientos en la producción de un aislado dependen de muchos factores; entre otros el calentamiento durante el procesamiento de la torta y la necesidad de varias etapas de lavado a la proteína después de la precipitación. En el caso de una torta comercial, Owen (1971, citado por Ohlson, 1985) recuperó el 18% del nitrógeno original de la semilla, obteniendo un aislado con 84% de proteína. Sosulski *et al.* (1972) bajo condiciones de laboratorio reportaron un rendimiento cercano al 50% y el aislado contenía 86% de proteína. Kroon *et al.* (1970, citados por Ohlson, 1985) tuvieron rendimientos de entre 29 a 49% y productos conteniendo más de 90% de proteína.

Törnell *et al.* (1972, citado por Ohlson, 1985) menciona que si se desea obtener un aislado capaz de formar fibras, se deben remover todos los fitatos para utilizar el producto como sustituto de carne. Lo anterior podría hacer competir éste producto con el de la soya.

Se han preparado a nivel de laboratorio aislados proteínicos, utilizando diferentes esquemas de extracción o solubilización de las proteínas, así como de recuperación de la proteína extraída.

Gillberg y Törnell (1976) prepararon tres aislados proteínicos partiendo de *B. napus*: uno a pH 11.1 y la recuperación de la proteína fué por precipitación a pH 4, obteniendo 75% de proteína y 16% del ac. fítico inicial; otro a pH 8.2 y la precipitación a pH 3.7, obteniendo 48% de nitrógeno y 18% de ac. fítico iniciales, no reportando el contenido de proteína; y por último a pH 6.2 y precipitando a pH 4 obteniendo un aislado con 85% de proteína en el que se conservó un 20% de ac. fítico inicial.

Lönnerdal *et al.* (1977) preparan también tres aislados a partir de *B. napus*. En éste caso los tres se extraen a pH 11.1, pero el primero se precipita a pH 4.9, el segundo a pH 6.6 y el tercero se obtiene por una precipitación a pH 5, de las proteínas que permanecieron solubles en el sobrenadante de la precipitación anterior. Sin embargo el objetivo del trabajo está en función de conocer las proteínas y sus características, más que en establecer un proceso tecnológico para la producción de aislados y así, omiten datos de producción o rendimiento; utilizan polímeros aniónicos como la carboximetilcelulosa para facilitar la precipitación de las proteínas, y enfatizan los tipos de proteínas que se encuentran en cada aislado en cuanto a pesos moleculares, puntos isoeléctricos y composición de aminoácidos.

Åman y Gillberg (1977) preparan los tres aislados de la misma manera, y estudian ahora la distribución de carbohidratos, encontrando generalmente en los aislados, azúcares simples tales como arabinosa, ribosa, galactosa, glucosa, xilosa, fucosa, ramnosa y azúcares ácidos como el ac. galacturónico, todos en pequeña cantidad.

Bhatty (1972) extrae las proteínas de bajo peso molecular (cerca de 13 KDa), y con puntos isoeléctricos alrededor de 11, solubilizándolas en 5% de ac. tricloroacético.

Diosday *et al.* (1984) preparan aislados usando *B. napus*, por el método de ultratiltración en dos etapas y posteriormente concentrando por evaporación el producto diluido, obteniendo un aislado con 80.4% de proteína.

Cho y Thompson (1984) preparan un aislado, acetilando inicialmente la harina de *B. napus* para facilitar la extracción de la proteína, posteriormente recupera ésta por precipitación isoeléctrica y por diálisis, encontrando mejores rendimientos al utilizar diálisis y el aislado contiene sólo 0.9% de ácido fítico en ambos casos.

Lacroix *et al.* (1983), obtienen a partir de harina desgrasada y libre de cascarilla (no mencionan especie) un aislado por ultrafiltración, previa hidrólisis enzimática parcial de las proteínas.

Es importante mencionar aquí, que el uso de un aislado puede estar limitado por el incremento en los costos de producción causado por rendimientos de producción reducidos, alto costo de lavado de la proteína cruda para eliminar impurezas, y altas cantidades de desechos. Una alternativa para mejorar ésto puede ser, partir de la torta previamente purificada o bien, de un concentrado proteínico para elaborar el aislado (Ohlson, 1985).

IIc. Funcionalidad de las proteínas y aplicaciones en alimentos:

Algunos de los más importantes aspectos de las proteínas vegetales, son sus propiedades funcionales. Ellas determinarán el tipo de aplicación que podrá tener un nuevo ingrediente proteínico, y su competitividad en el mercado.

Una definición adecuada de propiedades funcionales de una proteína es la siguiente: son propiedades fisicoquímicas que dan información sobre cómo una proteína se comportará en un sistema alimentario (Hermansson, 1979).

El comportamiento funcional de las proteínas en un sistema alimentario es el resultado de una compleja interacción entre la composición, estructura y propiedades fisicoquímicas de las proteínas "per se", de sus interacciones con otros componentes, tales como lípidos y carbohidratos, y la naturaleza del medio en el cuál están asociadas (Kinsella, 1979, citado por Paulson y Tung, 1987).

Las propiedades que son de interés general son las siguientes: solubilidad, viscosidad, textura, capacidades espumantes, de absorción de agua y de aceite, emulsificante, gelificante, y de hinchamiento.

Sosluski et al. (1976) mencionan que las harinas de *Brassica* son comparables a la harina de soya en cuanto a absorción de agua, pero las primeras muestran mucha más alta solubilidad de nitrógeno, absorción de grasa, emulsificación de aceites, capacidad de batido, y estabilidad de la espuma. Las curvas del viscoamilógrafo para harinas de *Brassica* se caracterizaron por picos intermedios y alta viscosidad en frío, pero sus propiedades gelificantes fueron malas. Desafortunadamente la harina no puede ser usada para consumo humano debido a los glucosinolatos presentes.

Los concentrados y los aislados muestran excelentes capacidades de retención de agua y aceite; el aislado tiene muy alta capacidad emulsificante y buenas características de batido, sin embargo, el uso de estos productos puede estar limitado por el color café o verde que presentan en solución acuosa.

Thompson et al. (1982) encuentran en un concentrado de *B. napus* buena solubilidad de nitrógeno, absorción de grasa, emulsificación y capacidad de batido o espumante, pero mala absorción de agua y gelificación. El mismo autor elabora salchichas y merengue de mejor calidad con éste concentrado que con el de soya. También hace mención al inconveniente del color para el merengue.

Ohlson (1985), además de las anteriores propiedades del concentrado de *Brassica*, menciona su alta capacidad de ligar grasas, propiedad que puede ser utilizada para regular el contenido de grasa en los alimentos.

Algunas de las propiedades físicas pueden ser modificadas, por ejemplo: la capacidad espumante, emulsionante, la estabilidad de la emulsión, y la solubilidad de nitrógeno mejora al tratar la proteína con anhídrido succínico que modifica los grupos amino libres de la misma (Paulson y Tung, 1988). Los mismos autores en otro estudio (1988) reportan también la reología y microestructura de las dispersiones de aislado proteínico de canola, y encuentran un incremento en viscosidad con el succinolato.

METODOLOGIA.

I. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LA SEMILLA DE *Brassica campestris*.

La semilla silvestre fué colectada en Escobedo, Nuevo León, y la "comercial", fué adquirida en los mercados de la localidad, a donde es traída principalmente de los Estados de Puebla y México.

Tanto la semillas cómo las harinas desgrasadas y libres de cascarilla fueron analizadas por duplicado con las siguientes determinaciones:

Humedad, Materia seca, Ceniza, Extracto etéreo, Fibra cruda, Proteína y Extracto libre de nitrógeno (AOAC, 1990)

Densidad energética Cal/g (con factores de Atwater, Scheider, 1985)

Glucosinolatos (Saini y Wratten, 1987) con tioglucosidasa Sigma.

Fitatos (Obreras, 1973 y Wheeler y Ferrel, 1971)

Zinc ppm, Hierro ppm, Manganeso ppm, Calcio % y Magnesio% por absorción atómica (Zeiss, 1978)

Fósforo total por absorción atómica (Zaugg y Knox, 1966)

En la harina desgrasada además se realizó la determinación de valor proteínico relativo (RNV), con *Tetrahymena thermophila* (Baker, H. et al., 1978) y Digestibilidad "in vitro" con pepsina (AOAC, 1990).

II. INACTIVACION DE LA MIROSINASA.

A partir de aquí se trabajó con la semilla silvestre. Primero se diseñó un experimento tendiente a comprobar si la enzima era inactivada por las condiciones de temperatura recomendadas en la literatura o si este tratamiento puede ser sustituido por las condiciones de extracción del aceite.

Ila. Experimento 1

Se realizó una extracción de la mirosinasa de acuerdo a Saini y Wratten (1987). Se parte de 100 g de semilla molida finamente, en un molino de café, la harina fué extraída en una licuadora con 500 ml de buffer de acetato de sodio de pH 4.9, almacenando la suspensión por dos horas a 4°C, centrifugando el extracto 15' a 18,000 rpm y 4°C. Al sobrenadante se le adiciona 70% de una solución de sulfato de amonio saturado, almacenando de nuevo por 2 hr a 4°C. El precipitado se recupera por centrifugación 20' a 18,000 rpm a 4°C, posteriormente se resuspende en un mínimo de agua y se dializa con dos cambios de agua en 24 horas a 4°C, después de lo cuál se centrifuga con las mismas condiciones anteriores. Al sobrenadante se agrega 70% de acetona fría, almacenando toda la noche a 4°C. El precipitado se recupera por centrifugación, se resuspende en 150 ml agua fría y se liofiliza.

La actividad de la enzima extraída se detectó incubando durante 15' a 37°C, 0.1 mg del precipitado enzimático de la semilla, resuspendido en buffer de tris pH 7, con 5 µM de sinigrina (Monohidratada, Aldrich), se cuantificó glucosa libre proveniente de la hidrólisis del glucosinolato.

Lo anterior fué realizado por triplicado, con semillas sin tratar y tratadas de la siguiente manera: A) a 90°C por 18' (Lönnnerdal *et al.*, 1977) y B) trituradas, descascarilladas y desgrasadas en soxhlet con hexano a 80°C por 2 Hrs.

Se corrió un control de sustrato conteniendo sinigrina sin adición de enzima.

La glucosa libre se analizó con el método de glucosa-oxidasa (Sigma); se estableció una curva estándar de glucosa con concentraciones de 0 a 100 µg y la lectura de absorbancia

se hizo a 515 nm en un Espectrofotómetro Beckman 25.

IIb. Experimento 2.

En un segundo experimento, en lugar de extraer la enzima se utilizó la semilla sin tratar y la semilla tratada con los tratamientos mencionados, basando esto en la técnica de Saini y Wratten (1987) para cuantificar glucosinolatos.

50 mg de semilla (contiene 3.15 μ M de glucosinolato) fueron molidos en un mortero con 2 ml de buffer de tris a pH 7, pasada a un tubo cónico graduado. El mortero fué lavado dos veces con 1 ml. de buffer cada vez, recuperándose los lavados en el tubo y ajustando el volumen de éste a 5 ml con el mismo buffer.

Tanto para la semilla sin tratamiento cómo para la semilla tratada, se prepararon 6 tubos, a tres de los cuáles les fué adicionado un ml de sinigrina (5 μ M). Los tubos fueron incubados 2 hr a 37°C en baño de agua con agitación ocasional, posteriormente se detiene la reacción agregando 5.1 ml de reactivo precipitante de proteínas, preparado a base de tungstato de sodio y se centrifuga. Del sobrenadante es tomado 1 ml para la determinación de glucosa, tal y como se describió anteriormente.

Se preparó un tubo control de sustrato con sinigrina, sin adición del extracto de semilla.

III. TRITURADO Y DESCASCARILLADO.

La semilla seca fué triturada o quebrada, obteniéndose los cotiledones y cascarillas. Luego las cascarillas fueron removidas por suspensión en aire y cribado.

IV. EXTRACCION DEL ACEITE Y DESOLVETIZADO.

Para la extracción del aceite se utilizó inicialmente hexano probándose dos tiempos

de extracción, con la proporción muestra : solvente 1:15 p/v, recomendada por diversos autores en la literatura (Ohlson, 1985). Ya que de ninguna manera se podría repetir la condición industrial de extracción y cómo el grado de extracción logrado con hexano no fué adecuado, el aceite residual interfería con la extracción de las proteínas, por lo que se decidió realizar una extracción en soxhlet con éter etílico.

Después de la extracción del aceite la muestra fué desolvatizada, en horno a 70°C.

V. SOLUBILIZACION DE LAS PROTEINAS.

Para solubilizar las proteínas se procedió a realizar extractos a diferentes pH: 6, 6.5, 7, 7.5, 8.2 y 10.8, con el siguiente esquema:

Va. Obtención de las proteínas.

1 litro de agua desionizada a 25°C a pH 7

+

75 g de harina desgrasada

+

ajustar el pH con NaOH 0.1M

+

mantener el pH con agitación durante 30' a temp. ambiente.

↓

adicionar agua desionizada, para una relación final de 1/20 p/v (Gillberg y Törnell, 1976)

(Volumen final 1,500 ml con 75 g de muestra)

↓

Centrifugar a 6,000 RPM a 20°C por 25 minutos.

(3,000 RCF)

↓

recuperar el sobrenadante

VI. DETERMINACIONES QUIMICAS Y ELECTROFORETICAS DE LOS EXTRACTOS.

En el sobrenadante se realizó una medición aproximada de la proteína extraída, realizando lecturas a 260-280 nm, inmediatamente después de la extracción, para lo cual fué necesario antes de la lectura realizar diluciones 1:20 y/o 1:40 de los extractos. La fórmula empleada es la siguiente: $(1.55)(\text{Abs } 280) - (0.76)(\text{Abs } 260) = \text{mg proteína/ml}$.

También fué probado el uso de otro método con lecturas a 215 y 225 empleando la fórmula $1.44(\text{Abs } 215 - \text{Abs } 225) = a \text{ } \mu\text{g/ml}$ (Cooper, 1977).

En el sobrenadante se determinó también proteína por el método de Kjeldhal ($N \times 6.25$; AOAC, 1990), y fitatos por el método de extracción clásico de Oberleas (1973), cuantificando el fósforo liberado del fitato según Wheeler y Ferrel (1971).

Muestras de los sobrenadantes, se aplicaron en geles de acrílamida inicialmente al 10%, después al 7.5% y con un gel de entrada a 5%, con buffer de cámara 0.173 M tris-glicina pH 8.2. Se realizó una tinción con azul de coomasie, después de la observación de los geles, se realizó una segunda tinción con plata (Schleif y Wensink, 1986).

El procedimiento anterior de electroforesis fué repetido pero ahora con condiciones desnaturalizantes empleando dodecilsulfato de sodio (SDS), y además de los sobrenadantes fué aplicado un estándar de pesos moleculares Sigma SDS-6H. Las corridas (tres) se realizaron a 70 mA por gel.

VII. PRECIPITACION DE LAS PROTEINAS.

Selección de pH adecuado

Posteriormente se trabajó con los extractos de pH 7 y 8, para precipitar la proteína, y mantener disuelta la mayor cantidad posible de fitatos. Se evaluaron los siguientes pH: 3.5,

4, 4.5, 5 y 5.5. Para bajar el pH al valor deseado se utilizó HCl 0.1N. El precipitado se recuperó por centrifugación a 7,000 RPM, a 10°C por 25'. Se lavó dos veces, centrifugando cada vez, se deshidrató y pesó. En el sobrenadante se determinaron nitrógeno disuelto y fitatos disueltos, obteniendo por diferencia los fitatos precipitados.

VIII. LIOFILIZACION.

Una vez seleccionado el pH de solubilización y el de precipitación óptimos (7.5 y 4), se realizaron extracciones sucesivas con las finalidad de reunir la cantidad de aislado suficiente para ser caracterizado lo más completamente posible. Las proteínas obtenidas fueron liofilizadas para su conservación correcta.

IX. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA Y NUTRICIONAL DEL AISLADO OBTENIDO.

ELECTROFORESIS (Schleif y Wensink, 1981)

PROTEINA (AOAC, 1990)

FITATOS (Oberelas, 1973 y Wheeler y Ferrel, 1971)

GLUCOSINOLATOS (Saini y Wratten, 1987)

AMINOACIDOS (Manual Beckman, Modelo 119)

COMPUTO QUIMICO (Pellet, 1980)

VALOR PROTEINICO RELATIVO. (Baker, H. et al., 1978)

- PROPIEDADES FUNCIONALES: Solubilidad de nitrógeno (AACC, 1974)
- Capacidad espumante y estabilidad de espuma (Lawhon y Cater, 1971)
- Capacidad de absorción de agua (Sosulski, 1962)
- Capacidad de absorción de aceite (Lin et al., 1974)
- Capacidad emulsificante de aceite y estabilidad de la emulsión (Marshall et al., 1975)
- Densidad, expresada como volumen por gramo de muestra (Thompson et al., 1982).

En las propiedades funcionales se utilizó un control de un aislado comercial de soya SUPRO, utilizado en la elaboración de embutidos. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado, con desviaciones estándar de no más de 2%.

RESULTADOS.

I. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LA SEMILLA Y PASTA.

Los resultados del análisis químico y nutricional de la semilla comercial y silvestre se reporta en el Cuadro I. Y en el Cuadro II, los de la harina o pasta de *Brassica campestris*.

En ellos se observa que el contenido de fibra es similar en los dos tipos de semillas, y el de ceniza es superior en la semilla silvestre.

En la pasta el contenido de ceniza es mucho más alto, que en la semilla integral, por lo que los minerales se encuentran de manera importante también en los cotiledones.

El aceite es el componente más valioso de estas semillas, por su uso a nivel industrial o comestible, en este trabajo la semilla comercial tuvo 41% y la silvestre 33%.

En la torta obtenida de semillas descascarilladas permanece un remanente de 1.5% y 1.3% en la torta de la semilla comercial y silvestre respectivamente.

La semilla de la localidad tiene mayor contenido de proteína 26% (Nx6.25), que la comercial, Cuadro I. Y en la torta obtenida la concentración de proteína lograda fué de 47%.

Otro aspecto positivo es la buena digestibilidad de la proteína de estas semillas, ya que en la pasta con cascarilla presentó un valor de 79%, similar al de soya de 78% (Pellet, 1980) y en la pasta libre de cascarillas el valor mejoró hasta 93%, determinada "In vitro", con pepsina.

En lo que respecta al valor nutricional de la torta sin cascarilla o harina de *B. campestris*, se obtuvo un valor nutritivo relativo a caseína de 97.93%, con *Tetralymena thermophila*.

La densidad energética fué levemente más alta en la semilla comercial, y en la torta la densidad es igual en ambas harinas.

En lo que respecta a los factores tóxicos o antinutricionales característicos de estas semillas, los glucosinolatos se presentaron en niveles superiores en la semilla comercial, ya que en la silvestre, fueron menores al 1%.

En el caso de la pasta, el contenido de glucosinolatos fué similar en la semilla

comercial y en la silvestre; 2.36 y 2.30% respectivamente, cuando la torta está libre de cascarilla. En la torta con cascarilla los contenidos se diluyeron, quedando en 1.77 y 1.40%.

El contenido de fitatos en la semilla comercial y su torta, es superior al de la silvestre, y en la torta sin cascarilla el contenido de fitatos fué casi el doble de lo encontrado en la semilla. Si la torta permanece con la cascarilla el valor es menor al de la torta libre de esta.

Comparando las semillas silvestre y comercial, en cuanto al contenido de minerales, se encontró que tienen concentraciones similares de fósforo, calcio y magnesio. Que el zinc y el hierro se encuentran en menor concentración en la especie silvestre y el manganeso en mayor concentración en ésta.

El calcio en la semilla está en una concentración de 0.8% y en la torta descascarillada 0.4%.

El magnesio en la semilla se encontró en 0.3% y en la torta 0.1%, si la torta se obtiene con cascarilla el Mg es el 0.2%. El Zn, Fe y Mn se concentran en la torta ya que los valores en ésta son superiores a los de la semilla.

CUADRO I

CARACTERIZACIÓN DE LA SEMILLA DE *B. campestris*

	Comercial	Silvestre
Humedad %p/p	5.55	4.84
Materia seca %p/p	94.5	95.16
Ceniza %p/p	3.61	4.38
Extracto etéreo %p/p	41.64	33.50
Fibra cruda %p/p	13.03	13.43
Proteína %p/p	20.69	26.00
Extracto libre de nitrógeno %p/p	21.03	22.69
Densidad energética Cal/g	5.41	4.96
Glucosinolatos %	1.13	0.92
Fitatos mg/100g	40.0	32.5
Zinc ppm	60.0	52.0
Hierro ppm	81.0	71.0
Manganeso ppm	28.0	35.0
Fósforo %	1.8	1.8
Calcio %	0.7	0.8
Magnesio %	0.3	0.3

CUADRO II

CARACTERIZACION DE LA HARINA DESGRASADA DE
B. campestris

	Comercial	Silvestre
Humedad %	6.0	5.6
Materia seca %	93.9	94.3
Ceniza %	7.0	7.2
Extracto etéreo %	1.5	1.3
Fibra cruda %	3.0	3.8
Proteína %	47.1	48.0
Digestibilidad %	92.0	92.8
	(77)*	(79)
RNV %	98.0	98.0
Extracto libre de nitrógeno %	41.4	39.7
Densidad energética Cal/g	3.67	3.63
Glucosinolatos %	2.36	2.30
	(1.77)	(1.40)
Fitatos mg/100g	84.4	67.4
	(63.1)	(39.2)
Zinc ppm	64.0	69.0
	(77)	(80)
Hierro ppm	91.0	100.0
	(99)	(110)
Manganeso ppm	40.0	46.0
	(53)	(60)
Fósforo %	1.7	1.8
	(2.1)	(2.3)
Calcio %	0.4	0.4
	(0.7)	(0.8)
Magnesio %	0.1	0.1
	(0.2)	(0.2)

()* en harina con cascavilla, ** No detectables, % es p/p.

I. INACTIVACION DE LA MIROSINASA.

Con la finalidad de detectar cuándo la enzima está ya inactiva, para no practicar tratamientos quizá innecesarios, se encontró:

En el Experimento 1. después de incubar el precipitado enzimático de la semilla no tratada, se cuantificó glucosa correspondiente a la hidrólisis de $0.932 \mu\text{M}$ de glucosinolato. Si consideramos que la concentración inicial de sustrato era $5 \mu\text{M}$, la enzima logró hidrolizar prácticamente un 20% del sustrato, sin embargo el valor de 0.932 es la media de tres determinaciones y la desviación estándar fué de ± 0.21

Cuando el precipitado enzimático se obtuvo de la semilla tratada, no se detectó glucosa. En el control conteniendo sólo sinigrina tampoco se registró lectura.

En el Experimento 2. igual que en el anterior se pretendía determinar si la enzima era inactivada por las condiciones de extracción del aceite o si requería el tratamiento previo recomendado por autores diversos.

En este caso las semillas tratadas adicionadas con sinigrina y sin tratar sin ninguna adición de sustrato extra, presentaron valores similares en la cuantificación de glucosa, obteniéndose equivalentemente una media de 0.297 ± 0.08 y $0.292 \pm 0.06 \mu\text{M}$ de glucosinolato hidrolizado respectivamente. En las semillas sin tratamiento adicionadas con $5 \mu\text{M}$ de sinigrina, el glucosinolato hidrolizado fué de 0.592 ± 0.005 . Por lo que haciendo la corrección lógica se realizó una hidrólisis de $0.295 \mu\text{M}$ de la sinigrina adicionada o sea aproximadamente el 6 %.

III. EXTRACCION DEL ACEITE Y DESOLVETIZADO.

En la extracción realizada con hexano en proporción 1:15, a los 90 minutos se extrajo el 66% del aceite y a 120 minutos 77%. Ya que el aceite remanente dificultaba la extracción de las proteínas, formando en las etapas de centrifugación, una capa que no permitía la separación y con fines analíticos se realizó la extracción con éter, obteniendo así una harina con sólo 1.41 % de grasa.

IV. SOLUBILIZACION DE LAS PROTEINAS.

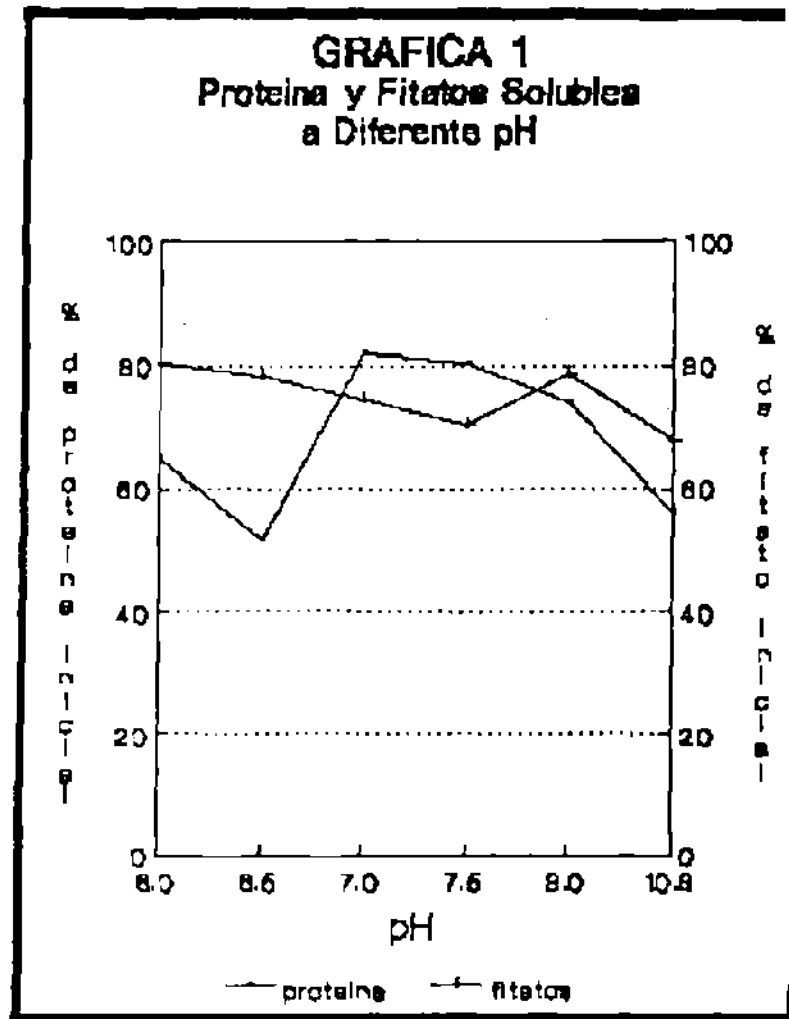
En lo que respecta a la detección de la proteína disuelta bajo las diferentes condiciones de pH, al evaluar el método 260-280 con albúmina, se encontró que en concentraciones de 150 a 400 µg/ml el error era de 6% y hasta 1200 µg/ml el error era de 10%.

Por el contrario el método con lecturas a 215 y 225 en la evaluación realizada con albúmina, éste requería un rango de concentración de 20 a 70 µg/ml, más bajo de lo que en los extractos preliminares se obtenía, y la detección tenía un error de 9%. Así que el primer método fué seleccionado.

Cómo se puede ver en la Graf. 1, la máxima cantidad de proteína disuelta se obtiene a pH superiores a 7.

A pH medios de 7, 7.5 y 8, se lograron solubilidades de 82, 80 y 74% de la proteína inicial, y a pH de 6 y 6.5 la extracción bajó. En lo que respecta a la solubilidad de los fitatos, estos tuvieron menos variación sin embargo los menores niveles de extracción fueron a pH 7.5 y 10.8 (70 y 68%).

Valorando los resultados obtenidos, se decidió seleccionar como pH de extracción pH 7 y 8, por presentarse buena extracción de proteína y la menor de fitatos.



V. ELECTROFORESIS DE LOS EXTRACTOS.

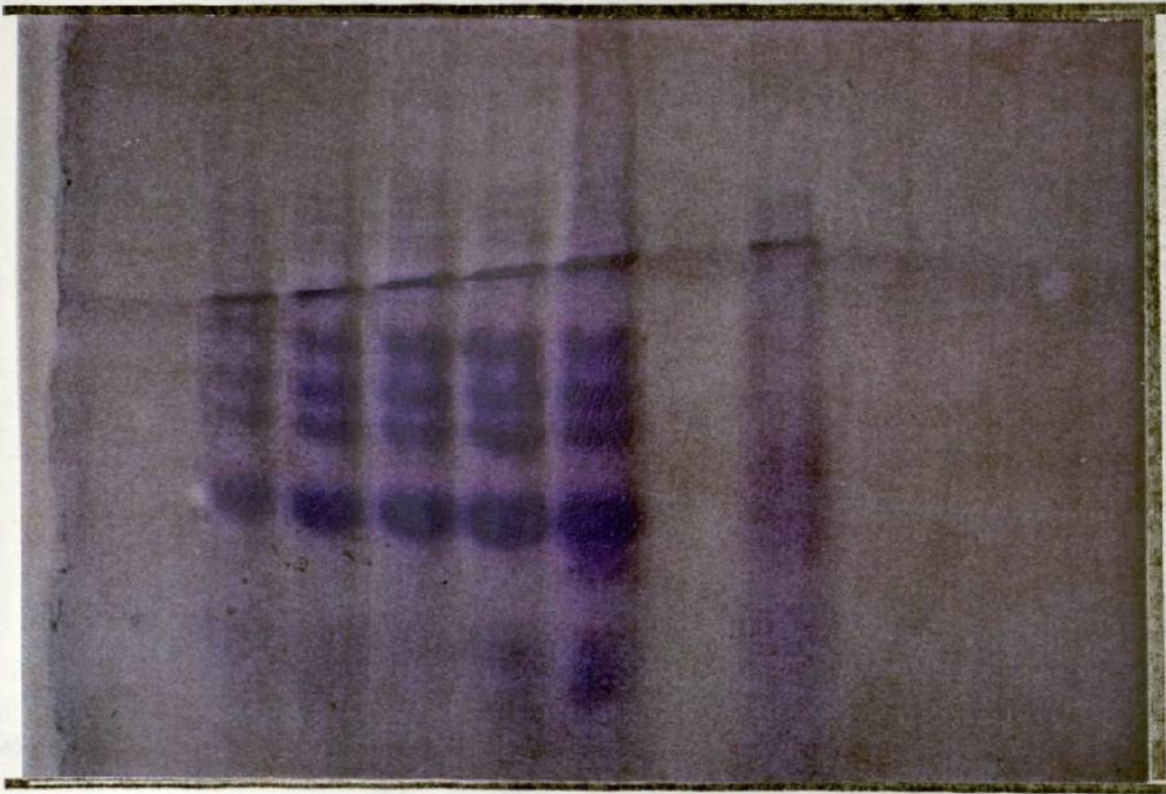
Después de solubilizadas las proteínas a los diferentes pH se realizaron algunas pruebas electroforéticas consideradas introductorias o preliminares, encontrándose lo siguiente:

Los extractos obtenidos a los diferentes pH fueron aplicados en geles de poliacrilamida, inicialmente a 10% no lográndose resolver, posteriormente en geles a 7.5%, se observan con tinción de coomassie, 4 manchas que suponemos igual número de proteínas, de las cuáles una es la más abundante, pero permanecen en la parte superior del gel por lo que la resolución no es considerada buena (Fotografía 1). Por lo anterior se probaron



FOTOGRAFIA 1.
ELECTROFORESIS DE PROTEINAS NATIVAS
EXTRAIDAS A DIFERENTE pH.

posteriormente condiciones desnaturizantes en el extracto con SDS, gel de entrada a 5% y de resolución a 7.5%, observándose en la Fotografía 2, 12 bandas, 4 de las cuáles están en mayor concentración en todos los extractos (Extractos pH 6, 6.5, 7, 7.5 y 10.8).



FOTOGRAFIA 2

ELCTROFORESIS DE PROTEINAS DESNATURALIZADAS
EXTRAIDAS A DIFERENTE pH.

Al calcular los Rf y compararlos contra los estándares, se determinaron los pesos moleculares reportados en el cuadro siguiente:

CUADRO III.

PESOS MOLECULARES (KDa) DE LAS PROTEINAS EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS

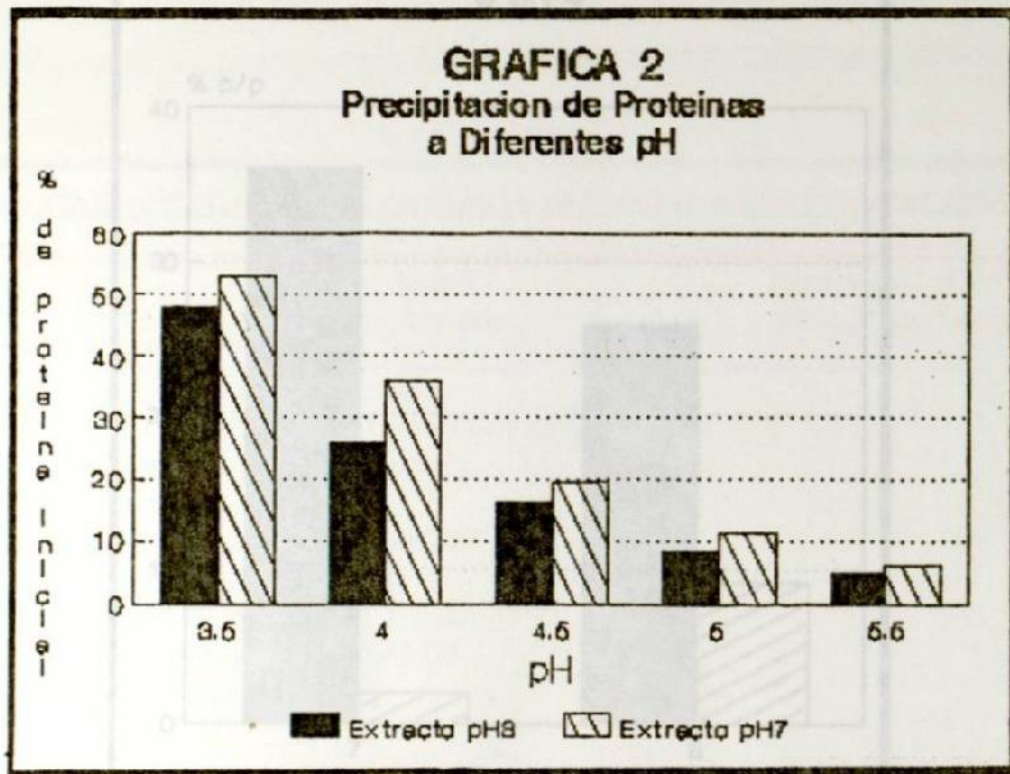
pH 6	pH de extracción		
	pH 7	pH 8.2	pH 9.2
74	74	74	74
66	66	66	66
60	60	60	60
56	56	56	56
52	52	52	52
44	44	44	44
40	40	40	40
36	36	36	36
			30
27	27	27	27
25	25	25	25
20	20	20	20
10	10	10	10

Las fracciones correspondientes a los pesos moleculares de 20 a 36 KDa. fueron las de mayor concentración.

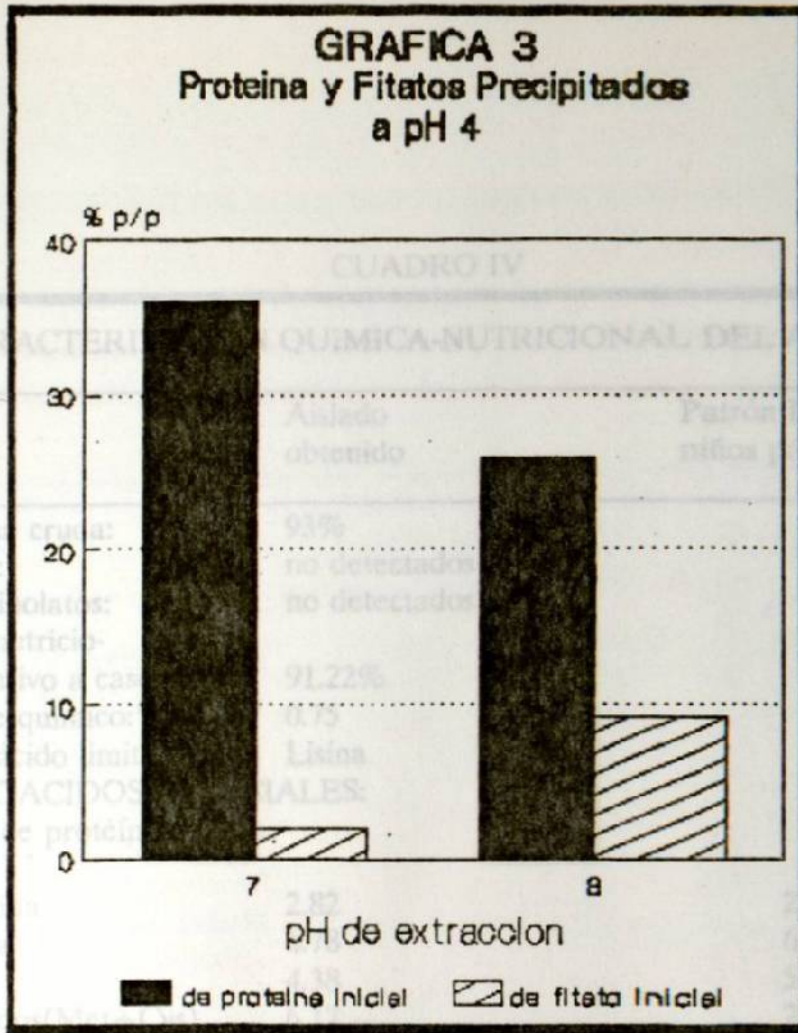
VI. PRECIPITACION DE LAS PROTEINAS.

Posteriormente se trabajó con los extractos de pH 7 y 8, para precipitar la proteína, y mantener disuelta la mayor cantidad posible de fitatos. En la Graf.2 se observa que la mayor precipitación, se logró a pH 3.5 y 4 en ambos extractos, siendo superior en el extracto pH 7. En los restantes pH de precipitación, el rendimiento fué igualmente bajo en los dos extractos.

GRAFICA 2
Precipitación de Proteínas
a Diferentes pH



Al determinar el rendimiento en base a proteína inicial y precipitada se tuvo una recuperación máxima de 53% en el extracto de pH 7, precipitando a pH 3.5. Sin embargo ya que los fitatos precipitan más a bajos pH y que la acidez extrema puede dañar la proteína, fué seleccionado el pH de precipitación de 4, con un rendimiento o recuperación de 36% en el extracto pH7 y de 26% en el extracto pH8. Después de obtener el precipitado proteínico a este pH, se analizaron los sobrenadantes para fitatos encontrándose por diferencia que sólo precipitaron 1.93% de los fitatos iniciales de la harina en el extracto pH 7, por lo tanto 1g de proteína contienen sólo 0.094 mg de fitato. Por el contrario en el de pH 8, precipitaron 9.26% y 1g de proteína contienen 0.45 mg de fitatos (Graf.3).



VII. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA Y NUTRICIONAL DEL AISLADO OBTENIDO:

El aislado liofilizado se caracterizó, obteniéndose los resultados mostrados en el Cuadro IV.

Las propiedades funcionales determinadas en el aislado obtenido así como en un aislado de soya comercial, se muestran en el Cuadro V.

En general se observa en el Cuadro V, que el aislado de *Brassica* tiene mejor capacidad de absorción de aceite y espumante, que el aislado de soya. Y que éste último supera al aislado obtenido en cuanto a las demás propiedades evaluadas.

CUADRO IV

CARACTERIZACION QUIMICA-NUTRICIONAL DEL AISLADO

	Aislado obtenido	Patrón FAO/OMS/UNU niños preescolares.*
Proteína cruda:	93%	
Fitatos:	no detectados	
Glucosinolatos:	no detectados	
Valor nutricional relativo a caseína:	91.22%	
Puntaje químico:**	0.75	
Aminoácido limitante:	Lisina	
AMINOACIDOS ESENCIALES:		
g/100g de proteína		
Isoleucina	2.82	2.8
Leucina	6.78	6.6
Lisina	4.38	5.8
Azufrados(Met+Cys)	6.12	2.5
Aromáticos(Phe+Tyr)	8.06	6.3
Treonina	5.71	3.4
Triptofano	2.24	1.0
Valina	4.48	3.5
Histidina	8.95	1.9

* Citado por Paredes *et al.*, 1991.

** Al utilizar el Patrón para puntaje de FAO/OMS 1973 el Puntaje del aislado obtenido dá un valor de 0.70 con isoleucina como primer limitante.

CUADRO V

PROPIEDADES FUNCIONALES DE AISLADO DE *B. campestris*
Y DE SOYA

	aislado obtenido	aislado soya *	aislado soya **
Absorción de aceite	272%	212%	200%
Absorción de agua	302%	569%	478%
Capacidad espumante ***	124%	20.6%	19%
Estabilidad de espuma			
permanencia a 1 Hrs.	92%	3%	10%
permanencia a 2 Hrs	84%	0%	10%
Capacidad emulsificante &*			
ml de aceite/0.5g de aislado	65	110	191.3
Estabilidad de la emulsión			
agua libre a las 35 Hrs.	26 ml	7 ml	14 ml
Densidad	3.8 ml/g	2.5 ml/g	2.8 ml/g
Solubilidad de nitrógeno			
a pH 7.	6.58%	51%	56.9%

* Supro, resultados de nuestro análisis. ** Promine D. (Thompson et al. 1982)

*** Con suspensiones al 3%. &* Con suspensiones al 1%

DISCUSIONES.

1. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LA SEMILLA Y HARINA.

Al analizar los resultados presentados en el Cuadro I, observamos que el contenido de humedad coincide con el rango lo citado por Ohlson (1985) de 6 a 8% y el contenido de fibra es similar en los dos tipos de semillas. Cheftel y Cheftel, 1976 para colza señalan 4% de fibra en la semilla. Sin embargo Ohlson (1985) ha mencionado que para las especies del género *Brassica* las cascarillas representan del 12 a 20% del peso de la semilla y que el embrión consiste principalmente de dos cotiledones los cuáles contienen aproximadamente el 50% del aceite y granos ricos en proteína en las células de aleurona, justo bajo la cubierta o cascarilla; y que cada célula está rodeada por una pared celular compuesta principalmente de celulosa; lo que justifica el hecho de que aún retirando la cascarilla para la obtención de la torta, sigue presentándose un contenido de fibra de 3%. En la soya la cascarilla representa sólo el 8% del peso de la semilla (Badui, 1990), mientras que en la semilla aquí estudiada se encontró, que la cascarilla representa del 18 al 20% del peso total.

El contenido de ceniza es superior en la semilla silvestre, y ya otros autores han reportado en México valores similares: Flores (1989) 4.38% y superiores, Salazar (1984) 5.50%. Ohlson (1985) cita valores de 2.4 a 2.8% pero excluyendo el fósforo fitico. Si consideramos que al retirar el aceite de la semilla estamos concentrando los minerales, aún y cuando hayamos quitado la cascarilla, es normal encontrar en la torta que el contenido de ceniza es mucho más alto, y que los minerales se encuentran de manera importante también en los cotiledones. Los resultados de 7% en la torta concuerdan con Ohlson (1985).

El aceite es el componente más valioso de estas semillas, por su uso a nivel industrial o comestible. En este trabajo la semilla comercial tuvo mayor contenido (41%) que la especie silvestre (33%). Anjou et al. (1979, citado por Ohlson, 1985) menciona a *Brassica napus* como colza ("rape") de invierno, común en Europa, con un contenido de aceite de 42 a 50%, y colza de verano conteniendo de 37 a 47% y a *B. campestris* como el nabo ("turnip rape") de invierno usual en Canadá con 40 a 48% de aceite y nabo de verano con 36 a 46% de aceite, todos en base seca. Por lo que el contenido de aceite de la variedad tanto

comercial como la silvestre de nuestra región concuerda con las variedades llamadas nabo de verano. Chetfel y Chetfel (1976) mencionan para colza un rango de 35 a 40% de aceite, como normal.

En lo que respecta a estudios nacionales se dan valores de 20.98% de aceite por Salazar (1984) y para variedad silvestre en Nuevo León de 33.50% (Flores, 1989).

En la torta obtenida de semillas descascarilladas permanece un remanente de 1.5% y 1.3% en la torta de la semilla comercial y silvestre respectivamente. Appelqvist and Ohlson (1972) citan en torta de *B.campestris* un contenido de aceite de 2%, que aunque no lo menciona, por su contenido de fibra debe haberse obtenido de manera comercial a partir de semilla integral.

La semilla de la localidad tiene mayor contenido de proteína 26% (Nx6.25), que la comercial, lo anterior se ha observado en diferentes tipos de semillas las que, en condiciones silvestres sus mecanismos de adaptación funcionan acumulando proteína (Moreno, 1993). Por otra parte resultados similares se citan en la literatura de 23 a 24.4% (Nx5.7) por Anjou et al. (1979, citados por Ohlson, 1985), de 15 a 30% por Chetfel y Chetfel (1976), 25% por Gillberg y Törnell (1976) y Ohlson y Anjou (1979). En México Aguirre García (1979, citado por Salazar 1984) reporta en *B. campestris* silvestre colectada en Perote, Veracruz, un contenido de proteína de 23.4 a 24.2%. Flores (1989) en la misma semilla pero colectada en Nuevo León cita 26% de proteína.

En la pasta obtenida en el presente trabajo (Cuadro II), la concentración de proteína lograda fué de 47%, valor superior a reportes previos, ya que en la variedad colectada en Veracruz Aguirre (1979, citado por Salazar, 1984) menciona que en la torta se presenta de 33 a 35% de proteína y Appelqvist y Ohlson (1972) reportan 41.1% en una torta con cascavilla o parcialmente descascarillada.

Comparada con la soya, *Brassica* tiene menor contenido de proteína y es la mayor fuente vegetal concentrada de proteína en las zonas frías. Otro aspecto positivo es la buena digestibilidad de la proteína de estas semillas, ya que en la torta con cascavilla presentó un valor de 79% y en la torta libre de cascavillas el valor mejoró hasta 93%, determinada "in vitro". Lacroix et al. (1983), evaluaron "in vivo" la digestibilidad de la proteína en la harina descascarillada reportando 82%, valor inferior al obtenido en este trabajo, pero quizá más

exacto al ser una determinación más real, aunque también Ohlson y Anjou (1979) en un concentrado proteico de similar nivel proteico al aquí evaluado, mencionan digestibilidad real de 95 a 100%. De cualquier manera la digestibilidad es superior a la de la soya que es 78% (Resultado obtenido en el Lab. de Alimentos F. C. B. y Pellet, 1980).

En lo que respecta al valor nutricional de la torta sin cascarilla o harina de *B. campestris* el valor de 97.93% obtenido en este trabajo, con *Tetrahymena thermophila* concuerda con Ohlson y Anjou (1979) quienes utilizando el Índice de Eficiencia Proteínica (PER), tuvieron valores superiores a la caseína y con el método de Valor Biológico, valores de 90 a 92. Esto es justificado ya que la composición de aminoácidos de esta harina es superior a la mayoría de las proteínas vegetales, teniendo buen nivel de aminoácidos azufrados, lo que supera a la soya y en general a cualquier oleaginosa (Jones, 1979) con un PER de 2.5 igual al de caseína, e inclusive algunas variedades la superan. Este mismo autor reporta un valor relativo de la proteína de 97, determinado en ratas a las que les fué adicionado Zn en la ración. Badui (1990) menciona para soya tratada con vapor a 100°C un RNV de 85 a 90 y sin tratamiento térmico de 50 a 60.

El extracto libre de nitrógeno de 21 y 22% es similar a lo reportado en estudios nacionales de 21.2 a 38.3% por Flores (1989) y Salazar (1984). El contenido de extracto libre de nitrógeno en la torta de 39 y 41% en la silvestre y comercial respectivamente, concuerda con Appelqvist y Ohlson (1972) de 37.8%.

La densidad energética fué levemente más alta en la semilla comercial, debido al contenido también superior de aceite. En el caso de la torta la densidad se iguala al obtenerse igual composición de nutrientes en ambas harinas.

En lo que respecta a los factores tóxicos o antinutricionales de las semillas y tortas de las diferentes especies del genero *Brassica*, los glucosinolatos se presentaron en niveles superiores en la semilla comercial, ya que en la silvestre, fueron menores al 1%, lo que es sumamente importante, ya que el valor es de los más bajos reportados en variedades en que el contenido de este compuesto tóxico no ha sido modificado genéticamente. Anjou et al. (1979, citado por Ohlson, 1985), reporta contenido de glucosinolatos en semillas de 4 variedades de *B. campestris*, de 1.5 a 2.4%. Saini y Wratten (1987) estudian 18 variedades de *B. oleracea*, algunas de ellas con bajos niveles de glucosinolatos genéticamente logrados, citando

valores desde 0.25% hasta 1.65%. Ohlson y Anjou (1979) mencionan para variedades normales de colza, un contenido de 4% de glucosinolatos. Josefsson y Appelqvist (1968), en su trabajo con colza y nabo encontraron contenidos de glucosinolatos de hasta 7.7%. Appelqvist y Ohlson (1972) enfatiza el identificar a *Brassica napus* como la de mayor contenido de glucosinolatos, principalmente las variedades de invierno con valores de hasta 7.7%, siendo la progoitrina el predominante y a *B. campestris* como de menor contenido, con valores entre 3.3 y 4.3% y la gluconapina como el dominante. Mc.Gregor y Downey (1975) utilizando un método similar al empleado en este trabajo, encontraron en semillas de 6 variedades de *B. campestris*, de 3.5 a 7.6% de glucosinolatos.

Por lo anterior la variedad silvestre analizada conteniendo 0.92% de glucosinolatos y adaptada a nuestro medio podría ser una buena base para mejoramiento genético, ya que en los cultivares de variedad "Canola". Daun y Declercq (1988) mencionan concentraciones de glucosinolatos desde 0.21% en semillas certificadas hasta 0.70% en semillas comerciales cultivadas en Canadá entre 1982 y 1985, responsabilizando a las cruas en los campos de los contenidos altos encontrados por él.

En el caso de la torta, el contenido de glucosinolatos fué similar en la semilla comercial y en la silvestre: 2.36 y 2.30% respectivamente, cuando la torta está libre de cascarilla. En la torta con cascarilla los contenidos se diluyeron, quedando en 1.77 y 1.40%, lo que nos indica que éstos compuestos se concentran en el endospermo. Mc.Gregor y Downey (1975), en la torta de 6 variedades de *B. campestris* encontraron de 0.71 a 1.39, Sani y Writen (1987), en 18 variedades tuvieron concentraciones de 0.29% a 1.84%, Appelqvist y Josefsson (1967, citados por VanEtten y Wolff, 1973); de 2.8 a 3.2% y Ohlson (1985) en *B. campestris* menciona contenidos de 3.30 a 3.44%, indicando además que el glucosinolato mayoritario en esta especie es gluconapina (3-butenyl-glucosinolato). En las variedades "Canola" la torta tiene menos de 0.3% (Canola Council of Canada, 1983).

El contenido de fitatos en la semilla tanto comercial y silvestre fué bajo, aunque siempre superior en la semilla cultivada (40 y 32 mg/100g respectivamente), y en la torta sin cascarilla (84 y 67 mg/100g). Existen variedades con bajo contenido de fitatos Anjou, (1978, citado por Ohlson y Anjou, 1979), sin embargo es el único reporte encontrado. Siendo esto sumamente importante ya que si la variedad silvestre aquí estudiada es de bajo contenido

de fitatos, es una semilla con gran potencial tanto en su actual estado, como base mejoramiento genético.

La técnica empleada cuantifica fósforo liberado del fitato y ya que las mismas plan contienen fitasas que hidrolizan el hexafosfato de inositol, con la consiguiente formación penta y tetrafosfato de inositol (Anderson, 1963), es posible que al cuantificar el fósforo asumiendo que el fitato está como hexafosfato se obtenga un resultado inferior al real. Por lo anterior sería conveniente realizar la determinación con semillas homogéneamente maduras, secar y moler inmediatamente antes de efectuar la determinación, así como emplear metodología más fina como la de intercambio iónico (Harland y Oberleas, 1977).

Los fitatos son los compuestos antinutricionales que actualmente dificultan el uso de la torta, de los concentrados e inclusive la obtención de aislados proteínicos. Aún en la variedades "Canola", este problema prevalece. En la semilla, se encuentran concentraciones de 1.8 a 2.1% (Anjou *et al.*, 1979, citado en Ohlson, 1985). Ohlson (1979) también menciona 2%. Por lo anterior los concentrados proteínicos que se han elaborado a partir de las semillas de *B. campestris* muestran altas concentraciones de fitatos, de 5.3 a 7.5% (Jones, 1979), lo cual las hace no recomendables al causar problemas de indisponibilidad de zinc en el organismo que las consume, efecto que se suprime al enriquecer o suplementar la dieta con mayores niveles de zinc. En ratas ha demostrado ser suficiente proporcionar 80 mg de zinc/Kg de dieta (Ohlson y Anjou, 1979). Esta práctica es discutible.

Es importante mencionar que numerosos productos vegetales que contienen fitatos son actualmente comercializados, inclusive productos de soya utilizadas en fórmulas para lactantes (Champagne y Philipppy, 1989).

En la torta sin cascavilla el contenido de fitatos fue casi el doble de lo encontrado en la semilla y si la torta permanece con la cascavilla, el valor es menor al de la torta libre de esta. La información respecto a la localización de los fitatos en las semillas es en el sentido de que se encuentra asociada a las proteínas, en el maíz exclusivamente en el germen (Oke, 1965, citado por Oberleas, 1973) y en la soya se encuentran en la aleurona unidos a la proteína (Badui, 1990). Los fitatos también son constituyentes importantes de la harina de trigo, causando problemas nutricionales relacionados con la disponibilidad de minerales en las regiones donde se consume habitualmente pan de trigo sin levadura. Anónimo (1975,

citado por Jones, 1979).

El contenido de minerales es un aspecto muy importante a considerar tanto en lo que respecta a la nutrición, cómo a la fisicoquímica involucrada en la extracción de las proteínas, para su estudio o uso.

Gilberg y Törnell (1976) estudiando la solubilidad de nitrógeno de la torta de colza, observaron la presencia de bandas blancas o claras que aparecían en el sedimento obtenido por la centrifugación y al analizarlas encontraron la presencia de grandes cantidades de sales principalmente de Mg, Ca, K, y Na del ac. fítico. Además a diferentes pH la solubilidad del fósforo total y de fitato presentaba comportamiento similar y paralelo, lo cuál es comprensible ya que el ac. fítico es la substancia dominante que contiene fósforo en la semilla de *Brassica*. Por lo anterior, es importante analizar los resultados de contenido mineral con reserva desde el punto de vista de aporte de micronutrientes, pero con interés desde la visión tecnológica.

Se mencionan en la pasta de *Brassica campestris*, contenidos de fósforo de 1.3% y 0.6% de calcio (Josefsson, 1972 y Ohlson, 1985). En este trabajo tanto para la semilla como para la torta sin cascarilla, el contenido de fósforo fué de 1.8%. El calcio en la semilla está en una concentración de 0.8% y en la torta descascarillada 0.4%. En la torta de soya el contenido de calcio es similar, 0.3%, pero el de fósforo es más bajo, 0.7%

Josefsson (1971 y Kjaer, 1960, citados por Josefsson, 1972) al comparar dos variedades, una de ellas de bajo glucosinolato, afirman que esta última tuvo mayor contenido de fósforo y calcio y menor de azufre y potasio; haciendo la observación de que el potasio es el catión que efectúa el balance del anión glucosinolato, por lo que en la variedad de bajo contenido de glucosinolato es de esperarse que éste elemento se encuentre disminuído. Por otro lado, para las fechas de la cita se desconocía el problema tóxico de los fitatos en estas semillas y sus harinas ya que el interés se centraba aún en los glucosinolatos, por lo que es posible que las variedades con bajos glucosinolatos al tener mayores niveles de fósforo y calcio, tengan también mayor contenido de fitatos.

El magnesio en la semilla se encontró en 0.3% y en la torta 0.1%, si la torta se tiene con cascarilla el Mg es el 0.2%. El Zn, Fe y Mn se concentran en la torta ya que sus valores ahí son superiores a los de la semilla, sin embargo estos últimos elementos son

menores en la semilla, ya que se encuentran en muy bajas concentraciones de 0.003 a 0.008%. Estos valores concuerdan también con Josefsson (1972).

II. INACTIVACION DE LA MIROSINASA.

Si analizamos los diversos trabajos previos en los cuales efectúan un tratamiento de inactivación de la enzima tioglucosidasa en la semilla, entre los que se encuentran Lönnerdal *et al.* (1977) y Gillberg y Törnell (1976), quienes efectuaron el tratamiento en un tambor rotatorio a 90°C por 18 min., posteriormente desgrasaron la semilla y finalmente la trituraron; Diosday *et al.* (1984) por el contrario desgrasaron la semilla previo a un calentamiento en un horno de convección a 105°C, toda la noche para inactivar la enzima. Jones (1979) y Ohlson y Anjou (1979), efectuaron una trituración de las semillas y descascarillado para someter a los cotiledones a una inactivación en agua hirviendo, previa a la extracción con hexano. Apelqvist y Josefsson (1967) reportan que 5 minutos a 90°C son suficientes para inactivar el 96% de la mirosinasa total. Sin embargo, cuando se pretende utilizar la harina o torta de estas semillas como materia prima para la posterior extracción de las proteínas, el tratamiento con calor sobre todo si es drástico, afecta tanto la solubilidad de las proteínas como su valor nutricional; por lo que se pensó importante encontrar la manera de detectar cuando la enzima está ya inactiva, para no utilizar tratamientos quizá innecesarios.

De los dos procedimientos evaluados el primero es bastante más laborioso en cuanto a que es necesario extraer la enzima y purificarla para obtener valores mas reproducibles. Por el contrario, si se utiliza la semilla molida, aunque el ensayo no diera valores cuantitativos de actividad enzimática, si detecta la actividad o inactividad de la enzima al adicionar sinigrina como sustrato extra. La desviación estándar presentada entre los resultados obtenidos en el primer procedimiento, fué superior al segundo por lo que considerando lo anterior se puede decir que el segundo procedimiento, puede ser útil para determinar la inactivación de la enzima.

Al inactivar la enzima quedan los glucosinolatos intactos, que no son tóxicos, sólo que estos pueden posteriormente ser hidrolizados por mirosinasas similares producidas por

bacterias intestinales (Tani *et al.*, 1971). Por lo que Ohlson (1985) cita a Ballester *et al.* (1970), Tape *et al.* (1970) y Eklund *et al.* (1971) entre otros, que han utilizado la extracción acuosa de los glucosinolatos de la torta o harina desgrasada para que esta pudiera ser utilizada en la alimentación. Sin embargo este proceso ocasiona grandes pérdidas de sólidos, además de producir grandes volúmenes de agua contaminada que es necesario reutilizar, lo que lo hace impráctico.

En general el procesamiento de las semillas de *Brassica* en Europa y Norte América enfatiza la importancia de inactivar la mirosinasa para evitar envenenamiento o contaminación del aceite con compuestos azufrados y para aumentar el valor nutricional de la torta. En contraste, en el proceso tradicional de Asia del Sur potencian la acción de la mirosinasa para alcanzar la hidrólisis máxima de los glucosinolatos (Dietz *et al.*, 1991).

Las variedades asiáticas son *Brassica campestris* o nabo, tal y como nuestra variedad silvestre, tienen principalmente gluconapina (3-butenilglucosinolato) que por hidrólisis enzimática libera 3-butenilisotiocyanato, 1-ciano-3,4-epitiobutano y trazas de 4 pentanitrilo (Dietz y King, 1987). Si consideramos que los epitionitrilos son inestables en matrices polares, el 1-ciano-3,4-epitiobutano en el prensado o extracción de la torta se polimerizará. El producto polimerizado en el laboratorio no resultó tóxico en reciente estudio desarrollado por Dietz *et al.* (1991) con administración tanto intraperitoneal como por sonda estomacal a ratas, en dos dosis de 12 hasta 600 mg/Kg de peso. El 4 pentanitrilo se forma sólo en pequeñas cantidades en el rango de pH (5 a 6.5) a que normalmente se tritura la semilla húmeda. En el estudio con ratas mencionado anteriormente tampoco causó mortalidad, pérdida de peso o retardo en el crecimiento con la ingesta de dosis de hasta 600 mg/Kg de peso. Sin embargo en las dosis superiores a 200 mg/Kg de peso, se presentó diarrea en algunas ratas y en otras hubo disminución de actividad estando menos alertas que las del grupo control. Y en cuanto al 3-butenil isotiocianato, estudios recientes (Dietz, 1987) indican que es bastante volátil (58°C), por lo que después del proceso sólo quedarían, si acaso, trazas de este compuesto.

Por el contrario las variedades Europeas que son *B. napus* produce en su hidrólisis 3-hidroxi-4 pentanitrilo, 5-oxalidona-tiona, no volátil y 1-ciano-2-hidroxi-3,4-epitiobutano en aproximadamente iguales proporciones.

En resumen es posible que las variedades de la especie *campestris* puedan ser utilizadas como materia prima para la obtención de aislados y concentrados proteicos o bien en alimentación de aves o cerdos si se permite la hidrólisis de los glucosinolatos en lugar de evitarla.

III. TRITURADO Y DESCASCARILLADO.

La semilla no es molida sino triturada o quebrada, lo que facilita la separación de las cascarillas ya que estando seca al quebrarla prácticamente se obtienen los dos cotiledones y las cascarillas, que posteriormente pueden ser retiradas de manera importante con cribado y aire. Lo anterior se hizo inmediatamente antes de colocar el material a desgrasar en el equipo soxhlet, para evitar que los glucosinolatos fueran hidrolizados.

Theander *et al.* (1977, citado por Åman y Gillberg, 1977), mencionan que en la torta con cascarillas se presenta un contenido de 12% de Klason-lignina, ya que en las cascarillas se localizan principalmente los polifenoles condensados (Jones, 1979), que además de interferir con la buena utilización de las proteínas aportan sabores indeseables; por lo que es importante que las cascarillas sean retiradas con la finalidad de obtener una harina de mejor calidad nutricional, con menor contenido de fibra en la torta.

IV. EXTRACCION DEL ACEITE Y DESOLVETIZADO.

Industrialmente, las semillas son molidas y calentadas en cilindros de 30 a 60 minutos a temperaturas de 75 a 120°C, posteriormente son prensadas para extraer el aceite quedando una torta hojuelada conteniendo de 12 a 20% de aceite, que posteriormente es extraída con hexano y la relación de solvente a torta varía según la eficiencia de los extractores. La torta extraída es desolvatizada con calentamiento indirecto o con inyección de vapor. En el proceso industrial no es rentable retirar las cascarillas, ya que éstas contienen aproximadamente 7% de los lípidos totales de la semilla, aado esto a que las cascarillas confieren cuerpo a la torta de prensa durante la extracción del aceite. Lo anterior seguirá rigiendo mientras el aceite sea el único componente de buen valor económico, en

estas semillas.

En la extracción realizada con hexano en proporción 1:15, aun a las dos horas dejaba un residuo alto de aceite (23% del contenido inicial) lo que dificultaba la extracción de las proteínas, formando en las etapas de centrifugación, una capa que no permitía la separación. Por lo que con fines analíticos o experimentales, no tecnológicos, se realizó la extracción con éter, obteniendo así una harina con sólo 1.41 % de grasa aunque quizá sobrecalentada.

V. SOLUBILIZACION DE LAS PROTEINAS.

Para detectar la proteína disuelta se decidió utilizar la lectura espectrofotométrica a 260-280 nm. Lönnerdal *et al.* (1977) también utilizan esta forma basada en la concentración relativamente constante de aminoácidos aromáticos en las proteínas y la absorción de éstos a las longitudes de onda mencionadas.

Cómo se puede ver en la Graf. 1, la máxima cantidad de proteína disuelta se obtiene a pH superiores a 7, coincidiendo con Gillberg y Törnell (1976). Esto puede ser explicado ya que Lönnerdal (1975, citado por Gillberg y Törnell, 1976) menciona que hasta un 60 % de las proteínas de colza tienen puntos isoeléctricos de 4 a 8.

A pH 10.8 es importante considerar que la proteína puede estar disminuída en su valor nutricional por la fuerte alcalinidad, que favorece la formación de compuestos como lisinoalanina y ornitolalanina, que bajan la disponibilidad biológica de los aminoácidos esenciales, aunque Lönnerdal *et al.* (1977) en un aislado obtenido realizando la extracción a pH 11 dicen no haber encontrado lisinoalanina y un contenido bueno de cisteína, lo que hace pensar que no se presentó daño en la proteína.

A pH medios de 7, 7.5 y 8, se lograron solubilidades de 82, 80 y 74% de la proteína inicial, y a pH de 6 y 6.5 la extracción bajó. En lo que respecta a la solubilidad de los fitatos, estos tuvieron menos variación, sin embargo los menores niveles de extracción fueron a pH 7.5 y 10.8 (70 y 68%).

Gillberg y Törnell (1976) evaluando el efecto de la temperatura sobre la solubilidad del nitrógeno y del fósforo lítico, muestran dos picos de máxima solubilidad de nitrógeno y mínima solubilización de fósforo lítico en valores de pH, el primero de 6.5 a 8 y el segundo

3. En el pH 7. Comprobando además el efecto de la temperatura que disminuye las concentraciones de estos elementos en las disoluciones a pH de 6.5 a 8, pero no en el pH extremo.

En lo que respecta a la máxima solubilidad de los fitatos, los mismos autores encontraron que ésta sucede a pH menores a 6, notándose en la torta calentada una disminución en la solubilidad de estos compuestos igual que en las proteínas.

Las sales cálcicas y magnésicas del ac. fítico, son solubles a pH de 4.5 y 6.5 respectivamente y prácticamente insolubles a pH altos (Jackman y Black, 1951). En el análisis de la semilla y harina reportados en los Cuadros I y II, encontramos suficientes cantidades de estos iones, para precipitar al ac. fítico en los pH superiores a 7.5, por lo que debido a esto pueden haberse presentado los resultados de menor solubilidad de fitato en estos pH.

Otro aspecto importante observado fué que la velocidad de centrifugación fuera superior a 3,000 RCF, debido a que Gillberg y Törnell (1976) reportaron la mayor extracción de nitrógeno y menor de fitatos por encima de 2,000 RCF.

Valorando los resultados obtenidos, se decidió seleccionar como pH de extracción pH 7 y 8, por presentarse buena extracción de proteína y la menor de fitatos.

VI. ELECTROFORESIS DE LOS EXTRACTOS.

Lograr la resolución adecuada de las proteínas fué difícil debido a que la extracción se realiza de la pasta, sin ningún otro proceso que inactivación de la enzima, los extractos obtenidos tienen junto con las proteínas todos los demás compuestos solubles en los extractos acuosos realizados. Lo y Hill (1972) reportan en la torta de *B. napus* de 7 a 9% de nitrógeno no proteico soluble, así como glucosinolatos y muy bajo contenido de aminoácidos libres, por lo que ellos sugieren utilizar filtración en gel para separar las proteínas solubles de los demás compuestos que pueden interferir con el estudio de las mismas.

Las proteínas en su estado nativo no pudieron ser resueltas debido quizá a su alto peso molecular, ya que aún en geles de 7.5% sólo se observaron dos bandas, una de ellas

muy concentrada, pero en la parte alta del gel (Fotografía 1).

Los pesos moleculares detectados en los extractos obtenidos y desnaturalizados, fueron de 10 a 74 KDa (Fotografía 2 y CUADRO III). Lönnnerdal y Janson (1972) separan y caracterizan las proteínas de bajo peso molecular de semillas de *Brassica napus*, reportando 4 proteínas de pesos moleculares de 12 a 14 KDa altamente básicas, cuya composición aminoacídica es similar y con puntos isoelectricos de 9 a 11. Debido a que utilizamos un tamaño de poro lo suficientemente grande para dar entrada a la mayor cantidad de proteínas, es probable que eso sea la causa de no detectar proteínas de pesos moleculares menores o mayores. Ya que en el trabajo mencionado anteriormente utilizan para las proteínas de bajo peso molecular, separaciones por columna y en la electroforesis un gel al 15% y la corrida se realiza a pH ácidos.

Ohlson (1985), agrupa las proteínas de acuerdo a su peso molecular de la siguiente manera: 320, 150, 75 y 13 KDa, señalando como las más abundantes las de 150 KDa.

Lönnnerdal et al. (1977), utilizando cromatografía, obtiene también 4 grupos de proteínas: 250, 150, de 50 a 75 y 13 KDa.

Appleqvist y Ohlson (1973) mencionan que las proteínas tienen pesos moleculares de 15 a 150 KDa y que el 20% de las proteínas tienen pesos moleculares entre 15 y 50 KDa, lo anterior concuerda con nuestros resultados ya que las bandas correspondientes a los pesos moleculares de 20 a 36 KDa se presentaron en mayor concentración.

Desde el punto de vista nutricional, las proteínas de pesos moleculares intermedios y bajos, presentan mejor digestibilidad (Lacroix et al., 1983)

VII. PRECIPITACION DE LAS PROTEINAS.

Al trabajar con los extractos de pH 7 y 8, para precipitar la proteína, y mantener disuelta la mayor cantidad posible de fitatos. En la Gráfica 2 se observa que la mayor precipitación, se logró a pH 3.5 y 4 en ambos extractos, siendo superior en el extracto pH 7, lo que es razonable si consideramos que en el extracto de pH 7 había más proteína disuelta.

El máximo rendimiento logrado, en base a proteína inicial y precipitada (53%) en el

extracto de pH 7, precipitando a pH 3.5, no fué seleccionado debido a que la cantidad de fósforo fítico en el precipitado se incrementa con cada descenso en el pH de precipitación, así la relación de P/N precipitando a pH 4.8 es de 0.06 y se incrementa a 0.15 al precipitar a pH 3 (Gillberg y Törnell, 1976).

Considerando lo anterior, fué considerado más adecuado aún con menor rendimiento (36%), el pH de precipitación de 4, (Graf. 3) en el extracto pH7 y de 26% en el extracto pH8. Obteniéndose un precipitado proteínico casi libre de fitatos y con un excelente nivel proteico (93%).

La temperatura a la que se efectuó la centrifugación para la separación del precipitado fué más baja que en la extracción 10°C, con la intención de que los fitatos quedaran solubles, ya que la extracción de fitatos analíticamente se realiza a bajas temperaturas y medios ácidos (Oberleas, 1973).

En estos resultados existen tres puntos principales de discusión que son; rendimiento, contenido de proteína en el aislado obtenido y contenido de fitatos en el mismo. El rendimiento logrado en este trabajo (36%) es bajo, ya que se puso especial énfasis en lograr buen contenido de proteína y bajo de fitato, obteniéndose las proteínas precipitadas en una sola etapa. En la literatura existen diversos reportes de obtención de aislados, principalmente utilizando *Brassica napus* y los más recientes con variedades "Canola", pero todos tienen pobres resultados en rendimientos. Utilizando como materia prima una torta comercial, Owen (1971, citado por Ohlson, 1985) recuperó el 18% del nitrógeno original de la semilla, obteniendo un aislado con 84% de proteína. Kroon et al. (1970, citados por Ohlson, 1985) tuvieron rendimientos de entre 29 a 49% y productos conteniendo más de 93% de proteína. Sosulski et al. (1972) bajo condiciones de laboratorio reportan un rendimiento cercano al 50% y el aislado contenía 86% de proteína. Otros autores tienen bajos rendimientos reales si consideramos que los rendimientos que reportan son en base a proteína disuelta y no a la proteína inicial de la harina, este es el caso de los siguientes autores citados por Gillberg y Törnell (1976): Girault (1973) obtuvo 53% de recuperación de las proteínas disueltas, Pokorny et al. (1963) un 49% y Gillberg y Törnell (1970) un 55%.

Si comparamos el resultado de este trabajo con lo realizado en *B. napus* por Gillberg y Törnell (1976) quienes prepararon tres aislados: uno a pH 11.1 y recuperación a pH 4,

recuperando 75% de la proteína y 16% del ac. fítico inicial. El **segundo**, extrayendo a pH 8.2 y precipitando a pH 3.7 logrando obtener 45% de nitrógeno y permameciendo en el producto 18% de los fitatos; y el **tercero** a pH 6.2 y precipitando a pH 4 obteniendo en el aislado 20% del ac. fítico inicial y 85% de la proteína. Tenemos que en el segundo aislado hay similitudes en cuanto a rendimiento, ya que el de ellos, es levemente superior siendo realizado en dos etapas de precipitación. En lo que respecta a contenido de fitatos en el aislado, ellos tuvieron mayor contenido de fitato precipitado debido a que utilizaron un pH bajo y es muy probable que los fitatos que se quedan suspendidos unidos a proteínas en el sobrenadante de la primer precipitación, precipiten junto con ellas en la segunda etapa. Cho y Thompson (1984) mencionan que a pH bajos en general los fitatos se unen a las proteínas y que utilizando agentes acetilantes y recuperando la proteína por precipitación o diálisis se obtienen rendimientos de 43 a 67% de una proteína con muy bajo contenido de fitato, y en una segunda etapa o re-precipitación se obtiene un 8 a 11% más de proteína pero con alto contenido de fitato. El contenido de proteína del aislado obtenido en este trabajo fué superior (93%), por lo que habría que analizar detenidamente para optar por un 10 a 18% más de rendimiento o un 8 a 10% más de proteína en el aislado, quedando este además prácticamente libre de fitatos.

Sosulski et al. (1976) cita a Sosulski y Bakal (1969) para comparar el rendimiento de 50% en la obtención de un aislado de *B. napus*, con el rendimiento de 70% en la obtención de uno de soya.

Los bajos rendimientos son atribuidos, principalmente a los muy variados tipos de proteínas que conforman la parte proteínica de esta semilla, ya que existen proteínas de pesos moleculares desde 11 hasta 300 KDa y puntos isoeléctricos, desde 4 hasta 11, (Lönnerdal y Janson, 1972; Lönnerdal et al., 1977). Así como a la presencia de fitatos, que afectan fuertemente la recuperación del nitrógeno disuelto.

VIII. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA Y NUTRICIONAL DEL AISLADO OBTENIDO:

El contenido de proteína logrado en el aislado aquí obtenido (Cuadro IV) es buena

consideramos que Owen (1971, citado por Ohlson, 1985) obtuvo un aislado con 84% de proteína. Kroon *et al.* (1970, citados por Ohlson, 1985) elaboraron un aislado conteniendo más de 90% de proteína. Sosulski *et al.* (1972) reportan un aislado con 86% de proteína. Sosulski *et al.* (1976) obtienen uno con 82% de proteína.

Otro aspecto importante es la calidad de las proteínas extraídas, ya que un valor nutritivo relativo a caseína de 91% es bastante bueno, considerando que es una fuente vegetal. El puntaje químico obtenido con la referencia FAO/OMS/UNU 1985 (Paredes *et al.*, 1991), tiene un valor de 75 y el aminoácido limitante es lisina, lo que no concuerda con los reportes anteriores para el género aquí estudiado, ya que se ha acostumbrado utilizar la referencia de 1973.

Un punto interesante es que el valor nutritivo relativo de la harina sin cascarrilla es superior al del aislado, lo que significa que la composición de aminoácidos en las proteínas originales es mejor que el de las fracciones que se lograron separar y que constituyen el aislado proteínico obtenido.

Existen diversos reportes en la literatura respecto a la calidad de la proteína de este tipo de semillas, y todos concuerdan en que es de excelente calidad. Analizando el aminograma presentado por Jones (1979) de un concentrado proteico de *Brassica campestris* variedad Echo y comparándolo con el patrón FAO/OMS 1973, se obtiene un puntaje químico de 95, con isoleucina como primer limitante. Al obtener el puntaje químico en nuestro aislado con el patrón de referencia FAO/OMS 1973, efectivamente el primer aminoácido limitante es isoleucina como en el reporte anterior, sólo que el valor es inferior (70). Ohlson (1979) menciona para concentrados proteicos puntaje químicos de 100 y valores de PER de 3.5 para un concentrado de colza, 2.2 para harina texturizada de soya y 1.9 para un aislado de soya.

Los glucosinolatos no fueron detectados en el análisis realizado, el cuál con 0.60mg/g, muestra una recuperación de 95% (Saini y Wratten, 1987). Lo que coincide con lo reportado por Sosulski *et al.* (1976) de un aislado con *B. napus*, con cero contenido de glucosinolatos. Jones (1979) menciona que después de etapas de extracciones acuosas, cuando el contenido inicial de glucosinolatos no es muy alto los glucosinolatos residuales no son detectados por los métodos rutinariamente empleados. Por otra parte Diosday *et al.* (1984) obtienen por

filtración un aislado conteniendo 80% de proteína y 0.42mg de glucosinolatos/g.

es (1978, citado por Ohlson y Anjou, 1979) reportan que si los niveles de glucosinolatos en la dieta son menores a 0.45mg/g, no se presentarán problemas ni con el crecimiento ni en la glándula tiroidea. Considerando esto el problema de la toxicidad de los glucosinolatos desaparece en los aislados proteicos.

El contenido de fitatos en el aislado es tan bajo que no es detectado. Cuando la proteína extraída fué precipitada el sobrenadante se analizó para fitatos y la diferencia con los fitatos iniciales que puede haber precipitado con la proteína, lo que sería aproximadamente 0.08mg/g, cantidad que no fué detectada por el método empleado. Aman Cullberg (1977) reporta que los aislados proteínicos de *Brassica* pueden tener cantidades variables de ac. fítico dependiendo del método empleado.

Por otro lado, es importante mencionar que los aislados de soya comúnmente usados tienen contenidos variables de fitatos, así Champagne y Phillippy (1989) utilizan en su investigación un aislado de soya Ralston-Purina conteniendo 1.30% de ac. fítico y Harland y Bedeas (1977) encontraron contenidos de fitatos desde 1.42 a 1.82% en concentrados de soya texturizados y en dos más valores de 0.28 y 0.59%. Por lo que el aislado obtenido puede considerarse seguro en cuanto al contenido del ac. fítico.

El aislado obtenido presentó 28% más capacidad de absorción de aceite, que el aislado de soya analizado (Cuadro V). Un aislado de *B napus* (Sosulski, 1976) presentó una absorción de aceite de 318%. Ohlson (1985) enfatiza la importancia de su alta capacidad de absorción de grasas, propiedad que puede ser utilizada para regular el contenido de grasa en los alimentos.

La capacidad espumante también fué superior, siendo quizá su mejor propiedad con fines tecnológicos, ya que presentó un valor 600% más alto que el del aislado de soya aquí analizado. Sin embargo, comparado con reportes previos (Sosulski *et al.*, 1976) con valores de 65%, el aislado aquí obtenido aparentemente presentó una menor cantidad de proteínas espumantes. Se debe considerar que durante el proceso de obtención de las proteínas, la espuma se presenta en varias etapas, perdiéndose en cada una de ellas precisamente este tipo de proteínas.

En lo referente a la estabilidad de la espuma es bastante buena ya que el 92%

permanece una hora y el 84% dos horas, no ocurriendo así con el aislado de soya evaluado. Comparado con el aislado obtenido por Sosluski, se obtiene en este trabajo mejor estabilidad a la hora e igual a las dos horas de reposo.

La capacidad emulsificante fué un 60% de la del aislado de soya y la estabilidad de la emulsión fué apenas 37% de la de soya. De manera general diferentes trabajos han documentado las propiedades funcionales de productos proteínicos de *Brassica*; Nakai *et al.* (1980), Paulson *et al.* (1984), Thompson *et al.* (1982), ellos han demostrado buena capacidad emulsificante, de batido y de absorción de grasa pero mala funcionalidad en cuanto a gelificación, así como la solubilidad en pH intermedios también es baja, siendo esta una de sus principales limitantes tecnológicas.

Actualmente se pueden utilizar procesos adicionales para elevar la calidad funcional de un aislado proteínico y así tenemos en el mercado aislados y concentrados de soya con características funcionales diferentes casi para cada uso. De la misma manera algunos investigadores buscan mejorar las características tecnológicas de las proteínas de *Brassica*. Paulson y Tung (1988), incrementan la capacidad emulsificante y la estabilidad de la emulsión con succinilación de la proteína. Paulson y Tung (1987) también con anhídrido succínico, incrementan la solubilidad a pH mayores de 6.

CONCLUSIONES

La semilla de *B. campestris* silvestre tiene un buen potencial nutricional ya que presenta adecuado contenido de proteína de buena calidad y bajos niveles de glucosinolatos y fitatos.

El contenido de proteína es mayor y el de compuestos tóxicos es inferior en la semilla silvestre que en la especie cultivada.

Respecto a la inactivación de la tioglucosidasa, realizando la extracción del aceite a 50°C, inmediatamente después del triturado y descasacrillado, la enzima es inactivada, evitándose así la hidrólisis indeseable de los glucosinolatos.

Para la obtención del aislado protéico se detectó que, el pH de mayor solubilización de nitrógeno y menor de fitatos es de 7 a 7.5. En las proteínas solubilizadas se detectaron pesos moleculares de 10 a 74 KDa.

Realizando una extracción a pH 7.5 y precipitando a pH 4, se obtiene un rendimiento en la obtención de proteína de 36%, precipitando a pH 3.5 el rendimiento aumenta a 50%, pero la calidad del aislado (contenido de fitatos) es inferior.

El aislado protéico obtenido contiene 93% de proteína, con VNR de 91% y un puntaje químico de 0.75, con lisina como primer aminoácido limitante. El aislado está libre de compuestos tóxicos y presenta buena capacidad de absorción de aceite y capacidad espumante. Sus propiedades emulsificantes y de absorción de agua son aproximadamente un 60% de las que presenta un aislado de soya.

LITERATURA CITADA.

- AACC. 1974. **Cereal Laboratory Methods**, Rev. 7th ed. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minn. U. S. A.
- Altschud, A.M., & H.L. Wileke. 1985. **New Protein Foods**. Food Science and Technology : A series of monographs. Vol 5. Academic Press, Inc. p.339.
- Åman, P., & L. Gillberg. 1977. **Preparation of rapeseed protein isolates: a study of the distribution of carbohydrates in the preparation of rapeseed protein isolates**. J.Food Sci. 42 (4):1114.
- Anderson, G., 1963. **Effect of Fe/P ratio and acid concentration on precipitation of ferric inositol hexaphosphate**. J. Sci. Food Agric. 14:352.
- AOAC. 1990. **Official Methods of Analysis**. 11th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C. U. S. A.
- Appelqvist, L., & E. Josefsson. 1967. **Method for quantitative determination of isothiocyanates and oxazolidinethiones in digests of seed meals of rape and turnip rape**. J. Sci. Food Agr. 18 (11):510
- Appelqvist, L.A., & R. Ohlson. 1972. **Rape seed cultivation, composition, processing and utilization**. 1a. Ed. Elsevier Publishing Company. U.S.A. p.169.
- Aspinall, G.O., & K.S. Jiang. 1974. **Rapeseed hull pectin**. Carbohid. Res. 38:247
- Badui, S., 1990. **Química de alimentos**. 2a.ed. Edit. Alhambra Mexicana. México, D.F. p.218, 372 y 617.
- Baker, H., O.Frank, I.Rusoff, R. Morck, & S.Hunter. 1978. **Protein quality of foodstuffs determined with *Tetrahymena thermophila* and rat**. Nutrition Reports International. 17:525.
- Bates, R.P., 1983. **Apropiate Food Technology**. en Sustainable Food Systems. Ed. Knorr, D. Avi Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut. USA. p.176.
- Bhatty, R.S., 1972. **A note on trichloroacetic acid precipitation of oilseed proteins**. Cereal Chem.49:729.
- Canola Council of Canada. 1983. **Research summary No.2** Winnipeg, Manitoba, R33-1B3; Canadá.

- Campbell, L.D., 1987. **Effects of different intact glucosinolates on liver hemorrhage in laying hens and the influence of vitamin K.** Nutrition Reports International.35 (6):1221.
- Campbell, L.D., 1987. **Intact glucosinolates and glucosinolate hydrolysis products as causative agents in liver hemorrhage in laying hens.** Nutrition Reports International.36 (3):491.
- Champagne, E.T., & B.Q. Phillippy. 1989. **Effects of pH on calcium, zinc, and phytate solubilities and complexes following in vitro digestions of soy protein isolate.** J. of food Sci. 54 (3):1989.
- Cheftel, J.C., y H. Cheftel. 1976. **Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos.** Vol.I. Ed. Acribia. Zaragoza España. p.100 y 222.
- Cho, Y.S., & L.Thompson. 1984. **Precipitation behavior of extracted nitrogen, phytic acid and minerals in rapeseed flour modified by acylating agents.** J. of Food Sci. 49:765.
- Cooper T.G., 1977. **The tools of biochemistry.** University of Pittsburgh. John Wiley & Sons.,N.Y. p.355
- Date, F.A., 1982. **Industria canola en Canada.** Información de la Embajada de Canadá en México.
- Daun, J.K., & D.R. DeClercq. 1988. **Quality of yellow and dark seeds in *Brassica campestris* Canola varieties candle and tobin.** J. Am. Oil Chemists'Soc. 65 (1):122.
- Daun, J.K., 1986. **Glucosinolate levels in western canadian rapeseed and canola.** J. Am. Oil Chemists'Soc. 63 (5):639.
- Daun, J.K., 1986. **Erucic acid levels in western canadian canola and rapeseed.** J. Am. Oil Chemists'Soc. 63(3).
- Dietz, H.M., & R.D. King. 1987. **Characterization of rapeseed (*B. campestris*) from Nepal and evaluation of the processing methods.** Trop. Sci.27:147.
- Dietz, H.M., S.Panigrahi, & R.V.Harris. 1991. **Toxicity of hydrolysis products from 3-butenyl glucosinolate in rats.** J. Agric. Food Chem. 39:311.
- Dosday, L.L., Y.M. Tzeng, & L.J. Rubin. 1984. **Preparation of rapeseed protein concentrates and isolates using ultrafiltration.** J.Food Sci. 49:768.
- Fores, J., 1989. **Estudio morfoanatómico, fenológico y bromatológico de *Brassica campestris* L. y *Sisymbrium irio* L. (Cruciferae) de la zona urbana de Monterrey, N.L. México.**

Tesis profesional. F.C.B. U.A.N.L.

- Gillberg, L., & B. Törnell. 1976. **Preparation of rapeseed protein isolates.** J. Food Sci. 41:1063.
- González, M.R., 1974. **El nabo aceitero (*Brassica* sp) una alternativa agroindustrial en el uso de los recursos del agricultor sonorense.** Tesis profesional, Chapingo, México.
- Gorill, A.D.L., D.M. Walker, & J.D. Jones. 1974. **Rapeseed protein sources and aminoacid supplementation of diets for weanling rats.** Can. J. Animal Sci.54:659.
- Graf, E, & F.R. Dintzis. 1982. **High-performance liquid chromatographic method for the determination of phytate.** Analytical Biochemistry.119:413.
- Harland, B., & D. Oberleas. 1977. **A modified method for phytate analysis using an ion-exchange procedure: Application to textured vegetable proteins.** Cereal Chem. 54(4):827.
- Hermansson, A.M., 1979. **Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins.** J. Am. Oil Chemists'Soc. 56:272.
- Instituto Nacional de la Nutrición. 1984. **Memorias del 2do. Simposium "Avances en Ciencia y Tecnología de Alimentos"** Instituto Tecnológico de Veracruz. Ver.México.
- Jackman, R., & C. Black. 1951. **Solubility of iron, aluminium, calcium and magnesium inositol phosphates at different pH values.** Soil. Sci. 72:179.
- Jones, J.D., 1979. **Rapeseed protein concentrate preparation and evaluation.** J. Am. Oil Chemists'Soc. 56(8):716.
- Josefsson, E., & L. Appelqvist. 1968. **Glucosinolates in seed of rape and turnip rape as affected by variety and environment.** J. Sci. Food Agric.19 (10):564.
- Josefsson, E., 1972. **Nutritional value and use of rapeseed meal.** pag.354 en: Rape seed cultivation, composition, processing and utilization. 1a. Ed. Elsevier Publishing Company. U.S.A
- King, J., C. Aguirre, & S. de Pablo. 1985. **Functional properties of lupin protein isolates.** J. Food Sci. 50 (1):82.
- Kipps, M.C., 1970. **Production of field crops.** 6th.ed. Mc.Graw Hill Book Company. U.S.A. p.739.
- Kolar, C.W., I.C.Cho, & W.L. Watrous. 1979. **Vegetable protein application in yogurt, coffe**

- creamers y whip toppings.** J. Am. Oil Chemists' Soc. 56:389.
- Kramer, J.K.G., F.D. Saurer, & W.J. Pigden. Eds. 1983. **Erucic acid: production, usage, chemistry and toxicological evaluation.** Academic Press. Toronto, Canadá.
- Lacroix, M., J. Amiot, & G.J. Brisson. 1983. **Hydrolysis and ultrafiltration treatment to improve the nutritive value of rapeseed proteins.** J. of food Sci. 48:1644.
- Landaverde, A., 1942. **Las plantas oleaginosas.** Ediciones Bartolomé Trucco. México, D.F. p.171.
- Lawhon, J.T., & C.M. Cater. 1971. **Effects of processing methods and pH of precipitation on the yields and functional properties of protein isolates from glandless cottonseed.** J. Food Sci. 36:372.
- Lin, M.J.Y., E.S. Humbert, & F.W. Sosulski. 1974. **Certain functional properties of sunflower meal products.** J. Food Sci. 39:368.
- Lo, M.T., & D.C. Hill. 1972. **Composition of aqueous extracts of rapeseed meals.** J. Sci. Food Agric. 23:823.
- Lockhart, J.A.R., & A.J.L. Wiseman. 1975. **Introduction to crops husbandry.** 3th.ed. Pergamon Press. p.149.
- Lönnerdal, B., & J.C.H. Janson. 1972. **Studies on Brassica seed proteins. L. The low molecular weight proteins in rapeseed. Isolation and characterization.** Biochim. Biophys. Acta. 278:175.
- Lönnerdal, B., L. Gillberg, & B. Törnell. 1977. **Preparation of rapeseed protein isolated: a study of rapeseed protein isolates by molecular sieve chromatography.** J. Food Sci. 42:75.
- Maheshwari, P.N., D.W. Stanley, & J.I. Gray. 1981. **Detoxification of rapeseed products.** J. of Food Protection. 44(6):459.
- Marshall, W.H., T.R. Dutson, Z.L. Carpenter, & G. Smith. 1975. **A simple method of emulsion end point determination.** J. Food Sci. 40:896.
- Mattson, F.H., 1973. **Potential toxicity of foods lipids.** Pag.189 en: **Toxicants occurring naturally in foods.** ed. Committee on food protection. Food and Nutrition Board National Research Council. 2th.ed. National Academy of Science. Washington, D.C.
- Mc. Gregor, D.L. & R.K. Downey. 1975. **A rapid and simple assay for identifying low**

- glucosinolates rapeseed*. Can. J. Plant. Sci. 55:191.
- Metcalfe, D.S., & D.M. Elkins. 1980. **Crops Production: Principles and practices**. 4th.ed. Mc.Millan Publishing Co. Inc. New York, U.S.A. P.502-504.
- Millan, F., E. Vioque, & M.P. Maza. 1984. **Polar lipids of sunflower meal and isolates**. . Am. Oil Chemists'Soc. 61 (8):1347.
- Millan, F., M.P. Maza, A. Lanzón, & E. Vioque. 1987. **Jujoba: características generales de la harina y estudio de sus proteínas**. Grasas y aceites.38 (1):33.
- Moreno, S., 1993. **Estudio Morfoanatómico, Ecofisiológico y Bioquímico de especie silvestres del género *Phaseolus* en Nuevo León**. Tesis de Maestría. F.C.B. UANL.
- Nakai, S., L. Ho., N. Helbig, A.Kato, & M.A.Tung. 1980. **Relationship between hydrophobicity and emulsifying properties of some plant proteins**. Can. Inst. Food Sci Technol. J. 13:23.
- Nash, M.J., 1978. **Crop conservation and storage in cool temperate climates**. 1a.ed Pergamon Press. USA.
- Oberleas, D., 1973. **Phytates**. Pag.363 en: Toxicants Occurring Naturally in Foods.2nd ed National Academy of Sciences. Washington,D.C.
- Ohlson, R., & K. Anjou. 1979. **Rapeseed protein products**. J. Am. Oil Chemists'Soc. 56:431
- Ohlson, R., 1985. **Rapeseed**. Pag. 339 en: New Protein Foods. Vol.5,Seed Storage proteins Ed. Altschul, A.M. y Wileke,H.L. Academic Press,Inc. New York, U.S.A.
- Paredes-López, O., C.Ordorica-Falomir, & M.R. Olivares-Vazquez 1991. **Chickpea Protein Isolates: Physicochemical, Functional and Nutritional Characterization** J.of Food Sci. 56(3):726.
- Paulson, A.T., M.A. Tung, M.R. Garland, & S.Nakai. 1984. **Functionality of modified plant proteins in model food systems**. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 17:202.
- Paulson, A.T., & M.A. Tung. 1987. **Solubility, hydrophobicity and net charge of succinylated canola protein isolate**. J. of Food Sci. 52 (6):1557.
- Paulson, A.T., & M.A. Tung. 1988. **Emulsification properties of succinylated canola protein isolate**. J. Food Sci. 53 (3):817.
- Paulson, A.T., & M.A. Tung. 1988. **Rheology and microstructure of succinylated canola protein isolate**. J. Food Sci. 53 (3):821.

- Pellet, P.L., y V.R. Young. Editores. 1980. **Evaluación nutricional de alimentos proteínicos.** Publicación técnica U.N.U. p. 3,7,19,36 y 149.
- Phoelman, J.M., 1979. **Breeding Field Crops.** 2d.ed. AVI Publishing Company, Inc. Westport Connecticut, p.62-63.
- Robles. R., 1982. **Producción de oleaginosas y textiles.** 1a.ed. Editorial Limusa, S.A. México, D.F. p.417.
- Rzedowski, J., 1978. **Vegetación de México.** Ed. Limusa, México, D.F. p. 41,54,68 y 220.
- Saini, H.S., & N. Wratten. 1987. **Quantitative determination of total glucosinolates in rapeseed and meal digests.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70 (1):141.
- Salazar, T.E., 1984. **Datos autoecológicos de Brassica campestris L. (Cruciferae) en General Escobedo, N.L. México.** Tesis Profesional. F.C.B. U.A.N.L.
- Scheider, W.L., 1985. **Nutrición. Conceptos básicos y aplicaciones.** 1a. Ed. Editorial McGraw-Hill de México. p.145
- Schleif, R.F., & P.C. Wensink. 1981. **Practical methods in molecular biology.** Edit. Springer-Verlag, New York, U.S.A. p.78.
- Shahidi, F., & J.E. Gabon. 1990. **Fate of sinigrin in methanol/ammonia/water-hexane extraction of B. juncea mustard seed.** J. of Food Sci.55(3):793.
- Siddiqui, I.R., & P.J. Wood. 1971. **Structural investigation of water soluble rapeseed (Brassica campestris) polysaccharides. Part.1. Rapeseed amyloid.** Carbohydr. Res. 17:97.
- Siddiqui, I.R., & P.J. Wood. 1972. **Structural investigation of water soluble rapeseed (Brassica campestris) polysaccharides. Part.2 An acidic arabinogalactan.** Carbohydr. Res. 24:1.
- Siddiqui, I.R., P.J. Wood, & G. Khanzada. 1973. **Low molecular weight carbohydrates from rapeseed (Brassica campestris) meal.** J.Sci. Food Agric.24:1427.
- Singh, D., 1958. **Rape and mustard.** Indian Central Oilseed Committee, Bombay.
- Slaughter, C., y C. Duffus. 1980. **Las semillas y sus usos.** 1a Ed. Edit. A.G.T.S.A. Planta Atlas de México, D.F. p.10, 12,115 y 174.
- Sosluski, F. W., 1962. **The centrifuge method for determining flour absorption in hard red spring wheats.** Cereal Chem.39:344.

- Sosluski, F.W., F.S. Soliman & R.S. Bhattu. 1972. **Diffusion extraction of glucosinolates from rapeseed.** Can. Inst. Food Sci. Technol.J. 5:101.
- Sosluski, F., E.S. Humbert & K. Bui. 1976. **Functional properties of rapeseed flours, concentrates and isolate.** J. Food Sci.41:1349.
- Tani, N., M. Ohtsura, & T. Hata. 1974. **Isolation of myrosinase-producing microorganism.** Agric. Biol. Chem. 38:1617.
- Thompson, L.U., R.F.K. Liu, & J.D. Jones. 1982. **Functional properties and food applications of rapeseed protein concentrate.** J.Food Sci.47:1175.
- VanEiten, C.H., M.E. Daxenbichler, & I.A. Wolff. 1969. **Natural glucosinolates (thioglucosides) in foods and feeds.** J. Agric. Food Chem. 17:483.
- VanEiten, C.H., y I.A. Wolff. 1973. **Natural sulfur compounds.** Pag.210 en: Toxicants occurring naturally in foods. 2nd ed. National Academy of Science. Washington,D.C.
- Vavilov, 1951. **The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants.** Trad. de Chester,K.S. Ed. Waltons Mass.U.S.A. p.54
- Weber, F.E., S.A. Taillie, & K.R. Stauffer. 1974. **Functional characteristics of mustard mucilage.** J. Food Sci. 39:461.
- Wheeler, E.L., & R.N. Ferrel 1971. **A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions.** Cereal Chem. 48:312.
- Zaugg, W., & Knox, R. 1966. **Indirect determination of inorganic phosphate by atomic absorption spectrometric determination of molybdenum.** Analytical Chem. 38 (12):1759.
- Zeiss, C., 1978. **Analytical methods for atomic absorption and flame emission.** Manual atomic absorption spectrometer FMD4.

