



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**“PROTEÍNA DE HUAUZONTLE (*Chenopodium nuttalliae* Saff.): COMPOSICIÓN,
ESTRUCTURA, PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y FUNCIONALES”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

M. C. Diana Itzel López Monterrubio

Matricula: 2171800983

Comité tutorial

Co-Director: Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter

Co. Director: Dra. Consuelo Silvia Olivia Lobato Calleros

Asesor: Dr. José Álvarez Ramírez

Jurado

Presidenta: Dra. Angélica Román Guerrero

Secretaria: Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez

Vocal: Dr. Fernando Rivera Cabrera

Vocal: Dr. Alejandro Martínez Velasco

Iztapalapa, Ciudad de México, 29 de enero de 2021



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 29 de enero de 2021

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

**PROTEÍNA DE HUAUZONTLE (*Chenopodium nuttalliae* Saff.):
COMPOSICIÓN, ESTRUCTURA, PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y
FUNCIONALES**

Que presentó

Diana Itzel López Monterrubio

Comité tutorial

CoDirector Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter
Universidad Autónoma Metropolitana



CoDirector Dra. Consuelo S.O. Lobato Calleros
Universidad Autónoma Chapingo



Asesor Dr. José Álvarez Ramírez
Universidad Autónoma Metropolitana



Comité de evaluación

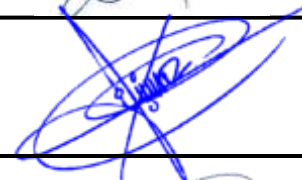
Presidente: Dra. Angelica Roman Guerrero
Universidad Autónoma Metropolitana



Secretario: Dra. Blanca Elizabeth Hernandez Rodriguez
Universidad Autónoma Chapingo



Vocal: Dr. Dr. Fernando Rivera Cabrera
Universidad Autónoma Metropolitana



Vocal: Dr. Alejandro Martinez Velasco
Universidad Interserrana del Estado de
Puebla-Chilchotla



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, desearía expresar el justo agradecimiento que merecen la **Dra. Consuelo Lobato Calleros** y el **Dr. Jaime Vernon Carter** por su labor como directores de la presente tesis doctoral, al haberme ofrecido la oportunidad de integrarme en su grupo de investigación, guiándome y poniendo sus conocimientos a mi servicio siempre que fue necesario.

Al **Dr. José Álvarez Ramírez** mi más sincero agradecimiento por su asesoría, interés y disposición que mostró para el desarrollo de este trabajo.

A la **Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez** por sus innumerables asesorías y oportunos comentarios que permitieron mejorar este trabajo, muchas gracias.

A los miembros del jurado, **Dra. Angélica Román Guerrero**, **Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez**, **Dr. Alejandro Martínez Velasco** y **Dr. Fernando Rivera Cabrera** por sus oportunas observaciones en la revisión final de la presente tesis.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el financiamiento de este trabajo.

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 mis compañeros de laboratorio por hacer esta labor más sencilla y por su apoyo al compartirme sus conocimientos.

A mi madre, que a lo largo de los años me ha enseñado con su ejemplo que hay que ser perseverantes para alcanzar las metas, que la responsabilidad y dedicación son indispensables. Gracias infinitas por todo el amor, apoyo y sabiduría que ha compartido conmigo

INDICE GENERAL

<i>INDICE GENERAL</i>	<i>i</i>
<i>INDICE DE FIGURAS</i>	<i>iv</i>
<i>INDICE DE TABLAS</i>	<i>vi</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>vii</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>viii</i>
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.-REVISION DE LITERATURA	3
2.1 Generalidades del huauzontle	3
2.2 Composición química del huauzontle	4
2.3 Proteínas	5
2.4 Proteínas de almacenamiento en semillas	6
2.4.1 Albúminas	7
2.4.2 Globulinas	7
2.4.3 Glutelinas	8
2.4.4 Prolaminas	8
2.5 Proteínas de pseudocereales	8
2.6 Propiedades tecno-funcionales	10
2.5.1 Solubilidad	11
2.5.2 Capacidad de absorción de agua y aceite	12
2.5.3 Gelificación	12
2.5.4 Formación de espuma.....	14
3. -JUSTIFICACIÓN	16
4.-HIPÓTESIS	17
5.-OBJETIVOS	18

5.1 Objetivo general	18
5.2 Objetivos particulares	18
6.- MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1 Materiales	19
6.2 Análisis químico proximal de la harina de huauzontle	19
6.3 Extracción de aislado de proteína de huauzontle (APH).....	19
6.4 Potencial- ζ	20
6.5 Digestión <i>in vitro</i> del APH	20
6.6 Perfil de peso molecular	21
6.7 Perfil de aminoácidos.....	21
6.8 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	22
6.9 Solubilidad de la proteína	22
6.10 Adsorción del APH en la interfase aire-agua	23
6.11 Capacidad de formación y estabilidad de espumas	23
6.12 Capacidades de retención de agua y aceite.....	24
6.13 Formación de gel y propiedades reológicas	24
6.14 Análisis estadístico	25
7.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
7.1 Análisis químico proximal de la harina de semilla de huauzontle	26
7.2 Potencial- ζ	26
7.3 Perfil de aminoácidos.....	28
7.4 SDS-PAGE.....	29
7.5 Análisis FT-IR.....	30
7.6 Digestibilidad <i>in vitro</i>	33

7.7 Solubilidad del aislado de proteína de huauzontle.....	34
7.8 Tensión superficial agua-aire.....	35
7.9 Formación y estabilidad de espuma	39
7.10 Capacidad de retención de agua y aceite	43
7.11 Propiedades gelificantes	43
7.11.1 Inspección visual.....	43
7.11.2 Reología de los geles.....	45
8.-CONCLUSIONES.....	49
9.-REFERENCIAS.....	50
10.- ANEXOS.....	66

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del género <i>Chenopodium</i>	3
Figura 2.- Planta de huauzontle	4
Figura 3.- Niveles estructurales de una proteína	6
Figura 4.- (a) Solubilidad de aislado de proteína de amaranto y (b) solubilidad de proteína de quinoa.....	12
Figura 5.- Representación esquemática de la agregación y gelificación aleatoria de proteínas globulares	13
Figura 6.- Representación gráfica de cuatro niveles en el análisis de espumas.....	15
Figura 7.- Descripción esquemática del proceso de adsorción de proteínas en interfases aire/agua.....	15
Figura 8.- Potencial ζ del aislado de proteína de huauzontle como función del pH.....	27
Figura 9.- SDS-PAGE de harina de semilla de huauzontle (HSH) y aislado de proteína de huauzontle (APH).....	30
Figura 10.- (a) Espectros FTIR para aislado de proteína de huauzontle a diferentes valores de pH y (b) ilustración de la deconvolución Gaussiana de las bandas FTIR en la región de la Amida I.	32
Figura 11.- Evolución de la tensión interfacial a través del tiempo para la adsorción de diferentes concentraciones de APH en un sistema agua-aire	35
Figura 12.- Dependencia de la presión superficial contra la raíz cuadrada del tiempo para el aislado de proteína de huauzontle en la interfase agua-aire.....	37
Figura 13.- Constantes de penetración (K_p) y reacomodo (K_R) para el aislado de proteína de huauzontle a diferentes concentraciones.....	38

Figura 14.- Morfología de las burbujas de aire estabilizadas con APH a diferentes concentraciones ((a,b) 0.1, (c,d) 0.5, (e,f) 1 y (g,h) 3 g/100 mL). Espumas al tiempo 0 min de preparación (a, c, e, g) y después de 60 min (b, d, f, h). Magnificación 40 ×. 42

Figura 15.- Geles formados a partir de dispersiones de aislado de proteína de huauzontle (15 g/100 mL) a diferentes valores de pH 44

Figura 16. Módulos de almacenamiento (G') (símbolos llenos) y pérdida (G'') (símbolos vacíos) como función de la temperatura para dispersiones de aislado de proteína de huauzontle (15 g/100 mL, pH 7.0 y 9.0). Las flechas indican las direcciones de calentamiento y enfriamiento. 46

Figura 17.- Módulos de almacenamiento (G') (símbolos llenos) y pérdida (G'') (símbolos vacíos) como función del porcentaje de deformación para geles de aislado de proteína de huauzontle a 15 g/100 mL, pH 7 y 9. 48

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Análisis químico proximal de la harina de semilla de huauzontle	26
Tabla 2.- Composición de aminoácidos del aislado de proteína de huauzontle (g/100 g de proteína).....	28
Tabla 3.- Estructura secundaria y propiedades funcionales de aislado de proteína de huauzontle a diferentes valores de pH	33
Tabla 4.- Parámetros dinámicos de adsorción de APH a diferentes concentraciones en la interfase aire-agua.....	39
Tabla 5.- Capacidad espumante y estabilidad de la espuma del aislado de proteína de huauzontle.....	41

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue obtener y evaluar un aislado de proteína de semilla de huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.) respecto a su calidad nutricional, propiedades fisicoquímicas y tecno-funcionales. El aislado de proteína de semilla de huauzontle (APH) se obtuvo por precipitación isoeléctrica. La calidad nutricional del APH fue denotada por su elevado contenido en la mayoría de los aminoácidos esenciales y su alta digestibilidad (83.0 ± 0.2 %). Espectros infrarrojos por transformada de Fourier mostraron que la proporción relativa de α -hélice y lámina β varió con el pH. SDS-PAGE mostró que el APH está compuesto por albuminas y globulinas. La capacidad de retención de agua (3.3 ± 0.2 g/g_{APH}) fue similar a la reportada para otros pseudocereales. La capacidad de formación de espuma (FC) y la estabilidad de la espuma (FS) fueron dependientes de la concentración del APH. Espumas formadas con APH al 3 % permanecieron estables después de 1 hora a temperatura ambiente. Esto estuvo de acuerdo con el análisis de tensión superficial donde una concentración del 3 % de APH propicio una fuerte disminución en los valores registrados durante los primeros minutos. Las propiedades reológicas de geles al 15 % a pH 7.0 y 9.0 mostró que el módulo de almacenamiento domino sobre el módulo de pérdida durante la rampa de calentamiento-enfriamiento. Un porcentaje de deformación (~60 %) promovió el cruce de los módulos en geles formados a pH 9.0. Estos resultados establecen claramente que el APH posee una elevada calidad nutricional y propiedades tecno-funcionales idóneas para su uso en diversos sistemas alimentarios.

Palabras clave: Proteína de huauzontle, calidad nutricional, estructuras proteínicas secundarias, propiedades tecno-funcionales.

ABSTRACT

The objective of this work was to obtain and evaluate a huauzontle seed protein isolate (*Chenopodium nuttalliae* Saff.) with respect to its nutritional quality, physicochemical and techno-functional properties. Huauzontle seed protein isolate (APH) was obtained by isoelectric precipitation. The nutritional quality of APH was denoted by its high content in most of the essential amino acids and its high digestibility (83.0 ± 0.2 %). Fourier transform infrared spectra report that the relative proportion of α -helix and β -sheet varied with pH. SDS-PAGE showed that APH is composed of albumin and globulins. The water holding capacity (3.3 ± 0.2 g/g_{APH}) was similar to that reported for other pseudo-cereals. The foaming capacity (FC) and foam stability (FS) were dependent on the concentration of APH. Foams formed with 3 % APH remained stable after 1 hour at room temperature. This was in agreement with the surface tension analysis where a concentration of 3% of APH led to a strong decrease in the values recorded during the first minutes. The rheological properties of 15 % gels at pH 7.0 and 9.0 showed that the storage modulus dominated the loss modulus during the heating-cooling ramp. A percentage of deformation (~60 %) promoted the crossover of the modules in gels formed at pH 9.0. These results clearly show that APH has high nutritional quality and techno-functional properties suitable for use in divers food systems.

Keywords: Huauzontle protein, nutritional quality, secondary protein structures, techno-functional properties.

1.- INTRODUCCIÓN

Durante las últimas dos décadas los consumidores han dirigido un creciente interés por las proteínas de origen vegetal como alternativa a aquellas de origen animal. La biocompatibilidad, los costos relativamente bajos y la sostenibilidad climática son las motivaciones detrás del creciente interés por las proteínas vegetales (López et al., 2018a). De hecho, estas proteínas son renovables y cuentan con interesantes propiedades funcionales y/o fisicoquímicas (Nesterenko et al., 2013). Se ha demostrado que las proteínas vegetales son adecuadas para la estabilización de emulsiones multicapa (Burgos-Díaz et al., 2016) y para la formación de geles (Moreno-Santander et al., 2020). Además, las proteínas vegetales se pueden combinar con otros polímeros comestibles para mejorar la calidad y el valor nutricional de los productos alimenticios (Lin et al., 2017). Las leguminosas y los cereales son las fuentes de proteínas vegetales más explotadas por la industria alimentaria (Song et al., 2011).

La proteína de soya es un material ampliamente utilizado para la producción de alimentos suplementarios y para la fabricación de películas comestibles o biodegradables (Song et al., 2011). Las proteínas de chícharos, garbanzos y lentejas también son fuentes importantes de proteínas vegetales (Boye et al., 2010; Roy et al., 2010). La proteína de salvado de arroz es una fuente proteínica prometedora con buenos valores biológicos y digestibilidad (Han et al., 2015). Recientemente, algunos pseudocereales han surgido como fuentes importantes de proteínas vegetales. Dado su contenido relativamente alto de proteínas, los pseudocereales, como la quinoa, la chía y el amaranto (López et al., 2018a; López et al., 2018b), han sido etiquetados como superalimentos, lo que los vuelve una alternativa viable a los productos alimenticios de origen animal. Por ejemplo, se ha encontrado que los hidrolizados de proteína de semilla de amaranto tienen actividades antihipertensivas (Fritz et al., 2011) y antioxidantes (Delgado et al., 2011). Los aislados de proteína de amaranto se han utilizado para la producción de nanofibras mediante “electrospinning” (Aceituno-Medina et al., 2013), ya que presentan propiedades fisicoquímicas destacadas (Shevkani et al., 2014). Las proteínas de las semillas de chía son altamente biodisponibles y tienen un elevado contenido de aminoácidos esenciales (Timilsena et al., 2016). Las proteínas de amaranto también exhiben importantes propiedades emulsionantes útiles para la industria alimentaria (Suarez y Añon, 2018).

Chenopodium nuttalliae Saff., conocido con el nombre común de huauzontle, es una especie vegetal comestible nativa de México. El nombre común se deriva del náhuatl huautli "amaranto" y tzontli "pelo". Este pseudocereal se consume tradicionalmente en México desde la época prehispánica (Kistler y Shapiro, 2011). El huauzontle, al igual que la quinoa, pertenece a la familia de las Chenopodiaceae, ambos son libres de gluten por lo que pueden ser consumidos por personas celíacas y tienen una composición rica en nutrientes (Pereira et al., 2019). El huauzontle tiene un contenido proteínico relativamente alto (aproximadamente 17 %), así como antioxidantes y almidón (Barrón-Yañez et al., 2009). Además, las semillas de huauzontle representan un ingrediente potencialmente útil para la salud del consumidor, ya que son una buena fuente de compuestos fenólicos con alta actividad antioxidante (Chaires-Martinez et al., 2013; Lazo-Vélez et al., 2016). También se han caracterizado las propiedades fisicoquímicas y funcionales del almidón de huauzontle (Assad-Bustillos et al., 2014).

Se han estudiado con cierto detalle las proteínas de diversos pseudocereales (Avanza et al., 2005; Janssen et al., 2017; Tironi y Añon, 2010), pero no aquellas de huauzontle. Por lo que, el objetivo de este estudio fue obtener un aislado proteico de semillas de huauzontle y evaluar su calidad nutricional y propiedades funcionales.

2.-REVISION DE LITERATURA

2.1 Generalidades del huauzontle

El huauzontle es un pseudocereal de origen mexicano, perteneciente al género *Chenopodium*. Alrededor de 250 especies pertenecen a este género. El huauzontle es una planta herbácea anual y se usa principalmente como hortaliza de hoja y para follaje (Bhargava et al., 2005). En la Figura 1 se muestra la distribución en América de diferentes variedades del género *Chenopodium*. En México, el huauzontle es de gran importancia debido a que representó junto con el maíz, el frijol y el chile la base de la alimentación de las culturas prehispánicas (Xingú-López et al., 2018).

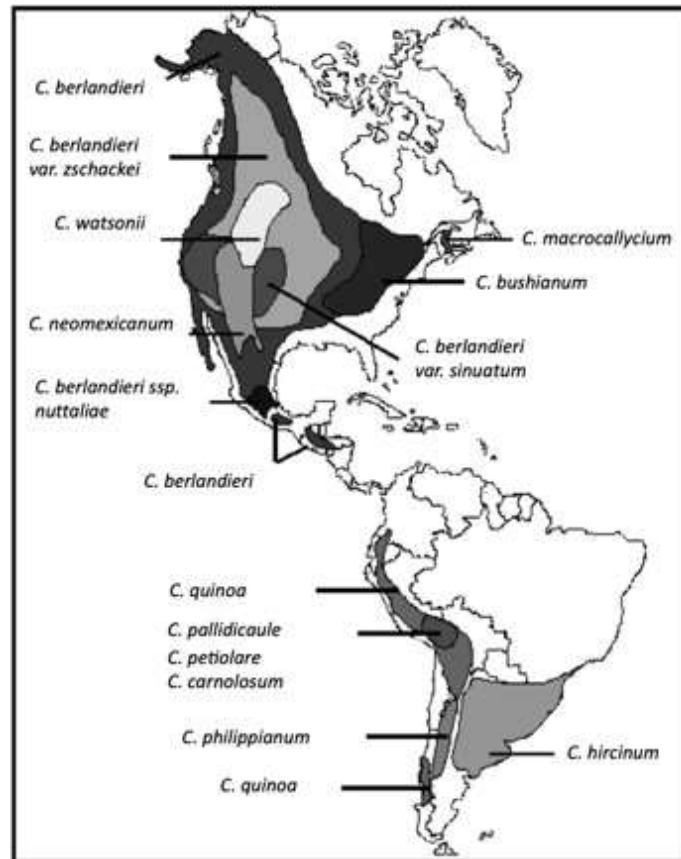


Figura 1. Distribución del género *Chenopodium* tomada de Allende (2014).

El huauzontle posee las características de crecer en suelos pobres y resistir heladas y sequías (Hernández-Marín et al., 2019) lo cual lo vuelve un cultivo ideal para su siembra en zonas

áridas y semiáridas con problemas agrícolas. De acuerdo con Mir et al. (2018) se puede entender como pseudocereal a toda aquella planta que no pertenece a la familia de las gramíneas, pero cuyas semillas son utilizadas para la producción de harina para pan. En botánica, un pseudocereal es una planta dicotiledónea pero sus semillas son similares a las de los cereales verdaderos en cuanto a su función y composición (Alvarez-Jubete et al., 2010).

Estudios de marcadores genéticos han demostrado una estrecha cercanía entre el huauzontle y la quinoa (Kolano et al., 2016). Anteriormente se consideraba al huauzontle de la misma especie que la quinoa; sin embargo, Bhargava et al. (2008) demostraron, de acuerdo con las características morfológicas, electroforéticas y los datos de cruzabilidad, que el huauzontle tiene un origen independiente. El huauzontle cuenta con una gran variabilidad genética lo cual puede observarse por la coloración de la planta, inflorescencia y semillas (Moreno, 2014). La gran variabilidad genética del huauzontle podría explicarse por el cruce de éste con poblaciones arvenses de *Chenopodium* (Xingú-López et al., 2018). El huauzontle es una planta anual que mide alrededor de 1 m de altura, sus hojas normalmente son de forma triangular, sus semillas tienen un diámetro entre 2-2.5 mm. En la figura 2 se muestran plantas de huauzontle.



Figura 2.- Planta de huauzontle tomada de Delegación SADER Puebla (2016).

2.2 Composición química del huauzontle

El huauzontle es un quelite ampliamente distribuido en Norteamérica y Centroamérica con un contenido proteínico destacado (17.8 %), además sobresale su alto contenido de ácidos

grasos esenciales (Xingú-López et al., 2018) y de saponinas, las cuales se han correlacionado con propiedades antifúngicas y antiinflamatorias (Lazo-Vélez et al., 2016). Aunado a esto, también es rico en minerales como hierro, potasio, calcio y cobre, lo cual lo hace ideal para su consumo (Bhargava et al., 2008). Chaires-Martínez et al. (2013) demostraron que la semilla de huauzontle tiene un elevado contenido de fenoles con alta actividad antioxidante, su consumo puede generar efectos benéficos en la salud del consumidor. Assad-Bustillos et al. (2014) investigaron las propiedades funcionales del almidón de semilla de huauzontle y determinaron que el poder de hinchamiento y solubilidad del almidón de huauzontle es equiparable al del maíz y superior al de quinoa. Barron-Yañez et al. (2009) determinaron el valor nutricional en semillas y germinados de huauzontle, encontrando que las primeras tienen la siguiente composición en 100 g de porción: proteína 17.83 g, extracto etéreo 6.21 g, cenizas 4.97 g, fibra cruda 6.59 g y carbohidratos 71 g (expresados en base seca).

2.3 Proteínas

Las proteínas son macronutrientes esenciales para el ser humano, su calidad nutricional depende de diversos factores como su digestibilidad, perfil de aminoácidos y pureza (Sá et al., 2020). Las principales fuentes de proteínas en la dieta humana son de origen animal y vegetal; sin embargo, las dietas ricas en proteínas animales se han asociado con diversos problemas a la salud, como obesidad (Segovia-Siapco et al., 2020) y diabetes tipo 2 (Ye et al., 2019). Por su parte las proteínas de origen vegetal presentan diversos beneficios a la salud, como su actividad contra el cáncer, apoyo nutricional a enfermos cirróticos y una mejora en la disfunción metabólica (Lin et al., 2017).

Las proteínas globulares son partículas coloidales esféricas que en su interior contienen grupos hidrofóbicos y en la superficie se encuentran ubicados los grupos hidrofílicos disponibles para formar interacciones dipolo-dipolo con disolventes (Kim et al., 2020). Generalmente, forman interacciones proteína-proteína por medio de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o interacciones electrostáticas, y en disolución se encuentran estabilizadas por medio de repulsiones electrostáticas entre proteínas cargadas (Nicolai, 2019).

La funcionalidad de una proteína está directamente relacionada con su estructura química conformacional, la cual puede clasificarse en cuatro niveles (Figura 3), los cuales ocurren en etapas y cada nivel inferior es necesario para la formación del siguiente. La estructura primaria está constituida por una cadena lineal de residuos de aminoácidos; por su parte, la estructura secundaria se forma mediante puentes de hidrógeno los cuales provocan doblamientos locales. Por convención, la estructura secundaria se clasifica en tres tipos α -hélice, lámina β y espiral aleatoria. La unión de diversas estructuras secundarias propicia aún más el plegamiento de la proteína, formando así la estructura terciaria, la cual se estabiliza mediante puentes de hidrógeno, enlaces disulfuro, puentes salinos e interacciones hidrofóbicas. Al unirse una o más estructuras terciarias mediante interacciones no covalentes y enlaces disulfuro se genera la estructura cuaternaria (Wardah et al., 2019).

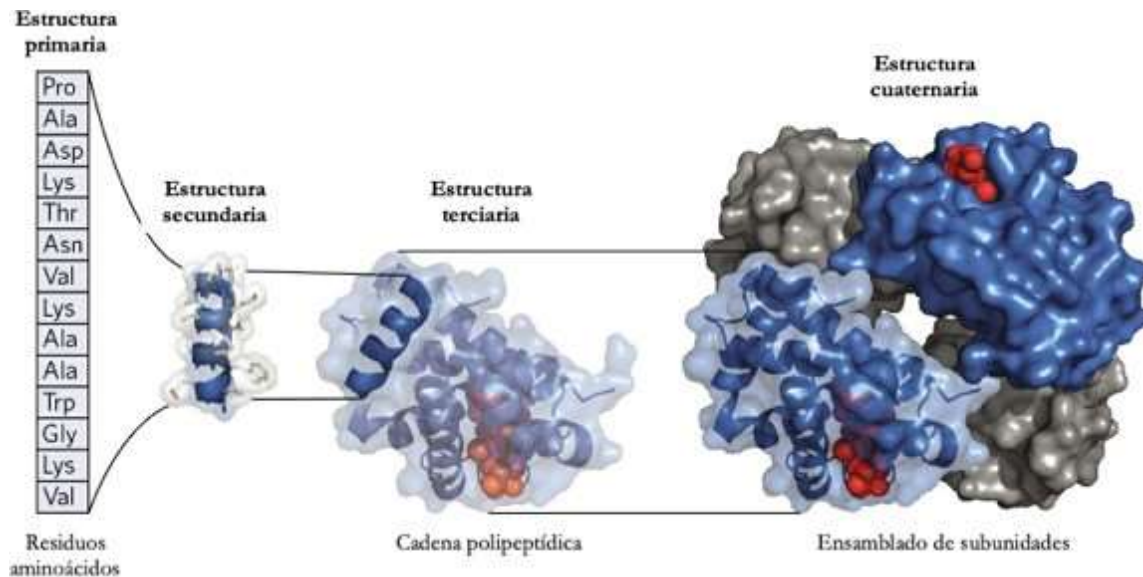


Figura 3.- Niveles estructurales de una proteína tomado de Nelson y Cox (2015).

2.4 Proteínas de almacenamiento en semillas

Las semillas han recibido gran atención en los últimos años, debido a su alto contenido de proteína con elevado valor nutricional, lo cual podría ayudar a cumplir con los objetivos de desarrollo del milenio postulados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), que buscan mitigar la pobreza y el hambre, para lo cual la suplementación con proteínas es fundamental (Kumar et al., 2019).

Las semillas son un reservorio de proteínas, carbohidratos y lípidos de las plantas, cuya finalidad es nutrir y proteger al embrión (Kumar et al., 2019). En las semillas podemos encontrar tres categorías de proteínas: de almacenamiento, estructurales y biológicamente activas, siendo las primeras las que se encuentran en mayor abundancia y por ende las que tienen un mayor impacto en las propiedades nutricionales y funcionales (Marcone, 1999).

De acuerdo con Osborne y Campbell (1898) las proteínas de almacenamiento se pueden clasificar de acuerdo con su solubilidad en cuatro tipos: Albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas diluidas), glutelinas (solubles en ácidos o álcalis diluidos) y prolaminas (solubles en disoluciones acuosas de alcohol). Se sabe que las semillas dicotiledóneas son ricas en albúminas y globulinas, como es el caso de los pseudocereales; por su parte, las plantas monocotiledóneas son ricas en glutelinas y prolaminas, como es el caso de los cereales (Kumar et al., 2019). Las proteínas de almacenamiento en semillas de pseudocereales se han catalogado como proteínas con un valor biológico más alto que el de los cereales debido a su alto contenido de aminoácidos esenciales y mayor biodisponibilidad (Deleu et al., 2019).

2.4.1 Albúminas

Las albúminas provenientes de fuentes vegetales son similares a la albúmina de huevo en sus propiedades funcionales (Kumar et al., 2019). Los análisis de perfil electroforético en fracciones de albúminas de quinoa han demostrado que éstas se encuentran en pesos moleculares por debajo de los 20 kDa (López et al., 2018a). Estudios estructurales en la albumina 2S de canola revelaron que es una proteína heterodimérica que se compone por dos subunidades de 30-40 y 60-90 residuos de aminoácidos (Kumar et al., 2019)

2.4.2 Globulinas

Las globulinas tienen un peso molecular superior al de las albúminas y por ende son solubles en soluciones salinas en lugar de agua (Kumar et al., 2019). Las globulinas pueden dividirse en dos clases 7S y 11S de acuerdo con sus coeficientes de sedimentación; diversos estudios han demostrado que las semillas dicotiledóneas favorecen la presencia de estructura 11S (Marcone, 1999). Comúnmente las globulinas 11S se encuentran glicosiladas (proceso

bioquímico en el que un glúcido se encuentra incorporado a otra molécula) y sus subunidades se encuentran unidas por enlaces disulfuro intercatenarios, su peso molecular oscila alrededor de 300 kDa; mientras que las globulinas 7S se aproximan a 180 kDa; aunque esto puede variar dependiendo a las condiciones de extracción y la fuente de obtención (Marcone, 1999). López et al. (2018a) reportaron ocho fracciones de globulinas para proteína de quinoa, las cuales se encontraron a pesos moleculares inferiores a 50 kDa.

2.4.3 Glutelinas

Las glutelinas son uno de los principales componentes de las proteínas de almacenamiento de los cereales (Zhao et al., 1983). Son ricas en aminoácidos hidrofóbicos como fenilalanina, valina, prolina, tirosina y leucina. Las glutelinas son proteínas de suma importancia para las propiedades de horneado ya que mediante enlaces inter o intra-disulfuro permite su reticulación (Kumar et al., 2019). La glutelina cuenta con dos subunidades principales, una ácida y una básica con pesos moleculares que van de 30-40 kDa y 19-23 kDa respectivamente (Kim et al., 2020).

2.4.4 Prolaminas

Las prolaminas pueden ser clasificadas de acuerdo con su solubilidad en etanol, las del primer grupo son solubles; mientras que las del segundo grupo son insolubles debido a la presencia de enlaces disulfuro (Kumar et al., 2019). Las prolaminas en pseudocereales como la quinoa están constituidas principalmente por aminoácidos como aspartato/asparagina, arginina, serina, leucina y glicina (Martínez-Villaluenga et al., 2020). La diferencia en la composición química y proporción de prolaminas entre los cereales y pseudocereales indica la falta de toxicidad de estos últimos para las personas con enfermedad celiaca (Martínez-Villaluenga et al., 2020).

2.5 Proteínas de pseudocereales

Hoy en día la sociedad es más consciente sobre la seguridad alimentaria y el desafío que implica el crecimiento poblacional constante, lo cual requiere de la búsqueda de fuentes alternativas de proteínas ambientalmente viables (Sá et al., 2020). En este sentido, las

proteínas de origen vegetal cada vez se están posicionando en el mercado con una mayor fuerza, debido a sus múltiples ventajas comparadas con las proteínas de origen animal, como lo es su excelente calidad nutricional, sus propiedades funcionales y bajos costos de producción (López et al., 2018b), así como su contribución para afrontar los desafíos medioambientales y de seguridad alimentaria (Alonso-Miravalles et al., 2020). La alta variabilidad genética de los pseudocereales les permite adaptarse a condiciones climáticas adversas (Martínez-Villaluenga et al., 2020). Además, el contenido de proteína de los pseudocereales generalmente es más alto que el de los cereales verdaderos (Alvarez-Jubete et al., 2010); por ejemplo, el contenido de proteína de algunas variedades de amaranto puede llegar a alcanzar el 21.5 % y el de la quinoa hasta el 16.7 % (Martínez-Villaluenga et al., 2020). Con base en lo expuesto, las proteínas de pseudocereales han surgido como una fuente vegetal de proteína altamente rentable. Por otro lado, la enfermedad celíaca es uno de los trastornos más comunes a nivel mundial, aproximadamente el 1 % de la población lo sufre, representando alrededor de 60 millones de personas, lo que hace primordial la búsqueda de fuentes de proteína libres de gluten (Álvarez-Jubete et al., 2010). Este requerimiento podría ser satisfecho por proteínas provenientes de granos de pseudocereales, debido a que son libres de gluten y poseen un valor nutricional y nutracéutico excelente (Martínez-Villaluenga et al., 2020).

Pseudocereales como la quinoa y el amaranto han sido altamente estudiados la última década como fuentes de proteínas vegetales y han demostrado tener propiedades nutricionales y funcionales superiores a las de algunos cereales y leguminosas, además de niveles bajos de ácidos grasos saturados (Mudgil, et al. 2019). La proteína de semilla de quinoa se compone principalmente (> 50 %) por globulinas y albúminas, lo cual se ha relacionado con su alta solubilidad y valor nutricional (Wang et al., 2020). Por su parte, la proteína de semilla de amaranto se compone principalmente por albúminas, glutelinas y globulinas; es bien conocido que las albúminas son ricas en triptófano, treonina y lisina, y las globulinas en cisteína, metionina y lisina (Sánchez-López et al., 2020). Diversos estudios han demostrado las buenas propiedades funcionales de las globulinas y albúminas, como su capacidad emulsificante y espumante (Du et al., 2020; Li et al., 2018; Wu et al., 2020).

Asimismo, la composición de aminoácidos de estos pseudocereales se encuentra bien balanceada, con un contenido mayor de lisina, metionina y cisteína y con un mayor valor biológico que el de los cereales y las leguminosas (Deleu et al., 2019; Martínez-Villaluenga et al., 2020). Wang et al. (2020) encontraron que la proteína de quinoa tiene un balance de aminoácidos esenciales excelente, ya que sus niveles son adecuados para siete de los ocho aminoácidos esenciales. Por su parte la proteína de amaranto comparada con otros granos contiene el doble de lisina, su contenido puede ser equiparado con el de la soya, la cual es considerada como una proteína de alto valor nutricional (Hejazi et al., 2016), además tiene un alto contenido de metionina lo cual la vuelve un ingrediente que promueve la calidad nutricional de los alimentos a los que se incorpora (Grundy et al., 2020). Aunado a esto, la biodisponibilidad de la proteína de pseudocereales es superior a la mostrada por la proteína de cereales y de origen animal, lo cual la vuelve una proteína de alta calidad (Alvarez-Jubete et al., 2010).

Las propiedades funcionales de la proteína de amaranto y quinoa han sido ampliamente estudiadas en los últimos años. Shevkani et al., (2014) demostraron que el aislado de proteína de amaranto es capaz de estabilizar emulsiones a pH 7.0. Bolontrade et al. (2016) determinaron que el aislado de proteína de amaranto puede formar espumas estables a pH ácido, a través de la formación de películas flexibles y elásticas. Bejarano-Luján et al. (2010) formaron geles firmes y resistentes a la fractura usando concentrados de proteína de amaranto, debido a la fracción de globulina presente en la proteína. Elsohaimy et al. (2015) demostraron las buenas propiedades espumantes y emulsificantes de aislado de proteína de quinoa. Avila et al. (2016) determinaron que geles formados por proteína de quinoa podrían ser usados en bebidas u otras aplicaciones de alimentos líquidos.

2.6 Propiedades tecno-funcionales

Las proteínas son ampliamente utilizadas por la industria alimentaria, no sólo por sus propiedades nutricionales, sino también por sus propiedades funcionales; sin embargo, los nuevos requerimientos a nivel mundial han exhortado a la sustitución de proteínas animales por fuentes más sustentables como las proteínas vegetales (Schmitt et al., 2019). De acuerdo con Kinsella y Melachouris (1976) las propiedades funcionales de las proteínas denotan

cualquier propiedad fisicoquímica que afecte el procesamiento y el comportamiento de estas biomoléculas en los sistemas alimentarios. En este sentido las proteínas vegetales han demostrado tener buenas propiedades funcionales, como solubilidad, absorción de agua y aceite, gelificación y capacidad de formación de espuma (Nesterenko et al., 2013). Sin embargo, las propiedades funcionales son influenciadas por las características intrínsecas de una proteína determinada; por ejemplo, la estructura y composición de aminoácidos influye fuertemente en las propiedades reológicas y texturales; la hidrofobicidad, distribución y carga neta influye en su capacidad de formación de espuma y emulsión, y la hidratación tendrá una fuerte influencia sobre la capacidad de absorción de agua y aceite y la solubilidad (Mirmoghtadaie et al., 2016). Esto resalta la importancia del análisis de las propiedades fisicoquímicas, estructurales y funcionales de fuentes novedosas y diversas de proteínas, con la finalidad de diversificar su uso en la industria alimentaria.

2.5.1 Solubilidad

La solubilidad de una proteína es una propiedad funcional de suma importancia dada su relación con otras propiedades como las capacidades emulsionante y espumante (Shevkani et al., 2014). Generalmente se asocia a las proteínas vegetales con una baja solubilidad (Alves y Tavares, 2019). Sin embargo, las proteínas provenientes de pseudocereales tienen una solubilidad diferente a las provenientes de cereales, dado que se componen principalmente por albúminas y globulinas, lo que favorece su carácter hidrofílico (Deleu et al., 2019). La solubilidad de una proteína se encuentra determinada por su contenido de puentes de hidrógeno y los residuos hidrófobos e hidrófilos en su superficie (Han et al., 2018). Las proteínas tienen los valores más bajos de solubilidad en y cerca del punto isoeléctrico, debido a la carga neta cero, lo cual favorece las interacciones proteína-proteína y por ende afecta su solubilidad; cuando el pH se aleja del punto isoeléctrico la solubilidad incrementa (Shevkani et al., 2014). Las proteínas de quinoa y amaranto presentan una curva de solubilidad típica, en las Figura 4a y 4b pueden observarse los trabajos de Shevkani et al. (2014) y Elsohaimy et al. (2015), respectivamente.

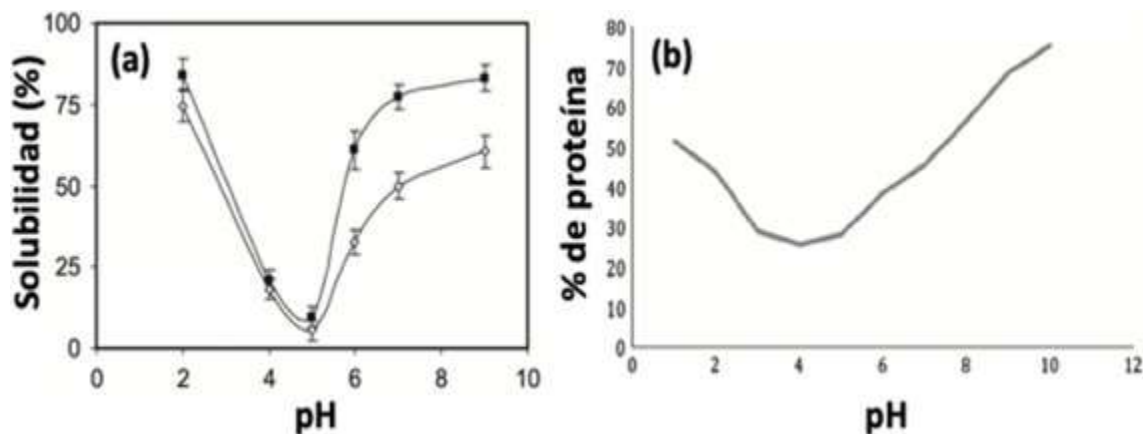


Figura 4.- (a) Solubilidad de aislado de proteína de amaranto tomado de Shevkani et al. (2014) y (b) solubilidad de proteína de quinoa tomado de Elsohaimy et al. (2015).

2.5.2 Capacidad de absorción de agua y aceite

La capacidad de absorción de aceite es un parámetro importante debido a su estrecha relación con la calidad sensorial de los alimentos y es determinado por la presencia de aminoácidos no polares que permiten la interacción proteína-aceite. Por otra parte, la capacidad de absorción de agua está estrechamente relacionada con la presencia de aminoácidos polares que favorecen las interacciones proteína-agua (Bessada et al., 2019). Una buena capacidad de absorción de agua y aceite en una proteína permite su uso en diversos productos procesados, además favorece la retención de sabor y la palatabilidad de los productos (Shi et al., 2019).

2.5.3 Gelificación

Se entiende como gel a aquellos sistemas en los que las moléculas se encuentran conectadas entre sí, formando una estructura de red bajo ciertas condiciones, donde los espacios vacíos en la red pueden estar llenos de líquido o gas (Lin et al., 2017). Durante la gelificación se tiene una disminución de las interacciones repulsivas y un aumento de las interacciones atractivas. Este cambio puede generarse por diversos métodos, como la incorporación de sales, reacciones enzimáticas, el empleo de altas presiones, la acidificación y el calentamiento, siendo este último el más común (Nicolai, 2019).

El calentamiento de las proteínas globulares a una concentración crítica de proteína propicia que la cadena peptídica sea más móvil, lo cual conlleva a que los aminoácidos interactúen y se unan (Nicolai, 2019; Schmitt et al., 2019). Al desnaturalizarse una proteína, las cadenas polipeptídicas pierden su estructura y rigidez, propiciando que los aminoácidos que se encuentran en el interior de la estructura terciaria queden expuestos para formar enlaces disulfuro, puentes de hidrógeno y/o interacciones hidrofóbicas (Nicolai, 2019).

Las proteínas globulares tienen una estructura secundaria y terciaria densa y definida que se agrega espontánea e irreversiblemente cuando se calienta por encima de los 60 °C (Nicolai y Durand, 2013). La disociación y reasociación de las cadenas de aminoácidos puede llevarse a cabo de diferentes maneras formando así geles con propiedades distintas (Bessada et al., 2019). Es conocido que la concentración de proteína es un factor de suma importancia en la formación de geles, ya que concentraciones altas generan geles que se sostienen así mismos, mientras que las concentraciones bajas provocan geles que colapsan con la gravedad (Nicolai y Durand, 2013).

Diversas investigaciones se han centrado en el estudio de las propiedades funcionales de las proteínas vegetales, sin embargo, las propiedades gelificantes de estas proteínas no han recibido gran atención (van Vliet et al., 2002).

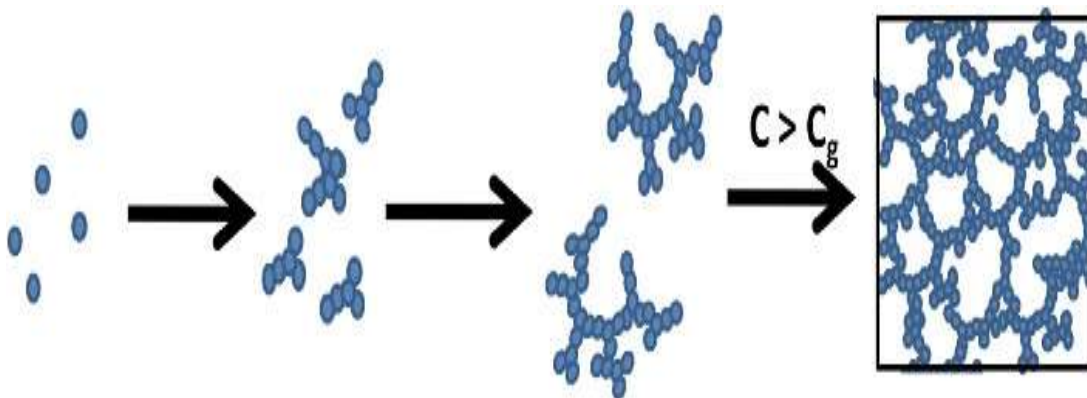


Figura 5.- Representación esquemática de la agregación y gelificación aleatoria de proteínas globulares tomada de Nicolai (2019).

2.5.4 Formación de espuma

Las múltiples propiedades impartidas a los sistemas alimentarios mediante las espumas (cambios en textura, apariencia, reología y sensación en la boca, mejoras en la digestibilidad y vida útil de los productos) han generado un creciente interés por el estudio de estos sistemas (Germain y Aguilera, 2014). Las espumas son sistemas termodinámicamente inestables, que consisten en burbujas de aire dispersas en un medio acuoso, que mejoran su estabilidad mediante el uso de tensoactivos que reducen la tensión interfacial (Amagliani y Schmitt, 2017).

En la actualidad, las investigaciones se centran en el uso de biopolímeros que al formar una monocapa en la interfase aire-agua, estabilizan las burbujas de aire (Dickinson, 2020). El uso de proteínas como estabilizantes de espumas, ya sea en estado nativo o hidrolizado, es una tendencia actualmente, debido a su carácter anfifílico que le da la capacidad de desplegarse y adsorberse en la interfase agua-aire formando una película interfacial que le confiere estabilidad a la espuma (Amagliani y Schmitt, 2017). De acuerdo con Dickinson (2020), si la capa de proteína es lo suficientemente gruesa y rígida será capaz de proteger la burbuja de aire contra la contracción influenciada por la diferencia de presión de Laplace. Por otra parte, el pH del medio es importante cuando se estabilizan las espumas, ya que éste tiene influencia sobre la carga superficial y la interacción electrostática de las proteínas (Lin et al., 2017).

El análisis de espumas estabilizadas por proteínas puede llevarse a cabo en diferentes niveles, los cuales podemos observar en la Figura 6 donde el nivel 1 refleja el nivel molecular, el cual es de gran importancia ya que las propiedades moleculares influyen en el resto de los niveles, el siguiente nivel muestra los procesos de adsorción y las propiedades interfaciales de las proteínas; el tercer nivel permite analizar el tamaño, la forma y organización espacial de las burbujas y el último nivel se enfoca en estudiar propiedades mecánicas y reológicas de las espumas (Germain y Aguilera, 2014).

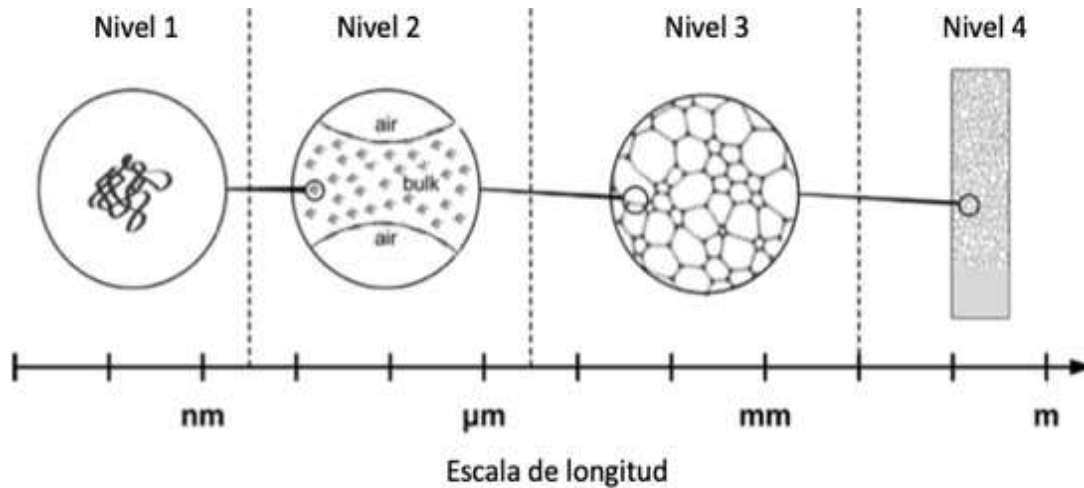


Figura 6.- Representación gráfica de cuatro niveles en el análisis de espumas tomado de Germain y Aguilera (2014).

El proceso de estabilización de espumas mediante proteínas se describe en la Figura 7, donde se puede observar que la proteína se difunde hacia la interfase aire-agua; esta difusión dependerá del peso molecular de la proteína y de la viscosidad del medio. La proteína se adsorbe en la interfase y sufre cambios conformacionales, quedando los grupos hidrofóbicos expuestos hacia la fase gaseosa y los hidrofílicos hacia la fase acuosa; por último, las proteínas se agregan en la capa interfacial estableciendo una red. Este último paso dependerá de la reactividad química y las propiedades fisicoquímicas de las cadenas laterales de la proteína (Germain y Aguilera, 2014).

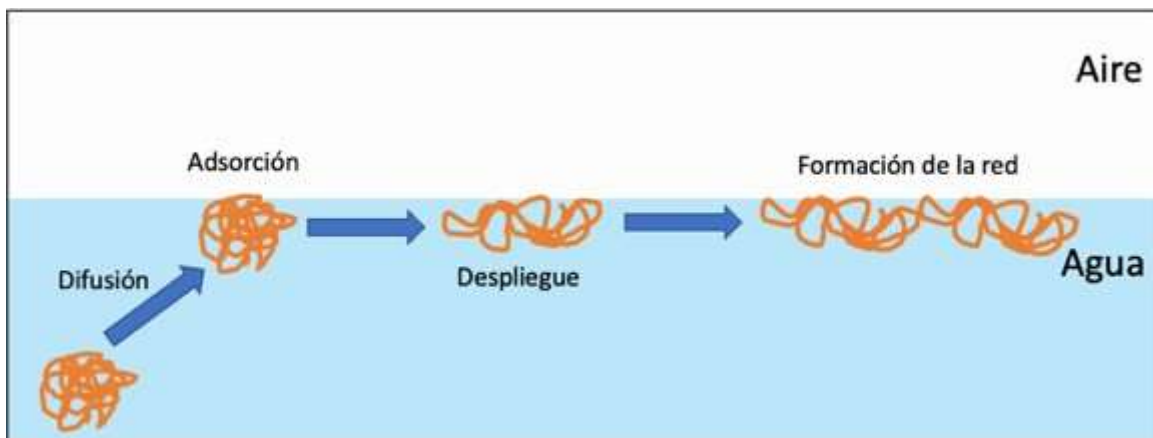


Figura 7.- Descripción esquemática del proceso de adsorción de proteínas en interfaces aire/agua.

3. -JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe una creciente preocupación por la seguridad alimentaria debido al constante incremento poblacional, por lo cual la búsqueda de fuentes alternativas de proteínas con un alto valor biológico y mejores propiedades funcionales es crucial. En este sentido, las proteínas vegetales, específicamente aquellas provenientes de semillas de pseudocereales han demostrado tener múltiples ventajas sobre otras proteínas vegetales y animales. Además, existe la necesidad de diversificar las proteínas disponibles para la industria alimentaria que cuenten con mejores cualidades, un perfil de aminoácidos esenciales balanceado y con una alta biodisponibilidad.

El cambio climático ha propiciado la búsqueda de fuentes de proteína sustentables y económicamente sostenibles como alternativas a las proteínas animales, las cuales se han asociado con costos elevados de producción, alto consumo de agua y excesiva contaminación. Aunado a ello, en la actualidad se busca rescatar los cultivos endémicos mexicanos, lo que hace necesario el estudio de sus macronutrientes, así como sus propiedades funcionales y biológicas, con la finalidad de lograr diversificar sus usos y propiciar su aprovechamiento agrícola e industrial.

No obstante, la sustitución parcial o total de las proteínas animales por proteínas vegetales sin afectar las propiedades tecno-funcionales de los productos sigue siendo un reto, por lo cual es de suma importancia la investigación de nuevas fuentes de proteínas vegetales.

4.-HIPÓTESIS

Las propiedades tecno-funcionales del aislado de proteína de semilla de huauzontle serán equiparables con las de los aislados de otros pseudocereales y algunas proteínas de origen animal.

La calidad nutricional del aislado de proteína de semilla de huauzontle será igual o superior al de otros aislados de proteínas vegetales.

5.-OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Obtener un aislado de proteína de semilla de huauzontle y evaluar su estructura, calidad nutricional y propiedades funcionales.

5.2 Objetivos particulares

- I. Establecer el método de obtención del aislado de proteína de huauzontle a partir de harina de la semilla.
- II. Determinar las propiedades físicoquímicas del aislado de proteína de huauzontle.
- III. Evaluar la calidad nutricional de la proteína de huauzontle mediante un perfil de aminoácidos.
- IV. Analizar la digestibilidad *in vitro* del aislado de proteína de huauzontle.
- V. Analizar las propiedades funcionales del aislado de proteína de huauzontle.
- VI. Analizar la influencia de la estructura secundaria de la proteína de huauzontle sobre las propiedades funcionales de la misma.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

Semillas de huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.) se obtuvieron de un productor local de la comunidad de Tepoztlán (18° 59' 7'' N, 99° 5' 59'' O, y 1706 msnm), Morelos, México. El ácido clorhídrico, el hidróxido de sodio y el etanol grado analítico se adquirieron en J.T. Baker (Xalostoc, Estado de México, México). Los reactivos de electroforesis se obtuvieron de Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, EUA). Las enzimas para el ensayo de digestibilidad de proteínas fueron de Sigma-Aldrich México (Toluca, Estado de México, México). Los reactivos para HPLC y para la derivatización de proteínas fueron de Waters Corp. (Milford, MA, EUA). El aceite de soya (Nutrioli, Ragasa Industrias S.A. de C.V., Monterrey, Nuevo León, México) se obtuvo en un supermercado local en la Ciudad de México. Se utilizó agua desionizada en todos los experimentos.

6.2 Análisis químico proximal de la harina de huauzontle

La harina de semilla de huauzontle se obtuvo moliendo las semillas de huauzontle en un procesador de alimentos (Nutribullet™, NB-101B, Hong Kong Ltd., Guandong, China) y se tamizó en una malla No. 80 (Manufacturers of Industrial and Commercial Supplies, St. Louis, MI, EUA). La humedad, las cenizas, la fibra cruda, la proteína total ($N \times 6.25$) y los lípidos totales se determinaron como se describe en AOAC (2000). El extracto libre de nitrógeno total se calculó mediante la diferencia: $100 - (\% \text{ proteína} + \% \text{ lípidos} + \% \text{ fibra} + \% \text{ ceniza})$. Posteriormente, la proteína soluble se determinó mediante el método de Lowry modificado por Peterson (1977) utilizando BSA (albumina de suero bovino, por sus siglas en inglés) como estándar (0.1-0.01 mg/mL).

6.3 Extracción de aislado de proteína de huauzontle (APH)

La harina de semilla de huauzontle se desgrasó con hexano en un Soxhlet durante 3 h, y luego se dejó secar a temperatura ambiente. La harina desgrasada (100 g) se dispersó en agua desionizada (10 g/100 mL) y el pH se ajustó a 9 con NaOH 1 N. La dispersión se agitó durante 1 h a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) y posteriormente se centrifugó a $9200 \times g$ a 10 °C

durante 10 min (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania). Se recolectó el sobrenadante y se ajustó el pH a 3.6 (punto isoeléctrico del APH) usando HCl 3 N. La proteína precipitada se aisló por centrifugación a $9200 \times g$ durante 10 min a 4°C y se lavó tres veces con agua desionizada en una proporción de 1:10 durante 10 min. Finalmente, las muestras se secaron a 35°C durante 24 h en un horno de circulación de aire (Riossa Digital HCF-62, Ciudad de México, México). El aislado seco se molió manualmente en un mortero y se almacenó en un recipiente sellado a temperatura de refrigeración ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) hasta su uso.

6.4 Potencial- ζ

El potencial ζ de dispersiones de APH (0.05 g/100 g) se determinó con un equipo Zetasizer Nano ZS90 acoplado a un autotitulado MTP-2 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, Reino Unido) a valores de pH que oscilaron entre 2.0 y 6.0 a 25°C . El pH de las soluciones se ajustó al valor deseado mediante la adición de NaOH 0.1 N o HCl 0.1 N. El potencial ζ se determinó midiendo la dirección y la velocidad de las moléculas en dispersión a medida que se movían a lo largo del campo eléctrico aplicado. El software del equipo convirtió las medidas de movilidad electroforética en valores de potencial ζ utilizando el modelo matemático de Smoluchowski (Cuevas-Bernardino et al., 2016)

6.5 Digestión *in vitro* del APH

El análisis de la digestibilidad *in vitro* de la proteína se llevó a cabo mediante el método multienzimático de Elsohaimy et al. (2015). Se añadió 63.8 mg de APH a 10 mL de agua desionizada y se ajustó el pH a 8.0 con NaOH 1 N. Se añadió un mL de solución acuosa de enzima (tripsina tipo IX $15,310 \text{ unidades } \text{mg}^{-1}$ de proteína, α -quimotripsina tipo II $48 \text{ unidades } \text{mg}^{-1}$ de sólido, peptidasa intestinal porcina P-7500, $115 \text{ unidades} \cdot \text{mg}^{-1}$ de sólido y proteasa bacteriana tipo XIV, $4.4 \text{ unidades} \cdot \text{mg}^{-1}$ de sólido) a la muestra de proteína y se dejó que la digestión prosiguiera durante 10 min a 37°C . Después de la adición de 1 mL (1.48 mg) de solución de proteasa bacteriana tipo XIV, la digestión continuó durante 9 min a 55°C . El valor de pH se registró después de 1 min más y se utilizó para estimar la digestibilidad *in vitro* de la proteína de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Y = 234.84 + 22.56+$$

Donde, Y es la digestibilidad *in vitro* de la proteína (%), y X es el pH de la suspensión después de 20 min de digestión.

6.6 Perfil de peso molecular

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) del APH se realizó siguiendo el método de Laemmli (1970). Las muestras de aislado de proteína se mezclaron en una proporción de 3: 2 (v/v) con solución amortiguadora pH 6.8: 200 g/L de SDS, 25 mL/L de concentrado de glicerol, 10 mL/L de β -mercaptoetanol, 0.20 g/L de azul de bromofenol y 1 L de agua desionizada. El sistema de gel constó de 2.1 g/L de SDS, 200 g/L de gel de separación de acrilamida (pH 8.8) y 50 g/L de gel de concentración de acrilamida (pH 6.8). El espesor total del gel fue de 0.75 mm, con 10 cm de gel de separación y 2 cm de gel de concentración. Las bandas de proteína se tiñeron por la inmersión del gel en azul brillante de Coomassie en una solución de 400 mL de metanol, 70 mL de ácido acético y 530 mL de agua desionizada. Se utilizaron estándares de peso molecular (10-250 kDa) de proteínas de amplio rango Bio-Rad® (Cat. 161– 0303, Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, EUA).

6.7 Perfil de aminoácidos

El perfil de aminoácidos del APH se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Mota et al. (2016), con modificaciones. Se colocaron muestras de APH (30 mg) en viales de digestión de cuarzo adecuados, se les añadió 1 mL de HCl 6 N que contenía fenol al 1 % v/v y 200 μ L de D-Norvalina (25 mM, como estándar interno). Los tubos sellados se colocaron en un sistema de digestión por microondas de recipiente cerrado MW 650 (Aurora Biomed, Vancouver, BC, Canadá). El horno se purgó con nitrógeno y una bomba de vacío. El horno se calentó a 160 °C, se mantuvo a esta temperatura durante 10 min y se enfrió a temperatura ambiente. Los extractos completamente hidrolizados se neutralizaron con 1 mL de NaOH 6 N y se llenaron hasta un volumen total de 10 mL con agua desionizada. Los hidrolizados se filtraron con papel de filtro (Whatman No. 40). La muestra (10 μ L) se colocó en un vial cromatográfico, se le añadieron 20 μ L de reactivo de carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo reconstituido (AQC) y 80 μ L de amortiguador de borato. La mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 10 min y se agitó con vórtex. Para la determinación

cromatográfica se utilizó un sistema Acquity UPLC (Waters Corp., Milford, MA, EUA) acoplado a un detector de matriz de fotodiodos (longitud de onda ajustada a 260 nm). Se usó una columna BEH C18 (130 Å, 1.7 µm, 100 mm × 2.1 mm), un flujo de 0.7 mL/min, una temperatura de 60 °C y un volumen de inyección de 1 µL. La fase móvil consistió en AccQTag® ultra eluyente Y (Acetonitrilo al 95 % en agua desionizada) y AccQTag® ultra eluyente Z. Las condiciones de gradiente fueron: 0-0.54 min, 99.9 % Y-0.1 % Z; 5.74 min, 90.9 % Y-9.1 % Z; 7.74 min, 78.8 % Y-21.2 % Z; 8.04 min, 40.4 % Y-59.6 % Z; 8.70–10 min, 99.9 % Y-0.1 % Z. Se preparó una curva de calibración a partir de la solución estándar de cada aminoácido diluido a las concentraciones adecuadas. Se utilizó D-norvalina (45.5 pmol) como patrón interno. Los aminoácidos derivatizados se cuantificaron e identificaron por comparación con los tiempos de retención y las relaciones de área de las mezclas de aminoácidos estándar con el estándar interno. Los resultados se expresaron en g/100 g de APH.

6.8 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros infrarrojos se registraron con un espectrofotómetro FTIR (Frontier, PerkinElmer, Ciudad de México, México), equipado con un accesorio universal de reflectancia total atenuada. La muestra seca de APH (10 mg) a diferentes valores de pH (2.0, 3.6 (punto isoelectrico), 5.0, 7.0, 9.0, 11.0) se puso en contacto con el cristal de diamante usando un ajuste de geometría de 60 unidades de medidor de fuerza, y se midió la absorbancia a longitudes de onda de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹ con una resolución de 40 cm⁻¹. Se realizó la autodeconvolución de Fourier y luego se ajustaron los picos en la banda de la región de la Amida I (1700-1600 cm⁻¹) utilizando el software del equipo. Los picos gaussianos pudieron asignarse a su estructura correspondiente en función de su centro (Achouri et al., 2012; Navarro-Lisboa et al., 2017) y la integral de cada pico se dividió entre la suma de todos los picos determinados para identificar los porcentajes de cada estructura secundaria.

6.9 Solubilidad de la proteína

La solubilidad de muestras de aislado de proteína se llevó a cabo mediante el método de Yu et al. (2017). Se prepararon soluciones acuosas (1 g/100 mL) de las muestras de proteína en amortiguador de fosfatos 0.01 M a pH (2.0, 3.6 (punto isoelectrico), 5.0, 7.0, 9.0, 11.0). Las

dispersiones de proteína se agitaron a temperatura ambiente durante 60 min y se centrifugaron (4400 ×g, 20 min). Los contenidos de proteína de los sobrenadantes se determinaron según el método de Lowry modificado por Peterson (1977), brevemente, 1 mL de solución A (CTC: Na₂CO₃ al 10 %, CuSO₄·5H₂O al 0.1 %, KNaC₄H₄O₆·4H₂O al 0.2 %; SDS al 10 %; NaOH 0.8 N) se mezcló con 0.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu-Fenol 2N y 1 mL de muestra. La absorbancia 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 como el porcentaje de proteína que permaneció en solución.

6.10 Adsorción del APH en la interfase aire-agua

Se prepararon dispersiones acuosas de APH a diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 y 3.0 g/L) y a pH 7.0 ± 0.1. La adsorción de superficie dinámica de moléculas de proteína se determinó monitoreando la evolución de la caída de tensión superficial con el tiempo en la interfase aire-agua a 25 °C, utilizando un medidor de ángulo de contacto óptico OCA-20 (Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt, Alemania) (Martínez-Velasco et al., 2018).

6.11 Capacidad de formación y estabilidad de espumas

Se homogeneizaron 20 mL de dispersiones de APH (0.1, 0.5, 1 y 3 g/L) a pH (7.0 ± 0.1) a alta velocidad (10,000 rpm, 1 min) con un homogeneizador Ultra-Turrax® (T50 basic IKA Works, Inc., Wilmington, EUA) para incorporar el aire y posteriormente se transfirieron a un cilindro de 50 mL. El volumen total se midió a los 0, 0.5, 5, 10, 40 y 60 min después de la homogeneización. La capacidad de formación de espuma (FC) se expresó como la expansión de la espuma lograda inmediatamente después del batido (t = 0 min), mientras que la estabilidad de la espuma (FS) se expresó como la expansión de la espuma a los 60 min después del batido. La expansión de la espuma se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Expansión de la espuma (\%)} = \frac{A - B}{B} * 100$$

donde A = volumen después de homogeneizar (mL) en diferentes momentos y B = volumen antes de homogeneizar.

6.12 Capacidades de retención de agua y aceite

La capacidad de retención de agua (WHC, por sus siglas en inglés) del APH se determinó según lo descrito por Gong et al. (2016) con ligeras modificaciones. La muestra seca de APH (~ 1.0 g, W_0) a pH 7.0 ± 0.1 se colocó en un tubo de centrífuga y se pesó junto con el tubo de centrífuga (W_1). Luego, se agregaron 10 mL de agua destilada a la muestra de APH y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min y luego se centrifugó a $3000 \times g$ durante 20 min. Se decantó el sobrenadante y se pesó el tubo de centrífuga que contenía el sedimento (W_2). El WHC (g de agua/g de proteína) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$EHC = \frac{E_2 - E_1}{E\#}$$

Para la capacidad de unión de aceite (OBC, por sus siglas en inglés), la muestra seca de APH (~ 1.0 g, W_0) a pH 7.0 ± 0.1 se colocó en un tubo de centrífuga y se pesó junto con el tubo (W_1). Luego, se agregaron 5 mL de aceite de soya a la muestra de APH y se mezcló durante 5 min usando un mezclador vórtex. Las muestras de aceite y de APH se dejaron reposar durante 30 min a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a $3000 \times g$ durante 20 min. Se decantó el sobrenadante de aceite de soya y se pesó el tubo de centrífuga (W_2) el tubo de centrífuga que contenía el sedimento. El OBC (gramo de aceite por gramo de proteína) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$OBC = \frac{E_2 - E_1}{E\#}$$

6.13 Formación de gel y propiedades reológicas

La formación de gel se logró calentando dispersiones de APH (15 g/100 mL) a pH 2.0, 3.6, 5.0, 7.0, 9.0 y 11.0 en un baño de agua a 90 ± 1 °C, mantenidas a esta temperatura durante 20 min, y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. La formación de gel se determinó mediante observación visual. Si las dispersiones no se movieron al girar el tubo, se consideró que se formó un gel (Yi et al., 2013).

Para las mediciones reológicas, se colocaron soluciones de APH (15 g/100 mL, pH 7.0 y 9.0) en la geometría placa-placa (25 mm de diámetro) de un reómetro Physica MCR 301 (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania). Para evitar la evaporación, el borde de la geometría se cubrió con una fina capa de parafina. Para imitar el proceso de gelificación, las soluciones de APH se sometieron a: (i) Una rampa de temperatura de 20 a 90 ° C a una velocidad de calentamiento de 3 °C/min, se mantuvo a 90 °C durante 5 min y se enfriaron a 20 °C a una velocidad de 5 °C/min, aplicando una amplitud de deformación del 1 % a una frecuencia de 0.1 Hz; (ii) Un barrido de deformación (0.01-100 %) a una frecuencia constante de 0.1 Hz, cuando la muestra se había enfriado a 20 °C y estaba en estado de gel. Los valores de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') fueron monitoreados con el software del equipo (Yi et al., 2013).

6.14 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado a partir de tres experimentos independientes utilizando un diseño completamente al azar y los valores se expresaron como valores medios \pm DE. Los datos se sometieron a un análisis de varianza de clasificación simple y, en los casos pertinentes, análisis de comparación de medias de Tukey. La significancia se estableció en $p \leq 0.05$. El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico SAS versión 9.4 (SAS Institute Inc., NC, EUA).

7.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis químico proximal de la harina de semilla de huauzontle

La Tabla 1 presenta los resultados del análisis químico proximal de la harina de semilla de huauzontle. Los valores de proteína, carbohidratos, cenizas y extracto etéreo fueron significativamente más altos que lo informado por Barrón-Yáñez et al. (2009). Las diferencias en la composición química pueden deberse a las condiciones ambientales de crecimiento del cultivo, como temperatura, humedad, ubicación y condiciones del suelo (da Silva et al., 2017). El contenido de proteína (20.4 ± 0.3 %) fue superior al señalado para otros pseudocereales, como *Chenopodium quinoa* con 14.0 % (Elsouhaimy et al., 2015), *Amaranthus cruentus* con 14.9 % (Bejarano-Luján y Netto, 2010) y *Amaranthus sp.* con 12.5 % (Chaparro Rojas et al., 2010). El contenido de proteína del APH fue de 0.9 ± 0.1 g/g_{APH}, determinado por el método de Lowry.

Tabla 1.- Análisis químico proximal de la harina de semilla de huauzontle

Constituyentes	% en base seca
Cenizas	5.7 ± 0.2
Proteína cruda	20.4 ± 0.3
Grasa	10.0 ± 0.1
Fibra cruda	3.6 ± 0.1
Carbohidratos	60.4 ± 0.1

Los valores se presentan como media \pm DE de triplicados.

7.2 Potencial- ζ

La variación del potencial ζ respecto al pH se muestra en la Figura 8. El punto isoeléctrico se ubicó en pH= 3.6. El potencial ζ cambió de 12.0 ± 1.0 mV a pH= 2.0 a -18.0 ± 0.3 mV a pH= 6.0. La ionización de grupos carboxílicos (-COOH) para formar carboxilatos (-COO⁻) es en general responsable de valores de potencial ζ negativos. En contraste, la protonación de grupos amino (-NH₂) para formar grupos amonio (-NH₃⁺) está detrás de los valores de

potencial positivos. Los aminoácidos como Asp y Glu contribuyeron a las cargas negativas, ya que su grupo carboxilo se ionizó a un pH superior al pI ($pK_R = 3.65$ y 4.3 , respectivamente). Por su parte, los aminoácidos como histidina, lisina y arginina contribuyen con las cargas positivas ya que su grupo amino se encuentra ionizado a pH ácido (Nelson y Cox, 2015). En general, el potencial ζ refleja el grado de estabilidad electrostática de las partículas coloidales, una propiedad que tiene influencia directa sobre las propiedades funcionales de las proteínas (López et al., 2018b). Shevkani et al. (2014) informaron que los valores de potencial ζ para diferentes cultivares de proteína de *A. hypochondriacus* variaron de $-40,6$ a $-43,7$ mV en el rango de pH de 6.5 a 7.0 y 0.5 mg de proteína/mL. Navarro-Lisboa et al. (2017) encontraron que la ultrafiltración de extractos de proteínas de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) a diferentes valores de pH afectaron la concentración de proteínas (7.0 y 9.5), e informaron que los valores de potencial ζ oscilaron entre -14.2 a pH 7.0 y -26.1 mV a pH 9.5 .

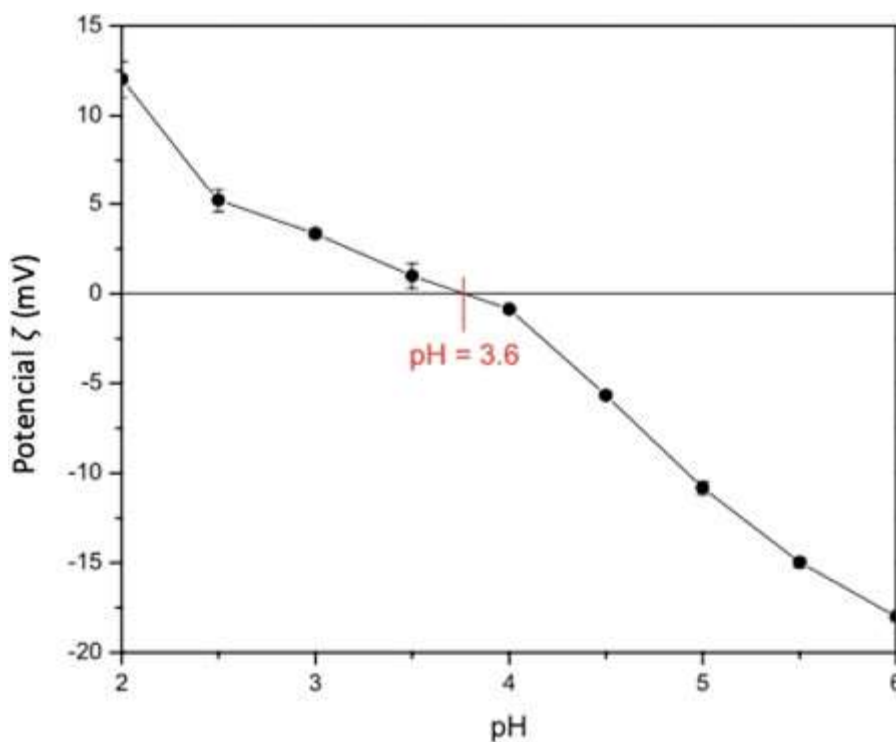


Figura 8.- Potencial ζ del aislado de proteína de huauzontle como función del pH.

7.3 Perfil de aminoácidos

El APH tuvo un alto contenido de la mayoría de los aminoácidos esenciales, excepto de valina (Tabla 2). Los valores son superiores a los recomendados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud/Universidad de las Naciones Unidas (FAO/OMS/UNU, 1985) para el consumo humano diario y a los informados para otros pseudocereales como el amaranto y la quinoa (Tabla 2). Las propiedades funcionales de una proteína están determinadas por su composición de aminoácidos. Las proteínas tienden a asumir forma de varilla alargada cuando su contenido de aminoácidos hidrofílicos es alto, mientras que las proteínas con alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos tienden a adquirir formas globulares (Wang et al., 2017). El APH presentó una fracción mayoritaria de aminoácidos hidrófobos (45.8 g/100 g) comparada con la fracción de aminoácidos hidrófilos (19.4 g/100 g), lo que podría representar una ventaja para aplicaciones donde son importantes las propiedades tensoactivas. Por otro lado, el APH presento un contenido de 24.3 g/100 g de aminoácidos básicos y 10 g/100 g de aminoácidos ácidos. Otros pseudocereales como el amaranto y la quinoa contienen 23.7 y 18.8 g/100 g y 19.1 y 24.1 g/100 g de aminoácidos básicos y ácidos, respectivamente (López et al., 2018a).

Tabla 2.- Composición de aminoácidos del aislado de proteína de huauzontle (g/100 g de proteína).

Aminoácidos esenciales	APH Contenido (g/100 g _{APH})	Recomendación de consumo FAO/WHO/UNU ^x	Amaranto* (g/100 g)	Quinoa** (g/100 g)
Histidina ^d	5.9 ± 0.0	1.6	1.8 ± 0.3	2.2 ± 0.5
Leucina ^{af}	10.5 ± 0.1	1.9	6.4 ± 0.6	2.5 ± 0.4
Isoleucina ^{af}	6.3 ± 0.1	1.3	2.8 ± 0.6	0.8 ± 0.2
Lisina ^d	8.8 ± 0.2	1.6	5.0 ± 0.7	2.4 ± 0.4
Metionina ^a +cistina ^b	6.2 ± 0.2	1.7	1.7 ± 0.4	0.4 ± 0.7
Fenilalanina ^a +tirosina ^b	12.3 ± 0.6	1.9	5.8 ± 0.4	2.7 ± 0.3
Treonina ^b	8.8 ± 0.2	0.9	4.2 ± 0.3	5.7 ± 5.9
Valina ^{af}	1.8 ± 0.1	1.8	3.6 ± 0.5	1.0 ± 0.6

Aminoácidos no esenciales				
Alanina ^a	1.5 ± 0.0	0.3	4.3 ± 0.4	2.2 ± 0.3
Glicina ^a	7.6 ± 0.3	0.2	11.4 ± 0.8	3.0 ± 0.5
Prolina ^a	3.9 ± 0.2	0.6	-	1.8 ± 0.3
Serina ^b	3.9 ± 0.1	0.5	10.7 ± 0.9	1.7 ± 0.3
Tirosina ^b	4.9 ± 0.0	0.5	2.3 ± 0.2	1.2 ± 0.3
Glutámico ^c	5.6 ± 0.1	1.8	18.1 ± 0.5	8.8 ± 1.4
Aspartico ^c	4.4 ± 0.1	0.9	12.9 ± 0.8	3.7 ± 0.8
Arginina ^d	9.7 ± 0.6	0.5	8.5 ± 1.1	3.0 ± 0.8

*Pastor et al., 2007

**Escuredo et al., 2014.

^x Requerimiento en adultos de acuerdo con FAO/WHO/UNU (1985).

^a Aminoácidos hidrofóbicos: Gli, Ala, Val, Leu, Pro, Met, Fen, Ile.

^b Aminoácidos hidrofílicos: Ser, Tre, Cis, Tir.

^c Aminoácidos ácidos: Glu, Asp.

^d Aminoácidos básicos: Lis, Arg, His.

^e Aminoácidos aromáticos: Tir, Fen.

^f Aminoácidos ramificados: Ile, Leu, Val.

El excepcional valor nutricional de los pseudocereales (alto contenido proteico, perfil de aminoácidos con un buen equilibrio de aminoácidos esenciales) se ha atribuido a la influencia de diferentes factores de estrés ambiental, así como al contexto agroecológico sobre las propiedades nutricionales (Reguera et al., 2018).

7.4 SDS-PAGE

Los perfiles SDS-PAGE de harina de semilla de huauzontle (HSH) y del APH se muestran en la Figura 9. Todas las bandas de proteína fueron detectadas a partir de un peso molecular estimado de 50 kDa e inferiores. Se observa que las bandas fueron más intensas para el APH que para la HSH, lo que es indicativo de la efectividad del proceso de purificación. La banda con mayor intensidad relativa se produjo aproximadamente a 20 kDa, seguida de 28 kDa y 50 kDa. Suárez y Anón (2018) informaron que para *A. hypochondriacus* la banda entre 20 y 22 kDa corresponde a la globulina P. Bejarano-Luján y Netto (2010) encontraron que las bandas por debajo de 30 kDa en *A. cruentus* se debieron a la albúmina-1. De acuerdo con diversos autores, las bandas a 50 kDa y en el rango de 30 a 35 kDa se asocian a la globulina

11S (quenopodina), la principal proteína en la quinoa (Elsouhaimy et al. 2015, Valcárcel-Yamani y da Silva, 2012, Wang et al., 2020).

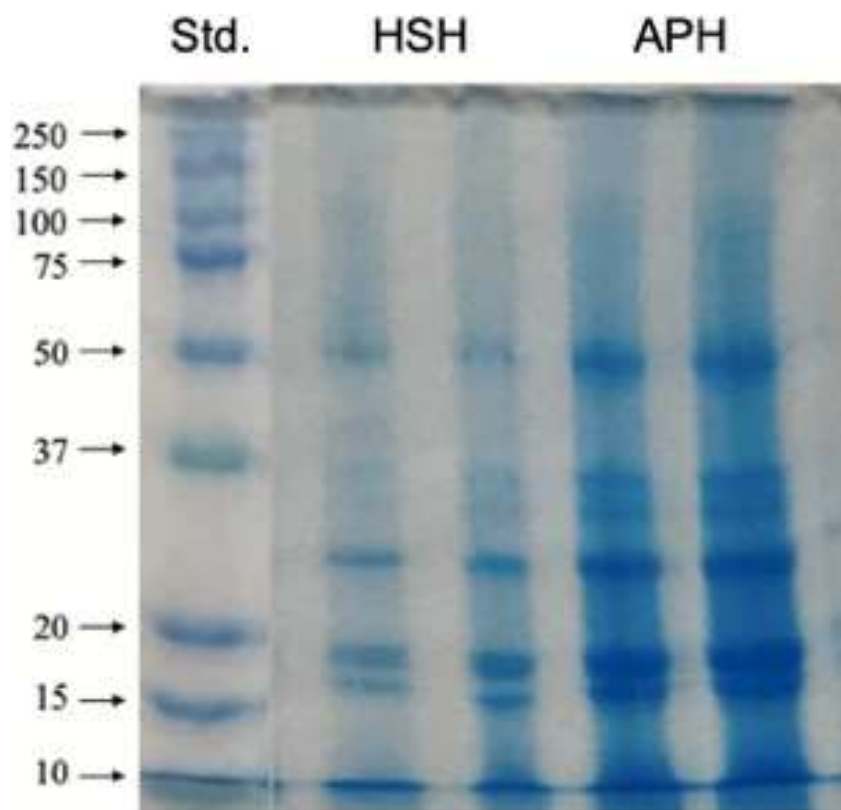


Figura 9.- SDS-PAGE de harina de semilla de huauzontle (HSH) y aislado de proteína de huauzontle (APH).

7.5 Análisis FT-IR

El análisis FT-IR proporciona información valiosa sobre la estructura secundaria de las proteínas (Rodsamran y Sothornvit, 2018). El espectro de FT-IR dependió del pH de la muestra (Fig. 10a). La banda ancha en $3300-3100\text{ cm}^{-1}$ está vinculada a estiramientos de -NH . Por otro lado, la banda de $2860-2930\text{ cm}^{-1}$ se atribuye a la Amida B y refleja vibraciones simétricas y asimétricas de los grupos -CH_2 y -CH_3 . Estos grupos funcionales se localizan en la cadena alifática de las proteínas (Rodsamran y Sothornvit, 2018). Las regiones $1600-1700$, $1500-1550$ y 1458 cm^{-1} se atribuyen a la Amida I, Amida II y Amida III,

respectivamente. La amida II se debe a la combinación de vibraciones de flexión N–H y vibraciones de estiramiento C–N (Estrada-Fernández et al., 2018). Mientras tanto, la amida III se debe a la combinación de vibración de flexión de N–H y vibración de estiramiento C–N con contribuciones menores de vibración de flexión CO y vibración de estiramiento CC (Shevkani et al., 2014). En particular, la intensidad de la Amida I fue más fuerte que la de Amida II y Amida III. El grupo Amida I está compuesto por la superposición de varios elementos estructurales que reflejan vibraciones de C–O (70-85 %) (Estrada-Fernández et al., 2018; Navarro-Lisboa et al., 2017), y es comúnmente utilizado para estimar la estructura secundaria. De hecho, la estructura secundaria está compuesta por unidades repetitivas (por ejemplo, α -hélice y lámina β). Las propiedades funcionales de las proteínas están fuertemente correlacionadas con su estructura secundaria, lo que afecta propiedades como la solubilidad y la gelificación (Biswal et al, 2019; Palaniappan y Jakobsson, 2017; Wang et al., 2017).

La Figura 10b ilustra la deconvolución de la banda Amida I mediante funciones gaussianas. Cuatro funciones bastaron para describir con precisión los datos experimentales. El pico en aproximadamente $1682\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$ se atribuye a giros β , el pico en aproximadamente $1655\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ a α -hélice, el pico en $1630\text{-}1625\text{ cm}^{-1}$ a lámina β (Navarro-Lisboa et al., 2017) y el pico a $1610\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ a las estructuras de cadena lateral (Achouri et al., 2012), que tienden a estar presentes en proteínas vegetales y se han relacionado con un aumento en la absorción de aceite (Lin y Zayas, 1987).

La variación de la estructura secundaria con respecto al pH se resume en la Tabla 3. Las conformaciones preponderantes fueron lámina β y α -hélice, pero su proporción relativa cambió con el pH. Un aumento en la estructura lámina β se acompañó de una disminución en las α -hélice. Las estructuras lámina β mostraron un máximo en el rango de pH de 5.0 a 7.0, y en este rango de pH las α -hélice exhibieron un mínimo. Por otro lado, las α -hélice presentaron un máximo en el rango de pH de 9.0 a 11.0, mientras que la estructura lámina β mostró valores más bajos. Aceituno-Medina et al. (2013) afirmaron que las disminuciones en las láminas β en *A. hypochondriacus* eran consistentes con una disposición menos estructurada de las cadenas de proteínas.

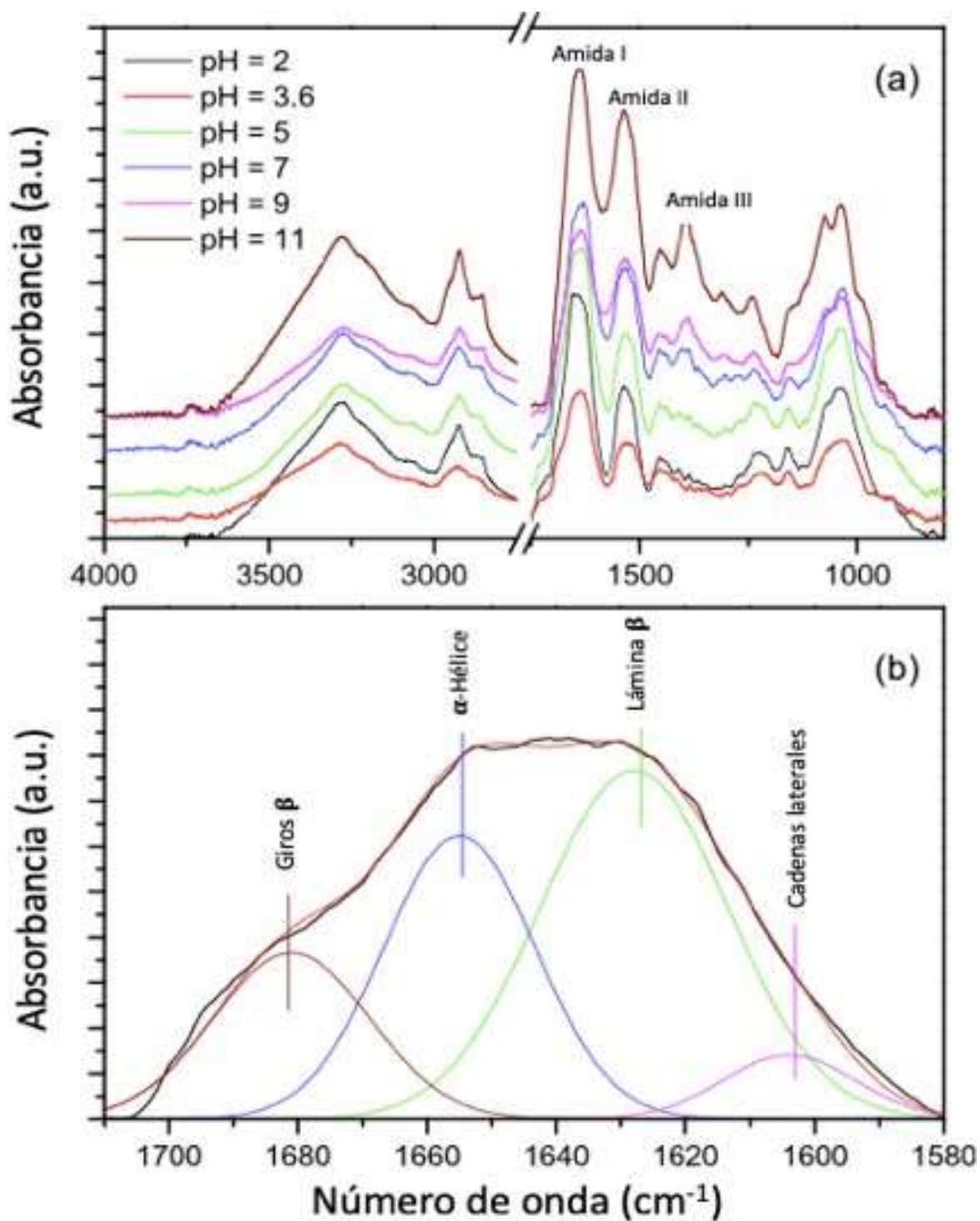


Figura 10.- (a) Espectros FTIR para aislado de proteína de huauzontle a diferentes valores de pH y (b) ilustración de la deconvolución Gaussiana de las bandas FTIR en la región de la Amida I.

Tabla 3.- Estructura secundaria y propiedades funcionales de aislado de proteína de huauzontle a diferentes valores de pH.

Estructura secundaria (%)	pH					
	2.0	3.6	5.0	7.0	9.0	11.0
Cadenas laterales	6.6 ± 0.1 ^b	7.9 ± 0.1 ^a	6.9 ± 0.1 ^{ab}	5.9 ± 0.1 ^c	4.1 ± 0.1 ^d	4.2 ± 0.1 ^d
Lámina β	43.7 ± 0.4 ^b	42.8 ± 0.5 ^b	44.3 ± 0.5 ^a	45.9 ± 0.5 ^a	37.6 ± 0.3 ^c	37.6 ± 0.3 ^c
α-hélice	36.3 ± 0.3 ^c	35.2 ± 0.4 ^c	31.8 ± 0.3 ^d	30.1 ± 0.4 ^e	40.8 ± 0.4 ^b	46.8 ± 0.3 ^a
Giros β	13.4 ± 0.1 ^d	14.1 ± 0.2 ^d	16.7 ± 0.2 ^c	18.1 ± 0.1 ^a	18.4 ± 0.2 ^a	17.4 ± 0.2 ^{ab}
Propiedades funcionales						
Solubilidad (%)	45.3 ± 0.8 ^c	26.3 ± 0.4 ^e	36.4 ± 0.8 ^d	37.1 ± 1.5 ^c	58.2 ± 0.6 ^b	95.3 ± 0.9 ^a
Gelificación	A	A	A	O	O	X

X: No se formó gel; A: Agregación; O: Se formó gel

^{abcd}Diferencias significativas en filas (P < 0.05).

7.6 Digestibilidad *in vitro*

La calidad nutricional de una proteína dependerá de su composición de aminoácidos y de la biodisponibilidad de estos. Por esta razón, la digestibilidad es un parámetro de suma importancia para determinar su calidad (Sá et al., 2020). El método multienzimático es un sistema que consta de tripsina, quimotripsina y peptidasa. Después de 10 min de digestión se monitorean, a través de la medición del pH, los iones H⁺ liberados por enlaces peptídicos rotos y la generación de grupos carboxilo libres (Tavano et al., 2016). El pH de la solución de proteína está altamente correlacionado con la digestibilidad *in vivo* de las ratas. Este método es altamente utilizado en la actualidad debido a sus ventajas como son su rapidez, practicidad, bajos costos comparado con métodos *in vivo* y su alto factor de correlación con estos (Hsu et al., 1977).

La digestibilidad *in vitro* es un método útil para evaluar la calidad nutricional de las proteínas. Cuando los enlaces peptídicos se hidrolizan, liberan iones de hidrógeno provocando una disminución del pH, una disminución rápida es indicativa de una mejor digestión (Aderinola

et al., 2020). Los resultados de este trabajo revelaron que el APH alcanzó valores de digestibilidad de 83.0 ± 0.2 %. Se informaron resultados similares para otros pseudocereales como el amaranto con 79.2 ± 5.8 % (Chaparro Rojas et al., 2010) y la quinoa con 78.4 ± 1.1 % (Elsohaimy et al., 2015). Cabe señalar que la digestibilidad *in vitro* de las proteínas de trigo es de aproximadamente 54.9 % (Căpriță et al., 2012). Según Aderinola et al. (2020) una alta digestión de proteína podría atribuirse al fácil acceso de la proteasa a los enlaces peptídicos favorecidos por el bajo contenido de elementos no proteínicos.

7.7 Solubilidad del aislado de proteína de huauzontle

La solubilidad de las proteínas juega un papel importante en la formación de geles y espumas (Bolontrade et al., 2013). Los resultados de la Tabla 3 muestran que la solubilidad del APH depende en gran medida del pH. Estudios previos han demostrado una correlación positiva entre la carga superficial y la solubilidad de una proteína (Karaca et al., 2011). Como era de esperar, el APH mostró la menor solubilidad en el punto isoeléctrico ($\text{pH} = 3.6$) donde se reducen las fuerzas electrostáticas repulsivas y se favorece la interacción hidrofóbica entre proteínas (Wang et al., 2017). La solubilidad aumentó a ambos lados de este pH, ya que la proteína presenta cargas positivas o negativas que favorecen la repulsión electrostática (Shevkani et al., 2014). A $\text{pH} 2.0$, la solubilidad del APH se vio favorecida y fue de 45.3 ± 0.8 , debido a la presencia de grupos NH_3^+ (ver subsección 3.2). Además, la menor presencia de estructura α -hélice (36.3 ± 0.8 %) se ha relacionado con una estructura más flexible (Zhu et al., 2020). La solubilidad máxima del APH se registró a $\text{pH} 11$ (95.3 ± 0.9 %). Esto es consistente con los resultados de FTIR, donde la disminución de las estructuras de la lámina β con el aumento de los valores de pH se ha asociado con una disposición menos estructurada de las cadenas de proteínas (Aceituno-Medina et al., 2013). Cabe mencionar que el perfil de solubilidad del APH fue similar al de la proteína nativa de la quinoa a $\text{pH} 1-10$ que tuvo la máxima solubilidad a $\text{pH} 10$ (75.2 %) (Elsohaimy et al., 2015) y al de la proteína nativa de amaranto que presentó una solubilidad máxima a pH extremos de 2 y 8 (Ventureira et al., 2012). López et al. (2019) afirmaron que las proteínas de quinoa, amaranto y chía tuvieron mayor solubilidad cuando se dispersaron en pH alcalino, atribuido a que los grupos carboxilo se ionizan, lo que favorece las interacciones proteína-disolvente (Dakhili et al., 2019).

7.8 Tensión superficial agua-aire

El comportamiento de adsorción de las proteínas es de suma importancia en el área de la tecnología de alimentos, puesto que, una rápida difusión y despliegue se asocia con propiedades funcionales mejoradas (Lin et al., 1995). La capacidad de las proteínas para reducir la tensión superficial las vuelve especialmente valiosas como agentes espumantes (Ruan et al., 2020, Martínez-Velasco et al., 2018). Como puede observarse en la Figura 11, el valor de tensión superficial de todas las muestras disminuyó gradualmente a medida que aumentaba el tiempo, lo que se debió principalmente a la adsorción de la proteína en la interfase. Durante los primeros minutos se tuvo una fuerte disminución de la tensión interfacial para todas las concentraciones de proteínas estudiadas, lo cual implica que el suministro de moléculas de proteína a la interfase por difusión fue lo suficientemente alto como para formar una monocapa después de unos minutos (Cuevas-Bernardino et al., 2016).

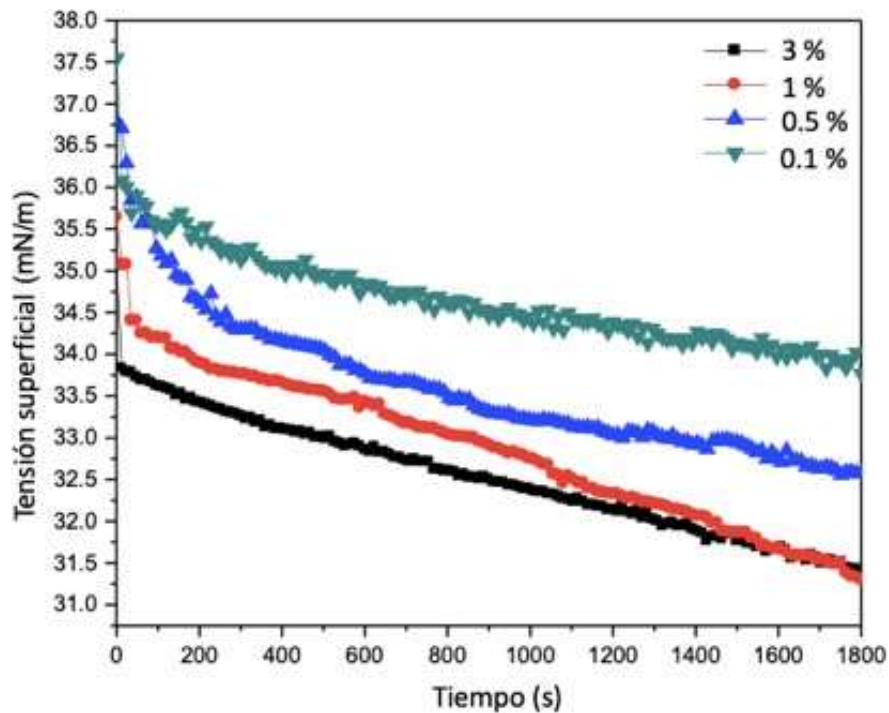


Figura 11.- Evolución de la tensión interfacial a través del tiempo para la adsorción de diferentes concentraciones de APH en un sistema agua-aire.

En la Figura 11 pueden observarse dos regiones, la primera marcada por una drástica disminución de la tensión interfacial debida a la difusión y adsorción de las moléculas de

proteína en la interfase, seguida de una lenta disminución en la segunda región, la cual se atribuye a la reorganización conformacional de las moléculas de proteína adsorbidas en la interfase (Martínez-Velasco et al., 2018). Por su parte, la cinética más rápida se relacionó con la mayor concentración de proteína, ya que la velocidad de difusión es directamente proporcional a la concentración de esta, resultados similares fueron observados por Felix et al. (2021) en concentrado de proteína de algas *Porphyra dioica* y por Makri y Doxastakis (2007) en proteína de *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus coccineus*. La concentración del agente emulsificante o espumante cumple una función fundamental para estabilizar la interfase, ya que concentraciones bajas del mismo tendrán una difusión lenta y por ende la tensión superficial de equilibrio será relativamente alta, lo cual implica la formación de una película interfacial delgada e inadecuada para la estabilización del sistema (Joshi et al., 2012). Por su parte, cuando la concentración es demasiado elevada, el suministro de moléculas por difusión es suficientemente alto y las moléculas que llegan a la interfase compiten por los sitios interfaciales provocando que la adsorción no sea eficiente debido al reducido espacio para desplegarse (Cuevas-Bernardino et al., 2016). Aunado a esto, se ha demostrado que la tensión superficial de una proteína esta inversamente relacionada con su hidrofobicidad (Xiao et al., 2020). En este sentido, el alto contenido de estructura lámina β podría haber favorecido la alta reducción de la tensión en la interfase aire-agua en presencia de APH, debido al carácter hidrofóbico de esta estructura.

A partir de las mediciones de la dinámica de adsorción pueden estimarse los parámetros cinéticos. En este sentido, los valores de la presión superficial (π) representan la diferencia entre la tensión superficial medida sin la adición del agente superficial (K_s) y aquella registrada una vez que se ha incorporado la molécula de interés (K_{APH}), es decir, $\pi = K_s - K_{APH}$. 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 APH (K_{diff}) (Figura 12). El valor de la π aumentó progresivamente con el tiempo de adsorción y fue dependiente de la concentración estudiada. El cambio de pendiente de las curvas de la Figura 12 indicó que la adsorción controlada por la difusión ocurrió en los primeros 96 s. Los valores de K_{diff} fueron dependientes de la concentración estudiada, indicando que la difusión de la proteína está controlada principalmente por el gradiente de concentración (Tang et al., 2015).

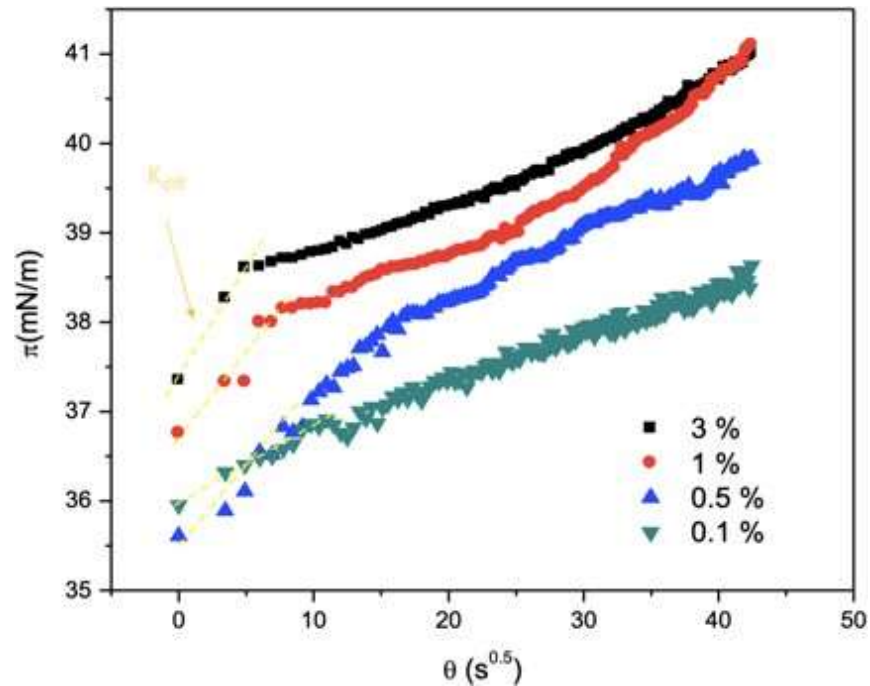


Figura 12.- Dependencia de la presión superficial contra la raíz cuadrada del tiempo para el aislado de proteína de huauzontle en la interfase agua-aire

Los perfiles de las curvas de presión superficial-tiempo indicaron que la cinética de adsorción del APH involucra varios mecanismos que pueden incluir: (i) difusión de la proteína del seno a la interfase, (ii) adsorción en la interfase y desdoblamiento interfacial, (iii) reacomodo de las moléculas en la interfase y formación de una multicapa (Cuevas-Bernardino et al., 2016). Para monitorear los mecanismos que tienen lugar después del breve periodo controlado por difusión se utilizó la siguiente ecuación fenomenológica de primer orden propuesta por Graham & Phillips (1979):

$$\ln \frac{\pi_{\infty} - \pi_0}{\pi_{\infty} - \pi_t} = -k_i t \quad (1)$$

Donde π_t , π_0 y π_{∞} son las presiones superficiales al final del proceso de adsorción, a cualquier tiempo y al tiempo inicial, respectivamente, mientras que k_i es la constante de velocidad de primer orden. Esta ecuación usualmente se compone de dos o más pendientes,

la primer pendiente indica la constante de penetración de primer orden (K_P), mientras que la siguiente indica la constante de reacomodo molecular para las proteínas adsorbidas (K_R) (Martínez-Velasco et al., 2018). El ajuste de los datos experimentales para obtener K_P y K_R se realizó a intervalos de tiempo basados en la regresión lineal, teniendo en cuenta que estos intervalos no fueron afectados por K_{diff} . En la Figura 13 pueden observarse las dos pendientes lineales producidas.

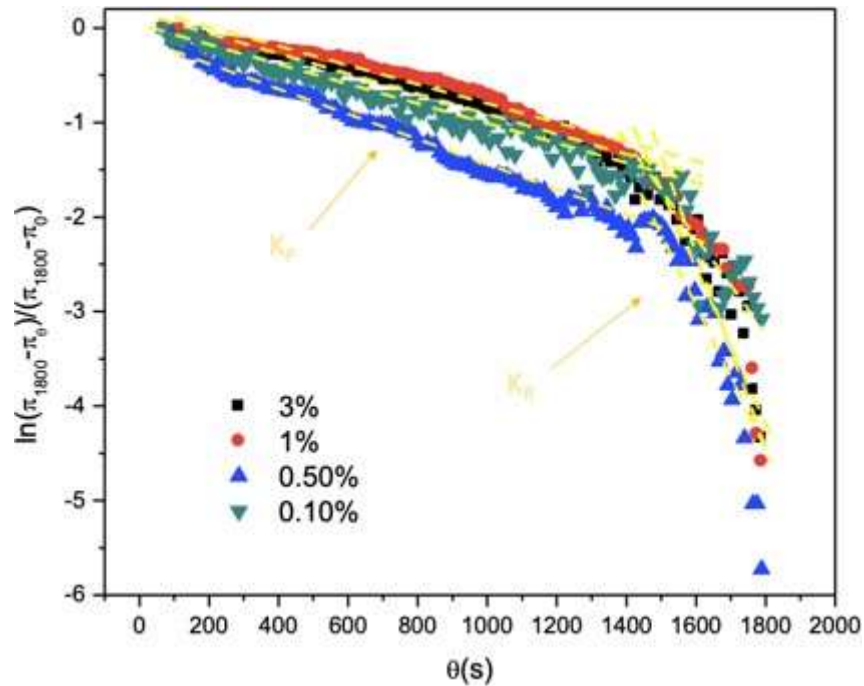


Figura 13.- Constantes de penetración (K_P) y reacomodo (K_R) para el aislado de proteína de huauzontle a diferentes concentraciones.

El gráfico de $\ln[(\pi_{1800} - \pi_\theta)/(\pi_{1800} - \pi_0)]$ frente al tiempo para APH a diferentes concentraciones mostró perfiles similares para todas las muestras (Figura 13). Los valores de K_P y K_R fueron dependientes de la concentración estudiada (Tabla 4), estos resultados concuerdan con lo reportado por Tang et al., 2015 para albumina de suero bovino.

Tabla 4.- Parámetros dinámicos de adsorción de APH a diferentes concentraciones en la interfase agua-aire.

Concentración (%)	K_{diff} (mN/m·s ^{0.5})	$K_p \times 10^3$ (s ⁻¹)	$K_R \times 10^3$ (s ⁻¹)
0.1	0.081 ± 0.008	1.02 ± 0.015	4.64 ± 0.104
0.5	0.153 ± 0.018	1.17 ± 0.038	6.41 ± 0.029
1	0.185 ± 0.027	1.28 ± 0.001	6.94 ± 0.102
3	0.198 ± 0.031	1.59 ± 0.048	9.43 ± 0.600

Los datos son los promedios ± desviaciones estándar.

7.9 Formación y estabilidad de espuma

La capacidad de formación de espuma de las proteínas está asociada a su capacidad para formar dispersiones líquido/aire, mientras que la estabilidad de la espuma está relacionada con la capacidad de la espuma para mantener su estructura durante un período de tiempo determinado (Yu et al., 2017; Bolontrade et al., 2013). Con el tiempo, las burbujas aumentan de tamaño debido a desestabilizaciones como la desproporción y la fusión. Con el aumento del líquido drenado, las burbujas se comprimen y comienzan a acumularse en forma poliédrica (Xu et al., 2020). En este trabajo sólo informamos la capacidad de formación de espuma del APH a pH 7.0 (Tabla 5), ya que la solubilidad en soluciones ligeramente ácidas o alcalinas, así como neutras, es importante para aplicaciones industriales (Yu et al., 2017). La capacidad de formación de espuma del APH a un pH de 7.0 aumentó exponencialmente a medida que aumentó la concentración de proteína. Además, no se evidenció líquido drenado inmediatamente después de la formación de la espuma, independientemente de la concentración de APH (0.1, 0.5, 1 y 3 g / 100 g) utilizada. Todas las espumas formadas a pH 7.0 estuvieron constituidas por burbujas de aire pequeñas y esféricas.

Las burbujas permanecieron esféricas incluso a los 60 min, y sólo unas pocas desarrollaron una forma poliédrica a una concentración de proteína del 0.1 % (Figura 14). El tamaño de las burbujas disminuyó a medida que aumentó la concentración de proteína ($2.8 \pm 0.6 \mu\text{m}$, $1.4 \pm 0.5 \mu\text{m}$, $1.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$, $0.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$), indicativo de que se logró una mayor estabilidad de la espuma (Martínez-Velasco et al., 2018). Timilsena et al. (2016) encontraron resultados

similares para espumas hechas con aislado de proteína de semilla de chía, donde una mayor concentración de proteína fortaleció la película interfacial y, en consecuencia, aumentó la estabilidad de la espuma. La capacidad espumante del APH a una concentración del 3 % (FC: 206 ± 2.8 %) fue comparable a la informada para las espumas elaboradas con amaranto (94-250 %) a pH neutro (Shevkani et al., 2014) y con albúmina de huevo (205 %) tradicionalmente considerada como el agente espumante por excelencia (Arzeni et al., 2012).

La estabilidad de la formación de espuma está relacionada con la formación de interfases fuertes, un efecto estrechamente relacionado con la cinética de adsorción de proteínas en la interfase aire-agua (Tang et al., 2012). La cinética de adsorción del APH (Figura 11) dependía de la concentración. Cuanto mayor sea la concentración de APH, más rápida fue la disminución inicial de la tensión superficial y menor fue el valor de tensión superficial logrado después de un período de tiempo. Después de 1 h de envejecimiento, la estabilidad de la espuma fue del 100 % cuando se usó una concentración de 3 g/100 mL de APH, 97.7 % para 1 g/100 mL de APH, 92.6 % para 0.5 g/100 mL de APH y 91.3 % para 0.1 g/100 mL de APH. Estos resultados son acordes con la proporción relativamente alta de estructuras α -hélice (30.1 %) y giros β (18.1 %) que se encuentran a pH 7.0, las cuales son estructuras muy flexibles en forma de "bucle", que son capaces de desplegarse rápidamente en la interfase y, por lo tanto, otorgan una alta estabilidad a la espuma (Jiang et al., 2015). La capacidad de formación de espuma obtenida a pH 7.0 fue mayor que la presentada por proteína de quinoa al 3 %, reportada por Elsohaimy et al. (2015). Las espumas de larga duración que normalmente son estables más de 50 min son muy utilizadas en productos aireados, como panes, galletas, helados y mousses, ya que mantienen el aspecto deseado de los alimentos (Xu et al., 2020). La albúmina de la clara de huevo (1.5 g/mL), que se considera un estabilizador de espuma de referencia, produce espumas con una vida media de 17 min (Yi et al., 2013). Estos resultados demuestran que el APH podría utilizarse en la formulación de productos de repostería y panadería.

Tabla 5.- Capacidad espumante y estabilidad de la espuma del aislado de proteína de huauzontle.

Concentración de proteína		Estabilidad (%) a diferentes tiempos (min)					
(%)	FC (%)	0	0.5	5	10	40	60
0.1	34 ± 0.1 ^A	100 ± 0.1 ^{Aa}	100 ± 0.1 ^{Aa}	100 ± 0.1 ^{Aa}	96.5 ± 0.3 ^{Bb}	93.9 ± 1.8 ^{Cc}	91.3 ± 0.8 ^{Cd}
0.5	44.8 ± 4.2 ^B	100 ± 0.1 ^{Aa}	100 ± 0.1 ^{Aa}	99.3 ± 1.0 ^{Aa}	96.3 ± 0.9 ^{Bb}	93.4 ± 0.8 ^{Cc}	92.6 ± 1.9 ^{Cc}
1	94 ± 2.8 ^C	100 ± 0.1 ^{Aa}	100 ± 0.1 ^{Aa}	100 ± 0.1 ^{Aa}	100 ± 0.1 ^{Aa}	97.7 ± 0.2 ^{Bb}	97.7 ± 0.2 ^{Bb}
3	206 ± 2.8 ^D	100 ± 0.1 ^{Aa}	100 ± 0.1 ^{Aa}	100 ± 0.1 ^{Aa}	100 ± 0.1 ^{Aa}	100 ± 0.1 ^{Aa}	100 ± 0.1 ^{Aa}

Los valores son medias ± DE por triplicado (P <0.05).

^{ABCD}Diferencias significativas en columnas (P <0.05).

^{abcd}Diferencias significativas en filas (P<0.05).

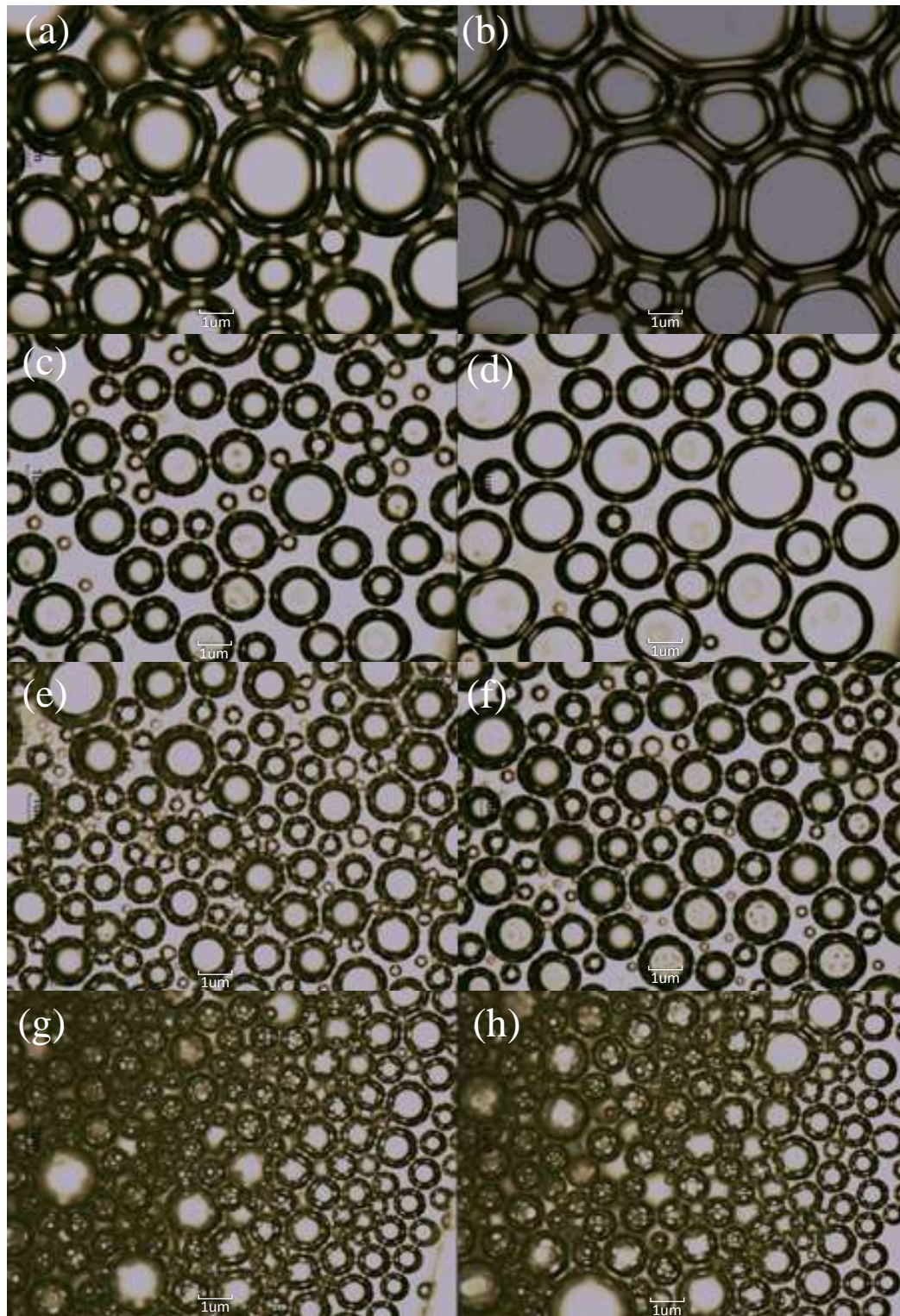


Figura 14.- Morfología de las burbujas de aire estabilizadas con APH a diferentes concentraciones ((a,b) 0.1, (c,d) 0.5, (e,f) 1 y (g,h) 3 g/100 mL)). Espumas al tiempo 0 min de preparación (a, c, e, g) y después de 60 min (b, d, f, h). Magnificación 40 ×.

7.10 Capacidad de retención de agua y aceite

La OBC es una propiedad que determina la funcionalidad de una proteína y se define como la capacidad de unir lípidos a través de cadenas laterales no polares de las proteínas, y se atribuye principalmente a la hidrofobicidad de las proteínas (López et al., 2019). El valor de OBC para el APH fue 1.6 ± 0.1 g/g_{APH}, menor que los reportados (3.6-6.4 g/g) para diferentes cultivares de proteína de amaranto (Shevkani et al., 2014) y similar al reportado para proteína de trigo 1.7 g/g (Ahmedna et al., 1999). Por tanto, podría utilizarse en la formulación de productos de panadería y productos a base de harina molida.

Por otro lado, la WHC es un parámetro muy importante, ya que está relacionado con la calidad y rentabilidad de una proteína. La WHC está relacionada con la pureza y las características conformacionales de una proteína, por lo que es un parámetro importante para la industria alimentaria. Por ejemplo, se ha informado que la WHC previene la pérdida de humedad, mejora la frescura en los productos de panadería y aumenta el rendimiento de embutidos y productos congelados (López et al., 2019). La WHC del APH fue de 3.3 ± 0.2 g/g_{APH} a pH 7.0. Se reportó un valor de WHC a pH 7 de 3.9 ± 0.1 g/g para quinoa (Elsohaimy et al., 2015) y 3.3 ± 0.1 g/g para amaranto (Shevkani et al., 2014). Se encontró que la WHC para aislado de proteína de trigo fue de 4.5 ± 0.2 g/g (Ashraf et al., 2012), una proteína de amplias aplicaciones en el sector alimentario. Se ha propuesto previamente un valor de la WHC de 1.49–4.72 g/g para aplicaciones en alimentos viscosos, por lo que el APH probablemente se pueda usar en la formulación de sopas y aderezos (Tontul et al., 2018). Chen et. (2019) determinaron que un bajo contenido de estructura α -hélice, promueve la hidratación y se relaciona con valores altos de la WHC. Este podría ser el caso del APH, donde el contenido de α -hélice más bajo se produjo a pH 7.0.

7.11 Propiedades gelificantes

7.11.1 Inspección visual

La inspección visual de las dispersiones del APH a una concentración del 15 % y diferentes valores de pH, después de ser sometidas a un proceso de calentamiento-enfriamiento, arrojó los resultados que se muestran en la Tabla 3. El pH tuvo un efecto notable en la formación y

estabilidad de los geles, que se manifestó en transiciones microestructurales progresivas (Figura 15). A pH 11, el aspecto visual de la dispersión del APH era el de una solución translúcida homogénea, donde las interacciones entre segmentos de proteína y moléculas de disolvente eran favorables. No hubo formación de gel. Lo anterior, probablemente debido a la elevada solubilidad de las moléculas del APH (> 80 %), lo que redujo las interacciones proteína-proteína, que dificultaron la formación de redes estables (Gao et al., 2018). Se formaron geles opacos, estables y auto-sostenibles a valores de pH de 9 y 7. En este intervalo de pH, es probable que se haya establecido un equilibrio entre las interacciones proteína-proteína y proteína-disolvente que conducen a la formación de zonas de unión. Makinen et al. (2016) encontraron que la proteína de quinoa formaba geles fuertes a un pH de 8.5, mientras que Mishyna et al. (2019) encontraron que las proteínas de cría de abejas formaban geles fuertes a pH 7.0 y 9.0. En ambos casos, la resistencia del gel estuvo mediada por la formación intensiva de enlaces disulfuro a pH alcalino.



Figura 15.- Geles formados a partir de dispersiones de aislado de proteína de huauzontle (15 g/100 mL) a diferentes valores de pH.

Avanza et al. (2005) informaron que los geles fuertes están vinculados a una fracción relativamente alta de estructuras de lámina β en la proteína de amaranto, en las que los puentes de hidrógeno intermoleculares entre las estructuras de lámina β actuaban como nodos para la formación de redes de proteínas fuertes. Éste fue el caso para las observaciones a pH 7.0, donde el APH mostró el mayor contenido de estructuras de lámina β (Tabla 3). A medida

que el pH se redujo a condiciones cada vez más ácidas, las interacciones proteína-proteína predominaron y se hicieron más fuertes. A pH 5 se formó una estructura de partículas gruesas, y cuando se alcanzó el punto isoelectrico (pH = 3.6) del APH, se produjo una separación de fases, donde se observó un precipitado de partículas y un sobrenadante de proteína soluble. A medida que el pH descendió hacia un valor de 2, se produjo el restablecimiento de una agregación de partículas gruesas. La reducción del pH de 7 a 2 produjo la desnaturalización de proteínas, lo cual promovió la formación de interacciones, así como una estructura de red, siendo las interacciones más fuertes en el punto isoelectrico. La formación de estructuras particuladas en condiciones ácidas puede explicarse por la teoría de la agregación fractal, la cual asume que las partículas esféricas de un tamaño determinado bajo el movimiento browniano pueden agregarse cuando se encuentran entre sí, formando una red de gel agregada. Esto se ha demostrado en geles de caseína (Lucey y Singh, 1997; Totosa et al., 2002).

7.11.2 Reología de los geles

El estudio de la reología en geles es de suma importancia puesto que nos permite una mayor comprensión de los cambios estructurales durante su formación, así como determinar la formulación óptima de los mismos (Ramírez-Navas, 2006). El proceso de gelificación de las dispersiones de APH se simuló sometiendo a una rampa de temperatura (20–90 °C), mantenida durante 5 min a 90 °C, seguida de enfriamiento hasta la temperatura inicial. Se controló la respuesta viscoelástica durante el proceso de calentamiento-enfriamiento. Los resultados de la Figura 16 muestran que los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') disminuyeron a medida que la temperatura aumentaba de 20 a aproximadamente 55 °C, seguido de un aumento de ambos módulos a medida que la temperatura se elevaba a 90 °C. La disminución inicial en los valores de los módulos podría deberse al debilitamiento de los puentes de hidrógeno producto del calentamiento. G' fue más alto que G'' durante toda la rampa de calentamiento de temperatura, probablemente debido a los enlaces disulfuro en las proteínas, que forman fuertes enlaces intercatenarios, lo que lleva a la formación de una estructura proteínica terciaria fuerte (Dakhili et al., 2019; Makinen et al., 2015). Durante el proceso de calentamiento, la proteína se somete a procesos de desnaturalización, lo que hace que las proteínas oligoméricas se disocien en monómeros que se vuelven a agregar y se

estabilizan mediante interacciones hidrofóbicas (Carbonaro et al., 2015). La disminución inicial de los valores de G' y G'' puede deberse a esta desnaturalización, pero el aumento posterior observado en los módulos viscoelásticos probablemente se deba a la agregación de proteínas debido a interacciones hidrofóbicas y enlaces disulfuro entre residuos de cisteína. Como consecuencia, la elasticidad de la red de proteínas mejoró notablemente (Kim et al., 2016).

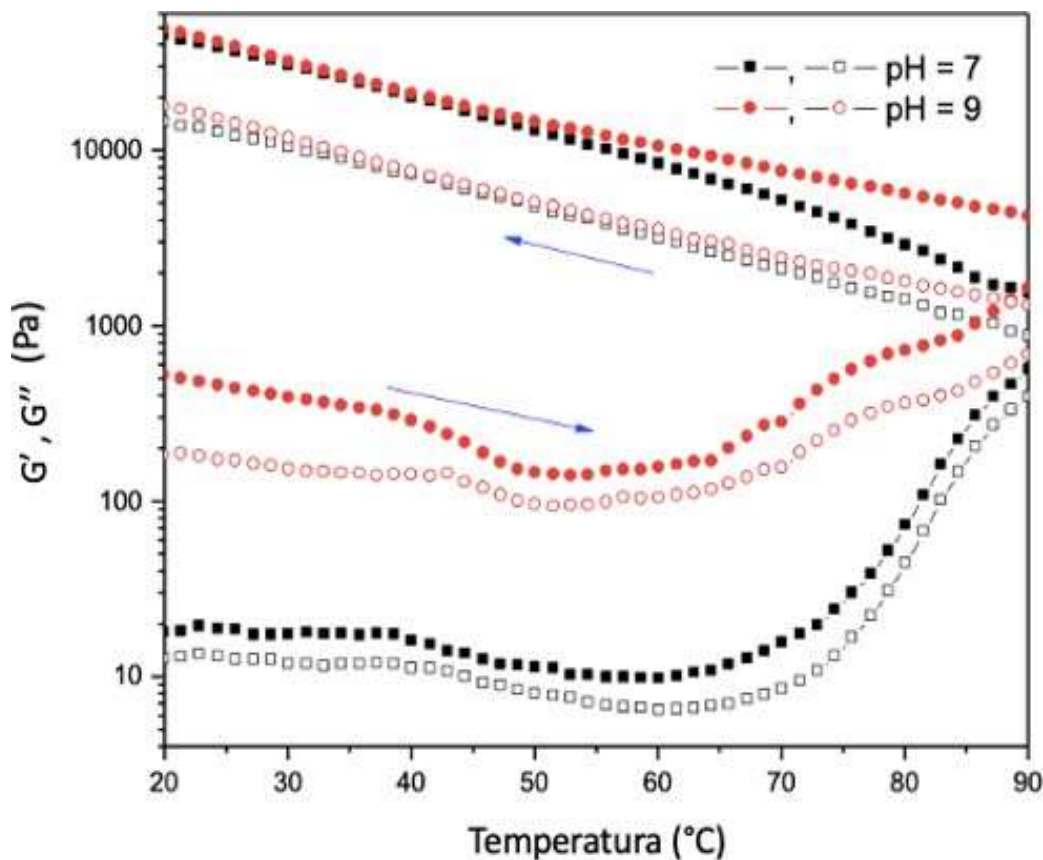


Figura 16. Módulos de almacenamiento (G') (símbolos llenos) y pérdida (G'') (símbolos vacíos) como función de la temperatura para dispersiones de aislado de proteína de huauzontle (15 g/100 mL, pH 7.0 y 9.0). Las flechas indican las direcciones de calentamiento y enfriamiento.

El comportamiento de G' y G'' en la dirección de enfriamiento experimentó un fuerte aumento, indicativo de un endurecimiento del gel y aumento de la elasticidad. Al enfriarse,

los agregados de proteína-proteína formados se asocian más a través de puentes de hidrógeno y la red de gel se vuelve más fuerte (Kim et al., 2016). Arogundade et al. (2012) informaron que las dispersiones de proteína de camote (10 g/100 mL) precipitadas isoelectricamente y sometidas a una rampa de temperatura de calentamiento-enfriamiento (25-95-25 °C) exhibieron consistentemente valores de G' mayores que G'' sobre el rango de temperatura completo.

Las pruebas de barrido de deformación para geles a pH 7 y 9 se muestran en la Figura 17. El comportamiento reológico fue lineal para deformaciones relativamente pequeñas. En esta región, $G' > G''$ reveló que los geles presentaron un comportamiento preponderantemente elástico (Tan et al., 2014). A medida que aumentó el valor de la deformación, los módulos G' y G'' disminuyeron, lo que sugiere la ruptura de las interacciones proteínas-proteína (Eleya y Gunasekaran, 2004). Se produjo un cruce entre G' y G'' a aproximadamente un 60 % de deformación a pH 9, pero no a pH 7. El cruce a pH 9 indicó la transición de una estructura de gel a un material líquido ($G' < G''$). Este comportamiento parece estar asociado al porcentaje de estructura relativa entre lámina β y α -hélice. A pH 7, la proporción de estructura lámina β fue de 45.9 % y de α -hélice 30.1 %, mientras que a pH 9, la estructura lámina β representó el 37.7 % y α -hélice el 40.8 %. Nuestros resultados están de acuerdo con las observaciones de Su et al. (2015), quienes atribuyeron la formación de geles más elásticos a la presencia de estructuras α -hélice y geles más duros a la estructura lámina β .

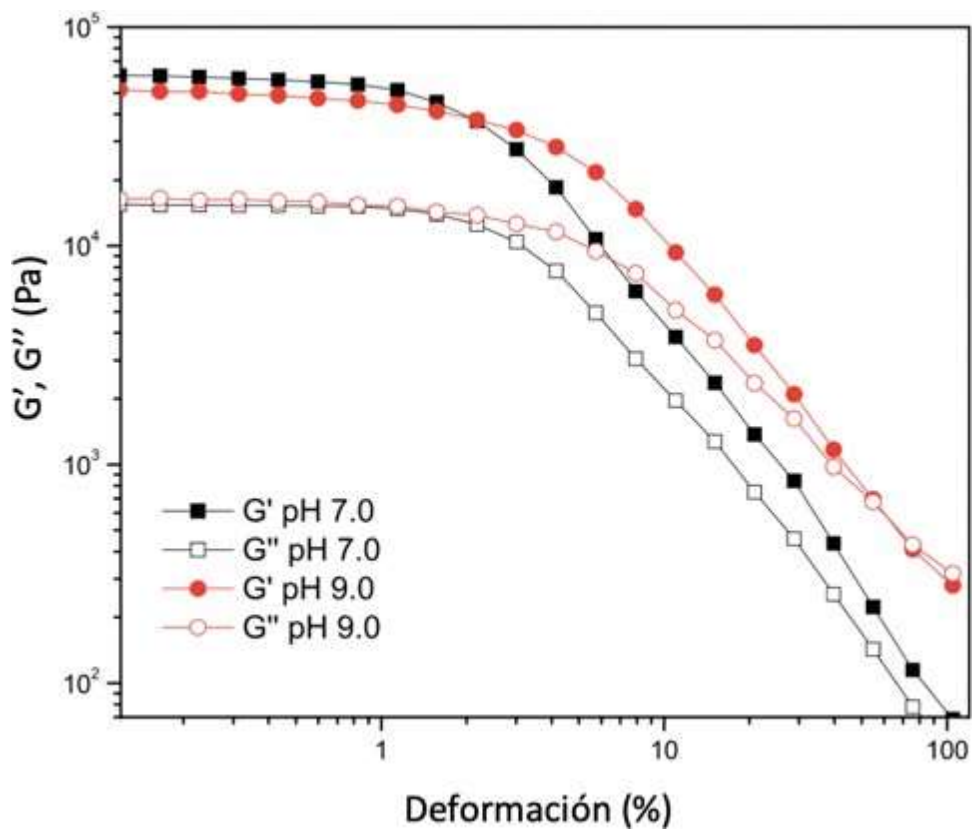


Figura 17.- Módulos de almacenamiento (G') (símbolos llenos) y pérdida (G'') (símbolos vacíos) como función del porcentaje de deformación para geles de aislado de proteína de huauzontle a 15 g/100 mL, pH 7 y 9.

8.-CONCLUSIONES

El APH tuvo un mayor contenido de proteína y mayor digestibilidad *in vitro* que los reportados para quinoa y amaranto. Por su parte, la mayoría de los aminoácidos esenciales, exceptuando a la valina, están presentes en la proteína de huauzontle en niveles superiores a los requerimientos de consumo humano diario recomendados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, la Universidad de las Naciones Unidas y la Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO/UNU, 1985). Las principales bandas de polipéptidos se encontraron a 20, 28 y 50 kDa. Todos estos indicadores señalan el excelente valor nutricional de este pseudocereal.

Por su parte, las propiedades funcionales y el porcentaje relativo de estructuras secundarias presentes en el aislado de proteína de huauzontle se modificaron en función del pH. Se formaron geles autosostenibles a valores de pH de 7.0 y 9.0, pero a valores inferiores de pH (2.0, 3.6 y 5.0) se formaron agregados de partículas muy similares a la cuajada de leche. La capacidad de formación de espuma aumentó a medida que incrementó la concentración de proteína y se encontró que la estabilidad de la espuma fue del 91.3 % a una concentración de proteína del 0.1 % y del 100 % a una concentración del 3 %, lo cual pudo verse favorecido por la presencia de la estructura lámina β a pH 7.0 y por la alta proporción de aminoácidos hidrófobos presentes en el APH. Estos resultados indican que la proteína de huauzontle puede considerarse un ingrediente alimentario novedoso y versátil para su uso en el desarrollo de una variedad de alimentos funcionales.

9.-REFERENCIAS

- Aceituno-Medina, M., Lopez-Rubio, A., Mendoza, S., Lagaron, J. M. (2013). Development of novel ultrathin structures based in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolate through electrospinning. *Food Hydrocolloids*, 3, 289-298.
- Achouri, A., Nail, V., Boye, J. I. (2012). Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure and functional properties. *Food Research International*, 46, 360-369.
- Aderinola, T. A., Alashi, A. M., Nwachukwu, I. D., Fagbemi, T. N., Enujiugha, V. N., Aluko, R. E. (2020). In vitro digestibility, structural and functional properties of *Moringa oleifera* seed proteins. *Food Hydrocolloids*, 101, 105574.
- Ahmedna, M., Prinyawiwatkul, W., Rao, R. M. (1999). Solubilized wheat protein isolate: functional properties and potential food applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1340-1345.
- Alonso-Miravalles, L., Zannini, E., Bez, J., Arendt, E. K., O'Mahony, J. A. (2020). Physical and flow properties of pseudocereal-based protein-rich ingredient powders. *Journal of Food Engineering*, 281, 109973.
- Alvarez-Jubete, L., Arendt, E. K., Gallagher, E. (2010). Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 21(2), 106-113.
- Alves, A. C., & Tavares, G. M. (2019). Mixing animal and plant proteins: Is this a way to improve protein techno-functionalities? *Food Hydrocolloids*, 97, 105171.
- Amagliani, L., & Schmitt, C. (2017). Globular plant protein aggregates for stabilization of food foams and emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 248-259.
- AOAC (2000). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.

- Arogundade, L. A., Mu, T-A., Añón, M. C. (2012). Heat-induced gelation properties of isoelectric and ultrafiltered sweet potato protein isolate and their gel microstructure. *Food Research International*, 49, 216-225.
- Arzeni, C., Pérez, O. E., Pilosof, A. M. (2012). Functionality of egg white proteins as affected by high intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, 29, 308-316.
- Ashraf, S., Saeed, S. M. G., Sayeed, S. A., Ali, R. (2012). Impact of microwave treatment on the functionality of cereals and legumes. *International Journal of Agriculture & Biology*, 14(3).
- Assad-Bustillos, M., Ramírez-Gilly, M., Tecante, A., Chaires-Martínez, L. (2014). Physicochemical, functional, thermal and rheological characterization of starch from huauzontle seeds (*Chenopodium berlandieri* spp. *nuttalliae*). *Agrociencia*, 48(8), 789-803.
- Avanza, M. V., Puppo, M. C., Añón, M. C. (2005). Rheological characterization of amaranth protein gels. *Food Hydrocolloids*, 19, 889-898.
- Barrón-Yáñez, M. R., Villanueva-Verduzco, C., García-Mateos, M. R., Colinas-León, M. T. (2009). Valor nutricional y contenido de saponinas en germinados de huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.), calabacita (*Cucurbita pepo* L.), canola (*Brassica napus* L.) y amaranto (*Amaranthus leucocarpus* S. Watson syn. hypoch. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 15(3), 237-243.
- Batista, A. P., Portugal, C. A., Sousa, I., Crespo, J. G., Raymundo, A. (2005). Accessing gelling ability of vegetable proteins using rheological and fluorescence techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, 36, 135-143.
- Bejarano-Luján, D. L., Netto, F. M. (2010). Effect of alternative processes on the yield and physicochemical characterization of protein concentrates from *Amaranthus cruentus*. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 736-743.

- Bessada, S. M., Barreira, J. C., Oliveira, M. B. P. (2019). Pulses and food security: Dietary protein, digestibility, bioactive and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 53-68.
- Bhargava, A., Rana, T. S., Shukla, S., Ohri, D. (2005). Seed protein electrophoresis of some cultivated and wild species of *Chenopodium*. *Biologia Plantarum*, 49(4), 505-511.
- Biswal, A. K., Samal, A. K., Tripathy, M., Misra, P. K. (2019). Identification of the secondary structure of protein isolated from deoiled cake flour of Mahua (*Madhuca latifolia*). *Materials Today: Proceedings*, 9, 605-614.
- 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.
- Bolontrade, A. J., Scilingo, A. A., Añón, M. C. (2016). Amaranth proteins foaming properties: Film rheology and foam stability—Part 2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 141, 643-650.
- Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., Rajamohamed, S. H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43, 537-546.
- Burgos-Díaz, C., Wandersleben, T., Marqués, A. M., Rubilar, M. (2016). Multilayer emulsions stabilized by vegetable proteins and polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 25, 51-57.
- Căpriță, R., Căpriță, A., Crețescu, I., Nicu, V. (2012). In vitro determination of wheat dry matter solubility and protein digestibility. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 45(2), 113-116.
- Carbonaro, M., Maselli, P., Nucara, A. (2015). Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Research International*, 76, 19-30.

- Chaires-Martinez, L. C., Vargas, M. P., del Angel, A. C., Bermudez, F. C., & Avalos, H. J. (2013). Total phenolic content and antioxidant capacity of germinated, popped, and cooked huauzontle (*Chenopodium berlandieri* spp. *nuttalliae*) seeds. *Cereal Chemistry*, *90*, 263-268.
- Chaparro Rojas, D. C., Pismag Portilla, R. Y., Elizalde Correa, A., Vivas Quila, N. J., Erazo Caicedo, C. A. (2010). Efecto de la germinación sobre el contenido y digestibilidad de proteína en semillas de amaranto, quinoa, soya y guandul. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *8*(1), 35-42.
- Chen, Y., Chen, J., Chang, C., Chen, J., Cao, F., Zhao, J., Zheng, Y., Zhu, J. (2019). Physicochemical and functional properties of proteins extracted from three microalgal species. *Food Hydrocolloids*, *96*, 510-517.
- Cuevas-Bernardino, J. C., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2016). Physicochemical characterisation of hawthorn pectins and their performing in stabilising oil-in-water emulsions. *Reactive and Functional Polymers*, *103*, 63-71.
- Dakhili, S., Abdolalizadeh, L., Hosseini, S. M., Shojaee-Aliabadi, S., Mirmoghtadaie, L. (2019). Quinoa protein: Composition, structure and functional properties. *Food Chemistry*, *299*, 125161.
- da Silva, B. P., Anunciação, P. C., da Silva Matyelka, J. C., Della Lucia, C. M., Martino, H. S. D., Pinheiro-Sant'Ana, H. M. (2017). Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in different places. *Food Chemistry*, *221*, 1709-1716.
- Deleu, L. J., Lambrecht, M. A., Van de Vondel, J., Delcour, J. A. (2019). The impact of alkaline conditions on storage proteins of cereals and pseudo-cereals. *Current Opinion in Food Science*, *25*, 98-103.
- Delgado, M. C. O., Tironi, V. A., Añón, M. C. (2011). Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT-Food Science and Technology*, *44*, 1752-1760.

- Delegación SADER Puebla. (2016). Huauzontle, de hortaliza a pseudocereal. Recuperado de <https://www.gob.mx/agricultura%7Cpuebla/articulos/huauzontle-de-hortaliza-a-seudo-cereal>
- Dickinson, E. (2020). Advances in food emulsions and foams: reflections on research in the neo-Pickering era. *Current Opinion in Food Science*, 33, 52-60.
- Du, Y., Zhang, Q., Zhao, X., Chen, F. (2020). Effect of reverse micelle on physicochemical properties of soybean 7S globulins. *Journal of Food Engineering*, 110026.
- Eleya, M. O., Ko, S., Gunasekaran, S. (2004). Scaling and fractal analysis of viscoelastic properties of heat-induced protein gels. *Food Hydrocolloids*, 18, 315-323.
- Elsouhaimy, 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.
- Escuredo, O., Martín, M. I. G., Moncada, G. W., Fischer, S., Hierro, J. M. H. (2014). Amino acid profile of the quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) using near infrared spectroscopy and chemometric techniques. *Journal of Cereal Science*, 60, 67-74.
- Estrada-Fernández, A. G., Román-Guerrero, A., Jiménez-Alvarado, R., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E. J. (2018). Stabilization of oil-in-water-in-oil (O1/W/O2) Pickering double emulsions by soluble and insoluble whey protein concentrate-gum Arabic complexes used as inner and outer interfaces. *Journal of Food Engineering*, 221, 35-44.
- Felix, M., Puerta, E., Bengoechea, C., & Carrera-Sánchez, C. Relationship between interfacial and foaming properties of a *Porphyra dioica* seaweed protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, 291, 110238.
- Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G., Añón, M. C. (2011). Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chemistry*, 126, 878-884.

- Gao, L. L., Li, Y. Q., Wang, Z. S., Sun, G. J., Qi, X. M., Mo, H. Z. (2018). Physicochemical characteristics and functionality of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed protein. *Food Chemistry*, 240, 980-988.
- Germain, J. C., Aguilera, J. M. (2014). Multi-scale properties of protein-stabilized foams. *Food Structure*, 1(1), 55-70.
- Gong, K. J., Shi, A. M., Liu, H. Z., Liu, L., Hu, H., Adhikari, B., Wang, Q. (2016). Emulsifying properties and structure changes of spray and freeze-dried peanut protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 170, 33-40.
- Graham, D. E., & Philips, M. C. (1979). Proteins at liquid interfaces: I. Kinetics of adsorption and Surface denaturation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70, 403-414.
- Grundy, M. M., Momanyi, D. K., Holland, C., Kawaka, F., Tan, S., Salim, M., Boyd, B.J., Bajka, B., Mulet-Cabero, A.I., Bishop, J., Owino, W. O. (2020). Effects of grain source and processing methods on the nutritional profile and digestibility of grain amaranth. *Journal of Functional Foods*, 72, 104065.
- Han, S. W., Chee, K. M., Cho, S. J. (2015). Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. *Food Chemistry*, 172, 766-769.
- Han, Z., Cai, M. J., Cheng, J. H., Sun, D. W. (2018). Effects of electric fields and electromagnetic wave on food protein structure and functionality: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 1-9.
- Hejazi, S. N., Orsat, V., Azadi, B., Kubow, S. (2016). Improvement of the in vitro protein digestibility of amaranth grain through optimization of the malting process. *Journal of Cereal Science*, 68, 59-65.
- Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L., & Miller, G. A. (1977). A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science*, 42(5), 1269-1273.
- Janssen, F., Pauly, A., Rombouts, I., Jansens, K. J., Deleu, L. J., Delcour, J. A. (2017). Proteins of amaranth (*Amaranthus* spp.), buckwheat (*Fagopyrum* spp.), and quinoa

- (*Chenopodium* spp.): A food science and technology perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16, 39-58.
- Jiang, Z. Q., Sontag-Strohm, T., Salovaara, H., Sibakov, J., Kanerva, P., Loponen, J. (2015). Oat protein solubility and emulsion properties improved by enzymatic deamidation. *Journal of Cereal Science*, 64, 126-132.
- Joshi, M., Adhikari, B., Aldred, P., Panozzo, J. F., Kasapis, S., & Barrow, C. J. (2012). Interfacial and emulsifying properties of lentil protein isolate. *Food Chemistry*, 134(3), 1343-1353.
- 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.
- Kim, J. H., Varankovich, N. V., Stone, A. K., Nickerson, M. T. (2016). Nature of protein-protein interactions during the gelation of canola protein isolate networks. *Food Research International*, 89, 408-414.
- Kim, W., Wang, Y., Selomulya, C. (2020). Dairy and plant proteins as natural food emulsifiers. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 261–272.
- Kinsella, J. E., Melachouris, N. (1976). Functional properties of proteins in foods: a survey. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 7(3), 219-280.
- Kistler, L., Shapiro, B. (2011). Ancient DNA confirms a local origin of domesticated chenopod in eastern North America. *Journal of Archaeological Science*, 38(12), 3549-3554.
- Kumar, A., Agarwal, D. K., Kumar, S., Reddy, Y. M., Chintagunta, A. D., Saritha, K. V., Pal, G., Kumar, S. J. (2019). Nutraceuticals derived from seed storage proteins: implications for health wellness. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 710-719.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lazo- Vélez, M. A., Guajardo- Flores, D., Mata- Ramírez, D., Gutiérrez- Uribe, J. A., Serna- Saldivar, S. O. (2016). Characterization and quantitation of triterpenoid saponins in raw and sprouted *Chenopodium berlandieri* spp. (Huauzontle) grains subjected to germination with or without selenium stress conditions. *Journal of Food Science*, 81,C19-C26.
- Li, P., Wen, J., Ma, X., Lin, F., Jiang, Z., Du, B. (2018). Structural, functional properties and immunomodulatory activity of isolated Inca peanut (*Plukenetia volubilis* L.) seed albumin fraction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1931-1941.
- Lin, C. S., Zayas, J. F. (1987). Functionality of defatted corn germ proteins in a model system: fat binding capacity and water retention. *Journal of Food Science*, 52, 1308-1311.
- Lin, D., Lu, W., Kelly, A. L., Zhang, L., Zheng, B., & Miao, S. (2017). Interactions of vegetable proteins with other polymers: Structure-function relationships and applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 130-144.
- Lin, F. Y. H., Kwok, D. Y., Policova, Z., Zingg, W., & Neumann, A. W. (1995). The effect of ph and concentration on the surface tension of adsorbed layers of various insulin preparations. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 3(5), 281-286.
- López, D. N., Ingrassia, R., Busti, P., Bonino, J., Delgado, J. F., Wagner, J., Boeris, V., Spelzini, D. (2018). Structural characterization of protein isolates obtained from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *LWT-Food Science and Technology*, 90, 396-402.
- López, D. N., Galante, M., Raimundo, G., Spelzini, D., Boeris, V. (2019). Functional properties of amaranth, quinoa and chia proteins and the biological activities of their hydrolyzates. *Food Research International*, 116, 419-429.

- López, D. N., Galante, M., Robson, M., Boeris, V., Spelzini, D. (2018). Amaranth, quinoa and chia protein isolates: Physicochemical and structural properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 152-159.
- Lucey, J. A., Singh, H. (1997). Formation and physical properties of acid milk gels: A review. *Food Research International*, 30, 529-542.
- Mäkinen, O. E., Zannini, E., Arendt, E. K. (2015). Modifying the cold gelation properties of quinoa protein isolate: influence of heat-denaturation pH in the alkaline range. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70, 250-256.
- Mäkinen, O. E., Zannini, E., Koehler, P., Arendt, E. K. (2016). Heat-denaturation and aggregation of quinoa (*Chenopodium quinoa*) globulins as affected by the pH value. *Food Chemistry*, 196, 17-24.
- Makri, E. A., & Doxastakis, G. I. (2007). Surface tension of Phaseolus vulgaris and coccineus proteins and effect of polysaccharides on their foaming properties. *Food Chemistry*, 101(1), 37-48.
- Marcone, M. F. (1999). Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S seed globulins. *Food Research International*, 32(2), 79-92.
- Martínez-Velasco, A., Lobato-Calleros, C., Hernández-Rodríguez, B. E., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E. J. (2018). High intensity ultrasound treatment of faba bean (*Vicia faba* L.) protein: Effect on surface properties, foaming ability and structural changes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 44, 97-105.
- Martínez-Villaluenga, C., Peñas, E., Hernández-Ledesma, B. (2020). Pseudocereal grains: Nutritional value, health benefits and current applications for the development of gluten-free foods. *Food and Chemical Toxicology*, 137, 111178.
- Mir, N. A., Riar, C. S., Singh, S. (2018). Nutritional constituents of pseudo cereals and their potential use in food systems: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 170-180.

- Mirmoghtadaie, L., Aliabadi, S. S., Hosseini, S. M. (2016). Recent approaches in physical modification of protein functionality. *Food chemistry*, 199, 619-627.
- Mishyna, M., Martinez, J. J. I., Chen, J., Davidovich-Pinhas, M., Benjamin, O. (2019). Heat-induced aggregation and gelation of proteins from edible honey bee brood (*Apis mellifera*) as a function of temperature and pH. *Food Hydrocolloids*, 91, 117-126.
- Moreno, A. (2014). Estudio comparativo de radiosensibilidad entre razas locales de pseudocereales nativos de México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Mexico. Toluca, México. Pp. 10
- Moreno-Santander, L.A., García-Zapateiro, R., Ortega-Toro, R. (2020). Rheological characterization of gums-gel obtained from the proteic isolate of sesame (*Sesamum indicum*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19, 21-31.
- Mota, C., Santos, M., Mauro, R., Samman, N., Matos, A.S., Torres, D., Castanheira, I. (2016). Protein content and amino acids profile of pseudocereals. *Food Chemistry*, 193, 55-61.
- Mudgil, P., Omar, L. S., Kamal, H., Kilari, B. P., Maqsood, S. (2019). Multi-functional bioactive properties of intact and enzymatically hydrolysed quinoa and amaranth proteins. *LWT*, 110, 207-213.
- Navarro-Lisboa, R., Herrera, C., Zúñiga, R. N., Enrione, J., Guzmán, F., Matiacevich, S., Astudillo-Castro, C. (2017). Quinoa proteins (*Chenopodium quinoa* Willd.) fractionated by ultrafiltration using ceramic membranes: The role of pH on physicochemical and conformational properties. *Food and Bioproducts Processing*, 102, 20-30.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2015). *Lehninger principles of biochemistry* (6th ed.). Omega (Chapter 3).
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42, 469-479.

- Nicolai, T. (2019). Gelation of food protein-protein mixtures. *Advances in Colloid and Interface Science*, 270, 147-164.
- Nicolai, T., Durand, D. (2013). Controlled food protein aggregation for new functionality. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(4), 249-256.
- Osborne, T. B., & Campbell, G. F. (1898). PROTEIDS OF THE PEA. *Journal of the American Chemical Society*, 20(5), 348-362.
- Palaniappan, A., Jakobsson, E. (2017). Fourier Analysis of Conservation Patterns in Protein Secondary Structure. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 15, 265-270.
- Pastor, J. R., Aláiz Barragán, M., Megías, C., Vioque, J. (2007). Caracterización proteica de las semillas de once especies de amaranto. *Grasas y Aceites*, 58 (1), 49-55.
- Pereira, E., Encina-Zelada, C., Barros, L., Gonzales-Barron, U., Cadavez, V., Ferreira, I. C. (2019). Chemical and nutritional characterization of *Chenopodium quinoa* Willd (quinoa) grains: A good alternative to nutritious food. *Food Chemistry*, 280, 110-114.
- Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83, 346-350.
- Ramírez-Navas, Juan. (2006). Introducción a la Reología de Alimentos. *Revista ReCiTeIA*. 6. 1-46.
- Reguera, M., Conesa, C. M., Gil-Gómez, A., Haros, C. M., Pérez-Casas, M. A., Briones-Labarca, V., Bolaños, L., Bonilla, I., Álvarez, R., Pinto, K., Mujica, A., Bascuñán-Godoy, L. (2018). The impact of different agroecological conditions on the nutritional composition of quinoa seeds. *PeerJ*, 6:e4442. DOI 10.7717/peerj.4442.
- Rodsamran, P., Sothornvit, R. (2018). Physicochemical and functional properties of protein concentrate from by-product of coconut processing. *Food Chemistry*, 241, 364-371.

- Roy, F., Boye, J. I., Simpson, B. K. (2010). Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International*, 43, 432-442.
- Ruan, Q. J., Wang, M. P., Zou, Y., Lin, C., Cai, D. C., & Wang, J. M. (2020). Interfacial stabilization of aqueous foam based on soy protein-rhamnolipids interacting mixture. *Industrial Crops and Products*, 153, 112587.
- Sá, A. G. A., Moreno, Y. M. F., Carciofi, B. A. M. (2020). Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 170-184.
- Sánchez-López, F., Robles-Olvera, V. J., Hidalgo-Morales, M., Tsopmo, A. (2020). Characterization of *Amaranthus hypochondriacus* seed protein fractions, and their antioxidant activity after hydrolysis with lactic acid bacteria. *Journal of Cereal Science*, 95, 103075.
- Schmitt, C., Silva, J. V., Amagliani, L., Chassenieux, C., Nicolai, T. (2019). Heat-induced and acid-induced gelation of dairy/plant protein dispersions and emulsions. *Current Opinion in Food Science*, 27, 43-48.
- Segovia-Siapco, G., Khayef, G., Pribis, P., Oda, K., Haddad, E., & Sabaté, J. (2020). Animal Protein Intake Is Associated with General Adiposity in Adolescents: The Teen Food and Development Study. *Nutrients*, 12(1), 110.
- Shevkani, K., Singh, N., Rana, J. C., Kaur, A. (2014). Relationship between physicochemical and functional properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates. *International Journal of Food Science & Technology*, 49, 541-550.
- Shi, D., Fidelis, M., Ren, Y., Stone, A. K., Ai, Y., Nickerson, M. T. (2020). The functional attributes of Peruvian (*Kankolla and Blanca juli blend*) and Northern quinoa (*NQ94PT*) flours and protein isolates, and their protein quality. *Food Research International*, 128, 108799.
- Song, F., Tang, D. L., Wang, X. L., Wang, Y. Z. (2011). Biodegradable soy protein isolate-based materials: a review. *Biomacromolecules*, 12, 3369-3380.

- Su, Y., Dong, Y., Niu, F., Wang, C., Liu, Y., Yang, Y. (2015). Study on the gel properties and secondary structure of soybean protein isolate/egg white composite gels. *European Food Research and Technology*, 240, 367-378.
- Suarez, S. E., Añón, M. C. (2018). Comparative behaviour of solutions and dispersions of amaranth proteins on their emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, 74, 115-123.
- Tan, S. H., Mailer, R. J., Blanchard, C. L., Agboola, S. O., Day, L. (2014). Gelling properties of protein fractions and protein isolate extracted from Australian canola meal. *Food Research International*, 62, 819-828.
- 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.
- Tang, L., Sun, J., Zhang, H. C., Zhang, C. S., Yu, L. N., Bi, J., Zhu, F., Liu, S.F., Yang, Q. L. (2012). Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of peanut protein hydrolysate. *PloS One*, 7(5), e37863.
- Tavano, O. L., Neves, V. A., & da Silva Júnior, S. I. (2016). In vitro versus in vivo protein digestibility techniques for calculating PDCAAS (protein digestibility-corrected amino acid score) applied to chickpea fractions. *Food Research International*, 89, 756-763.
- Timilsena, Y. P., Adhikari, R., Barrow, C. J., Adhikari, B. (2016). Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. *Food Chemistry*, 212, 648-656.
- Tironi, V. A., Añón, M. C. (2010). Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Research International*, 43, 315-322.
- Tontul, İ., Kasimoglu, Z., Asik, S., Atbakan, T., Topuz, A. (2018). Functional properties of chickpea protein isolates dried by refractance window drying. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1253-1259.

- Totosaus, A., Montejano, J.G., Salazar, J. A., Guerrero, I. (2002). Review of physical and chemical protein-gel induction. *International Journal of Food Science & Technology* 37, 589 – 601.
- Valcárcel-Yamani, B., da silva S.C. (2012). Applications of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and amaranth (*Amaranthus spp.*) and their influence in the nutritional value of cereal based foods. *Food and Public Health*, 2(6), 265-275.
- Ventureira, J. L., Bolontrade, A. J., Speroni, F., David-Briand, E., Scilingo, A. A., Ropers, M. H., Boury, F., Añón, M. C., Anton, M. (2012). Interfacial and emulsifying properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates under different conditions of pH. *LWT-Food Science and Technology*, 45, 1-7.
- van Vliet, T., Martin, A. H., Bos, M. A. (2002). Gelation and interfacial behaviour of vegetable proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(5-6), 462-468.
- Wang, L., Wu, M., Liu, H. M. (2017). Emulsifying and physicochemical properties of soy hull hemicelluloses-soy protein isolate conjugates. *Carbohydrate Polymers*, 163, 181-190.
- Wang, X., Zhao, R., & Yuan, W. (2020). Composition and secondary structure of proteins isolated from six different quinoa varieties from China. *Journal of Cereal Science*, 95, 103036.
- Wardah, W., Khan, M. G., Sharma, A., Rashid, M. A. (2019). Protein secondary structure prediction using neural networks and deep learning: A review. *Computational Biology and Chemistry*, 81, 1-8.
- WHO/FAO/UNU. 1985. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization/United Nations University, Energy and Protein Requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU meeting. World Health, Organization, Geneva. Food and Agriculture Organization (FAO).

- Wu, W., Li, F., Wu, X. (2020). Effects of rice bran rancidity on oxidation, structural characteristics and interfacial properties of rice bran globulin. *Food Hydrocolloids*, *110*, 106123.
- Xiao, H., Huang, L., Zhang, W., & Yin, Z. (2020). Damage of Proteins at the air/water interface: Surface tension characterizes globulin interface stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 119445.
- Allende, C. L. (2014). Estudio de radiosensibilidad de pseudocereales mediante marcadores moleculares y microscopía electrónica. Tesis profesional. Universidad Autónoma del Estado de México, México.
- Xingú-López, A., Balbuena-Melgarejo, A., Laguna-Cerda, A., Iglesias-Andréu, L. G., Olivares, V. (2018). Caracterización de huauzontle (*Chenopodium berlandieri* spp *nuttalliae*) del Estado de México mediante microsatélites. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria México*, *6*(2), 9-16.
- Xu, Y., Yang, N., Yang, J., Hu, J., Zhang, K., Nishinari, K., Phillips, G. O., Fang, Y. (2019). Protein/polysaccharide intramolecular electrostatic complex as superior food-grade foaming agent. *Food Hydrocolloids*, 105474.
- Ye, J., Yu, Q., Mai, W., Liang, P., Liu, X., & Wang, Y. (2019). Dietary protein intake and subsequent risk of type 2 diabetes: a dose–response meta-analysis of prospective cohort studies. *Acta Diabetologica*, *56*(8), 851-870.
- Yi, L., Lakemond, C. M. M., Sagis, L. M. C., Eisner-Schadler, V., van Huis, A., van Boekel, M.A. J. S. (2013). Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. *Food Chemistry*, *141*, 3341-3348.
- Yu, M., Zeng, M., Qin, F., He, Z., Chen, J. (2017). Physicochemical and functional properties of protein extracts from *Torreya grandis* seeds. *Food Chemistry*, *227*, 453-460.
- Zhao, W. M., Gatehouse, J. A., Boulter, D. (1983). The purification and partial amino acid sequence of a polypeptide from the glutelin fraction of rice grains; homology to pea legumin. *FEBS letters*, *162*(1), 96-102.

Zhu, Y., Fu, S., Wu, C., Qi, B., Teng, F., Wang, Z., Li, Y., Jiang, L. (2020). The investigation of protein flexibility of various soybean cultivars in relation to physicochemical and conformational properties. *Food Hydrocolloids*, 103, 105709.

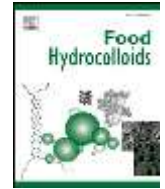
10.- ANEXOS

Publicación

**Huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.) protein: Composition, structure,
physicochemical and functional properties**

D.I. López-Monterrubio, C. Lobato-Calleros, J. Alvarez-Ramirez, E.J. Vernon-Carter.

Food Hydrocolloids, 108 (2020) 106043



Huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.) protein: Composition, structure, physicochemical and functional properties

D.I. López-Monterrubio^a, C. Lobato-Calleros^c, J. Alvarez-Ramirez^b, E.J. Vernon-Carter^{b,*}

^a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Istapalapa, Apartado Postal 55-534, CDMX, 09340, Mexico

^b Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Istapalapa, Apartado Postal 55-534, CDMX, 09340, Mexico

^c Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, 7m 38.5, Carretera México-Texcoco, 56230, Texcoco, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Huauzontle protein
Pseudocereal
Secondary protein structures
Foaming properties
Gelling properties

ABSTRACT

The physicochemical and functional properties of huauzontle protein isolates (HPI) were investigated. HPI had high contents of most essential amino acids excepting valine, and a protein digestibility of 83.0 ± 0.2%. SDS-PAGE showed that the main protein bands were located between 20 and 50 KDa. FTIR pinpointed that the Amide I secondary structure was composed by repetitive units (e.g., α -helix and β -sheet), whose relative proportion varied with pH. Foaming capacity (FC) and foaming stability (FS) were higher as HPI concentration increased. FC was 206 ± 2.8% and FS was 100% after 1 h of aging using 3% HPI at pH 7.0. Self-supporting homogeneous gels were formed at pH 7.0 and 9.0, but not at other pH values. The storage modulus (G') predominated over the loss modulus (G'') over a heating-cooling temperature ramp (20–90–20 °C), with both moduli tending to increasing upon heating, and with gel hardening occurring during cooling. G' and G'' decreased sharply at moderate and high strain%, with a crossover of both moduli taking place at lower strain% (~60%) at pH 9.0. This behavior might be attributed to the relative percentage of protein secondary structures which changed with pH. This study clearly establishes HPI as a potential and novel functional ingredient for the food industry, which besides possesses a high nutritional quality.

1. Introduction

The recent two decades have witnessed the interest of consumers for proteins of vegetal origin as an alternative for animal-based sources. Biocompatibility, relatively low costs and climatic sustainability are motivations behind the growing interest on vegetal proteins (López, Galante, Robson, Boeris, & Spelzini, 2018a). In fact, vegetable proteins are renewable and biodegradable with interesting functional and/or physicochemical properties (Nesterenko, Alric, Silvestre, & Durrieu, 2013). It has been shown that vegetable proteins are suitable for multilayer emulsion stabilization (Burgos-Díaz, Wandersleben, Marqués, & Rubilar, 2016) and gel formation (Moreno-Santander, Garcí, a-Zapateiro, & Ortega-Toro, 2020). Besides, vegetable proteins can be combined with other edible polymers to improve the quality and nutritional value of food products (Lin et al., 2017). On the other hand, vegetable proteins exhibit good gelling ability, with important applications to food products (Batista, Portugal, Sousa, Crespo, & Raymundo, 2005).

Legumes and cereals are the most exploited sources of vegetal

proteins. Soy protein is widely used material for the production of supplemental foods and for the fabrication of edible biopolymer composites (Song, Tang, Wang, & Wang, 2011). Green pea, chickpea and lentil proteins are also important sources of vegetable proteins (Boye et al., 2010; Roy, Boye, & Simpson, 2010). Rice bran protein is a promising protein source with good biological values and digestibility (Han, Chee, & Cho, 2015). Recently, some pseudocereals have emerged as important sources of vegetable proteins. Given their relatively high content of proteins, pseudocereals, like quinoa, chia and amaranth (López et al., 2018b; (López, Galante, Robson, Boeris, & Spelzini, 2018a)), have been tagged as super-foods, prompting a viable alternative to animal-based food products. For instance, it has been found that amaranth seed protein hydrolyzates have antihypertensive (Fritz, Vecchi, Rinaldi, & Anón, 2011) and antioxidant (Delgado, Tironi, & Anón, 2011) activities. Amaranth protein isolates have been used for the production of ultrathin structures through electrospinning (Aceituno-Medina, Lopez-Rubio, Mendoza, & Lagaron, 2013), as these proteins present salient physicochemical properties (Shevkani, Singh, Rana, & Kaur, 2014). Proteins from chia seeds are highly bioavailable and have a

* Corresponding author.

E-mail addresses: jvc@xanum.uam.mx, jvernoncarter@gmail.com (E.J. Vernon-Carter).

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106043>

Received 30 January 2020; Received in revised form 14 May 2020; Accepted 18 May 2020

Available online 4 June 2020

0268-005X/O 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

high content of essential amino acids (Timilsena, Adhikari, Barrow, & Adhikari, 2016). Amaranth proteins also exhibit important emulsifying properties for the preparation of emulsions in food products (Suarez & Anón, 2018).

Chenopodium nuttalliae Saff., known by the common name of huauzontle, is an edible plant species native to Mexico. The common name is derived from the Nahuatl huautli “amaranth” and tzontli “hair”. This pseudocereal has been traditionally consumed in Mexico since pre-Hispanic times (Kistler & Shapiro, 2011). Huauzontle, just as quinoa, belongs to the Chenopodiaceae family, and both are gluten free so they can be consumed by people with celiac disease, and have a nutrient-rich composition (Pereira et al., 2019). Huauzontle has a relatively high protein content (approx. 17%), as well as antioxidants and starch (Barrón-Táñez, Villanueva-Verduzco, García-Mateos, & Colinas-León, 2009). Besides, huauzontle seeds represent a useful potential ingredient for consumer health, as they are a good source of phenolic compounds with high antioxidant activity (Chaires-Martinez, Vargas, del Angel, Bermudez, & Avalos, 2013; Lazo-Vélez, Guajardo-Flores, Mata-Ramírez, Gutiérrez-Urbe, & Serna-Saldivar, 2016). The physicochemical and functional properties of starch from huauzontle have been also characterized (Assad-Bustillos, Ramírez-Gilly, Tecante, & Chaires-Martinez, 2014).

Proteins from diverse pseudocereals have been studied in some detail (Avanza, Puppo, & Anón, 2005; Janssen et al., 2017; Tironi & Anón, 2010), but not those from huauzontle. Thus, the aim of this study was to obtain protein isolate from huauzontle seeds and to evaluate their chemical composition, *in vitro* digestibility, molecular weight profile, secondary structure, amino acid profile, solubility, zeta potential variation with pH, foaming capacity and stability, water-holding and oil-binding capacity, gelling capacity and rheological properties of the gels. It is hoped that knowledge is gained regarding the potential functional properties of huauzontle protein isolate, in order to promote their usage in the food industry as a novel food ingredient.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.) seeds were obtained from a local producer from the community of Tepoztlán (18° 59' 7" N, 99° 5' 59" W, elevation above sea level of 1706 m), State of Morelos, Mexico. Hydrochloric acid, sodium hydroxide and ethanol were analytical grade and purchased from J.T. Baker (Xalostoc, State of Mexico, Mexico). Electrophoresis reagents were obtained from Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA). Enzymes for protein digestibility assay were from Sigma-Aldrich Mexico (Toluca, State of Mexico, Mexico). Reagents for HPLC and for protein derivatization were from Waters Corp. (Milford, MA, USA). Soybean oil (Nutrioli, Ragasa Industrias S.A. de C.V., Monterrey, State of Nuevo Leon, Mexico) was obtained at a local supermarket in Mexico City. Deionized water (DW) was used in all the experiments.

2.2. Proximate analysis of huauzontle seed flour (HSF)

Huauzontle seed flour (HSF) was obtained by grinding the huauzontle seeds in a food processor (Nutribullet™, NB-101B, Hong King Ltd., Guangdong, China) and sieved in a No. 80 mesh screen (Manufacturers of Industrial and Commercial Supplies, St. Louis, MI, USA). HSF moisture, ash, crude fiber, total protein (N_x6.25) and total lipids were determined as described in AOAC (2000). The total nitrogen free extract (NFE), consisting of carbohydrates, sugars, starches, etc., was calculated by the difference {100 - (%protein + %lipids + %fiber + %ash)}. Subsequently, the soluble protein was determined by the Lowry method modified by Peterson (1977) using BSA as a standard (0.1–0.01 mg/mL).

2.3. Preparation of huauzontle protein isolates (HPI)

The HSF was degreased with hexane in a soxhlet apparatus for 3 h, and afterwards allowed to dry at room temperature. HSF sample (100 g) was dispersed in DW (10 g/100 mL), and the pH was adjusted to 9 with 1 N NaOH. The dispersion was stirred for 1 h at room temperature (22 ± 2 °C) and subsequently centrifuged at 9200_xg at 10 °C for 10 min (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburg, Germany). The supernatant was collected and the pH was adjusted to 3.6 (HPI isoelectric point) using 3 N HCl. The precipitated protein was isolated by centrifugation at 9200_xg for 10 min at 4 °C and washed thrice with DW at 1:10 ratio for 10 min. Finally, the samples were dried at 35 °C for 24 h in an air-circulating oven (Riossa Digital HCF-62, Mexico City, Mexico). The dried isolate was ground manually and stored in a sealed container at refrigeration temperature (4 ± 1 °C) until its use.

2.4. Zeta potential (ζ-potential) of HPI dispersions

The ζ-potential of the HPI (0.05 g/100 g) dispersions was determined with a Zetasizer Nano ZS90 coupled to the autotitrator MTP-2 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) at pH values ranging between 2.0 and 6.0 at 25 °C. The pH of the solutions was adjusted to the desired value by the addition of either 0.1 N NaOH or 0.1 N HCl. The ζ-potential was determined by measuring the direction and velocity of the dispersion molecules as they moved along the applied electric field. The equipment software converted the electrophoretic mobility measurements into ζ-potential values using the Smoluchowski mathematical model.

2.5. *In vitro* digestibility of HPI

In vitro protein digestibility was carried out by the multienzymes method of Elsohaimy, Refaay, and Zaytoon (2015). HPI sample (63.8 mg) was added to 10 mL of DW and the pH was adjusted to 8.0 with 1 N NaOH. One mL of enzyme aqueous solution (1.58 mg of trypsin Type IX, 3.65 mg of α-chymotrypsin type II and 0.45 mg of aminopeptidase I) 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 type XIV 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 *in vitro* protein digestibility according the following equation:

$$Y = 234.84 - 22.56X \quad (1)$$

Here, *Y* is the *in vitro* digestibility of protein (%), and *X* is the pH of the suspension after 20 min digestion.

2.6. Molecular weight profile

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of HPI was performed following the method of Laemmli (1970). Protein isolates samples were mixed in a 3:2 (v/v) ratio with buffer solution: 200 g/L SDS, 25 mL/L glycerol concentrate, 10 mL/L p-mercaptoethanol, 0.20 g/L bromophenol blue and 1 L of DW. The gel system consisted of 2.1 g/L SDS, 200 g/L acrylamide resolving gel (pH 8.8) and 50 g/L acrylamide stacking gel (pH 6.8). The total gel thickness was 0.75 mm, with 10 cm of resolving gel and 2 cm of stacking gel. Protein bands were stained by gel immersion in Coomassie brilliant blue in a solution of 400 mL of methanol, 70 mL of acetic acid and 530 mL of DW. Broad-range protein molecular weight standards were used.

2.7. Amino acid profile

The amino acid profile of HPI was determined following the procedure described by Mota et al. (2016), with modifications. HPI (30 mg) samples were put into proper quartz digestion vials, added with 1 mL of

6 N HCl containing phenol 1% v/v, and 200 μL of D-Norvaline (25 mM, as internal standard). The sealed tubes were put into a MW 650 closed vessel microwave digestion system (Aurora Biomed, Vancouver, BC, Canada). The oven was purged with nitrogen and a vacuum pump. The oven was heated to 160 $^{\circ}\text{C}$, maintained at this temperature for 10 min, and cooled down to room temperature. The complete hydrolyzed extracts were neutralized with 1 mL 6 N NaOH, and filled up to a total volume of 10 mL with DW. The hydrolyzates were filtered with filter paper (Whatman No. 40). Sample (10 μL) was put into a chromatographic vial, added with 20 μL of reconstituted 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent and 80 μL of dilution buffer. The reaction mix was heated to 60 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min and vortexed. An Acquity UHPLC system (Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled to a photodiode array detector (wavelength set at 260 nm) was used for chromatographic determination. A BEH C18 column (130 Å , 1.7 μm , 100 mm \times 2.1 mm), a flow rate of 0.7 mL/min, a temperature of 60 $^{\circ}\text{C}$, injection volume of 1 μL were used. The mobile phase consisted of AccQTag ultra eluent T (95% in DW) and AccQTag ultra eluent Z. The gradient conditions were: 0–0.54 min, 99.9% T–0.1% Z; 5.74 min, 90.9% T–9.1% Z; 7.74 min, 78.8% T–21.2% Z; 8.04 min, 40.4% T–59.6% Z; 8.70–10 min, 99.9% T–0.1% Z. A calibration curve was prepared from the stock solution of each amino acid diluted to appropriate concentrations. D-norvaline (45.5 pmol) was used as internal standard. Derivatized amino acids were quantified and identified by comparison to the retention times and area ratios of standard amino acids mixtures with the internal standard. Results are given in g/100 g of HPI.

2.8. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The infrared spectra were recorded with a FTIR spectrophotometer (Frontier, PerkinElmer, Mexico City, Mexico), equipped with universal attenuated total reflectance accessory. Dried sample (10 mg) of HPI at different pH (2.0, 3.6 (isoelectric point), 5.0, 7.0, 9.0, 11.0) was brought into contact with the diamond crystal using a geometry adjustment of 60 units of force gauge, 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) 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 center and the integral of each peak was divided by the sum of all determined peaks to identify the % of each secondary structure.

2.9. Protein solubility

The solubility of protein isolate samples was carried out by method of Tu, Zeng, Qin, He, and Chen (2017). Aqueous solutions (1 g/100 mL) of the protein samples were prepared in 0.01 M phosphate buffer at pH (2.0, 3.6 (isoelectric point), 5.0, 7.0, 9.0, 11.0). The protein dispersions were stirred at ambient temperature for 60 min, centrifuged (4400 \times g, 20 min) and filtered into tubes of 15 mL. The protein contents of the supernatants were determined according to Lowry method modified by Petterson (1977). 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.

2.10. HPI adsorption at the air-water interface

HPI aqueous solutions were prepared at different concentrations (0.1, 0.5, 1.0 and 3.0 g/L) and at pH 7.0 \pm 0.1. The dynamic surface adsorption of protein molecules was determined by monitoring the evolution of surface tension drop with time at the air-water interface at 25 $^{\circ}\text{C}$, using an optical contact angle meter, OCA-20, with oscillating drop accessory ODG-20 (Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt, Germany) (Martinez-Velasco et al., 2018).

2.11. Foaming capacity and stability

Twenty mL of HPI dispersions (0.1, 0.5, 1 and 3 g/L) at pH (7.0 \pm 0.1) were whipped at high speed (10,000 rpm, 1 min) with an Ultra-Turrax[®] homogenizer (T50 basic IKA Works, Inc., Wilmington, USA) in order to incorporate the air, and transferred to a 50 mL cylinder. The total volume was measured at 0, 0.5, 5, 10, 40 and 60 min after whipping. Foaming capacity was expressed as the foam expansion achieved immediately after whipping ($t = 0$ min), while foam stability was expressed as foam expansion at 60 min after whipping. Foam expansion was calculated according to the following equation:

$$\text{Foam expansion} (\%) = \frac{B - A}{A} \times 100 \quad (2)$$

where A is volume after whipping (mL) at different time and B is volume before whipping.

2.12. Water-holding and oil-binding capacities

The water holding capacity (WHC) of samples was determined as described by Gong et al. (2016) with slight modifications. HPI sample (\sim 1.0 g, W_0) at pH 7.0 \pm 0.1 was placed in a centrifugal tube and was weighed together with the centrifuge tube (W_1). Then, 10 mL distilled water was added to the HPI sample and was stirred for 1 h at room temperature. The mixture they were allowed to stand at room temperature for 30 min and then centrifuged at 3000 \times g for 20 min. The supernatant was decanted and the centrifuge tube containing the sediment was weighed (W_2). The WHC (g of water/g of protein) was calculated according to the following equation:

$$\text{WHC} (\%) = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \times 100 \quad (3)$$

For oil binding capacity (OBC), the sample of HPI (\sim 1.0 g, W_0) at pH 7.0 \pm 0.1 was placed in a centrifugal tube and was weighed together with the tube (W_1). Then, 5 mL soybean oil was added to the HPI sample and was mixed for 5 min using a vortex mixer. The HPI-oil samples were allowed to stand for 30 min at ambient temperature, and then centrifuged at 3000 \times g for 20 min. The supernatant of soybean oil was decanted and the centrifuge tube containing the sediment was weighed (W_2). The OBC (gram of oil per gram of protein) was calculated according to the following equation:

$$\text{OBC} (\%) = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \times 100 \quad (4)$$

2.13. Gel formation and rheological properties of protein solutions

Gel formation was achieved by heating HPI dispersions (15 g/100 mL) at pH 2.0, 3.6, 5.0, 7.0, 9.0, and 11.0 in a water bath to 90 $^{\circ}\text{C}$, held at this temperature for 20 min, and then let to cool down to room temperature. Gel formation was determined through visual observation. If the dispersions did not move upon turning the tube, it was considered that a gel was formed.

For the rheological properties, HPI solutions (15 g/100 mL, pH 7.0 and 9.0) were loaded into the plate-plate geometry (25 mm diameter) of a Physica MCR 301 rheometer (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Germany). To avoid evaporation, the edge of the geometry was covered with a thin layer of paraffin. In order to mimic the gelation process, the HPI solutions were subjected to: (i) A temperature ramp from 20 to 90 $^{\circ}\text{C}$ at a heating rate of 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, kept at 90 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min, and cooled to 20 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, applying a strain amplitude of 1% at a frequency of 0.1 Hz, and (ii) A strain sweep (0.01–100%) at a constant frequency of 0.1 Hz, when the sample had been cooled down to 20 $^{\circ}\text{C}$ and was in the gel state. The storage (G') and loss (G'') moduli values were monitored with the equipment software.

Table 1
Proximate analysis of huauzontle seed flour.

Constituents	% Dry weight basis
Ash	5.7 ± 0.2
Crude protein (N × 6.25)	20.4 ± 0.3
Crude fat	
Carbohydrates (NFE)	10.0 ± 0.1
Cellulose	3.6 ± 0.1
Hemicelluloses	60.4 ± 0.1

Values are presented as mean ± SD of triplicates (P < 0.05).

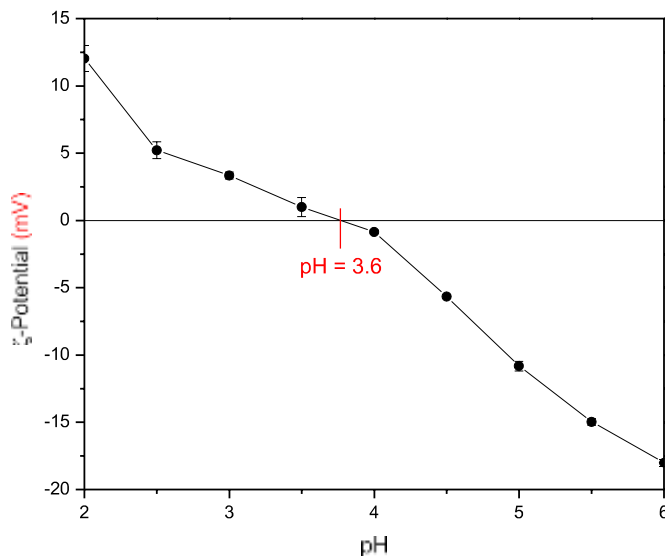


Fig. 1. ζ -potential of huauzontle protein isolates as function of pH.

2.14. Statistical analysis

All experiments were done in triplicate from 3 independent experiments using a randomized experimental design and values were expressed as mean values ± SD. Data were subjected to simple classification analysis of variance and in pertinent cases to Tukey's mean comparison analysis. Significance was established at $p \leq 0.05$. Data analysis was performed with the statistical package SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., NC, USA).

3. Results and discussion

3.1. Proximal analysis of huauzontle seed flour

Table 1 presents the results of proximal analysis of HSF. This study presented significantly higher values for protein, carbohydrates, ash and ether extract than what was reported by Barrón-Táñez et al. (2009). Differences in chemical composition may be due to the environmental conditions of growth of the crop such as temperature, humidity, location of the crop and soil conditions (da Silva et al., 2017). On the other hand, the protein content (20.4 ± 0.3%) was higher than that reported for other pseudocereals, like *Chenopodium quinoa* with 14.0% (Esohaimy et al., 2015), *Amaranthus cruentus* with 14.9% (Bejarano-Luján & Netto, 2010) and *Amaranthus sp.* with 12.5% (Chaparro Rojas, Pismag Portilla, Elizalde Correa, Vivas Quila, & Erazo Caicedo, 2010).

3.2. ζ -potential

The variation of the ζ -potential of HPI with the pH is shown in Fig. 1. The isoelectric point was located at pH 3.6. The ζ -potential changed from 12.0 ± 1.0 mV at pH 2.0 to about -18.0 ± 0.3 mV at pH 6.0. The ionization of carboxylic groups (-COOH) to give carboxylates

Table 2
Amino acid composition of huauzontle protein isolate (g/100 g de protein).

Essential aminoacids	Content (g/100 g)	Consumer recommendation FAO/WHO/UNU ^x	Amaranth* ^x	Quinoa** ^x
Histidine ^d	5.9 ± 0.4	1.6	1.8 ± 0.3	2.2 ± 0.5
Leucine ^{af}	10.5 ± 0.5	1.9	6.4 ± 0.6	2.5 ± 0.4
Isoleucine ^{af}	8.3 ± 0.3	1.3	3.8 ± 0.9	2.8 ± 0.4
Lysine ^d	6.2 ± 0.4	1.9	1.7 ± 0.4	0.4 ± 0.7
Methionine ^a p cystine ^b				
Phenylalanine ^{ae}	12.3 ± 0.6	1.9	5.8 ± 0.4	2.7 ± 0.3
β tyrosine ^{be}	0.6			
Threonine ^d	8.8 ± 0.3	0.9	4.2 ± 0.3	5.7 ± 5.9
Valine ^{af}	1.8 ± 0.1	1.8	3.6 ± 0.5	1.0 ± 0.6
Non-essential amino acids				
Alanine ^a	1.5 ± 0.3	0.3	4.3 ± 0.4	2.2 ± 0.3
Glycine ^a	7.6 ± 0.4	0.2	11.4 ± 0.8	3.0 ± 0.5
Proline ^a	3.9 ± 0.2	0.6	-	1.8 ± 0.3
Serine ^b	3.9 ± 0.5	0.5	10.7 ± 0.9	1.7 ± 0.3
Tyrosine ^{be}	4.9 ± 0.1	0.5	2.3 ± 0.2	1.2 ± 0.3
Glutamic ^c	5.6 ± 0.3	1.8	18.1 ± 0.5	8.8 ± 1.4
Aspartic ^c	4.4 ± 0.6	0.9	12.9 ± 0.8	3.7 ± 0.8
Arginine ^d	9.7 ± 0.6	0.5	8.5 ± 1.1	3.0 ± 0.8

*Pastor et al., 2007

**Escuredo, Martín, Moncada, Fischer, & Hierro (2014).

^x Adults requirement according to FAO/WHO/UNU (1985).

^a Hydrophobic amino acids: Gly, Ala, Val, Leu, Pro, Met, Phe, Ile.

^b Hydrophilic amino acids: Ser, Thr, Cys, Tyr.

^c Acid amino acids: Glu, Asp.

^d Basic amino acids: Lys, Arg, His.

^e Aromatic amino acids: Tyr, Phe.

^f Branched chain amino acid: Ile, Leu, Val.

(-COO⁻) are in general responsible of negative ζ -potential values. On the other hand, protonation of amino groups (-NH₂) to give ammonium groups (-NH₃⁺) are behind positive potential values. Amino acids such as Asp and Glu contributed to the negative charges since their carboxyl group was ionized at a pH higher than pI (pK_a 3.65 and 4.3, respectively). Meanwhile, amino acids such as His, Lys and Arg, contributed to positive charges as their amino group was ionized at acidic pH (Nelson, Lehninger, & Cox, 2008). In general, the ζ -potential reflects the degree of electrostatic stability of colloidal particles, a property having direct influence on the functional properties of proteins (López et al., 2018b). Shevkani et al. (2014) reported that the ζ -potential values for different *A. hypochondriacus* protein cultivars varied from -40.6 to -43.7 mV in the pH range from 6.5 to 7.0 and 0.5 mg protein/mL. Navarro-Lisboa et al. (2017) found that ultrafiltration of quinoa proteins (*Chenopodium quinoa* Willd.) extracts at different pH affected (7.0 and 9.5) protein concentration, and reported that the ζ -potential values ranged from -14.2 at pH 7.0 to -26.1 mV at pH 9.5.

3.3. Amino acids profile

HPI had high contents of most essential amino acids, excepting valine (Table 2). The values are superior to those recommended by Food and Agriculture Organization of the United States/World Health Organization/United Nations University (FAO/WHO/UNU, 1985) for daily human consumption and those reported for other pseudocereals such as amaranth and quinoa (Table 2). The functional properties of a given protein are determined by its biochemical composition of amino acids. Hydrophilic amino acids are commonly grouped enlarged structures, while hydrophobic amino acids tend to form globular forms (Wang, Wu, & Liu, 2017). HPI had a large fraction of hydrophobic amino acids (45.8 g/100 g) as compared with the content of hydrophilic amino acids (19.4 g/100 g), which might prove advantageous for applications where surface active properties are desirable. On the other hand, HPI had 24.3 g/100 g of basic amino acids and 10 g/100 g of acid amino acids. Other

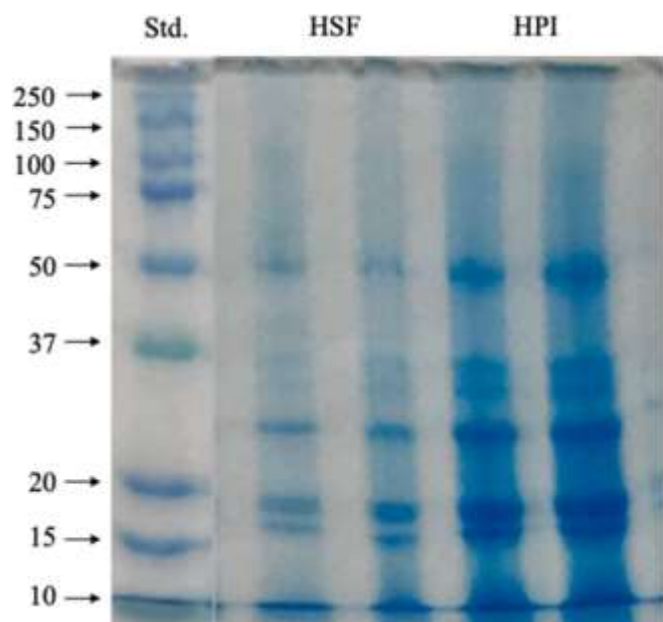


Fig. 2. SDS-PAGE of huauzontle seed flour (HSF) and huauzontle protein isolates (HPI). The two lanes for HSF and HPI represent the repetitions.

pseudocereals such as amaranth and quinoa contain 23.7 and 18.8 g/100 g and 19.1 and 24.1 g/100 g of basic and acid amino acids, respectively (López et al., 2018a).

3.4. SDS-PAGE

The SDS-PAGE profiles of huauzontle seed flour (HSF) and protein isolates (HPI) are shown in Fig. 2. All the protein bands detected at 50 kDa or lower. It is noted that the PAGE bands were more intense for HPI than for HSF, which is indicative of the effectiveness of the extraction process. The greatest relative band intensity occurred at approximately 20 kDa, followed by 28 kDa and 50 kDa. Suarez and Anón (2018) reported that for *A. hypochondriacus* the band between 20 and 22 kDa was due to globuline P. Bejarano-Luján and Netto (2010) found that the bands below 30 kDa in *A. cruentus* were due to albumin-1. Elsohaimy et al. (2015) attributed that the band around 55 kDa for *Chenopodium quinoa* was due to globulin, while those around 31–33 kDa were owed to globulin 11S (chenopodin), the major class of protein in quinoa (Valcárcel-Tamani & Lannes, 2012). The protein content of HPI was 0.9 ± 0.1 g/g, determined by Lowry's method. The exceptional nutritional value of pseudocereals (high protein content, amino acid profile with a good balance of essential amino acids) has been attributed to the influence of different environmental stresses and to the effect of the agroecological context on the nutritional properties (Reguera et al., 2018).

3.5. FTIR

FTIR analysis provides valuable insights on the secondary structure of proteins (Rodsamran & Sothornvit, 2018). The FTIR spectrum depended on the pH of the sample (Fig. 3a). The wide band at 3300–3100 cm^{-1} is linked to stretchings of $-\text{NH}$. On the other hand, the band at 2860–2930 cm^{-1} is ascribed to Amide B, and reflects symmetric and asymmetric vibrations of the groups $-\text{CH}_2$ and $-\text{CH}_3$. These functional groups are located in the aliphatic chain of the proteins (Rodsamran & Sothornvit, 2018). The regions 1600–1700, 1500–1550, and 1458 cm^{-1} are attributed to Amide I, Amide II and Amide III groups, respectively. Amide II is due to combination of N–H bending vibrations and C–N stretching vibrations (Estrada-Fernández et al., 2018). Meanwhile, the amide III is due to combination of N–H bending vibration and

C–N stretching vibration with minor contributions from CO in plane bending and CC stretching vibration (Shevkani et al., 2014). In particular, the intensity of the Amide I group was stronger than that for Amide II and Amide III. The Amide I group is composed by the superposition of several structural elements reflecting vibrations of C=O (70–85%) (Estrada-Fernández et al., 2018; Navarro-Lisboa et al., 2017), and is commonly used to estimate the secondary structure. Indeed, the secondary structure is composed by repetitive units (e.g., α -helix and β -sheet). The functional properties of proteins are strongly correlated to their secondary structure, affecting strongly properties like solubility and gelling (Biswal, Samal, Tripathy, & Misra, 2019; Palaniappan & Jakobsson, 2017; Wang et al., 2017).

Fig. 3 b illustrates the deconvolution of the Amide I band by means of Gaussian functions. Four functions sufficed to describe accurately the experimental data. The peak at about 1682–1680 cm^{-1} is attributed to β -turns, the peak at about 1655–1650 cm^{-1} to α -helix, the peak at 1630–1625 cm^{-1} to β -sheets (Navarro-Lisboa et al., 2017) and the peak at 1610–1600 cm^{-1} to side-chain structures (Achouri, Nail, & Boye, 2012), which tend to be present in vegetable proteins and have been related to an increase in oil absorption (Lin & Zayas, 1987). The variation of the secondary structure with respect to the pH is summarized in Table 3. The preponderant conformations were β -sheets and α -helix, but their relative proportion changed with pH. An increase in β -sheets was accompanied by a decrease in α -helices. The β -sheets showed a maximum in the pH range from 5.0 to 7.0, and at this pH range the α -helices exhibited a minimum. On the other hand, the α -helices presented a maximum in the pH range from 9.0 to 11.0, while the β -sheets showed lowest values. Aceituno-Medina et al. (2013) stated that decreases in β -sheets in *A. hypochondriacus* were consistent with a less structured arrangement of the protein chains.

3.6. In vitro protein digestibility

In vitro digestibility is a useful approach for assessing the nutritional quality of proteins. When the peptide bonds hydrolyze, they release hydrogen ions causing a decrease in pH, a rapid decrease is indicative of a better digestion (Aderinola et al., 2020). The results in this work revealed that HPI achieved digestibility values of 83.0 ± 0.2%. Similar results were reported for other pseudocereals like amaranth with 79.2 ± 5.8% (Chaparro Rojas et al., 2010) and quinoa with 78.4 ± 1.1% (Elsohaimy et al., 2015). It should be noted that the *in vitro* digestibility of wheat proteins is about 54.9% (Capriță, Căpriță, Crețescu, & Nicu, 2012). According to Aderinola et al. (2020) a high protein digestion could be attributed to the easy access of the protease to the peptide bonds favored by the low content of non-protein elements.

3.7. HPI solubility

Protein solubility plays an important role in the formation and some functional properties of gels and foams (Bolontrade, Scilingo, & Anón, 2013). The results in Table 3 show that the solubility of HPI depended strongly on pH. Previous studies have shown a positive correlation between the surface charge and the solubility of a protein (Karaca, Low, & Nickerson, 2011). As expected, HPI showed the lowest solubility at the isoelectric point (pH 3.6) where repulsive electrostatic forces are reduced and the hydrophobic interaction between proteins is favored (Wang et al., 2017). The solubility increased on either side of this pH, since the protein presents positive or negative charges favoring electrostatic repulsion (Shevkani et al., 2014). At pH 2.0, the HPI solubility was favored and was of 45.3 ± 0.8, due to the presence of NH_3^+ groups (see subsection 3.2). Furthermore, the lower presence of α -helix structure (36.3 ± 8%) has been related to more flexible structure (Zhu et al., 2020). The maximum solubility of HPI was recorded at pH 11 (95.3 ± 0.9%). This is consistent with the FTIR results, where the decrease of β -sheet structures with increasing pH values been associated with a less structured arrangement of the protein chains (Aceituno-Medina et al.,

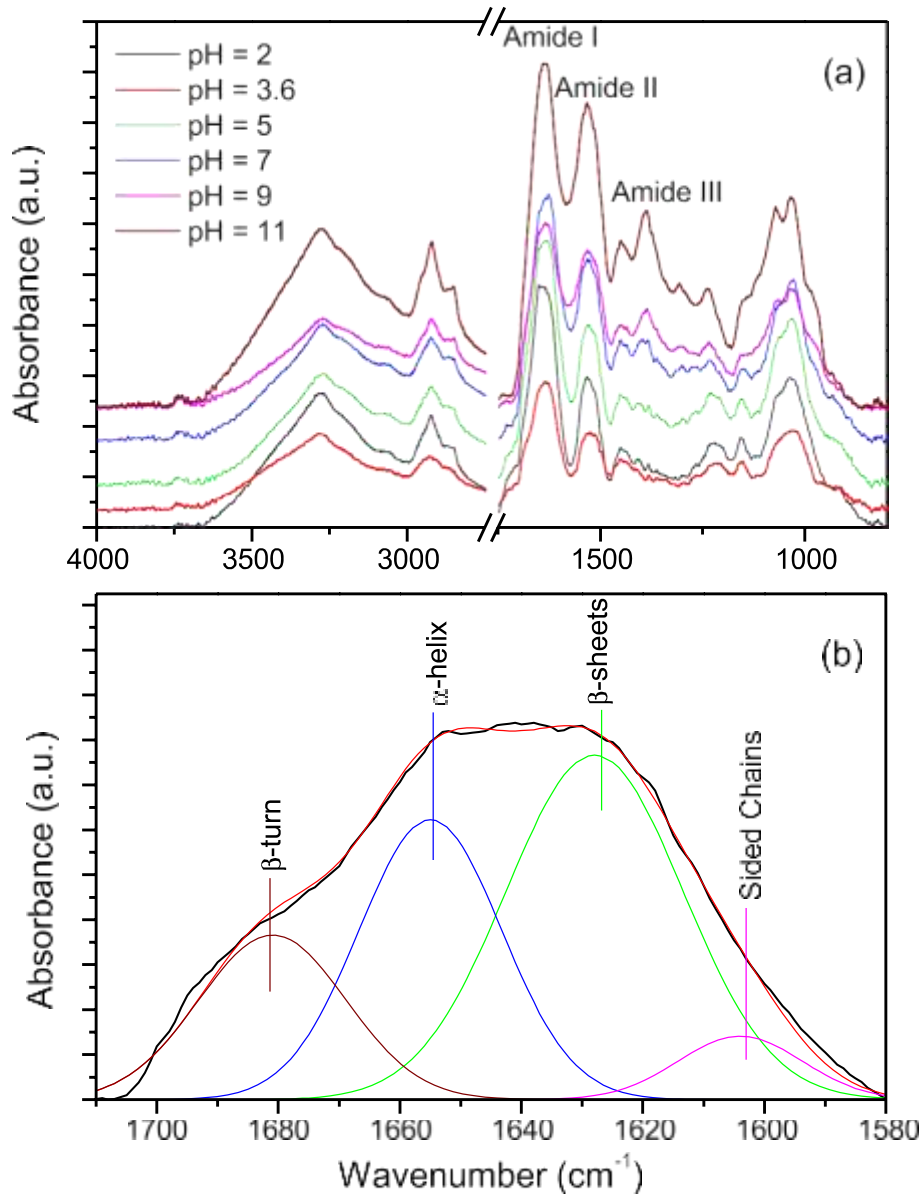


fig. 3. (a) FTIR spectra for huauzontle protein isolates at different pH values. (b) Illustration of the Gaussian deconvolution of the FTIR signal in the Amide I region.

Table 3

Secondary structure and functional properties of the huauzontle protein isolates at different pH values.

	pH	2.0	3.6	5.0	7.0	9.0	11.0
Secondary structure (%)							
Side chains		6.6 ! 0.1 ^b	7.9 ! 0.1 ^a	6.9 ! 0.1 ^{ab}	5.9 ! 0.1 ^c	4.1 ! 0.1 ^d	4.2 ! 0.1 ^d
p-sheet		43.7 ! 0.4 ^b	42.8 ! 0.5 ^b	44.3 ! 0.5 ^a	45.9 ! 0.5 ^a	37.6 ! 0.3 ^c	37.6 ! 0.3 ^c
α-helix		36.3 ! 0.3 ^c	35.2 ! 0.4 ^c	31.8 ! 0.3 ^d	30.1 ! 0.4 ^a	40.8 ! 0.4 ^b	46.8 ! 0.3 ^a
p-turn		13.4 ! 0.1 ^d	14.1 ! 0.2 ^d	16.7 ! 0.2 ^c	18.1 ! 0.1 ^a	18.4 ! 0.2 ^a	17.4 ! 0.2 ^{ab}
functional property							
Solubility (%)		45.3 ! 0.8 ^c	26.3 ! 0.4 ^e	36.4 ! 0.8 ^d	37.1 ! 1.5 ^c	58.2 ! 0.6 ^b	95.3 ! 0.9 ^a
Gelification		A	A	A	O	O	X

X: Gel was not formed; A: Aggregation; O: Gel was formed.

Table 4

Huauzontle protein isolates foaming capacity and stability.

Protein concentration (%)	FC (%)	FS (%) at different times (min)					
		0	0.5	5	10	40	60
0.1	34 ! 0.1	100	100	100	96.5	93.9	91.3
	!	0.1 ^{Aa}	0.1 ^{Aa}	0.1 ^{Aa}	0.3 ^{Bb}	1.8 ^{Cc}	0.8 ^{dC}
0.5	44.8 ! !	100	100	99.3	96.3	93.4	92.6
	4.2 ^B	!	!	!	!	!	!
1	94 ! 2.8	100	100	100	100	97.7	97.7
	!	!	!	!	!	!	!
3	206 ! !	100	100	100	100	100	100
	2.8 ^D	!	!	!	!	!	!

Values are presented as mean ! SD of triplicates (P < 0.05).

ABCD Significant differences in column (P < 0.05).

abcd Significant differences in rows (P < 0.05).

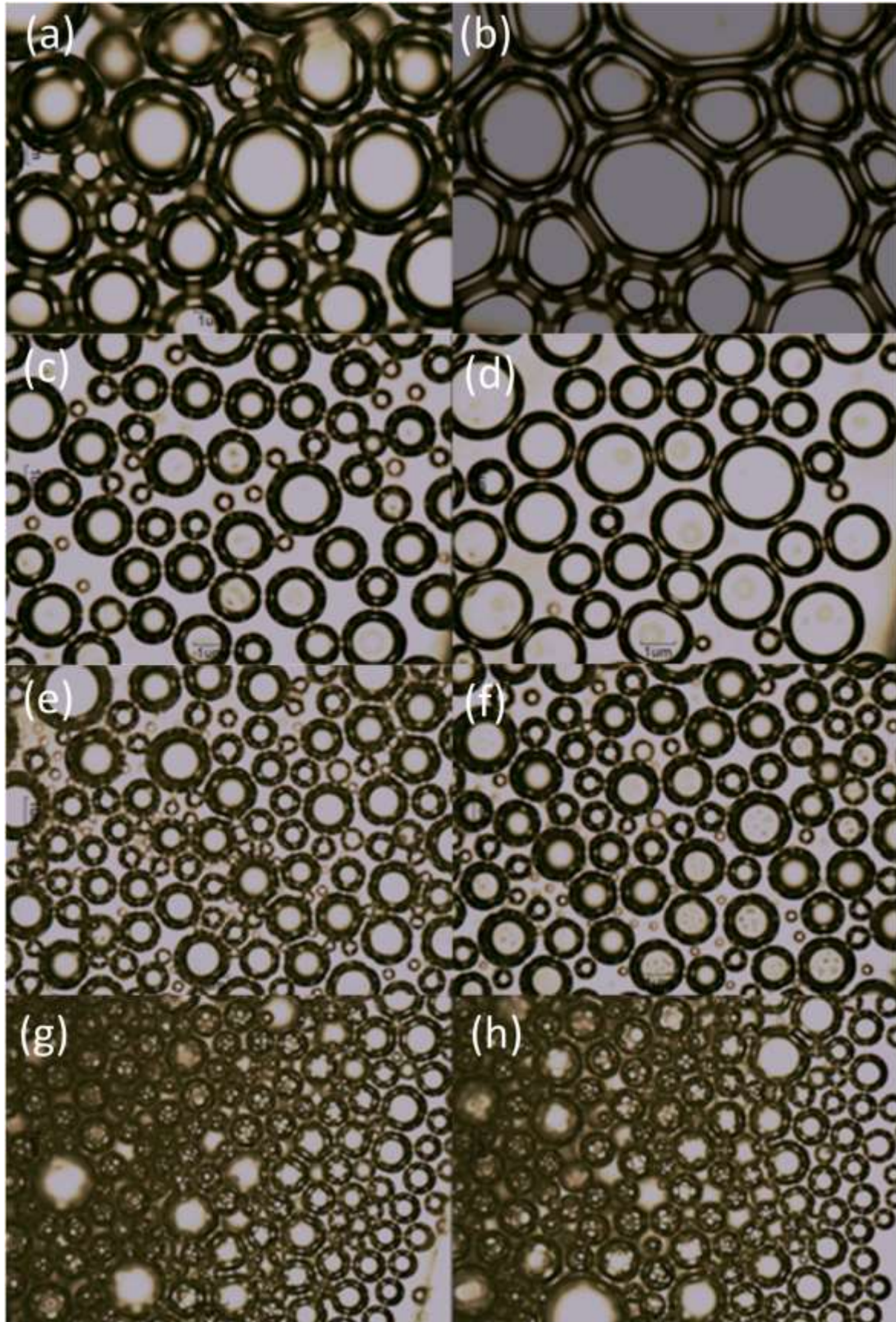


fig. 4. Morphology of air bubbles made with HPI at different concentrations ((a) 0.1, (c) 0.5, (e) 1 and (g) 3 g/100 mL)) immediately after formation (0 min) and after 60 min (b, d, f, h) at same concentration, respectively.



fig. 5. Gels formed from huauzontle protein isolates dispersions (15 g/100 mL) at different pH values.

2013). It should be mentioned that the solubility profile of HPI was similar to that of quinoa native protein at pH 1–10 which had maximum solubility at pH 10 (75.2%) (Elsouhaimy et al., 2015) and to that of amaranth native protein which had maximum solubility at pH extremes of 2 and 8 (Ventureira et al., 2012). López, Galante, Raimundo, Spelzini, and Boeris (2019) stated that quinoa, amaranth and chia proteins had higher solubility when dispersed in alkaline pH. At alkaline pH the carboxyl groups are ionized, favoring protein-solvent interactions (Dakhili, Abdolalizadeh, Hosseini, Shojaee-Aliabadi, & Mirmoghtadaie, 2019).

3.8. Foam formation and stability

The foaming capacity of proteins is associated to their ability to form liquid/air dispersions, while foam stability is related to the ability of the foam to maintain its structure for a given period of time (Tu et al., 2017; Bolontrade et al., 2013). Over time, bubbles grow in size due to destabilizations such as disproportion and fusion. With the increase of the drained liquid, the bubbles compress and begin to gather in polyhedral form (Xu et al., 2020). In this work we only reported the foaming capacity of HPI at pH 7.0 (Table 4), as solubility in faintly acidic or alkaline solutions as well as neutral ones is important for industrial applications (Tu et al., 2017). The foaming capacity of HPI at a pH of 7.0 increased exponentially as the protein concentration increased. Furthermore, no draining liquid was evident immediately after foam formation, independently of HPI concentration (0.1, 0.5, 1 and 3 g/100 g) used. All the foams formed at pH 7.0 were made up by small and spherical air bubbles. Moreover, the bubbles remained spherical even at 60 min, with only a few developing a polyhedral shape at a protein concentration of 0.1% (Fig. 4). The size of the bubbles decreased as protein concentration increased (2.8 ± 0.6 μm, 1.4 ± 0.5 μm, 1.0 ± 0.4 μm, 0.8 ± 0.2 μm), indicative that a higher foam stability was achieved (Martínez-Velasco et al., 2018). Timilsena et al. (2016) found similar results for foams made with chia seed protein isolates, where higher protein concentration strengthened the interfacial film and consequently the foam stability increased. The foaming capacity of HPI was comparable to that reported for foams made with amaranth (94–250%) at a neutral pH (Shevkani et al., 2014) and with egg albumin (205%) traditionally considered as the foaming agent by excellence (Arzeni, Pérez, & Pilosof, 2012). The foaming stability is related to the formation of strong interfaces, an effect closely linked with the protein adsorption kinetics at the air-water interface (Tang et al., 2012). The HPI adsorption

kinetics (data not shown) were concentration dependent. The higher HPI concentration, the more rapid was the initial decrease in the surface tension and the lower the surface tension value achieved after a period of time. After 1 h aging, foam stability was 100% when using 3 g/100 mL HPI, 97.7% for 1 g/100 mL HPI, 92.6% for 0.5 g/100 mL HPI and 91.3% for 0.1 g/100 mL HPI. These results are in agreement with the relatively high proportion of α-helix (30.1%) and β-turns (18.1%) structures found at pH 7.0, which are highly flexible “loop-like” structures that are capable of rapidly deploying in the interface, and thus endow a high stability to the foam (Jiang et al., 2015). The foaming capacity at pH 7.0 for quinoa protein at 3% was lower than that found in this work (Elsouhaimy et al., 2015). Long-lasting foams that normally last more than 50 min are highly used in aerated products, such as breads, biscuits, ice cream and mousses, since they maintain the desired appearance of food (Xu et al., 2020). Albumin from chicken egg white (1.5 g/mL) which is considered a reference foam stabilizer, produces foams with a half life-time of 17 min (Ti et al., 2013).

3.9. Water holding and oil binding capacities

The WHC is a very important parameter since it is related to the quality and profitability of a protein. WHC is related to the purity and conformational characteristics of a protein, so it is an important parameter for the food industry. For example, it has been reported that WHC prevents moisture loss and enhances freshness in bakery products, and increases sausages and frozen products yields (López et al., 2019). The water holding capacity of HPI was 3.3 ± 0.2 g/g at pH 7.0. WHC at pH 7 was reported as 3.9 ± 0.1 g/g for quinoa (Elsouhaimy et al., 2015) and 3.3 ± 0.1 g/g for amaranth (Shevkani et al., 2014). WHC for wheat protein isolates was found to be 4.5 ± 0.2 g/g (Ashraf, Saeed, Sayeed, & Ali, 2012), a protein that is highly used in the manufacturing of food products. WHC of 1.49–4.72 g/g has been previously proposed for viscous food applications, so that HPI can be probably used in the formulation of viscous foods such as soups and dressings (Tontul, Kasimoglu, Asik, Atbakan, & Topuz, 2018). Chen et al. (2019) determined that a lower content of α-helix structure promotes hydration and is related with high WHC values. This could be the case of HPI, where the lowest α-helix content occurred at pH 7.0. On the other hand, OBC is a property that determines the functionality of a protein and is defined as the ability to bind lipids through non-polar side chains of proteins and is mainly attributed to the hydrophobicity of proteins (López et al., 2019). The OBC of HPI was 1.6 ± 0.1 g/g, lower than the 3.6–6.4 g/g reported

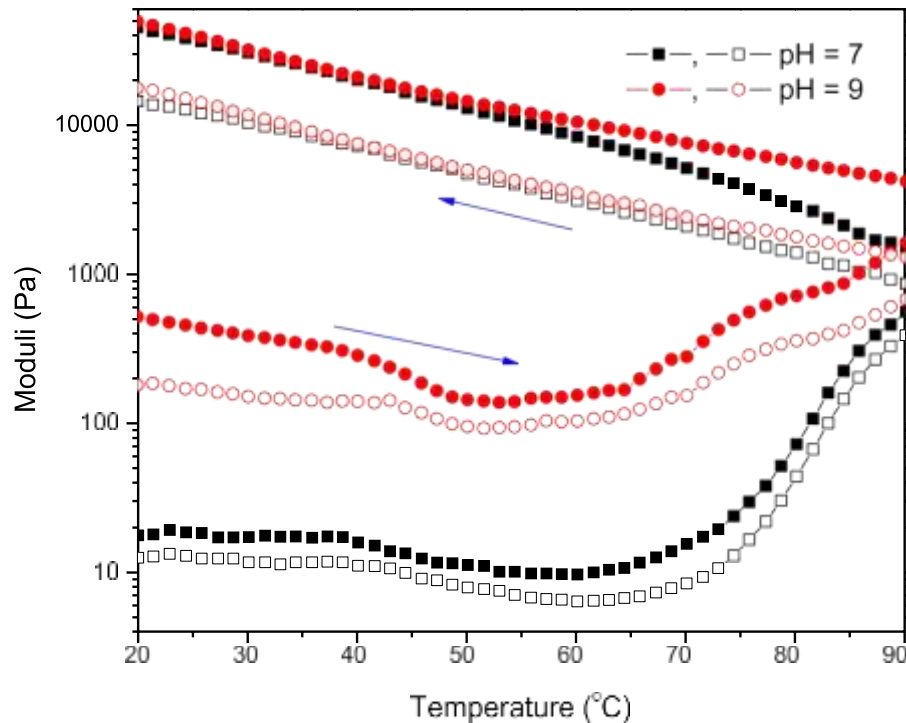


fig. 6. Storage (G') (filled symbols) and loss (G'') (empty symbols) moduli as function of temperature for huauzontle protein isolates dispersions (15 g/100 mL, pH 7.0 and 9.0). Tests were conducted at frequency 0.1 Hz and strain 1%. Arrows indicate the heating and cooling directions.

for different cultivars of amaranth protein (Shevkani et al., 2014) and similar to that reported for wheat protein 1.7 g/g (Ahmedna, Prinyawiwatkul, & Rao, 1999). Therefore, it could be used in the formulation of bakery and ground meal products.

3.10. Gelling

3.10.1. Visual inspection

The visual inspection of 15% HPI dispersions at different pH values, after being subjected to a heating-cooling process led to the results shown in Table 3. The pH had a strong effect on the formation and stability of the gels, which was manifested in progressive microstructural transitions (Fig. 5). At pH 7.0 the visual aspect of the HPI dispersion was that of a homogeneous translucent solution, where protein segments-solvent molecules interactions were favorable. There was no gel formation. This was probably due to the high HPI molecules solubility (>80%), which reduced protein-protein interactions, hampering the formation of stable networks (Gao et al., 2018). Stable, self-supporting opaque gels were formed at pH values of 9.0 and 7.0. At this pH interval, it is likely that a balance between protein-protein and protein-solvent interactions was established leading to the formation of junction zones. Mäkinen, Zannini, Koehler, and Arendt (2016) found that quinoa protein formed strong gels at pH of 8.5, while Mishyna, Martinez, Chen, Davidovich-Pinhas, and Benjamin (2019) found that honey bee brood proteins formed strong gels at pH 7.0 and 9.0. In both cases, gel strength was mediated by intensive formation of disulfide bonds at alkaline pH. Avanza et al. (2005) reported that strong gels were linked to a relatively high fraction of β -sheet structures in amaranth protein where the intermolecular hydrogen bonds between β -sheet structures acted as nodes for the formation of strong protein networks. This was certainly the case for pH 7.0, where HPI showed the highest content of β -sheet structures (Table 3). As pH was lowered to increasingly acid conditions, the protein-protein interactions predominated, and became stronger. At pH 5.0 a coarse particulate structure was formed, and as pH reached the isoelectric point (pH 3.6) of HPI, a phase separation occurred, where a particulate precipitate and a soluble

protein supernatant was observed. As pH decreased towards a value of 2.0, the reestablishment of a coarse particulate aggregation occurred. The pH lowering from 7.0 to 2.0 produced enough protein denaturation to cause interactions and the formation of a network structure, with interactions being stronger at the isoelectric point. The formation of particulate structures under acid conditions, can be explained by the fractal aggregation theory, that assumes that spherical particles of a given size under Brownian motion can aggregate when they encounter each other, forming an aggregated gel network (Lucey & Singh, 1997; Totosaus, Montejaño, Salazar, & Guerrero, 2002). This has been demonstrated in casein gels.

3.10.2. Gels rheology

The gelling process of the HPI dispersions was mimicked by subjecting them to a temperature ramp (20–90 °C), hold for 5 min at 90 °C, followed by cooling down to the initial temperature. The viscoelastic response of was monitored over the heating-cooling process. The results in Fig. 6 show that the storage (G') and loss (G'') moduli decreased as the temperature was increased from 20 to about 55 °C, followed by an increase of both moduli as temperature was further raised to 90 °C. The initial decrease in the moduli values could be due to hydrogen bond weakening occurring upon heating. G' was higher than G'' over the whole temperature heating ramp, probably due to the disulfide bonds in proteins, which form strong intercatenary bonds, leading to the formation of a strong tertiary protein structure (Dakhili et al., 2019; Mäkinen, Zannini, & Arendt, 2015). During the heating process, the protein is subjected to denaturing processes, causing oligomeric proteins to dissociate into monomers which re-aggregate and are stabilized by hydrophobic interactions (Carbonaro, Maseeli, & Nucara, 2015). The initial decrease in G' and G'' can be due to this denaturation, but the subsequent increase observed in the viscoelastic moduli, is probably due to protein aggregation due to hydrophobic interactions and disulfide bonds between cysteine residues. As a consequence, the elasticity of the protein network was greatly improved (Kim, Varankovich, Stone, & Nickerson, 2016). The behavior of G' and G'' in the cooling direction underwent a sharp increase, indicative of an active gel hardening and

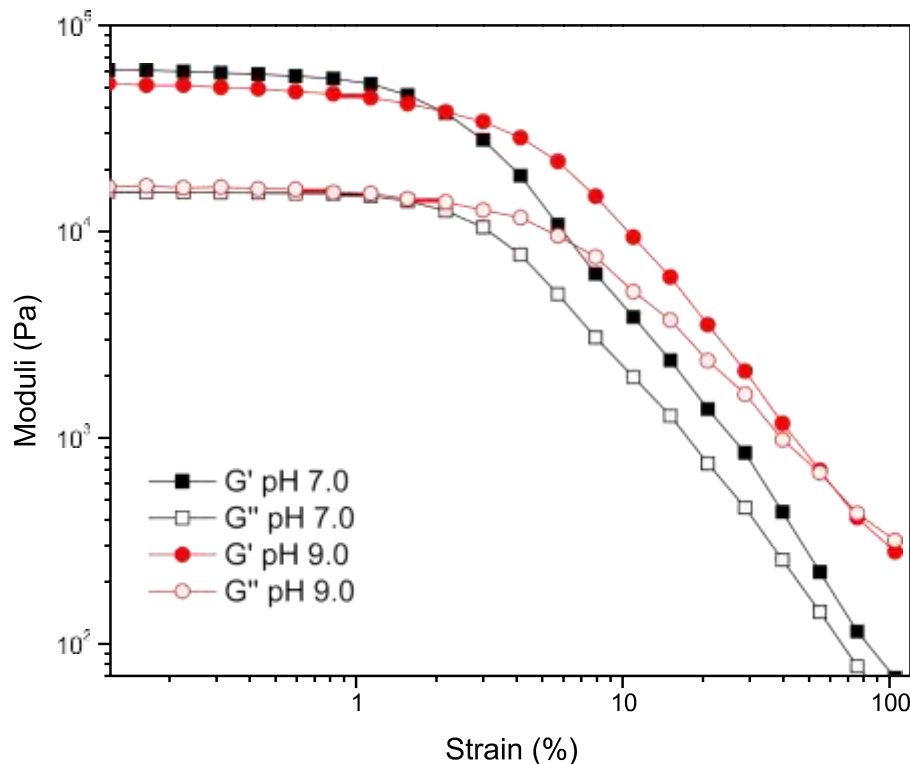


Fig. 7. Storage (G') (filled symbols) and loss (G'') (empty symbols) moduli as function of the strain for huauzontle protein isolates gels at 15 g/100 mL, pH 7.0 and 9.0.

elasticity increase. Upon cooling, formed protein-protein aggregates, undergo further association through hydrogen bonding, and the gel network becomes stronger (Kim et al., 2016). Arogundade, Mu, and Anón (2012) reported that isoelectrically precipitated sweet potato protein dispersions (10 g/100 mL) subjected to heating-cooling temperature ramp (25–95–25 °C) exhibited consistently higher G' than G'' over the whole temperature range.

The strain sweep tests for gels at pH 7.0 and pH 9.0 are shown in Fig. 7. The rheological behavior was linear for relatively small strains. In this region, $G' > G''$ indicating that the gels presented a behavior that was preponderantly elastic (Tan, Mailer, Blanchard, Agboola, & Day, 2014). As the strain value was increased, G' and G'' moduli decreased, suggesting that protein bonds broke-down (Eleya & Gunasekaran, 2004). A crossover between G' and G'' occurred at about 60% strain at pH 9.0, but not at pH 7.0. The crossover at pH 9.0 indicated the transition from a gel structure to a liquid like material ($G' < G''$). This behavior seems to be associated to the relative structure % between β -sheets and α -helices. At pH 7.0, β -sheets were present at 45.9% and α -helices at 30.1%, while at pH 9.0, β -sheets occurred at 37.7% and α -helices at 40.8%. Our results are in agreement with the observations of Su et al. (2015), who attributed more elastic gels to the presence of α -helix structures, and harder gel to the β -sheet structure.

4. Conclusions

Huauzontle had higher protein content and higher *in vitro* digestibility than that reported for quinoa and amaranth. Most of the essential amino acids, excepting valine, are present in huauzontle protein, in levels above recommended daily human consumption requirements indicated by the Food and Agriculture Organization. The main polypeptide bands were found at 20, 28 and 50 kDa. All of these indicators pinpoint the very high nutritional value of this pseudocereal. Huauzontle protein isolates functional properties and the relative percentage of secondary protein structures varied with pH. Protein

solubility was maximum at pH 11.0 and minimum at the isoelectric point (pH 3.6). Self-supporting gels were formed at pH values of 7.0 and 9.0, but at lower pH values (2.0, 3.6, and 5.0), particulate aggregates very similar to milk curds were formed. Foaming capacity increased as protein concentration increased, and foam stability was found to be 91.3% at 0.1% protein concentration, and of 100% at a 3% concentration. These results indicate that huauzontle protein can be considered a novel and versatile food ingredient for use in the development of a variety of functional foods.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

CRediT authorship contribution statement

D.I. López-Monterrubio: Formal analysis, Writing - original draft. C. Lobato-Caldereros: Formal analysis. E. Aivaré-Ramírez: Writing - original draft, Validation. E.S. Vernon-Carter: Conceptualization, Writing - review & editing.

Acknowledgements

Author (D.I.L.M.) thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT) for her Ph. D. scholarship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106043>.

References

Aceituno-Medina, M., Lopez-Rubio, A., Mendoza, S., & Lagaron, J. M. (2013). Development of novel ultrathin structures based in amaranth (*Amaranthus*

- hypochondriacus) protein isolate through electrospinning. *Food Hydrocolloids*, *3*, 289–298.
- Achouri, A., Nail, V., & Boye, J. I. (2012). Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure and functional properties. *Food Research International*, *46*, 360–369.
- Aderinola, T. A., Alashi, A. M., Nwachukwu, I. D., Fagbemi, T. N., Enujiugha, V. N., & Aluko, R. E. (2020). In vitro digestibility, structural and functional properties of Moringa oleifera seed proteins. *Food Hydrocolloids*, *101*, 105574.
- Ahmedna, M., Prinyawiwatkul, W., & Rao, R. M. (1999). Solubilized wheat protein isolate: Functional properties and potential food applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 1340–1345.
- AOAC. (2000). *Official methods of analysis*. Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Arogundade, L. A., Mu, T.-A., & Anón, M. C. (2012). Heat-induced gelation properties of isoelectric and ultrafiltered sweet potato protein isolate and their gel microstructure. *Food Research International*, *49*, 216–225.
- Arzeni, C., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. (2012). Functionality of egg white proteins as affected by high intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, *29*, 308–316.
- Ashraf, S., Saeed, S. M. G., Sayeed, S. A., & Ali, R. (2012). Impact of microwave treatment on the functionality of cereals and legumes. *International Journal of Agriculture and Biology*, *14*(3).
- Assad-Bustillos, M., Ramírez-Gilly, M., Tecante, A., & Chaires-Martínez, L. (2014). Physicochemical, functional, thermal and rheological characterization of starch from huauzontle seeds (*Chenopodium berlandieri* spp. nuttalliae). *Agrociencia*, *48*(8), 789–803.
- Avanza, M. V., Puppo, M. C., & Anón, M. C. (2005). Rheological characterization of amaranth protein gels. *Food Hydrocolloids*, *19*, 889–898.
- Barrón-Táñez, M. R., Villanueva-Verduzco, C., García-Mateos, M. R., & Colinas-León, M. T. (2009). *Valor nutricional y contenido de saponinas en germinados de huauzontle (Chenopodium nuttalliae Saff.), calabacita (Cucurbita pepo L.), canola (Brassica napus L.) y amaranto (Amaranthus leucocarpus S. Watson syn. hypoch. Revista Chapingo. Serie Horticultura*, *15* pp. 237–243).
- Batista, A. P., Portugal, C. A., Sousa, I., Crespo, J. G., & Raymundo, A. (2005). Accessing gelling ability of vegetable proteins using rheological and fluorescence techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, *36*, 135–143.
- Bejarano-Luján, D. L., & Netto, F. M. (2010). Effect of alternative processes on the yield and physicochemical characterization of protein concentrates from *Amaranthus cruentus*. *LWT-Food Science and Technology*, *43*, 736–743.
- Biswal, A. K., Samal, A. K., Tripathy, M., & Misra, P. K. (2019). Identification of the secondary structure of protein isolates from deoiled cake flour of Mahua (*Madhuca latifolia*). *Materials Today: Proceedings*, *9*, 605–614.
- Bolontrade, A. J., Scilingo, A. A., & Anón, M. C. (2013). Amaranth proteins foaming properties: Adsorption kinetics and foam formation—part 1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *105*, 319–327.
- Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., et al. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, *43*, 537–546.
- Burgos-Díaz, C., Wandersleben, T., Marqués, A. M., & Rubilar, M. (2016). Multilayer emulsions stabilized by vegetable proteins and polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *25*, 51–57.
- Carbonaro, M., Maselli, P., & Nucara, A. (2015). Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Research International*, *76*, 19–30.
- Chaires-Martínez, L. C., Vargas, M. P., del Angel, A. C., Bermudez, F. C., & Avalos, H. J. (2013). Total phenolic content and antioxidant capacity of germinated, popped, and cooked huauzontle (*Chenopodium berlandieri* spp. nuttalliae) seeds. *Cereal Chemistry*, *90*, 263–268.
- Chaparro Rojas, D. C., Pismag Portilla, R. T., Elizalde Correa, A., Vivas Quila, N. J., & Erazo Caicedo, C. A. (2010). Efecto de la germinación sobre el contenido y digestibilidad de proteína en semillas de amaranto, quinoa, soya y guandul. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *8*(1), 35–42.
- Chen, T., Chen, J., Chang, C., Chen, J., Cao, F., Zhao, J., et al. (2019). Physicochemical and functional properties of proteins extracted from three microalgal species. *Food Hydrocolloids*, *96*, 510–517.
- Căpriță, R., Căpriță, A., Crețescu, I., & Nicu, V. (2012). In vitro determination of wheat dry matter solubility and protein digestibility. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, *45*(2), 113–116.
- Dakhili, S., Abdolalizadeh, L., Hosseini, S. M., Shojaaee-Aliabadi, S., & Mirmoghtadaie, L. (2019). Quinoa protein: Composition, structure and functional properties. *Food Chemistry*, *299*, 125161.
- Delgado, M. C. O., Tironi, V. A., & Anón, M. C. (2011). Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT-Food Science and Technology*, *44*, 1752–1760.
- Eleya, M. O., Ko, S., & Gunasekaran, S. (2004). Scaling and fractal analysis of viscoelastic properties of heat-induced protein gels. *Food Hydrocolloids*, *18*, 315–323.
- Elshohaimy, S. A., Refaay, T. M., & Zaytoon, M. A. M. (2015). Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Annals of Agricultural Science*, *60*, 297–305.
- Escuredo, O., Martín, M. I. G., Moncada, G. W., Fischer, S., & Hierro, J. M. H. (2014). Amino acid profile of the quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) using near infrared spectroscopy and chemometric techniques. *Journal of Cereal Science*, *60*, 67–74.
- Estrada-Fernández, A. G., Román-Guerrero, A., Jiménez-Alvarado, R., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2018). Stabilization of oil-in-water-in-oil (O1/W/O2) Pickering double emulsions by soluble and insoluble whey protein concentrate-gum Arabic complexes used as inner and outer interfaces. *Journal of Food Engineering*, *221*, 35–44.
- Food and Agriculture Organization (FAO). (1985). *Food and agriculture organization of the United States/World health organisation/United Nations University, energy and protein requirements report of a joint FAO/WHO/UNU meeting*. Geneva: World Health Organization.
- Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G., & Añón, M. C. (2011). Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chemistry*, *126*, 878–884.
- Gao, L. L., Li, T. Q., Wang, Z. S., Sun, G. J., Qi, X. M., & Mo, H. Z. (2018). Physicochemical characteristics and functionality of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed protein. *Food Chemistry*, *240*, 980–988.
- Gong, K. J., Shi, A. M., Liu, H. Z., Liu, L., Hu, H., Adhikari, B., et al. (2016). Emulsifying properties and structure changes of spray and freeze-dried peanut protein isolate. *Journal of Food Engineering*, *170*, 33–40.
- Han, S. W., Chee, K. M., & Cho, S. J. (2015). Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. *Food Chemistry*, *172*, 766–769.
- Janssen, F., Pauly, A., Rombouts, I., Jansens, K. J., Deleu, L. J., & Delcour, J. A. (2017). Proteins of amaranth (*Amaranthus* spp.), buckwheat (*Fagopyrum spp.*), and quinoa (*Chenopodium* spp.): A food science and technology perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *16*, 39–58.
- Jiang, Z. Q., Sontag-Strohm, T., Salovaara, H., Sibakov, J., Kanerva, P., & Loponen, J. (2015). Oat protein solubility and emulsion properties improved by enzymatic deamidation. *Journal of Cereal Science*, *64*, 126–132.
- 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.
- Kim, J. H., Varankovich, N. V., Stone, A. K., & Nickerson, M. T. (2016). Nature of protein-protein interactions during the gelation of canola protein isolate networks. *Food Research International*, *89*, 408–414.
- Kistler, L., & Shapiro, B. (2011). Ancient DNA confirms a local origin of domesticated chenopod in Eastern North America. *Journal of Archaeological Science*, *38*(12), 3549–3554.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680–685.
- Lazo-Vélez, M. A., Guajardo-Flores, D., Mata-Ramírez, D., Gutiérrez-Urbe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2016). Characterization and quantitation of triterpenoid saponins in raw and sprouted *Chenopodium berlandieri* spp. (Huauzontle) grains subjected to germination with or without selenium stress conditions. *Journal of Food Science*, *81*, C19–C26.
- Lin, D., Lu, W., Kelly, A. L., Zhang, L., Zheng, B., & Miao, S. (2017). Interactions of vegetable proteins with other polymers: Structure-function relationships and applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, *68*, 130–144.
- Lin, C. S., & Zayas, J. F. (1987). Functionality of defatted corn germ proteins in a model system: Fat binding capacity and water retention. *Journal of Food Science*, *52*, 1308–1311.
- López, D. N., Galante, M., Raimundo, G., Spelzini, D., & Boeris, V. (2019). Functional properties of amaranth, quinoa and chia proteins and the biological activities of their hydrolysates. *Food Research International*, *116*, 419–429.
- López, D. N., Galante, M., Robson, M., Boeris, V., & Spelzini, D. (2018a). Amaranth, quinoa and chia protein isolates: Physicochemical and structural properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, *109*, 152–159.
- López, D. N., Ingrassia, R., Busti, P., Bonino, J., Delgado, J. F., Wagner, J., et al. (2018b). Structural characterization of protein isolates obtained from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *LWT-Food Science and Technology*, *90*, 396–402.
- Lukey, J. A., & Singh, H. (1997). formation and physical properties of acid milk gels: A review. *Food Research International*, *30*, 529–542.
- Mäkinen, O. E., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2015). Modifying the cold gelation properties of quinoa protein isolate: Influence of heat-denaturation pH in the alkaline range. *Plant Foods for Human Nutrition*, *70*, 250–256.
- Mäkinen, O. E., Zannini, E., Koehler, P., & Arendt, E. K. (2016). Heat-denaturation and aggregation of quinoa (*Chenopodium quinoa*) globulins as affected by the pH value. *Food Chemistry*, *196*, 17–24.
- Martínez-Velasco, A., Lobato-Calleros, C., Hernández-Rodríguez, B. E., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2018). High intensity ultrasound treatment of faba bean (*Vicia faba* L.) protein: Effect on surface properties, foaming ability and structural changes. *Ultrasonics Sonochemistry*, *44*, 97–105.
- Mishyna, M., Martínez, J. J. I., Chen, J., Davidovich-Pinhas, M., & Benjamin, O. (2019). Heat-induced aggregation and gelation of proteins from edible honey bee brood (*Apis mellifera*) as a function of temperature and pH. *Food Hydrocolloids*, *91*, 117–126.
- Moreno-Santander, L. A., García-Zapateiro, R., & Ortega-Toro, R. (2020). Rheological characterization of gums-gel obtained from the proteic isolate of sesame (*Sesamum indicum*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *19*, 21–31.
- Mota, C., Santos, M., Mauro, R., Samman, N., Matos, A. S., Torres, D., et al. (2016). Protein content and amino acids profile of pseudocereals. *Food Chemistry*, *193*, 55–61.
- Navarro-Lisboa, R., Herrera, C., Zúñiga, R. N., Enriente, J., Guzmán, F., Matiacevich, S., et al. (2017). Quinoa proteins (*Chenopodium quinoa* Willd.) fractionated by ultrafiltration using ceramic membranes: The role of pH on physicochemical and conformational properties. *Food and Bioprocess Technology*, *102*, 20–30.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry* (6th ed.) Omega (Chapter 3).
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., & Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, *42*, 469–479.

- Palaniappan, A., & Jakobsson, E. (2017). Fourier analysis of conservation patterns in protein secondary structure. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *15*, 265–270.
- Pastor, J. R., Alaiz Barragán, M., Megías, C., & Vioque, J. (2007). Caracterización proteica de las semillas de once especies de amaranto. *Grasas Y Aceites*, *58*(1), 49–55.
- Pereira, E., Encina-Zelada, C., Barros, L., Gonzales-Barron, U., Cadavez, V., & Ferreira, I. C. (2019). Chemical and nutritional characterization of Chenopodium quinoa Willd (quinoa) grains: A good alternative to nutritious food. *Food Chemistry*, *280*, 110–114.
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, *83*, 346–350.
- Reguera, M., Conesa, C. M., Gil-Gómez, A., Haros, C. M., Pérez-Casas, M. A., Briones-Labarca, V., et al. (2018). The impact of different agroecological conditions on the nutritional composition of quinoa seeds. *PeerJ*, *6*, e4442. <https://doi.org/10.7717/peerj.4442>.
- Rodsamran, P., & Sothornvit, R. (2018). Physicochemical and functional properties of protein concentrate from by-product of coconut processing. *Food Chemistry*, *241*, 364–371.
- Roy, F., Boye, J. I., & Simpson, B. K. (2010). Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International*, *43*, 432–442.
- Shevkani, K., Singh, N., Rana, J. C., & Kaur, A. (2014). Relationship between physicochemical and functional properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates. *International Journal of Food Science and Technology*, *49*, 541–550.
- da Silva, B. P., Anunciacao, P. C., da Silva Matyelka, J. C., Della Lucia, C. M., Martino, H. S. D., & Pinheiro-Sant'Ana, H. M. (2017). Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in different places. *Food Chemistry*, *221*, 1709–1716.
- Song, F., Tang, D. L., Wang, X. L., & Wang, T. Z. (2011). Biodegradable soy protein isolate-based materials: A review. *Biomacromolecules*, *12*, 3369–3380.
- Suarez, S. E., & Anón, M. C. (2018). Comparative behaviour of solutions and dispersions of amaranth proteins on their emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, *74*, 115–123.
- Su, T., Dong, T., Niu, F., Wang, C., Liu, T., & Tang, T. (2015). Study on the gel properties and secondary structure of soybean protein isolate/egg white composite gels. *European Food Research and Technology*, *240*, 367–378.
- Tang, L., Sun, J., Zhang, H. C., Zhang, C. S., Tu, L. N., Bi, J., et al. (2012). Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of peanut protein hydrolysate. *PLoS One*, *7*(5), e37863.
- Tan, S. H., Mailer, R. J., Blanchard, C. L., Agboola, S. O., & Day, L. (2014). Gelling properties of protein fractions and protein isolate extracted from Australian canola meal. *Food Research International*, *62*, 819–828.
- Timilsena, T. P., Adhikari, R., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2016). Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. *Food Chemistry*, *212*, 648–656.
- Tironi, V. A., & Anón, M. C. (2010). Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Research International*, *43*, 315–322.
- Tontul, I., Kasimoglu, Z., Asik, S., Atbakan, T., & Topuz, A. (2018). Functional properties of chickpea protein isolates dried by refractance window drying. *International Journal of Biological Macromolecules*, *109*, 1253–1259.
- Totosaus, A., Montejano, J. G., Salazar, J. A., & Guerrero, I. (2002). Review of physical and chemical protein-gel induction. *International Journal of Food Science and Technology*, *37*, 589–601.
- Valcárcel-Tamani, B., & Lannes, S. D. S. (2012). Applications of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and amaranth (*Amaranthus* spp.) and their influence in the nutritional value of cereal based foods. *Food and Public Health*, *2*(6), 265–275.
- Ventureira, J. L., Bolontrade, A. J., Speroni, F., David-Briand, E., Scilingo, A. A., Ropers, M. H., et al. (2012). Interfacial and emulsifying properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates under different conditions of pH. *LWT-Food Science and Technology*, *45*, 1–7.
- Wang, L., Wu, M., & Liu, H. M. (2017). Emulsifying and physicochemical properties of soy hull hemicelluloses-soy protein isolate conjugates. *Carbohydrate Polymers*, *163*, 181–190.
- Xu, T., Tang, N., Tang, J., Hu, J., Zhang, K., Nishinari, K., et al. (2020). Protein/polysaccharide intramolecular electrostatic complex as superior food-grade foaming agent. *Food Hydrocolloids*, 105474.
- Ti, L., Lakemond, C. M. M., Sagis, L. M. C., Eisner-Schadler, V., van Huis, A., & van Boekel, M. A. J. S. (2013). Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. *Food Chemistry*, *141*, 3341–3348.
- Tu, M., Zeng, M., Qin, F., He, Z., & Chen, J. (2017). Physicochemical and functional properties of protein extracts from *Torreya grandis* seeds. *Food Chemistry*, *227*, 453–460.
- Zhu, T., Fu, S., Wu, C., Qi, B., Teng, F., Wang, Z., et al. (2020). The investigation of protein flexibility of various soybean cultivars in relation to physicochemical and conformational properties. *Food Hydrocolloids*, *103*, 105709.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 0023A

Matricula: 2171800983

Proteína de huauzontle
(*Chenopodium nuttalliae*
Saff.): composición,
estructura, propiedades
fisicoquímicas y funcionales

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 29 del mes de enero del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO
DR. FERNANDO RIVERA CABRERA
DR. ALEJANDRO MARTINEZ VELASCO
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:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: DIANA ITZEL LOPEZ MONTERRUBIO

DIANA ITZEL LOPEZ MONTERRUBIO
ALUMNA

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

MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

VOCAL

DR. FERNANDO RIVERA CABRERA

VOCAL

DR. ALEJANDRO MARTINEZ VELASCO

SECRETARIA

DRA. BLANCA ELIZABETH HERNANDEZ
RODRIGUEZ