



UNIVERSIDAD VERACRUZANA
INSTITUTO DE CIENCIAS BASICAS



Extracción, modificación y caracterización de proteínas de
amaranto

Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias
Alimentarias

Presenta:

Ana Isabel Polanco Murrieta

Directores de Tesis:

Dra. Maribel Jiménez Fernández

Dr. Oscar García Barradas

Xalapa, Veracruz

Septiembre 2017



La presente tesis titulada

Extracción, modificación y caracterización de proteínas de amaranto

Realizada por la

I.A. ANA ISABEL POLANCO MURRIETA

Ha sido aprobada por el comité de evaluación de tesis, y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

Maestro en Ciencias Alimentarias

Otorgando su autorización como jurado para ser presentada y defendida oralmente el 06 de septiembre de 2017.

Dr. Cesar Ignacio Beristain Guevara

Dra. Elia Nora Aquino Bolaños

Dra. Maria Remedios Mendoza López

DEDICATORIAS

A mi papá porque sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible.

A Luis que me ha acompañado a lo largo de este camino siempre con la mejor sonrisa y ofreciendo todo su apoyo, gracias por entenderme, creer en mí y motivarme, porque has escuchado todas mis metas y aspiraciones y las has hecho tuyas con el único propósito de ayudarme a alcanzarlas, no tengo palabras para expresar lo agradecida que estoy con la vida por habernos conocido.

A mis amigas Flor y Jessica, por su amistad, su apoyo incondicional y por estar siempre presentes.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización del presente trabajo.

A mi directora de tesis Dra. Maribel Jiménez Fernández quien me dio la oportunidad de trabajar con ella y fue mi guía durante este trayecto compartiendo su atención y conocimientos, así como brindando siempre todo su apoyo.

A mi director de tesis Dr. Oscar García Barradas por sus consejos, su paciencia y por hacerme ver la química desde una nueva perspectiva.

A mis sinodales Dr. Cesar Ignacio Beristain Guevara, Dra. Elia Nora Aquino Bolaños y Dra. María Remedios Mendoza López por dedicar su tiempo a la revisión de este trabajo y por sus valiosas aportaciones que sin duda enriquecieron esta tesis y a mi persona.

Al Dr. Ebner por su disposición, sus enseñanzas, por compartir sus valores y conocimiento, me siento afortunada de haber sido su alumna pues profesores como usted inspiran a querer aprender, pensar y hacer del mundo un lugar mejor.

A mis compañeros de laboratorio Concha, Naida, Montse, Martín, Rosa, Flor, Erick, Jaquie, Dafne, Ricardo, Martín y Cindy por brindar su apoyo, por compartir sus conocimientos y por ser un equipo de trabajo con el que siempre se puede contar.

.

ÍNDICE

1	Introducción	1
2	Marco Teórico	2
2.1	Amaranto	2
2.2	Proteínas	4
2.3	Propiedades Funcionales	5
2.3.1	Solubilidad	7
2.3.2	Capacidad de retención de agua	8
2.3.3	Viscosidad	8
2.3.4	Gelificación	9
2.3.5	Propiedades emulsificantes	9
2.3.6	Formación de Espuma	10
2.3.7	Capacidad de Retención de Aceite	11
2.4	Modificación de Proteínas	11
2.4.1	Modificación Física	12
2.4.2	Modificación Química	14
2.5	Antecedentes	17
3	Planteamiento del Problema	19
4	Objetivos e hipótesis	20
4.1	Objetivo General	20
4.2	Objetivos Específicos	20
4.3	Hipótesis	20
5	Material y métodos	21
5.1	Materia Prima	21
5.2	Reactivos	21
5.3	Equipos	21
5.4	Obtención de aislado de proteína	22
5.5	Modificación Física	22
5.6	Modificación Química (Lipofilización)	23
5.6.1	Determinación del grado de modificación	23

5.7	Características Fisicoquímicas	24
5.7.1	Humedad.....	24
5.7.2	Proteína.....	24
5.7.3	pH.....	24
5.7.4	Acidez Titulable	25
5.7.5	Cenizas	25
5.7.6	Grasa.....	25
5.7.7	Fibra	26
5.7.8	Color.....	27
5.7.9	Actividad de Agua.....	27
5.7.10	Higroscopicidad.....	27
5.7.11	Grado de Apelmazamiento	28
5.7.12	Propiedades de Flujo.....	28
5.7.13	Conductividad Térmica.....	30
5.7.14	Potencial zeta.....	31
5.8	Micrográficas MEB.....	31
5.9	Isotermas de Sorción	32
5.9.1	Modelamiento de Isotermas de Sorción.....	32
5.10	Propiedades Termodinámicas	34
5.11	Propiedades Funcionales.....	36
5.11.1	Índice de Solubilidad (IS).....	36
5.11.2	Capacidad de Hinchamiento (CHi)	37
5.11.3	Actividad emulsionante (AE) y estabilidad de la emulsión (EE)	37
5.11.4	Capacidad espumante (CEs) y estabilidad de espuma (EEs).....	37
5.11.5	Capacidad de retención de agua (CRA) y aceite (CRAc)	38
5.12	Análisis Estadístico	38
6	Resultados y discusión	39
6.1	Extracción de Aislados de proteína de amaranto.	39
6.2	Determinación del Grado de Modificación	40
6.3	Composición de Aislados de Proteína de Amaranto Lipofilizada.	41
6.4	Caracterización Fisicoquímica de Aislados de Proteína de Amaranto	42
6.4.1	Análisis de Color.....	44

6.4.2	Propiedades de Flujo.....	47
6.4.3	Conductividad Térmica de Aislados de Proteína de Amaranto	50
6.4.4	Potencial z.....	51
6.5	Micrografías MEB.....	53
6.6	Isotermas de Sorción	56
6.7	Propiedades Termodinámicas.....	65
6.8	Propiedades Funcionales.....	74
6.8.1	Solubilidad.....	74
6.8.2	Capacidad de Hinchamiento.....	76
6.8.3	Actividad Emulsionante	77
6.8.4	Capacidad Espumante	80
6.8.5	Capacidad de Retención de Agua y Aceite.....	82
7	Conclusiones	85
8	Bibliografía.....	87
9	ANEXOS.....	99
9.1	Anexo 1. Curva de calibración de albúmina de suero bovino.	99
9.2	Anexo 2. Imágenes microscopio electrónico de barrido.	100
9.3	Anexo 3. Tamaño de Partícula, PDI y Potencial z	106
9.4	Anexo 4. Isotermas de Sorción.	109
9.5	Anexo 5. Análisis de imagen	111
9.6	Anexo 6. Datos CRA y CRAc	112
9.7	Anexo 7. Correlaciones de propiedades fisicoquímicas	113

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química de granos de varias especies de amaranto.....	3
Cuadro 2. Propiedades funcionales de las proteínas.	6
Cuadro 3. Modificación química de grupos funcionales de aminoácidos.....	15
Cuadro 4. Composición de aislados de proteína de amaranto modificados físicamente.	39
Cuadro 5. Determinación del grado de modificación para diferentes relaciones de proteína de amaranto y cloruro de ácido láurico.....	40
Cuadro 6. Rendimiento y composición de aislados de proteína de amaranto.	42
Cuadro 7. Humedad y actividad de agua.	43
Cuadro 8. pH y acidez titulable	43
Cuadro 9. Higroscopicidad	44
Cuadro 10. Análisis de Color de Aislados de Proteína de Amaranto.	45
Cuadro 11. Densidad, Índice de Hausner y Compresibilidad de Aislados de Proteína de Amaranto.	48
Cuadro 12. Ángulo de reposo, densidad de partícula, porosidad y grado de apelmazamiento de aislados de proteína de amaranto.	49
Cuadro 13. Conductividad Térmica de Aislados de Proteínas de Amaranto.....	50
Cuadro 14. Parámetros obtenidos a partir del ajuste de las isothermas con el modelo de GAB a diferentes temperaturas de las muestras SE, CL y NL.....	61
Cuadro 15. Índice de Solubilidad (IS).....	75
Cuadro 16. Capacidad de Hinchamiento (CHi).....	77
Cuadro 17. Actividad Emulsionante (AE) de Aislados de Proteína de Amaranto.....	78
Cuadro 18. Estabilidad de la Emulsión (EE) de Aislados de Proteína de Amaranto.	80
Cuadro 19. Capacidad de Formación de Espuma (CEs) y Estabilidad de la Espuma (EEs).....	81
Cuadro 20. Estabilidad de la Espuma (EEs)	82

Cuadro 21. Imágenes obtenidas en microscopio electrónico de barrido de la muestra SE y SEyLpf a diferentes aumentos.....	100
Cuadro 22. Imágenes obtenidas en microscopio electrónico de barrido de la muestra CL y CLyLpf a diferentes aumentos.....	102
Cuadro 23. Imágenes obtenidas en microscopio electrónico de barrido de la muestra NL y NLyLpf a diferentes aumentos.....	104
Cuadro 24. Valores obtenidos de tamaño de partícula en Malvern Zetasizer Nano	106
Cuadro 25. Valores obtenidos de índice de polidispersión (PDI) en Malvern Zetasizer Nano	107
Cuadro 26. Valores obtenidos de potencial z en Malvern Zetasizer Nano.....	108
Cuadro 27. Datos obtenidos de las isotermas de adsorción a diferentes temperaturas para la muestra secada en estufa (SE)	109
Cuadro 28. Datos obtenidos de las isotermas de adsorción a diferentes temperaturas para la muestra congelada en ultra congelador y liofilizada (CL)	109
Cuadro 29. Datos obtenidos de las isotermas de adsorción a diferentes temperaturas para la muestra congelada en nitrógeno líquido y liofilizada (NL).....	110
Cuadro 30. Parámetros de textura obtenidos de micrografías de MEB de aislados de proteína de amaranto.....	111
Cuadro 31. Capacidad de Retención de Agua (CRA) y Capacidad de Retención de Aceite (CRAc)	112
Cuadro 32. Tabla de Correlaciones entre propiedades fisicoquímicas de aislados de proteína de amaranto modificados físicamente	113
Cuadro 33. Tabla de Correlaciones entre propiedades fisicoquímicas de aislados de proteína de amaranto modificados químicamente	114
Cuadro 34. Tabla de correlaciones entre propiedades funcionales de aislados de proteína de amaranto modificados físicamente	115
Cuadro 35. Tabla de correlaciones entre propiedades funcionales de aislados de proteína de amaranto modificados químicamente	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacción de Schotten-Baumann.....	16
Figura 2. Mecanismo de Reacción de Acilación con Cloruro de Ácido Graso.	17
Figura 3. Potencial zeta a pH 4, 7 y 10 de aislados de proteína de amaranto.	52
Figura 4. Micrografías obtenidas en microscopio electrónico de barrido a 1200X (a) y 4300X (b) de aislados modificados físicamente de proteína de amaranto.	54
Figura 5. Micrografías obtenidas en microscopio electrónico de barrido a 1200X (a) y 4300X (b) de aislados de proteína de amaranto modificados químicamente.....	55
Figura 6. Isotermas de adsorción a 25 °C de las muestras SE, CL y NL.	56
Figura 7. Isotermas de sorción a 25, 35 y 45 °C de la muestra secada en estufa (SE) .	58
Figura 8. Isotermas de sorción a 25, 35 y 45 °C de la muestra congelada en congelador a -40 °C y liofilizada (CL).	59
Figura 9. Isotermas de sorción a 25, 35 y 45 °C de la muestra congelada con nitrógeno líquido y liofilizada (NL).	60
Figura 10. Isoterma de adsorción a 25 °C de la muestra NLYLpf	64
Figura 11. Variación de la Entropía Diferencial e Integral a diferentes Contenidos de humedad a 25, 35 y 45 °C de la proteína SE.	66
Figura 12. Variación de la Entropía Integral a diferentes a_w a 25, 35 y 45 °C de la proteína SE.	67
Figura 13. Variación de la Entropía Diferencial e Integral a diferentes Contenidos de humedad a 25, 35 y 45 °C de la proteína CL.	69
Figura 14. Variación de la Entropía Integral a diferentes a_w a 25, 35 y 45 °C de la proteína CL.	70
Figura 15. Variación de la Entropía Diferencial e Integral a diferentes Contenidos de humedad a 25, 35 y 45 °C de la proteína NL.	72
Figura 16. Variación de la Entropía Integral a diferentes a_w a 25, 35 y 45 °C de la proteína NL.	73
Figura 17. Capacidad de Retención de Agua (CRA) y Capacidad de Retención de Aceite (CRAc)	84
Figura 18. Curva de Calibración albúmina de suero bovino	99

RESUMEN

Las proteínas son ingredientes frecuentemente utilizados para proporcionar ciertas propiedades como sabor, color, textura y aroma a los alimentos, la industria está constantemente en busca de nuevas proteínas de buena calidad para impartir éstas propiedades a los alimentos, el objetivo de este trabajo fue el de extraer proteínas de amaranto, analizar sus características fisicoquímicas y propiedades funcionales, así como la posibilidad de mejorar estas propiedades funcionales mediante modificaciones físicas y químicas. La modificación física se realizó utilizando tres diferentes métodos de secado diferentes de los aislados de proteína de amaranto: secado en estufa (SE), liofilización con congelación previa a -40 °C en ultra congelador (CL) y liofilización con una congelación previa con nitrógeno líquido (NL). La modificación química se realizó a partir de los aislados obtenidos en las modificaciones físicas mediante acilación de aminas con ácidos carboxílicos, también conocido como lipofilización (SEyLpf, CLyLpf y NLyLpf). La modificación física de los aislados presentó mejoras considerables en la capacidad de hinchamiento, la actividad emulsionante, la capacidad y estabilidad de la espuma y la capacidad de retención de agua, por otro lado, la modificación química disminuyó considerablemente la solubilidad de las muestras, aumentó la higroscopicidad y la capacidad de retención de agua y de aceite.

Palabras Clave: Proteínas de origen vegetal, amaranto, modificación de proteínas, lipofilización, propiedades funcionales.

SUMMARY

Proteins are often used to provide certain properties such as flavor, color, texture and odor to the food. The industry is constantly looking for novel good quality proteins to impart these properties to the food, the objective of the present work was to obtain an amaranth protein isolate, to analyze its physicochemical characteristics and functional properties as well as the possibility of improving these functional properties by means of physical and chemical modifications. The physical modification was performed by three different drying methods of the amaranth protein isolates: oven dried (SE), lyophilization with previous freezing at -40 ° C (CL) and lyophilization with previous freezing with liquid nitrogen (NL). The chemical modification was carried out from isolates obtained in the physical modifications by acylation of amines with carboxylic acids, a process known as lipophilization (SEyLpf, CLyLpf and NLyLpf). The physical modification of the isolates showed an improvement in the swelling capacity, the emulsifying activity, the foaming capacity and the water retention capacity, on the other hand the chemical modification considerably decreased the solubility of the samples but increased the hygroscopicity and the water and oil retention capacity.

Key Words: Plant proteins, amaranth, protein modification, lipophilization, functional properties.

1 INTRODUCCIÓN

Las proteínas desempeñan funciones específicas y son ingredientes necesarios en muchos procesos de alimentos, éstas imparten propiedades como textura, color, aroma y sabor, actualmente las proteínas que se utilizan para impartir propiedades funcionales a los alimentos son las de origen animal, sin embargo, debido a diferencias generacionales, el cambio en el estilo de vida, la preocupación por el cuidado del medio ambiente y el desarrollo de alergias y enfermedades, los consumidores están sustituyendo el consumo de proteínas de origen animal por proteínas de origen vegetal y microbiano.

El mercado actual de proteínas de origen vegetal está ocupado en su mayoría por las proteínas de soya y trigo, y en menor proporción chícharo, cáñamo, nueces y otras, sin embargo, algunas de estas proteínas pueden ser de difícil acceso o ser deficientes en por lo menos alguno de los aminoácidos esenciales e incluso presentar riesgos para la salud de individuos susceptibles como es el caso del gluten, es por esto que el amaranto es una buena alternativa debido a que es un grano económico, libre de gluten, fácil de cultivar y cuenta con un perfil de aminoácidos esenciales superior al de la mayoría de los cereales y legumbres, sin embargo, la utilización de las proteínas de amaranto está limitada debido a que no tienen la capacidad de proveer ciertas propiedades funcionales deseadas en los alimentos.

Ha sido reportada la posibilidad de la modificación de las propiedades funcionales de las proteínas mediante métodos físicos, químicos y enzimáticos, en el presente trabajo se analiza la posibilidad de mejorar las propiedades funcionales mediante dos métodos: una modificación física que consiste en la manipulación de la estructura de la superficie de las moléculas, y una modificación química, en la cual se altera la distribución de cargas de las proteínas para cambiar el comportamiento hidrofílico de éstas mediante el acoplamiento de componentes lipídicos, con el propósito de obtener una proteína que además de poseer un alto valor nutritivo, cuente con propiedades que puedan satisfacer las necesidades de los consumidores.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Amaranto

El cultivo de amaranto fue fundamental para las civilizaciones precolombinas, además de ser una de sus principales fuentes alimenticias era utilizado en rituales y como tributo en diversas culturas ancestrales (Kauffman y Weber, 1990). El registro arqueológico más antiguo de amaranto corresponde a granos de *A. cruentus* de más de 5000 años de antigüedad hallados en Tehuacán, México, lo que convierte al amaranto en uno de los cultivos alimenticios más antiguos (Montufar López, 2012; Paredes-López y Hernández-López, 1992).

El cultivo de amaranto o *huauhtli*, en lengua náhuatl, fue dejado en el olvido a partir de la conquista de los españoles, quienes consideraban pagano el uso de la semilla en los rituales mesoamericanos, en los que la semilla era tostada, molida y mezclada con alguna melaza para formar una pasta llamada *tzoalli* con la que formaban figurillas que simulaban a los dioses. Al final de los rituales que incluían sacrificios humanos y de animales, las figuras de *tzoalli* eran repartidas y consumidas como alimento sagrado (Morán-Bañuelos *et al.*, 2012).

Amaranthus es uno de los 70 géneros que conforman la familia Amaranthaceae, y el género comprende alrededor de 60 especies (Délano-Frier y Martínez-Gallardo, 2012); es una planta dicotiledónea que produce semillas tipo granos, por lo que se le ha denominado como pseudocereal (Berghofer y Schoenlechner, 2002). Estas plantas crecen rápidamente debido a su eficiente fotosíntesis conocida como vía de fijación de carbono C4, son muy resistentes a la sequía, la salinidad, calor, pestes y pueden crecer en suelos que no son aptos para el cultivo de otros cereales (Omamt *et al.*, 2006; Espitia *et al.*, 2012).

Hay tres especies del género *Amaranthus* que se cultivan actualmente para el consumo de sus semillas: *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* nativas de México y Guatemala y *A. caudatus* nativa de las regiones Andinas de Ecuador, Perú y Bolivia (Sauer, 1967). Por otro lado, especies de amaranto como *A. tricolor*, *A. dubis*, *A. cruentus* y *A. hybridus* son cultivadas para utilizar sus hojas en la preparación de sopas y ensaladas en África, el Sureste de Asia, el sur de China, el sur de India y el Caribe (National Academy of Science, 1984; Shukla *et al.*, 2006). El grano de amaranto se consume hervido, tostado, reventado o como harina en combinación con otras para hacer pan al moler el grano (National Academy of Science, 1984). En México el grano se revienta y se aglutina con jarabe o miel para elaborar dulces conocidos como “alegrías” (Kauffman y Weber, 1990).

El 26% de la semilla de amaranto está constituido por el germen, rico en aceite y proteínas y el salvado que contiene proteínas, vitaminas, fibra y minerales y el 74% por harina que está compuesta principalmente de almidón (National Academy of Science, 1984). En el Cuadro 1 se muestra la composición química aproximada reportada de granos de algunas especies de amaranto.

Cuadro 1. Composición química de granos de varias especies de amaranto.

Componente	<i>A. caudatus</i>	<i>A. cruentus</i>	<i>A. hypochondriacus</i>
Carbohidratos (g/100 g)	59.6-62.8	60.7-62.6	57.0
Proteína cruda^a (g/100 g)	17.6-18.4	13.2-18.2	17.9
Grasa (g/100 g)	6.9-8.1	6.3-8.1	7.7
Fibra cruda (g/100 g)	3.2-5.8	3.6-4.4	2.2
Cenizas (g/100 g)	3.1-4.4	2.8-3.9	4.1
Humedad (g/100 g)	9.5-11.6	6.2-8.8	11.1

^a N x 5.85

Adaptada de Cai *et al.*, 2004.

2.2 Proteínas

El contenido de proteína del grano de amaranto en crudo ha sido reportado en un rango entre 13 y 18% para las especies *A. caudatus*, *A. cruentus*, *A. hypochondriacus*, *A. edulis* y *A. hybridus* (Reyna, 1988). La calidad de las proteínas depende de su composición aminoacídica, las proteínas de cereales y leguminosas suelen ser deficientes en al menos uno de los aminoácidos esenciales, en especial, la lisina, treonina, triptófano y los aminoácidos azufrados suelen ser limitantes pues se encuentran en bajas concentraciones en las proteínas alimentarias (Damodaran, 2000).

Las proteínas de amaranto presentan un perfil de aminoácidos muy cercano al óptimo recomendado por la FAO/WHO, tiene altos niveles del aminoácido lisina, que es escaso en la mayoría de los cereales, contiene casi el doble de lisina que la proteína del trigo y el triple que la proteína del maíz (Paredes-López y Hernández-López, 1992); además de lisina presenta altos contenidos de arginina y triptófano (Juan *et al.*, 2007). Los aminoácidos más escasos son leucina, valina, treonina e isoleucina, sin embargo, la cantidad de treonina es suficiente para satisfacer las necesidades nutricionales según los valores recomendados por la FAO/WHO (Becker *et al.*, 1981; Juan *et al.*, 2007) y la leucina se encuentra en abundancia en la mayoría de los granos y legumbres. La proteína de amaranto, con un valor biológico de 75, se acerca más que los demás granos proteicos al balance perfecto de aminoácidos esenciales que en teoría sería de 100 en la escala de calidad de las proteínas basada en la composición aminoacídica, mientras que la puntuación de granos como el maíz es de alrededor de 44, el trigo 60, la soya 68 y la leche de vaca 72; si se mezcla harina de amaranto y harina de maíz, la combinación casi alcanza una puntuación perfecta de 100, debido a que los aminoácidos deficientes en uno son abundantes en el otro (National Academy of Science, 1984).

Osborne (1924) realizó una clasificación de las proteínas de semillas por su solubilidad en diferentes solventes: albúminas, solubles en agua; globulinas, solubles en soluciones salinas; prolaminas, solubles en soluciones alcohólicas y glutelinas, solubles en soluciones ácidas o básicas (Huerta Ocampo y Barba de la Rosa, 2012). En las proteínas de amaranto, en general, la fracción mayoritaria es la de albúminas (32-33%), seguida por las fracciones de glutelinas (26.5-30%), globulinas (19.5-20.5%) y en una

menor proporción prolaminas (1.6-3%) (Leyva-Lopez *et al.*, 1995). La fracción de albúminas presenta un alto contenido del aminoácido lisina, las globulinas son ricas en metionina y leucina, las prolaminas en treonina, fenilalanina y aminoácidos azufrados y las glutelinas contienen la mayor proporción de aminoácidos esenciales como leucina, treonina e histidina (Paredes-López y Hernández-López, 1992; Barba de la Rosa *et al.*, 1992). Las prolaminas son consideradas como tóxicas para personas con enfermedad celiaca, por lo que el bajo contenido de prolaminas en la proteína de amaranto la convierte en una excelente opción alimenticia (Shoenlechner *et al.*, 2010)

2.3 Propiedades Funcionales

La predilección por un alimento u otro está basada especialmente en los atributos sensoriales como son la textura, el color, el sabor y la apariencia en general. Las características sensoriales de los alimentos son consecuencia del efecto total de interacciones complejas entre los diversos componentes del alimento. Generalmente las proteínas afectan estas características sensoriales mediante la formación de soles, geles, espumas, emulsiones, reacciones de oscurecimiento, proteólisis, y por atrapamiento y ligamiento de sabores (Zayas, 1997; Damodaran, 2000).

Las propiedades funcionales de las proteínas son todas las propiedades no nutricionales que éstas imparten a los productos alimenticios (Roussel-Philippe *et al.*, 2000), denotan las características fisicoquímicas que determinan el uso de las proteínas en los alimentos y el comportamiento durante el procesado, almacenamiento y consumo de los mismos (Zayas, 1997). En el Cuadro 2 se enlista la clasificación de las propiedades funcionales por las interacciones de las cuales se derivan, el mecanismo mediante el cual se producen y los sistemas alimentarios en los que se suelen utilizar.

Los factores que determinan las propiedades funcionales son el procesado de los alimentos y las características fisicoquímicas propias de las proteínas. Los procesos que suelen tener un efecto en la funcionalidad de la proteína son: la procedencia de la proteína, el proceso de extracción, la temperatura que puede ocasionar la desnaturalización de la proteína, el proceso de secado que puede causar cambios en la porosidad y el tamaño de partícula, los cambios de pH, las impurezas como grasas y

carbohidratos que pueden formar complejos con las proteínas y el almacenamiento, que puede afectar la estabilidad de la proteína (Pour-El, 1981).

Cuadro 2. Propiedades funcionales de las proteínas.

Interacciones	Propiedad Funcional	Mecanismo	Sistemas Alimentarios
Hidrofílicas	Solubilidad	Polaridad, solvatación de proteínas.	Bebidas, sustitutos de crema para café.
	Retención de Agua	Puentes de hidrógeno, hidratación iónica.	Cárnicos, embutidos, panificación.
	Viscosidad	Fijación de agua, tamaño y forma hidrodinámica.	Batidos, bebidas, lácteos, sopas, salsas, aderezos.
	Gelificación	Atrapamiento e inmovilización de agua, formación de redes tridimensionales.	Cárnicos, quesos, natillas, productos horneados.
Hidrofílicas-Hidrofóbicas	Emulsificación	Adsorción y formación de película en la interfase.	Embutidos, pasteles, sopas, aderezos.
	Formación de espuma	Adsorción en la interfase y formación de película.	Coberturas batidas, postres, helados.
Hidrofóbicas	Retención de aceite	Interacciones hidrofóbicas, atrapamiento.	Cárnicos, embutidos, donas.

Adaptada de Damodaran, 2000; Kinsella y Melachouris, 1976; Zayas, 1997.

Las características fisicoquímicas que tienen un efecto en la funcionalidad de las proteínas incluyen: la composición y secuencia aminoacídica, el tamaño, las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria, y las fuerzas y enlaces que afectan a las proteínas como son las fuerzas de Van der Waals, enlaces iónicos, puentes de hidrógeno, enlaces covalentes, etc. (Pour-El, 1981).

Las proteínas alimentarias se componen usualmente de fracciones, cada una con diferentes propiedades. En consecuencia, la funcionalidad asociada con ciertas fracciones de proteínas podría no reflejarse en las propiedades de toda la proteína (Kinsella y Melachouris, 1976).

La conformación nativa de las proteínas globulares, en las cuales los aminoácidos polares están expuestos a la fase acuosa, favorece la solubilidad, y por lo tanto, esta conformación es deseada para que las proteínas sean útiles en aplicaciones de emulsificación y espumado, mientras que una conformación desdoblada es más deseable en las proteínas para gelificación y estabilidad de espumas (Kinsella y Melachouris, 1976).

2.3.1 Solubilidad

La solubilidad es la cantidad de proteína de una muestra que se disuelve en una disolvente. Las propiedades espesantes, espumantes y gelificantes dependen de la solubilidad proteica. Las proteínas utilizadas como aditivos en alimentos pueden ser parcialmente o completamente solubles o completamente insolubles en agua (Zayas, 1997; Damodaran, 2000).

Existen diversos factores por los que se ve afectada la solubilidad de las proteínas, entre los cuales se encuentran la fuerza iónica, el tipo de disolvente, pH, temperatura y las condiciones de procesamiento (Zayas, 1997). Las interacciones hidrofóbicas promueven la asociación proteína-proteína y disminuyen la solubilidad, mientras que las interacciones iónicas promueven las interacciones proteína-agua y aumentan la solubilidad (Damodaran, 2000).

A valores de pH mayores o menores al punto isoeléctrico, las proteínas tienen cargas netas positivas o negativas, respectivamente, lo que ocasiona que exista repulsión o atracción de los restos cargados, lo que promueve la solubilización. La mayoría de las proteínas alimentarias exhiben una menor solubilidad a pH en el punto isoeléctrico (4-5) y la máxima solubilidad a pH alcalino (Damodaran, 2000).

2.3.2 Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua es la habilidad de retener agua propia y añadida durante la aplicación de fuerzas como presión, centrifugación o calentamiento (Zayas, 1997). Las moléculas de agua se fijan a varios grupos de las proteínas, entre los cuales se encuentran los grupos funcionales con carga mediante interacciones ion-dipolo, los grupos peptídicos del esqueleto, los grupos amida de asparagina y glutamina, los grupos hidroxilo de los residuos de serina, treonina y tirosina mediante interacciones dipolo-dipolo y los residuos hidrofóbicos mediante interacciones dipolo inducido-dipolo (Damodaran, 2000).

La capacidad de retención de agua de una proteína estará influenciada por la concentración de la proteína, el pH, las fuerzas iónicas, temperatura, condiciones de almacenamiento, la presencia de otros componentes de los alimentos como polisacáridos hidrofílicos, lípidos y sales, y la composición aminoacídica (entre más elevado sea el número de residuos cargados, mayor es la capacidad de retención) (Damodaran, 2000).

2.3.3 Viscosidad

La viscosidad de una disolución define su resistencia al flujo cuando se somete a la acción de una fuerza de cizalla (Damodaran, 2000). El conocimiento de las propiedades de flujo y viscosidad de las dispersiones proteicas es de gran importancia en relación con el procesado y diseño del proceso (bombeo, tasa de alimentación, secado por aspersion, intercambio de calor) y desarrollo de nuevos productos (Kinsella y Melachouris, 1976).

Las propiedades de flujo están influenciadas por el tamaño molecular, la forma, la carga, solubilidad, y capacidad de hinchamiento de las moléculas de las proteínas, y

estas en cambio están afectadas por las condiciones ambientales, temperatura, concentración, pH, fuerza iónica, y procesos previos (Kinsella y Melachouris, 1976).

2.3.4 Gelificación

El proceso de gelificación es el resultado de interacciones proteína-proteína y proteína-agua. El gel se forma cuando las proteínas se desenvuelven ligeramente y segmentos polipeptídicos interactúan en puntos específicos para formar redes reticuladas tridimensionales. Para la gelificación se requiere un desplegamiento parcial de las proteínas que ocasiona ligeros cambios en su estructura secundaria (Clark y Lee-Tuffnell, 1986).

Los enlaces responsables de la formación del gel son principalmente puentes disulfuro, puentes salinos y/o interacciones hidrofóbicas. Para que un gel sea rígido se requieren concentraciones altas de proteína, pero la estructura del gel y sus propiedades reológicas varían dependiendo del tipo de proteína, pH, fuerza iónica y temperatura (Walstra, 2000).

Los geles se caracterizan por una alta viscosidad, plasticidad, y elasticidad. La habilidad de las proteínas para formar un gel y proveer una matriz estructural para retener agua, sabores, azúcares e ingredientes alimentarios es útil en el desarrollo de nuevos productos, porque provee una dimensión añadida a la funcionalidad de la proteína (Kinsella y Melachouris, 1976).

Además de la formación de cuajadas y geles, que pueden ser explotadas para fabricar alimentos análogos, como quesos y carnes, la capacidad de nuevas proteínas de formar pastas con propiedades texturales, físicas y organolépticas peculiares, merece atención porque son excelentes vehículos de nutrientes (Kinsella y Melachouris, 1976).

2.3.5 Propiedades emulsificantes

Las emulsiones son gotas inmiscibles dispersas en otra fase líquida y estabilizadas por componentes de interface (Pour-El, 1981), estos componentes de interface también

conocidos como emulsificantes son un grupo de agentes con superficies activas que pueden estabilizar una dispersión de dos líquidos inmiscibles (McWatters y Cherry, 1981).

Las proteínas tienen superficies activas, por su naturaleza anfipática son buenos emulsificantes para alimentos. Su capacidad para actuar como surfactantes depende de la habilidad que presenten para formar películas que rodeen a los glóbulos y para disminuir la tensión en la interface aceite-agua (Kinsella *et al.*, 1985).

La estabilidad de la emulsión es la capacidad de las gotas emulsionadas de permanecer dispersas sin separarse por coalescencia o floculación (Zayas, 1997). Entre más alta sea la carga neta (a un pH dado) de una proteína en la interface aceite-agua, mayor será la repulsión entre las gotas, lo que mejora la estabilidad (Richardson y Kester, 1984).

2.3.6 Formación de Espuma

La espuma es un sistema de dos fases que consiste en porciones de aire separadas por una delgada capa líquida continua (Phillips *et al.*, 1987). Las proteínas intervienen en la distribución uniforme de las burbujas de aire en la espuma, lo que les imparte a los alimentos cuerpo, suavidad y ligereza (Zayas, 1997).

La función básica de las proteínas en la formación de espuma es disminuir la tensión interfacial para mejorar las propiedades viscoelásticas de la fase líquida y formar películas resistentes (Zayas, 1997). Ciertas proteínas como la albúmina de huevo, exhiben una excelente capacidad de encapsular aire, rodeando las gotas de aire con capas de proteína cohesiva la cual tiene suficiente fuerza mecánica para prevenir la coalescencia o ruptura de las gotas (Kinsella y Melachouris, 1976).

Las proteínas con propiedades espumantes ideales tienen la habilidad de formar membranas alrededor de las gotas de aire para someterse a cierto grado de desnaturalización espontánea, el cual estabiliza la espuma y forma un esqueleto estructural de espuma (Kinsella y Melachouris, 1976; Phillips *et al.*, 1987).

La estabilidad de la espuma depende de su habilidad para retener su volumen máximo a través del tiempo, y usualmente se determina midiendo la tasa de filtración de fluido de la espuma (Kinsella y Melachouris, 1976). Para que la espuma sea estable se necesita que las proteínas tengan la capacidad de formar películas que sean viscosas, elásticas, continuas e impermeables alrededor de cada burbuja de gas (Zayas, 1997).

La fuerza de la espuma depende de la magnitud de las interacciones proteína-proteína y proteína-agua. Un cierto grado de cohesión se necesita para la formación de una película de proteína, lo cual no ocurre si hay mucha interacción proteína-agua y el exceso de interacciones proteína-proteína resulta en agregación, desnaturalización, y formación reducida de espuma, por lo cual se requiere que la proteína sea soluble (Kinsella y Melachouris, 1976).

2.3.7 Capacidad de Retención de Aceite

La capacidad de las proteínas de retener lípidos está influenciada por las interacciones proteína-lípido y el arreglo espacial de la fase lipídica, el cual está determinado por las interacciones lípido-lípido. Enlaces hidrofóbicos, electrostáticos, no covalentes y puentes de hidrógeno son los involucrados en las interacciones proteína-lípido (Zayas, 1997). La habilidad de la proteína para retener lípidos es muy importante para aplicaciones como sustitutos de carnes y extensores, principalmente porque mejora la retención de sabor y mejora la sensación en la boca (Kinsella y Melachouris, 1976).

2.4 Modificación de Proteínas

Con la finalidad de optimizar las propiedades funcionales de las proteínas se han realizado alteraciones de su estructura mediante procesos físicos, químicos o enzimáticos. Estas alteraciones pueden incluir modificaciones en la conformación y en la estructura primaria, secundaria o terciaria de las proteínas, mediante disrupción y reformación de enlaces covalentes y fuerzas secundarias (Zayas, 1997).

Los procesos físicos involucran cambios en el tamaño de partícula mediante la aplicación de temperatura, remoción de volátiles y humedad; los procesos químicos, se

basan principalmente en alteraciones de pH, derivación y formación de complejos; y los métodos enzimáticos, los cuales aprovechan a las enzimas producidas por ciertos microorganismos (Pour-Ei, 1981).

Esta modificación puede resultar en mejoras en sabor, textura y color; eliminación de olores desagradables; destrucción de enzimas indeseables, factores antinutritivos, hemaglutininas y alérgenos, y retardo de algunas reacciones como la reacción de Maillard (Zayas, 1997; Feeney y Whitaker, 2016).

2.4.1 Modificación Física

La modificación física de las proteínas se basa principalmente en la manipulación de las condiciones del ambiente en el que se encuentra la proteína, modificaciones de este tipo se pueden derivar del procesamiento mismo de los alimentos, por ejemplo, alteraciones de pH o de temperatura provocan cambios fisicoquímicos en las proteínas que afectan sus propiedades funcionales (Phillips *et al.*, 1994).

El método de extracción y secado de los aislados de proteínas afecta la funcionalidad de las proteínas; procesos como calentamiento, deshidratación, congelamiento, ultrafiltración y homogenización durante el proceso de obtención de aislados pueden tener efectos sobre las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, derivados de cambios en la estructura de las mismas que afectan las interacciones con el medio, con otros componentes de los alimentos y las interacciones proteína-proteína (Zayas, 1997; Sumner *et al.*, 1981).

Las interacciones de las proteínas con el medio son influenciadas por diversos factores, generalmente, el factor principal que afecta la transferencia de masa en los sólidos es la difusión molecular, la cual se basa en las leyes de Fick, la primera ley de Fick establece que en un medio continuo y en presencia de un gradiente de concentración, la migración neta de moléculas de soluto ocurre de una región de alta concentración a una región de baja concentración, sin embargo, existen otros mecanismos que afectan esta transferencia de masa como es la presencia de poros o

capilaridades en la microestructura de los sólidos, principalmente los de naturaleza particulada (Aguilera, 2005).

El secado es una tecnología que aumenta la estabilidad de los alimentos disminuyendo el contenido de humedad de éstos, sin embargo, el proceso de secado está asociado con cambios estructurales y las características del producto final como la sorción de agua, la porosidad y el color dependerán del método de secado utilizado; la liofilización o secado por congelamiento es uno de los procesos de deshidratación más avanzados que provee un producto seco con una estructura porosa (Aguilera, 2005; Tsami *et al.*, 1999).

2.4.1.1 Liofilización

El proceso de secado afecta significativamente el color, la textura, densidad, porosidad y las características de sorción de los materiales en general. El secado por congelación o liofilización es un método basado en el fenómeno de sublimación, el producto es inicialmente congelado y luego expuesto a un ambiente de temperatura controlada y presión reducida (<300Pa), la liofilización es el método de secado que preserva mejor las propiedades del producto inicial como son la forma, dimensiones, apariencia, sabor, color, textura y actividad biológica, por lo que es el método más conveniente para conservar la calidad del producto (Toontom *et al.*, 2012; Ceballos *et al.*, 2012).

La estructura final de la superficie de los productos liofilizados depende del proceso de congelación previo. La velocidad de congelamiento y la temperatura mínima alcanzada durante el congelamiento son factores que determinarán las propiedades del producto obtenido; una velocidad de congelamiento rápida, genera núcleos de hielo pequeños, mientras que bajas velocidades derivan en la formación de grandes cristales de hielo; el tamaño de los cristales formados durante la congelación afecta directamente la forma y dimensiones de los poros y consecuentemente el tiempo de sublimación y el flujo de masa durante la deshidratación y reconstitución de los materiales (Ceballos *et al.*, 2012; Hottot *et al.*, 2004).

Durante la liofilización en algunos productos se ocasiona un colapso en la estructura cuando la temperatura de la muestra congelada es mayor que una temperatura característica llamada temperatura de colapso (T_c). Un producto colapsado pierde su forma convirtiéndose en un líquido muy viscoso y a menudo muestra poca retención de volátiles, rehidratación pobre y un secado irregular. Cuando ocurre el colapso durante la liofilización los núcleos de hielo parecen disolverse antes que sublimarse, lo que resulta en la obstrucción de los capilares y esto conlleva a un aumento en la resistencia al flujo de vapor. El espacio ocupado por el hielo en el material congelado formará parte de los poros en la matriz seca, menor cantidad de espacios vacíos indica menor cantidad de capilares y por lo tanto menos área superficial interna (Tsourouflis *et al.*, 1976).

La tasa de congelación puede considerarse en términos de tasa de nucleación y crecimiento de los cristales de hielo. La tasa de nucleación influye en el número de cristales de hielo formados y los tamaños relativos de los cristales de hielo, por lo tanto, también en el tamaño de los poros y el grosor de la matriz. El congelamiento rápido aumenta el número de núcleos formados, por lo tanto, la distancia entre los cristales de hielo disminuye, así como el grosor de la matriz (Tsourouflis *et al.*, 1976).

2.4.2 Modificación Química

La introducción de ciertos grupos funcionales a las proteínas permite modificar su punto isoeléctrico, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, etc., y se puede lograr mediante reacciones químicas o enzimáticas (Richardson y Kester, 1984).

Hay un número limitado de grupos funcionales en las cadenas laterales de residuos de aminoácidos en las proteínas disponibles para la modificación, estos grupos funcionales son fácilmente modificados para producir una amplia gama de aductos de proteínas (Damodaran, 2000), en el Cuadro 3 se enlistan los grupos funcionales las cadenas laterales de los aminoácidos que pueden ser modificados y la reacción con la que se pueden modificar.

Cuadro 3. Modificación química de grupos funcionales de aminoácidos.

Aminoácido	Grupo Funcional	Reacción de Modificación
Ác. Aspártico y Glutámico	Carboxilo	Esterificación
Arginina	Guanidino	Condensación con dicarbonilos
Cisteína	Tiol	Oxidación, Alquilación
Histidina	Imidazol	Fotoxidación, Yodación, Alquilación
Lisina	Amino	Alquilación, Acilación
Metionina	Sulfhidrilo	Oxidación, Alquilación
Tirosina	Fenol	Yodación, Acilación
Triptófano	Indol	Fotoxidación

Adaptado de Feeney y Whitaker, 2016; Richardson y Kester, 1984.

De las reacciones de modificación citadas anteriormente, sólo algunas son apropiadas para la modificación de proteínas alimentarias como son la alquilación reductiva y la acilación.

2.4.2.1 Lipofilización

El término lipofilización se refiere al fenómeno de incrementar la hidrofobicidad de la superficie de las proteínas mediante la adición de componentes lipídicos, que incrementan la afinidad de las proteínas por las moléculas apolares (Haque y Kito, 1983), lo que las hace más liposolubles y facilita su integración en los sistemas lipídicos y su translocación a través de membranas biológicas (Roussel-Philippe *et al.*, 2000).

El grupo amino en la posición ϵ de los residuos de lisina y el grupo SH de la cisteína son los grupos nucleofílicos más reactivos, por lo que los procedimientos más utilizados para la modificación química de las proteínas atacan a estos grupos (Damodaran, 2000). La modificación de estos grupos funcionales implica el uso de reactivos que reaccionen covalentemente con estos grupos funcionales (Matemu *et al.*, 2011).

El mecanismo mediante el cual se modifican las propiedades de las proteínas depende de la naturaleza del reactivo utilizado para la reacción, éste puede modificar el balance de cargas de la molécula de diferentes maneras, puede preservar la carga positiva de los grupos amino, suprimir la carga y convertir la molécula en neutra, o imponer una carga negativa que sustituya la carga positiva original (Lakkis y Villota, 1992).

Algunos reactivos utilizados como agentes para la lipofilización de proteínas alimentarias han sido: ésteres de *N*-hidroxisuccinimida (Haque y Kito, 1982; Haque *et al.*, 1982; Matemu *et al.*, 2011), anhídrido citracónico y succínico (Barber y Warthesen, 1982), anhídrido acético (Franzen y Kinsella, 1976), anhídridos de ácidos grasos (Creuzenet *et al.*, 1992) y cloruros de ácidos grasos (Roussel-Philippe *et al.*, 2000).

La lipofilización se puede realizar por acilación de aminas con ácidos carboxílicos para formar amidas, mediante la reacción de Schotten-Baumann que se muestra en la Figura 1 (Feeney y Whitaker, 2016; Kinsella *et al.*, 1985; Richardson y Kester, 1984; Roussel-Philippe *et al.*, 2000).

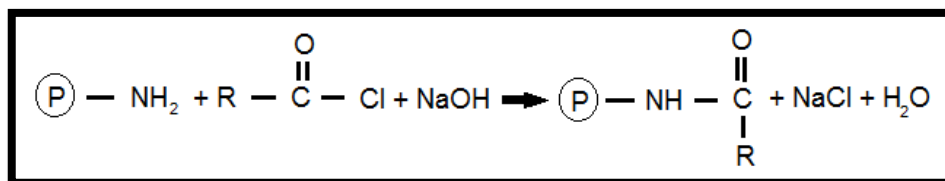


Figura 1. Reacción de Schotten-Baumann.
Adaptada de Lamus y Barrera-Arellano, 2005.

La reacción de Schotten-Baumann es una reacción de acilación que se da en presencia de una base, el mecanismo de la reacción se ilustra en la Figura 2, la reacción comienza con un ataque nucleófilo del grupo amino al carbono del haluro, la base remueve fácilmente el cloruro y el hidrógeno que se libera, y finalmente se obtiene la proteína ligada al ácido graso, sal y agua (Wang, 2009).

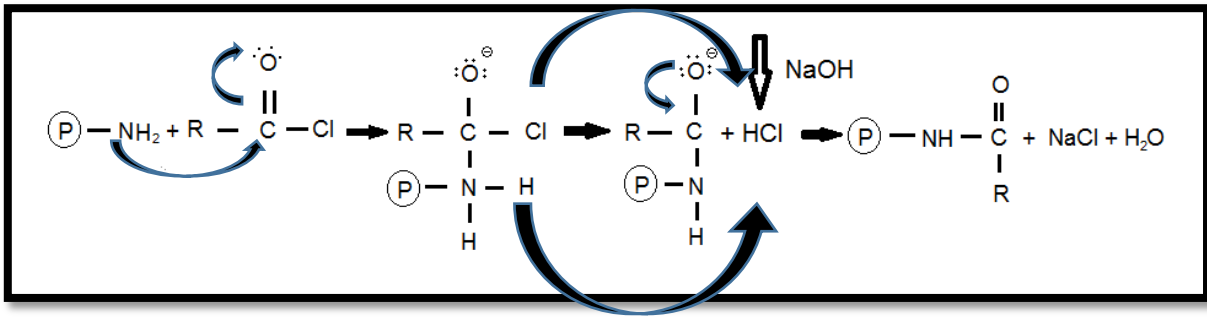


Figura 2. Mecanismo de Reacción de Acilación con Cloruro de Ácido Graso.

Adatada de Wang, 2009.

La unión de ácidos grasos a los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina de las proteínas mediante reacción del cloruro de acilo de un ácido graso con una proteína puede mejorar la lipofilia y la capacidad de retención de aceite de las proteínas y facilitar la formación de estructuras micelares y otros tipos de agregados proteicos. La acilación con anhídridos de ácidos sustituye las cargas positivas por cargas negativas en los residuos de lisina, con lo que aumenta la electronegatividad y podría provocar un desplegamiento de la proteína (Damodaran, 2000).

2.5 Antecedentes

Acosta-Domínguez *et al.* (2016), realizaron una modificación de la superficie de aislado de proteína de soya congelando el aislado con nitrógeno líquido, seguido por liofilización; reportaron que existe una modificación a escala nanométrica de la superficie, ya que demostraron que congelando con nitrógeno líquido se forman cavidades en la superficie de las partículas con diámetros entre 8 y 15 nm, mientras que las partículas del aislado nativo presentaron cavidades con diámetros entre 50 y 150 nm, además señalan que esta nanoestructuración afecta de manera directa propiedades de las proteínas, y hallaron un aumento en la capacidad de retención de agua y aceite y la capacidad de formación de gel de las proteínas nanoestructuradas.

Rahma y Rao (1983), evaluaron el efecto de la acetilación y la succinilación sobre las propiedades funcionales de la harina de semilla de algodón y reportaron una dependencia entre el grado de modificación y el efecto sobre las propiedades funcionales. En el caso de la acetilación, la solubilidad y la capacidad de retención de aceite

incrementaron, pero cuando las proteínas alcanzaron un 73% de acilación se observó disminución en ambas; por otro lado, la succinilación produjo un incremento de la solubilidad y una disminución en la capacidad de retener aceite cuando la modificación alcanzaba un 35%. La capacidad de retención de agua mejoró en el caso de la acetilación, y no se produjeron cambios en el caso de la succinilación. La capacidad emulsificante incrementó con acetilación y succinilación hasta que alcanzaron grados de modificación de un 65%, luego comenzó a disminuir, pero en ambos casos, incluso al grado de modificación más alto, la capacidad emulsificante fue mayor que en las harinas nativas. Finalmente, la capacidad espumante incrementó para los dos tipos de modificación.

Lamus y Barrera-Arellano (2005) lipofilizaron proteínas de harina de palmiste con cloruro de ácido palmítico, con lo que consiguieron una evidente mejoría en la actividad emulsionante, la estabilidad de la emulsión, y la expansión y estabilidad de la espuma, a pesar de que se disminuyó la solubilidad y la capacidad de retención de agua de las proteínas.

Matemu *et al.* (2011) realizaron una acilación de proteína de soya con diferentes ácidos grasos. La acilación incrementó la actividad emulsificante, la estabilidad de la emulsión y la capacidad de retención de aceite de las proteínas. Además, hallaron una relación entre el tamaño de la cadena de ácido graso y la modificación de las propiedades de la proteína, los ácidos grasos saturados de cadena media (10-12C) fueron los más adecuados para mejorar las propiedades emulsificantes de las proteínas de soya.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente se requieren proteínas que sean económicas, que estén siempre disponibles, que confieran ciertas características deseables a los productos y que tengan una buena calidad nutrimental.

Las proteínas de origen animal presentan un excelente perfil de aminoácidos esenciales y confieren las mejores propiedades funcionales a los alimentos, sin embargo, el mercado actual presenta una tendencia a consumir menos nutrientes de origen animal y más nutrientes de origen vegetal debido a diversos factores como son: el alza en el precio de los alimentos, la preocupación por el cuidado del medio ambiente y el trato animal, el riesgo de sufrir enfermedades, entre otros. Para sustituir proteínas tradicionales por nuevas proteínas, estas deben tener características funcionales idénticas o mejores que las utilizadas en la elaboración de alimentos tradicionalmente aceptados.

El amaranto es un grano endémico de México que tiene un gran potencial debido a su rápido crecimiento, su resistencia a las condiciones climáticas adversas y su alto valor nutrimental, la digestibilidad del grano de amaranto cocido es de alrededor de 90% y su valor biológico de 75 (National Academy of Science, 1984), sin embargo, el consumo per cápita de amaranto en México es de apenas 7 g anuales en promedio, por lo que, de las 9 mil toneladas de amaranto producidas en México en el 2015, la mayor parte se destinó a la exportación (SIAP, 2016), por otro lado, tiene un uso limitado en la elaboración convencional de alimentos, debido a que no provee a los productos alimenticios de las características funcionales deseadas.

4 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1 Objetivo General

Evaluar y comparar las propiedades fisicoquímicas y funcionales de proteína de amaranto nativa y modificada mediante un método físico y un método químico.

4.2 Objetivos Específicos

- Extraer un aislado de proteínas a partir de semillas de amaranto.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas y funcionales del extracto proteico de amaranto a tres pH diferentes.
- Modificar el concentrado de proteínas de amaranto utilizando un método físico y uno químico.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas y funcionales de los extractos proteicos modificados.

4.3 Hipótesis

Es posible alterar las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas de amaranto mediante modificaciones físicas y químicas.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos de la Maestría en Ciencias Alimentarias del Instituto de Ciencias Básicas perteneciente a la Universidad Veracruzana, con dirección Av. Luis Castelazo Ayala s/n, Colonia Industrial Ánimas, CP. 91190 en la ciudad de Xalapa, Veracruz, México.

5.1 Materia Prima

Como materia prima se utilizó harina obtenida a partir de semillas de amaranto adquiridas en la central de abastos de la Ciudad de México, que fueron pulverizadas en un molino (GM, GlenMills Inc, USA).

5.2 Reactivos

Agua destilada, nitrógeno líquido, cloruro de ácido láurico (Sigma Aldrich), soluciones de hidróxido de sodio 0.01, 0.5, 2 N y al 1.25%, soluciones de ácido clorhídrico 2 y 6 N, buffer PBS 0.1 M pH 4, 7 y 10, hexano (CONQUIMEX), orto-ftalaldehído (Sigma Aldrich), β -mercaptoetanol (Sigma Aldrich), metanol 95%, buffer de tetraborato de sodio pH 9.5, solución de dodecil sulfato de sodio al 20%, reactivo de Biuret (Golden Bell), pentóxido de Fósforo (J.T. Baker), buffer de referencia pH 4 y 7 (Golden Bell), aceite de canola (Canoil), albúmina de suero bovino (Sigma Aldrich), solución de fenolftaleína al 1%, tolueno, cloruro de sodio y ácido sulfúrico al 1.25%.

5.3 Equipos

Molino de discos (GM, GlenMills Inc, USA), centrífuga (marca Eppendorf, modelo 5804 R, Alemania), estufas (GS Laboratory Equipment, modelo BOD10A14, USA; Shell Lab, modelo 1410, USA), ultra congelador (SANYO, modelo MDF-U5411, Japón), liofilizador (LABCONCO, modelo FreeZone 4.5, USA), espectrofotómetro UV-Visible (Thermo Fisher, modelo G105 UV-Vis, China), balanza analítica (OHAUS, modelo Pioneer PA64, China), potenciómetro (Oakton,

Singapore), mufla (Felisa, modelo FE-340, México), rotavapor (Hahn Vapor modelo HS-2000 NS, South Korea), colorímetro (Color Flex marca Hunter Lab, modelo CX115 45/0, USA), higrómetro (Aqua Lab, modelo series 3, USA), analizador de propiedades térmicas (KD2 Pro, Decagon Devices Inc. USA), baño termostático (Julabo F25-HD, Alemania), Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcester, UK), microscopio electrónico de barrido (JSM-5600LV, Jeol, Japón), analizador de sorción de vapor (VSA, marca Aqualab, EUA) y homogeneizador (Wiggen Hauser, modelo D-130, Malasia).

5.4 Obtención de aislado de proteína

La extracción de proteínas de la semilla de amaranto se llevó a cabo según el método de Martínez y Añón (1996) con algunas modificaciones. La harina de amaranto se suspendió en agua al 10% (w/v) y el pH de la suspensión se ajustó a 9 añadiendo hidróxido de sodio 2N. Las suspensiones se mantuvieron en agitación durante 30 min a temperatura ambiente y se centrifugaron en centrífuga (marca Eppendorf, modelo 5804 R, Alemania) a 3554g durante 20 min a temperatura ambiente. El precipitado se descartó y las proteínas se extrajeron del sobrenadante ajustando el pH a 4 añadiendo ácido clorhídrico 2N y luego se centrifugó a 3554g durante 20 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante.

5.5 Modificación Física

El precipitado se secó mediante tres métodos diferentes para comparar los efectos de la modificación física resultante del secado, el primer método de secado (SE) se realizó aplicando en una caja Petri una delgada capa del precipitado de proteínas obtenido de la extracción y colocándolo en una estufa (marca GS Laboratory Equipment, modelo BOD10A14, USA) a 35 °C durante 24 h, la segunda muestra (CL) primero fue congelada en ultra congelador (marca SANYO, modelo MDF-U5411, Japón) a -40 °C para inducir una modificación física de la estructura de la superficie de las partículas y se removió la humedad en liofilizador (marca LABCONCO, modelo FreeZone 4.5, USA) a -50 °C y <1.0 mBar, por último, una tercera muestra (NL) se obtuvo congelando el aislado proteico con nitrógeno líquido

para inducir otro tipo de modificación en la superficie de las partículas y se removió la humedad en liofilizador (marca LABCONCO, modelo FreeZone 4.5, USA).

5.6 Modificación Química (Lipofilización)

Se llevó a cabo por el método de Roussel-Philippe *et al.* (2000). Se preparó una solución del aislado de proteína de amaranto al 10% (w/v) en hidróxido de sodio 0.5 N y se agitó a 25 °C, por 15 min. Se ajustó el pH de la solución a 9 con ácido clorhídrico 6N y se añadió cloruro de ácido láurico mientras se mantuvo en agitación y se mantuvo el pH en 9 añadiendo hidróxido de sodio 2N hasta que todo el cloruro reaccionó, lo que sucede cuando deja de haber cambios de pH. Las proteínas modificadas se llevaron a un pH de 4.3 con ácido clorhídrico 6N para que precipiten y se centrifugaron en centrífuga (marca Eppendorf, modelo 5804 R) a 3554g por 10 min a 20 °C.

Para lavar y remover el exceso de sal, se añadió agua al precipitado para hacer una dispersión al 50%. Esta dispersión se centrifugó y el residuo se secó en liofilizador (marca LABCONCO, modelo FreeZone 4.5, USA). Para remover el exceso de reactivo graso, las proteínas lipofilizadas se lavaron con *n*-hexano en un extractor Soxhlet por 4 h y se secaron en un desecador.

5.6.1 Determinación del grado de modificación

El grado de modificación de las proteínas lipofilizadas se analizó mediante el ensayo de *orto*-ftalaldehído (OPA) reportado por Matemu *et al.* (2011). Para cada análisis se preparó reactivo fresco mezclando 16.4 mg de OPA disuelto en 2.5 mL de metanol al 95% con 25 mL de buffer de tetraborato de sodio pH 9.5, 5 mL de dodecil sulfato de sodio al 20%, 400 µL de solución de β-mercaptoetanol y el volumen total se ajustó a 100 mL con agua destilada. 100 µL de muestra al 0.1% se mezclaron con 2 mL de reactivo de OPA y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 2 min. La absorbancia de la reacción se determinó en espectrofotómetro UV-Visible (marca Thermo Fisher, modelo G105 UV-Vis, China) a

340 nm. El grado de modificación se calculó con base en la disminución de la absorbancia de las muestras lipofilizadas en comparación con las nativas.

5.7 Características Fisicoquímicas

5.7.1 Humedad

Se determinó de acuerdo al método 925.10 de la AOAC (1990) colocando en una charola previamente pesada 1 g de muestra. La muestra se colocó en estufa (marca Shell Lab, modelo 1410, USA) a $130 \pm 3^\circ\text{C}$ y se pesó en balanza analítica (marca OHAUS, modelo Pioneer PA64, China) después de 1 h de calentamiento o hasta que alcanzó un peso constante.

5.7.2 Proteína

La determinación de proteínas se realizó por Método de Biuret, se preparó una solución de proteína al 1% y se tomaron alícuotas de 300 μL , a las que se les añadieron 3 mL del reactivo de Biuret, se mezclaron y se dejaron en reposo 30 min a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible (marca Thermo Fisher, modelo G105 UV-Vis, China) a 540 nm contra un blanco preparado de la misma manera con 1 mL de la solución en que se encuentra diluida la muestra. La concentración de proteína se obtuvo por referencia a una curva de calibración preparada con albúmina de suero bovino en concentraciones de 1 a 10 mg/mL (Ver Figura 18 en Anexo 1).

5.7.3 pH

El pH de la muestra se determinó de acuerdo al método 943.02 de la AOAC (1990) pesando 1 g de muestra en un matraz Erlenmeyer y se añadieron 10 mL de agua hervida y enfriada a 25°C . Se mezclaron con agitador magnético hasta que las partículas quedaron uniformemente suspendidas, se dejó reposar durante 10 min y se decantó el sobrenadante en un matraz y en éste se midió el pH utilizando un potenciómetro (Oakton, Singapore) estandarizado con soluciones buffer de pH 4.01 y 7.01, ambas a 25°C .

5.7.4 Acidez Titulable

La acidez se determinó mediante titulación con hidróxido de sodio (NaOH) 0.01 N utilizando fenolftaleína al 1% como indicador. Se pesó 1 g de muestra y se mezcló con 20 mL de agua destilada hervida y fría, se colocó en baño maría a 40 °C durante 1 h, se filtró y el sobrenadante se tituló con el NaOH 0.01 N y unas gotas de fenolftaleína. El porcentaje de acidez en la muestra se expresa como ácido láctico mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de acidez} = \frac{V * N * meq * 100}{M} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde V es el volumen de NaOH 0.01 N gastados en la titulación, N es la normalidad de la solución de NaOH, meq son los miliequivalentes de ácido láctico (0.09) y M es el peso de la muestra.

5.7.5 Cenizas

Las cenizas de la muestra se determinaron por el método 923.03 de la AOAC (1990) pesando 0.5 g de la muestra en un crisol limpio y llevado a peso constante colocándolo en mufla (marca Felisa, modelo FE-340, México) a 600 °C durante 30 min. La muestra se calcinó en parrilla hasta que se tornó de color negro y se colocó en la mufla para terminar de calcinar a 550 °C hasta que la muestra se tornó color gris claro o hasta que alcanzó un peso constante. La muestra se enfrió en un desecador y se pesó en cuanto alcanzó una temperatura ambiente.

5.7.6 Grasa

La determinación del contenido de grasa se realizó mediante una extracción semicontinua con hexano por el método de Soxhlet. 1 g de muestra seca se colocó en una envoltura de papel filtro y se introdujo en el extractor. El disolvente se calentó, se volatilizó y se condensó goteando sobre la muestra, la cual quedó sumergida en el hexano, el hexano fue sifoneado al matraz de calentamiento y el proceso se repitió durante 6 h, finalmente, en el matraz de calentamiento se obtuvo

la grasa junto con el hexano, el cual se recuperó por evaporación en un rota vapor (marca Hahn Vapor modelo HS-2000 NS, South Korea) y el contenido de grasa de la muestra se cuantificó por diferencia de peso del matraz de calentamiento.

5.7.7 Fibra

El contenido de fibra cruda se determinó por el método de la AOAC (1990). La fibra cruda es el residuo que queda sin disolver cuando productos de origen vegetal son tratados con ácidos y álcalis diluidos. Se colocó 1 g de muestra seca y desgrasada en un matraz balón de 250 mL y se adicionaron 50 mL de solución de ácido sulfúrico al 1.25%, se conectó el matraz a un refrigerante y se dejó reflujar durante 30 min, luego se filtró con ayuda de un embudo Buchner y un matraz Kitasato y se realizaron tres lavados con 25 mL de agua hirviendo cada lavado a través del embudo, la fase sólida se colocó nuevamente en el matraz balón y se adicionaron 50 mL de solución de hidróxido de sodio al 1.25% y se dejó reflujar durante 30 min, al finalizar el reflujo, el contenido del matraz se filtró en el embudo Buchner y se realizó un lavado con 10 mL de ácido sulfúrico al 1.25%, luego tres lavados con 10 mL de agua caliente cada lavado y un último lavado con 10 mL de etanol, el residuo sólido se colocó en un crisol de peso conocida y se secó en estufa a 130 °C durante dos horas, se dejó enfriar en desecador y se pesó, posteriormente el contenido del crisol fue carbonizado y calcinado en mufla a 600 °C (marca Felisa, modelo FE-340, México), se enfrió en desecador y se pesó. El contenido de fibra cruda se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ Fibra Cruda} = \frac{(M_1 - M_2) * 100}{M} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

M es el peso de la muestra

M₁ es el peso de la muestra antes de calcinar

M₂ es el peso de las cenizas

5.7.8 Color

La determinación de color de la superficie de los aislados de proteína se realizó utilizando un colorímetro (Color Flex marca Hunter Lab, modelo CX115 45/0, USA), con una iluminación D_{65} y un ángulo de observación de 10° , se recopilaron los siguientes parámetros del sistema CIELab:

- L: luminosidad: 0 = negro, 100 = blanco.
- a: valores positivos = rojo, valores negativos: verde.
- b: valores positivos: amarillo, valores negativos: azul.

Con los parámetros obtenidos se calculó el índice de saturación (C) a partir de la Ecuación 3, y el ángulo matiz (h) a partir de la Ecuación 4 (Pathare *et al.*, 2012).

$$C = \sqrt{a^2 + b^2} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$h = \tan^{-1} \frac{b}{a} \quad \text{Ecuación 4}$$

5.7.9 Actividad de Agua

La actividad de agua (a_w) se determinó colocando 1 g de muestra en un higrómetro con sensor de punto de rocío (marca Aqua Lab, modelo series 3, USA).

5.7.10 Higroscopicidad

Para determinar la higroscopicidad se colocaron 0.25 g de muestra en un desecador con solución saturada de NaCl para mantener la muestra en una humedad relativa de 75.29%, las muestras fueron pesadas después de una semana y la higroscopicidad se expresó como masa de humedad higroscópica por 100 g de sólido seco (Islam *et al.*, 2017).

5.7.11 Grado de Apelmazamiento

El grado de apelmazamiento se determinó secando la muestra utilizada en la prueba de higroscopicidad en una estufa a 70 °C hasta alcanzar un peso constante, las muestras secas se dejaron enfriar y se colocaron en un tamiz de 425 micras, se pesó la cantidad de muestra que permaneció en la malla después de 1 min de tamizado y el grado de apelmazamiento se calculó con la siguiente ecuación:

$$GA = \frac{100*a}{b} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde GA es el grado de apelmazamiento, a es la cantidad de muestra que queda en el tamiz y b es la cantidad inicial de muestra (Islam *et al.*, 2017).

5.7.12 Propiedades de Flujo

5.7.12.1 Densidad aparente

La densidad aparente es la masa del polvo dividida entre el volumen aparente. Se determinó pesando y colocando 1 g de muestra en una probeta de 10mL. La densidad se calculó con la siguiente ecuación:

$$\rho = \frac{m}{v} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde ρ es la densidad aparente, m es el peso de la muestra en gramos y v es el volumen de la muestra en mL. (Shah *et al.*, 1997).

5.7.12.2 Densidad compactada

La densidad compactada es el volumen que ocupa la muestra después de compactarse. Se determinó colocando 1 g de muestra en una probeta de 10 mL y dejando caer continuamente la probeta desde una altura de 2 a 5 cm sobre una superficie dura hasta que no hubo cambios en el volumen ocupado por la muestra y la densidad compactada se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\rho_c = \frac{m}{vc} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde ρ_c es la densidad de la muestra compactada, m es el peso de la muestra en gramos y v es el volumen de la muestra compactada en mL (Shah *et al.*, 1997).

5.7.12.3 Índice de Hausner

El índice de Hausner sirve para determinar la cohesividad que presentan los polvos. Valores de $IH < 1.2$ indican baja cohesividad, valores entre 1.2 y 1.4 indican cohesividad intermedia y valores de $IH > 1.4$ indican alta cohesividad (Islam *et al.*, 2017). Se calculó con la siguiente ecuación:

$$IH = \frac{\rho_c}{\rho} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde IH es el índice de Hausner, ρ_c es la densidad compactada y ρ es la densidad aparente (Islam *et al.*, 2017).

5.7.12.4 Compresibilidad

La compresibilidad también conocida como índice de Carr sirve para determinar la fluidez de los polvos, porcentajes de compresibilidad de < 15 , 15-20, 20-35, 35-45 y $> 45\%$ indican excelente, buena, intermedia, poca y muy poca fluidez (Islam *et al.*, 2017). Se calculó con la siguiente ecuación:

$$IC = 100 - \frac{100}{IH} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde IC es el índice de compresibilidad e IH es el índice de Hausner (Islam *et al.*, 2017).

5.7.12.5 Ángulo de Reposo

El ángulo de reposo es el ángulo formado por la base horizontal y el pico de la pila de gránulos formada al dejar caer 1 g de muestra a través de un embudo de plástico colocado a una altura de 2 cm de la superficie, se mide la altura de la pila

formada y el radio de la base y se calculó el ángulo de reposo con la siguiente ecuación:

$$\theta = \tan^{-1} \left(\frac{h}{r} \right) \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde θ es el ángulo de reposo, h es la altura de la pila y r es el radio de la base (Shah *et al.*, 2008).

5.7.12.6 Densidad de Partícula

La densidad de partícula es la masa de la partícula dividida entre el volumen que ocupa, excluyendo los poros de las partículas y se determinó pesando 0.15 g de muestra y colocándola en un matraz aforado de 1 mL, el matraz se aforó con tolueno y se midió el volumen de tolueno utilizado para así calcular la densidad de partícula con la siguiente ecuación:

$$\rho P = \frac{g}{(vf-vi)} \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde ρP es la densidad de partícula, g es la cantidad de muestra en gramos, vf el volumen del matraz utilizado y vi es el volumen de tolueno utilizado en mL.

5.7.12.7 Porosidad

La porosidad fue calculada con la densidad de partícula y la densidad compactada como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\varepsilon = \frac{\rho P - \rho c}{\rho P} \times 100 \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde ε es la porosidad, ρP es la densidad de partícula y ρc es la densidad compactada (Islam *et al.*, 2017).

5.7.13 Conductividad Térmica

Para medir la conductividad térmica se utilizó un analizador de propiedades térmicas (KD2 Pro, Decagon Devices Inc. USA), y se utilizó un sensor TR-1 (aguja

de 10 cm de largo y 2.4 mm de diámetro). Las muestras se colocaron en tubos de plástico Vacutainer® y se compactaron con golpes suaves, los tubos fueron sellados con septum y colocados en un baño termostático (Julabo F25-HD, Alemania) a 25 °C, el sensor se introdujo en cada una de las muestras y se procedió a la medición de la conductividad térmica.

5.7.14 Potencial zeta

El potencial zeta de las partículas de las muestras en dispersión se evaluó a pH 4, 7 y 10 a 25 °C, según el método reportado por Allouni *et al.* (2009) mediante micro electroforesis de láser Doppler en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcester, UK). Se aplica un campo eléctrico con un voltaje de 150 V a una solución de moléculas o a una dispersión de partículas, que entonces se mueven con una velocidad relacionada con su potencial zeta. La movilidad electroforética se convierte a potenciales zeta mediante el software incluido en el equipo: Dispersion Technology Software (v. 5.03 Malvern Instruments Ltd., UK) utilizando la ecuación de Henry:

$$U_e = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta} \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde:

U_e es la movilidad electroforética

ε es la constante dieléctrica

ζ es el potencial zeta

η es la viscosidad del dispersante

$f(\kappa a)$ es la función de Henry: para medios de alta fuerza iónica se utiliza la aproximación de Smoluchowski $f(\kappa a)-1.5$ y para medio dieléctrico bajo se utiliza la aproximación de Hückel $f(\kappa a)-1$.

5.8 Micrografías MEB

Las muestras fueron analizadas utilizando un microscopio electrónico de barrido (JSM-5600LV, Jeol, Japón) a 25 kV; las muestras fueron colocadas en un

porta muestras y recubiertas con oro 60% y 40% de paladio y se observaron a diferentes aumentos para evaluar su microestructura.

5.9 Isotermas de Sorción

Se obtuvieron isotermas de adsorción para evaluar el comportamiento de adsorción de humedad de las muestras nativas y modificadas, todas las muestras se colocaron en desecadores individuales con pentóxido de fósforo durante 15 días para llevar el contenido de humedad a cero y se llevó a cabo la obtención de isotermas estáticas o de equilibrio tipo DVS (Dynamic Vapor Sorption) en un equipo Analizador de Sorción de Vapor (VSA, marca Aqualab, EUA), en el cual se va registrando el peso de la muestra mientras ésta se expone a diferentes humedades controladas, la muestra se mantiene en cada humedad relativa establecida hasta que se alcance un equilibrio en el cambio de peso, las isotermas se realizaron desde $a_w = 0.04$ hasta $a_w = 0.85$ a temperaturas de 25 °C, 35 °C y 45 °C, con saltos de a_w de 0.1, valor disparador %dm/dt de 0.01%/h y utilizando detector de punto de rocío.

5.9.1 Modelamiento de Isotermas de Sorción

Para modelar las isotermas de adsorción de las muestras modificadas físicamente SE, CL y NL se utilizó la ecuación de GAB (Guggenheim-Anderson-De Boer), de acuerdo a lo reportado por Azuara y Beristain (2006).

$$M = \frac{M_0 * C * K * a_w}{(1 - K * a_w) * (1 - K * a_w + C * K * a_w)} \quad \text{Ecuación 14}$$

Donde:

M es el contenido de humedad en equilibrio (g H₂O/100 g de s.s.)

a_w es la actividad de agua

M_0 es el valor del contenido de humedad de la monocapa (g H₂O/100 g s.s.)

C y K son constantes relacionadas con la temperatura y corresponden a las siguientes ecuaciones:

$$C = c \exp[(h_m - h_n)/RT_a] \quad \text{Ecuación 15}$$

$$K = k \exp[(h_i - h_n)/RT_a] \quad \text{Ecuación 16}$$

Donde:

c y k son factores de acomodamiento entrópico.

h_m , h_n , y h_i son entalpías de sorción (J/mol) de la monocapa, la multicapa y el agua libre del vapor de agua a cierta temperatura dada, respectivamente.

R es la constante universal de los gases ideales (J/mol*K)

T_a es la temperatura absoluta (K)

Las isothermas de sorción fueron modeladas en el programa KaleidaGraph™ versión 4.0 de Sinergy Software.

La confiabilidad del ajuste del modelo de GAB fue evaluada mediante el porcentaje de la desviación media relativa entre los valores experimentales y los valores predichos (P) reportado por Lomauro *et al.* (1985), con la siguiente ecuación:

$$P = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|M_i - Mp_i|}{M_i} \quad \text{Ecuación 17}$$

Donde:

M_i es el contenido de humedad experimental

Mp_i es el contenido de humedad calculado

N es el número de datos experimentales.

Un modelo es considerado aceptable si el valor de P está por debajo del 10% (Azuara y Beristain, 2007)

5.10 Propiedades Termodinámicas

Se realizó el análisis de las propiedades termodinámicas a partir de las isothermas de sorción ajustadas con el modelo de GAB mediante la metodología reportada por Azuara y Beristain (2006).

Para realizar el cálculo de la entropía diferencial (ΔS)_{dif} se calculó la entalpía diferencial de adsorción o calor isostérico de acuerdo al método reportado por Beristain y Azuara (1990), mediante la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{\partial \ln a_w}{\partial \left(\frac{1}{T} \right)} \right)_{\Gamma} = - \frac{H_l - h_1}{R} = - \frac{\Delta H_{dif}}{R} = - \frac{Q_{st}}{R} \quad \text{Ecuación 18}$$

Donde:

a_w es la actividad de agua

T es la temperatura absoluta

$\Gamma = MK$, donde M es la humedad del alimento y K es una constante que depende del área superficial del alimento.

H_l es la entalpía del agua líquida pura en equilibrio con el vapor

h_1 es la entalpía diferencial del agua adsorbida en el alimento

R es la constante universal de los gases

ΔH_{dif} es la entalpía diferencial molar de adsorción

Q_{st} es el calor isostérico.

A partir de la ecuación anterior, por medio de regresiones lineales, se calcularon las ΔH_{dif} a diferentes humedades y con estos resultados es posible calcular el cambio en la entropía diferencial molar (ΔS_{dif}) de acuerdo al método reportado por Beristain y Azuara (1990) con la siguiente ecuación:

$$\Delta S_{dif} = s_1 - s_l = - \frac{\Delta H_{dif}}{T} - R \ln a_w \quad \text{Ecuación 19}$$

Donde:

ΔS_{dif} es la entropía diferencial molar

s_1 es entropía diferencial molar del agua adsorbida en el alimento y es igual a $(\partial S/\partial N_1)_{T,P}$ donde S es la entropía total del agua adsorbida en el alimento y N_1 es el número de moles de agua adsorbidos en el alimento.

S_l es la entropía molar del agua líquida pura en equilibrio con el vapor

ΔH_{dif} es la entalpía diferencial molar de adsorción

T es la temperatura absoluta

R es la constante universal de los gases

a_w es la actividad de agua.

Para calcular la entropía integral, se calculó entalpía molar integral a una presión de difusión o potencial de superficie (Φ) constante de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$(\Delta H_{int})_T = \left[\frac{H_v(T)}{H_v^\circ(T)} - 1 \right]_{\phi} H_v^\circ(T) \quad \text{Ecuación 20}$$

Donde:

$H_v(T)$ es el calor molar integral de sorción (J/mol)

H_v° es el calor de condensación del agua pura (J/mol) que se obtiene a partir de la ecuación de Wexler (1976):

$$H_v^\circ(T) = 6.15 \times 10^4 - 94.14T + 17.74 \times 10^{-2} T^2 - 2.03 \times 10^{-4} T^3 \quad \text{Ecuación 21}$$

Φ es la presión de difusión o potencial de superficie del alimento y se puede calcular mediante la siguiente ecuación:

$$\phi = \mu_{ap} - \mu_a = RT \frac{W_{ap}}{W_v} \int_0^{a_w} M dn a_w \quad \text{Ecuación 22}$$

Donde:

μ_{ap} es el potencial químico del adsorbente puro (J/mol)

μ_a es el potencial químico del adsorbente participando en la fase condensada (J/mol).

W_{ap} es el peso molecular del adsorbente (g/mol)

W_a es el peso molecular del agua (g/mol)

A partir de los valores de entalpía molar integral obtenidos se pueden calcular los cambios en la entropía molar integral $(\Delta S_{int})_T$ a partir de la siguiente ecuación:

$$(\Delta S_{int})_T = S_s - S_L = -\frac{(\Delta H_{int})_T}{T} - R \ln a_w \quad \text{Ecuación 23}$$

Donde:

$S_s = S/N_1$ (J/mol K) es la entropía molar integral del agua adsorbida en el alimento,

S es la entropía total del agua adsorbida en el alimento (J/mol K)

N_1 son los moles de agua adsorbidos en el alimento

S_L es la entropía molar del agua líquida pura en equilibrio con el vapor (J/mol K).

5.11 Propiedades Funcionales

5.11.1 Índice de Solubilidad (IS)

La solubilidad de las proteínas se determinó según el método reportado por Silva-Sánchez *et al.* (2004) con algunas modificaciones de la siguiente manera: Se preparó una dispersión de la muestra al 1% (w/v) en buffer de fosfatos 0.1 M con pH 4, 7 y 10. Las dispersiones se agitaron con un agitador magnético durante 30 min y se centrifugaron en centrífuga (marca Eppendorf, modelo 5804 R, Alemania) a 3554g durante 20 min a 20 °C. La proteína solubilizada se determinó tomando alícuotas de 300 μ L del sobrenadante y añadiendo 3 mL de reactivo de Biuret, se realizó una lectura en espectrofotómetro a 540 nm contra un blanco y el índice de solubilidad se reportó como porcentaje de proteína soluble como se muestra en la

$$IS(\%) = \frac{\text{Proteína en el sobrenadante}}{\text{Proteína total}} \times 100 \quad \text{Ecuación 24}$$

5.11.2 Capacidad de Hinchamiento (CHi)

La capacidad de hinchamiento se determinó de acuerdo al método descrito por Gómez-Ordóñez *et al.* (2010), en el cual, 250 mg de muestra seca se colocan en tubos graduados de 10 mL y se añaden 5 mL de buffer de fosfatos a pH 4, 7 y 10, respectivamente. Se agitó suavemente para remover burbujas de aire atrapadas y los tubos se colocan en una superficie nivelada, se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 24 h. El volumen en mL ocupado por la muestra se midió y la capacidad de hinchamiento se reportó como mL/g de muestra seca.

5.11.3 Actividad emulsionante (AE) y estabilidad de la emulsión (EE)

La AE y EE se determinaron por el método de Yasumatsu *et al.* (1972) con algunas modificaciones. Para determinar la AE se prepararon suspensiones al 4% de muestra en buffer de fosfatos a pH 4, 7 y 10 en tubos graduados para centrifuga. Se agregaron 5 mL de aceite de soya y se homogenizaron a 10,000 rpm durante 1 min en un homogeneizador (marca Wiggen Hauser, modelo D-130, Malasia). Los tubos se centrifugaron a 2029g durante 5 min a 20 °C en centrífuga (marca Eppendorf, modelo 5804 R, Alemania). La AE se expresó como se muestra en la

$$AE = \frac{\text{Altura de la capa emulsionada}}{\text{Altura total}} \times 100 \quad \text{Ecuación 25}$$

La EE se determinó calentando la emulsión a 80 °C durante 30 min, se enfrió en un baño de hielo y se centrifugaron a 2029g durante 5 min a 20 °C. La EE se expresó de la misma manera que la AE.

5.11.4 Capacidad espumante (CEs) y estabilidad de espuma (EEs)

La capacidad y estabilidad espumante se determinaron mediante el método de Wani *et al.* (2013). Se prepararon dispersiones acuosas al 2% w/v del aislado de proteína en pH 4, 7 y 9 se homogenizaron a 10,000 rpm durante 1 min en un homogeneizador (marca Wiggen Hauser, modelo D-130, Malasia). La capacidad espumante se calculó como el porcentaje de aumento de volumen de la dispersión

proteica. La estabilidad de la espuma se determinó midiendo el volumen de la espuma en el tiempo.

5.11.5 Capacidad de retención de agua (CRA) y aceite (CRAc)

Se determinaron por el método de Wani *et al.* (2013) pesando 0.25 g de muestra en un tubo para centrífuga previamente pesado y dispersando en 2.5 mL de agua destilada o aceite puro de soya con agitación constante durante 1 min. Las muestras se dejaron reposar durante 30 min y se centrifugaron en centrífuga (marca Eppendorf, modelo 5804 R, Alemania) a 2199g durante 10 min. El agua o aceite liberados en la centrifugación se descartaron y los tubos se pesaron.

La capacidad de retención de agua o aceite se expresó en g de agua o aceite retenidos por g de muestra.

5.12 Análisis Estadístico

Los resultados se encuentran expresados en promedio \pm desviación estándar, todos los análisis se realizaron por triplicado. Se realizó un análisis de varianza y cuando se obtuvieron valores de F significativos, se diferenciaron los pares de medias con una prueba de Tukey. El análisis estadístico se realizó en el programa JMP 13.0.0 (SAS Institute Inc. 2016. USA)

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Extracción de Aislados de proteína de amaranto.

La composición de los aislados obtenidos se desglosa en el Cuadro 4, se puede observar que el contenido de proteínas totales en los aislados modificados físicamente fue de 78 g/100 g, Bolontrade *et al.* (2016) y Martínez y Añón (1996), realizaron una extracción utilizando el método de precipitación isoeléctrica que se utiliza en el presente trabajo y obtuvieron un contenido de proteínas totales en aislado de proteínas de amaranto de 85 g/100 g y de 80-90 g/100 g, respectivamente, en ambos casos la harina fue desgrasada antes de comenzar la extracción, por lo que el alto contenido de grasa obtenido en el aislado (13 g /100 g) sugiere que un desgrasado de la harina previo a la extracción podría mejorar el rendimiento. Finalmente, el contenido de cenizas totales en los aislados fue del 2 g/100 g y los aislados no contienen fibra, Gueguen (1983) reporta contenido de cenizas totales de 0.9-2.1, 2.2-2.6 y 3.4 g/100 g en aislados de proteínas de chícharo, haba y lupino, respectivamente, extraídos mediante el método de precipitación isoeléctrica y señalan que el contenido de cenizas totales varía dependiendo del pH de extracción y de precipitación.

Cuadro 4. Composición de aislados de proteína de amaranto modificados físicamente.

	Rendimiento (g/100 g)	Proteína (g/100 g b.s.)	Grasa (g/100 g b.s.)	Cenizas (g/100 g b.s.)	Fibra (g/100 g b.s.)
Aislados Modificados Físicamente	11.18 ± 1.10	78.94 ± 4.70	13.78 ± 2.13	2.21 ± 0.14	0.00 ± 0.00

Media ± Media desviación estándar

6.2 Determinación del Grado de Modificación

Para realizar la modificación química de los aislados modificados físicamente se evaluaron diferentes relaciones de proteína: cloruro de ácido láurico, con la finalidad de hallar la concentración necesaria de cloruro de ácido láurico para obtener el mayor grado de modificación, se analizaron relaciones proteína: cloruro de ácido láurico entre 1:2 y 1:16 p:v.

Como se puede observar en el Cuadro 5, se obtuvieron grados de modificación entre el 83 y el 93%; resultados similares reporta Matemu *et al.* (2011) quienes analizaron el grado de modificación en fracciones de aislado de proteína de soya lipofilizados con cloruro de ácido láurico y obtuvieron grados de modificación entre 54 y 92%. El mayor grado de modificación se presentó en la relación 1:10 y 1:12 p:v y el menor grado de modificación para la relación 1:16 p:v, lo que podría deberse a una saturación de cloruro de ácido láurico en la proporción 1:16 p:v, sin embargo, las relaciones 1:2 y 1:6 p:v no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto a la relación 1:10 p:v.

Cuadro 5. Determinación del grado de modificación para diferentes relaciones de proteína de amaranto y cloruro de ácido láurico.

Relación Proteína: Cloruro de ác. Láurico p:v	Grado de Modificación (%)
1:2	85.13 ± 3.95 ^{bc}
1:6	85.32 ± 4.80 ^{bc}
1:10	91.61 ± 2.40 ^{ab}
1:12	93.71 ± 1.57 ^a
1:16	83.22 ± 0.90 ^c

Media ± Media desviación estándar

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Roussel-Philippe *et al.* (2000) lipofilizaron aislados de proteína de soya con cloruro de ácido láurico utilizando una reacción de acilación y analizaron el grado de modificación en proporciones entre 0.5:1 p:v y 1:2 p:v , encontrando el mayor grado de modificación en la proporción 1:2 p:v.

Debido a que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) en las proporciones 1:2, 1:6 y 1:10 p:v y a que concentraciones de cloruro de ácido láurico excesivas podrían obstaculizar el proceso de lipofilización, la relación proteína: cloruro de ácido láurico utilizada para la lipofilización de aislados de proteína de amaranto fue de 1:2 p:v.

6.3 Composición de Aislados de Proteína de Amaranto Lipofilizada.

Se analizó la composición de los aislados lipofilizados, como se puede observar en el Cuadro 6, se obtuvo un rendimiento de 76 g/100 g en los aislados lipofilizados, este rendimiento es a partir de los aislados nativos; el contenido de proteínas totales en los aislados lipofilizados, como se puede observar en el Cuadro 6, disminuyó ligeramente respecto a los nativos, se obtuvo una tasa de recuperación de proteínas de alrededor de 87 g/100 g, esta disminución del contenido de proteínas totales podría deberse a efectos de dilución o desnaturalización de proteínas durante la modificación química, Lamus y Barrera-Arellano (2005) obtuvieron una tasa de recuperación de 85-87 g/100 g después de lipofilizar harina de palmiste con cloruro de ácido palmítico, Roussel-Philippe *et al.* (2000) obtuvieron una tasa de recuperación de proteínas de 93-97 g/100 g al lipofilizar aislado de proteína de soya y gluten de trigo con cloruro de ácido láurico .

El contenido de grasa en los aislados lipofilizados disminuyó considerablemente debido al proceso de desgrasado que se realizó dentro de la metodología de modificación química para la eliminación del exceso de ácidos grasos liberados durante la acilación. El porcentaje de cenizas totales en las muestras lipofilizadas aumentó considerablemente en comparación con el contenido de cenizas inicial, lo que podría ser resultado de la sal residual que se

produce con la neutralización del hidróxido de sodio añadido con el ácido clorhídrico que se libera de la reacción de acilación.

Cuadro 6. Rendimiento y composición de aislados de proteína de amaranto.

	Rendimiento (g/100 g)	Proteína (g/100 g b.s.)	Grasa (g/100 g b.s.)	Cenizas (g/100 g b.s.)	Fibra (g/100 g b.s.)
Aislados Modificados Físicamente	11.18 ± 1.10	78.94 ± 4.70 ^a	13.78 ± 2.13 ^a	2.21 ± 0.14 ^b	0.00 ± 0.00 ^a
Aislados Lipofilizados	76.33 ± 5.69	69.13 ± 3.22 ^b	5.33 ± 1.21 ^b	13.79 ± 3.80 ^a	0.00 ± 0.00 ^a

Media ± desviación estándar

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

6.4 Caracterización Fisicoquímica de Aislados de Proteína de Amaranto

Como se puede observar en el Cuadro 7 los tres métodos de secado utilizados en las muestras secada en estufa (SE), congelada en ultracongelador y liofilizada (CL) y congelada con nitrógeno líquido y liofilizada (NL) presentaron diferencias significativas ($F_{(2,6)} = 32.488$ $p < 0.05$) en cuanto a humedad y actividad de agua, siendo el secado por estufa el que presenta un contenido de humedad y una actividad de agua mucho mayor, la muestra NL presenta un contenido de humedad mayor que CL, Ceballos *et al.* (2012) reportaron una dependencia entre el contenido de humedad y la tasa de congelamiento, debido a que entre mayor sea la velocidad de congelamiento menor es el tamaño de los núcleos formados y esto produce un tamaño de poro reducido en las capas secas externas lo que conlleva a una sublimación más lenta y un contenido final de humedad mayor, fenómeno que podría presentarse de la misma manera en las muestras SEyLpf, CLyLpf y NLyLpf, las cuales presentan altos contenidos de humedad y valores de a_w en comparación con CL y al igual que NL, fueron congeladas con nitrógeno líquido y liofilizadas después de la modificación química.

Cuadro 7. Humedad y actividad de agua.

	Humedad (g/100 g)	Humedad Lpf (g/100 g)	a_w	a_w Lpf
SE	6.55 ± 0.24 ^c	6.28 ± 0.29 ^b	0.53 ± 0.00 ^c	0.64 ± 0.01 ^b
CL	1.78 ± 0.04 ^a	4.92 ± 0.33 ^a	0.06 ± 0.00 ^a	0.45 ± 0.03 ^a
NL	2.93 ± 0.03 ^b	4.24 ± 0.32 ^a	0.16 ± 0.01 ^b	0.42 ± 0.01 ^a

Media ± desviación estándar

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

En el Cuadro 8 se presenta el pH y la acidez titulable de las muestras, el pH de las muestras SE, CL y NL se encuentra en un rango entre 4.69 y 4.8, siendo ligeramente menor en la muestra SE, mientras que el pH de las muestras lipofilizadas fue de entre 3.8 y 4.05, menor al pH de las muestras nativas y el porcentaje de acidez titulable fue menor en las muestras lipofilizadas en comparación con las nativas, por lo que las muestras nativas presentan una menor concentración de protones libres que las lipofilizadas pero una mayor acidez.

Cuadro 8. pH y acidez titulable

	pH	pH Lpf	Acidez (%)	Acidez Lpf (%)
SE	4.69 ± 0.00 ^a	4.05 ± 0.39 ^a	0.99 ± 0.13 ^c	0.1 ± 0.02 ^a
CL	4.80 ± 0.07 ^b	3.80 ± 0.23 ^a	0.69 ± 0.03 ^b	0.07 ± 0.03 ^a
NL	4.79 ± 0.00 ^b	3.93 ± 0.00 ^a	0.38 ± 0.03 ^a	0.07 ± 0.02 ^a

Media ± desviación estándar

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

En el Cuadro 9 se presenta la higroscopicidad de las muestras, las muestras lipofilizadas presentaron una mayor higroscopicidad, seguidas por la muestra CL y por último SE y NL, Islam *et al.* (2017) señalan que los polvos con mayor actividad de agua y contenido de humedad son más higroscópicos, sin embargo en los resultados obtenidos no se observó ninguna correlación entre estas variables (Ver Cuadro 32 y Cuadro 33 en Anexo 7), estas diferencias podrían ser resultado de cambios en la microestructura de la superficie de las partículas, Acosta *et al.* (2016) señalan que entre menor sea el tamaño de las cavidades en la superficie de un material, mayor es la energía de los átomos en la superficie y esto permite el atrapamiento de ciertas moléculas como las de agua.

Cuadro 9. Higroscopicidad

	Higroscopicidad (g H₂O/100g s.s.)	Higroscopicidad Lpf (g H₂O/100g s.s.)
SE	2.71 ± 0.06 ^a	8.94 ± 0.54 ^a
CL	5.38 ± 0.12 ^b	9.12 ± 0.01 ^a
NL	2.59 ± 0.12 ^a	8.8 ± 0.18 ^a

Media ± desviación estándar







Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

6.4.1 Análisis de Color

El color se puede describir mediante diversos sistemas de coordenadas de color, entre los cuales se encuentra el espacio de color de la Comisión Internacional de Iluminación (Commission Internationale de l'Eclairage's) CIE L*a*b* concebido en 1976, el cual provee diferencias de color más uniformes en relación a la percepción humana de las diferencias (Pathare *et al.*, 2012). En el Cuadro 10 se presenta el color observado de las muestras, las muestras NL, SEyLpf, CLyLpf y NLyLpf presentan valores entre 83 y 93 en el parámetro L* (luminosidad) que puede presentar valores de 0 (oscuro) a 100 (claro), lo que indica que estas muestras presentan un color más cercano al blanco que SE y CL que presentan valores de

70 y 65 para el parámetro L*, respectivamente, lo que podría ser resultado de la velocidad de la congelación, debido a que la congelación rápida deriva en la formación de núcleos de hielo pequeños que después de la sublimación originan poros pequeños en la superficie y éstos dispersan más luz que los poros más grandes que se forman con la congelación lenta (Ceballos *et al.*, 2012).

Cuadro 10. Análisis de Color de Aislados de Proteína de Amaranto.

	SE	CL	NL
L*	70.21 ± 0.05 ^b	65.67 ± 0.19 ^a	83.07 ± 0.91 ^c
L* Lpf	92.33 ± 0.05 ^a	92.79 ± 0.20 ^b	93.75 ± 0.19 ^c
a*	2.74 ± 0.05 ^b	3.25 ± 0.13 ^c	0.49 ± 0.17 ^a
a* Lpf	0.45 ± 0.16 ^a	0.20 ± 0.16 ^a	0.29 ± 0.16 ^a
b*	19.08 ± 0.20 ^b	23.13 ± 0.14 ^c	13.36 ± 0.21 ^a
b* Lpf	10.03 ± 0.64 ^a	9.77 ± 0.36 ^a	10.12 ± 0.34 ^a
Índice de Saturación	19.28 ± 0.20 ^b	23.36 ± 0.12 ^c	13.37 ± 0.21 ^a
Índice de Saturación Lpf	10.04 ± 0.64 ^a	9.78 ± 0.35 ^a	10.12 ± 0.34 ^a
° matiz	81.82 ± 0.17 ^a	82.01 ± 0.34 ^a	87.89 ± 0.72 ^b
° matiz Lpf	87.36 ± 1.15 ^a	88.78 ± 0.99 ^a	88.38 ± 0.82 ^a
Color			
Color Lpf			

Media ± desviación estándar

Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

El parámetro a^* donde valores positivos indican rojo y valores negativos indican verde, presenta valores entre 0.20 y 0.49 para las muestras NL, SEyLpf, CLyLpf y NLyLpf, 2.7 para SE y 3.2 para CL, por lo que todas las muestras tienden a tonalidades rojas y para el parámetro b^* donde valores positivos indican amarillo y valores negativos indican azul, las muestras presentan valores en un rango entre 9 y 23, por lo que todas tienden a tonalidades amarillas.

El índice de saturación es considerado un atributo cuantitativo de la saturación, se usa para determinar el grado de diferencia de un tono en comparación a un color gris con la misma luminosidad, entre más altos son los valores de índice de saturación, mayor es la intensidad de color percibida por los humanos (Pathare *et al.*, 2012) que indica la saturación, la mayor saturación se presentó en la muestra CL que presentó un valor de 23.36 y la menor saturación se presentó en las muestras lipofilizadas que presentaron valores de saturación de 9.78-10.04 sin diferencias significativas entre estas últimas ($F_{(2,6)}=0.462$, $p > 0.05$).

El ángulo matiz es un atributo cualitativo del color, es el atributo por el cual los colores han sido definidos tradicionalmente como rojo, verde, etc., y es usado para definir la diferencia de cierto color con referencia a el color gris con la misma luminosidad, este atributo se relaciona con las diferencias en la absorbancia a diferentes longitudes de onda, un ángulo matiz de 0° o 360° representa un matiz rojo, mientras que ángulos de 90° , 180° y 270° representan matiz amarillo, verde y azul, respectivamente (Pathare *et al.*, 2012). Las muestras presentaron valores de ángulo Hue en un rango de 81° a 88° , por lo que tienden a un matiz amarillo.

6.4.2 Propiedades de Flujo

En el Cuadro 11 se presentan las propiedades de flujo de las muestras, como se puede observar la muestra SE presentó la mayor densidad aparente y compactada, resultado que coincide con lo obtenido por Islam *et al.* (2017), quienes reportan que un mayor contenido de humedad deriva en una mayor densidad aparente (Ver Cuadro 32 y Cuadro 33 en Anexo 7), sin embargo, SEyLpf también cuenta con un alto contenido de humedad y una densidad aparente y compactada mucho menor, lo que podría deberse a la porosidad de las muestras.

El índice de Hausner determina la cohesividad que presentan los polvos (Islam *et al.*, 2017), en las muestras el índice de Hausner varió entre 1.2 y 1.5, el mayor valor para el índice de Hausner se presentó en la muestra NL (1.5), lo que indica una alta cohesividad en esta muestra, mientras que el resto de las muestras presentó valores intermedios de cohesividad. Las fuerzas cohesivas que actúan entre las partículas pueden ser fuerzas de van der Waals, fuerzas interfaciales y ligamientos líquido-sólido, y éstas fuerzas son dependientes de la distancia entre las partículas y el número de puntos de contacto, cuando se aplica alguna presión sobre los polvos, el número de puntos de contacto aumente y se forman ligamientos sólidos, lo que ocasiona que los polvos se endurezcan y apelmacen (Peleg *et al.*, 1973).

La compresibilidad indica de qué manera la presión reduce el volumen de un conjunto de gránulos y sirve para determinar la fluidez de los polvos, las muestras CL, NL, SEyLpf, CLyLpf y NLyLpf se encuentran en un rango entre 20 y 33% de compresibilidad lo que indica que tienen una fluidez intermedia, mientras que SE presenta un valor de 16% de compresibilidad lo que indica que tiene una mejor fluidez, la compresibilidad y el índice de Hausner se correlacionan (Ver Cuadro 32 y Cuadro 33 en Anexo 7), un alto porcentaje de compresibilidad e índice de Hausner indican poca fluidez y alta cohesividad, lo que se puede observar en la muestra NL, que tiene, en general, menor fluidez que el resto de las muestras.

Konstance *et al.* (1995) señalan que un entre más cohesivo sea un polvo, menor será la densidad aparente y mayor será la compresibilidad, lo que coincide con los resultados obtenidos (Ver Cuadro 32 en Anexo 7), donde NL presenta un mayor índice de Hausner, un alto porcentaje de compresibilidad y una baja densidad aparente, mientras que SE presenta los valores de densidad aparente más altos y los valores de compresibilidad e índice de Hausner más bajos.

Cuadro 11. Densidad, Índice de Hausner y Compresibilidad de Aislados de Proteína de Amaranto.

	SE	CL	NL
Densidad Aparente (g/mL)	0.61 ± 0.02 ^c	0.20 ± 0.01 ^b	0.15 ± 0.00 ^a
Densidad Aparente Lpf (g/mL)	0.17 ± 0.00 ^c	0.13 ± 0.00 ^a	0.15 ± 0.00 ^b
Densidad Compactada (g/mL)	0.73 ± 0.03 ^b	0.25 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.01 ^a
Densidad Compactada Lpf (g/mL)	0.21 ± 0.01 ^c	0.16 ± 0.00 ^a	0.19 ± 0.00 ^b
Índice de Hausner	1.20 ± 0.09 ^a	1.31 ± 0.07 ^{ab}	1.50 ± 0.06 ^c
Índice de Hausner Lpf	1.27 ± 0.10 ^a	1.27 ± 0.02 ^a	1.28 ± 0.02 ^a
Compresibilidad (%)	16.28 ± 6.30 ^a	23.27 ± 4.42 ^{ab}	33.31 ± 2.70 ^b
Compresibilidad Lpf (%)	20.85 ± 6.20 ^a	21.41 ± 1.14 ^a	22.15 ± 1.48 ^a

Media ± desviación estándar

Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

En el cuadro 12 se presentan los valores obtenidos de ángulo de reposo, densidad de partícula, porosidad y grado de apelmazamiento, el ángulo de reposo es un método simple para caracterizar la fluidez, la magnitud de este ángulo está influenciada por la fricción y fuerzas entre las partículas, generalmente los polvos con ángulos de reposo menores o iguales a 40° tienen buena fluidez, mientras que ángulos de reposo mayores a 50° son indicadores de problemas de flujo (Konstance *et al.*, 1995), en los resultados obtenidos el ángulo de reposo varía entre 27 y 41°, por lo que todas las muestras se encuentran en un rango aceptable de fluidez, por debajo de 50°.

La porosidad de las muestras CL, NL, SEyLpf, CLyLpf y NLyLpf se encuentra en un rango entre 64 y 80%, mientras que SE presentó la menor porosidad (7%), lo que indica que en la muestra SE existe un menor espacio entre las partículas, Islam *et al.* (2017) señalan que los polvos que tienen valores de porosidad bajos tienen menor probabilidad de degradarse durante el almacenamiento.

El grado de apelmazamiento se encuentra en un rango entre el 23 y el 68%, siendo NL la muestra que presenta el mayor grado de apelmazamiento, mientras que las muestras modificadas químicamente mostraron los menores valores de apelmazamiento, Islam *et al.* (2017) señalan que valores entre 5 y 34% son los más deseables en polvos alimenticios, sin embargo, las muestras CL y NL presentan valores por encima del rango de aceptabilidad, 58 y 68%, respectivamente.

Cuadro 12. Ángulo de reposo, densidad de partícula, porosidad y grado de apelmazamiento de aislados de proteína de amaranto.

	SE	CL	NL
Ángulo de Reposo	32.94±8.65 ^a	37.78±0.79 ^a	41.46±0.31 ^a
Ángulo de Reposo Lpf	31.21±3.35 ^a	27.78±0.77 ^a	34.72±3.77 ^a
Densidad de Partícula (%)	0.79±0.07 ^a	1.33±0.29 ^a	0.7±0.09 ^a
Densidad de Partícula Lpf (%)	0.61±0.09 ^a	0.61±0.10 ^a	0.89±0.19 ^a
Porosidad (%)	7.45±4.66 ^a	80.26±4.58 ^c	66.69±4.02 ^b
Porosidad Lpf (%)	64.14±6.91 ^a	73.29±4.36 ^a	77.88±5.77 ^a
Apelmazamiento (%)	49.91±0.29 ^a	58.60±5.07 ^b	68.66±2.04 ^c
Apelmazamiento Lpf (%)	30.31±4.50 ^{ab}	23.54±1.99 ^b	36.90±3.70 ^a

Media ± desviación estándar

Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

6.4.3 Conductividad Térmica de Aislados de Proteína de Amaranto

La conductividad térmica de un material es una medida de la habilidad del material de conducir el calor, en los alimentos esta habilidad depende principalmente de su composición y de cualquier factor que afecte la transferencia de calor a través del material como la cantidad, forma, tamaño y homogeneidad de los poros. Los materiales granulares o porosos son sistemas de dos fases, una fase sólida y una fase gaseosa, principalmente aire, cada una de éstas fases afecta a la conductividad térmica del material (Wallapapan y Sweat 1982).

Los valores de conductividad térmica obtenida en los aislados de proteína de amaranto se desglosan en el Cuadro 13 y se puede observar que la conductividad térmica varía entre 0.042 y 0.101 W/mK, estos valores se encuentran dentro del rango para polvos alimenticios reportado por Carson (2015), que señala que la conductividad térmica debe encontrarse en un rango entre 0.03 y 0.30 W/mK.

Cuadro 13. Conductividad Térmica de Aislados de Proteínas de Amaranto.

Muestra	Conductividad Térmica (W/mK)	Conductividad Térmica Lpf (W/mK)
SE	0.101 ± 0.00 ^b	0.043 ± 0.00 ^{ab}
CL	0.051 ± 0.01 ^a	0.044 ± 0.00 ^b
NL	0.047 ± 0.00 ^a	0.042 ± 0.00 ^a

Media ± desviación estándar

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Normalmente la conductividad térmica aumenta con el aumento en el contenido de humedad, lo que coincide con el resultado obtenido en la muestra SE, que presentó la mayor conductividad térmica (0.101 W/mK) y ésta presenta el mayor contenido de humedad (6.55g/100 g), además SE presenta el valor más alto de densidad aparente (0.61 g/mL) y la menor porosidad (7.45%), lo que coincide con lo reportado por Wallapapan y Sweat (1982), quienes señalan que existe una relación entre la densidad aparente y la conductividad térmica, la conductividad térmica de los sólidos es mayor que la del aire, por lo que una mayor densidad de

la muestra es un aumento de fracción sólida y una disminución de la porosidad, por lo tanto, se espera una mayor conductividad térmica cuando la densidad aparente es mayor (Ver Cuadro 32 en Anexo 7), sin embargo, esto no ocurre en las muestras CL, NL, SEyLpf, CLyLpf y NLyLpf, las cuales presentan diferentes contenidos de humedad, algunos son muy bajos, otros son similares a SE y la conductividad térmica en todos los casos es menor a SE, lo que podría deberse a la microestructura de las muestras.

Sweat (1995) señala que los productos liofilizados presentan menor valor de conductividad térmica debido a que presentan una mayor porosidad, por lo que la conductividad térmica de los alimentos porosos depende de los espacios vacíos tanto o más que del contenido de humedad, lo cual es el caso de CL, NL, SEyLpf, CLyLpf y NLyLpf que efectivamente presentan una mayor porosidad (>60%) y todas pasaron por un proceso de liofilización.

6.4.4 Potencial z

Cuando un sólido se encuentra en presencia de una solución acuosa en la superficie del sólido se disocian los grupos funcionales o se adsorben iones de la solución y se adquiere una carga neta en la superficie de las partículas. El potencial zeta indica la magnitud de las interacciones electrostáticas en la interface de un sólido y el líquido que le rodea (Salgin *et al.*, 2012). Generalmente las biomoléculas presentan valores de potencial zeta positivos a pH ácido y el potencial zeta disminuye conforme aumenta el pH (Malhotra y Coupland, 2004), en la Figura 3 se puede observar como las muestras SE, CL y NL presentan este comportamiento en el cual el potencial zeta disminuye conforme aumenta el pH, sin embargo en el caso de las muestras lipofilizadas SEyLpf, CLyLpf y NLyLpf este comportamiento se ve afectado y el potencial zeta es menor a pH 7 que a pH 10 (Cuadro 26 en Anexo 3).

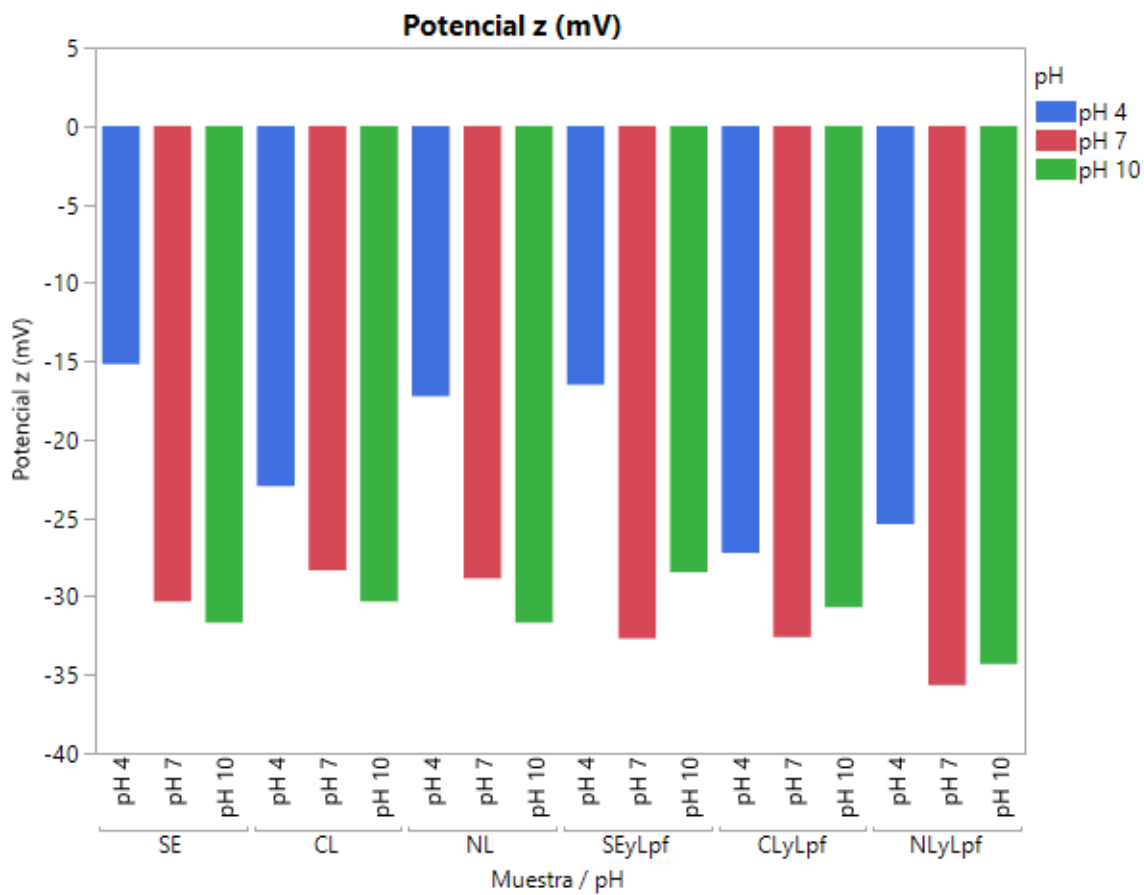


Figura 3. Potencial zeta a pH 4, 7 y 10 de aislados de proteína de amaranto.

6.5 Micrografías MEB

En la Figura 4 y la Figura 5 se muestran las imágenes obtenidas en microscopio electrónico de barrido de los aislados de proteína de amaranto modificados física y químicamente, respectivamente, se puede observar que existe una diferencia en la superficie de las partículas, el aislado secado en estufa (SE) en la magnificación 1200X (a) presenta una superficie rugosa, sin embargo en la magnificación 4300X (b) se puede observar que estas rugosidades no son muy profundas, por otro lado, la muestra congelada en congelador (CL) presenta una superficie con algunas irregularidades en la magnificación 1200X (a), sin embargo, al observar la muestra en una magnificación mayor (b) se muestra una superficie mayormente lisa, mientras que la muestra congelada con nitrógeno (NL) presenta una superficie con partículas más pequeñas y cavidades más profundas, por último las muestras modificadas químicamente (SEyLpf, CLyLpf y NLyLpf) además de ser partículas más pequeñas, presentan una superficie más rugosa y con un mayor número de cavidades que las muestras modificadas físicamente.

Estas diferencias en la microestructura de la superficie de las partículas podrían deberse a una modificación física inducida por la congelación instantánea a temperaturas bajas que se realizó en las muestras NL, SEyLpf, CLyLpf y NLyLpf, pues se ha comprobado que velocidades de congelamiento lentas generan poros grandes en la superficie, mientras que congelamiento rápido genera poros más pequeños debido a la formación de pequeños cristales de hielo que después de la sublimación conducen a la formación estructuras muy porosas (Ceballos *et al.*, 2012; O'Brien *et al.*, 2004), incluso se ha reportado que la congelación con nitrógeno líquido de aislados de proteína puede llegar a formar poros en la superficie de hasta 8 nm de diámetro (Acosta-Domínguez *et al.*, 2016).

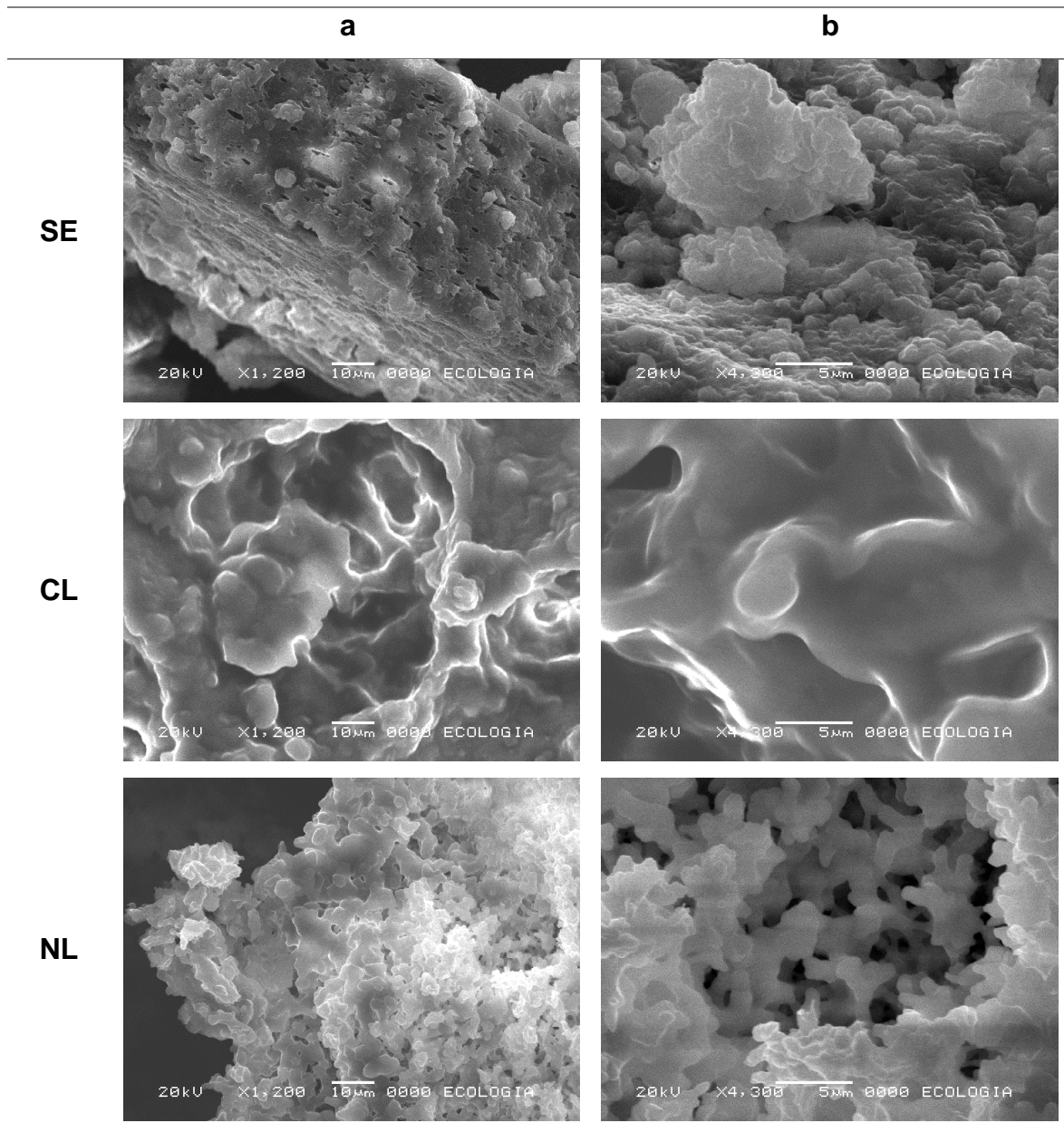


Figura 4. Micrografías obtenidas en microscopio electrónico de barrido a 1200X (a) y 4300X (b) de aislados modificados físicamente de proteína de amaranto.

(Cuadro 21, Cuadro 22 y Cuadro 23 en Anexo 2)

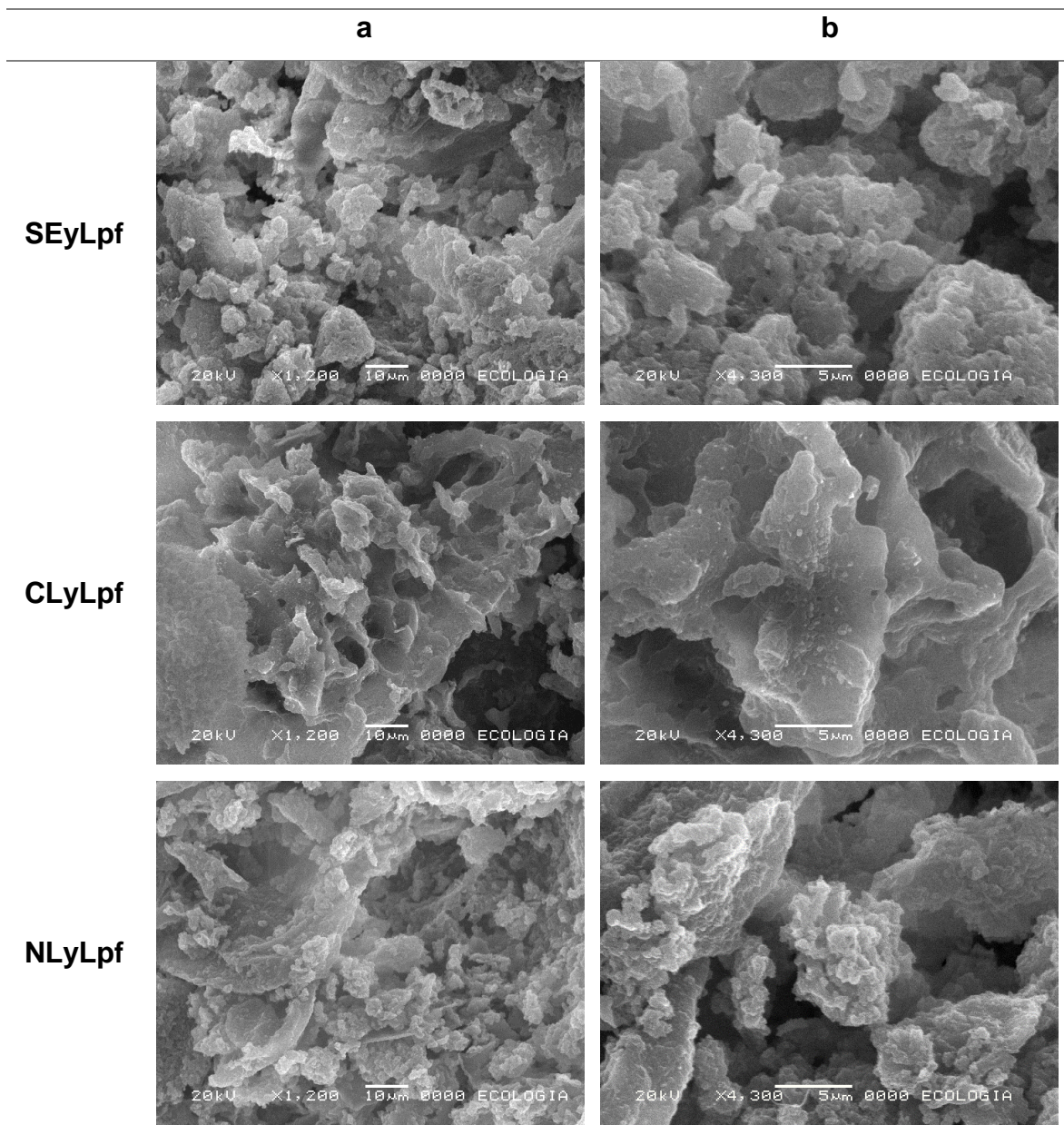


Figura 5. Micrografías obtenidas en microscopio electrónico de barrido a 1200X (a) y 4300X (b) de aislados de proteína de amaranto modificados químicamente.

(Cuadro 21, Cuadro 22 y Cuadro 23 en Anexo 2)

6.6 Isotermas de Sorción

La sorción de agua es uno de los parámetros más importantes, sirve para predecir el desempeño tecnológico y la calidad de los alimentos durante el almacenamiento (Tsami *et al.*, 1999), las isotermas de sorción son una relación entre la actividad de agua y el contenido de humedad a cierta temperatura (Pascual-Pineda *et al.*, 2014). En la Figura 6 se presentan las isotermas de sorción de las muestras modificadas físicamente (SE, CL y NL) a 25 °C y se puede apreciar que todas las muestras presentan una isoterma con la forma sigmoideal que Brunauer *et al.* (1940) describen como Tipo II. La muestra CL tuvo una mayor adsorción seguida por la muestra SE y finalmente la menor adsorción se presentó en la muestra NL.

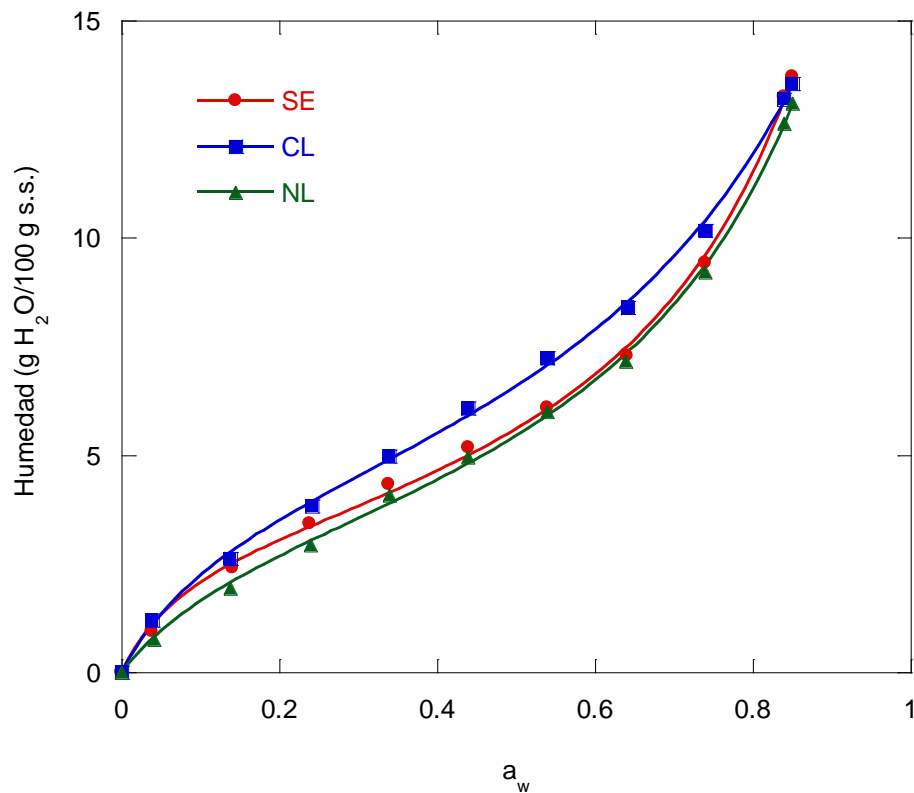


Figura 6. Isotermas de adsorción a 25 °C de las muestras SE, CL y NL.

Kinsella *et al.* (1985) señala que cuando una proteína se expone a un ambiente en el que se incrementa la actividad de agua progresivamente, se obtiene una isoterma de sorción sigmoideal que refleja el aumento progresivo en la cantidad de agua que se asocia a la proteína, a bajas a_w el agua es ligada a los grupos polares cargados y a los residuos polares para formar una mono capa de agua vecinal o unida mediante puentes de hidrógeno, en el caso de los residuos hidrofóbicos esta mono capa se forma alrededor de las proteínas mediante el atrapamiento físico de las moléculas de agua. En actividades de agua entre 0.30 y 0.90 comienzan a aparecer multicapas de agua, sin embargo, la movilidad de esta agua es menor que la del agua libre; en la región de los grupos hidrofóbicos esta agua podría incluso estar más estructurada y tener una diferente configuración que en los grupos hidrofílicos donde se forman puentes de hidrógeno.

Debido a las diferencias observadas en la capacidad de adsorción de las muestras SE, CL y NL, se realizaron isotermas de adsorción a tres temperaturas para conocer las propiedades termodinámicas y por consiguiente los cambios en la estabilidad que podrían estar ocasionando los diferentes métodos de secado de los aislados de proteína de amaranto.

En la Figura 7, 8 y 9 se presentan las isotermas de las muestras SE, CL y NL (Ver Cuadro 27, Cuadro 28 y Cuadro 29 en Anexo 4), respectivamente, a 25, 35 y 45 °C, se realizó un ajuste de los datos experimentales mediante el modelo de GAB, que es un modelo de los más aceptados para alimentos en un amplio rango de actividades de agua que va de 0.10 a 0.90, el cual permite estimar el valor de la monocapa, cuyo calculo ha sido considerado en algunos casos como un método efectivo para estimar la cantidad de agua ligada a sitios polares específicos en sistemas de alimentos deshidratados (Rahman y Labuza, 1999), los datos experimentales están representados con símbolos y el ajuste se representa con líneas continuas, se puede observar que en los tres casos la adsorción de humedad disminuye conforme aumenta la temperatura, lo que se debe a que la adsorción en estos materiales es un proceso exotérmico (Azua y Beristain, 2007).

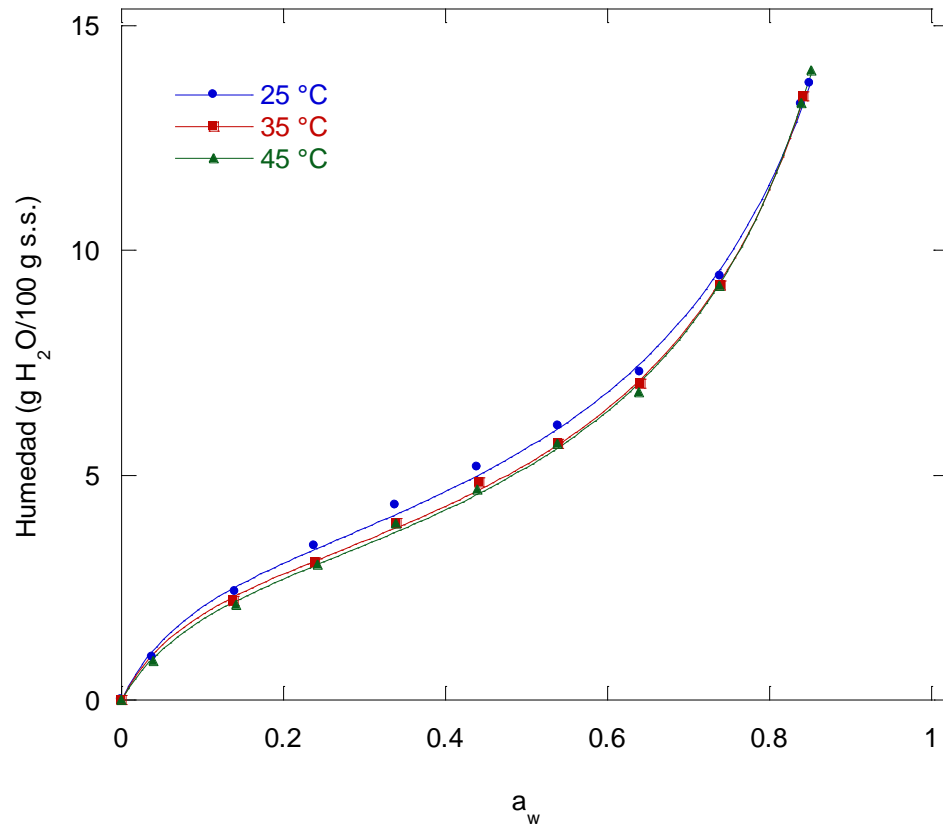


Figura 7. Isothermas de sorción a 25, 35 y 45 °C de la muestra secada en estufa (SE)

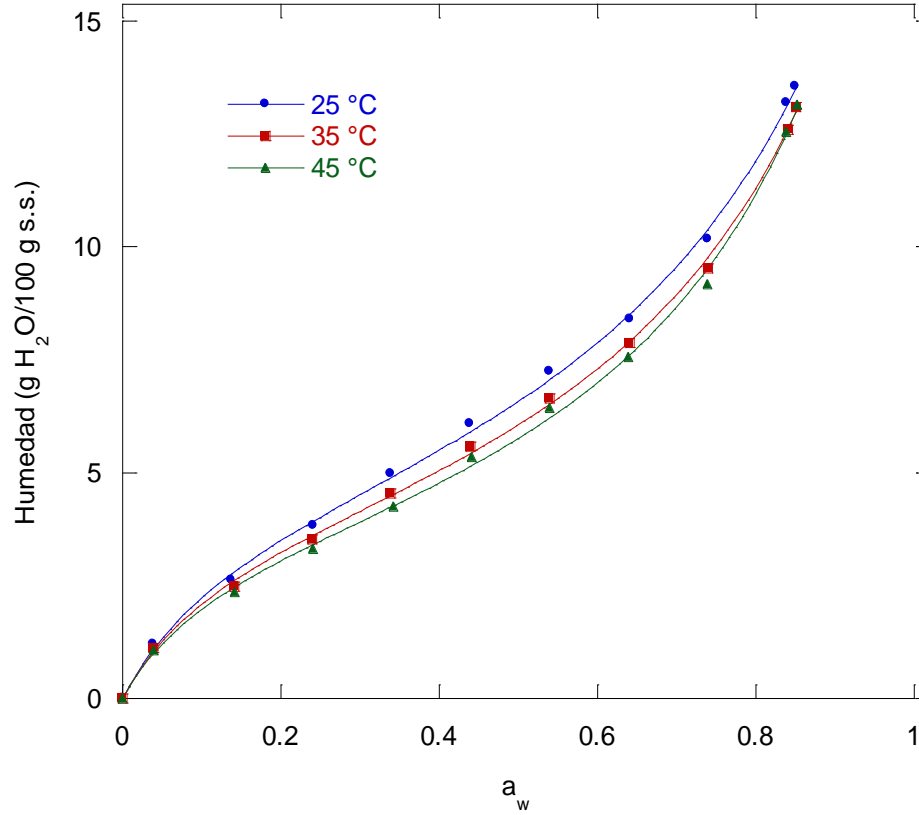


Figura 8. Isothermas de sorción a 25, 35 y 45 °C de la muestra congelada en congelador a -40 °C y liofilizada (CL).

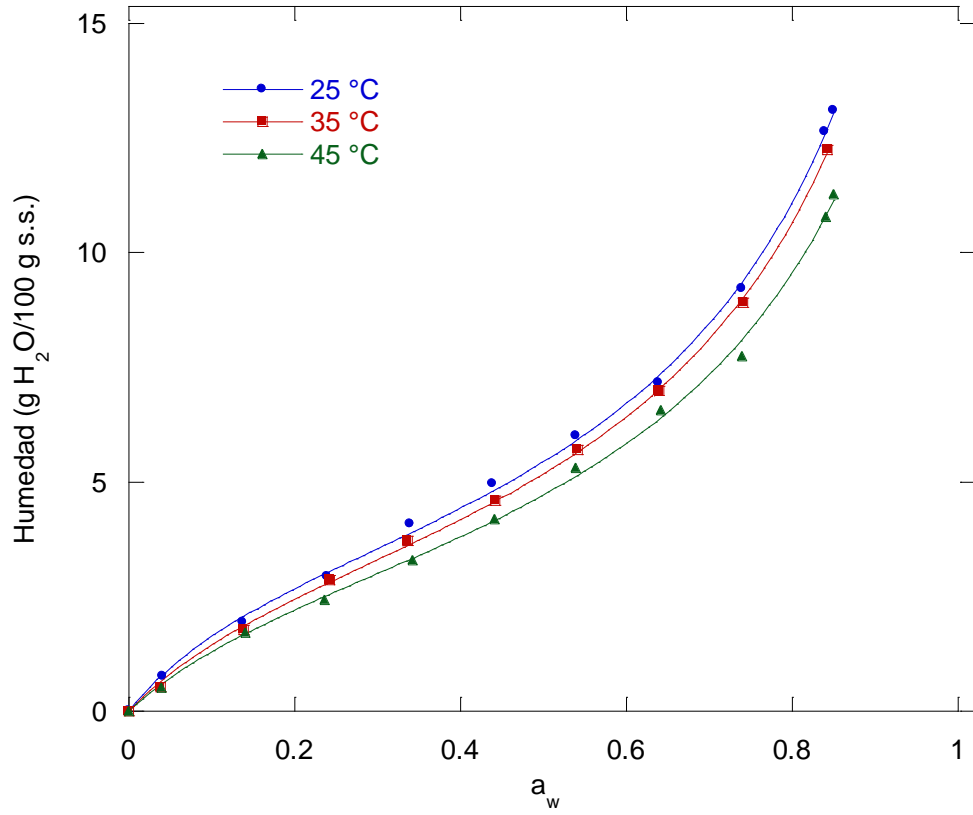


Figura 9. Isothermas de sorción a 25, 35 y 45 °C de la muestra congelada con nitrógeno líquido y liofilizada (NL).

A partir del ajuste de los datos experimentales con el modelo de GAB, en el Cuadro 14 se presentan los valores obtenidos de los parámetros M_0 , que indica el contenido de humedad en la mono capa, C que es un parámetro adimensional relacionado con el calor de adsorción de la mono capa y K que es una constante adimensional relacionada con el calor de adsorción de la multicapa. En modelo de GAB se hace la suposición de que las moléculas de agua en la segunda capa y subsiguientes multicapas poseen el mismo estado energético y que éste es diferente al del agua pura (Pascual-Pineda *et al.*, 2017) y por último se presenta el valor de P obtenido para evaluar el ajuste del modelo.

Se puede observar que el valor obtenido de P se encuentra por debajo de 4% en todas las muestras, por lo que el ajuste de GAB describe adecuadamente los resultados experimentales obtenidos en el rango de a_w manejado; Lomauro *et al.*, (1985) considera que valores de P iguales o cercanos a 5 representan un buen ajuste del modelo.

Cuadro 14. Parámetros obtenidos a partir del ajuste de las isotermas con el modelo de GAB a diferentes temperaturas de las muestras SE, CL y NL.

	Temperatura (°C)	M_0 (g H ₂ O/100 g s.s.)	C	K	$P\%$
SE	25	3.4099	12.6580	0.89057	3.49
	35	3.1034	12.455	0.91855	1.84
	45	3.0888	10.9110	0.92120	2.50
CL	25	4.6171	9.2989	0.79382	2.76
	35	4.0971	9.8262	0.82039	2.39
	45	3.7761	9.9363	0.84685	2.62
NL	25	3.6457	7.3674	0.86320	2.82
	35	3.5923	6.2141	0.85769	3.84
	45	3.3472	5.9501	0.84526	3.19

El valor de mono capa es considerado por algunos autores como el valor óptimo para asegurar la estabilidad de los alimentos (Gabas *et al.*, 2007; Lomauro *et al.*, 1985). Los valores de mono capa se encuentran en rangos de 3.08-3.4 para SE, 3.7-4.6 para CL y 3.3-3.6 para NL, todos con una tendencia a disminuir conforme aumenta la temperatura, lo que se debe a que el proceso de adsorción es exotérmico (Pascual-Pineda *et al.*, 2017), el valor de la mono capa fue mayor para la muestra CL, seguido por NL y finalmente por SE, estas diferencias en los valores de mono capa podrían deberse a la microestructura de la superficie del polvo debido al proceso fisicoquímico mediante el cual fueron procesadas (Pascual-Pineda *et al.*, 2017).

Los valores de C se presentaron en un rango entre 5.9 y 12.65, lo que se encuentra dentro del rango reportado por Lewicki (1997), quien señala que una isoterma de tipo sigmoide está descrita correctamente por el modelo de GAB cuando $5.67 \leq C \leq \infty$; los valores de C son menores para NL, seguidos por CL y los valores mayores se presentaron en la muestra SE; $C > 2$ corresponde a isothermas tipo II y esto indica que la interacción energética de las moléculas de agua con la superficie de los polvos es mayor que las fuerzas de atracción entre las moléculas del agua libre (Lowell y Shields, 1984; Pascual-Pineda *et al.*, 2017). En procesos exotérmicos, las interacciones adsorbente-adsorbato se favorecen a menor temperatura, por lo que se espera un incremento en el parámetro C conforme disminuye la temperatura (Gabas *et al.*, 2007), lo que concuerda con la Ecuación 15, la cual describe la dependencia de C de la temperatura, lo cual corresponde con los valores de C obtenidos en las muestras SE y NL, en las cuales el aumento de la temperatura de 25 a 45 °C produjo una disminución en C, sin embargo en el caso de la muestra CL este comportamiento se vio alterado, produciéndose un aumento en el valor de C conforme aumenta la temperatura, lo que podría deberse a cambios irreversibles asociados con las temperaturas como reacciones de desnaturalización (Gabas *et al.*, 2007; Pascual-Pineda *et al.*, 2017; Iglesias y Chirife, 1982); por otro lado, Pascual-Pineda *et al.* (2017) señalan que es posible que C carezca de significado físico y que sea resultado de una compensación matemática entre parámetros.

Los valores del parámetro K obtenidos se encuentran en un rango entre 0.79 y 0.92, los cuales se encuentran dentro del rango reportado por Lewicki (1997), quien señala que los valores de K deben ser mayores de 0.24 y menores o iguales a uno, debido a que constantes fuera de estos rangos indican que el modelo de GAB no describe correctamente a la isoterma o que se pueden presentar errores en la estimación del valor de mono capa. El valor de K provee una estimación de las interacciones entre las moléculas de las multicapas con el adsorbente, y tiende a estar entre el valor de la energía de las moléculas en la mono capa y la del agua libre; si $K=1$, las multicapas tienen propiedades del agua libre y éstas no tienen interacción alguna con la superficie del alimento (Pérez-Alonso *et al.*, 2006), debido a que los valores de K que se obtuvieron son menores a uno, se podría deducir que existen interacciones energéticas entre las moléculas de agua de la multicapa con la superficie del alimento (Gabas *et al.*, 2007; Pascual-Pineda *et al.*, 2017).

La isoterma de sorción de NLyLpf se presenta en la Figura 10, en el caso de la muestra NLyLpf el contenido de humedad aumentó considerablemente a partir de actividades de agua de 0.7, resultados similares reporta Barber y Warthesen (1982) para gluten de trigo acilado, en el cual las curvas de adsorción de agua son similares a las del gluten de trigo sin modificar hasta actividades de agua de 0.75 y a partir de 0.75 la adsorción de agua aumenta considerablemente. Normalmente durante la etapa inicial de adsorción, el agua ocupa sitios de alta energía en la superficie del sólido y se liga iónicamente para formar una mono capa muy estructurada, después de la formación de la mono capa la adsorción de agua se debe a la formación de puentes de hidrógeno con los grupos polares y con el agua de la mono capa, lo que conlleva a la formación de la multicapa donde las fuerzas que unen al agua son débiles y el comportamiento del agua se asemeja al comportamiento del agua libre (Kinsella *et al.*, 1985), sin embargo en el caso de la muestra NLyLpf, al haber una mayor cantidad de grupos hidrofóbicos las moléculas de agua podrían encontrarse débilmente ligadas a la superficie formando una mono capa mucho menos estructurada que conlleva a la adsorción de más moléculas de agua y con esto la formación de una multicapa a humedades relativas por encima de 70%. Phillips *et al.* (1994) señalan que en las regiones inmediatas a los grupos no polares de las

proteínas, las moléculas de agua se podrían ordenar de tal manera que se forma una especie de jaula o “clatrato”, donde las moléculas de agua tienen propiedades intermedias entre el agua ligada y el agua libre; ésta agua retenida físicamente en las cavidades expuestas de las proteínas o en las redes proteína-proteína tiene un efecto en la cantidad de agua que se asocia a las estructuras proteicas pero esto generalmente ocurre a altas actividades de agua, entre 0.5 y 0.95, dependiendo de la topografía de la proteína, lo que podría estar ocurriendo en el caso de la muestra NLyLpf, que a actividades de agua de 0.7 tiene una adsorción de agua considerable.

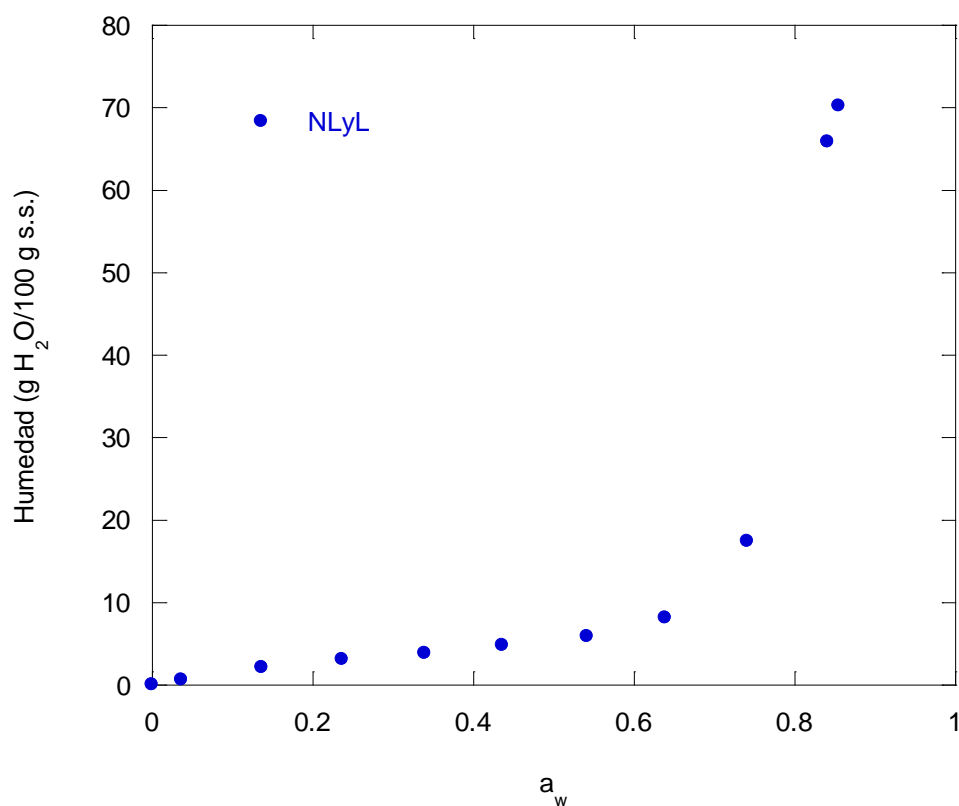


Figura 10. Isotherma de adsorción a 25 °C de la muestra NLyLpf

6.7 Propiedades Termodinámicas

Se determinaron las propiedades termodinámicas de las muestras modificadas físicamente (SE, CL y NL) a partir de las isothermas de sorción a temperatura 25, 35 y 45 °C ajustadas con el modelo de GAB para determinar el punto de máxima estabilidad de las muestras y si se registran cambios derivados de las diferencias en los procesos de secado de los aislados de proteína de amaranto.

La entropía diferencial (ΔS_{dif}) de un material es proporcional al número disponible de sitios de sorción correspondientes a un nivel de energía específico (McMinn *et al.*, 2004), por otro lado la entropía integral (ΔS_{int}) describe el grado de desorden o de aleatoriedad del movimiento de las moléculas de agua adsorbidas, está relacionada con las fuerzas de atracción o repulsión del sistema e indica el nivel al cual la interacción del agua y el adsorbente es mayor que la interacción entre las moléculas de agua (Pascual-Pineda *et al.*, 2014; McMinn *et al.*, 2004), la mínima entropía integral ha sido propuesta como el indicador más apropiado para determinar las mejores condiciones de almacenamiento (Beristain y Azuara, 1990).

En la Figura 11 se muestran las variaciones de las entropías diferencial e integral a diferentes contenidos de humedad de la muestra Secada en Estufa (SE) a temperatura 25, 35 y 45 °C y se puede observar que las intersecciones de las curvas de entropía se encuentran en el valor mínimo de la entropía integral, que corresponde a un contenido de humedad de alrededor de 2 g H₂O/100 g de s.s. y éste es el punto que se considera de máxima estabilidad, ya que es en donde se encuentran más ordenadas las moléculas de agua con respecto al alimento y aunque el valor de la intersección es único, existe una zona en la cual la entropía integral no varía, por lo que existe un margen de estabilidad (Beristain y Azuara, 1990) que como se puede observar en la Figura 12, donde se presentan las variaciones de entropía integral con respecto a la actividad de agua de la muestra Secada en Estufa SE a temperatura 25, 35 y 45 °C, la mínima entropía integral se ubica en un rango de actividades de agua entre 0.05 y 0.15 aproximadamente,

además se observa que la entropía integral disminuye hasta alcanzar un mínimo en las actividades de agua mencionadas y luego conforme aumenta la actividad de agua hay un incremento en la entropía integral, incremento que es aún mayor a 25 °C, McMinn *et al.* (2004) señalan que este incremento en la magnitud de la entropía integral después de alcanzar un mínimo es indicativo de moléculas de agua que no están fuertemente ligadas al adsorbente, las cuales dan pie a la formación de multicapas y conforme aumenta el contenido de humedad la entropía del sistema se aproximará más a la del agua libre.

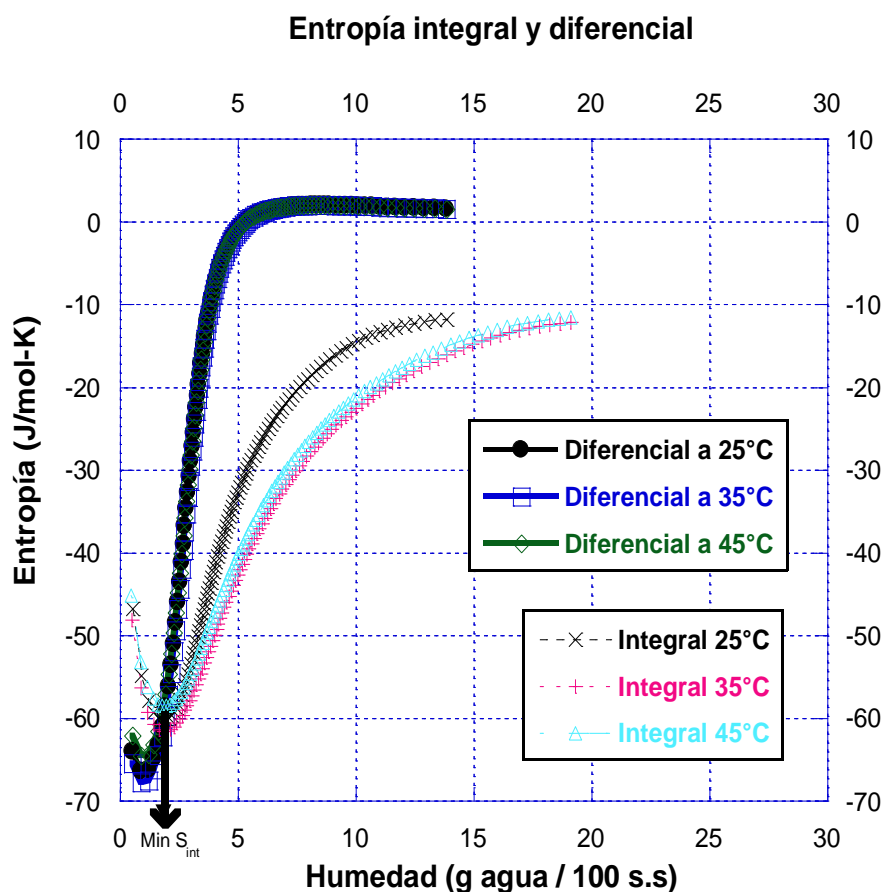


Figura 11. Variación de la Entropía Diferencial e Integral a diferentes Contenidos de humedad a 25, 35 y 45 °C de la proteína SE.

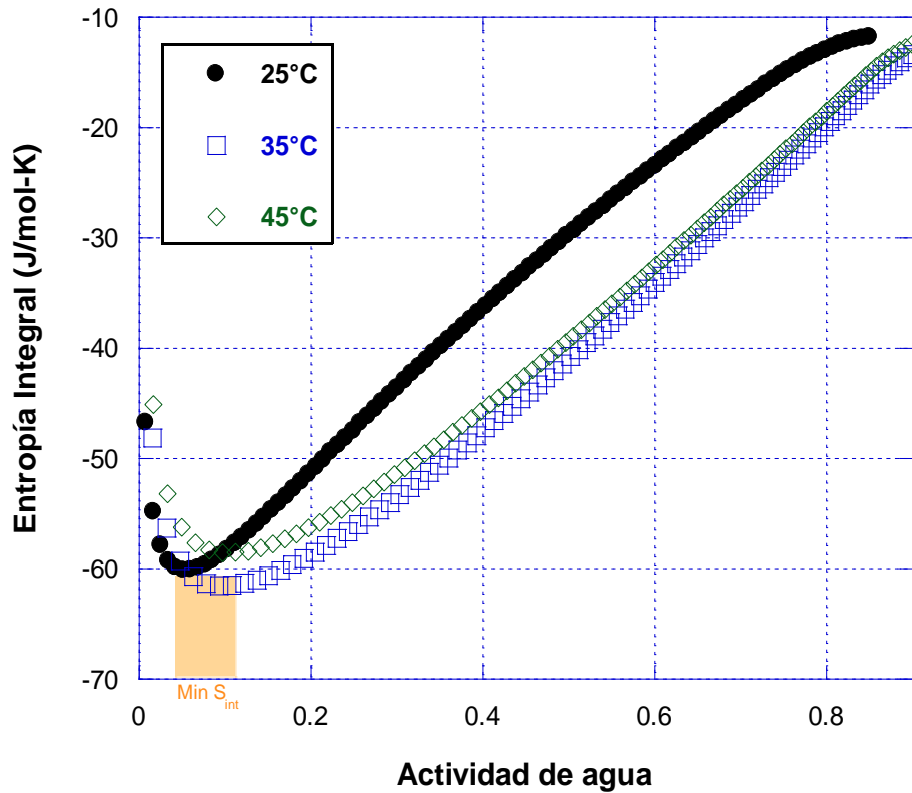


Figura 12. Variación de la Entropía Integral a diferentes a_w a 25, 35 y 45 °C de la proteína SE.

En la Figura 13 y Figura 14 se presentan las gráficas de la variación de la entropía diferencial e integral a diferentes contenidos de humedad y de la variación de la entropía integral a diferentes actividades de agua, respectivamente, de la muestra congelada en ultra congelador a -40 °C y liofilizada (CL), en la Figura 13 se puede observar que la intersección de las curvas de entropía diferencial e integral se encuentra en un contenido de humedad de alrededor de 8 g H₂O/100 g de s.s. que como se puede observar en la Figura 14 corresponde a un rango de actividades de agua de entre 0.60 y 0.70, lo cual aumentó considerablemente en comparación

con la muestra secada en estufa (SE), Pascual-Pineda *et al.* (2017) obtuvieron valores de contenido de humedad en la mínima entropía integral de 7.3 y 19.9 g H₂O/100 g de s.s. en cápsulas de alginato-zeolita con oleoresina de paprika y polvo de pina secado en lecho vibro-fluidizado, respectivamente y señalan que ambos materiales poseen una estructura microporosa en comparación con polvos de sacarosa-calcio, en los cuales obtuvieron valores de contenido de humedad en la mínima entropía integral de 4.9 g H₂O/100 g de s.s., de la misma forma Pascual-Pineda *et al.* (2014) reportaron valores de contenido de humedad en la mínima entropía integral de 7.0, 7.2 y 23.6 g H₂O/100 g de s.s. para un material no nano estructurado preparado con alginato (macro poros con diámetro de 90 nm), un material nano estructurado preparado con alginato-zeolita valfor y zeolita valfor (micro poros con diámetro de 0.4 nm), respectivamente, estos contenidos de humedad corresponden a actividades de agua de 0.10, 0.35-0.45 y 0.70-0.86, respectivamente, y Pascual-Pineda *et al.* (2014) señalaron que en el material nano estructurado el mecanismo de adsorción de agua es controlado por mecanismos entrópicos en un mayor rango de actividades de agua debido a las nano cavidades de zeolita inmersas en la matriz del material y que esta zona de mínima entropía integral en los materiales nano estructurados corresponde a una acomodación ordenada de las moléculas de agua sobre y dentro de la superficie del producto nano estructurado, por lo que concluyen que al aumentar el volumen de micro poros con diámetros menores a 2 nm se pueden preservar los productos con altos contenidos de humedad sin que el agua intervenga en las reacciones de deterioro.

Como se observa en la Figura 14, la curva presenta un declive de la entropía integral conforme aumenta la actividad de agua, McMinn *et al.* (2004) señalan que esta disminución de la entropía refleja un aumento en la restricción del movimiento, es decir, una pérdida de la libertad rotacional o del grado de aleatoriedad de las moléculas de agua a medida que los sitios disponibles se saturan y se comienzan a utilizar los sitios más activos, el punto mínimo se alcanza cuando el agua adsorbida comienza a localizarse y se forma la primera capa de moléculas de agua sobre el adsorbente fuertemente ligada a éste (Nunes y Rotstein, 1991).

Entropía integral y diferencial

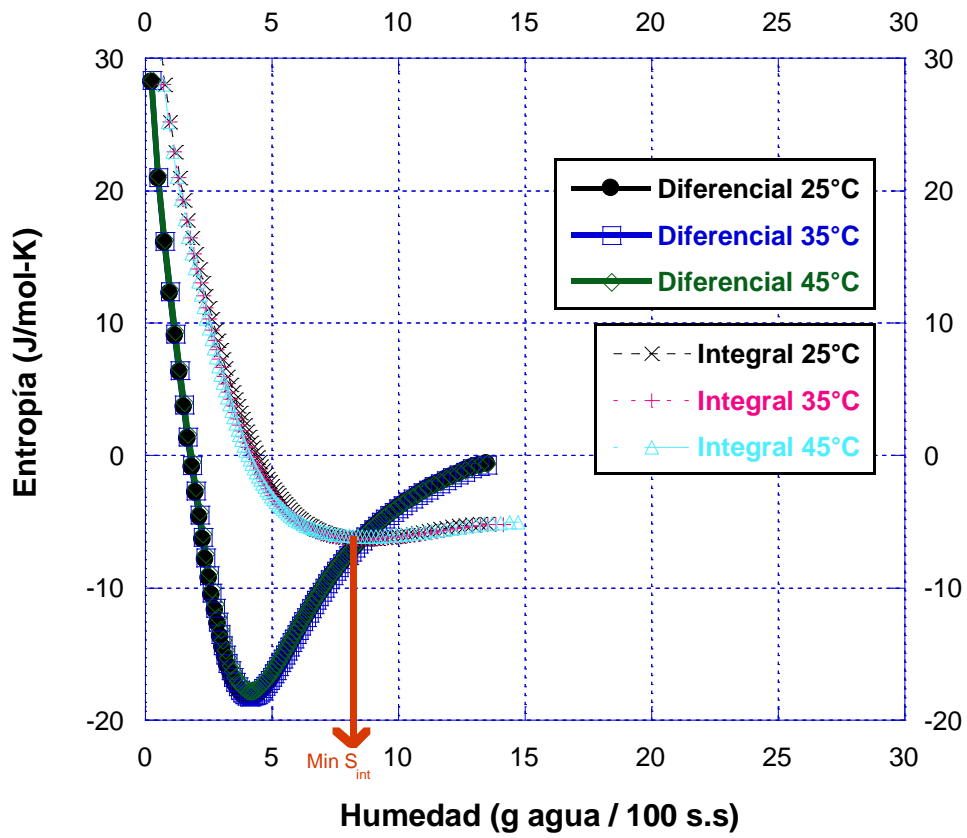


Figura 13. Variación de la Entropía Diferencial e Integral a diferentes Contenidos de humedad a 25, 35 y 45 °C de la proteína CL.

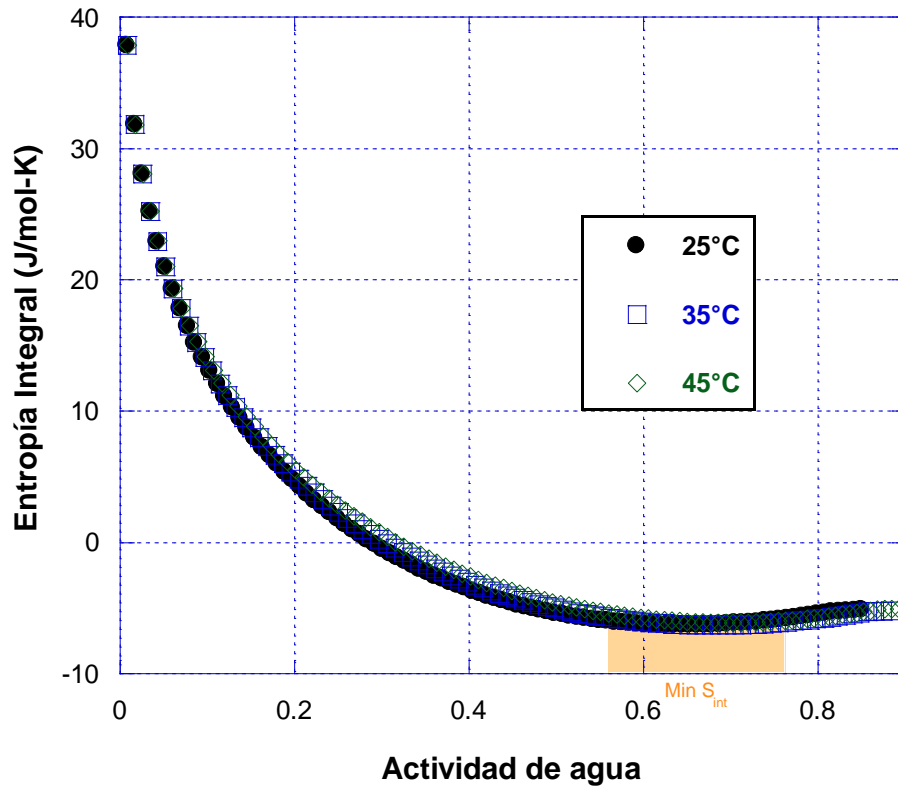


Figura 14. Variación de la Entropía Integral a diferentes a_w a 25, 35 y 45 °C de la proteína CL.

En la Figura 15 y en la Figura 16 se presentan la gráfica de las variaciones de la entropía integral y diferencial a diferentes contenidos de humedad y la gráfica de las variaciones de la entropía integral a diferentes actividades de agua, respectivamente, de la muestra congelada con nitrógeno líquido y liofilizada (NL), en la Figura 15 se puede observar que la intersección de las curvas de entropía diferencial e integral se encuentra en un contenido de humedad de alrededor de 4 g H₂O/100 g de s.s. que como se puede observar en la Figura 16, corresponde a un rango de actividades de agua de entre 0.25 y 0.35, estos valores superan ligeramente a los obtenidos en la muestra SE, en la cual la mínima entropía integral corresponde a contenidos de humedad de 2.5 g H₂O/100 g de s.s. ($a_w \approx 0.05$ y 0.15), estas diferencias podrían deberse a la microestructura de la superficie de las

partículas que en el caso de la muestra NL podría ser más porosa que SE, lo que es resultado del método de secado utilizado, debido a la formación de cristales pequeños durante el congelamiento rápido que, después del secado en liofilizador generaron porosidades, sin embargo, el contenido de humedad en la mínima entropía integral en la muestra NL difiere considerablemente con el de la muestra CL, en la cual la mínima entropía integral corresponde a contenidos de humedad de hasta 8 g H₂O/100 g de s.s. ($a_w \approx 0.60$ y 0.70), debido a que ambas muestras fueron secadas por liofilización, esta diferencia se puede adjudicar exclusivamente al proceso de congelamiento, aunque era de esperarse un comportamiento opuesto debido a que a mayor velocidad de congelamiento, menor es el tamaño de los cristales obtenidos y por lo tanto menor tamaño de poro al finalizar el proceso de secado, sin embargo algún componente de los aislados de proteína podría estar interfiriendo con el proceso de congelación, por lo que sería necesario profundizar en el análisis de la micro estructura de las muestras.

Entropía integral y diferencial

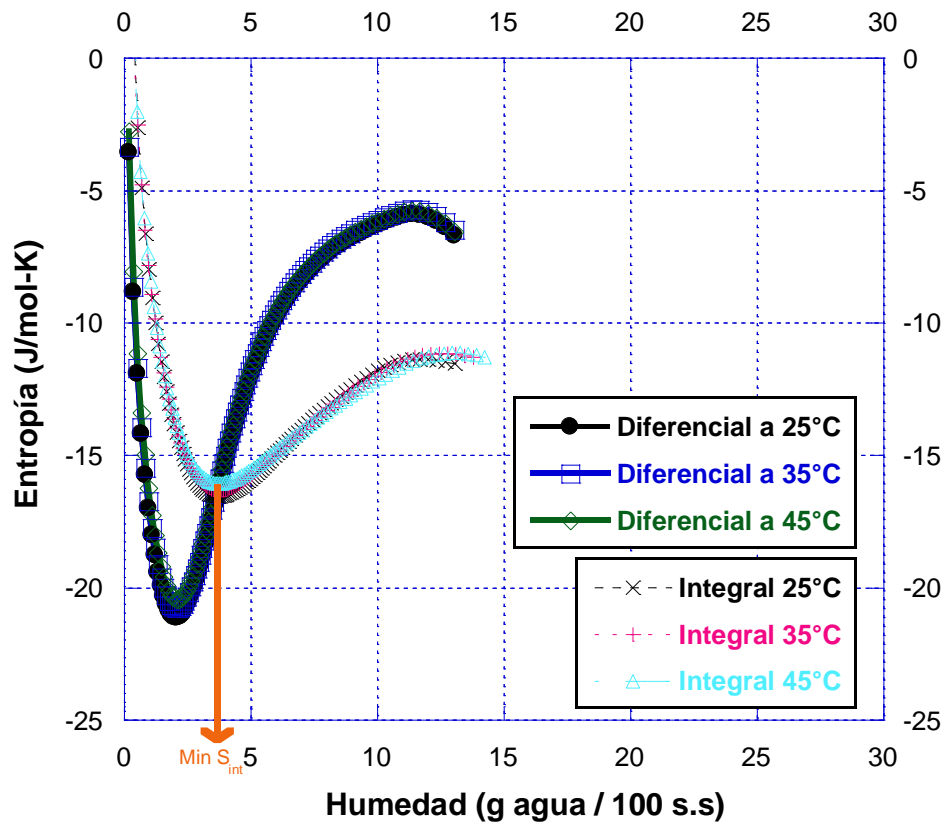


Figura 15. Variación de la Entropía Diferencial e Integral a diferentes Contenidos de humedad a 25, 35 y 45 °C de la proteína NL.

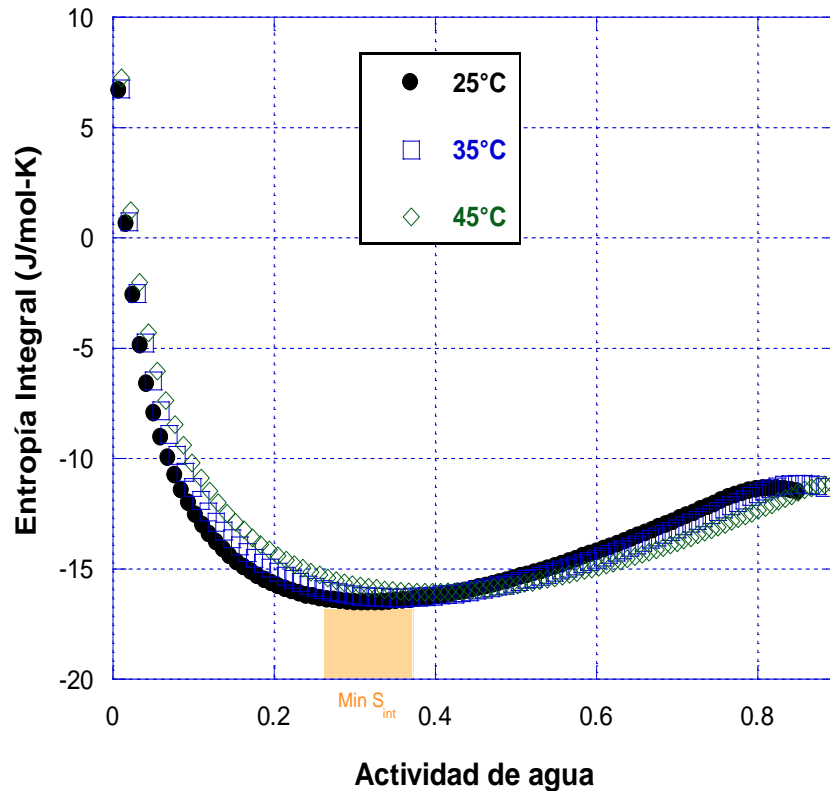


Figura 16. Variación de la Entropía Integral a diferentes a_w a 25, 35 y 45 °C de la proteína NL.

Los valores del contenido de humedad de máxima estabilidad de las muestras obtenidos mediante la mínima entropía integral (SE = 2.5 g H₂O/100 g de s.s., CL ≈ 8 g H₂O/100 g de s.s., NL ≈ 4 g H₂O/100 g de s.s.) difieren de los valores de mono capa obtenidos mediante el ajuste de GAB, (SE ≈ 3.08-3.4 g H₂O/100 g de s.s., CL ≈ 3.7-4.6 y NL ≈ 3.3-3.6), Pascual-Pineda *et al.* (2017) resaltan el hecho de que esta divergencia ha sido manifestada por diversos autores y señalan que podría deberse a que la mínima entropía integral permite cuantificar el contenido de agua adsorbido en los micro poros y en las irregularidades de la superficie del alimento, mientras que la mono capa de GAB no considera la forma de la microestructura y se basa en la suposición de que la superficie del adsorbente es plana y por lo tanto

los sitios de adsorción están distribuidos de manera homogénea, sin embargo tanto en el valor de mínima entropía integral como en el valor de mono capa, se observa una tendencia en la cual la máxima estabilidad se observa en la muestra congelada en ultra congelador a -40 °C y liofilizada (CL), seguida por la muestra congelada con nitrógeno líquido y liofilizada (NL) y por último la muestra secada en estufa a 35 °C (SE), por lo que las diferencias en el proceso de secado provocan cambios en la estabilidad de las muestras.

6.8 Propiedades Funcionales

6.8.1 Solubilidad

Las propiedades funcionales de los aislados se analizaron a pH 4, 7 y 10, las muestras modificadas físicamente (SE, CL y NL) presentaron diferencias significativas ($F_{(2,18)}= 395.315$, $p < 0.05$) en el factor pH, como se puede observar en el Cuadro 15 el mayor índice de solubilidad para estas muestras se presentó a pH 10, mientras que la menor solubilidad se presentó a pH 4 y 7, probablemente debido a que el punto isoeléctrico ($pI \approx 4.3$) de las proteínas se encuentra en este rango de pH, lo que coincide con lo reportado por Silva-Sánchez *et al.* (2004), que analizaron la solubilidad de albúmina de amaranto a pH entre 3 y 9, obteniendo una mayor solubilidad a pH más básicos, Cordero de los Santos *et al.* (2005) evaluaron la solubilidad de aislados de proteína de amaranto obtenidos mediante el método de precipitación isoeléctrica y reportaron que el menor índice de solubilidad se encuentra a pH entre 4 y 5 y la mayor solubilidad a pH 9 y que el índice de solubilidad en este pH fue del 70%, además reportan un índice de solubilidad del 66% en pH 10, lo que coincide con el mayor índice de solubilidad obtenido en el presente trabajo, que fue de 66% en la muestra secada en estufa (SE) a pH 10.

La solubilidad aumenta a pH 10, probablemente debido a que a pH básico la repulsión electrostática entre las proteínas es mayor que las interacciones hidrofóbicas, lo cual aumenta la solubilidad de las proteínas; en el caso de las muestras modificadas químicamente (SEyLpf, CLyLpf y NLyLpf), se observaron diferencias significativas ($F_{(2,18)}= 442.056$, $p < 0.05$) entre los diferentes pH, las

muestras mostraron una disminución de la solubilidad a pH 10, lo que podría deberse a la adición de grupos lipofílicos que ocasiona que aumenten las interacciones hidrofóbicas aumenten y las proteínas precipiten, esta disminución de la solubilidad ha sido reportada en estudios en los que se adicionan grupos hidrofóbicos (Lamus y Barrera-Arellano, 2005).

Cuadro 15. Índice de Solubilidad (IS)

	pH	IS (%)	IS Lpf (%)
SE	4	5.27 ± 1.56 ^{cA}	1.86 ± 0.49 ^{aB}
	7	4.58 ± 0.60 ^{cA}	2.23 ± 0.89 ^{aA}
	10	66.16 ± 0.63 ^{cB}	0.90 ± 1.56 ^{aA}
CL	4	6.62 ± 0.29 ^{bA}	8.33 ± 3.34 ^{bB}
	7	3.79 ± 0.29 ^{bA}	2.12 ± 1.88 ^{bA}
	10	40.25 ± 7.34 ^{bB}	3.29 ± 0.80 ^{bA}
NL	4	3.33 ± 0.14 ^{aA}	7.53 ± 1.96 ^{bB}
	7	3.47 ± 0.77 ^{aA}	2.49 ± 2.17 ^{bA}
	10	16.29 ± 0.79 ^{aB}	2.49 ± 0.56 ^{bA}

Media ± desviación estándar

Letras minúsculas diferentes en las columnas indican diferencias significativas por efecto del método de secado ($p < 0.05$), letras mayúsculas diferentes en columnas indican diferencias significativas por efecto de pH ($p < 0.05$).

Además, Rahma y Rao (1983) señalan que la disminución de la solubilidad cuando se introducen grupos hidrofóbicos a las moléculas de proteínas va a depender del número de grupos modificados y en la presente investigación se pretende evaluar el efecto de los niveles máximos de modificación por lo que se alcanzaron grados de modificación de más del 80%. Por otro lado, Shen (1981) señala que en algunos casos la solubilidad de las proteínas se ve afectada por la presencia de sales, en solución con sales con aniones monovalentes la solubilidad disminuye y como se ha mencionado anteriormente, en el caso de las muestras

SEyLpf, CLyLpf y NLyLpf es probable que exista un alto contenido de NaCl residual, resultado de la neutralización de HCl que se libera durante la reacción de modificación de las proteínas.

En cuanto al método de secado, se observaron diferencias significativas ($F_{(2,18)} = 57.506$, $p < 0.05$) el método de secado en estufa (SE) presentó la mayor solubilidad, mientras que el aislado congelado con nitrógeno líquido (NL) presentó la menor solubilidad, el mismo fenómeno de disminución de la solubilidad de las proteínas al congelar con nitrógeno líquido ha sido reportado por Acosta-Domínguez *et al.* (2016) quienes realizaron este procedimiento en aislado de proteína de soya. Cao (2004) señala que en superficies convexas, la curvatura es positiva y el potencial químico de los átomos en la superficie es mayor, por lo que la transferencia de masa a una superficie convexa resulta en un incremento en el potencial químico de la superficie, mientras que la transferencia de masa hacia una superficie cóncava conlleva a una disminución del potencial químico; termodinámicamente, un átomo en una superficie cóncava tiene un potencial químico bajo y esto se ve reflejado en la solubilidad del sólido.

6.8.2 Capacidad de Hinchamiento

En el Cuadro 16 se presenta la capacidad de hinchamiento, para los aislados modificados físicamente fue mayor en NL (6.67-7.73 mL/g), seguidas por CL (3.47-4.53 mL/g) y por último las proteínas SE (1.73-2.8 mL/g), Kinsella *et al.* (1985) señala que a actividades de agua mayores a 0.9 el agua podría asociarse ligeramente a la proteína, lo que ocasiona un hinchamiento, ya sea porque las moléculas de agua son atrapadas en la matriz de los polipéptidos, como es el caso de los geles, o porque se retiene como agua capilar, lo que podría ser el caso de NL, la cual presenta una capacidad de hinchamiento mayor.

En el caso de las proteínas modificadas químicamente (SEyLpf, CLyLpf, NLyLpf) no hubo diferencias significativas entre las tres ni por efecto del método de secado ($F_{(2,18)} = 0.527$, $p > 0.05$) ni por efecto del pH ($F_{(2,18)} = 1.401$, $p > 0.05$) y todas

presentaron valores negativos de capacidad de hinchamiento, debido a que presentan una alta hidrofobicidad lo que ocasionó que la adición del buffer ejerciera cierta presión sobre las muestras lo que resultó en una compactación del polvo y finalmente una capacidad de hinchamiento negativa.

Cuadro 16. Capacidad de Hinchamiento (CHi)

		CHi (mL/g)	CHi Lpf (mL/g)
SE	4	1.73 ± 0.23 ^{aA}	-7.5 ± 0.50 ^{aA}
	7	2.40 ± 0.00 ^{aB}	-8.1 ± 1.15 ^{aA}
	10	2.80 ± 0.40 ^{aB}	-8.6 ± 0.69 ^{aA}
CL	4	3.47 ± 0.46 ^{bA}	-7.8 ± 1.08 ^{aA}
	7	4.00 ± 0.00 ^{bB}	-8.4 ± 0.56 ^{aA}
	10	4.53 ± 0.46 ^{bB}	-8.23 ± 1.16 ^{aA}
NL	4	6.67 ± 0.46 ^{cA}	-7.63 ± 0.85 ^{aA}
	7	7.47 ± 0.46 ^{cB}	-8.37 ± 0.60 ^{aA}
	10	7.73 ± 0.46 ^{cB}	-7.3 ± 0.61 ^{aA}

Media ± desviación estándar

Letras minúsculas diferentes en las columnas indican diferencias significativas por efecto del método de secado ($p < 0.05$), letras mayúsculas diferentes en columnas indican diferencias significativas por efecto de pH ($p < 0.05$).

6.8.3 Actividad Emulsionante

Como se puede observar en el Cuadro 17, para las proteínas modificadas físicamente SE, CL y NL la actividad emulsionante (AE) no presentó diferencias significativas en cuanto al tipo de secado ($F_{(2,18)} = 0.956$, $p > 0.05$), sin embargo, se vio afectada por efecto del pH ($F_{(2,18)} = 10.816$, $p < 0.05$), la mayor actividad emulsionante se encontró a pH 4 y 7, lo que es similar a los resultados obtenidos por Silva-Sánchez *et al.* (2004) que reportaron que la actividad emulsionante depende del pH y obtuvieron la mayor actividad emulsionante a pH 5 en albúmina de amaranto, por otro lado, también coincide con lo reportado por Cordero de los

Santos *et al.* (2005), quienes evaluaron la actividad emulsionante de aislados de proteína de amaranto y hallaron una mayor actividad emulsionante en pH ácido, sin embargo ellos reportan actividades emulsionantes mayores, de hasta 86%, pero en pH 2. Cerca del punto isoeléctrico, las moléculas proteicas se encuentran en una configuración más compacta que en otros valores de pH y éstas son adsorbidas en la interface en esta configuración, lo que podría proveer una mayor concentración de moléculas proteicas por unidad de área de la interface y, consecuentemente, un mayor número de interconexiones por unidad de área, en comparación con otros valores de pH (Fidantsi y Doxastakis, 2001).

Cuadro 17. Actividad Emulsionante (AE) de Aislados de Proteína de Amaranto.

	pH	AE (%)	AE Lpf (%)
SE	4	58.33 ± 2.89 ^{aB}	8.33 ± 2.89 ^{aB}
	7	50.00 ± 0.00 ^{aA}	8.52 ± 2.57 ^{aB}
	10	50.00 ± 0.00 ^{aA}	5.18 ± 0.32 ^{aA}
CL	4	52.03 ± 6.09 ^{aB}	13.89 ± 3.47 ^{abAB}
	7	51.85 ± 3.2 ^{aA}	10.17 ± 0.29 ^{abB}
	10	50.00 ± 0.00 ^{aA}	11.67 ± 2.89 ^{abA}
NL	4	60.74 ± 5.59 ^{aB}	10.00 ± 0.00 ^{bAB}
	7	50.00 ± 0.00 ^{aA}	29.29 ± 2.70 ^{bB}
	10	50.00 ± 0.00 ^{aA}	10.00 ± 0.00 ^{bA}

Media ± desviación estándar

Letras minúsculas diferentes en las columnas indican diferencias significativas por efecto del método de secado ($p < 0.05$), letras mayúsculas diferentes en columnas indican diferencias significativas por efecto de pH ($p < 0.05$).

En el caso de las proteínas modificadas químicamente SEyLpf, CLyLpf y NLyLpf hay un efecto tanto del tipo de muestra ($F_{(2,18)} = 6.478$, $p < 0.05$) como del pH ($F_{(2,18)} = 4.204$, $p < 0.05$), sin embargo, la actividad emulsionante fue mucho menor en comparación con las muestras modificadas físicamente, ha sido reportado que la modificación química tiene un efecto positivo en la actividad emulsionante de

las proteínas (Creuzenet *et al.*, 1992; Lamus y Barrera-Arellano, 2005; Rahma y Rao, 1983, Johnson y Brekke, 1983), Creuzenet *et al.* (1992) señalan que esto se debe a que las cadenas hidrofóbicas ligadas a los grupos amino disminuyen la polaridad de la proteína y mejoran su capacidad de actuar en las interacciones hidrofóbicas en la interface aceite-agua, sin embargo resaltan el hecho de que utilizan proteínas moderadamente modificadas, debido a que un mayor grado de sustitución disminuye la solubilidad de la proteína en la fase acuosa y esto podría conllevar a una menor capacidad emulsificante, debido a que se requiere una relación óptima de hidrofobicidad/hidrofilicidad.

La estabilidad de la emulsión se presenta en el Cuadro 18 y como se puede observar fue mucho mayor en las proteínas modificadas físicamente, en las que se alcanzaron valores de estabilidad de emulsión de hasta 50% en las muestras CL y NL, mientras que las muestras modificadas químicamente únicamente alcanzaron estabilidades de emulsión de entre 5 y 17%, presentándose la mayor estabilidad en la muestra NLyLpf a pH 7, esta baja estabilidad de las emulsiones de las muestras modificadas químicamente se deriva probablemente de la baja actividad emulsionante que presentan estas muestras, además el contenido de sal de las muestras modificadas químicamente podría estar afectando la estabilidad de la emulsión, debido a que la presencia de sal puede afectar la solubilidad, lo que a su vez afecta la estabilidad de emulsión porque los iones de las sales pueden interactuar con los grupos cargados de las proteínas y esto tiene un efecto sobre las interacciones electrostáticas (Fidantsi y Doxastakis, 2001).

Cuadro 18. Estabilidad de la Emulsión (EE) de Aislados de Proteína de Amaranto.

		EE (%)	EE Lpf (%)
SE	4	33.33 ± 5.77 ^{aA}	5.00 ± 0.00 ^{aA}
	7	29.26 ± 5.16 ^{aA}	10.17 ± 0.30 ^{aB}
	10	43.33 ± 2.89 ^{aB}	3.33 ± 2.89 ^{aA}
CL	4	50.37 ± 8.98 ^{bA}	10.37 ± 0.64 ^{bA}
	7	32.78 ± 2.55 ^{bA}	10.17 ± 0.29 ^{bB}
	10	50.00 ± 0.00 ^{bB}	5.00 ± 0.00 ^{bA}
NL	4	37.4 ± 3.57 ^{bA}	5.00 ± 0.00 ^{bA}
	7	50.00 ± 0.00 ^{bA}	17.20 ± 3.29 ^{bB}
	10	45.00 ± 0.00 ^{bB}	6.67 ± 2.89 ^{bA}

Media ± desviación estándar

Letras minúsculas diferentes en las columnas indican diferencias significativas por efecto del método de secado ($p < 0.05$), letras mayúsculas diferentes en columnas indican diferencias significativas por efecto de pH ($p < 0.05$).

6.8.4 Capacidad Espumante

En el Cuadro 19 se muestra la capacidad de formación de espuma y en el Cuadro 20 la estabilidad de la espuma, en el caso de SE, CL y NL se obtuvo la mayor capacidad de formación de espuma en la proteína congelada en ultra congelador (CL) y a pH básico, para estas muestras la mayor estabilidad se obtuvo a pH 7, Silva-Sánchez *et al.* (2004) obtuvieron valores de capacidad de formación de espuma de albúmina de amaranto de hasta 200%, sin embargo, ellos obtuvieron mayor capacidad de formación de espuma en un rango de pH ácido, esta diferencia podría deberse a que ellos analizan únicamente la fracción de albúminas de la proteína de amaranto mientras que en el presente trabajo se analiza el aislado completo y Fidantsi y Doxastakis (2001) reportan que aislados de proteína de amaranto obtenidos mediante precipitación isoeléctrica contienen principalmente la

fracción de globulinas y no la de albúminas; por otro lado, Cordero de los Santos *et al.* (2005) obtuvieron valores de capacidad de formación de espuma de apenas 41% en aislados de proteína de amaranto y reportan que la mayor capacidad de formación de espuma se encontró a pH ácido y utilizan el método de precipitación isoeléctrica para la extracción del aislado, sin embargo los resultados obtenidos no coinciden con lo reportado, pero Cordero de los Santos *et al.* (2005) señalan además que el efecto del pH sobre las propiedades funcionales es más complejo y la capacidad de formación de espuma no depende únicamente del efecto del pH sobre la solubilidad de los aislados. En el caso de SEyLpf, CLyLpf y NLyLpf, no existen diferencias significativas ($F_{(2,18)} = 2.4885$, $p > 0.05$) entre la capacidad espumante de cada una de las muestras por efecto del tipo de secado, sin embargo, las mayores capacidades de formación de espuma para estas muestras modificadas químicamente se encontraron a pH 7 y 10.

Cuadro 19. Capacidad de Formación de Espuma (CEs) y Estabilidad de la Espuma (EEs).

	pH	CEs (%)	CEs Lpf (%)
SE	4	61.17 ± 20.96 ^{aA}	38.00 ± 5.29 ^{aA}
	7	52.77 ± 12.73 ^{aA}	115.00 ± 13.23 ^{aC}
	10	86.67 ± 11.55 ^{aB}	110.30 ± 16.80 ^{aB}
CL	4	77.77 ± 19.25 ^{cA}	54.00 ± 22.54 ^{aA}
	7	117.04 ± 5.13 ^{cA}	100.00 ± 0.00 ^{aC}
	10	262.59 ± 14.07 ^{cB}	60.00 ± 10.00 ^{aB}
NL	4	73.33 ± 11.55 ^{bA}	73.33 ± 11.55 ^{aA}
	7	87.87 ± 5.25 ^{bA}	87.87 ± 5.25 ^{aC}
	10	100.00 ± 9.19 ^{bB}	100.00 ± 9.10 ^{aB}

Media ± desviación estándar

Letras minúsculas diferentes en las columnas indican diferencias significativas por efecto del método de secado ($p < 0.05$), letras mayúsculas diferentes en columnas indican diferencias significativas por efecto de pH ($p < 0.05$).

Cuadro 20. Estabilidad de la Espuma (EEs)

		EEs (horas)	EEs Lpf (horas)
SE	4	0.03 ± 0.00 ^{aA}	0.02 ± 0.02 ^{bA}
	7	0.06 ± 0.01 ^{aC}	3.04 ± 0.40 ^{bB}
	10	0.35 ± 0.16 ^{aB}	3.59 ± 0.23 ^{bB}
CL	4	0.12 ± 0.04 ^{cA}	0.06 ± 0.01 ^{aA}
	7	7.33 ± 1.15 ^{cC}	0.98 ± 0.18 ^{aB}
	10	6.71 ± 0.26 ^{cB}	1.24 ± 0.65 ^{aB}
NL	4	0.06 ± 0.01 ^{bA}	0.06 ± 0.01 ^{bA}
	7	2.64 ± 0.38 ^{bC}	2.64 ± 0.38 ^{bB}
	10	0.62 ± 0.02 ^{bB}	0.62 ± 0.02 ^{cB}

Letras minúsculas diferentes en las columnas indican diferencias significativas por efecto del método de secado ($p < 0.05$), letras mayúsculas diferentes en columnas indican diferencias significativas por efecto de pH ($p < 0.05$).

6.8.5 Capacidad de Retención de Agua y Aceite

Se evaluó la capacidad de las proteínas para retener moléculas de agua y aceite, como se puede observar en la Figura 17, se obtuvieron capacidades de retención de agua de entre 1.19 y 3.12 g/g s.s., resultados similares han sido reportados para harinas de soya, concentrados de soya y aislados de soya, con capacidades de retención de agua de 1.3, 2.2 y 4.4 g/g s.s., respectivamente (Lin *et al.*, 1974); por otro lado, se obtuvieron capacidades de retención de aceite entre 1.06 y 5.56 g/g s.s., lo que es 106 y 556 g/100 g s.s., Kinsella *et al.* (1985) señalan que se han reportado valores de capacidad de retención de aceite de 65-130, 74-101 y 119-156 mL/100 g para harinas de soya texturizada, concentrados de soya y aislados de soya, respectivamente.

Como se puede observar en la Figura 17 el aislado congelado con nitrógeno líquido presenta una capacidad de retención de agua y de aceite mayor en comparación con las demás muestras modificadas físicamente (SE, CL), esta

capacidad mejorada de adsorción ha sido reportada también por Acosta-Domínguez *et al.*, (2016) que congelaron proteína de soya con nitrógeno líquido, la liofilizaron y hallaron un aumento en la capacidad de retención de agua y aceite.

Por otro lado, en las muestras modificadas químicamente la capacidad de retención de aceite aumentó considerablemente, mientras que la capacidad de retención de agua de las muestras modificadas químicamente permaneció constante en comparación con la muestra NL y aumentó en comparación con las muestras SE y CL, Kinsella *et al.* (1985) señalan que es probable que la mayor parte del aceite retenido por las proteínas esté atrapado físicamente y por lo tanto la cantidad de aceite atrapado esté influenciado principalmente por el área superficial y la densidad aparente del polvo, resultados similares a los obtenidos fueron reportados por Childs y Park (1976) quienes reportaron aumento en la capacidad de retención de agua y aceite en harina de semilla de algodón acetilada.

Zayas (1997) señala que la capacidad de retención de agua de las proteínas depende del tipo y la cantidad de grupos hidrofílicos polares presentes en la proteína, sin embargo, también depende del tamaño de poro, entre más pequeño sea el tamaño de los poros, mejor se distribuyen en la estructura del producto, y mejor será la retención de las moléculas de agua; en el caso de los geles la retención de agua es mayor si el tamaño de los poros es entre 1-100 nm. Por lo tanto, la congelación con nitrógeno líquido podría estar modificando el tamaño de los poros de las partículas en los aislados de proteína, lo que produce un aumento en la capacidad de retener humedad.

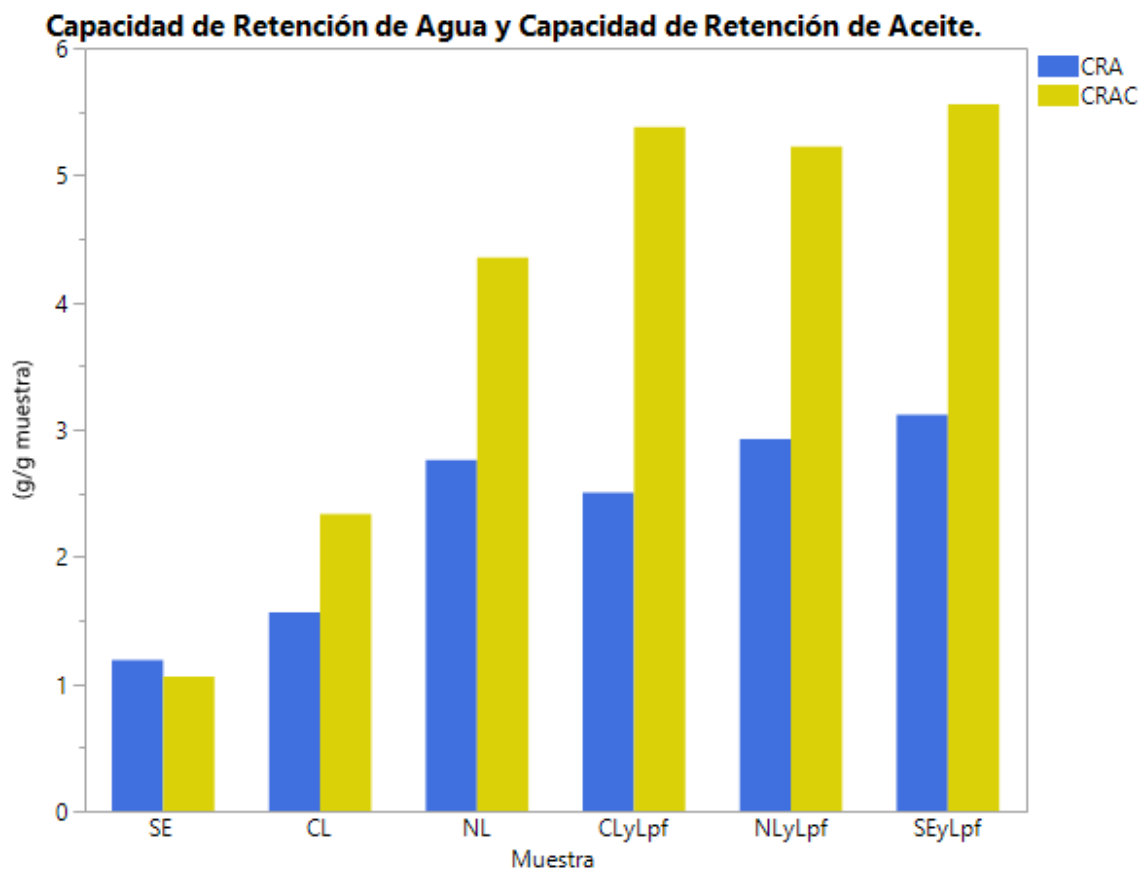


Figura 17. Capacidad de Retención de Agua (CRA) y Capacidad de Retención de Aceite (CRAC)

(Cuadro 31 en Anexo 6)

7 CONCLUSIONES

- El método de extracción de precipitación isoelectrica es adecuado para la obtención de un alto rendimiento con un contenido de proteínas aceptable, sin embargo, es necesario realizar un desgrasado previo a la extracción para disminuir el contenido de grasa de los aislados.
- Para llevar a cabo la acilación de aislados de proteína de amaranto con ácido láurico una proporción proteína:cloruro de ácido láurico 1:2 p:v es suficiente para obtener un alto grado de modificación.
- El proceso de secado de los aislados modificados físicamente tiene un efecto sobre la acidez y la higroscopicidad de los aislados de proteína de amaranto, mientras que la modificación química de aislados de proteína de amaranto produjo una disminución de la acidez y del pH de los aislados de proteína de amaranto y un aumento de la higroscopicidad, el color de los aislados se vio afectado por el método de secado utilizado y todos los aislados que fueron liofilizados en algún momento de su proceso presentan colores más claros.
- El aislado de proteína de amaranto secado en estufa (SE) presentó una mejor fluidez, mientras que el aislado de proteínas de amaranto congelado con nitrógeno líquido y liofilizado (NL) presentó la menor fluidez, lo que podría deberse a un colapso de la estructura de la muestra durante la liofilización.
- La modificación química de los aislados de proteína de amaranto alteró el comportamiento del potencial zeta, cuya tendencia normal en proteínas es la de aumentar conforme aumenta el pH; las micrografías obtenidas en microscopio electrónico de barrido mostraron que hay una modificación en la microestructura de la superficie de los aislados de proteína de amaranto modificados físicamente y químicamente; por otro lado, la muestra congelada con nitrógeno líquido, liofilizada y lipofilizada (NLyLpf) adsorbe una mayor cantidad de humedad en comparación con las muestras modificadas físicamente (SE, CL, NL).

- Las propiedades funcionales de las proteínas se ven afectadas por el método de secado de los aislados y por efectos del pH del medio en el que se utilizan, la solubilidad es mayor en pH básico y en la muestra secada en estufa y disminuyó considerablemente en las muestras modificadas químicamente, la mayor capacidad de hinchamiento se presentó en las proteínas congeladas con nitrógeno líquido y liofilizadas (NL), la capacidad emulsionante se vio afectada por efecto del pH y esta fue mayor a pH básico y neutro, la capacidad de formación de espuma y estabilidad de espuma se ve afectada por el tipo de secado de las muestras y fue mayor en el aislado congelado en congelador y liofilizado (CL), además se ve afectada por el pH del medio, el método de secado afectó la capacidad de retención de agua, mostrándose un aumento en todas las muestras que fueron congeladas con nitrógeno líquido y liofilizadas (NL), incluyendo las modificadas químicamente (NL, SEyLpf, CLyLpf, NLyLpf) y finalmente, la capacidad de retención de aceite aumentó con la modificación química (SEyLpf, CLyLpf, NLyLpf).

8 BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Domínguez L., H. Hernández-Sánchez, G. Gutiérrez-López, L. Alamilla-Beltrán and E. Azuara. 2016.** Modification of the soy protein isolate surface at nanometric scale and its effect on physicochemical properties. *Journal of Food Engineering* 168: 105-112.
- Aguilera J. M. 2005.** Why food microstructure? *Journal of Food Engineering*. 67: 3-11
- Allouni Z. E., M. R. Cimpan, P. J. Høi, T. Skodvin and N. R. Gjerdet. 2009.** Agglomeration and sedimentation of TiO₂ nanoparticles in cell culture medium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 68: 83–87.
- AOAC. 1990.** Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th edition. Washington, DC.
- Azuara E. and C. I. Beristain. 2006.** Enthalpic and entropic mechanisms related to water sorption of yogurt. *Drying Technology* 24: 1501–1507.
- Azuara-Nieto E. and C. I. Beristain-Guevara. 2007.** Thermodynamic and kinetic study of water adsorption on whey protein. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 6: 3593–65.
- Barba de la Rosa A., J. Gueguen, O. Paredes-Lopez and G. Viroben. 1992.** Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 931-936.
- Barber K. and J. Warthesen. 1982.** Some functional properties of acylated wheat gluten. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30: 930-934.

- Becker R., E. Wheeler, K. Lorenz, A. Stafford, O. Grosjean, A. Betschart and R. Saunders. 1981.** A compositional study of amaranth grain. *Journal of Food Science* 46: 1175-1180.
- Beristain C. I. y E. Azuara. 1990.** Estabilidad máxima en productos deshidratados. *Ciencia* 41: 229-236
- Berghofer E. and R. Schoenlechner. 2002.** Grain Amaranth. *In: Pseudocereals and less common cereals*, Belton P. and J. Taylor (eds.). Ed. Springer. Berlin pp. 219-260.
- Bolontrade A., A. Scilingo and M. Añón. 2016.** Amaranth proteins foaming properties: Film rheology and foam stability – Part 2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 141: 643-650.
- Brunauer S., L.S. Deming, W. E. Deming and E. Teller. 1940.** On a theory of the Van der Waals adsorption of gases. *Journal of the American Chemical Society*. 62: 1723-1732.
- Cai Y., H. Corke, and H. Wu. 2004.** Amaranth. *In: Encyclopedia of Grain Science*, Wrigley C., H. Corke and C. Walker (eds.). Ed. Elsevier Academic Press. Australia pp. 1-10.
- Cao G. 2004.** Nanostructures and Nanomaterials. Ed. Imperial College Press. London. 433 p.
- Carson J. K. 2015.** Thermal conductivity measurement and prediction of particulate foods. *International Journal of Food Properties* 18: 2840–2849.
- Ceballos A. M., G. I. Giraldo, and C. E. Orrego. 2012.** Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp. *Journal of Food Engineering* 111: 360–365.

- Childs E. A. and K. K. Park. 1976.** Functional properties of acylated glandless cottonseed flour. *Journal of Food Science*. 41: 713-714.
- Clark A. and C. Lee-Tuffnell. 1986.** Gelation of globular proteins. *In: Functional Properties of Food Macromolecules*, Mitchell J. and D. Ledward (eds.). Ed. Elsevier. New York pp. 203-272.
- Cordero de los Santos M. Y., J. A. Osuna-Castro, A. Borodanenko and O. Paredes-López. 2005.** Physicochemical and functional characterisation of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellisation. *Food Science and Technology International* 11: 269–280.
- Creuzenet C., A. Touati, E. Dufour, Y. Choiset, J.M. Chobert and T. Haertlé. 1992.** Acylation and alkylation of bovine β -lactoglobulin in organic solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 184–190.
- Damodaran S. 2000.** Aminoácidos, péptidos y proteínas. *In: Química de los alimentos*. O. Fennema (ed.). Ed. Acribia. España pp. 383-511.
- Délano-Frier J. y N. Martínez-Gallardo. 2012.** El transcriptoma de *Amaranthus hypochondriacus* L.: una poderosa herramienta para profundizar en su conocimiento y aprovechamiento. *In: Amaranto: Ciencia y Tecnología*. E. Espitia Rangel (ed.). Ed. INIFAP/SINAREFI. México pp. 31-48.
- Espitia R.E., D. Escobedo L., C. Mapes S., M. de la O O., M. Aguilar D. y J. Hernández C. 2012.** Conservación de los recursos genéticos de amaranto (*Amaranthus spp.*) en México. *In: Amaranto: Ciencia y Tecnología*. E. Espitia Rangel (ed.). Ed. INIFAP/SINAREFI. México pp. 147-163.
- Feeney R. and J. Whitaker. 2016.** Chemical and enzymatic modification of plant proteins. *In: New Protein Foods, Volume 5: Seed Storage Proteins*. A. Altschul and H. Wilcke (eds.). Ed. Academic Press, Inc. EUA pp. 181-219.

- Fidantsi A. and G. Doxastakis. 2001.** Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 21: 119–124.
- Franzen K. and J. Kinsella. 1976.** Functional properties of succinylated and acetylated soy protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24: 788-795.
- Gabas A. L., V. R. N. Telis, P. J. A. Sobral and J. Telis-Romero. 2007.** Effect of Maltodextrin and Arabic Gum in Water Vapor Sorption Thermodynamic Properties of Vacuum Dried Pineapple Pulp Powder 82: 246–252.
- Gómez-Ordóñez E., A. Jiménez-Escrig and P. Rupérez. 2010.** Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. *Food Research International*, 43: 2289-2294.
- Gueguen J. 1983.** Legume seed protein extraction, processing, and end product characteristics. *Qualitas Plantarum-Plant Foods Human Nutrition* 32: 267–303.
- Haque Z. and M. Kito. 1982.** Lipophilization of soybean glycinin: Covalent attachment to long chain fatty acids. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46: 597-599.
- Haque Z. and M. Kito. 1983.** Lipophilization of alpha.s1-casein. 1. Covalent attachment of palmitoyl residue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31: 1225-1230.
- Haque Z., T. Matoba and M. Kito. 1982.** Incorporation of fatty acid into food protein: palmitoyl soybean glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30: 481-486.

- Hottot A., S. Vessot and J. Andrieu. 2004.** A direct characterization method of the ice morphology. Relationship between mean crystals size and primary drying times of freeze-drying processes. *Drying Technology* 22: 2009–2021.
- Huerta O. J. and A. Barba de la Rosa. 2012.** Caracterización bioquímica y estructural de las proteínas de reserva de amaranto. *In Amaranto: Ciencia y Tecnología*. E. Espitia Rangel (ed.). Ed. INIFAP/SINAREFI. México pp. 293-302.
- Iglesias H. A. and J. Chirife. 1982.** Handbook of food isotherms. Academic Press. New York.
- Islam M. Z., Y. Kitamura, M. Kokawa, K. Monalisa, F. Hsuan Tsai and S. Miyamura. 2017.** Effects of micro wet milling and vacuum spray drying on the physicochemical and antioxidant properties of orange (*Citrus Unshiu*) Juice with Pulp Powder. *Food and Bioproducts Processing* 101: 132–144.
- Johnson E. A. and C. J. Brekke. 1983.** Functional properties of acylated pea protein isolates. *Journal of Food Science* 48: 722–725.
- Juan R., J. Pastor, M. Alaiz, C. Megías y J. Vioque. 2007.** Caracterización proteica de las semillas de once especies de amaranto. *Grasas Y Aceites*, 58: 49-55.
- Kauffman S. and E. Weber. 1990.** Grain amaranth. *In: Advances in new crops*. J. Janick and J. Simon (eds.). Ed. Timber Press. Portland, OR. pp. 127-139.
- Kinsella J. and N. Melachouris. 1976.** Functional properties of proteins in foods: A survey. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 7: 219-280.
- Kinsella J., S. Damodaran and B. German. 1985.** Physicochemical and functional properties of oilseed proteins with emphasis on soy proteins. *In: New Protein Foods. Volume 5: Seed Storage Proteins*. A. Altschul and H. Wilcke (eds.). Ed. Academic Press, Inc. Washington, D. C. pp. 107-179.

- Konstance R. P., C. I. Onwulata and V. H. Holsinger. 1995.** Flow properties of spray-dried encapsulated butteroil. *Journal of Food Science*, 60: 841–844.
- Lakkis J. and R. Villota. 1992.** Effect of acylation on substructural properties of proteins: a study using fluorescence and circular dichroism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 553-560.
- Lamus U. M. y D. Barrera-Arellano. 2005.** Efecto de la lipofilización sobre las propiedades funcionales de la harina de palmiste (*Elaeis guineensis*). *Grasas Y Aceites*, 56: 1-8.
- Leyva-Lopez N., N. Vasco, A. Barba de la Rosa and O. Paredes-Lopez. 1995.** Amaranth seed proteins: Effect of defatting on extraction yield and on electrophoretic patterns. *Plant Foods for Human Nutrition* 47: 49-53.
- Lewicki P. P. 1997.** The applicability of the GAB model to food water sorption isotherms. *International Journal of Food Science and Technology* 32: 553–557.
- Lin M. J. Y., E. S. Hummbert and F. W. Sosulski. 1974.** Certain functional properties of sunflower meal products. *Journal of Food Science* 39: 368-370.
- Lomauro C. J., A. S. Bakshi and T. P. Labuza. 1985.** Evaluation of food moisture sorption isotherm equations. Part I: Fruit, vegetable and meat products. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 18: 111–117.
- Lowell S. and J. E. Shields. 1984.** Powdersurface area and porosity. *Powder Technology Series*. Chapman and Hall Ltd. London. 234 p.
- Malhotra A. and J. N. Coupland. 2004.** The effect of surfactants on the solubility, zeta potential, and viscosity of soy protein isolates. *Food Hydrocolloids* 18: 101–108.

- Martínez E. N. and M. C. Añón. 1996.** Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 2523-2530.
- Matemu A., H. Kayahara, H. Murasawa, S. Katayama and S. Nakamura. 2011.** Improved emulsifying properties of soy proteins by acylation with saturated fatty acids. *Food Chemistry* 124: 596-602.
- McMinn W. A. M., A. H. Al-Muhtaseb and T. R. A. Magee. 2004.** Moisture sorption characteristics of starch gels. Part II: Thermodynamic properties. *Journal of Food Process Engineering* 27: 213–227.
- McWatters K. and J. Cherry. 1981.** Emulsification: vegetable proteins. *In: Protein functionality in foods.* J. Cherry (ed.). Ed. American Chemical Society. Washington, D. C. pp. 217-242.
- Montúfar L. A. 2012.** Amaranto (*Amaranthus spp.*), planta ritual mesoamericana. *In: Amaranto: Ciencia y Tecnología.* E. Espitia Rangel (ed.). Ed. INIFAP/SINAREFI. México pp. 1-13.
- Morán-Bañuelos S., Cortés L. E., Espitia R. E. and D. Sangerman-Jarquín. 2012.** Tzoalli, de cuerpo de dioses a alegría de mortales. *In: Amaranto: Ciencia y Tecnología.* E. Espitia Rangel (ed.). Ed. INIFAP/SINAREFI. México pp. 15-27.
- National Academy of Science. 1984.** Amaranth: modern prospects for an ancient crop. Ed. National Academy Press. Washington, DC. 80 p.
- Nunes R. V. and E. Rotstein. 1991.** Thermodynamics of the water-foodstuff equilibrium. *Drying technology: An International Journal.* 9: 113-137.
- O'Brien F. J., B. A. Harley, I. V. Yannas and L. Gibson. 2004.** Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* 25: 1077–1086.

- Omamt E., P. Hammes and P. Robbertse. 2006.** Differences in salinity tolerance for growth and water-use efficiency in some amaranth (*Amaranthus spp.*) genotypes. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 34: 11-22.
- Osborne T. B. 1924.** The vegetable proteins. *Monographs on Biochemistry*. London: Longmans Green and Co. *Journal of the Society of Chemical Industry* 43: 17.
- Paredes-López O. and D. Hernández-López. 1992.** Food properties of amaranth seeds and methods for starch isolation and characterization. *In: Seed Analysis*. H. Linskens and J. Jackson (eds.). Ed. Springer-Verlag. Berlin pp. 217-239.
- Pascual-Pineda L. A., E. Flores-Andrade, L. Alamilla-Beltrán, J. J. Chanona-Pérez, C. I. Beristain, G. F. Gutiérrez-López and E. Azuara. 2014.** Micropores and their relationship with carotenoids stability: A new tool to study preservation of solid foods. *Food and Bioprocess Technology* 7: 1160–1170.
- Pascual-Pineda L. A., L. Alamilla-Beltrán, G. F. Gutiérrez-López, E. Azuara y E. Flores-Andrade. 2017.** Predicción de condiciones de almacenamiento de alimentos deshidratados a partir de una isoterma de adsorción de vapor de agua. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 16: 207-220
- Pathare P. B., U. Linus O. and F. Al Julanda A. 2012.** Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology* 6: 36–60.
- Peleg M., C. H. Manheim and N. Passy. 1973.** Flow properties of some food powders. *Journal of Food Science*. 38: 959-964
- Pérez-Alonso C., C.I. Beristain, C. Lobato-Calleros, M.E. Rodríguez-Huezo and E.J. Vernon-Carter. 2006.** Thermodynamic analysis of the sorption isotherms

of pure and blended carbohydrate polymers. *Journal of Food Engineering* 77: 753–760.

Phillips L., Z. Haque and J. Kinsella. 1987. A method for the measurement of foam formation and stability. *Journal of Food Science* 52: 1074-1077.

Phillips L. G., D. M. Whitehead and J. Kinsella. 1994. Structure-function properties of food proteins. Ed. Academic Press Inc. San Diego, CA. 271 p.

Pour-Ei A. 1981. Protein Functionality: Classification, Definition, and Methodology. *In: Protein functionality in foods.* J. Cherry (ed.). Ed. American Chemical Society. Washington, D. C. pp. 1-19.

Rahma E. and M. Rao. 1983. Effect of acetylation and succinylation of cottonseed flour on its functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31: 352-355.

Rahman M. S. and T. P. Labuza. 1999. Water activity and food preservation. *In: Handbook of Food Preservation.* M. S. Rahman (ed.) Ed. Marcel Dekker. Ne York. Pp. 339-382.

Reyna T. T. 1988. Investigaciones recientes sobre amaranto. Instituto de Geografía, Ed. UNAM. México, D.F.

Richardson T. and J. Kester. 1984. Chemical modifications that affect nutritional and functional properties of proteins. *Journal of Chemical Education* 61: 325-331.

Roussel-Philippe C., M. Pina and J. Graille. 2000. Chemical lipophilization of soy protein isolates and wheat gluten. *European Journal of Lipid Science and Technology* 102: 97-101.

- Salgin S., U. Salgin and S. Bahadir. 2012.** Zeta potentials and isoelectric points of biomolecules: The effects of ion types and ionic strengths. *International Journal of Electrochemical Science* 7: 12404–12414.
- Sauer J. 1967.** The grain amaranths and their relatives: A revised taxonomic and geographic survey. *Annals of The Missouri Botanical Garden* 54: 103-137.
- Schoenlechner R., J. Drausinger, V. Ottenschlaeger, K. Jurackova and E. Berghofer. 2010.** Functional properties of gluten-free pasta produced from amaranth, quinoa and buckwheat. *Plant Foods For Human Nutrition* 65: 339-349.
- Shah D., Y. Shah, and R. Pradhan. 1997.** Development and evaluation of controlled-release diltiazem HCl microparticles using cross-linked poly (vinyl alcohol) 23: 567–574.
- Shah R. B., M. A. Tawakkul, and M. A. Khan. 2008.** Comparative evaluation of flow for pharmaceutical powders and granules. *AAPS PharmSciTech* 9: 250–258.
- Shen J. L. 1981.** Solubility and viscosity. *In: Protein functionality in foods.* J. Cherry (ed.). Ed. American Chemical Society. Washington, DC. pp. 89-109
- Shukla S., A. Bhargava, A. Chatterjee, J. Srivastava, N. Singh and S. Singh. 2006.** Mineral profile and variability in vegetable amaranth (*Amaranthus tricolor*). *Plant Foods for Human Nutrition* 61: 21-26.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2016.** Atlas agroalimentario 2016. México. 321 p.
- Silva-Sánchez C., J. González-Castañeda, A. de León-Rodríguez and A. de la Rosa. 2004.** Functional and rheological properties of amaranth albumins extracted from two Mexican varieties. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59: 169-174.

- Sumner A. K., M. A. Nielsen and C. G. Youngs. 1981.** Production and evaluation of pea protein isolate. *Journal of Food Science* 46: 364–366.
- Sweat V. E. 1995.** Thermal properties of foods In: *Engineering Properties of Foods*. M.A. Rao and S. S. H. Rizvi (eds.) Ed. Marcel Dekker, Inc. EUA. pp:99-138.
- Toontom N., M. Meenune, W. Posri and S. Lertsiri. 2012.** Effect of drying method on physical and chemical quality, hotness and volatile flavour characteristics of dried chilli. *International Food Research Journal* 19: 1023–1031.
- Tsami E., M.K. Krokida and A.E. Drouzas. 1999.** Effect of drying method on the sorption characteristics of model fruit powders. *Journal of Food Engineering* 38: 381–392.
- Tsourouflis S., J. M. Flink and M. Karel. 1976.** Loss of structure in freeze-dried carbohydrates solutions: effect of temperature, moisture content and composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 27: 509–519.
- Wallapapan K. and V. E. Sweat. 1982.** Thermal conductivity of defatted soy flour. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 614: 1440–1444.
- Walstra P. 2000.** Sistemas dispersos: consideraciones básicas. *In: Química de los alimentos*. O. Fennema (ed.). Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 110-185.
- Wani I., D. Sogi, A. Wani and B. Gill. 2013.** Physico-chemical and functional properties of flours from Indian kidney bean (*Phaseolus vulgaris L.*) cultivars. *LWT-Food Science and Technology* 53: 278-284.
- Wang Z. 2009.** Schotten-Baumann reaction. *In: Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*. Ed. John Wiley and Sons Inc. Hoboken, N.J. pp. 2535-2539

Wexler A. 1976. Vapor pressure formulation for water in range 0 to 100 °C. Journal of Research of the National Bureau of Standards. Physics and Chemistry 80: 775-785.

Yasumatsu K., K. Sawada, S. Moritaka, M. Misaki, J. Toda, T. Wada and K. Ishii. 1972. Whipping and emulsifying properties of soybean products. Agricultural and Biological Chemistry 36: 719-727.

Zayas J. 1997. Functionality of proteins in food. Ed. Springer. New York. 373 p.

9 ANEXOS

9.1 Anexo 1. Curva de calibración de albúmina de suero bovino.

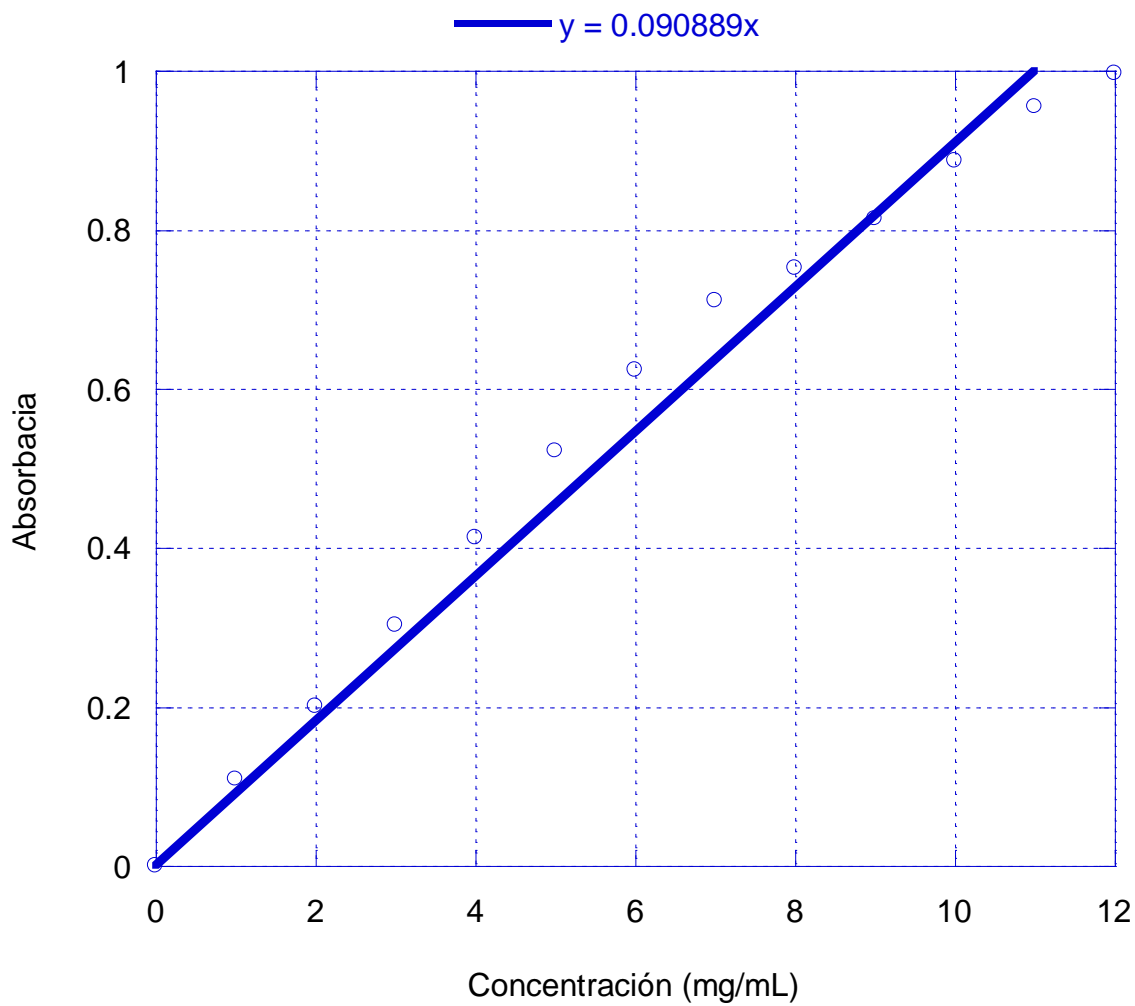
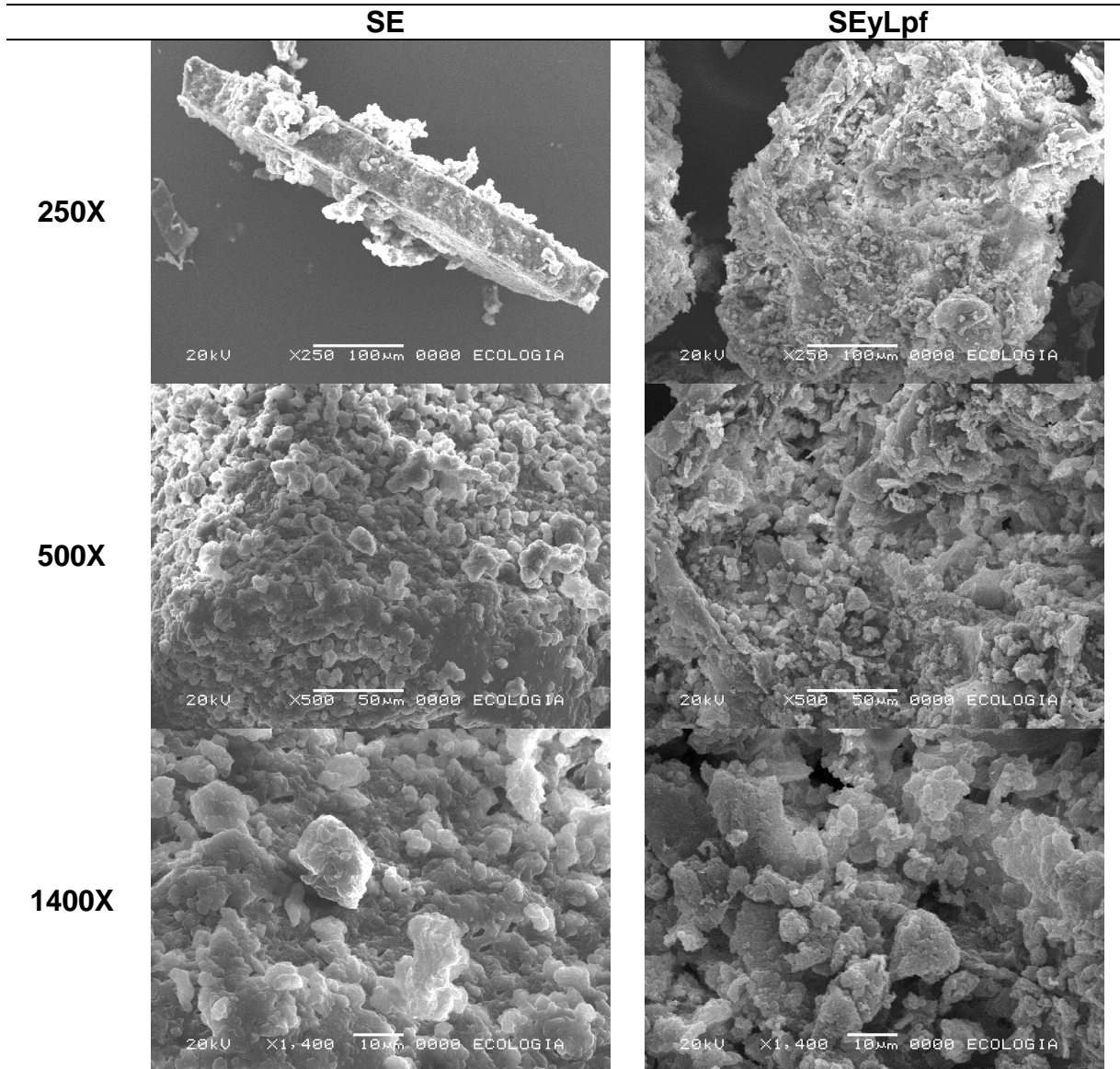


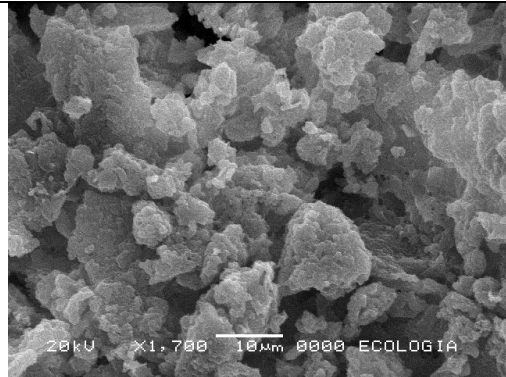
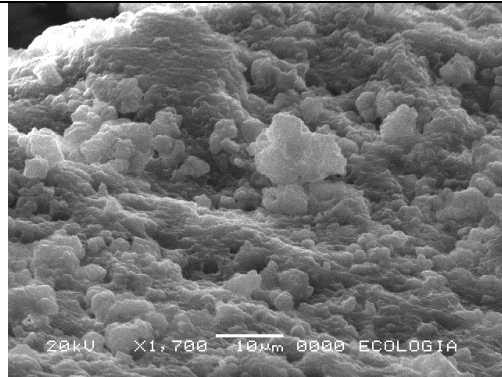
Figura 18. Curva de Calibración albúmina de suero bovino

9.2 Anexo 2. Imágenes microscopio electrónico de barrido.

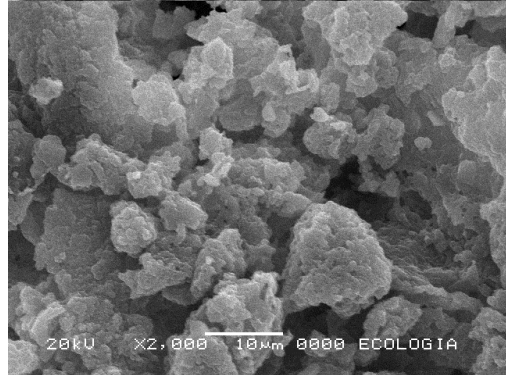
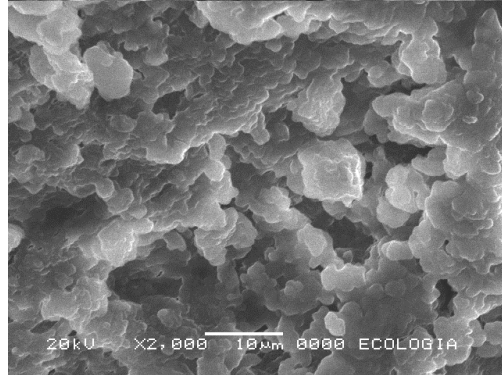
Cuadro 21. Imágenes obtenidas en microscopio electrónico de barrido de la muestra SE y SEyLpf a diferentes aumentos.



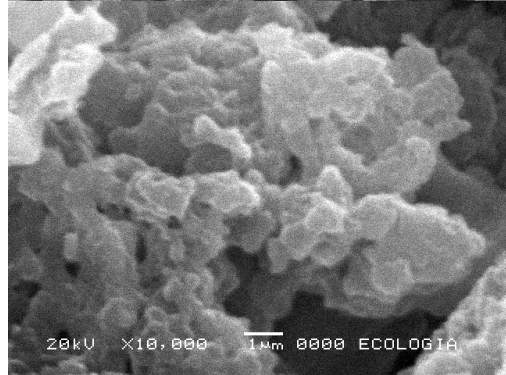
1700X



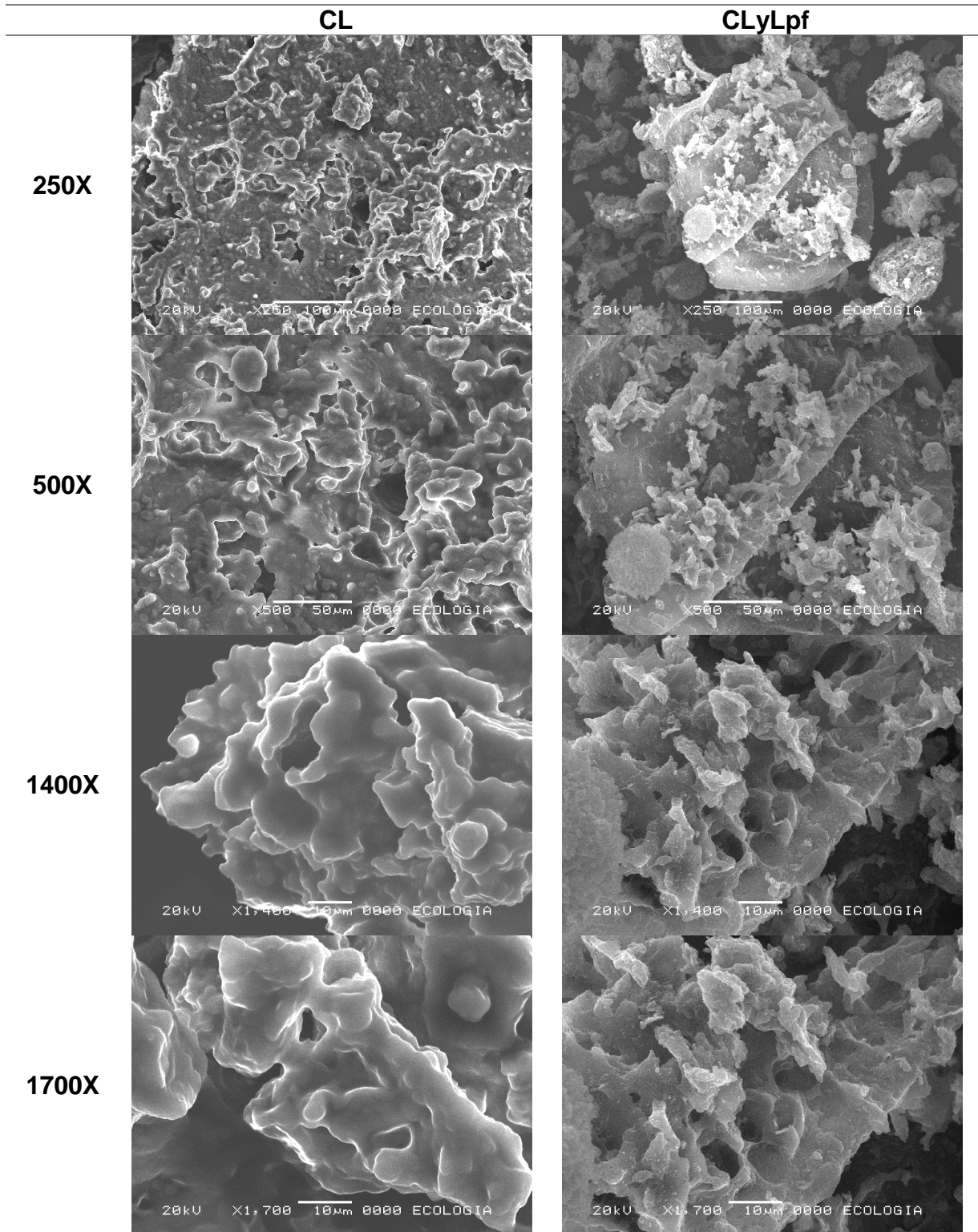
2000X



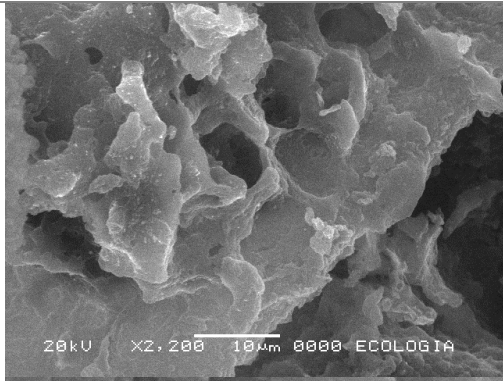
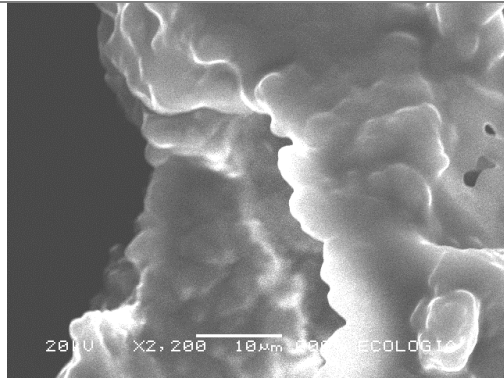
10000X



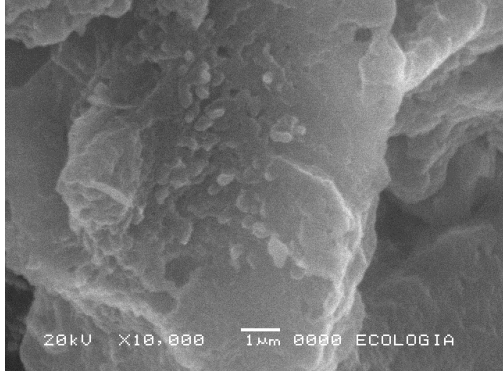
Cuadro 22. Imágenes obtenidas en microscopio electrónico de barrido de la muestra CL y CLyLpf a diferentes aumentos.



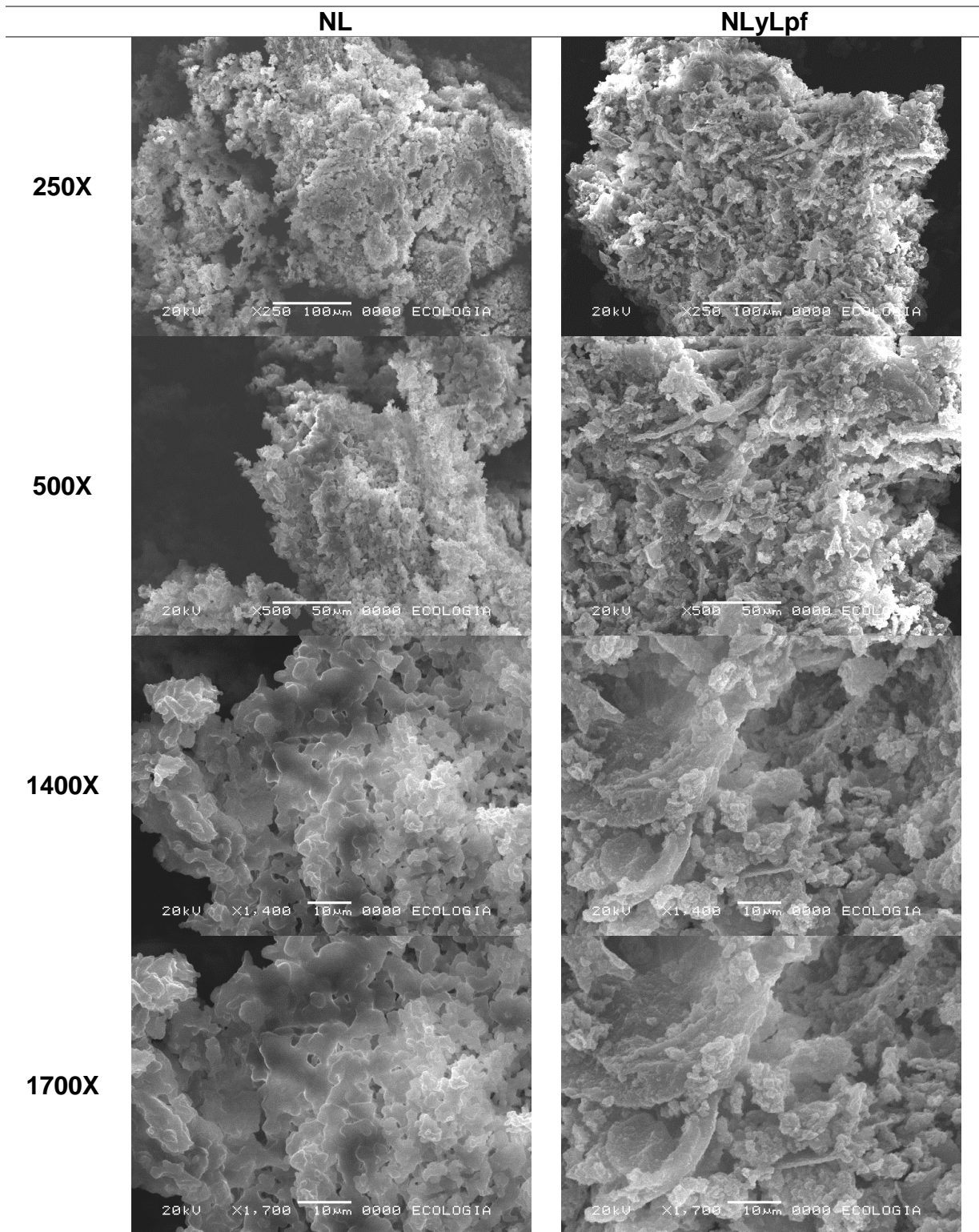
2200X



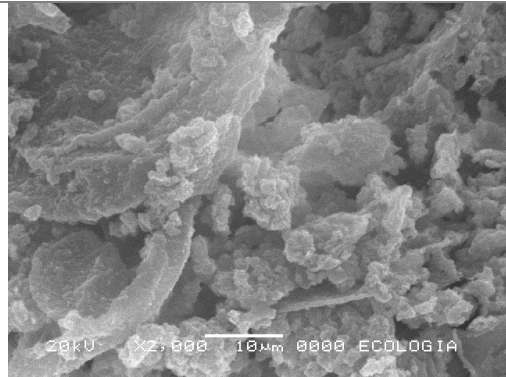
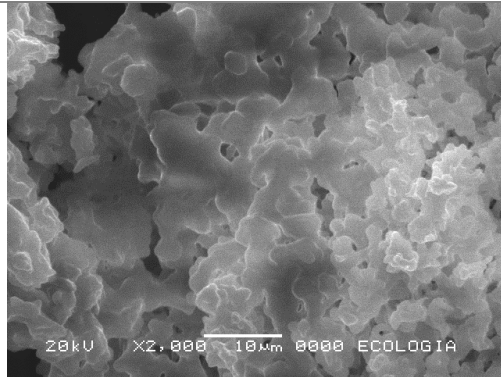
10000X



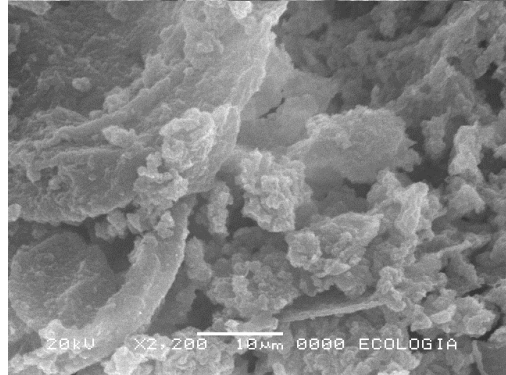
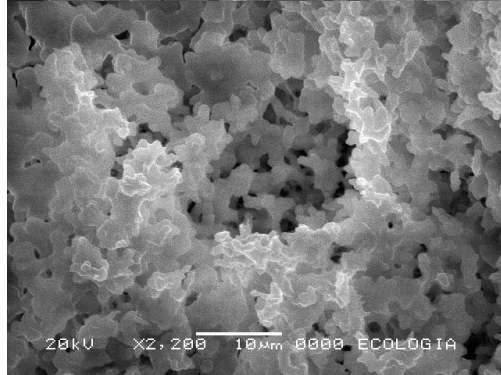
Cuadro 23. Imágenes obtenidas en microscopio electrónico de barrido de la muestra NL y NLyLpf a diferentes aumentos.



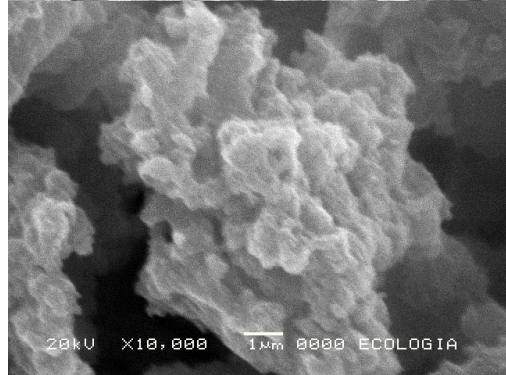
2000X



2200X



10000X



9.3 Anexo 3. Tamaño de Partícula, PDI y Potencial z

Cuadro 24. Valores obtenidos de tamaño de partícula en Malvern Zetasizer Nano

Muestra	pH	Tamaño de partícula	Tamaño de partícula Lpf
SE	4	909.30 ± 186.64 ^{aA}	6506.33 ± 1221.56 ^{bB}
	7	1363.30 ± 395.22 ^{aA}	5048.00 ± 2681.40 ^{bAB}
	10	3785.00 ± 290.13 ^{aA}	4813.33 ± 1251.75 ^{bA}
CL	4	1449.33 ± 181.48 ^{aA}	6228.33 ± 4992.49 ^{abB}
	7	3130.33 ± 550.92 ^{aA}	2080.00 ± 280.74 ^{abAB}
	10	2832.00 ± 1002.32 ^{aA}	755.77 ± 49.97 ^{abA}
NL	4	4927.67 ± 748.58 ^{aA}	3220.00 ± 625.97 ^{aB}
	7	4140.33 ± 901.23 ^{aA}	3894.00 ± 918.10 ^{aAB}
	10	869.43 ± 31.61 ^{aA}	1356.63 ± 449.73 ^{aA}

Media ± desviación estándar

Letras minúsculas diferentes en las columnas indican diferencias significativas por efecto del método de secado ($p < 0.05$), letras mayúsculas diferentes en columnas indican diferencias significativas por efecto de pH ($p < 0.05$).

Cuadro 25. Valores obtenidos de índice de polidispersión (PDI) en Malvern Zetasizer Nano

Muestra	pH	PDI	PDI Lpf
SE	4	0.76±0.09 ^{aA}	0.29±0.26 ^{aA}
	7	0.92±0.14 ^{aA}	0.68±0.46 ^{aA}
	10	1.00±0.00 ^{aA}	0.89±0.20 ^{aA}
CL	4	0.94±0.05 ^{aA}	0.69±0.02 ^{abA}
	7	1.00±0.01 ^{aA}	1.00±0.00 ^{abA}
	10	0.98±0.04 ^{aA}	0.85±0.12 ^{abA}
NL	4	0.90±0.18 ^{aA}	1.00±0.00 ^{bA}
	7	0.89±0.19 ^{aA}	1.00±0.00 ^{bA}
	10	0.80±0.07 ^{aA}	0.88±0.11 ^{bA}

Media ± desviación estándar

Letras minúsculas diferentes en las columnas indican diferencias significativas por efecto del método de secado ($p < 0.05$), letras mayúsculas diferentes en columnas indican diferencias significativas por efecto de pH ($p < 0.05$).

Cuadro 26. Valores obtenidos de potencial z en Malvern Zetasizer Nano

Muestra	pH	Potencial z	Potencial z Lpf
SE	4	-15.20±0.10 ^{aB}	-16.50±1.80 ^{bB}
	7	-30.33±0.67 ^{aA}	-32.70±0.89 ^{bA}
	10	-31.67±0.25 ^{aA}	-28.47±1.70 ^{bA}
CL	4	-22.97±1.21 ^{aB}	-27.23±2.61 ^{aB}
	7	-28.33±0.45 ^{aA}	-32.60±0.78 ^{aA}
	10	-30.33±0.15 ^{aA}	-30.70±0.53 ^{aA}
NL	4	-17.25±2.75 ^{aB}	-25.40±3.50 ^{aB}
	7	-28.87±0.29 ^{aA}	-35.67±0.81 ^{aA}
	10	-31.67±2.08 ^{aA}	-34.30±2.15 ^{aA}

Media ± desviación estándar

Letras minúsculas diferentes en las columnas indican diferencias significativas por efecto del método de secado ($p < 0.05$), letras mayúsculas diferentes en columnas indican diferencias significativas por efecto de pH ($p < 0.05$).

9.4 Anexo 4. Isotermas de Sorción.

Cuadro 27. Datos obtenidos de las isotermas de adsorción a diferentes temperaturas para la muestra secada en estufa (SE)

SE					
25 °C		35 °C		45 °C	
A_w	M (g H ₂ O/100 g s.s.)	A_w	M (g H ₂ O/100 g s.s.)	A_w	M (g H ₂ O/100 g s.s.)
0.0000	0.000	0.0000	0.000	0.0000	0.000
0.0380	0.950	0.0396	0.660	0.0397	0.870
0.1406	2.410	0.1380	2.200	0.1418	2.120
0.2385	3.430	0.2393	3.060	0.2426	3.010
0.3382	4.330	0.3398	3.940	0.3390	3.930
0.4400	5.170	0.4420	4.850	0.4400	4.680
0.5400	6.090	0.5391	5.700	0.5386	5.700
0.6402	7.290	0.6405	7.030	0.6393	6.850
0.7401	9.430	0.7396	9.230	0.7385	9.210
0.8397	13.260	0.8420	13.430	0.8398	13.280
0.8504	13.720			0.8513	14.010

a_w = Actividad de agua, M= Humedad de equilibrio

Cuadro 28. Datos obtenidos de las isotermas de adsorción a diferentes temperaturas para la muestra congelada en ultra congelador y liofilizada (CL)

CL					
25 °C		35 °C		45 °C	
A_w	M (g H ₂ O/100 g s.s.)	A_w	M (g H ₂ O/100 g s.s.)	A_w	M (g H ₂ O/100 g s.s.)
0.0000	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.000
0.0392	1.190	0.0392	1.120	0.0394	1.070
0.1377	2.620	0.1411	2.480	0.1416	2.360
0.2409	3.830	0.2397	3.530	0.2406	3.310
0.3391	4.970	0.3384	4.550	0.3422	4.260
0.4393	6.080	0.4398	5.580	0.4411	5.350
0.5395	7.240	0.5401	6.640	0.5397	6.430
0.6414	8.390	0.6403	7.880	0.6391	7.570
0.7400	10.170	0.7395	9.530	0.7393	9.180
0.8392	13.190	0.8406	12.600	0.8383	12.550
0.8504	13.560	0.8506	13.100	0.8525	13.150

Cuadro 29. Datos obtenidos de las isotermas de adsorción a diferentes temperaturas para la muestra congelada en nitrógeno líquido y liofilizada (NL)

NL					
25 °C		35 °C		45 °C	
A_w	M (g H ₂ O/100 g s.s.)	A_w	M (g H ₂ O/100 g s.s.)	A_w	M (g H ₂ O/100 g s.s.)
0.0000	0.000	0.0000	0.000	0.0000	0.000
0.0408	0.7600	0.0384	0.530	0.0395	0.520
0.1374	1.9400	0.1381	1.780	0.1406	1.710
0.2394	2.9400	0.2422	2.860	0.2364	2.430
0.3394	4.0800	0.3366	3.720	0.3424	3.300
0.4393	4.9600	0.4420	4.600	0.4408	4.200
0.5397	6.000	0.5414	5.700	0.5391	5.310
0.6389	7.1700	0.6400	6.990	0.6417	6.570
0.7401	9.2200	0.7406	8.910	0.7400	7.740
0.8399	12.640	0.8426	12.250	0.8404	10.790
0.8503	13.110			0.8498	11.280

a_w = Actividad de agua, M= Humedad de equilibrio

9.5 Anexo 5. Análisis de imagen

Cuadro 30. Parámetros de textura obtenidos de micrografías de MEB de aislados de proteína de amaranto

	SE	CL	NL
Energía (x10⁻⁴)	7.36 ± 0.00 ^b	20.00 ± 0.00 ^c	5.85 ± 0.00 ^a
Energía Lpf (x10⁻⁴)	4.86 ± 0.00 ^a	6.35 ± 0.00 ^a	5.69 ± 0.00 ^a
Contraste	465.56 ± 26.81 ^b	233.64 ± 28.88 ^a	540.59 ± 104.56 ^b
Contraste Lpf	565.65 ± 69.76 ^a	490.31 ± 203.13 ^a	644.79 ± 12.68 ^a
Homogeneidad (x10⁻²)	9.57 ± 0.00 ^a	16.73 ± 0.01 ^b	9.8 ± 0.01 ^a
Homogeneidad Lpf (x10⁻²)	8.4 ± 0.01 ^a	9.97 ± 0.01 ^{ab}	11.57 ± 0.01 ^b
Entropía	7.46 ± 0.06 ^b	6.48 ± 0.10 ^a	7.66 ± 0.05 ^a
Entropía Lpf	7.82 ± 0.07 ^a	7.63 ± 0.26 ^a	7.68 ± 0.01 ^a
Dimensión Fractal	2.62 ± 0.00 ^b	2.44 ± 0.04 ^a	2.62 ± 0.04 ^b
Dimensión Fractal Lpf	2.63 ± 0.00 ^a	2.59 ± 0.03 ^a	2.61 ± 0.03 ^a

Media ± desviación estándar

Letras diferentes en cada fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

9.6 Anexo 6. Datos CRA y CRAc

Cuadro 31. Capacidad de Retención de Agua (CRA) y Capacidad de Retención de Aceite (CRAc)

	CRA (g/g s.s.)	CRA (g/g s.s.) muestras lipofilizadas	CRAc (g/g s.s.)	CRAc (g/g s.s.) muestras lipofilizadas
SE	1.19 ± 0.08 ^a	3.12 ± 0.00 ^b	1.06 ± 0.11 ^a	5.56 ± 0.02 ^c
CL	1.56 ± 0.22 ^b	2.50 ± 0.05 ^a	2.34 ± 0.16 ^b	5.38 ± 0.01 ^b
NL	2.76 ± 0.07 ^c	2.93 ± 0.18 ^b	4.35 ± 0.15 ^c	5.22 ± 0.00 ^a

Media ± desviación estándar

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

9.7 Anexo 7. Correlaciones de propiedades fisicoquímicas

Cuadro 32. Tabla de Correlaciones entre propiedades fisicoquímicas de aislados de proteína de amaranto modificados físicamente

	H	a _w	ρA	ρC	IH	%C	AR	ρP	Porosidad	CT	Hgp	°Ap
H	1.0000											
a_w	0.9971	1.0000										
ρA	0.9458	0.9574	1.0000									
ρC	0.9619	0.9673	0.9924	1.0000								
IH	-0.5198	-0.5583	-0.7501	-0.6827	1.0000							
%C	-0.5517	-0.5893	-0.7707	-0.6998	0.9955	1.0000						
AR	-0.4976	-0.5106	-0.6272	-0.5676	0.6969	0.7214	1.0000					
ρP	-0.4561	-0.4315	-0.2618	-0.2706	-0.0361	0.0084	-0.0197	1.0000				
Porosidad	-0.9848	-0.9892	-0.9496	-0.9502	0.5842	0.6191	0.5284	0.5189	1.0000			
CT	0.9429	0.9502	0.9929	0.9883	-0.7231	-0.7484	-0.6315	-0.2288	-0.9348	1.0000		
Hgp	-0.6541	-0.6336	-0.3926	-0.4253	-0.1637	-0.1060	0.0448	0.7043	0.6279	-0.3980	1.0000	
°Ap	-0.6627	-0.6848	-0.8317	-0.8194	0.7884	0.7710	0.5876	-0.0587	0.6797	-0.7980	-0.0847	1.0000

H= Humedad, a_w= Actividad de agua, ρA= Densidad aparente, ρC= Densidad Compactada, IH= Índice de Hausner, %C=Porcentaje de compresibilidad, AR= Ángulo de Reposo, ρP= Densidad de partícula, CT= Conductividad térmica, Hgp=Higroscopicidad, °Ap= Grado de apelmazamiento

Cuadro 33. Tabla de Correlaciones entre propiedades fisicoquímicas de aislados de proteína de amaranto modificados químicamente

	H Lpf	a _w Lpf	ρA Lpf	ρC Lpf	IH Lpf	%C Lpf	AR Lpf	ρP Lpf	Porosidad Lpf	CT Lpf	Hgp Lpf	°Ap Lpf
H Lpf	1.0000											
aw Lpf	0.9072	1.0000										
ρA Lpf	0.6433	0.7760	1.0000									
ρC Lpf	0.5534	0.7252	0.9390	1.0000								
IH Lpf	-0.2140	-0.0884	-0.0933	0.2544	1.0000							
%C Lpf	-0.2507	-0.1267	-0.1317	0.2169	0.9988	1.0000						
AR Lpf	-0.3576	-0.0958	0.3428	0.4313	0.2688	0.2772	1.0000					
ρP Lpf	-0.6001	-0.4941	-0.0032	0.0095	0.0548	0.0580	0.4100	1.0000				
Porosidad Lpf	-0.7320	-0.7839	-0.4868	-0.5194	-0.1154	-0.0977	0.0150	0.8213	1.0000			
CT Lpf	0.1406	-0.0446	-0.5291	-0.5779	-0.1776	-0.1637	-0.6055	-0.4844	-0.0599	1.0000		
Hgp Lpf	-0.0756	0.0304	-0.3249	-0.1342	0.5051	0.5250	0.1229	-0.3550	-0.3619	0.3929	1.0000	
°Ap Lpf	-0.3881	-0.1088	0.4083	0.5038	0.3178	0.3170	0.8602	0.6762	0.2035	-0.6990	-0.0230	1.0000

Lpf= Lipofilizada, H= Humedad, a_w= Actividad de agua, ρA= Densidad aparente, ρC= Densidad Compactada, IH= Índice de Hausner, %C=Porcentaje de compresibilidad, AR= Ángulo de Reposo, ρP= Densidad de partícula, CT= Conductividad térmica, Hgp=Higroscopicidad, °Ap= Grado de apelmazamiento

Cuadro 34. Tabla de correlaciones entre propiedades funcionales de aislados de proteína de amaranto modificados físicamente

	IS	AE	EE	CEs	EEs	CHi
IS	1.0000					
AE	-0.3203	1.0000				
EE	0.3072	-0.1948	1.0000			
CEs	0.4026	-0.2714	0.4228	1.0000		
EEs	0.0791	-0.2531	0.1111	0.7775	1.0000	
CHi	-0.2000	-0.0095	0.4276	0.2080	0.0943	1.0000

IS= Índice de solubilidad, AE= Actividad emulsionante, EE= Estabilidad de la emulsión, CEs= Capacidad de formación de espuma, EEs= Estabilidad de espuma, CHi= Capacidad de hinchamiento.

Cuadro 35. Tabla de correlaciones entre propiedades funcionales de aislados de proteína de amaranto modificados químicamente

	IS	AE	EE	CEs	EEs	CHi
IS	1.0000					
AE	0.1436	1.0000				
EE	-0.0127	0.7547	1.0000			
CEs	-0.3911	0.2718	0.3995	1.0000		
EEs	-0.5273	0.3310	0.3345	0.8437	1.0000	
CHi	0.1547	-0.1120	-0.0789	-0.2157	-0.2701	1.0000

IS= Índice de solubilidad, AE= Actividad emulsionante, EE= Estabilidad de la emulsión, CEs= Capacidad de formación de espuma, EEs= Estabilidad de espuma, CHi= Capacidad de hinchamiento.