



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**EFFECTO DEL ULTRASONIDO DE ALTA INTENSIDAD SOBRE
LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, ESTRUCTURALES Y
SUPERFICIALES DE PROTEÍNA DE HABA (*Vicia faba* L.)**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

M.C. ALEJANDRO MARTÍNEZ VELASCO

CoDirección

Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter

Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros

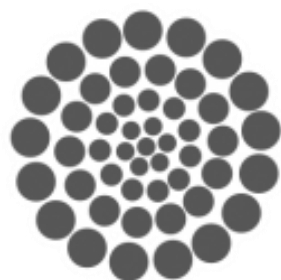
Asesor

Dra. Angélica Román Guerrero

CBS

México, CDMX

Noviembre/2018



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT con nivel de competencia internacional, referencia 001466.

Ciudad de México, México a 30 de Noviembre de 2018

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad
Iztapalapa aprobó la tesis

**EFFECTO DEL ULTRASONIDO DE ALTA INTENSIDAD SOBRE LAS
PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, ESTRUCTURALES Y SUPERFICIALES
DE PROTEÍNA DE HABA (*Vicia faba* L.)**

Que presentó

Alejandro Martínez Velasco

Comité tutorial

CoDirector: Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter
Universidad Autónoma Metropolitana



CoDirectora: Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros
Universidad Autónoma Chapingo



Asesor: Dra. Angélica Román Guerrero
Universidad Autónoma Metropolitana



Comité de evaluación:

Presidente: Dra. Angélica Román Guerrero
Universidad Autónoma Metropolitana



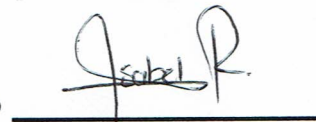
Secretario: Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez
Universidad Autónoma Chapingo



Vocal: Dra. Nancy Alonso Carrillo
Instituto Politécnico Nacional-CIIDIR Oaxaca



Vocal: Dra. María Isabel Reyes Arreozola
Universidad Autónoma del Estado de México



Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el financiamiento de este trabajo a través del proyecto 236500, así como por el apoyo económico otorgado mediante la beca-nacional para la realización de los estudios de doctorado.

Al **Dr. E. Jaime Vernon Carter**, por la gran oportunidad de trabajar bajo su dirección, por sus sabios y oportunos consejos, pero sobretodo por su confianza, respaldo y paciencia.

A la **Dra. Consuelo Lobato Calleros** por la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, de trabajar con usted, y por su confianza, muchas gracias por todo su apoyo.

A la **Dra. Angélica Román Guerrero** por sus excelentes aportaciones a este trabajo, la oportuna asesoría, aun estando muy ocupada, y por supuesto por su amistad.

A los **miembros del jurado**, Dra. Angélica Román Guerrero, Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez, Dra. Nancy Alonso Carrillo y Dra. María Isabel Reyes Arreozola por su tiempo para la revisión final de la presente tesis.

A la **Universidad Autónoma Metropolitana** por la oportunidad de permitirme culminar mis estudios de doctorado en su *casa abierta al tiempo* en su posgrado de Biotecnología.

A la **Universidad Autónoma Chapingo**, mi *alma mater*, por permitirme utilizar sus instalaciones para realizar gran parte del trabajo experimental de la presente tesis.

A todas las personas que me apoyaron durante mis estudios de posgrado, en especial a mis compañeros del laboratorio de tecnología de alimentos de la UACH, del Lab. W107 (Daniel, César, Samuel, Isa) y R-003 de la UAMI (Elvia, Nancy).

Dedicatorias

A **Dios** por permitirme culminar una etapa más de mi vida y por la oportunidad de conocer a grandes personas y amigos.

A mi mamá Cristina, por darme la vida, por tu amor y ejemplo de vida, por ser mi mejor maestra.
Te quiero mucho.

A mis hermanos, Elizabeth, Bernardo, Maricruz y Luis Enrique, para siempre estar unidos y enfrentar cualquier problema como familia.

A todas las personas que me apoyaron y acompañaron durante este largo y complicado camino de estudios de doctorado, en especial al Dr. Eleazar, a mis compañeros del laboratorio de Tecnología de Alimentos de la UACH, Lab. W y R-003 de la UAM-I.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Propiedades superficiales de proteínas.....	3
2.2. Proteínas vegetales.....	4
2.3. Leguminosas.....	5
2.3.1. El haba (<i>Vicia faba</i> L.).....	6
2.4. Ultrasonido.....	7
2.4.1. Ultrasonido de baja intensidad.....	8
2.4.2. Ultrasonido de alta intensidad.....	8
2.5. Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FT-IR).....	10
2.6. Espumas alimentarias.....	11
2.6.1. Formación de espumas.....	12
2.6.2. Estabilidad de espumas.....	12
2.6.3. Morfología de las espumas.....	14
2.6.4. Reología de espumas.....	16
2.7. Efecto del ultrasonido de alta intensidad en la estabilización de espumas.....	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	20
5.1 Objetivo general.....	20

5.2. Objetivos particulares.....	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.1. Materiales.....	22
6.2. Obtención y caracterización del aislado de proteína de haba.....	22
6.2.1. Contenido de humedad.....	23
6.2.2. Determinación del contenido de proteína.....	23
6.2.3. Determinación de grasa.....	23
6.3. Tratamiento con ultrasonido.....	24
6.3.1. Dispersiones stock de proteína.....	24
6.3.2. Solubilidad.....	25
6.3.3. Tamaño de partícula.....	25
6.3.4. Potencial ζ	26
6.3.5. Tensión superficial.....	26
6.4. Optimización del ultrasonido de alta intensidad por metodología de superficie de respuesta.....	27
6.5. Características fisicoquímicas de APHN y APHOP.....	27
6.5.1. Viscosidad aparente.....	27
6.5.2. Digestibilidad relativa de proteína (DRP)	27
6.5.3. Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FT-IR).....	28
6.5.4. Dinámicas de tensión superficial.....	29
6.6. Evaluación de las propiedades espumantes de APHN y APHOP.....	29
6.7. Análisis estadístico.....	30
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
7.1. Composición química proximal del material experimental.....	32
7.2. Efecto de la sonicación sobre las propiedades fisicoquímicas de proteína de haba.....	32

7.2.1. Tamaño de partícula.....	32
7.2.2. Solubilidad.....	35
7.2.3. Tensión superficial.....	35
7.2.4. Potencial- ζ	36
7.3. Caracterización de la proteína obtenida con las condiciones optimizadas (APHOP).....	36
7.3.1. Análisis FT-IR.....	39
7.3.2. Dinámicas de adsorción en la interfase.....	42
7.3.3. Características espumantes.....	48
8. CONCLUSIONES.....	52
9. REFERENCIAS.....	53
10. ANEXO.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El espectro del sonido.	7
Figura 2. Esquema de la cavitación ultrasónica.	9
Figura 3. Proceso que indica la desestabilización de una espuma con el tiempo.	14
Figura 4. Ilustración generalizada de los componentes estructurales de una espuma líquida.	15
Figura 5. Efecto de la amplitud y el tiempo de ultrasonido sobre (a) tensión superficial y (b) tamaño de partícula del aislado de proteína de haba.	37
Figura 6. Espectro infrarrojo (FT-IR) en la región vibracional de las amidas (a) para los aislados de proteína nativa de haba (APHN) y optimizada (APHOP). La banda de la amida I y deconvolución espectral del APHN (b) y APHOP (c).	40
Figura 7. Comportamiento de la tensión superficial con el tiempo en la interfase aire-agua de los aislados de proteína nativa de haba (APHN) y optimizada (APHOP).	43
Figura 8. Dependencia de la presión superficial (π) contra la raíz cuadrada del tiempo ($\theta^{0.5}$) para los aislados de proteína nativa de haba (APHN) y optimizada (APHOP), adsorbidos en la interfase aire-agua.	45
Figura 9. Gráfico del $\ln(\pi_{1800} - \pi_{\theta})/(\pi_{1800} - \pi_0)$ contra el tiempo (θ) para los aislados de proteína nativa de haba (APHN) y optimizada (APHOP) adsorbidos. Las líneas sólidas describen la primer pendiente que representa el coeficiente de penetración (K_p) y la segunda pendiente el reordenamiento estructural (K_R), respectivamente.	47

Figura 10. (a) Capacidad espumante de espumas estabilizadas con aislados de proteína nativa de haba (APHN) y optimizada (APHOP). Barras verticales indican la desviación estándar. (b) Morfología de burbujas de aire preparadas con APHN y APHOP a los 0 min y después de 30 min. 49

Figura 11. (a) Variaciones en la altura total de la espuma (símbolos llenos) y altura del líquido de drenado (símbolos vacíos) para espumas estabilizadas con aislados de proteína nativa de haba (APHN) y optimizada (APHOP) durante 30 min. (b) Cambios en el esfuerzo cortante en función de la tasa de corte para las espumas estabilizadas con APHN y APHOP. 51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de las condiciones de ultrasonido sobre las propiedades físicas de la proteína de haba.	34
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los aislados de proteína nativa de haba (APHN) y optimizada (APHOP).	38
Tabla 3. Valores de pico determinados y contenido relativo de los componentes de la estructura secundaria de APHN y APHOP obtenidos de la deconvolución espectral de la banda de la amida I.	41
Tabla 4. Parámetros dinámicos de adsorción de APHN y APHOP en la interfase aire-agua (γ_s), incluyendo la velocidad aparente de difusión a la interfase (K_{diff}), la penetración molecular (K_P) y el reordenamiento estructural (K_R).	48

RESUMEN

Se utilizó una metodología de superficie de respuesta para establecer las condiciones de amplitud (72.67 %) y tiempo (17.29 min) de ultrasonido de alta intensidad (HIUS) que condujeron a un aislado de proteína de haba optimizada (APHOP) con menor tensión interfacial, potencial zeta y viscosidad, y mayor solubilidad que el aislado de proteína nativa de haba (APHN). APHOP presentó dinámicas de adsorción significativamente mayores en la interfase aire-agua, y produjeron espumas con diámetros de burbuja significativamente menores, mayor capacidad espumante, estabilidad y esfuerzo de cedencia, y menor drenado de líquido que APHN. Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) reveló que la estructura secundaria de APHOP fue diferente de APHN en términos de incremento en conformaciones- β (6.61% láminas- β , 19.6% giros- β , 0.8% láminas- β antiparalelas) y una disminución en agregados inter-moleculares (43.54%). El estudio multienzimático indicó que los cambios estructurales podrían haber inducido una disminución en la digestibilidad relativa de la proteína de APHOP respecto a APHN. Los resultados de este trabajo demostraron que la tecnología de HIUS mejora las propiedades superficiales y espumantes del aislado de proteína de haba, lo cual podría favorecer la revalorización de este cultivo.

Palabras clave: Proteína de haba, ultrasonido, propiedades interfaciales, capacidad espumante, digestibilidad, solubilidad.

ABSTRACT

Response surface methodology was used for establishing the amplitude (72.67%) and time (17.29 min) high intensity ultrasound (HIUS) conditions leading to an optimized faba bean protein isolate (OFPI) with lower interfacial tension, zeta potential and viscosity, and higher solubility than native faba bean protein isolate (NFPI). OFPI showed significantly higher adsorption dynamics at the air-water interface, and produced foam with significant smaller bubble diameter, higher overrun, stability and yield stress, and lower liquid drainage than NFPI. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) revealed that the secondary structure of OFPI differed from NFPI in terms of increases in β conformations (6.61% β -sheet, 19.6% β -turn, 0.8% anti-parallel β -sheet) and decreases in inter-molecular aggregates (43.54%). Multienzyme study pinpointed that the structural changes could have induced a decrease on the relative protein digestibility of OFPI respect that of NFPI. The results of this work demonstrate that HIUS technology improves the surface and foaming properties of faba bean protein isolate, which may favour the revalorisation of this crop.

Keywords: Faba bean protein, ultrasound, interfacial properties, foaming ability, digestibility, solubility.

1. INTRODUCCIÓN

El haba (*Vicia faba* L.) tiene un contenido de proteína sólo ligeramente por debajo de la soya y es la séptima leguminosa más importante en el mundo (Vioque *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2014). A pesar de ello, el haba se utiliza más como alimento para ganado que como alimento humano, por lo que sería de gran interés la revalorización de este cultivo basada en la producción de una proteína funcional para la industria alimentaria (Parmar *et al.*, 2017). Existen muy pocos estudios sobre las propiedades funcionales de la proteína nativa de haba. El secado por aspersion y la liofilización de la harina de proteína de haba influyeron en su solubilidad, emulsificación, retención de agua, viscosidad y propiedades de hidrólisis enzimática (Cepeda *et al.*, 1998). Espumas formadas a partir de concentrado de proteína de haba fueron más estables a pH 4.0 que a pH 2.0, 10.0 y 12.0, pero su capacidad espumante fue menor a pH 4.0 que a pH 12.0 y 2.0 (Arogundade *et al.*, 2006). La actividad emulsificante de los aislados de proteína nativa de haba fue comparable a la de los aislados de proteína de soya y lenteja, pero inferior a la del aislado de proteína de garbanzo (Karaca *et al.*, 2011). La aplicación de ultrasonido de alta intensidad (HIUS, por sus siglas en inglés) se ha estudiado cada vez más para modificar las propiedades de los biopolímeros (Arzeni *et al.*, 2012). La funcionalidad de las proteínas, tales como solubilidad, gelificación, emulsificación y espumado se han mejorado con HIUS (Hu *et al.*, 2013; Morales *et al.*, 2015; O'Sullivan *et al.*, 2016; Xiong *et al.*, 2016), posiblemente debido a la cavitación, calentamiento, agitación, esfuerzo cortante y turbulencia, los cuales inducen cambios físicos y químicos en las moléculas (Güzey *et al.*, 2006). Sin embargo, no existe reporte sobre el efecto del HIUS en las propiedades funcionales y estructurales de la proteína de haba, y hay poca información sobre el efecto del HIUS en la digestibilidad de las proteínas vegetales en general.

Las proteínas vegetales tienen una baja digestibilidad, por lo que es deseable evaluar el efecto del HIUS en la digestibilidad de las proteínas. Recientemente, se informó que la digestibilidad de los conjugados dextrano-aislado de proteína de colza se disminuyó por tratamiento con ultrasonido (Qu *et al.*, 2018).

El objetivo de este estudio fue determinar los efectos del tratamiento con ultrasonido sobre: (a) las propiedades fisicoquímicas y superficiales; (b) capacidad espumante, estabilidad, morfología, tamaño de burbujas y reología de espumas; y (c) estructura y digestibilidad relativa del aislado de proteína de haba en comparación con los mostrados por el aislado de proteína nativa de haba.

2. ANTECEDENTES

2.1. Propiedades superficiales de proteínas

Las proteínas son macromoléculas complejas compuestas por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Debido a su carácter anfifílico pueden adsorberse en la interfase aire/agua y por lo tanto juegan un papel importante en la formación y estabilización de sistemas alimentarios dispersos como las espumas (Morales *et al.*, 2015). Las propiedades funcionales de las proteínas están relacionadas con sus características físicas, químicas y conformacionales. Las principales características que determinan las propiedades funcionales de las proteínas en un sistema alimentario incluyen el peso molecular, tamaño, forma, flexibilidad, composición de aminoácidos (proporción de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos), estructura (fibrosas y globulares), carga neta, distribución de carga e hidrofobicidad (González-Pérez and Arellano, 2009). Particularmente, la actividad superficial de una proteína depende de la estabilidad termodinámica, flexibilidad, anfipaticidad, tamaño molecular y carga (Mitropoulos *et al.*, 2014). Las proteínas se adsorben en la interfase aire-agua debido a que poseen regiones hidrofóbicas, atribuido a los residuos de aminoácidos hidrofóbicos, reduciendo la tensión interfacial y formando una película interfacial estable que resiste la ruptura (Vaclavik and Christian, 2008). Se ha encontrado que las proteínas empleadas como agentes espumantes tienen las siguientes características: i) se difunden y adsorben rápidamente a la interfase aire-agua; ii) cambian su estructura molecular, y iii) se extienden en la interfase y se vuelven a reorientar para formar películas interfaciales capaces de atrapar y retener aire. La funcionalidad puede variar con la fuente de proteína, composición, el método de preparación, historia térmica y el ambiente

predominante (por ejemplo, pH, fuerza iónica, temperatura, presencia de sales, etc.) (González-Pérez and Arellano, 2009).

2.2. Proteínas vegetales

Debido al aumento de la demanda mundial de proteínas, hay una necesidad de nuevas fuentes de este tipo de nutrimentos. Las proteínas animales poseen un alto costo en términos de precio de mercado, requerimientos de tierra e impacto ambiental. Además, la confianza de los consumidores ha disminuido debido principalmente al uso de hormonas en animales. Las proteínas vegetales son alternativas versátiles y económicas, respecto a las proteínas de origen animal como ingredientes funcionales en la formulación de alimentos; sin embargo, un reemplazo efectivo de las proteínas animales requiere innovaciones tecnológicas. Para lograr estas innovaciones de una manera eficiente y efectiva, debe ser de gran importancia la relación entre la estructura de la proteína y las propiedades funcionales (González-Pérez and Arellano, 2009). Las principales fuentes de proteínas vegetales que se encuentran actualmente bajo estudios científicos y tecnológicos en el mercado son las siguientes: Granos de leguminosas como frijol, soya, alberjón, garbanzo y cacahuate; cereales como el trigo, maíz, arroz, cebada, centeno, avena y sorgo; oleaginosas como girasol, canola, sésamo y semilla de algodón; tubérculos como papa, tapioca o camote; hojas como alfalfa, tapioca, amaranto y plantas acuáticas; frutas como semilla de uva, semilla de tomate o papaya (González-Pérez and Arellano, 2009).

2.3. Leguminosas

Las leguminosas son plantas de la familia *Fabaceae* (o *Leguminosae*) que se caracterizan por contener un fruto en forma de legumbre, donde se alojan las semillas. Las legumbres son las semillas secas que se diferencian de las semillas oleaginosas por el bajo contenido en grasa. En la alimentación humana se utilizan hasta 150 especies de leguminosas, de las que el *Codex Alimentarius* considera como más relevantes para el consumo humano directo las siguientes: frijol (alubias/judías) de *Phaseolus* spp.; Lentejas (*Lens culinaris medicinalis* o *Lens esculenta Moench*); chícharos (*Pisum sativum* L.); garbanzos (*Cicer arietinum* L.); habas (*Vicia faba* L.) y frijol pinto (*Vigna unguiculata* L. Walp. o *Vigna sesquipedalis* Fruhw., *Vigna sinensis* L. *Savi exd Hassk*) (Olmedilla *et al.*, 2010). Las proteínas de leguminosas son de especial interés debido al valor nutricional, disponibilidad, bajo costo y efectos benéficos a la salud (Duranti, 2006).

Las leguminosas están formadas principalmente por dos fracciones proteicas: Globulinas y albúminas. Las globulinas son solubles en disoluciones salinas y representan aproximadamente el 70% de la proteína que se encuentra en las semillas de leguminosas (Roy *et al.*, 2010). Estas se clasifican como proteínas 11S (leguminas, unidad Svedberg) o proteínas 7S (vicilinas) de acuerdo con sus coeficientes de sedimentación. La legumina es una proteína hexamérica con un peso molecular total de 300-400 kDa mientras que la vicilina es una proteína trimérica con un peso molecular entre 150 y 180 kDa (Derbyshire *et al.*, 1976). Las cadenas α y β de la legumina están unidas por puentes disulfuro, y las cadenas- α hidrofílicas están ubicadas en la superficie de la molécula, mientras que las secciones hidrofóbicas están ocultas en el interior, lo que minimiza el contacto con el agua. Las globulinas se disocian en sus subunidades a valores extremos de pH y fuerza iónica (Henning *et al.*, 1997). Por su parte, las albúminas son solubles

en agua y constituyen del 10-20% de la proteína en las semillas de leguminosas y pueden tener pesos moleculares variables (16-483 kDa) (Papalamprou *et al.*, 2010). La relación entre globulinas y albúminas y/o leguminas y vicilinas en aislados puede mostrar diferencias debido a la especie y al método de producción que podrían influir en las propiedades fisicoquímicas (Swanson, 1990).

2.3.1. El haba (*Vicia faba* L.)

El haba es la séptima leguminosa de grano más importante en el mundo. El rendimiento mundial de grano seco promedio es de 2.06 t ha⁻¹ pero en México sólo es de 0.66 t ha⁻¹; los rendimientos más altos se han obtenido en los estados de Morelos, Sonora, Durango, Guanajuato, Veracruz y México (de 1.48 a 3.42 t ha⁻¹) (Pérez *et al.*, 2014). El haba ha sido un alimento básico durante mucho tiempo en el área mediterránea, India, Pakistán y China, pero su uso para alimentar animales es mucho más extenso. Los granos de haba tienen un alto contenido de proteína (24-28 %), carbohidratos y son ricos en fibra, vitaminas y minerales (Husband *et al.*, 1994). Como en la mayoría de las leguminosas, las proteínas de las semillas de *Vicia faba* están formadas por dos fracciones principales, albúminas y globulinas. Las primeras son proporcionalmente ricas en aminoácidos azufrados y lisina, en tanto que las globulinas están conformadas de convicilina, vicilina y legumina (Vioque *et al.*, 2012). La harina de los granos de haba se ha utilizado para la producción de concentrados y aislados de proteína liofilizados, enfocados en la alimentación animal (vacas y borregos). Sin embargo, a pesar de sus características nutricionales y agronómicas favorables, el área cultivada ha disminuido de 5 millones de hectáreas en 1965 a 2.4 en 2007. Por lo tanto, sería de gran interés una revalorización de este cultivo, basada en su utilización para producir componentes alimenticios funcionales de alta calidad.

2.4. Ultrasonido

El tipo de onda de sonido es determinado por su frecuencia (Figura 1). El infrasonido se refiere a ondas de sonido con frecuencia (20 Hz) por debajo de aquella que es detectable por el oído humano y es utilizada por ballenas y por dispositivos sonoros submarinos. El rango de sonido humano es de 20 Hz a ~20 kHz. El ultrasonido es una onda acústica con una frecuencia superior a los 20 kHz (20-100 kHz), el umbral para la detección auditiva humana, y necesita un medio para propagarse (Mason and Lorimer, 2002). La fuente de salida ultrasónica es típicamente un cuerpo vibrante; la vibración de dicho cuerpo se comunica con las partículas del medio circundante, que a su vez comienzan a oscilar. Del mismo modo y también por oscilación, estas partículas comunican la energía a otras partículas vecinas. El nivel de energía ultrasónica o energía propagada al medio se puede expresar como potencia de ultrasonido (W), intensidad de ultrasonido (W/cm) o densidad de energía acústica (W/cm³ o W/mL). Sin embargo, la densidad de energía acústica ha sido ampliamente aceptada como la medida más apropiada del nivel de potencia ultrasónica (Esclapez *et al.*, 2011).

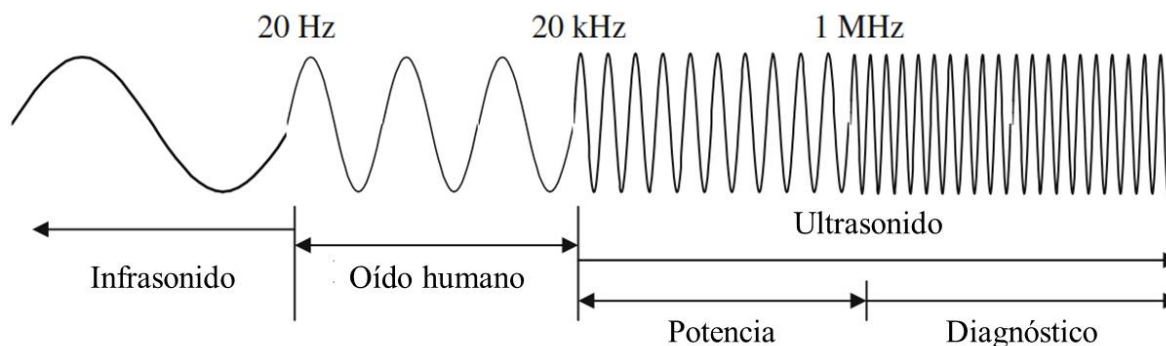


Figura 1. El espectro del sonido (Kentish and Ashokkumar, 2011).

La aplicación de ultrasonido en la ciencia y tecnología de los alimentos se puede clasificar en dos grupos principales: ultrasonido de baja intensidad y de alta intensidad.

2.4.1. Ultrasonido de baja intensidad

“El ultrasonido de baja intensidad” también es conocido como ultrasonido de alta frecuencia (>100 kHz) y de baja potencia ($< 1\text{W}/\text{cm}^2$). Estas aplicaciones no invasivas se utilizan en el control de calidad de productos y/o procesos (Chandrapala *et al.*, 2012b) y se basan principalmente en la medición de la velocidad ultrasónica, la atenuación de la señal o el análisis de espectro de la frecuencia, con el fin de obtener información sobre el medio en el que se propaga el ultrasonido. El ultrasonido de alta frecuencia se ha utilizado para proporcionar información sobre las propiedades fisicoquímicas de los alimentos, como el contenido de sal y grasa en los productos cárnicos (Corona *et al.*, 2013; De Prados *et al.*, 2015) o firmeza, madurez, contenido de azúcar y acidez en frutas y productos vegetales (Mizrach, 2008).

2.4.2. Ultrasonido de alta intensidad

Por otro lado, se encuentra el “ultrasonido de alta intensidad” (HIUS, por sus siglas en inglés) también conocido como ultrasonido de baja frecuencia (20-100 kHz) y alta potencia ($> 1\text{W}/\text{cm}^2$). A diferencia del ultrasonido de baja intensidad, el HIUS se utiliza para provocar cambios en el producto o en el proceso en el que se aplica (Chemat *et al.*, 2011; Tao and Sun, 2015). Al atravesar un medio, el HIUS genera una serie de efectos, algunos de los cuales pueden afectar los fenómenos de transporte de masa y calor. Estos efectos pueden explicarse por diversos mecanismos asociados, que varían según el entorno en el que se propagan las ondas acústicas (Cárcel *et al.*, 2012). Los efectos del HIUS en sistemas líquidos están principalmente relacionados con el fenómeno de la cavitación (Chandrapala *et al.*, 2012a; Esclapez *et al.*, 2011).

La propagación del HIUS en un líquido induce una serie de compresiones y descompresiones, causando el desplazamiento molecular. Cuando la potencia acústica alcanza un cierto umbral, las presiones negativas que ocurren durante el ciclo de descompresión pueden superar las fuerzas atractivas de las moléculas en el líquido, especialmente la tensión superficial, formando así una burbuja de gas en el líquido (Soria y Villamiel, 2010) (Figura 2).

Evolución de la cavitación en la burbuja durante el ciclo de onda

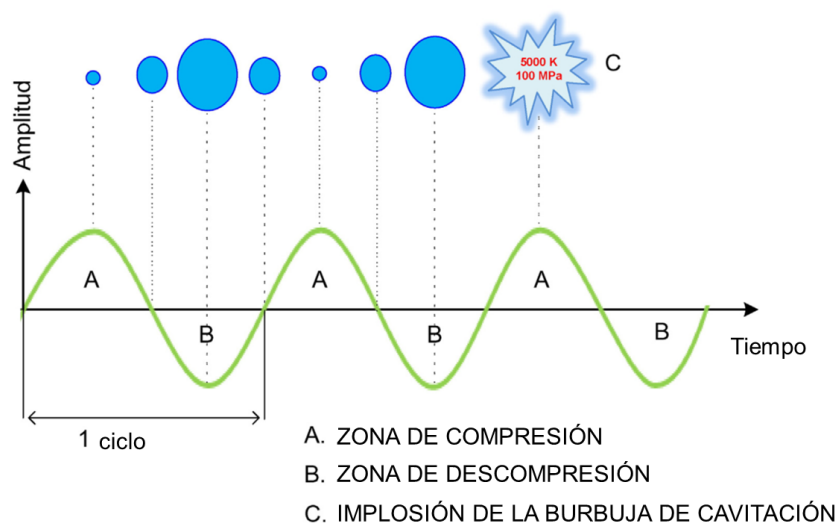


Figura 2. Esquema de la cavitación ultrasónica (Ozuna *et al.*, 2015)

En el ciclo de presión negativa, el flujo de gas ocurre desde el líquido hasta la burbuja que se expande, aumentando de tamaño. Cuando la presión es positiva, el flujo es opuesto y la burbuja se vuelve más pequeña. La cantidad de vapor perdido es siempre menor que la cantidad de vapor obtenida, por lo que el tamaño de la burbuja aumenta con cada ciclo (Luque de Castro and Priego Capote, 2007) (Figura 2). Las burbujas de cavitación pueden alcanzar un tamaño estable con una variación de tamaño constante debido a las compresiones y descompresiones sucesivas,

generando microagitaciones en el líquido. Este fenómeno se llama "cavitación estable". Sin embargo, el tamaño de la burbuja también puede ser inestable cuando el ciclo de crecimiento de la burbuja es mayor que el ciclo de reducción, lo que provoca un crecimiento rápido resultando en el colapso de la burbuja y generando por lo tanto altas temperaturas (5000 K) y presiones (100 MPa) en la zona de cavitación (Luque de Castro and Priego Capote, 2007) (Figura 2). Este tipo de cavitación, llamada "cavitación transitoria", puede producir fuerzas de corte y turbulencia en el medio (Cárcel *et al.*, 2012; Pingret *et al.*, 2013). Otro efecto importante es que las moléculas de agua pueden romperse, generando radicales libres altamente reactivos ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H} + \text{OH}$) que pueden reaccionar y, en consecuencia, modificar otras moléculas, como las proteínas (Arzeni *et al.*, 2012). Este amplio intervalo de mecanismos implicados en el tratamiento de HIUS induce efectos físicos y bioquímicos con varias aplicaciones potenciales en la industria alimentaria.

2.5. Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopia infrarroja es uno de los métodos clásicos para la determinación de la estructura de moléculas pequeñas. Esto se debe a su sensibilidad a la composición química y la arquitectura de las moléculas (estiramientos y flexiones geométricas), lo que la hace una valiosa herramienta para la investigación de la estructura de la proteína, los mecanismos moleculares de reacciones y del plegamiento o desplegamiento de las proteínas (Barth, 2007). La espectroscopia infrarroja se basa en el hecho de que las moléculas tienen frecuencias a las cuales rotan y vibran, es decir, los movimientos de rotación y vibración moleculares tienen niveles de energía discretos (modos normales vibracionales). La región espectral infrarroja se puede subdividir en la región del infrarrojo cercano ($12,800\text{-}4,000\text{ cm}^{-1}$), la región del infrarrojo medio

(4,000-400 cm^{-1}) y la región del infrarrojo lejano (400-10 cm^{-1}). Los espectrómetros modernos de infrarrojos son espectrómetros de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), atribuido a que la señal del detector de estos equipos está relacionada a una transformación de Fourier con el espectro medido, favoreciendo una rápida recolección de datos y la reducción del ruido en las señales obtenidas. La FT-IR es una técnica espectroscópica vibracional que puede ser una poderosa herramienta para obtener información sobre la estructura secundaria de las proteínas mediante el estudio a detalle de las diferentes contribuciones a la banda de la amida I, que surge de las vibraciones de estiramientos del grupo C=O en el enlace peptídico (Carbonaro *et al.*, 2010). Las energías de vibración del grupo carboxilo dependen de las diferentes conformaciones de la proteína tales como estructuras láminas- β y α -hélices, giros α y β , y agregados inter e intramoleculares (Carbonaro *et al.*, 2008; Carbonaro *et al.*, 2012). La determinación y la asignación de los componentes espectrales de la banda de la amida I puede entonces proporcionar información sobre la estructura secundaria de la proteína.

2.6. Espumas alimentarias

Una espuma es una dispersión coloidal en la que un gas se encuentra disperso en una fase líquida, semisólida o sólida. La fase dispersa algunas veces se denomina como fase interna y la fase continua como fase externa (Schramm, 2005). Aunque son estructuralmente complejas, las espumas alimentarias se encuentran todos los días, desde pasteles y panes, hasta champagne, cerveza, merengues y helados (Berry *et al.*, 2009). En cuestiones prácticas de espumas, los tamaños de las burbujas generalmente tienen diámetros superiores a 10 μm y pueden ser mayores de 1000 μm . Sin embargo, la estabilidad a largo plazo en sistemas aireados es mucho más difícil de lograr que en emulsiones. Por lo tanto, la incorporación de proteínas como una

posible manera de mejorar la estabilidad de las espumas es una cuestión de gran importancia tecnológica y comercial (Schramm, 2005). Esto es especialmente importante para los sistemas alimentarios porque la presencia de una estructura aireada proporciona las características de textura esenciales de los alimentos altamente populares, como los helados. Además, la incorporación de burbujas de gas como un reemplazo total o parcial de partículas de grasa dispersas puede desempeñar un papel útil en el desarrollo de productos más saludables.

2.6.1. Formación de espumas

Los métodos más comunes para elaborar espumas son: (i) mediante sobresaturación bajo presión, seguido de la liberación de la presión, (ii) mediante inyección de gas en un líquido; y (iii) batido en el aire. Este último es el método más común utilizado por la industria alimentaria. Para producir una espuma por batido, debe aplicarse energía para incorporar gas al líquido, rompiendo burbujas grandes para obtener burbujas más pequeñas, que pueden difundirse a la fase líquida alrededor de las burbujas de aire conforme se van formando (González-Pérez and Arellano, 2009). Normalmente se utiliza un agente espumante, que se encuentra contenido en la fase líquida, el cual se adsorbe a la superficie del líquido, reduciendo la tensión superficial y también formando una película alrededor de las burbujas de gas.

2.6.2. Estabilidad de espumas

La estabilidad de una espuma puede medirse como la pérdida del volumen de espuma en algún periodo de tiempo. Cuando un líquido es batido para formar una espuma, el volumen del líquido incrementa debido a la incorporación de aire. Si la espuma es estable, el volumen no cambiará mucho. Sin embargo, la pérdida de aire de una espuma inestable podría provocar una

considerable reducción en el volumen (Vaclavik and Christian, 2008). La estabilidad de una espuma puede disminuirse debido a los siguientes factores:

- La tendencia de la película de líquido (lamela) de drenar debido a la gravedad. Esto podría permitir que el gas escape y el volumen de la espuma se reduzca.
- La tendencia de la película de romperse y permitir la coalescencia o escape de las burbujas de gas.
- Difusión del gas desde burbujas pequeñas a unas más grandes.

Lo anterior, puede conducir a mecanismos de desestabilización física de las espumas, que se refieren a cambios en la posición o el tamaño de las burbujas, siendo los más importantes el drenaje, la coalescencia y la desproporción (Figura 3). El drenaje es el líquido que fluye desde la espuma como consecuencia de la gravedad, conduciendo a una disminución en el volumen total de la espuma, y causando indirectamente la disminución del espesor de la película con el tiempo. La coalescencia, que es la ruptura de la delgada película entre dos burbujas, se vuelve más probable, con la distribución de tamaño de las burbujas cambiando hacia burbujas más grandes. La desproporción, es el crecimiento de burbujas grandes a expensas de las más pequeñas, siendo el tipo más importante de inestabilidad en las espumas (Ronteltap and Prins, 1989).

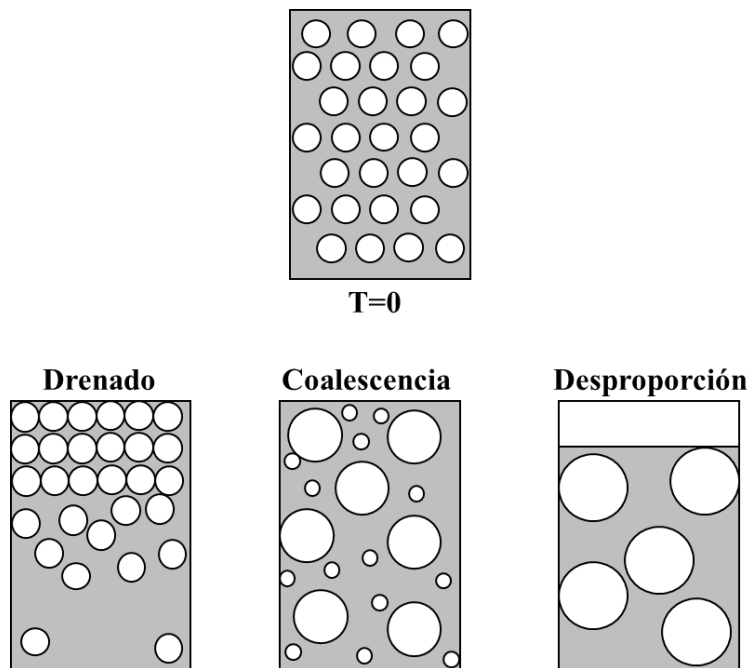


Figura 3. Proceso que indica la desestabilización de una espuma con el tiempo (Vaclavik and Christian, 2008).

2.6.3. Morfología de las espumas.

En las espumas es necesario distinguir dos tipos: húmedas y secas. En una espuma húmeda el contenido de líquido es elevado y, por lo tanto, las paredes de las celdas son gruesas. Como consecuencia, las celdas, suficientemente alejadas unas de otras, no resultan distorsionadas, por lo que son esféricas, por la misma razón que lo son las gotas de agua, ya que la tensión superficial determina que las burbujas aisladas presenten una forma esférica, pues su superficie es mínima. A medida que el líquido abandona la espuma, es decir, a medida que la espuma se seca, su geometría se torna más compleja. Ahora, las celdas, separadas entre sí por paredes más delgadas sufren su influencia mutua, y debido a ello, las burbujas esféricas se convierten en poliedros. Los componentes estructurales más importantes en las espumas son la lamela y las fronteras de Plateau (Figura 4). Una lamela es definida como la delgada película de líquido que rodea a las

burbujas de aire y las separa una de otra (Schramm, 2005). Las burbujas en una espuma se organizan en poliedros de modo que, a lo largo de la frontera de una lamela, tres lamelas siempre se unen en ángulos de 120° , la frontera donde se conectan se denomina frontera de Plateau. El líquido de una espuma poliédrica se distribuye entre las películas y las llamadas fronteras de Plateau, es decir, los canales que se forman en los lugares en que se encuentran las películas. La curvatura de estas fronteras manifiesta que la presión en su interior es menor que la presión en las celdas y en las películas. La consiguiente “succión de las fronteras” tiene efectos desestabilizadores, puesto que tiende a retirar el líquido de las películas. El balance de fuerzas es tal que, en muchos casos, la mayoría del líquido de una espuma se encuentra en las fronteras de Plateau (Kocszo *et al.*, 1992). Cuando tres películas forman una frontera de Plateau, los ángulos que determinan son idénticos e iguales a 120° , debido al equilibrio de las fuerzas de tensión superficial. Mas aún, el empaquetamiento de dodecaedros pentagonales ha servido de modelo para estudiar las relaciones entre el contenido de líquido, tamaño de las celdas, espesor de las películas y curvaturas de las fronteras de Plateau.

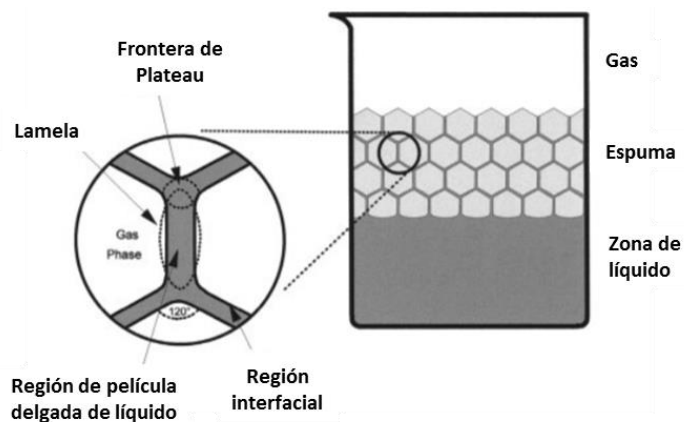


Figura 4. Ilustración generalizada de los componentes estructurales de una espuma líquida

(Schramm, 2005).

2.6.4. Reología de espumas

La reología es la ciencia de la deformación y flujo de la materia. Cuando un esfuerzo dado es aplicado a un material, la deformación resultante puede indicar si éste tiene propiedades viscosas, elásticas o una combinación de ambas (pseudoplásticas). En algunas dispersiones coloidales, muchas emulsiones y espumas, la tasa de corte permanece en cero hasta que se alcanza un esfuerzo de corte, denominado esfuerzo de cedencia (τ_0), y entonces empieza el flujo pseudoplástico o no-newtoniano que permite que un material fluya. Una causa común de tal comportamiento es la existencia de una red inter-partículas o intermolecular el cual inicialmente actúan como un sólido y proporciona resistencia a algún cambio en la posición de los elementos de volumen (Schramm, 2000). En este caso, el flujo sólo ocurre cuando el esfuerzo aplicado supera la resistencia de la red y lo que fue como un sólido, se convierte en un fluido. Los modelos empíricos más comunes utilizados para describir el comportamiento de fluidos pseudoplásticos con esfuerzos de cedencia son el modelo plástico de Bingham, el modelo de Herschel-Bulkley, el modelo de Robertson-Stiff y el modelo de Casson. Este último es descrito de la siguiente manera:

$$\tau^{1/2} = \tau_0^{1/2} + \eta_\infty \dot{\gamma}^{1/2}$$

Donde: $\tau^{1/2}$ es el esfuerzo cortante; τ_0 es el esfuerzo de cedencia; η_∞ es la viscosidad infinita y $\dot{\gamma}$ es la tasa de deformación.

2.7. Efecto del ultrasonido de alta intensidad en la estabilización de espumas

Investigaciones recientes sobre el tratamiento ultrasónico de soluciones purificadas de proteína han informado de una mayor actividad superficial en la interfase aire-agua (Guzey *et al.*, 2004;

Weiss y Seshadri, 2001). Potencialmente, el incremento en la flexibilidad y la actividad superficial podrían producir proteínas que poseen mayor capacidad de estabilizar espumas. Un grupo de investigación en el Reino Unido demostró que la estabilidad de la espuma y la uniformidad de la burbuja aumentaron y el diámetro de burbuja disminuyó en espumas con concentrado de proteína de suero de leche (WPC) tras la sonicación (Lim y Barigou, 2005b). Esta investigación sugiere que se podría utilizar el ultrasonido de alta intensidad para mejorar el rendimiento y la calidad de las espumas alimenticias. El grupo también informó que un aumento en la concentración de proteína permitió la producción de espumas con una mejor textura, pero que la mayor resistencia de las películas de proteína en la interfase requería el uso de amplitudes de ondas de ultrasonido más altas (Murray *et al.*, 2007; Schramm, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

Las proteínas en general juegan un papel importante en la tecnología de los alimentos como sistemas estabilizadores de espumas alimentarias. En este sentido, el estudio sobre la funcionalidad de las proteínas se ha enfocado preponderantemente en aquellas de origen animal y poco se ha explorado sobre el uso de proteínas vegetales, particularmente aquellas obtenidas a partir de leguminosas. El uso de proteínas vegetales presenta algunos inconvenientes, dentro de las cuales destaca una baja solubilidad y propiedades espumantes limitadas atribuidas a su composición y estructura química compacta (arreglo estructural). Lo anterior, ha motivado la búsqueda de tecnologías verdes e innovadoras que mejoren el comportamiento superficial y la funcionalidad de las proteínas, y que al mismo tiempo sean rentables en costos y amigables con el medio ambiente. El ultrasonido de alta intensidad (HIUS, por sus siglas en inglés) es una tecnología verde que está recibiendo mucha atención como alternativa novedosa ya que hay varios reportes que respaldan su efectividad para mejorar las propiedades fisicoquímicas, funcionales y el comportamiento superficial de diferentes proteínas. Dentro de las leguminosas, el haba ocupa el segundo lugar sólo después de la soya en contenido de proteína; sin embargo, ha tenido un uso muy limitado en la alimentación humana, derivándose una parte importante de su producción a la alimentación animal. Lo anterior, implica la necesidad de diversificar el uso de este cultivo con la finalidad de obtener una proteína funcional, mediante la modificación de sus propiedades fisicoquímicas y con ello incrementar su funcionalidad con potencial aplicación en la industria alimentaria.

4. HIPÓTESIS

Las propiedades fisicoquímicas como solubilidad, tamaño de partícula, potencial zeta y tensión superficial de la proteína de haba pueden mejorarse con respecto a las proteínas nativas, en función de las condiciones aplicadas de amplitud y tiempo de ultrasonido de alta intensidad.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del ultrasonido de alta intensidad sobre las propiedades fisicoquímicas como solubilidad, tamaño de partícula, potencial zeta y tensión superficial de la proteína de haba, para obtener mediante una metodología de superficie de respuesta, una proteína de haba optimizada con propiedades fisicoquímicas, estructurales y superficiales (capacidad espumante) mejoradas, en comparación de aquellas exhibidas por el aislado de proteína nativa de haba.

5.2. Objetivos particulares

- a) Establecer el método de obtención del aislado de proteína de haba (APHN) a partir de harina de la leguminosa en seco.
- b) Realizar la caracterización fisicoquímica de la harina de haba y del aislado de proteína de haba obtenido.
- c) Evaluar el efecto de las distintas condiciones de amplitud y tiempo de *ultrasonido de alta intensidad* sobre las propiedades fisicoquímicas (Solubilidad, tamaño de partícula, potencial zeta y tensión superficial) de la proteína de haba.
- d) Analizar los resultados de las propiedades fisicoquímicas por metodología de superficie de respuesta, con la finalidad de identificar las condiciones para obtener una proteína de haba optimizada que rinda la mejor funcionalidad.
- e) Estudiar las propiedades superficiales y espumantes (capacidad y estabilidad espumante, morfología y tamaño de burbuja, así como reología de espumas) de la proteína de haba

optimizada en comparación a aquellas mostradas por el aislado de proteína nativa de haba.

- f) Estudiar los cambios estructurales del aislado de proteína de haba optimizado para obtener el porcentaje de cada estructura secundaria y relacionarlos con la digestibilidad relativa y comparar con aquellos mostrados por el aislado de proteína nativa de haba.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

Granos de haba (*Vicia faba* L.) de la variedad Diamante fueron obtenidos de un productor local de la comunidad de San Lucas Xolox, Tecámac, Estado de México, México, con coordenadas GPS de 19 ° 46 '25 " N y 98 ° 58 '54 " W y una altura sobre el nivel del mar de 2,250 m. La planta se cultivó durante el ciclo primavera-verano del 2015. La precipitación media anual y la temperatura fueron de 622 mm y de 12-18 ° C, respectivamente. El suelo tuvo una estructura franca-arcillosa, ligeramente alcalina (pH 7.4) y un clima templado-subhúmedo clasificado como tipo C (w) (w) b en la clasificación de Köppen. La planta se cosechó cuando alcanzó la madurez fisiológica, que ocurrió después de 180 días de siembra. Los granos se secaron en un horno de convección a 35 ° C hasta que se alcanzó un contenido de humedad del 13%. Los granos se empacaron en bolsas de polietileno y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que fueron requeridas. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se obtuvieron de J.T. Baker (Xalostoc, Estado de México, México). El agua utilizada en todos los experimentos fue destilada y desionizada (DDW).

6.2. Obtención y caracterización del aislado de proteína de haba

Granos enteros de haba (*Vicia faba* L.) se molieron hasta obtener una harina fina, la cual se desengrasó mediante la extracción con hexano en un equipo Soxhlet durante 4 h. El aislado de proteína nativa de haba (APHN) se obtuvo mediante precipitación isoelectrica, de la siguiente manera: Se dispersaron 100 g de harina desengrasada en agua destilada a una relación 1:10 p/v, durante 10 min a 800 rpm; el pH se ajustó a 9.5 utilizando NaOH 2.5 N, continuando la agitación a 800 rpm durante 40 min a temperatura ambiente (20-22°C). El extracto alcalino se centrifugó

(Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburg, Alemania) a 5,000 rpm por 15 min a 4° C y el sobrenadante obtenido se filtró a través de un filtro de membrana de 0.45 µm (Millipore Co., Milford, NH, EUA) y el pH se ajustó a 3.6 (punto isoeléctrico del APHN) utilizando HCl 2.5 N, manteniendo la agitación durante 30 min. La proteína precipitada se aisló mediante centrifugación a 6,000 rpm durante 15 min a 4°C y se lavó 3 veces durante 30 min utilizando agua destilada (adicionada con 0.02 % p/v de azida de sodio para prevenir el crecimiento microbiano (Arzeni *et al.*, 2012)) a una relación 1:10 p/p (proteína: agua destilada) (Vioque *et al.*, 2012). Finalmente, la mezcla se secó a 35 °C durante 42 h en un horno con circulación de aire (Riossa Digital Modelo HCF-62, Ciudad de México, México).

6.2.1. Contenido de humedad (%).

El contenido de humedad se determinó por diferencia de peso, después de secar la muestra a 105 °C durante 2h hasta que se alcanzó el peso constante (AOAC, 2005).

6.2.2. Determinación del contenido de proteína.

La determinación de la proteína total del APHN se realizó por el método de Kjeldahl, utilizando un factor de conversión de 6.25, de acuerdo al método de la AOAC (2005).

6.2.3. Determinación de grasa.

La cuantificación de grasa se obtuvo por diferencia de peso del residuo resultante en el matraz después de realizar el desengrasado con hexano durante 4h utilizando el método Soxhlet y después de eliminar el disolvente por secado a 100 °C hasta peso constante (AOAC, 2005).

6.3. Tratamiento con ultrasonido

Dispersiones de APHN (10 mg/mL; buffer de fosfatos 0.1 mol/L, pH 7.4, 50 mL, 0.02 % p/v de azida de sodio) se dispersaron durante toda la noche (12 h) a temperatura ambiente y después se almacenaron en refrigeración ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) por 12 h para lograr su hidratación completa. Enseguida, se sonicaron (Ultrasonic processor, Model VCX 130 PB 500/750 W, con una sonda de acero inoxidable de 8 mm de diámetro, Sonics and Materials, Inc., Newtown, CT, EUA) a una frecuencia de 20 kHz. Un baño de hielo fue utilizado para disipar el calor producido durante la sonicación (O'Sullivan *et al.*, 2016). Un diseño central compuesto (DCC) a partir de un arreglo factorial 2^2 se utilizó para analizar los efectos de la amplitud (A) y el tiempo (B) de HIUS sobre la tensión superficial, solubilidad, tamaño de partícula y potencial zeta (Potencial ζ) de la proteína. Los valores codificados de los factores experimentales y sus niveles se muestran en la Tabla 1. Después del tratamiento con ultrasonido, todas las muestras se secaron a 35°C en un horno de convección durante 36 h y se obtuvo un polvo fino (APHS) por maceración.

6.3.1. Dispersiones stock de proteína

Dispersiones stock (10 mg/mL) de los tratamientos de APHN y APTS (Tabla 1) se dispersaron con agitación suave en una disolución buffer de fosfatos (SBF, 0.01 mol/L, pH 7.4) durante 3 h, se dejaron reposar toda la noche y se centrifugaron a 5,000 rpm por 15 min a 20°C . Los sobrenadantes obtenidos se filtraron a través de una membrana de $0.45\ \mu\text{m}$ y cuando fue necesario, las dispersiones stock se diluyeron con SBF.

6.3.2. Solubilidad

La solubilidad de APHN y APHS se determinó de la siguiente manera: 100 mg de la proteína en polvo se dispersó en 10 mL de la SBF. La disolución se agitó por 30 min y se centrifugó a 5,000 rpm por 15 min a 20 °C. La concentración de proteína en los sobrenadantes se determinó utilizando el método de Lowry y albúmina de suero bovino para construir una curva estándar de proteína en un rango de concentración de 0.01 a 0.1 mg/mL (Jiang *et al.*, 2014). La absorbancia de los sobrenadantes se midió a 750 nm con un espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). La solubilidad de la proteína se expresó utilizando la ecuación 1:

$$\text{Solubilidad (\%)} = \frac{\text{Proteína soluble (Lowry)}}{\text{Contenido de proteína total}} \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

6.3.3. Tamaño de partícula

Las dispersiones stock de APHN y APHS se diluyeron en gua desionizada en una proporción 1:2, y se utilizó 1 mL de muestra para medir el tamaño de partícula, el cual se reportó como diámetro hidrodinámico (d_h) y el ancho de la distribución de tamaño se determinó como índice de polidispersidad (IPD) con un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), utilizando un índice de refracción de 1.334 y un índice de absorción de 0.001 (Morales *et al.*, 2015).

6.3.4. Potencial – ζ

El Potencial – ζ de cada una de las dispersiones de proteína se midió por movilidad electroforética utilizando un Zetasizer Nano ZS90. Las dispersiones stock diluidas en una proporción 1:2 se colocaron en una celda capilar para ζ (O’Sullivan *et al.*, 2015).

6.3.5. Tensión superficial

La tensión superficial de las dispersiones stock de APHN y APHS se midió con un tensiómetro de Du Nouy (CSC Scientific Company Inc., Fairfax, VA, EUA). Muestras (5 mL; 10 mg/mL) se colocaron en cajas petri de 4.3 cm de diámetro, en las que se sumergió un anillo de platino-iridio. Se midió la fuerza necesaria requerida para retirar el anillo de la superficie de las dispersiones de proteína y con las ecuaciones 2 y 3 se obtuvo la tensión superficial actual en mN/m:

$$A = P \times F \dots\dots\dots (2)$$

Donde A=Tensión superficial actual; P = Tensión superficial aparente (lectura del disco); F= Factor de corrección.

$$F = 0.7250 + \sqrt{\frac{0.01452P}{C^2(D-d)} + 0.04534 - \frac{1.679r}{R}} \dots\dots\dots (3)$$

Donde P=lectura; C= circunferencia del anillo y R/r=55, parámetros indicados en las especificaciones de catálogo del accesorio de acuerdo a CSC Scientific, E.U.A; D= densidad de fase inferior (muestra); d= densidad de la fase superior (aire).

6.4. Optimización del ultrasonido de alta intensidad por metodología de superficie de respuesta.

Se obtuvo un aislado de proteína de haba optimizado (APHOP) aplicando las condiciones óptimas de sonicación de A y B, determinadas como fue descrito en la subsección de análisis estadístico (apartado 6.7).

6.5. Características fisicoquímicas de APHN y APHOP

La tensión superficial, solubilidad, tamaño de partícula y potencial- ζ se determinaron para APHN Y APHOP como fue descrito anteriormente. Enseguida, se describen los métodos para la caracterización adicional de las propiedades fisicoquímicas:

6.5.1. Viscosidad aparente

La viscosidad aparente de las dispersiones stock de proteína se determinó a una tasa de corte fija (50 s^{-1}) con un reómetro MCR 301 (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania), acoplada a una geometría de cilindros concéntricos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

6.5.2. Digestibilidad relativa de proteína (DRP)

Las mediciones de la calidad de la proteína se utilizan para predecir su calidad nutricional, y están diseñadas para reflejar el contenido y la biodisponibilidad de los aminoácidos, así como la digestibilidad de las proteínas. Mientras que el patrón de perfil de aminoácidos es probablemente el más determinante de la calidad de la proteína, la digestibilidad de la proteína y la biodisponibilidad de sus aminoácidos constituyentes son los siguientes factores importantes. La susceptibilidad de una proteína a la hidrólisis enzimática en el sistema digestivo está relacionada directamente con las estructuras primaria, secundaria y terciaria

(Maforimbo, 2001). Se ha encontrado que las pruebas de digestibilidad multienzimáticas de proteína *in vitro* se correlacionan altamente con la digestibilidad aparente *in vivo* en ratas, y la ventaja más significativa del método *in vitro* para predecir la digestibilidad aparente de proteínas es rapidez, sensibilidad y bajo costo (Saunders *et al.*, 1973; Hsu *et al.*, 1977). En este trabajo, se utilizó el método multienzimático de Elsohaimy *et al.* (2015). Se utilizaron para la digestión enzimática, tripsina pancreática porcina (tipo IX, 15,310 unidades·mg⁻¹ de proteína), quimotripsina pancreática bovina b (tipo II, 48 unidades·g⁻¹ de sólido), peptidasa intestinal porcina (P-7500, 115 unidades·mg⁻¹ de sólido) y proteasa bacteriana (tipo XIV, 4.4 unidades·mg⁻¹ de sólido) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Se adicionó la muestra (63.8 mg) a 10 mL de agua destilada y el pH se ajustó a 8.0 con NaOH 1N. Se adicionó 1 mL de solución acuosa enzimática (1.58 mg de tripsina, 3.65 mg de quimotripsina y 0.45 mg de peptidasa) a la muestra de proteína y la digestión se dejó proceder por 10 min a 37 °C. Después de la adición de 1 mL (1.48 mg) de disolución de proteasa bacteriana, la digestión continuó por 9 min a 55 °C. El valor de pH se registró después de 1 min y se utilizó para estimar la DRP de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$DRP = 234.84 - 22.56X \dots\dots\dots (4)$$

Donde X es el pH de la suspensión después de 20 min de digestión.

6.5.3. Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros infrarrojos se grabaron con un espectrofotómetro FT-IR (Frontier, Perkin Elmer, Ciudad de México, México), equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada. Muestras secas molidas (10 mg) de APHN y APHOP se pusieron en contacto con el cristal de diamante utilizando un ajuste de geometría de 60 unidades de fuerza (Tovar-Benítez *et al.*,

2016), y se midió la absorbancia a longitudes de onda desde 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} con una resolución de 40 cm^{-1} . Se realizó una autodeconvolución de Fourier (FSD, en inglés) y un análisis de segunda derivada y entonces los picos se ajustaron en la banda de la región de la amida I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) utilizando el software del equipo. Picos gaussianos se pueden asignar a su estructura correspondiente basados en su centro y la integral de cada pico se dividió por la suma de todos los picos determinados para identificar la proporción (%) de cada estructura (Beck *et al.*, 2017).

6.5.4. Dinámicas de tensión superficial

Dispersiones stock de APHN y APHOP se centrifugaron a 5,000 rpm por 15 min a 20 °C, se filtraron (membrana de $0.45\text{ }\mu\text{m}$) para eliminar impurezas, y se diluyeron a una relación 1:10. La adsorción superficial dinámica de las moléculas de proteína se determinó monitoreando la evolución de la tensión superficial con el tiempo en la interfase aire-agua a 25°C, utilizando un medidor de ángulo de contacto OCA-20, con un accesorio de gota oscilante ODG-20 (Data-physics Instrument GmbH, Filderstadt, Alemania).

6.6. Evaluación de las propiedades espumantes de APHN y APHOP

Dispersiones de APHN y APHOP (30 mL, 10 mg/mL) se colocaron en un tubo graduado (6.2 cm de diámetro) y se agitaron por 3 min a velocidad 2 con una batidora Black & Decker (Power Pro 175-Watt, Maryland, DE, EUA) a temperatura ambiente. El porcentaje de incremento en espuma se registró como capacidad espumante (CE) (Mune *et al.*, 2016). El volumen de líquido drenado en la parte inferior de los tubos graduados y la disminución de la

altura de la espuma se relacionaron con el colapso a temperatura ambiente y se registraron a los 0, 15 y 30 min.

Las muestras de espumas se colocaron en un portaobjetos (G.S.C. International, Inc., VWR, Radnor, PA, EUA) para evitar la ruptura de las muestras cuando se les colocó el cubreobjetos, y se utilizó un microscopio de luz Olympus BX45 (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) para su observación con un aumento de 4x. Las imágenes fueron capturadas con una cámara AxioCam ERc 5 s (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Germany). El diámetro de burbuja medio de número-longitud ($d_{1,0}$) se estimó mediante el paquete de software ZEN-2012 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Germany). Se contaron alrededor de 100-150 burbujas para cada muestra (Indrawati *et al.*, 2008).

El comportamiento de flujo de las espumas frescas se determinó con un reómetro Physica MCR 301, acoplado con una geometría plato-plato serrada de 50 mm, ajustada a una altura constante de 1 mm a 25 °C, aplicando una tasa de corte desde 10^{-2} a 10^3 s⁻¹ (Vernon-Carter *et al.*, 2001).

6.7. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado utilizando un diseño experimental aleatorizado y analizados por triplicado. Un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple fue aplicado, y cuando fue necesario, se utilizó una prueba de Tukey para determinar diferencias entre las medias. El software Statgraphics Centurion v.16.1 (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, EUA) se utilizó para este propósito. Los datos del diseño experimental DCC se analizaron por una metodología de regresión múltiple por mínimos cuadrados para ajustar los modelos polinomiales y predecir las propiedades fisicoquímicas de las dispersiones de APHS en función de las condiciones de ultrasonido de A y B. Los gráficos

de contorno y superficie de respuesta se obtuvieron utilizando los modelos ajustados y se determinaron las condiciones óptimas de amplitud y tiempo con la ayuda del software Design-Expert versión 10 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, EUA). En todos los casos, se estableció un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Composición química proximal del material experimental

Los contenidos de humedad, proteína y grasa de la harina de haba desengrasada fueron 8.20 ± 0.13 %, 26.83 ± 0.15 % y 1.26 ± 0.04 %, respectivamente. El APHN tuvo un valor de humedad significativamente menor (7.80 ± 0.06 %) y mayor contenido de proteína (89.02 ± 1.01 %) respecto a la harina de haba desengrasada. Estos valores se encuentran en el rango reportado por otros autores (Vioque *et al.*, 2012; Karaca *et al.*, 2011).

7.2. Efecto de la sonicación sobre las propiedades fisicoquímicas de proteína de haba

Independientemente de las condiciones utilizadas de A (amplitud) y B (tiempo), la sonicación aumentó la solubilidad y disminuyó el tamaño de partícula, el potencial- ζ y la tensión superficial de las dispersiones de APHS (Tablas 1 y 2).

7.2.1. Tamaño de partícula

El diámetro hidrodinámico (d_h) de las dispersiones de APHS varió desde 225.30 ± 0.28 nm (T3) a 311.55 ± 2.45 nm (T6) (Tabla 1), y en todos los casos fueron significativamente menores que 369.4 ± 3.09 nm de APHN (Tabla 2). El IPD de las dispersiones tiende a ser más estrecho cuanto menor es el d_h . La relación entre d_h , A y B para las dispersiones de APHS fue descrita por el siguiente modelo polinomial ($p = 0.0024$; $R^2 \text{ adj} = 0.8226$).

$$247.38 - 22.36 A - 12.91 B + 32.95 AB + 15.93 B^2 \dots\dots\dots (5)$$

Los coeficientes de los términos indicaron que el tamaño de partícula de las dispersiones de APHS fue afectado principalmente por la interacción AB ($p = 0.0020$), seguido por el término lineal de A ($p = 0.0025$). La disminución de d_h por el aumento de A podría atribuirse a las fuerzas

de corte hidrodinámicas asociadas con las cavitaciones ultrasónicas, y la ruptura de las interacciones asociativas hidrofóbicas y electrostáticas que mantienen estos agregados de proteína (Jiang *et al.*, 2014; O'Sullivan *et al.*, 2015). Jambrak *et al.* (2009) determinaron que el HIUS (20 kHz) durante 15 y 30 min redujo el tamaño de partícula de dispersiones de proteína de soya.

Los gráficos de contorno y superficie de respuesta se generaron basados en el modelo de tamaño de partícula (Eq. (5); Figura 5b). Se encontró que a valores de amplitud altos por tiempos cortos se producen partículas más pequeñas. Por el contrario, partículas de proteína más grandes se formaron por la aplicación de bajas amplitudes por tiempos relativamente largos, debido a la formación de agregados solubles. Jiang *et al.* (2014) informaron que el efecto de las fuerzas de turbulencia y micro-agitación con tratamientos de ultrasonido de baja potencia podría aumentar la velocidad de colisión y agregación de las partículas de proteína. Liu *et al.* (2016) informaron que tiempos prolongados de sonicación promovieron interacciones entre las moléculas de proteína conduciendo a la agregación de proteínas y formación de moléculas más grandes. Kang *et al.* (2016) informaron que el HIUS aumentó la agregación de proteínas de la carne mediante enlaces disulfuro entrecruzados y promovió su oxidación, atribuyendo estos resultados a los radicales libres producidos por la cavitación.

Tabla 1. Efecto de las condiciones de ultrasonido sobre las propiedades físicas de la proteína de haba.

	T	Código de factores		Niveles de los factores		Tamaño de partícula (nm)	IPD Adimensional	Tensión superficial (mN/m)	Solubilidad (%)	Potencial- ζ (mV)
		A (%)	B (min)							
Puntos factoriales	T1	-1	-1	50	15	311.55 ± 2.45 ^d	0.46 ± 0.01 ^d	51.95 ± 0.30 ^f	33.58 ± 0.73 ^{cde}	-23.85 ± 0.21 ^a
	T2	-1	1	50	30	228.20 ± 0.16 ^a	0.34 ± 0.00 ^b	49.25 ± 0.01 ^{bc}	37.32 ± 2.45 ^e	-24.15 ± 0.05 ^a
	T3	1	-1	70	15	225.33 ± 0.28 ^a	0.30 ± 0.00 ^a	48.17 ± 0.15 ^a	44.33 ± 1.51 ^f	-23.95 ± 0.07 ^a
	T4	1	1	70	30	265.21 ± 2.83 ^c	0.38 ± 0.01 ^c	49.30 ± 0.08 ^{bc}	30.80 ± 2.99 ^{bcd}	-26.05 ± 0.07 ^{cd}
Puntos centrales (5)	T5	0	0	60	22.5	246.75 ± 0.38 ^b	0.37 ± 0.01 ^c	49.26 ± 0.13 ^{bc}	34.85 ± 1.94 ^{de}	-25.90 ± 0.12 ^c
Puntos axiales	T6	$-\sqrt{2}$	0	45	22.5	320.10 ± 3.58 ^e	0.40 ± 0.04 ^c	50.72 ± 0.56 ^{de}	25.25 ± 2.34 ^a	-26.45 ± 0.21 ^{cd}
	T7	0	$\sqrt{2}$	60	33.7	270.65 ± 2.03 ^c	0.38 ± 0.02 ^c	49.95 ± 0.08 ^{cd}	29.41 ± 1.64 ^{abc}	-26.35 ± 0.02 ^{cd}
	T8	$\sqrt{2}$	0	75	22.5	225.95 ± 0.78 ^a	0.30 ± 0.00 ^a	48.98 ± 0.23 ^{ab}	27.24 ± 1.34 ^{ab}	-25.05 ± 0.16 ^b
	T9	0	$-\sqrt{2}$	60	11.3	306.93 ± 0.68 ^d	0.46 ± 0.04 ^d	51.25 ± 0.08 ^{ef}	34.37 ± 0.93 ^{cde}	-26.50 ± 0.14 ^d

7.2.2. Solubilidad

La solubilidad de las dispersiones de APHS varió desde $25.25 \pm 2.34\%$ (T6) a $44.33 \pm 1.51\%$ (T3), mientras que APHN tuvo $19.87 \pm 1.62\%$ (Tablas 1 y 2). Las moléculas de proteína tienden a formar agregados macromoleculares a través de interacciones no covalentes resultando en una disminución de la solubilidad (Jiang *et al.*, 2014). El HIUS disminuye el tamaño de partícula de dispersiones de proteína (Liu *et al.*, 2016), lo que aumenta la solubilidad en agua debido a una mayor área de interacción entre las moléculas de proteína y el agua (Arzeni *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2014). En general, las dispersiones de APHS mostraron mayores valores de solubilidad a tiempos relativamente cortos y amplitudes altas (Tabla 1), pero no se encontró un modelo significativo para predecir esta variable respuesta.

7.2.3. Tensión superficial

Las dispersiones de APHS exhibieron valores de tensión superficial menores que los de la dispersión de APHN (54.40 ± 0.20 mN/m). Los tratamientos de las dispersiones de APHS de 70% -15 min (T3) y 75% -22.5 min (T8) no tuvieron diferencia significativa en tensión superficial (Tabla 1). La relación entre la tensión superficial de APHS y las variables independientes fue cuadrática ($p = 0.0006$; $R^2 \text{ adj} = 0.8836$):

$$49.28 - 0.77A - 0.42B + 0.96AB + 0.52B^2 \dots\dots\dots (6)$$

La tensión superficial de las dispersiones de APHS fue afectada principalmente por la interacción AB ($p = 0.0004$), seguido por el término lineal de A ($p = 0.0010$). La disminución de la tensión superficial se relacionó con la mayor cantidad de moléculas de proteína soluble presentes que podrían adsorberse en la interfase aire-agua. Xiong *et al.* (2016) encontraron que valores menores en tensión superficial se relacionaron con tamaños de partícula y carga

superficial más pequeños, condiciones que en conjunto pueden disminuir la barrera electrostática y por lo tanto favorecer una mayor velocidad de adsorción en la interfase aire-agua. El gráfico de contorno y superficie de respuesta revelaron que la tensión superficial disminuyó cuando A aumento y B tuvo un valor bajo (Figura 5a).

7.2.4. Potencial- ζ

El potencial- ζ de las dispersiones de APHS varió desde -26.50 ± 0.14 mV (T9) a -23.85 ± 0.21 mV (T1) (Tabla 1), siendo significativamente menores que APHN (-30.15 ± 0.31 mV) (Tabla 2). La carga superficial de las proteínas surge principalmente de la ionización de los grupos superficiales (Zhao *et al.*, 2009). La disminución en la carga superficial se puede atribuir a la exposición de residuos hidrofóbicos no polares posiblemente por el despliegue de la estructura secundaria de la proteína sometida a ultrasonido (Jiang *et al.*, 2014). La mayoría de las proteínas tienen residuos hidrofóbicos no polares tales como grupos aromáticos y alquilo, grupos iónicos como $-\text{NH}^{3+}$ y $-\text{COO}^-$ así como grupos hidrofílicos polares como $-\text{OH}$ y $-\text{NH}_2$, cuyo equilibrio puede influir en la carga superficial final (Liu *et al.*, 2016). Xiong *et al.* (2016) encontraron que la aplicación de ultrasonido a la ovoalbúmina disminuyó su carga neta superficial. Este comportamiento se atribuyó a cambios irreversibles en la conformación y estructura de la proteína. Ningún modelo pudo ajustarse significativamente para predecir el potencial- ζ de las dispersiones de APHS.

7.3. Caracterización de la proteína obtenida con las condiciones optimizadas (APHOP)

Los gráficos de contorno y superficie de respuesta de tamaño de partícula y tensión superficial (Figuras 5a y b) mostraron que, en la zona inferior derecha, la interacción de AB

generó los valores mínimos para ambas variables de respuesta. El valor mínimo (óptimo) del tamaño de partícula para las dispersiones de APHS fue de 219.56 nm con un A = 72.67% y B = 16.11 min; mientras que el valor óptimo para tensión superficial fue de 48.16 mN/m con un A = 72.67% y B = 17.29 min.

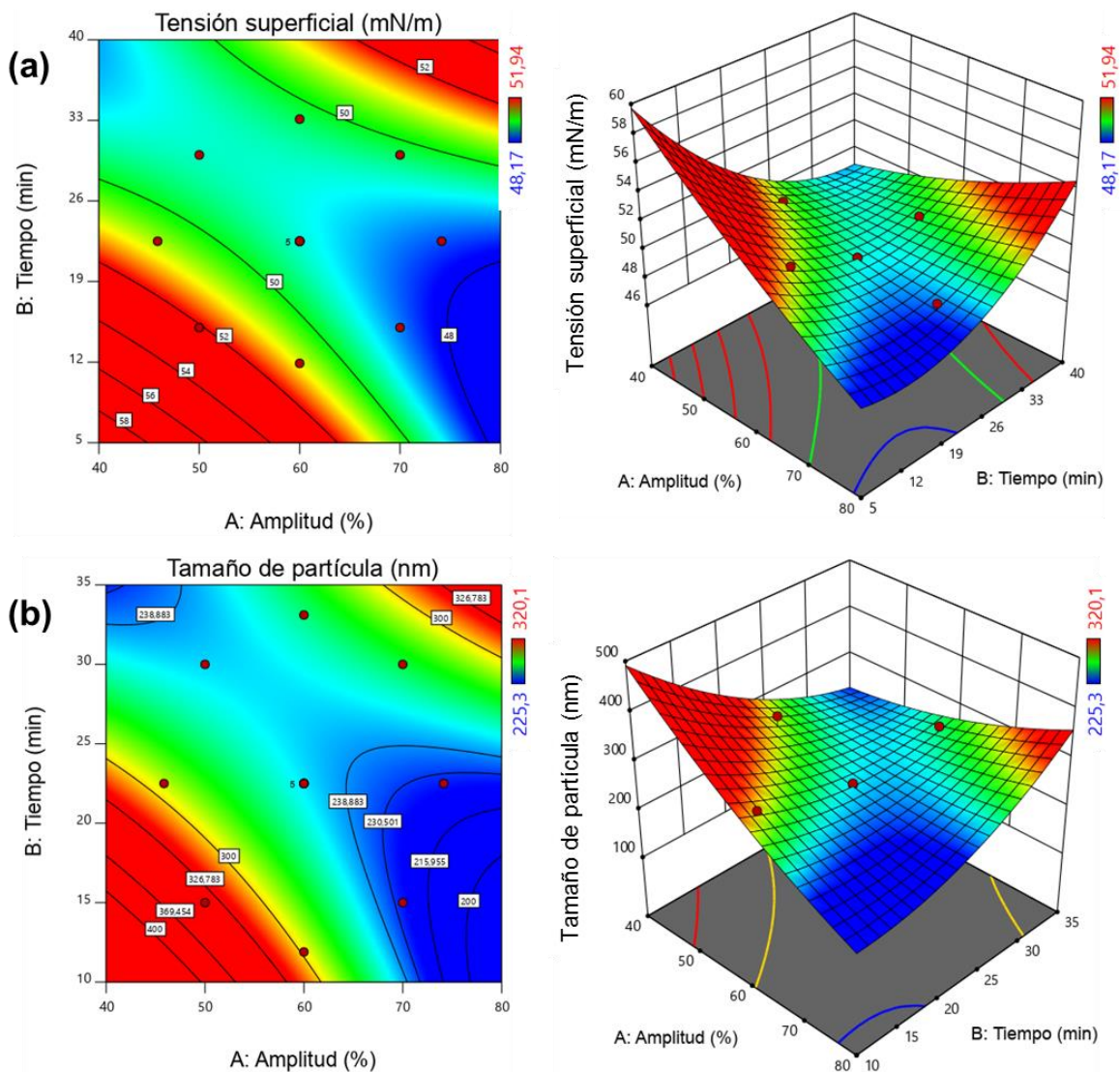


Figura 5. Efecto de la amplitud y el tiempo de ultrasonido sobre (a) tensión superficial y (b) tamaño de partícula del aislado de proteína de haba.

Dado que las condiciones de ultrasonido que generan un valor mínimo para ambas respuestas mostraron una tendencia similar, se seleccionaron aquellas de la tensión superficial para obtener el aislado de proteína de haba optimizado (APHOP).

Las propiedades fisicoquímicas de APHOP se determinaron y compararon con aquellas de APHN (Tabla 2). La aplicación de las condiciones óptimas de A y B producen una disminución significativa en tensión superficial y tamaño de partícula, y un fuerte incremento en la solubilidad de la proteína y una disminución en la carga superficial de APHOP. El valor experimental para tensión superficial de APHOP estuvo muy cercano al valor predicho de 48.17 mN/m (Tabla 2), que se atribuyó al buen ajuste proporcionado por el modelo cuadrático. En cuanto al tamaño de partícula, el valor experimental fue de aproximadamente 230.1 nm.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los aislados de proteína nativa de haba (APHN) y optimizada (APHOP).

Propiedad	APHN	APHOP
Tensión superficial (mN/m)	54.40 ± 0.20 ^b	48.16 ± 0.07 ^a
Tamaño de partícula (nm)	369.4 ± 3.09 ^b	230.1 ± 2.78 ^a
Índice de polidispersidad	0.47 ± 0.04 ^b	0.28 ± 0.02 ^a
Potencial - ζ (mV)	-30.15 ± 0.31 ^a	-24.65 ± 0.31 ^b
Solubilidad (%)	19.87 ± 1.62 ^a	35.21 ± 0.58 ^b
Viscosidad aparente (m.Pa.s)	1.176 ± 0.04 ^b	0.946 ± 0.03 ^a
DRP (%)	68.42 ± 0.26 ^b	65.98 ± 0.47 ^a

DRP = Digestibilidad relativa de proteína. Los valores son el promedio ± desviación estándar. Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre ambos tratamientos.

La viscosidad aparente de APHOP fue significativamente menor que la de APHN (Tabla 2). Hu *et al.* (2013) informaron que, durante el tratamiento con ultrasonido del aislado de proteína de soya, se produjo un movimiento rápido de moléculas debido a la cavitación y la microcorriente, lo que provocó el despliegue de las cadenas de proteínas, conduciendo a cambios en el comportamiento del flujo. Martínez *et al.* (2011) encontraron que la homogenización de alta presión del aislado de proteína de soya produjo una disminución significativa en la viscosidad de las soluciones, permitiendo una mayor incorporación de aire durante el proceso de batido. Zisu *et al.* (2013) informaron que el tratamiento de ultrasonido (A ~ 30-60% a 20 kHz) produce una disminución en el tamaño de partícula del suero de leche, que se correlacionó fuertemente con la disminución observada en la viscosidad de las dispersiones.

7.3.1. Análisis FT-IR

El FT-IR proporciona información importante con respecto a los cambios estructurales sufridos por las proteínas durante el procesamiento, por ejemplo, el tratamiento de HIUS, y el efecto de estos cambios en su digestibilidad (De María *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2011). La Figura 6a muestra los espectros FT-IR para APHN y APHOP. Las principales características espectrales consistieron de tres bandas intensas atribuidas a la amida I (1636.29 cm^{-1}), amida II (1523.54 cm^{-1}) y amida III (1250 cm^{-1}). El ultrasonido produjo una drástica disminución en la intensidad de las tres bandas de APHOP con respecto a las de APHN. La estructura secundaria de la proteína se basa comúnmente en el análisis de la banda de la amida I (Carbonaro *et al.*, 2008), donde el enlace C=O tiene un papel predominante, seguido de C-N, y por contribuciones de flexiones NH en el plano. La deconvolución de la banda de la amida I permitió aislar e identificar las estructuras secundarias de APHN (Figura 6b) y APHOP (Figura 6c).

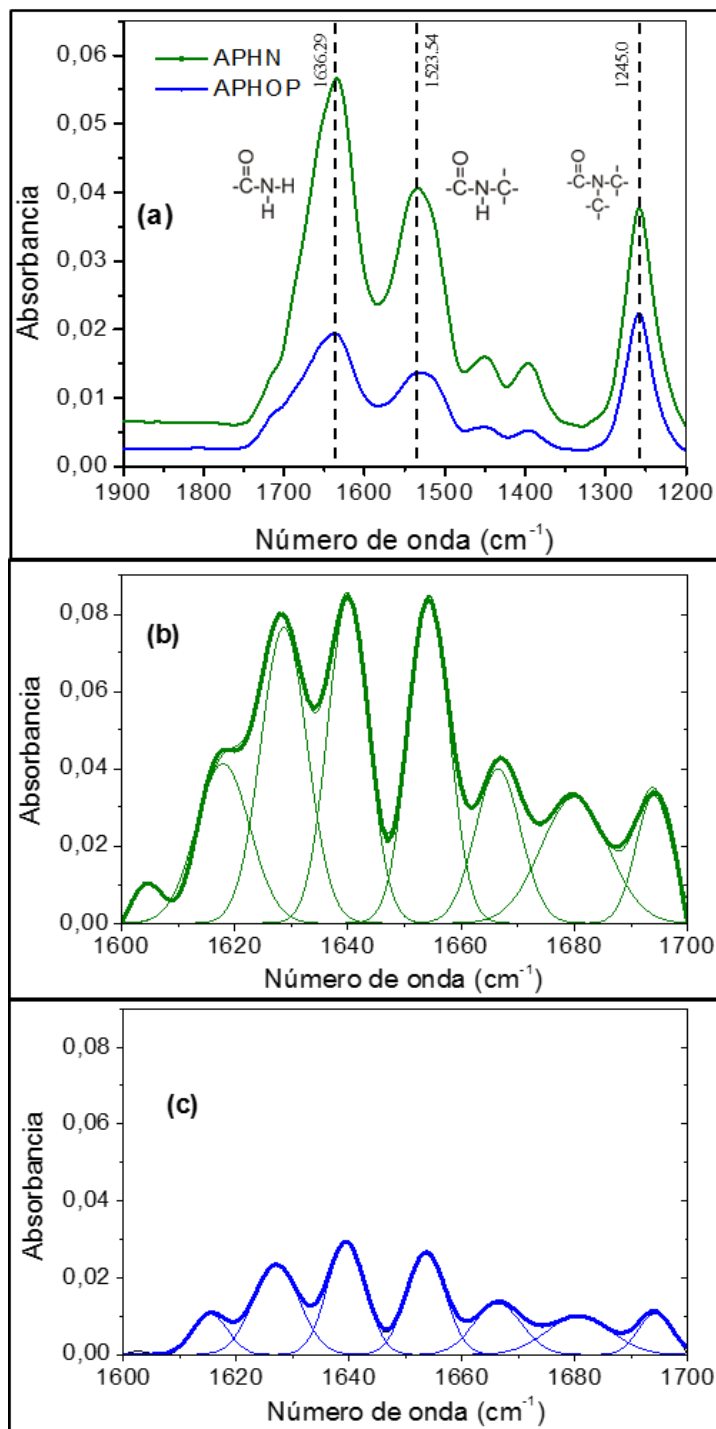


Figura 6. Espectro infrarrojo (FT-IR) en la región vibracional de las amidas (a) para los aislados de proteína nativa de haba (APHN) y optimizada (APHOP). La banda de la amida I y deconvolución espectral del APHN (b) y APHOP (c).

Ajustes gaussianos a las bandas podrían asignarse a su estructura correspondiente en función de su centro. El centro de los agregados intramoleculares, láminas- β antiparalelas, giros- β , α -hélices, láminas- β , y agregados intermoleculares (Beck *et al.*, 2017; Carbonaro *et al.*, 2008; Carbonaro *et al.*, 2012) para APHN y APHOP se proporcionan en la Tabla 3. El área de los picos se calculó para identificar los pesos espectrales relativos (W_i) y el porcentaje de las estructuras secundarias (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de pico determinados y contenido relativo de los componentes de la estructura secundaria de APHN y APHOP obtenidos de la deconvolución espectral de la banda de la amida I.

Componente de la estructura secundaria	APHN		APHOP	
	Valor del centro de pico (cm^{-1})	Contenido relativo (%)	Valor del centro de pico (cm^{-1})	Contenido relativo (%)
W_{A1}	1617.96	12.4	1615.36	7.0
W_{β}	1634.38	39.3	1633.26	41.9
W_{α}	1654.32	19.3	1653.56	19.7
W_T	1666.53	10.2	1666.29	12.2
$W_{\beta-A}$	1680.08	12.3	1680.68	12.4
W_{A2}	1694.07	6.5	1694.21	6.8
R^2	0.98		0.99	

Los símbolos en la primera línea se refieren a agregados intermoleculares (W_{A1}), láminas- β (W_{β}), α -hélices (W_{α}), giros- β (W_T), láminas- β antiparalelas ($W_{\beta-A}$) y agregados intramoleculares (W_{A2}).

Los resultados de la Tabla 3 muestran que el HIUS produjo un aumento del 6.61 % en láminas- β , 19.6 % en giros- β , 2.1 % en α -hélices, 4.6 % en agregados intramoleculares, y 0.8 % en el contenido de láminas- β antiparalelas, pero una disminución del 43.54 % en agregados intermoleculares. Los resultados de las pruebas multienzimáticas sugieren que estos cambios estructurales producen una disminución (~3.6 %) en la DRP de APHOP con respecto a la de APHN (Tabla 2), pero se requieren más estudios corroborativos para establecer este punto. Carbonaro *et al.* (2012) encontraron una alta correlación lineal negativa entre el contenido de las conformaciones- β y la digestibilidad *in vitro* de proteína en las proteínas del frijol común, garbanzo, lenteja y soya. La disminución en la digestibilidad de la proteína en función de la cantidad de conformaciones- β puede explicarse por el alto carácter hidrofóbico de estas estructuras. La menor digestibilidad de APHOP también se relacionó con el aumento de conformaciones- β . Carbonaro *et al.* (2012) esperaban que los altos contenidos de agregados inter e intramoleculares mantuvieran una correlación inversa con la digestibilidad, debido a una mayor resistencia a la proteólisis, pero ocurrió lo contrario. En nuestro caso, los agregados intramoleculares aumentaron, pero los agregados intermoleculares disminuyeron debido a la sonicación, por lo que no se pudo establecer una tendencia clara con la digestibilidad.

7.3.2. Dinámicas de adsorción en la interfase

La adsorción de la proteína es importante para la estabilización de interfaces, y por lo tanto la formación de espumas y emulsiones (Xiong *et al.*, 2016). La disminución en la tensión superficial con el tiempo en la interfase aire-agua para las dispersiones de APHN y APHOP, y del medio de dispersión sólo (SBF) se puede observar en la Figura 7.

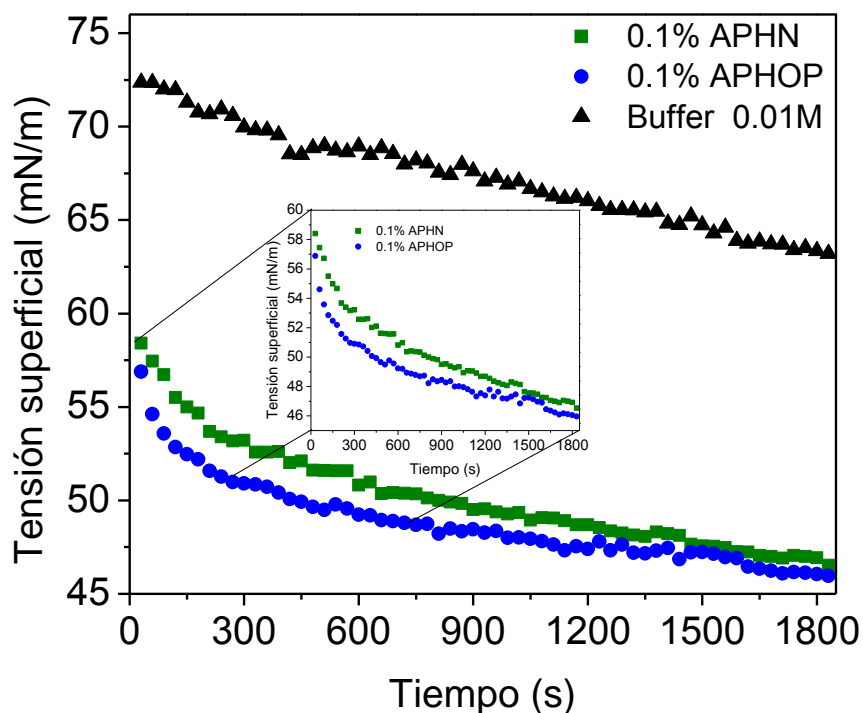


Figura 7. Comportamiento de la tensión superficial con el tiempo en la interfase aire-agua de los aislados de proteína nativa de haba (APHN) y optimizada (APHOP).

La caída inicial de la tensión fue substancial durante los primeros segundos para ambas proteínas, lo que indica que poseen fuertes propiedades de superficie activa. Sin embargo, APHOP produjo una mayor disminución de la tensión que APHN, indicando que el ultrasonido tuvo un fuerte efecto en la mejora de sus propiedades de adsorción en la interfase. Tanto APHN como APHOP mostraron dos zonas características en las dinámicas de adsorción interfacial. La primera región corresponde a una drástica disminución en la tensión relacionada a la difusión y adsorción de las moléculas de proteína en la interfase, seguida de una disminución lenta en la segunda región atribuida a la reorganización conformacional de las moléculas de proteína adsorbidas en la interfase. La mayor velocidad de disminución de la tensión superficial para APHOP respecto a APHN puede atribuirse al menor tamaño de partícula de sus moléculas, lo

que las dotó de un aumento en su actividad superficial y movilidad a la interfase (Martínez *et al.*, 2011). El ultrasonido también tuvo un efecto en la disminución del potencial- ζ neto de las moléculas de APHOP, causando una disminución en la repulsión electrostática entre ellas, lo que permitió una mayor velocidad de adsorción. O'Sullivan *et al.* (2015) encontraron que el ultrasonido produce una mejora en la conformación y empaquetado interfacial debido a la disminución significativa en el tamaño de los agregados de proteína.

La raíz cuadrada de la dependencia de la presión superficial (π) con respecto al tiempo en la interfase aire-agua fue graficada para determinar el coeficiente de difusión de APHOP y APHN (Figura 8). π aumentó progresivamente con el tiempo de adsorción y fue mayor para APHOP que para APHN (Figura 8).

El perfil de las curvas π - tiempo indica que las cinéticas de adsorción pueden incluir: (i) difusión de las moléculas de proteína desde el líquido hasta la interfase aire-agua; (ii) adsorción (penetración) a la interfase y despliegue interfacial; (iii) reordenamiento de las moléculas en la interfase, formación de multicapas y posible gelificación interfacial (Camino *et al.*, 2011). El cambio de pendiente de las curvas de la Figura 8 indicó que la adsorción controlada por la difusión ocurrió en los primeros 90 s. Tang y Shen (2015) reportaron tiempos de adsorción similares para albúmina de suero humana. La velocidad de difusión mejorada para APHOP se atribuyó en gran medida a los cambios inducidos en el tamaño y despliegue de las moléculas de proteína (Ruíz-Henestrosa *et al.*, 2007).

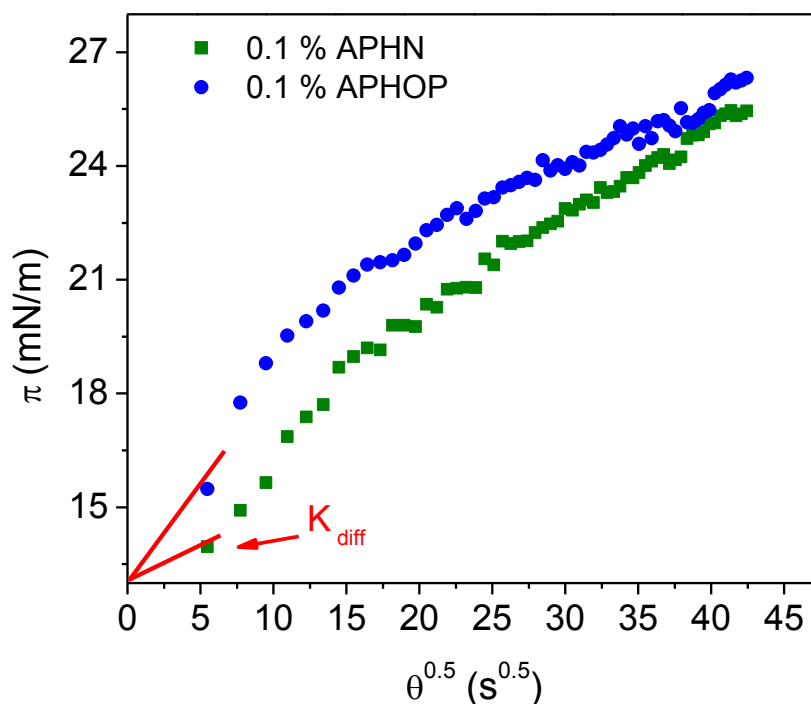


Figura 8. Dependencia de la presión superficial (π) contra la raíz cuadrada del tiempo ($\theta^{0.5}$) para los aislados de proteína nativa de haba (APHN) y optimizada (APHOP), adsorbidos en la interfase aire-agua.

La menor carga superficial, menor tamaño y mayor grado de despliegue de las moléculas de proteína se pueden asociar con una rápida disminución de la tensión superficial (Bolontrade *et al.*, 2013). APHOP presentó mayor K_{diff} que APHN (Tabla 4) probablemente debido a las diferencias en la naturaleza superficial hidrofóbica y/o hidrofílica entre estas proteínas. APHN presentó un mayor K_{diff} que el reportado para BSA nativa (0.36–0.79 mN/m · s^{0.5}), pero menor que el de la β -lactoglobulina (> 2.3 mN/m · s^{0.5}) en la interfase aire-agua. Después de un periodo corto de adsorción controlado por la difusión (90 s), la velocidad de adsorción disminuye gradualmente en la interfase debido a una barrera de energía. La siguiente ecuación se utilizó

para monitorear los coeficientes de penetración y reordenamiento de la proteína en la interfase aire-agua (Pérez *et al.*, 2009):

$$\ln[(\pi_{1800} - \pi_{\theta})/(\pi_{1800} - \pi_0)] = -k_i\theta \dots\dots\dots (7)$$

Donde: π_{1800} , π_{θ} y π_0 son las presiones superficiales en el tiempo experimental de adsorción final (1800 s), en algún momento (θ), y en el tiempo inicial (90 s), respectivamente, y k_i es la constante de velocidad de primer orden. Un gráfico de $\ln[(\pi_{1800} - \pi_{\theta})/(\pi_{1800} - \pi_0)]$ contra θ , donde el periodo de tiempo corto (< 90 s) controlado por la difusión fue eliminado del análisis, produjo dos pendiente (Figura 9): la primer pendiente está asociada a una constante cinética de penetración de primer orden (K_P), mientras que la segunda está asociada a la constante de reordenamiento (K_R) de las moléculas de proteína adsorbidas en la interfase aire-agua. Los valores de K_P para APHOP fueron mayores que para APHN (Tabla 4), posiblemente debido a que más moléculas se adsorbieron en la interfase aire-agua, debido al despliegue de las moléculas de APHOP por efecto del ultrasonido, lo que produjo la formación de capas interfaciales más gruesas.

El despliegue de la proteína aumentó la exposición de fracciones hidrofóbicas, promoviendo la adsorción y penetración en la interfase (Carbonaro *et al.*, 2010). K_R fue mayor para APHOP que para APHN, ya que el ultrasonido mejoró la solubilidad de la proteína dotándola de una mayor flexibilidad estructural, y permitiendo a las moléculas lograr con más facilidad una configuración energéticamente favorable en la interfase (Tang and Shen, 2015). La menor carga

superficial mostrada por APHOP podría facilitar una mejor reorganización de sus moléculas en la interfase, debido a la disminución de la repulsión entre ellas (Bolontrade *et al.*, 2013).

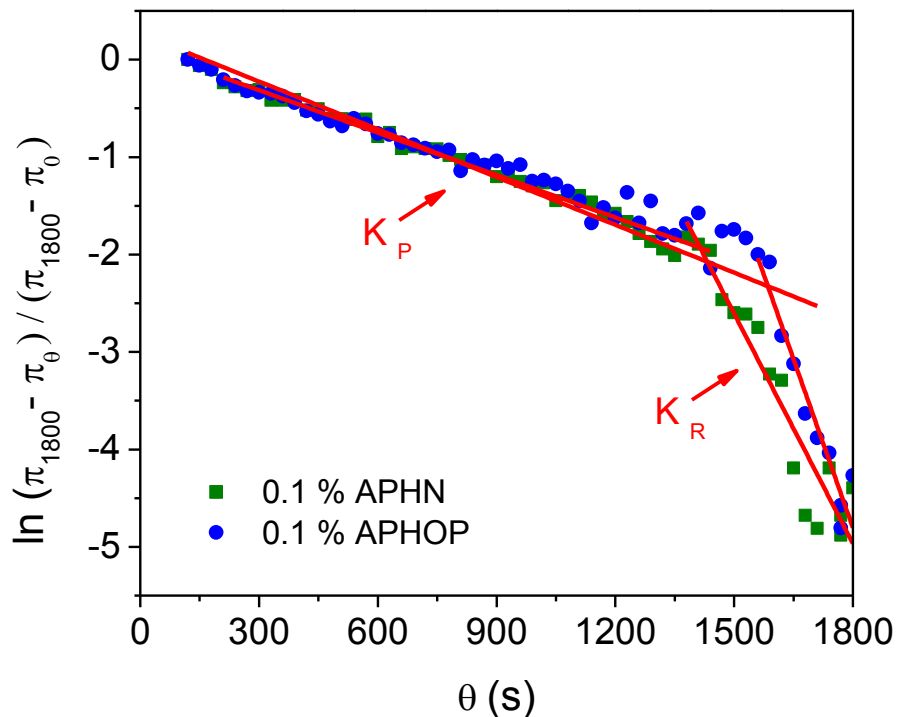


Figura 9. Gráfico del $\ln(\pi_{1800} - \pi_\theta) / (\pi_{1800} - \pi_0)$ contra el tiempo (θ) para los aislados de proteína nativa de haba (APHN) y optimizada (APHOP) adsorbidos. Las líneas sólidas describen la primer pendiente que representa el coeficiente de penetración (K_P) y la segunda pendiente el reordenamiento estructural (K_R), respectivamente.

Tabla 4. Parámetros dinámicos de adsorción de APHN y APHOP en la interfase aire-agua, incluyendo la velocidad aparente de difusión a la interfase (K_{diff}), la penetración molecular (K_P) y el reordenamiento estructural (K_R).

Código de proteína	K_{diff} (mN/m. s ^{0.5})	$K_P \times 10^3$ (s ⁻¹)	$K_R \times 10^3$ (s ⁻¹)
APHN	1.947 ± 0.005 ^b	1.45 ± 0.03 ^b	7.86 ± 0.64 ^b
APHOP	2.824 ± 0.116 ^a	1.63 ± 0.09 ^a	11.54 ± 1.10 ^a

Los datos son los promedios ± desviaciones estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa entre los promedios ($p \leq 0.05$).

7.3.3. Características espumantes

Las espumas, una vez formadas, son termodinámicamente inestables, y se deteriorarán con el tiempo. La velocidad de deterioro de las espumas depende principalmente de la velocidad de tres fenómenos físicos, drenado, coalescencia y la desproporción. El drenado es el líquido que fluye desde la espuma como consecuencia de la gravedad, conduciendo a una disminución en el volumen total de la espuma, y causando indirectamente la disminución del espesor de la película con el tiempo. La coalescencia, que es la ruptura de la delgada película que separa dos burbujas, se vuelve más probable, cuando se presenta una distribución de tamaño de burbujas que cambia hacia tamaños más grandes (Ronteltap and Prins, 1989). La desproporción es el crecimiento de burbujas de gas a expensas de las más pequeñas y se acelera como resultado del drenado. La capacidad espumante (CE) es un buen indicador de la estabilidad de la espuma (Mune and Minka, 2016).

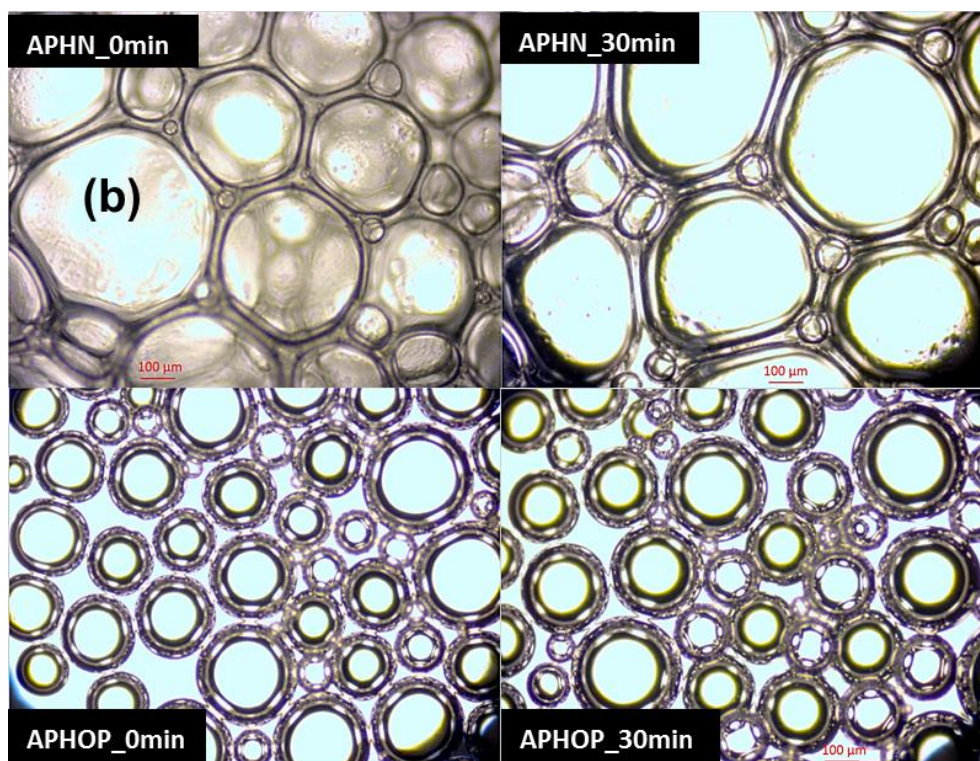
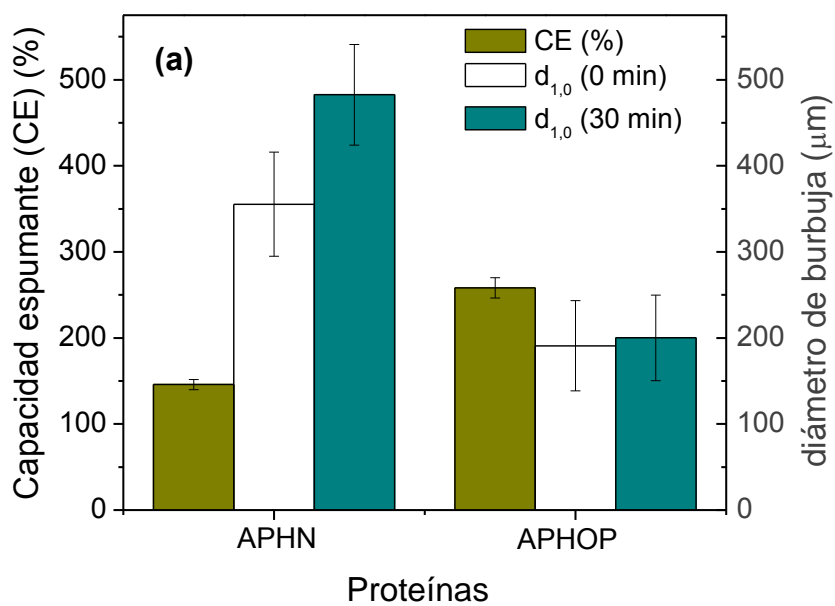


Figura 10. (a) Capacidad espumante de espumas estabilizadas con aislados de proteína nativa de haba (APHN) y optimizada (APHOP). Barras verticales indican la desviación estándar. (b) Morfología de burbujas de aire preparadas con APHN y APHOP a los 0 min y después de 30 min.

La CE de APHOP (258.3%) fue significativamente mayor que la de APHN (145.8%) (ver Figura 10a). Esto puede atribuirse a la menor viscosidad aparente de APHOP (Tabla 2), que ofrece menor resistencia a la incorporación de burbujas de aire (Martínez *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2015), y a la mayor velocidad de difusión y adsorción de las moléculas de APHOP en la interfase aire-agua. De esta manera, se produjeron burbujas más pequeñas que contribuyeron a una mayor estabilidad de la espuma (Walstra, 1993). La espuma de APHOP recién preparada presentó burbujas de aire relativamente pequeñas ($d_{1,0} = 190.0 \mu\text{m}$) con morfología esférica, distribución de tamaño unimodal y lamelas delgadas bien definidas (Figura 10b). Los cambios de la morfología esférica, espesor de la lamela y tamaño de burbuja ($d_{1,0} = 200.0 \mu\text{m}$) después de 30 min no fueron significativos. Las espumas de APHN recién preparadas mostraron burbujas en promedio mayores ($d_{1,0} = 363.5 \mu\text{m}$), morfología distorsionada (poliédrica), distribución de tamaño multimodal y lamelas menos definidas y más delgadas. Después de 30 minutos, fue evidente el engrosamiento de la espuma, y el tamaño de las burbujas evolucionó a valores significativamente mayores ($d_{1,0} = 482.5 \mu\text{m}$) (Figura 10b). Por lo tanto, una mayor y más rápida adsorción de APHOP, resultó en una mayor capacidad espumante, con películas adsorbidas más fuertes y gruesas, y lamelas con una resistencia mejorada contra el colapso de las burbujas (Ruíz-Henestrosa *et al.*, 2007).

La espuma de APHOP mostró una mayor estabilidad al drenado que la espuma de APHN (Figura 11a). Dicha estabilidad se puede relacionar con burbujas más pequeñas agrupadas en estructuras que son más resistentes a la deformación. Las espumas con estas características tienden a exhibir un mayor esfuerzo de cedencia (τ_0) (Vernon-Carter *et al.*, 2001). La Figura 11b muestra que las propiedades de flujo de las espumas se ajustaron bien al modelo de Casson, donde la espuma de APHOP muestra un $\tau_0 = 10.05 \pm 0.62 \text{ Pa}$ ($R^2 = 0.90$) y la espuma de APHN

un $\tau_0 = 4.98 \pm 0.46$ Pa ($R^2 = 0.97$), confirmando que τ_0 fue inversamente proporcional al tamaño de la burbuja y drenado del líquido.

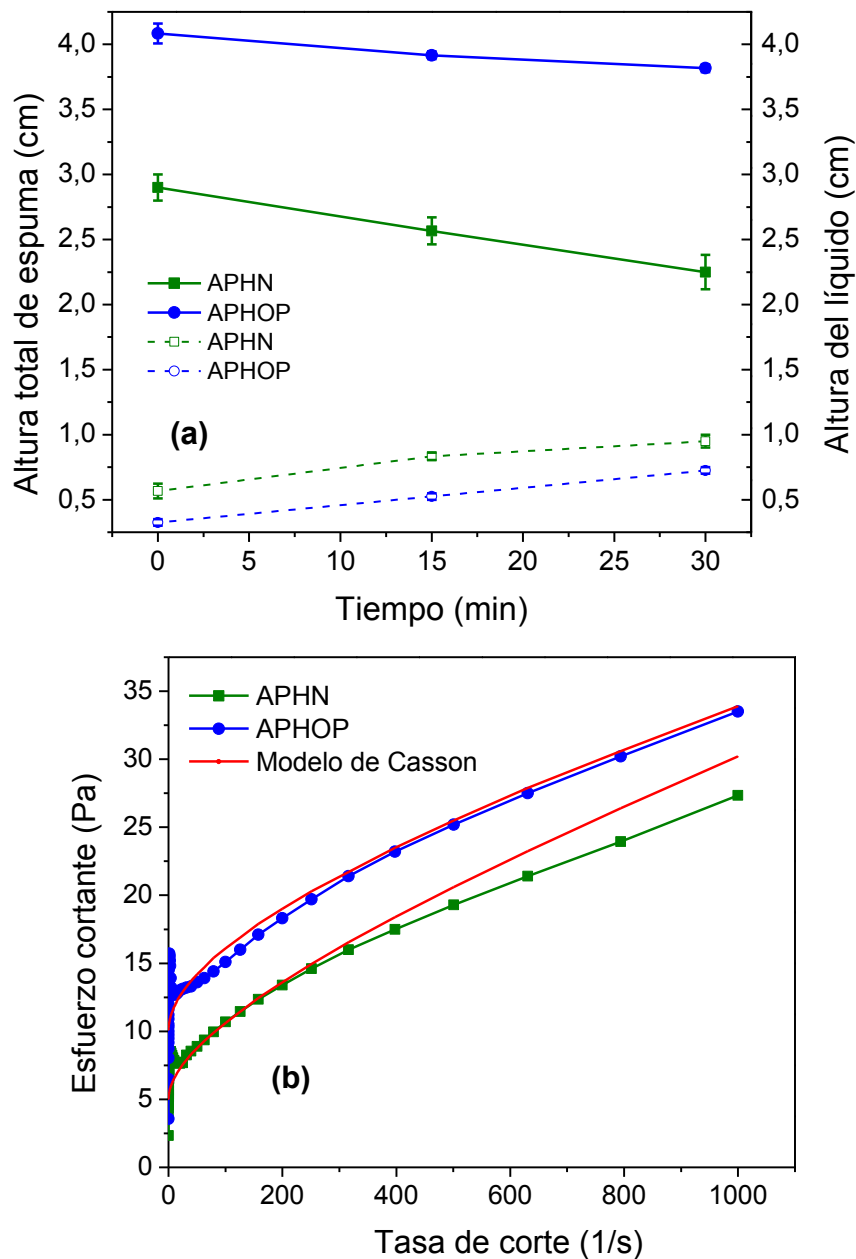


Figura 11. (a) Variaciones en la altura total de la espuma (símbolos llenos) y altura del líquido de drenado (símbolos vacíos) para espumas estabilizadas con aislados de proteína nativa de haba (APHN) y optimizada (APHOP) durante 30 min. (b) Cambios en el esfuerzo cortante en función de la tasa de corte para las espumas estabilizadas con APHN y APHOP.

8. CONCLUSIONES

Las condiciones optimizadas del proceso con ultrasonido de alta intensidad de 72.67 % de amplitud durante 17.29 min se obtuvieron por metodología de superficie de respuesta y se aplicaron al aislado de proteína nativa de haba (APHN) para obtener un aislado de proteína de haba optimizado (APHOP). APHOP exhibió una tensión superficial, tamaño de partícula y potencial zeta significativamente menores, y mayor solubilidad respecto a APHN. El análisis de las curvas de dinámicas de adsorción en la interfase aire-agua permitió estudiar a detalle las propiedades superficiales de la proteína de haba mediante la obtención de los coeficientes de difusión, penetración y reacomodo configuracional, donde APHOP obtuvo valores significativamente mayores que APHN, indicando que el ultrasonido favorece un claro aumento de la actividad superficial y movilidad a la interfase. Los resultados obtenidos indican que el ultrasonido es un método eficiente, económico y amigable con el medio ambiente para producir proteína de haba con una funcionalidad mejorada, lo que puede incrementar la utilización de este cultivo.

9. REFERENCIAS

- AOAC. (2005). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 18th ed. Washington, DC, USA.
- Arogundade, L. A., Tshay, M., Shumey, D., Manazie, S. (2006). Effect of ionic strength and/or pH on extractability and physico-functional characterization of broad bean (*Vicia faba* L.) protein concentrate. *Food Hydrocolloids*, 20, 1124–1134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.12.010>.
- Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E., Pilosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108, 463–472. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.018>.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins: A review. *Biochimica et Biophysica Acta* 1767, 1073–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.06.004>.
- Beck, S. M., Knoerzer, K., Sellahewa, J., Emin, M. A., Arcot, J. (2017). Effect of different heat-treatment times and applied shear on secondary structure, molecular weight distribution, solubility and rheological properties of pea protein isolate as investigated by capillary rheometry. *Journal of Food Engineering*, 208, 66–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.016>.
- Berry, T. K., Yang, X., Foegeding, E. A. (2009). Foams prepared from whey protein isolate and egg white protein: 2. Changes associated with angel food cake functionality. E269-E277.
- Bolontrade, A. J., Scilingo, A. A., Añón, M. C. (2013). Amaranth proteins foaming properties: adsorption kinetics and foam formation—Part 1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105, 319–327. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.039>.

- Camino, N. A., Sánchez, C. C., Patino, J. M. R., Pilosof, A. M. R. (2011). Hydroxypropylmethylcellulose at the oil-water interface. Part I. Bulk behaviour and dynamic adsorption as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 25, 1–11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.012>.
- Carbonaro, M., Maselli, P., Dore, P., Nucara, A. (2008). Application of Fourier transform infrared spectroscopy to legume seed flour analysis. *Food Chemistry*, 108, 361–368. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.045>.
- Carbonaro, M., Masseli, P., Nucara, A. (2012). Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study. *Amino Acids*, 43, 911–921. <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-011-1151-4>.
- Carbonaro, M., Nucara, A. (2010). Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. *Amino Acids*, 38, 679–690. <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-009-0274-3>.
- Cárcel, J. A., García-Pérez, J.V., Benedito, J., & Mulet, A. (2012). Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. *Journal of Food Engineering*, 110 (2), 200-207. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.038>.
- Cepeda, E., Villarán, M. C., Aranguiz, N. (1998). Functional properties of faba bean (*Vicia faba*) protein flour dried by spray drying and freeze drying. *Journal of Food Engineering*, 36, 303–310. [http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774\(98\)00061-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774(98)00061-2).
- Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2012a). Ultrasonics in food processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19 (5), 975–983. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.01.010>.

- Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2012b). Ultrasonics in food processing - Food quality assurance and food safety. *Trends in Food Science & Technology*, 26 (2), 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.01.010>.
- Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18 (4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>.
- Corona, E., Garcia-Perez, J.V., Gomez Alvarez-Arenas, T.E., Watson, N., Povey, M.J.W., & Benedito, J. (2013). Advances in the ultrasound characterization of dry-cured meat products. *Journal of Food Engineering*, 119 (3), 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.023>.
- De María, S., Ferrari, G., Maresca, P. (2017). Effects of high hydrostatic pressure on the enzymatic hydrolysis of bovine serum albumin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 3151–3158. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8157>.
- De Prados, M., García-Pérez, J.V., & Benedito, J. (2015). Non-destructive salt content prediction in brined pork meat using ultrasound technology. *Journal of Food Engineering*, 154, 39– 48. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.12.024>.
- Derbyshire, E., Wright, D. J. and Boulter, D. (1976). Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry*, 15, 3-24. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89046-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89046-9).
- Duranti, N. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties: A review. *Fitoterapia*, 77, 67-82.
- Elsohaimy, S. A., Refaay, T. M., Zaytoun, M. A. M. (2015). Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Annals of Agricultural Sciences*, 60, 297–305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aogas.2015.10.007>.

- Esclapez, M. D., García-Pérez, J.V., Mulet, A., & Cárcel, J. A. (2011). Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews*, 3 (2), 108–120.
- González-Pérez, S., Arellano, J. B. (2009). 15-Vegetable protein isolates, in: Handbook of Hydrocolloids (Second edition). *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, 383-419. <https://doi.org/10.1533/9781845695873.383>.
- Güzey, D., Gülseren, I., Bruce, B., Weiss, J., Gu, D., Gu, I. (2006). Interfacial properties and structural conformation of thermosonicated bovine serum albumin. *Food Hydrocolloids*, 20, 669–677. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.06.008>.
- Guzey, D., Kim, H. J., and McClements, D. J. (2004). Factors influencing the production of o/w emulsions stabilized by β -lactoglobulin-pectin membranes. *Food Hydrocolloids*, 18, 967–975. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.04.001>.
- Henning, T., Mothes, R., Dudek, S., Krause, J. P., & Schwenke, K. D. (1997). Structural and functional changes of faba bean legumin during super-limited tryptic hydrolysis. *Nahrung*, 41 (2), 81–86.
- Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L. D., Miller, G. A. (1977). A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science*, 42 (5), 1269–1273. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb14476.x>.
- Hu, H., Wu, J., Li-chan, E.C.Y., Zhu, L., Zhang, F., Xu, X., Fan, G., Wang, L., Huang, X., Pan, S. (2013). Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. *Food Hydrocolloids*, 30, 647–655. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.08.001>.

- Husband, F. A., Wilde, P. J., Clark, D. C., Rawel, H. M., Muschiolik, G. (1994). Foaming properties of modified faba bean protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 8 (55), 455-468. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80088-X](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80088-X).
- Indrawati, L., Narsimhan, G. (2008). Characterization of protein stabilized foam formed in a continuous shear mixing apparatus. *Journal of Food Engineering*, 88, 456-465. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.03.003>.
- Jambrak, A. R., Lelas, V., Mason, T. J., Krešić, G., Badanjak, M. (2009). Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*, 93, 386-393. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.02.001>.
- Jiang, L., Wang, J., Li, Y., Wang, Z., Liang, J., Wang, R., Chen, Y., Ma, W., Qi, B., Zhang, M. (2014). Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. *Food Research International*, 62, 595-601. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.022>.
- Kang, D. C., Zou, Y. H., Cheng, Y. P., Xing, L. J., Zhou, G. H., Zhang, W. G. (2016). Effects of power ultrasound on oxidation and structure of beef proteins during curing processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 33, 47-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.04.024>.
- Karaca, A. C., Low, N., Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, 44, 2742-2750. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.012>.
- Kentish, S. and Ashokkumar, M. (2011). The Physical and Chemical Effects of Ultrasound, in: H. Feng et al. (eds.), *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing. Food Engineering Series* (Chapter 1). DOI 10.1007/978-1-4419-7472-3_1.

- Kocszo, K., Lobo, L. A., y Wasan, D. T. (1992). Effect of oil on foam stability: aqueous foams stabilized by emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 150 (2), 492-506. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(92\)90218-B](https://doi.org/10.1016/0021-9797(92)90218-B).
- Lim, K. S., and Barigou, M. (2005b). Ultrasound-assisted generation of foam. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 44, 3312–3320.
- Liu, S., Liu, Y., Huang, X., Yang, W., Hu, W., Pan, S. (2016). Effect of ultrasonic processing on the changes in activity, aggregation and the secondary and tertiary structure of polyphenol oxidase in oriental sweet melon (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 1326–1334. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.7869>.
- Luque de Castro, M.D., & Priego Capote, F. (2007). *Analytical applications of ultrasound*. Elsevier.
- Maforimbo, E. (2001). In vitro relative protein digestibility and lipoxygenase activity used as parameters to test and compare quality in five varieties of soybean meals. *Journal of Food Technology in Africa*, 6 (2), 48–52. <http://dx.doi.org/10.4314/jfta.v6i2.19286>.
- Martínez, K. D., Ganesan, V., Pilosof, A. M. R., Harte, F. M. (2011). Effect of dynamic highpressure treatment on the interfacial and foaming properties of soy protein isolate/hydroxypropylmethylcelluloses systems. *Food Hydrocolloids*, 25, 1640–1645. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.013>.
- Mason, T. J., & Lorimer, J. P. (2002). *Applied sonochemistry. The uses of power ultrasound in chemistry and processing*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Mitropoulos, V., Mütze, A., Fischer, P. (2014). Mechanical properties of protein adsorption layers at the air/water and oil/water interface: A comparison in light of the thermodynamical stability of proteins. *Advances in Colloid and Interface Science*, 206: 195-206. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.11.004>.

- Mizrach, A. (2008). Ultrasonic technology for quality evaluation of fresh fruit and vegetables in pre- and postharvest processes: A review. *Postharvest Biology and Technology*, 48 (3), 315–330. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.10.018>.
- Morales, R., Martínez, K. D., Ruiz-Henestrosa, V. M. P., Pilosof, A. M. R. (2015). Modification of foaming properties of soy protein isolate by high ultrasound intensity: particle size effect. *Ultrasonics Sonochemistry*, 26, 48–55, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.01.011>.
- Mune, M. A. M., Minka, S. R. (2016). Production and characterization of cowpea protein hydrolysate with optimum nitrogen solubility by enzymatic hydrolysis using pepsin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 2561–2568. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8076>.
- Murray, B. S. (2007). Stabilization of bubbles and foams. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 12, 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.07.009>.
- O’Sullivan, J., Beevers, J., Park, M., Greenwood, R., Norton, I. (2015). Comparative assessment of the effect of ultrasound treatment on protein functionality pre- and postemulsification. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 484, 89–98, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.07.065>.
- O’Sullivan, J., Murray, B., Flynn, C., Norton, I. (2016). The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. *Food Hydrocolloids*, 53, 141–154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.009>.
- Olmedilla-Alonso, B., Farré-Rovira, R., Asensio-Vegas, C., Martín-Pedrosa, M. (2010). Papel de las leguminosas en la alimentación actual. *Actividad dietética* 14 (2): 72-76. [https://doi.org/10.1016/S1138-0322\(10\)70014-6](https://doi.org/10.1016/S1138-0322(10)70014-6).
- Ozuna, C., Paniagua-Martínez, I., Castaño-Tostado, E., Ozimek, L., Amaya-Llano, S. L. (2015). Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food

- ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides: A review. *Food Research International*, 77 (4), 685-696. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.10.015>.
- Papalamprou, E. M., Doxastakis, G. I., & Kiosseoglou, V. (2010). Chickpea protein isolates obtained by wet extraction as emulsifying agents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90 (2), 304–313.
- Parmar, N., Singh, N., Kaur, A., Viridi, A. S., Shevkani, K. (2017). Protein and microstructure evaluation of harder-to-cook and easy-to-cook grains from different kidney bean accessions. *LWT – Food Science and Technology*, 79, 487–495. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.027>.
- Pérez, L. D. J., González, H. A., Franco, M. O., Rubí, A. M., Ramírez, D. J. F., Castañeda, V. A., Aquino, M. J. G. (2014). Application of multivariate methods to identify outstanding broad bean cultivars for the State of Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5, 265–278.
- Pérez, O. E., Sánchez, C. C., Pilosof, A. M. R., Patino, J. M. R. (2009). Surface dilatational properties of whey protein and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixed systems at the air–water interface. *Journal of Food Engineering*, 94, 274–282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.03.019>.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control*, 31 (2), 593–606. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.039>.
- Qu, W., Zhang, X., Chen, W., Wang, Z., He, R., Ma, H. (2018). Effects of ultrasonic and graft treatments on grafting degree, structure, functionality, and digestibility of rapeseed protein isolate-dextran conjugates. *Ultrasonics Sonochemistry*, 42, 250–259. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.11.021>.

- Ronteltap, A.D., Prins, A. (1989). Contribution of drainage, coalescence, and disproportionation to the stability of aerated foodstuffs and the consequences of bubble size distribution as measured by a newly developed optical glass-fibre technique, in: R.D. Bee, P. Richmond, J. Mingins (Eds.), *Food colloids*, Royal Society of Chemistry, London, pp. 39–47.
- Roy, F., Boye, J. I., & Simpson, B. K. (2010). Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International*, 43 (2), 432–442. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.002>.
- Ruíz-Henestrosa, V. P., Sánchez, C. C., Escobar, M. M. Y., Jiménez, J. J. P., Rodríguez, F. M., Patino, J. M. R. (2007). Interfacial and foaming characteristics of soy globulins as a function of pH and ionic strength. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 309, 202–215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.01.030>.
- Saunders, R. M., Connor, M. A., Booth, A. N., Bickoff, E. M., Kohler, G. O. (1973). Measurement of digestibility of alfalfa protein concentrates by in vivo and in vitro methods. *The Journal of Nutrition*, 103, 530–535.
- Schramm L. L. (2005). *Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications*. WILEY- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. ISBN: 3-527-30743-5.
- Schramm, G. (2000). *A practical approach to rheology and rheometry*. 2nd Edition. Gebrueder HAAKE GmbH, Karlsruhe. Germany. pp. 1-291.
- Soria, A.C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 21 (7), 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>.
- Swanson, B. G. (1990). Pea and lentil protein extraction and functionality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67 (5), 276–280.

- Tan, M. C., Chin, N. L., Yusof, Y. A., Taip, F. S., Abdullah, J. (2015). Characterisation of improved foam aeration and rheological properties of ultrasonically treated whey protein suspension. *International Dairy Journal*, 43, 7–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.09.013>.
- Tang, C. H., Shen, L. (2015). Dynamic adsorption and dilatational properties of BSA at oil/water interface: role of conformational flexibility. *Food Hydrocolloids*, 43, 388–399. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.06.014>.
- Tao, Y., & Sun, D. -W. (2015). Enhancement of food processes by ultrasound: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55 (4), 570–594.
- Tovar-Benítez, T., Jiménez-Martínez, C., Perea-Flores, M. J., Téllez-Medina, D. I., Dávila-Ortiz, G. (2016). Microencapsulation of bayo bean (*Phaseolus vulgaris*) protein hydrolysate with inhibitory activity on angiotensin-i converting enzyme through freeze-drying. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15, 797–807.
- Vaclavik V.A., Christian E.W. (2008) Food Emulsions and Foams. In: Essentials of Food Science. Food Science Texts Series. Springer, New York, NY.
- Vernon-Carter, E. J., Espinosa-Paredes, G., Beristain, C. I., Romero-Tehuitzil, H. (2001). Effect of foaming agents on the stability, rheological properties, drying kinetics and flavour retention of tamarind foam-mats. *Food Research International*, 34, 587–598. [http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00076-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00076-X).
- Vioque, J., Alaiz, M., Girón-Calle, J. (2012). Nutritional and functional properties of Vicia faba protein isolates and related fractions. *Food Chemistry*, 132, 67–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.033>.
- Walstra, P. (1993). Principles of emulsion formation. *Chemical Engineering Science*, 48 (2), 333–349. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(93\)80021-H](https://doi.org/10.1016/0009-2509(93)80021-H).

- Wang, C., Jiang, L., Wei, D., Li, Y., Sui, X., Wang, Z., Li, D. (2011). Effect of secondary structure determined by FTIR spectra on surface hydrophobicity of soybean protein isolate. *Procedia Engineering*, 15, 4819–4827. <http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2011.08.900>.
- Weiss, J., and Seshadri, R. (2001). Modifying interfacial and colloidal properties of proteins using thermosonication. *Abstracts of Papers of the Annual Meeting of the ACS*,
- Xiong, W., Wang, Y., Zhang, C., Wan, J., Shah, B. R., Pei, Y., Zhou, B., Li, J., Li, B. (2016). High intensity ultrasound modified ovalbumin: structure, interface and gelation properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 302–309. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.01.014>.
- Zhao, Y., Li, F., Carvajal, M. T., Harris, M. T. (2009). Interactions between bovine serum albumin and alginate: an evaluation of alginate as protein Carrier. *Journal of Colloid and Interface Science*, 332, 345–353. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2008.12.048>.
- Zisu, B., Schleyer, M., Chandrapala, J. (2013). Application of ultrasound to reduce viscosity and control the rate of age thickening of concentrated skim milk. *International Dairy Journal*, 31, 41–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.04.007>.

10. ANEXO

Publicación

High intensity ultrasound treatment of faba bean (*Vicia faba* L.) protein: Effect on surface properties, foaming ability and structural changes.

Alejandro Martínez-Velasco, Consuelo Lobato-Calleros, Blanca E. Hernández-Rodríguez, Angélica Román-Guerrero, Jose Alvarez-Ramirez, E. Jaime Vernon-Carter.

Ultrasonics Sonochemistry, (2018), 44, 97-105.



High intensity ultrasound treatment of faba bean (*Vicia faba* L.) protein: Effect on surface properties, foaming ability and structural changes

Alejandro Martínez-Velasco^a, Consuelo Lobato-Calleros^{b,*}, Blanca E. Hernández-Rodríguez^b, Angélica Román-Guerrero^a, Jose Alvarez-Ramirez^c, E. Jaime Vernon-Carter^c

^a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, México, Ciudad de México 09340, Mexico

^b Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5, Carretera México-Texcoco, 56230 Texcoco, Mexico

^c Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, México, Ciudad de México 09340, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Faba bean protein
Ultrasound
Interfacial properties
Foaming ability
Digestibility
Solubility

ABSTRACT

Response surface methodology was used for establishing the amplitude (72.67%) and time (17.29 min) high-intensity ultrasound (HIUS) conditions leading to an optimized faba bean protein isolate (OFPI) with lower interfacial tension, zeta potential and viscosity, and higher solubility than native faba bean protein isolate (NFPI). OFPI showed significantly higher adsorption dynamics at the air-water interface, and produced foam with significant smaller bubble diameter, higher overrun, stability and yield stress, and lower liquid drainage than NFPI. Fourier Transform Spectroscopy (FT-IR) revealed that the secondary structure of OFPI deferred from NFPI in terms of increases in β conformations (6.61% β -sheet, 19.6% β -turn, 0.8% anti-parallel β -sheet) and decreases in inter-molecular aggregates (43.54%). Multienzyme study pinpointed that the structural changes could have induced a decrease on the relative protein digestibility of OFPI respect that of NFPI. The results of this work demonstrate that HIUS technology improves the surface and foaming properties of faba bean protein isolate, which may favour the revalorisation of this crop.

1. Introduction

Faba bean (*Vicia faba* L.) has a protein content only slightly lower than soybean, and is the seventh most important food grain legume in the world [1,2]. Despite this, faba bean is rather used as animal feed than as human food, so revalorization of this crop based on the production of a functional protein for the food industry would be of great interest [3]. There are very few studies regarding the functional properties of native faba bean protein. Spray-drying and freeze-drying of faba bean protein flour affected its solubility, emulsification, water retention, viscosity and enzymatic hydrolysis properties [4]. Foam formed with faba bean protein concentrate was more stable at pH 4 than at pH 2, 10 and 12, but its overrun was lower at pH 4 than at pH 12 and 2 [5]. The emulsifying activity of native faba bean protein isolate was comparable to that of soybean and lentil protein isolates, but lower than that of chickpea protein isolate [6]. The application of high-intensity ultrasound (HIUS) for modifying biopolymers properties has been increasingly studied [7]. The functionality of proteins, such as solubility, gelation, emulsification and foamability has been improved by HIUS [8–11], possibly due to cavitation, heating, agitation, shear

stress and turbulence, which induce chemical and physical changes in the molecules [12]. However, there is not a single report regarding the effect of HIUS on the structure-functional properties of faba bean protein, and to our knowledge there is scant information about the effect of HIUS on the digestibility of plant proteins in general. Plant proteins have low digestibility and it is desirable to evaluate the effect of HIUS on protein digestibility. Recently, it was reported that the digestibility of rapeseed protein isolate-dextran conjugates was decreased by ultrasonic treatment [13].

The aim of this study was to determine the effects of ultrasound treatment on the: (a) physicochemical and surface properties; (b) foaming ability, stability, morphology, bubbles size and rheology of foams; and (c) structure and relative digestibility of faba bean protein isolate in comparison to those displayed by native faba bean protein isolate.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Faba bean (*Vicia faba* L.) grains of the Diamante variety were

* Corresponding author.

E-mail address: ac2392@chapingo.mx (C. Lobato-Calleros).

obtained from a local producer from the community of San Lucas Xolox, Tecamac, State of Mexico, Mexico, with GPS coordinates of 19° 46' 25" N and 98° 58' 54" W and an elevation above sea level of 2,250 m. The plant was grown during the spring-summer cycle of 2015. Annual mean rainfall and temperature were of 622 mm and 12–18 °C, respectively. Soil had frankly-clay structure, was slightly alkaline (pH 7.4), and climate was temperate-sub-humid classified as type C (w_0) (w) b in Köppen classification. The plant was harvested when it achieved physiological maturity, which occurred after 180 days of sowing. Grains were dried in a convection oven at 35 °C until a moisture content of 13% was achieved. The grains were packed in polyethylene bags and kept at room temperature until required. All reagents used were analytical grade and were obtained from J.T. Baker (Xalostoc, State of Mexico, Mexico). The water used in all the experiments was distilled and deionized (DDW).

2.2. Obtention and characterization of the faba bean protein isolate

Whole grains of faba bean were ground into a fine flour and defatted by extraction with hexane in a Soxhlet apparatus during 4 h. Isoelectric-precipitated native faba bean protein isolate (NFPI) was obtained as follows: 100 g defatted flour was dispersed in DDW at 1:10 ratio for 10 min at 800 rpm. pH was adjusted to 9.5 using 2.5 N NaOH, and stirred at 800 rpm for 40 min at room temperature (20–22 °C). The alkaline extract was centrifuged (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburg, Germany) at 5,000 rpm for 15 min at 4 °C, and the supernatant was filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore Co., Milford, NH, USA) and pH was adjusted to 3.6 (NFPI isoelectric point) using 2.5 N HCl, maintaining stirring for 30 min. The precipitated protein was isolated by centrifugation at 6,000 rpm for 15 min at 4 °C and washed 3 times for 30 min using DDW (added with 0.02% sodium azide in order to prevent microbial growth [7]) at 1:10 ratio [1]. Finally, the mixture was dried at 35 °C for 42 h in an air-circulating oven (Riossa Digital HCF-62, Mexico City, Mexico). Moisture, protein (conversion factor of 6.25) and fat contents were determined [14].

2.3. Ultrasound treatment

NFPI dispersions (10 g/L; phosphate buffer 0.1 mol/L, pH 7.4, 50 mL, 0.02% sodium azide) were ultrasonicated (Ultrasonic processor, Model VCX 130 PB 500/750 W, with 8 mm diam. stainless steel probe, Sonics and Materials, Inc., Newtown, CT, USA) at a frequency of 20 kHz. An ice-water bath was used to dissipate heat produced during sonication [10]. A 2² factorial central composite design (CCD) was used to analyse the effects of the amplitude (A) and time (B) on the surface tension, solubility, particle size and zeta potential (ζ -potential) of the protein. The coded values of the experimental factors and their levels are shown in Table 1. After ultrasound treatment, all samples were dried at 35 °C in a convection oven for 36 h and then a fine powder (SFPI) was obtained by grinding.

2.3.1. Protein stock dispersions

Stock dispersions (10 g/L) of NFPI and SFPI treatments (Table 1) were dispersed in phosphate buffer solution (PBS; 0.01 mol/L, pH 7.4) by gentle stirring for 3 h, let to stand overnight, and centrifuged at 5,000 rpm for 15 min at 20 °C to obtain supernatants, which were filtered through a 0.45 µm membrane filter. When required, the stock dispersions were diluted with PBS.

2.3.2. Solubility

The solubility of NFPI and SFPI was determined as follows: 100 mg of the protein powder were dispersed in 10 mL of the PBS. The solution was stirred for 30 min and centrifuged at 5,000 rpm for 15 min at 20 °C. The crude protein content in the supernatants was measured using the Lowry method and bovine serum albumin was used for generating the standard curve [15]. The supernatants absorbance at 750 nm was

measured with a Genesys 10S UV-VIS spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Protein solubility was expressed as the percentage of protein remaining in solution.

2.3.3. Particle size

The NFPI and SFPI stock dispersions were diluted in a ratio 1:2, and 1 mL samples were used for particle size measurement as hydrodynamic diameter (d_h), and the width of the size distribution was determined as polydispersity index (PDI) with a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), using a refraction index of 1.334 and an absorption index of 0.001 [9].

2.3.4. ζ -Potential

The ζ -potential of each of the protein dispersions was measured with the Zetasizer Nano ZS90. The stock dispersions diluted in a ratio 1:2 were placed in a capillary cell for ζ [16].

2.3.5. Surface tension

The surface tension of the protein stock dispersions was measured with a Du Nouy tensiometer (CSC Scientific Company Inc., Fairfax, VA, USA). Samples (5 mL) were placed in 4.3 cm diameter Petri dishes, in which a platinum-iridium ring was submerged. The force required to withdraw a ring from the surface of the protein dispersion was measured and the actual surface tension ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) was obtained using equations provided by the manufacturer.

2.4. Ultrasonication optimization by response surface methodology

An optimized faba protein isolate (OFPI) was obtained by applying the optimal A and B sonication conditions, determined as described in the statistical analysis subsection.

2.5. Physicochemical characteristics of NFPI and OFPI

The surface tension, solubility, particle size and ζ -potential were determined for NFPI and OFPI as described above. In the following, methods for characterizing additional physicochemical properties are described.

2.5.1. Apparent viscosity

The apparent viscosity of the protein stock dispersions was determined at a fixed shear rate (50 s^{-1}) with a MRC 301 rheometer (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Germany) coupled to concentric cylinder geometry at 25 °C.

2.5.2. Relative protein digestibility (RPD)

Protein quality measurements are used to predict their nutritional quality, and tests are designed to reflect the content and bioavailability of amino acids, and protein digestibility. While amino acid profile pattern is probably the most determinant of protein quality, digestibility of protein and bioavailability of its constituent amino acids are the next important factors. The susceptibility of a protein to enzymatic hydrolysis in the digestive system is directly related to primary, secondary and tertiary structure of the protein [17]. *In vitro* multienzyme protein digestibility assays have been found to highly correlate with the *in vivo* apparent digestibility of rats, and the most significant advantage of this *in vitro* method for predicting apparent protein digestibility is that it is fast, economical and is highly sensitive [18–19]. In this work, the multienzyme method of Elsohaimy et al. [20] was employed. Porcine pancreatic trypsin (type IX, 15,310 units $\cdot\text{mg}^{-1}$ protein), bovine b pancreatic chymotrypsin (type II, 48 units $\cdot\text{g}^{-1}$ of solid), porcine intestinal peptidase (P-7500, 115 units $\cdot\text{mg}^{-1}$ of solid) and bacterial protease (type XIV, 4.4 units $\cdot\text{mg}^{-1}$ of solid) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) were used for the enzymatic digestion. Sample (63.8 mg) was added to 10 mL of distilled water and the pH was adjusted to 8.0 with 1 N NaOH. One mL of enzyme aqueous solution

(1.58 mg of trypsin, 3.65 mg of chymotrypsin and 0.45 mg of peptidase) was added to the protein sample and digestion was allowed to proceed for 10 min at 37 °C. After addition of 1 mL (1.48 mg) of bacterial protease solution, the digestion was continued for 9 min at 55 °C. The pH value was registered after a further 1 min and used to estimate the RPD according the following equation:

$$RPD (\%) = 234.84 - 22.56X \quad (1)$$

where X is the pH of the suspension after 20 min digestion.

2.5.3. Fourier transform infrared Spectroscopy (FTIR)

The infrared spectra were recorded with a FTIR spectrophotometer (Frontier, Perkin Elmer, Mexico City, Mexico), equipped with universal attenuated total reflectance accessory. Dried ground sample (10 mg) of NFPI or OFPI was brought into contact with the diamond crystal using a geometry adjustment of 60 units of force gauge [21], and the absorbance at wavelengths from 4000 cm^{-1} to 400 cm^{-1} with a resolution of 40 cm^{-1} was measured. Fourier self-deconvolution (FSD) and second derivative analysis was performed and then the peaks were fitted in the amide-I region (1700–1600 cm^{-1}) band using the equipment software. Gaussian peaks could be assigned to their corresponding structure based on their centre and the integral of each peak was divided by the sum of all determined peaks to identify the proportion (%) of each structure [22].

2.5.4. Dynamics of surface tension

NFPI and OFPI stock dispersions were centrifuged at 5000 rpm for 15 min at 20 °C, filtered through a 0.45 μm membrane filter to remove impurities, and diluted at a ratio 1:10. The dynamic surface adsorption of protein molecules was determined by monitoring the evolution of surface tension with time at the air-water interface at 25 °C, using an optical contact angle meter, OCA-20, with oscillating drop accessory ODG-20 (Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt, Germany).

2.6. Evaluation of foaming properties of NFPI and OFPI

NFPI and OFPI dispersions (30 mL, 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) were placed in a graduated tube (6.2 cm diameter) and shaken for 3 min at speed 2 with a Black & Decker mixer (Power Pro 175-Watt, Maryland, DE, USA) at room temperature. The percentage increase in foam was recorded as foaming ability (FA) [23]. The volume of liquid drained to the bottom of the graduated tubes and foam height decrease related to collapse at room temperature, were recorded at 0, 15 and 30 min.

Foam samples were placed in glass depression slides (G.S.C. International, Inc., VWR, Radnor, PA, USA) to avoid sample disruption when placing coverslip, and an Olympus BX45 light microscope (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) was used for visualization at magnification of 4 \times . Images were captured with an AxioCam ERc 5 s camera (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Germany). The number-length mean bubble diameter ($d_{1,0}$) was estimated by means of the ZEN-2012 software package (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Germany). About 100–150 bubbles were counted for each sample [24].

The flow behaviour of freshly prepared foams was determined with the Physica MCR 301 rheometer coupled to a 50 mm serrated plate-plate geometry set at constant gap height of 1 mm at 25 °C, applying shear rate from 10 $^{-2}$ to 10 3 s^{-1} [25].

2.7. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate using a randomised experimental design and analysed in triplicate. Simple classification analysis of variance was applied, and whenever appropriate, Tukey's test was used in order to determine differences between the means. The Statgraphics Centurion XVI software (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, USA) was used for this purpose. The

data from CCD experimental design were analysed by least square multiple regression methodology to fit the polynomial models for predicting the physicochemical properties of SFPI as function of the A and B ultrasound conditions. Response surfaces and contour plots were obtained by using the fitted models and the optimal amplitude and time conditions were determined, with the help of the Design-Expert software version 10 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, USA). In all cases a significance level of $p \leq 0.05$ was established.

3. Results and discussion

3.1. Proximate chemical composition of the experimental material

The moisture, protein and fat contents of defatted faba bean flour were 8.20 ± 0.13 , 26.83 ± 0.15 and 1.26 ± 0.04 g/100 g. NFPI had significant lower moisture (7.80 ± 0.06) and higher protein (89.02 ± 1.01 g/100 g) than defatted faba bean flour. These values were within the range of those reported by other authors [1,6].

3.2. Effect of sonication on the physicochemical properties of faba bean protein

Independently of A and B conditions employed, sonication increased the solubility and decreased the particle size, ζ -potential and surface tension of SFPI dispersions (Tables 1 and 2).

3.2.1. Particle size

The hydrodynamic diameter (d_h) of the SFPI dispersions varied between 225.30 ± 0.28 nm (T3) and 311.55 ± 2.45 nm (T6) (Table 1), and in all the cases was significantly lower than the 369.4 ± 3.09 nm of NFPI (Table 2). PDI of the dispersions tended to show a narrower width the smaller was d_h . The relationship between d_h , A and B for the SFPI dispersions was described by the following polynomial model ($p = 0.0024$; R^2 adj = 0.8226):

$$247.38 - 22.36A - 12.91 B + 32.95AB + 15.93B^2 \quad (2)$$

The coefficients of the terms indicated that the particle size of the SFPI dispersions was mainly affected by the interaction AB ($p = 0.0020$), followed by the linear term of A ($p = 0.0025$). The decrease in d_h with increase in A could be attributed to hydrodynamic shear forces associated with ultrasonic cavitations, and disruption of associative hydrophobic and electrostatic interactions maintaining these protein aggregates [15,16]. Jambrak et al. [26] determined that HIUS (20 kHz) for 15 and 30 min reduced the particle size of soy protein dispersions.

Response surface and contour plot were generated based on the particle size model (Eq. (2); Fig. 1b). It was found that at high amplitudes and short times, smaller particles were produced. In contrast, larger protein particles were formed by applying low amplitudes for relatively long times, due to the formation of soluble aggregates. Jiang et al. [15] informed that the effect of turbulent forces and microstreaming at low-power ultrasound treatment might increase the speed of collision and protein particles aggregation. Liu et al. [27] reported that prolonged sonication times promoted interactions among protein molecules leading to protein aggregation and larger molecules formation. Kang et al. [28] reported that HIUS increased beef protein aggregation through disulfide cross-linking and promoted its oxidation, attributing these results to the free radicals produced by cavitation.

3.2.2. Solubility

The solubility of the SFPI dispersions ranged from $25.25 \pm 2.34\%$ (T6) to $44.33 \pm 1.51\%$ (T3), while that of NFPI was $19.87 \pm 1.62\%$ (Tables 1 and 2). Protein molecules tend to form macromolecular aggregates through non-covalent interactions resulting in reduced solubility [15]. HIUS reduces the particle size of protein dispersions [27], increasing water solubility due to a larger interaction area between

Table 1
Effect of ultrasound conditions on the physical properties of faba bean protein.

	T	Code factors	Levels of the factors		Particle size (nm)	PDI (dimensionless)	Surface tension (mN/m)	Solubility (%)	ζ-potential (mV)
			A (%)	B (min)					
Factorial points	T1	-1 -1	50	15	311.55 ± 2.45 ^d	0.46 ± 0.01 ^d	51.95 ± 0.30 ^f	33.58 ± 0.73 ^{cde}	-23.85 ± 0.21 ^a
	T2	-1 1	50	30	228.20 ± 0.16 ^a	0.34 ± 0.00 ^b	49.25 ± 0.01 ^{bc}	37.32 ± 2.45 ^e	-24.15 ± 0.05 ^a
	T3	1 -1	70	15	225.33 ± 0.28 ^a	0.30 ± 0.00 ^a	48.17 ± 0.15 ^a	44.33 ± 1.51 ^f	-23.95 ± 0.07 ^a
	T4	1 1	70	30	265.21 ± 2.83 ^c	0.38 ± 0.01 ^c	49.30 ± 0.08 ^{bc}	30.80 ± 2.99 ^{bcd}	-26.05 ± 0.07 ^{cd}
Centre points (5)	T5	0 0	60	22.5	246.75 ± 0.38 ^b	0.37 ± 0.01 ^c	49.26 ± 0.13 ^{bc}	34.85 ± 1.94 ^{de}	-25.90 ± 0.12 ^c
Axial points	T6	-√2 0	45	22.5	320.10 ± 3.58 ^e	0.40 ± 0.04 ^c	50.72 ± 0.56 ^{de}	25.25 ± 2.34 ^a	-26.45 ± 0.21 ^{cd}
	T7	0 √2	60	33.7	270.65 ± 2.03 ^c	0.38 ± 0.02 ^c	49.95 ± 0.08 ^{cd}	29.41 ± 1.64 ^{abc}	-26.35 ± 0.02 ^{cd}
	T8	√2 0	75	22.5	225.95 ± 0.78 ^a	0.30 ± 0.00 ^a	48.98 ± 0.23 ^{ab}	27.24 ± 1.34 ^{ab}	-25.05 ± 0.16 ^b
	T9	0 -√2	60	11.3	306.93 ± 0.68 ^d	0.46 ± 0.04 ^d	51.25 ± 0.08 ^{ef}	34.37 ± 0.93 ^{cde}	-26.50 ± 0.14 ^d

T = Treatment; A = Amplitude; B = time; PDI = polydispersity index. The values are means ± standard deviation. Different superscripts in the same column indicate significant difference (p ≤ 0.05) between means.

Table 2
Physicochemical properties of native (NFPI) and optimized (OFPI) faba protein isolates.

Property	NFPI	OFPI
Surface tension (mN/m)	54.40 ± 0.20 ^b	48.16 ± 0.07 ^a
Particle size (nm)	369.4 ± 3.09 ^b	230.1 ± 2.78 ^a
Polydispersity index	0.47 ± 0.04 ^b	0.28 ± 0.02 ^a
ζ-Potential (mV)	-30.15 ± 0.31 ^a	-24.65 ± 0.31 ^b
Solubility (%)	19.87 ± 1.62 ^a	35.21 ± 0.58 ^b
Apparent viscosity (mPa.s)	1.176 ± 0.04 ^b	0.946 ± 0.03 ^a
RPD (%)	68.42 ± 0.26 ^b	65.98 ± 0.47 ^a

RPD = relative protein digestibility. The values are means ± standard deviation. Different superscripts in a same row indicate significant difference (p ≤ 0.05) between means.

protein and water molecules [7,15]. In general, the SPFI dispersions displayed higher solubility values at relatively high amplitude and short time (Table 1), but no significant model was found to predict this response variable.

3.2.3. Surface tension

SFPI dispersions exhibited lower surface tension values than the NFPI dispersion (54.40 ± 0.20 mN.m⁻¹). The SFPI dispersion treatments of 70%-15 min (T3) and 75%-22.5 min (T8) had non-significant different surface tension (Table 1). The relationship between the surface tension of SFPI and the independent variables was quadratic (p = 0.0006; R² adj = 0.8836):

$$49.28 - 0.77A - 0.42B + 0.96AB + 0.52B^2 \tag{3}$$

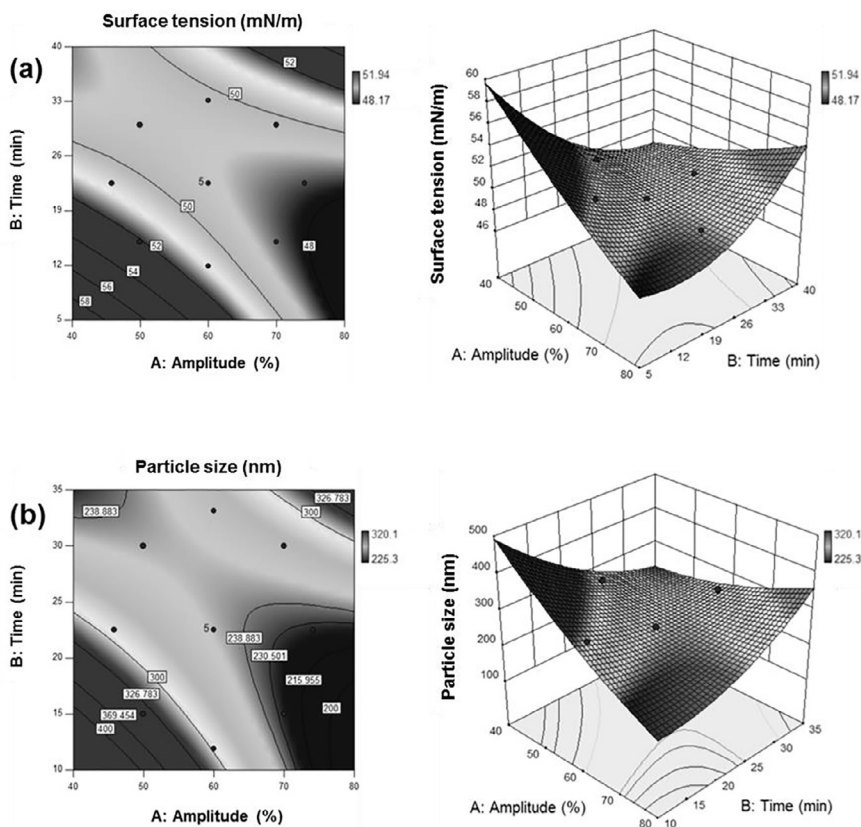


Fig. 1. Effect of amplitude and time of ultrasonication on: (a) surface tension and (b) particle size of faba protein isolate.

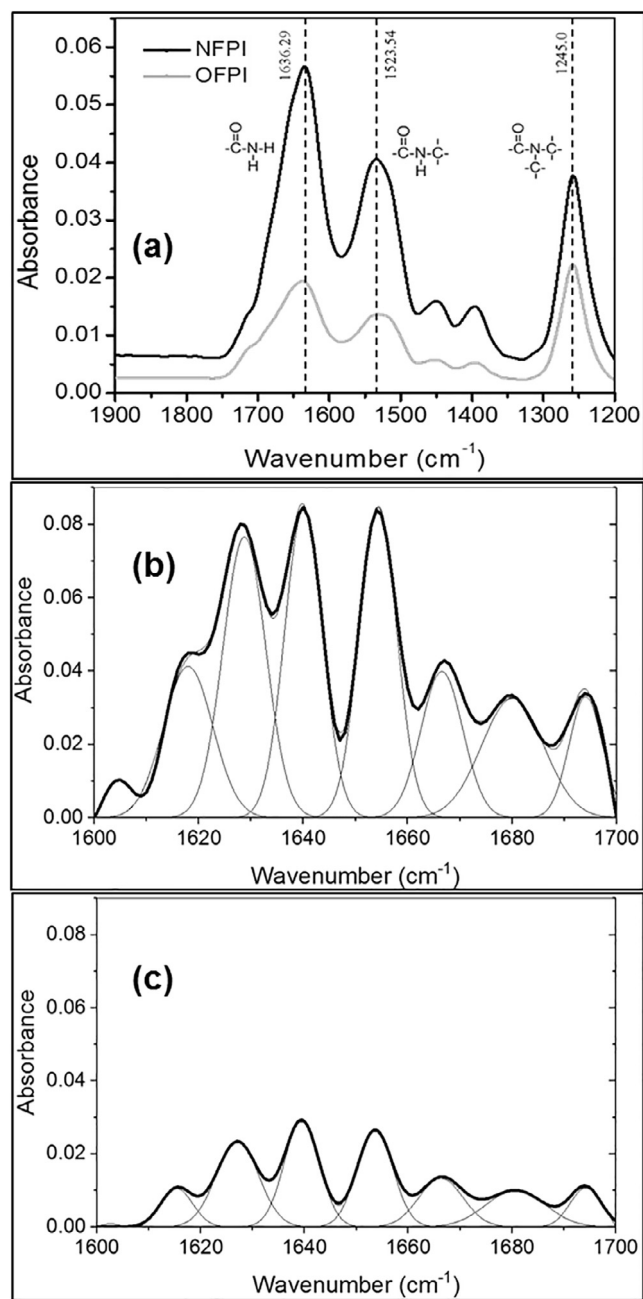


Fig. 2. FTIR infrared spectra in the amide vibrational region (a) for native (NFPI) and optimized (OFPI) faba protein isolates. The amide I band and its spectral deconvolution of NFPI (b) and OFPI (c).

The surface tension of SPFI dispersions was mainly affected by the interaction AB ($p = 0.0004$), followed by the linear term of A ($p = 0.0010$). The lowering in surface tension was related to the greater amount of soluble protein molecules present that could be adsorbed to the air-water interface. Xiong et al. [11] found that low values in the surface tension were related to smaller particle size and surface charge conditions that together can decrease the electrostatic barrier and thus favour a higher adsorption rate at the air-water interface. The response surface and contour plot (Fig. 1a) revealed that surface tension decreased when A increased and B was short.

3.2.4. ζ -Potential

The ζ -potential of SFPI ranged from -26.50 ± 0.14 mV (T9) to -23.85 ± 0.21 mV (T1) (Table 1), being significantly lower than for NFPI (-30.15 ± 0.31 mV) (Table 2). T1, T2 and T3 exhibited the

lowest ζ -potential values (Table 1). The surface charge of proteins arises primarily from ionization of surface groups [29]. The decrease in the surface charge can be attributed to exposure of non-polar hydrophobic residues possibly by the unfolding of secondary structure of the protein subjected to ultrasonication [15]. Most proteins have non-polar hydrophobic residues such as aromatic and alkyl groups, ionic groups such as $-\text{NH}_3^+$ and $-\text{COO}^-$ as well as hydrophilic polar groups as $-\text{OH}$ and $-\text{NH}_2$, whose balance can influence the final surface charge [27]. Xiong et al. [11] found that the application of ultrasound to ovalbumin decreased its net surface charge. This behaviour was attributed to irreversible changes in the protein conformation and structure. No model could be significantly adjusted to predict ζ -potential of SPFI.

3.3. Characterization of the protein obtained with optimized conditions (OFPI)

The response surfaces and contour plots of particle size and surface tension (Fig. 1a and b) showed that in the lower right zone the interaction of AB generated minimum values of both response variables. The minimum (i.e. optimal) value of particle size for SPFI dispersions was 219.56 nm with an A = 72.67% and B = 16.11 min; while the optimal value of surface tension was $48.16 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ with an A = 72.67% and B = 17.29 min. Since the ultrasonication conditions generating a minimum value for both responses showed a similar trend, we chose those for the surface tension for obtaining the optimized faba bean protein isolate (OFPI).

The physicochemical properties of OFPI were determined and compared to those of the NFPI (Table 2). The application of the optimal conditions of A and B produced a significant decrease in surface tension and particle size, and a strong increase in protein solubility and decrease in the surface charge of OFPI. The experimental value for surface tension of OFPI was very close to the predicted value (Table 2), which was attributed to the good fit provided by quadratic model. Regarding particle size, the experimental value was about 230.1 nm.

The apparent viscosity of OFPI was significantly lower than that of NFPI (Table 2). Hu et al. [8] reported that during ultrasound treatment of soy protein isolate, a rapid molecule movement due to cavitation and micro-streaming occurred, causing unfolding of protein chains, leading to changes in flow behaviour. Martínez et al. [30] found that high-pressure homogenization of soy protein isolate produced a significant decrease in the solutions viscosity, allowing higher air incorporation during the whipping process. Zisu et al. [31] reported that ultrasonication treatment (A ~ 30–60% at 20 kHz) produced a decrease in the particle size of whey, which strongly correlated with the observed decrease in dispersion viscosity.

3.3.1. FTIR analysis

FTIR provides important information regarding the structural changes undergone by proteins during processing, e.g., HIUS processing, and the effect of these changes on their digestibility [32,33]. Fig. 2a shows the IR spectra for NFPI and OFPI. The main spectral features consisted of three intense bands attributed to amide I (1636.29 cm^{-1}), amide II (1523.54 cm^{-1}) and amide III (1250 cm^{-1}). Ultrasonication produced a drastic decrease in the three intensity bands of OFPI with respect those of NFPI. The secondary structure of protein is commonly based on amide I band analysis [34], where C=O has a predominant role, followed by C-N, and by in-plane NH bending contributions. Deconvolution of the amide I band permitted to isolate and identify the secondary structures of NFPI (Fig. 2b) and OFPI (Fig. 2c). Gaussian peaks could be assigned to their corresponding structure based on their centre. The centre of the intra-molecular aggregates, anti-parallel β -sheet, β -turn, α -helix, β -sheet, and inter-molecular aggregates [22,34,35] for NFPI and OFPI are given in Table 3. The peak areas were calculated to identify the relative spectral weights (W_i) and the percentage of the secondary structures (Table 3). Results in Table 3 show that HIUS produced an increase of 6.61% in β -sheet, 19.6% in β -

Table 3
Determined peak values and relative contents of the secondary structure components of NFPI and OFPI obtained from the spectral deconvolution of the amide I band.

Secondary structure component	NFPI		OFPI	
	Peak centre value (cm ⁻¹)	Relative content (%)	Peak centre value (cm ⁻¹)	Relative content (%)
W _{A1}	1617.96	12.4	1615.36	7.0
W _β	1634.38	39.3	1633.26	41.9
W _α	1654.32	19.3	1653.56	19.7
W _T	1666.53	10.2	1666.29	12.2
W _{β-A}	1680.08	12.3	1680.68	12.4
W _{A2}	1694.07	6.5	1694.21	6.8
R ²	0.98		0.99	

Symbols in the first column refer to inter-molecular aggregates (W_{A1}), β-sheet (W_β), α-helix (W_α), β-turn (W_T), antiparallel β-sheet (W_{β-A}) and intra-molecular aggregates (W_{A2}).

turn, 2.1% in α-helix, 4.6% in intra-molecular aggregates, and 0.8% in anti-parallel β-sheet contents, but a decrease of 43.54% in inter-molecular aggregates. The multienzyme assays results suggest that these structural changes produced a decrease (~3.6%) on the RPD of OFPI with respect that of NFPI (Table 2), but further corroborative studies are required for establishing this point. Carbonaro et al. [35] found a high negative linear correlation between the β conformations content and the *in vitro* protein digestibility of common bean, chickpea, lentil and soybean proteins. The decrease in protein digestibility as a function of the amount of β conformations can be explained by the high hydrophobic character of these structures. The lower digestibility of OFPI was also related to β conformations increase. Carbonaro et al. [35] expected that high inter- and intra- molecular aggregates contents should keep an inverse correlation with digestibility, due to a higher resistance to proteolysis, but the opposite occurred. In our case, the intra-molecular aggregates increased, but inter-molecular aggregates decreased due to sonication, so that a clear cut trend with digestibility could not be established.

3.3.2. Adsorption dynamics at the interface

Protein adsorption is important for the stabilization of interfaces, and thereby the formation of foams and emulsions [11]. The decrease in surface tension over time at the air-water interface for the OFPI and NFPI dispersions, and of the dispersion medium alone (PBS) can be seen in Fig. 3. The initial drop in tension was substantial during the first seconds for both proteins, indicative that they possess strong surface

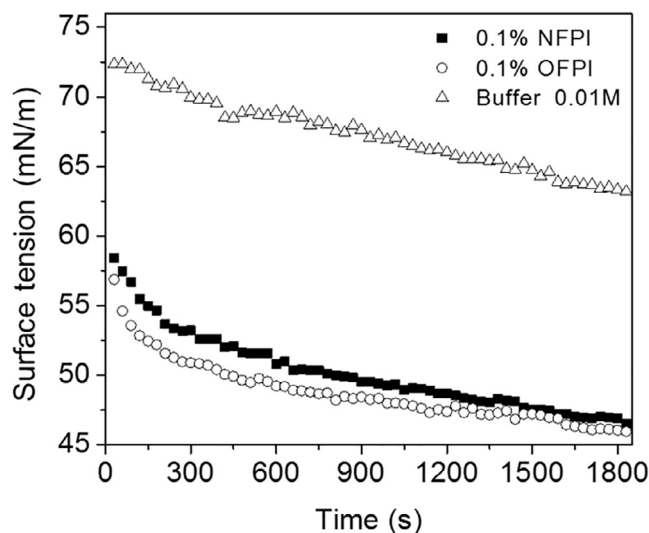


Fig. 3. Interfacial tension-time behaviour at air-water interface of native (NFPI) and optimized (OFPI) faba protein isolates.

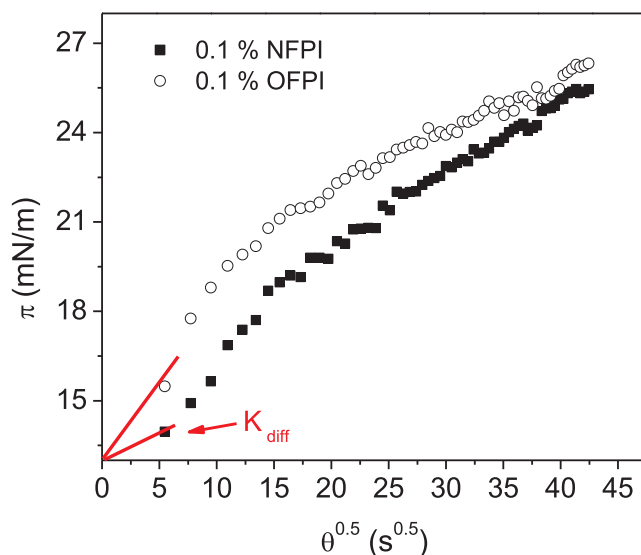


Fig. 4. The square root of time ($\theta^{0.5}$) dependence of surface pressure (π) for adsorbed native (NFPI) and optimized (OFPI) faba protein isolates at the air-water interface.

Table 4
Dynamic parameters of adsorption of NFPI and OFPI at the air-water (γ_s) interface, including apparent rate of diffusion to the interface (K_{diff}), molecular penetration (K_p) and configurational rearrangement (K_R).

Protein code	K_{diff} (mNm ⁻¹ s ^{-0.5})	$K_p \times 10^3$ (s ⁻¹)	$K_R \times 10^3$ (s ⁻¹)
NFPI	1.947 ± 0.005 ^b	1.45 ± 0.03 ^b	7.86 ± 0.64 ^b
OFPI	2.824 ± 0.116 ^a	1.63 ± 0.09 ^a	11.54 ± 1.10 ^a

Data are means ± standard deviations. Different letters in the same column indicate significant differences between means ($p \leq 0.05$).

active properties. Nevertheless, OFPI produced a greater decrease of tension than NFPI, indicative that ultrasonication had a strong effect in improving its adsorption properties at the interface. Both NFPI and OFPI showed two distinctive zones in the interfacial adsorption dynamics (Fig. 3). The first region corresponds to a drastic decrease in tension related to diffusion and adsorption of the protein molecules at the interface, followed by a slow decline in the second region attributed

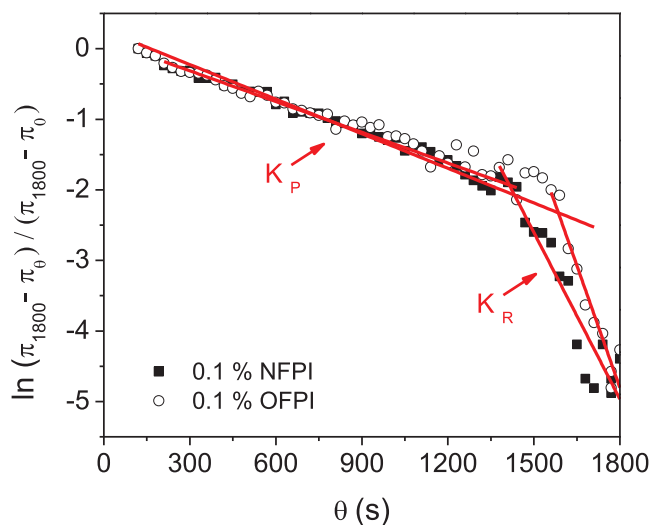


Fig. 5. Plot of $\ln(\pi_{1800} - \pi_0)/(\pi_{1800} - \pi_0)$ against the time (θ) for the adsorbed native (NFPI) and optimized (OFPI) faba protein isolates. The solid lines depict the first slope representing the penetration (K_p) and the second slope structural rearrangement (K_R) coefficients, respectively.

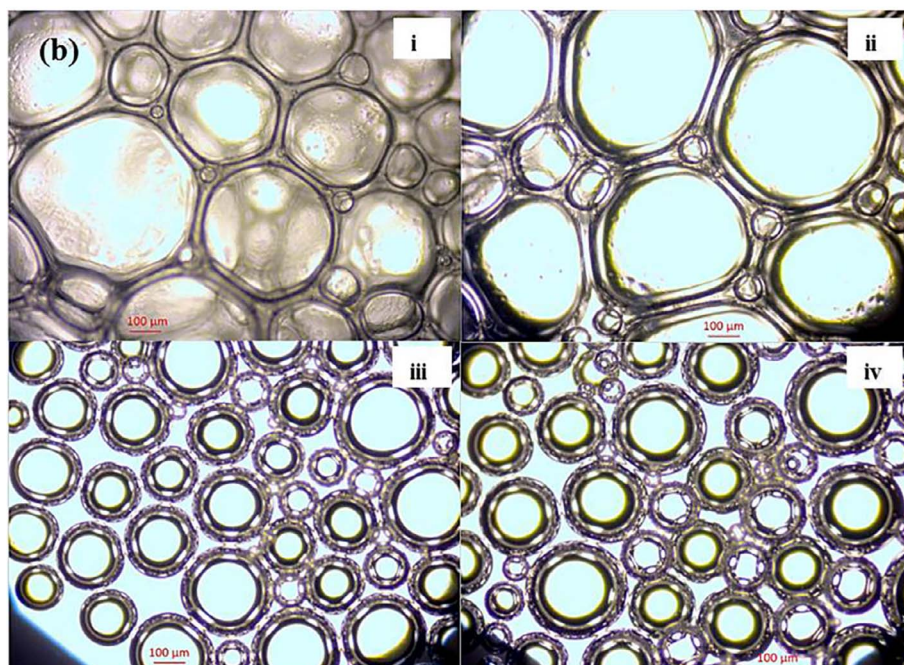
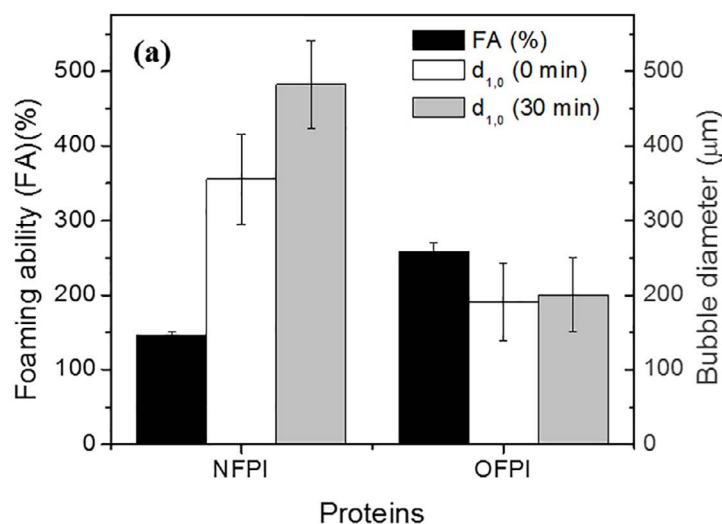


Fig. 6. (a) Foam overrun for foams stabilized with native (NFPI) and optimized (OFPI) faba protein isolates. Vertical bars indicate the standard deviation. (b) Morphology of air bubbles made with NFPI at 0 min (i), aged 30 min (ii) and made with OFPI at 0 min (iii), aged 30 min (iv).

to the conformational arrangement of the protein molecules adsorbed at the interface. The faster rate of surface tension decrease by OFPI respect NFPI can be attributed to its molecules smaller particle size, which endowed them with increased surface activity and mobility at the interface [30]. Ultrasonication also had the effect of decreasing the net ζ -potential of the OFPI molecules, causing a decrease in the electrostatic repulsion between them, allowing for an increased adsorption rate. O'Sullivan et al. [16] found that ultrasonication produced an improved interfacial packaging and conformation due to the significant reduction in protein aggregate size.

The square root of time dependence of the surface pressure (π) at the air–water interface was plotted for determining the diffusion coefficient of OFPI and NFPI (Fig. 3). π progressively increased with adsorption time and was higher for OFPI than for NFPI (Fig. 4). The π -time curves profile indicate that adsorption kinetics may include: (i) diffusion of protein from the bulk to the interface, (ii) adsorption

(penetration) at the interface and interfacial unfolding, (iii) re-arrangement of molecules at the interface, multilayer formation and possible interfacial gelation [36]. The slope change of the curves of Fig. 4 indicated that the diffusion-controlled adsorptions occurred within 90 s. Tang and Shen [37] reported similar adsorption times for human serum albumin. The improved rate of diffusion for OFPI was largely attributed to the induced changes in the size and unfolding of protein molecules [38]. Lower surface charge, smaller size and greater unfolding degree of the protein molecules can be associated with a rapid reduction in surface tension [39]. OFPI exhibited higher K_{diff} than NFPI (Table 4) probably due to the differences in surface hydrophobic and/or hydrophilic nature between these proteins. NFPI exhibited a higher K_{diff} than the reported for native BSA ($0.36\text{--}0.79\text{ mNm}^{-1}\cdot\text{s}^{-0.5}$), but lower than that for β -lactoglobulin ($> 2.3\text{ mNm}^{-1}\cdot\text{s}^{0.5}$) at the air–water interface. After a short adsorption period controlled by diffusion, the adsorption rate gradually decreased at the interface due to an

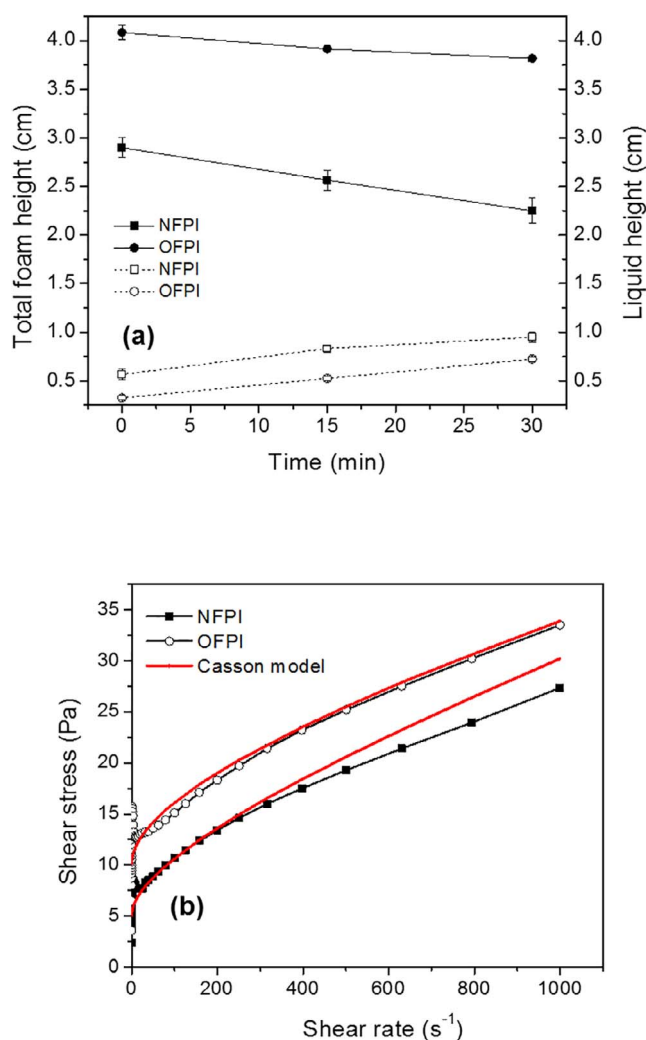


Fig. 7. Variations in total foam height (bold symbols) and drainage liquid height (empty symbols) for foams stabilized with native (NFPI) and optimized (OFPI) faba protein isolates over 30 min. (b) Changes in the shear stress as function of shear rate for the foams stabilized with NFPI and OFPI.

energy barrier. The following equation was used to monitor the protein penetration and rearrangement coefficients at the air-water interface [40]:

$$\ln[(\pi_{1800}-\pi_{\theta})/(\pi_{1800}-\pi_0)] = -k_i\theta \quad (4)$$

where π_{1800} , π_{θ} and π_0 are the surface pressures at the experimental final adsorption time (1800 s), at any time (θ), and at the initial time (90 s), respectively, and k_i is the first-order rate constant. A plot of $\ln[(\pi_{1800}-\pi_{\theta})/(\pi_{1800}-\pi_0)]$ versus θ , where the short diffusion-controlled time (< 90 s) period was deleted from the analysis, yields two slopes (Fig. 5): the first slope is associated to a kinetic first-order penetration constant (K_p), while the second slope is associated to the rearrangement constant (K_R) of the protein molecules adsorbed at the air-water interface. The values of K_p for OFPI were higher than for NFPI (Table 4), possibly because more molecules were adsorbed at the air-water interface, due to the unfolding in the OFPI molecules by ultrasonication, which produced the formation of thicker interfacial layers. Protein unfolding increased the exposure of hydrophobic patches in the protein, promoting the adsorption and penetration at the interface [41]. K_R was higher for OFPI than for NFPI, as ultrasonication improved the solubility of the former protein endowing it with higher structural flexibility, and allowing the molecules to achieve more easily an energetically favourable configuration at the interface [37]. The lower

surface charge exhibited by OFPI could facilitate a better rearrangement of its molecules at the interface, due to the decreased repulsion between them [39].

3.3.3. Foam characteristics

Aqueous foams, once formed, are thermodynamically unstable, and will deteriorate with time. The rate of deterioration of foam depends mostly on the velocity of three physical phenomena, i.e., drainage, coalescence and disproportionation. Drainage is the liquid flow from the foam as consequence of gravity, leading to a decrease in the total foam volume, and indirectly causing the film thickness to decrease with time. Disproportionation is the growth of bigger gas bubbles at the expense of smaller ones and accelerates as result of drainage. Coalescence, which is the breakage of the thin film between two bubbles, becomes more likely, with bubbles size distribution shifting to larger bubbles [42]. Foaming ability (FA) is a good indicator of foaming stability [23]. FA of OFPI (258.3%) was significantly higher than that of NFPI (145.8%) (see Fig. 6a). This can be attributed to the lower apparent viscosity of OFPI (Table 2), which offered less resistance to the incorporation of gas bubbles [30,43], and to the faster rate of diffusion and adsorption of the OFPI molecules at the air-water interface. In this way, smaller bubbles were produced which contributed to enhanced foam stability [44]. The freshly prepared OFPI foam presented relatively small air bubbles ($d_{1,0} = 190.0 \mu\text{m}$) with spherical morphology, unimodal size distribution, and well defined thin lamellae (Fig. 6b). The spherical morphology, lamellae thickness and bubble size ($d_{1,0} = 200.0 \mu\text{m}$) changes after 30 min were non-significant. The freshly prepared NFPI foams showed bigger mean bubbles ($d_{1,0} = 363.5 \mu\text{m}$), distorted morphology (polyhedral), multimodal size distribution, and well less defined and thinner lamellae. After 30 min foam coarsening was evident, with bubble size evolving to significantly higher values ($d_{1,0} = 482.5 \mu\text{m}$) (Fig. 6b). Thus, a more rapid and increased adsorption of OFPI, resulted in higher foaming capacity, thicker and stronger adsorbed films, and lamella with an enhanced resistance against bubble collapse [38].

OFPI foam showed higher drainage stability than NFPI foam (Fig. 7a). Higher drainage stability of foams can be related with smaller bubbles packed together into structures that are more resistant to deformation. Foams with these characteristics tend to exhibit higher yield stress (τ_0) [25]. Fig. 7b shows that flow properties of the foams fitted well Casson's model, with OFPI foam displaying a $\tau_0 = 10.05 \pm 0.62 \text{ Pa}$ ($R^2 = 0.90$) and NFPI foam a $\tau_0 = 4.98 \text{ Pa}$ ($R^2 = 0.97$), confirming that τ_0 was inversely proportional to bubble size and liquid drainage.

4. Conclusions

Optimized ultrasound processing conditions of amplitude of 72.67% for 17.29 min were obtained by response surface methodology and applied to native faba bean protein isolate (NFPI) for obtaining an optimized faba bean protein isolate (OFPI). OFPI exhibited significant lower surface tension, ζ -potential, particle size and apparent viscosity, and higher solubility than NFPI. OFPI foam exhibited significant lower liquid drainage, smaller and more homogeneous bubbles, higher yield stress and higher stability than NFPI foam. Fourier transform infrared spectra revealed that ultrasonication changed the secondary structure of OFPI, producing a significant increase of β conformations and decrease of inter-molecular aggregates. Multienzyme hydrolysis assays pinpoint that the structural changes caused by ultrasonication induced a decrease ($\sim 3.6\%$) on the relative protein digestibility of OFPI respect to NFPI. However, more in depth studies are desirable for establishing this point. Ultrasonication is an efficient method for producing faba bean protein with enhanced functionality and increased revalorisation.

Acknowledgements

The authors thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – Mexico (CONACyT) for partially financing this work through Project 236500 and Ph. D. Carmen Ybarra Moncada (Universidad Autónoma Chapingo) for her advice on the experimental design of this work.

References

- [1] J. Vioque, M. Alaiz, J. Girón-Calle, Nutritional and functional properties of Vicia faba protein isolates and related fractions, *Food Chem.* 132 (2012) 67–72, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.033>.
- [2] L.D.J. Pérez, H.A. González, M.O. Franco, A.M. Rubí, D.J.F. Ramírez, V.A. Castañeda, M.J.G. Aquino, Application of multivariate methods to identify outstanding broad bean cultivars for the State of Mexico, *Rev. Mex. Cienc. Agric.* 5 (2014) 265–278.
- [3] N. Parmar, N. Singh, A. Kaur, A.S. Virdi, K. Shevkani, Protein and microstructure evaluation of harder-to-cook and easy-to-cook grains from different kidney bean accessions, *LWT – Food Sci. Technol.* 79 (2017) 487–495, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.027>.
- [4] E. Cepeda, M.C. Villarán, N. Aranguiz, Functional properties of faba bean (*Vicia faba*) protein flour dried by spray drying and freeze drying, *J. Food Eng.* 36 (1998) 303–310, [http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774\(98\)00061-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774(98)00061-2).
- [5] L.A. Arogundade, M. Tshay, D. Shumey, S. Manazie, Effect of ionic strength and/or pH on extractability and physico-functional characterization of broad bean (*Vicia faba* L.) protein concentrate, *Food Hydrocoll.* 20 (2006) 1124–1134, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.12.010>.
- [6] A.C. Karaca, N. Low, M. Nickerson, Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction, *Food Res. Int.* 44 (2011) 2742–2750, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.012>.
- [7] C. Arzeni, K. Martínez, P. Zema, A. Arias, O.E. Pérez, A.M.R. Pilosof, Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality, *J. Food Eng.* 108 (2012) 463–472, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.018>.
- [8] H. Hu, J. Wu, E.C.Y. Li-chan, L. Zhu, F. Zhang, X. Xu, G. Fan, L. Wang, X. Huang, S. Pan, Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions, *Food Hydrocoll.* 30 (2013) 647–655, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.08.001>.
- [9] R. Morales, K.D. Martínez, V.M.P. Ruiz-Henestrosa, A.M.R. Pilosof, Modification of foaming properties of soy protein isolate by high ultrasound intensity: particle size effect, *Ultrason. Sonochem.* 26 (2015) 48–55, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultrsonch.2015.01.011>.
- [10] J. O'Sullivan, B. Murray, C. Flynn, I. Norton, The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins, *Food Hydrocoll.* 53 (2016) 141–154, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.009>.
- [11] W. Xiong, Y. Wang, C. Zhang, J. Wan, B.R. Shah, Y. Pei, B. Zhou, J. Li, B. Li, High intensity ultrasound modified ovalbumin: structure, interface and gelation properties, *Ultrason. Sonochem.* 31 (2016) 302–309, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultrsonch.2016.01.014>.
- [12] D. Güzey, I. Gülsiren, B. Bruce, J. Weiss, D. Gu, I. Gu, Interfacial properties and structural conformation of thermosonicated bovine serum albumin, *Food Hydrocoll.* 20 (2006) 669–677, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.06.008>.
- [13] W. Qu, X. Zhang, W. Chen, Z. Wang, R. He, H. Ma, Effects of ultrasonic and graft treatments on grafting degree, structure, functionality, and digestibility of rapeseed protein isolate-dextran conjugates, *Ultrason. Sonochem.* 42 (2018) 250–259, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultrsonch.2017.11.021>.
- [14] AOAC, Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 18th ed. Washington, DC, USA, 2005.
- [15] L. Jiang, J. Wang, Y. Li, Z. Wang, J. Liang, R. Wang, Y. Chen, W. Ma, B. Qi, M. Zhang, Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates, *Food Res. Int.* 62 (2014) 595–601, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.022>.
- [16] J. O'Sullivan, J. Beevers, M. Park, R. Greenwood, I. Norton, Comparative assessment of the effect of ultrasound treatment on protein functionality pre- and post-emulsification, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 484 (2015) 89–98, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.07.065>.
- [17] E. Maforimbo, *In vitro* relative protein digestibility and lipoxigenase activity used as parameters to test and compare quality in five varieties of soybean meals, *J. Food Technol. Afr.* 6 (2) (2001) 48–52, <http://dx.doi.org/10.4314/jfta.v6i2.19286>.
- [18] R.M. Saunders, M.A. Connor, A.N. Booth, E.M. Bickoff, G.O. Kohler, Measurement of digestibility of alfalfa protein concentrates by *in vivo* and *in vitro* methods, *J. Nutr.* 103 (1973) 530–535.
- [19] H.W. Hsu, D.L. Vavak, L.D. Satterlee, G.A. Miller, A multienzyme technique for estimating protein digestibility, *J. Food Sci.* 42 (5) (1977) 1269–1273, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb14476.x>.
- [20] S.A. Elsohaimy, T.M. Refaay, M.A.M. Zaytoon, Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate, *Ann. Agric. Sci.* 60 (2015) 297–305, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aos.2015.10.007>.
- [21] T. Tovar-Benítez, C. Jiménez-Martínez, M.J. Perea-Flores, D.I. Téllez-Medina, G. Dávila-Ortiz, Microencapsulation of bayo bean (*Phaseolus vulgaris*) protein hydrolysate with inhibitory activity on angiotensin-I converting enzyme through freeze-drying, *Rev. Mex. Ing. Quim.* 15 (2016) 797–807.
- [22] S.M. Beck, K. Knoerzer, J. Sellahewa, M.A. Emin, J. Arcot, Effect of different heat-treatment times and applied shear on secondary structure, molecular weight distribution, solubility and rheological properties of pea protein isolate as investigated by capillary rheometry, *J. Food Eng.* 208 (2017) 66–76, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.016>.
- [23] M.A.M. Mune, S.R. Minka, Production and characterization of cowpea protein hydrolysate with optimum nitrogen solubility by enzymatic hydrolysis using pepsin, *J. Sci. Food Agric.* 97 (2016) 2561–2568, <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8076>.
- [24] L. Indrawati, G. Narsimhan, Characterization of protein stabilized foam formed in a continuous shear mixing apparatus, *J. Food Eng.* 88 (2008) 456–465, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.03.003>.
- [25] E.J. Vernon-Carter, G. Espinosa-Paredes, C.I. Beristain, H. Romero-Tehuiztil, Effect of foaming agents on the stability, rheological properties, drying kinetics and flavour retention of tamarind foam-mats, *Food Res. Int.* 34 (2001) 587–598, [http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00076-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00076-X).
- [26] A.R. Jambak, V. Lelas, T.J. Mason, G. Krešič, M. Badanjak, Physical properties of ultrasound treated soy proteins, *J. Food Eng.* 93 (2009) 386–393, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.02.001>.
- [27] S. Liu, Y. Liu, X. Huang, W. Yang, W. Hu, S. Pan, Effect of ultrasonic processing on the changes in activity, aggregation and the secondary and tertiary structure of polyphenol oxidase in oriental sweet melon (*Cucumis melo* var. *makua* Makino), *J. Sci. Food Agric.* 97 (2016) 1326–1334, <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.7869>.
- [28] D.C. Kang, Y.H. Zou, Y.P. Cheng, L.J. Xing, G.H. Zhou, W.G. Zhang, Effects of power ultrasound on oxidation and structure of beef proteins during curing processing, *Ultrason. Sonochem.* 33 (2016) 47–53, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultrsonch.2016.04.024>.
- [29] Y. Zhao, F. Li, M.T. Carvajal, M.T. Harris, Interactions between bovine serum albumin and alginate: an evaluation of alginate as protein carrier, *J. Colloid Interface Sci.* 332 (2009) 345–353, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2008.12.048>.
- [30] K.D. Martínez, V. Ganesan, A.M.R. Pilosof, F.M. Harte, Effect of dynamic high-pressure treatment on the interfacial and foaming properties of soy protein isolate-hydroxypropylmethylcelluloses systems, *Food Hydrocoll.* 25 (2011) 1640–1645, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.013>.
- [31] B. Zisu, M. Schleyer, J. Chandrapala, Application of ultrasound to reduce viscosity and control the rate of age thickening of concentrated skim milk, *Int. Dairy J.* 31 (2013) 41–43, <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.04.007>.
- [32] S. De Maria, G. Ferrari, P. Maresca, Effects of high hydrostatic pressure on the enzymatic hydrolysis of bovine serum albumin, *J. Sci. Food Agric.* 97 (2017) 3151–3158, <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8157>.
- [33] C. Wang, L. Jiang, D. Wei, Y. Li, X. Sui, Z. Wang, D. Li, Effect of secondary structure determined by FTIR spectra on surface hydrophobicity of soybean protein isolate, *Proc. Eng.* 15 (2011) 4819–4827, <http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2011.08.900>.
- [34] M. Carbonaro, P. Maselli, P. Dore, A. Nucara, Application of Fourier transform infrared spectroscopy to legume seed flour analysis, *Food Chem.* 108 (2008) 361–368, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.045>.
- [35] M. Carbonaro, P. Maselli, A. Nucara, Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study, *Amino Acids* 43 (2012) 911–921, <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-011-1151-4>.
- [36] N.A. Camino, C.C. Sánchez, J.M.R. Patino, A.M.R. Pilosof, Hydroxypropylmethylcellulose at the oil-water interface. Part I. Bulk behaviour and dynamic adsorption as affected by pH, *Food Hydrocoll.* 25 (2011) 1–11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.04.012>.
- [37] C.H. Tang, L. Shen, Dynamic adsorption and dilatational properties of BSA at oil/water interface: role of conformational flexibility, *Food Hydrocoll.* 43 (2015) 388–399, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.06.014>.
- [38] V.P. Ruiz-Henestrosa, C.C. Sánchez, M.M.Y. Escobar, J.J.P. Jiménez, F.M. Rodríguez, J.M.R. Patino, Interfacial and foaming characteristics of soy globulins as a function of pH and ionic strength, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 309 (2007) 202–215, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.01.030>.
- [39] A.J. Bolontrade, A.A. Scilingo, M.C. Añón, Amaranth proteins foaming properties: adsorption kinetics and foam formation—Part 1, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 105 (2013) 319–327, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.039>.
- [40] O.E. Pérez, C.C. Sánchez, A.M.R. Pilosof, J.M.R. Patino, Surface dilatational properties of whey protein and hydroxypropyl-methyl-cellulose mixed systems at the air-water interface, *J. Food Eng.* 94 (2009) 274–282, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.03.019>.
- [41] M. Carbonaro, A. Nucara, Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region, *Amino Acids* 38 (2010) 679–690, <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-009-0274-3>.
- [42] A.D. Ronteltap, A. Prins, Contribution of drainage, coalescence, and disproportionation to the stability of aerated foodstuffs and the consequences of bubble size distribution as measured by a newly developed optical glass-fibre technique, in: R.D. Bee, P. Richmond, J. Mingins (Eds.), *Food colloids*, Royal Society of Chemistry, London, 1989, pp. 39–47.
- [43] M.C. Tan, N.L. Chin, Y.A. Yusof, F.S. Taip, J. Abdullah, Characterisation of improved foam aeration and rheological properties of ultrasonically treated whey protein suspension, *Int. Dairy J.* 43 (2015) 7–14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.09.013>.
- [44] P. Walstra, Principles of emulsion formation, *Chem. Eng. Sci.* 48 (2) (1993) 333–349.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00205

Matricula: 2143800348

EFFECTO DEL ULTRASONIDO DE ALTA INTENSIDAD SOBRE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, ESTRUCTURALES Y SUPERFICIALES DE PROTEÍNA DE HABA (*vicia faba* L.)

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:00 horas del día 30 del mes de noviembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO
- DRA. NANCY ALONSO CARRILLO
- DRA. MARIA ISABEL REYES ARREOZOLA
- DRA. BLANCA ELIZABETH HERNANDEZ RODRIGUEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: ALEJANDRO MARTINEZ VELASCO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ALEJANDRO MARTINEZ VELASCO
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

VOCAL

DRA. NANCY ALONSO CARRILLO

VOCAL

DRA. MARIA ISABEL REYES ARREOZOLA

SECRETARIA

DRA. BLANCA ELIZABETH HERNANDEZ
RODRIGUEZ