



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

**MODIFICACIÓN DE LAS PROPIEDADES
FUNCIONALES EN PROTEÍNA DE AMARANTO
MEDIANTE CAMBIOS DE pH Y ULTRASONICACIÓN**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

Presenta:

JUAN JOSÉ FIGUEROA GONZÁLEZ

Bajo la supervisión de: DRA. CONSUELO SILVIA OLIVIA LOBATO CALLEROS y

DR. E. JAIME VERNON CARTER



APROBADA



Chapingo, Estado de México, abril de 2022



Tesis realizada por **JUAN JOSÉ FIGUEROA GONZÁLEZ** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

DIRECTOR:



**DRA. CONSUELO SILVIA OLIVIA LOBATO
CALLEROS**

CO-DIRECTOR:



DR. E. JAIME VERNON CARTER

ASESOR:



DR. ELEAZAR AGUIRRE MANDUJANO

ASESOR:



DR. ALEJANDRO MARTÍNEZ VELASCO

LECTOR EXTERNO:



DRA. MAIRA RUBI SEGURA CAMPOS

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
DEDICATORIAS	vii
AGRADECIMIENTOS.....	viii
RESUMEN GENERAL.....	x
GENERAL ABSTRACT	xi
1 INTRODUCCIÓN GENERAL	12
1.1 Objetivo general.....	14
1.2 Objetivos específicos	14
1.3 Hipótesis.....	14
1.4 Organización de la tesis doctoral	14
1.5 Literatura citada.....	15
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	17
2.1. Generalidades del amaranto.....	17
2.2. Proteínas de amaranto: composición y estructura	19
2.2.1 Aminoácidos.....	19
2.2.2 Albúminas, globulinas y glutelinas.....	19
2.3 Propiedades funcionales de las proteínas de amaranto.....	21
2.3.1 Solubilidad	21
2.3.2 Propiedades emulsificantes.....	22
2.3.3 Propiedades espumantes.....	24
2.3.4 Propiedades gelificantes	26
2.3.5 Hidrofobicidad superficial	27
2.3.6 Potencial Zeta (ζ)	28

2.3.7	Propiedades de digestibilidad.....	29
2.4	Técnicas de modificación de las propiedades funcionales de las proteínas	30
2.4.1	Cambios de pH	30
2.4.2	Ultrasonido	31
2.5	Literatura citada	35
3	MODIFYING THE STRUCTURE, PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES, AND FOAMING ABILITY OF AMARANTH PROTEIN BY DUAL pH-SHIFTING AND ULTRASOUND TREATMENTS.....	43
3.1	Abstract	43
3.2	Introduction.....	44
3.3	Materials and methods.....	46
3.3.1	Materials	46
3.3.2	Obtention of the amaranth protein	46
3.3.3	Modification of the amaranth protein by pH-shifting and ultrasonication.....	47
3.3.4	Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).....	48
3.3.5	Electrophoresis (SDS-PAGE).....	48
3.3.6	Sulfhydryl groups (SH) and disulfide bonds (SS).....	49
3.3.7	Particle size.....	49
3.3.8	ζ -potential.....	49
3.3.9	Solubility.....	49
3.3.10	Foaming properties	50
3.3.11	Relative protein digestibility (RPD)	50
3.3.12	Statistical analysis	51
3.4	Results and discussion	51

3.4.1	FTIR analysis	51
3.4.2	Sulfhydryl groups (SH) and disulfide bonds (SS)	54
3.4.3	Molecular weight distribution (MW).....	55
3.4.4	Particle size	56
3.4.5	ζ-potential.....	57
3.4.6	Protein solubility	59
3.4.7	Foaming properties	60
3.5	Relative protein digestibility (RPD).....	63
3.6	Conclusions	64
3.7	References	65
4	CONCLUSIONES GENERALES	72

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición químico proximal de diferentes especies de amaranto.	19
Cuadro 2. Composición de aminoácidos presentes en el grano entero y aislado de proteína de amaranto comparado con otros cereales y los estándares de la WHO/FAO/UNU recomendados para el consumo en etapa adulta.....	20
Cuadro 3. Cambios en la estructura secundaria y digestibilidad relativa de la proteína (DRP) en arroz, avena y maíz.....	35
Cuadro 4. The relative content of the components of the secondary structure of the amaranth protein variations.....	54
Cuadro 5. Foaming capacity (FC) and foaming stability (FS) of the amaranth protein variations at different pH values.	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inflorescencia de tres especies de plantas de amaranto. a) <i>A. hypochondriacus</i> ; b) <i>A. caudatus</i> y c) <i>A. cruentus</i> (Joshi et al., 2018).	18
Figura 2. FTIR spectra for amaranth protein subjected to pH-shifting (AP_{pH2} , AP_{pH12}), ultrasonication (AP_{US}), and combined pH-shifting/ultrasonication (AP_{pH2US} , AP_{pH12US}). AP_N is the untreated native amaranth protein.	52
Figura 3. Illustration of Gaussian deconvolution of FTIR signals in the Amide I region for AP_N (a), AP_{pH2} (b), AP_{pH2US} (c), AP_{pH12} (d), AP_{pH12US} (e) and AP_{US} (f).	53
Figura 4. Exposed (SH_e) and total (SH_t) sulfhydryl groups, and disulfide bonds (SS).	55
Figura 5. SDS-PAGE of the amaranth protein variations.	56
Figura 6. Particle size.	57
Figura 7. ζ -potential (mV).	58
Figura 8. AP solubility (%). Vertical bars indicate the SD.	59
Figura 9. Morphology of the air bubbles made with AP.	62
Figura 10. Diameter of air bubbles made with AP at 0 min, aged 30 min and made at: (a) pH 5, (b) pH 7 and (c) pH9.	63

DEDICATORIAS

A **DIOS** por estar siempre aquí en mi persona, en mis estudios, en mi trabajo de laboratorio, porque gracias a Él, puedo llegar al final de esta experiencia. “y si logro volver sano y salvo a la casa de mi padre, Yavé será mi DIOS” (Gén 28, 21).

A mi esposa **María Elena**, por acompañarme en este recorrido y por siempre estar a mi lado. Pilar fundamental en mis proyectos y en mi familia. TE AMO.

A mis hijos **Angelo Gabriel** y **Carmen Aurora**, por comprender estas mudanzas a temprana edad, pero que, con el tiempo, se darán cuenta, que valió la pena compartir estos momentos con papá.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo por la oportunidad que me brindó a lo largo de estos cuatro años, siempre estaré agradecido.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, por los momentos de formación académica, mil gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de los estudios de doctorado.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), CIRNOC-Campo Experimental Zacatecas, por su apoyo para realizar esta etapa profesional.

A la Dra. Consuelo Lobato Calleros, por brindarme conocimiento, paciencia, motivación, seguridad y creatividad para el desarrollo de las diferentes actividades de este trabajo de investigación. Muchas gracias por todo.

Al Dr. Jaime Vernon Carter, por su apoyo incondicional hacia las diferentes actividades de este trabajo de investigación. Gracias por el aporte de equipo y espacio de laboratorio para la obtención de resultados de algunas variables de investigación. Infinitamente gracias.

A mis asesores el Dr. Eleazar Aguirre Mandujano y Dr. Alejandro Martínez Velasco por su aportación y orientación académica y científica hacia este trabajo de tesis doctoral.

A mis compañeros de generación Vianney, Leticia, Graciela, Bernabé y Abraham por compartir sus experiencias y conocimientos conmigo.

A mi amiga Magaly y su esposo Jesús por ser cercanos hacia mi persona, por brindarme su amistad, por sentarnos en la mesa a compartir el pan, gracias. Pronto nos veremos en Ecuador.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Juan José Figueroa González
Fecha de nacimiento: 11 de enero de 1981
Lugar de nacimiento: Río Grande, Zacatecas
CURP: FIGJ810111HZSGNN05
Profesión: Ingeniero en Industrias Alimentarias
Cédula profesional: 5638765 (Licenciatura),
9484681 (Maestría)



Desarrollo académico

Bachillerato: Preparatoria Independencia, Plantel
Río Grande, Zacatecas. 1997-1999

Licenciatura: Ingeniería en Industrias Alimentarias, Tecnológico Nacional de México, Campus Instituto Tecnológico Superior Zacatecas Norte. 2002-2007.

Maestría: Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán.

Experiencia profesional

En 2008 ingresó al INIFAP-Campo Experimental Zacatecas en el área de valor agregado de frijol (desarrollo y formulación de galletas, pan y dulces de frijol con altas propiedades funcionales), desarrollo de licores de fruta de la región (tuna, manzana, guayaba y durazno), deshidratados (nopal verdura, guayaba, durazno) y transferencia de tecnología. Coautor de la Nota de Investigación “Comportamiento productivo y valor nutricional de veza común (*Vicia sativa* L.) durante otoño-invierno en Zacatecas, México” publicado en la Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 2020. Autor del artículo “Atributo nutricional y nutraceutica de panqué y barritas a base de harina de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)” publicado en la revista *Biotechnia*, 2015. Coautor del artículo “Caracterización fisicoquímica de vinos tinto Malbec con diferente tiempo de añejamiento” publicado en la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 2012. Autor del folleto técnico: “Manual elaboración de productos agroindustriales de frijol” y “Producción de dos alimentos de la panificación preparados con harina compuesta de frijol, trigo y avena”. Coautor del libro técnico “Técnicas para la transformación de leche de cabra en zonas marginales”.

RESUMEN GENERAL

Modificación de las propiedades funcionales en proteína de amaranto mediante cambios de pH y ultrasonificación

El interés en la proteína nativa (AP_N) de amaranto (*Amaranthus* spp.) ha crecido en los últimos años, debido a su equilibrio saludable de aminoácidos esenciales, propiedades funcionales y amplia aplicación potencial en la industria alimentaria; sin embargo, su escasa solubilidad limita su aplicación en productos alimenticios. Por lo tanto, un tema de investigación en curso es explorar tecnologías de bajo costo, simples y efectivas para modificar la estructura y mejorar la funcionalidad de las proteínas, como el cambio de pH y la ultrasonificación. En este trabajo se evaluó el efecto de las condiciones de ultrasonificación (US) al 50% de amplitud por 10 min (AP_{US}), el cambio de pH a pH 2 y 12 (AP_{pH2} y AP_{pH12}), y la combinación de ambos (AP_{pH2US} y AP_{pH12US}) sobre los aspectos estructurales, propiedades fisicoquímicas y funcionales de AP_N . La AP_N se obtuvo por solubilización a pH 11 y precipitación a pH 4.5, con un rendimiento de $5.0 \pm 0.5\%$ y $83.29 \pm 1.0\%$ de contenido proteico. Las fracciones la hélice- α , lámina- β , giro- β y estructuras de espirales aleatorias de las estructuras de AP_N se vieron afectadas por el cambio de pH12 y US, pero no por el cambio de pH2. Los grupos sulfhidrilo expuestos de AP_N disminuyeron, mientras que los enlaces disulfuro aumentaron como resultado del cambio de pH solo o combinado con US. La AP_{pH12US} logró la mayor solubilidad. La capacidad de formación de espuma y la estabilidad aumentaron significativamente con todos los tratamientos, excepto con AP_{pH2} . El cambio de pH alcalino solo o combinado con US mejoró las propiedades funcionales de AP_N .

Palabras clave: proteína de amaranto, propiedades espumantes, cambio de pH, estructura secundaria, solubilidad, ultrasonificación.

Tesis de Doctorado en Ciencias Agroalimentarias, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: M.C. Juan José Figueroa González

Directora de Tesis: Dra. Consuelo Silvia Olivia Lobato Calleros

Co-Director de Tesis: Dr. E. Jaime Vernon Carter

GENERAL ABSTRACT

Modification of the functional properties in amaranth protein through pH shifting and ultrasonication

The interest in native amaranth (*Amaranthus* spp.) protein (AP_N) has grown in recent years, due to its healthy balance of essential amino acids, functional properties, and wide potential application in the food industry; however, its poor solubility limits its application in food products. Thus, an ongoing research topic is to explore low-cost, simple, and effective technologies for modifying the structure and improving the functionality of proteins, such as pH-shifting and ultrasonication. In this work, the effect of the ultrasonication conditions (US) at 50% amplitude for 10 min (AP_{US}), the change in pH at pH 2 and 12 (AP_{pH2} and AP_{pH12}), and the combination of both (AP_{pH2US} and AP_{pH12US}) on the structural aspects, physicochemical and functional properties of AP_N were investigated. AP_N was obtained by solubilization at pH 11 and precipitation at pH 4.5, with a yield of $5.0 \pm 0.5\%$ and $83.3 \pm 1.0\%$ of protein content. The fractions of α -helix, β -sheet, β -turn, and random coil structures of the AP_N were affected by pH12 shifting and US, but not by pH2 shifting. The exposed sulfhydryl groups of AP_N decreased, while the disulfide bonds increased as a result of the change in pH-shifting alone or combined with US. AP_{pH12US} exhibited the highest solubility. Foaming ability and stability increased significantly with all treatments except AP_{pH2}. Alkaline pH-shifting alone or combined with US improved the functional properties of AP_N.

Keywords: amaranth protein, foaming properties, pH-shifting, secondary structure, solubility, ultrasonication.

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El amaranto (*Amaranthum*) es una fuente no convencional de proteína, que se ha estudiado en los últimos años (López, Galante, Raimundo, Spelzini & Boeris, 2019). Además, es un pseudocereal con un alto contenido de proteína (15 a 17%) (Lado, Burini, Rinaldi, Añón & Tironi, 2015), comparado con otros cereales de alto consumo como el trigo (12.2%), arroz (8.5%), maíz (9.5%) y avena (13%) (Bright, Shewry & Kasarda, 1983). El amaranto tiene un buen equilibrio de aminoácidos (Lado et al., 2015). Por ejemplo, la lisina es un aminoácido deficiente en cereales; mientras que en el amaranto de acuerdo con Mendoça, Saldiva, Cruz & Arêas (2009), el grano entero contiene 6.2 g de lisina 100 g⁻¹ en base seca. La calidad de las proteínas depende no solo de la composición de aminoácidos sino también de la biodisponibilidad (digestibilidad). La digestibilidad de las proteínas, la lisina disponible, la utilización pura de las proteínas y el índice de eficiencia de las proteínas se han utilizado ampliamente como indicadores de la calidad nutricional de las proteínas (Salcedo-Chávez, Osuna-Castro, Guevara-Lara, Domínguez-Domínguez & Paredes-López, 2002). La proteína de amaranto tiene una mayor digestibilidad *in vivo* y biodisponibilidad en comparación con la proteína del trigo (Banerji, Ananthanarayan, & Lele, 2018). La especie y la germinación del grano de amaranto afectan la digestibilidad de la proteína. Sin embargo, la digestibilidad de proteína aumenta cuando el grano es sometido al proceso de germinación, debido a que la proteína liberada queda mayor expuesta por la ruptura del almidón (Cornejo, Novillo, Villacrés, & Rosell, 2019). De la misma manera, los granos reventados de amaranto suelen tener menor digestibilidad en comparación con los granos tostados, debido a la degradación de aminoácidos, la formación de enlaces disulfuro intramoleculares y la reacción de Maillard (Muyonga, Andabati, & Ssepuuya, 2014).

Actualmente, se requiere un uso cada vez mayor de proteínas vegetales para apoyar en la producción de alimentos ricos en proteínas para la dieta humana (López, Galante, Robson, Boeris, & Spelzini, 2018). No obstante, en general antes de utilizar cualquier proteína vegetal como ingrediente alimentario depende en gran medida de su función y propiedades nutricionales. Además de examinar la idoneidad su uso como ingrediente funcional y complemento alimenticio se requiere evaluar sus propiedades funcionales, tales como solubilidad, capacidad de retención de agua/aceite, capacidad emulsificante, habilidad espumante, la viscosidad, la gelificación, que, a su vez, dependen de muchos factores, como el pH, y el tipo y la cantidad de sal presente (Kumar, Ganesan, Selvaraj, & Rao, 2014). Las propiedades funcionales de las proteínas están directamente relacionadas con su composición y estructura, por lo que, se han desarrollado diversas técnicas para modificar la estructura de las proteínas vegetales con el fin de mejorar su solubilidad y propiedades funcionales (Jiang, Wang, & Xiong, 2018). Entre las técnicas para tales modificaciones, destacan por su bajo costo, simplicidad y efectividad los cambios de pH y la aplicación de ultrasonido (US). El tratamiento con US puede mejorar la solubilidad de las proteínas vegetales, ya que son poco solubles y, además, es capaz de mejorar su capacidad emulsionante (O'Sullivan, Murray, Flynn, & Norton, 2016). El efecto benéfico del US se atribuye a los fenómenos de la cavitación ultrasónica y la cavitación hidrodinámica, reduciendo así el tamaño de partícula y la viscosidad e incrementando la hidrofobicidad superficial y mejorando la propiedad de capacidad espumante (Ren et al., 2020).

Los tratamientos de cambio de pH ácido (1.5-3.5) y pH alcalino (10-12) en el aislado de proteína de soya mejoraron su actividad emulsionante y estabilidad emulsionante, a través de modificaciones estructurales (Jiang et al., 2009). Asimismo, la microfluidización combinada con cambios de pH disminuyeron el tamaño de las partículas de gluten de harina de maíz y aumentaron el área de superficie de las moléculas, lo que resultó en la mejora de sus propiedades emulsionantes (Ozturk & Mert, 2019). El proceso combinado de cambios de pH y ultrasonido mejoró la solubilidad, disminuyó el contenido de grupos sulfhidrilo libres y mejoró la hidrofobicidad superficial de la proteína de

guisante, los cuales correlacionaron en forma positiva con las propiedades emulsificantes, espumantes y gelificación de las proteínas de guisante (Jiang et al., 2017). Con base en lo expuesto, en este trabajo se plantearon los objetivos que a continuación se describen.

1.1 Objetivo general

Determinar los efectos individuales y combinados de los tratamientos de cambio de pH y ultrasonido sobre la estructura y las propiedades fisicoquímicas de proteína de amaranto nativa, y determinar su impacto en la solubilidad, capacidad de formación de espuma y digestibilidad relativa de esta proteína.

1.2 Objetivos específicos

- Obtener el aislado de proteína del amaranto.
- Modificar la estructura de proteína de amaranto mediante la aplicación de cambios de pH y combinada con ultrasonido.
- Determinar los cambios en la estructura secundaria de la proteína del amaranto.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas de la proteína del amaranto.
- Evaluar las propiedades tecno-funcionales de la proteína del amaranto.
- Evaluar la digestibilidad relativa de la proteína de amaranto.

1.3 Hipótesis

La aplicación de cambios de pH ácidos y alcalinos y ultrasonificación, individualmente y combinados, producirán modificaciones en la estructura secundaria de la proteína nativa de amaranto, los cuales en turno mejorarán sus propiedades tecno-funcionales y digestibilidad relativa.

1.4 Organización de la tesis doctoral

El documento consta de tres capítulos: el presente capítulo corresponde a la introducción general y la importancia del amaranto, los aislados de proteína vegetal, la modificación de proteína mediante cambios de pH y ultrasonido. El capítulo dos presenta el estado del arte acerca de las generalidades del amaranto, la estructura y las propiedades funcionales de las proteínas, las

técnicas (cambios de pH y ultrasonido) para la modificación de las propiedades funcionales de las proteínas. El capítulo tres está conformado por un artículo publicado (01/octubre/2021) en la revista *LWT, Food Science and Technology* (Impact Factor: 4.952) referente a la evaluación de la estructura, las propiedades fisicoquímicas y las propiedades funcionales, de proteína nativa de amaranto como resultado de la aplicación de cambios de pH ácidos (pH 2) y alcalinos (pH 12) y de ultrasonificación (50 % de amplitud, 10 min), individualmente o en forma combinada, haciendo énfasis en la relación entre los cambios de la estructura secundaria de la proteína de amaranto y sus propiedades fisicoquímicas; así como la relación de estas últimas con su capacidad espumante y digestibilidad relativa.

1.5 Literatura citada

- Banerji, A., Ananthanarayan, L., & Lele, S. (2018). Rheological and nutritional studies of amaranth enriched wheat chapatti (Indian flat bread). *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1), e13361. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13361>
- Bright, S. W., Shewry, P. R., & Kasarda, D. D. (1983). Improvement of protein quality in cereals. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1(1), 49-93. <https://doi.org/10.1080/07352688309382171>
- Cornejo, F., Novillo, G., Villacrés, E., & Rosell, C. M. (2019). Evaluation of the physicochemical and nutritional changes in two amaranth species (*Amaranthus quitensis* and *Amaranthus caudatus*) after germination. *Food Research International*, 121, 933-939. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.022>
- Kumar, K. S., Ganesan, K., Selvaraj, K., & Rao, P. S. (2014). Studies on the functional properties of protein concentrate of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty—An edible seaweed. *Food chemistry*, 153, 353-360. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.058>
- Jiang, J., Chen, J., & Xiong, Y. L. (2009). Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7576-7583. <https://doi.org/10.1021/jf901585n>
- Jiang, J., Wang, Q., & Xiong, Y. L. (2018). A pH shift approach to the improvement of interfacial properties of plant seed proteins. *Current Opinion in Food Science*, 19, 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.002>
- Jiang, S., Ding, J., Andrade, J., Rababah, T. M., Almajwal, A., Abulmeaty, M. M., & Feng, H. (2017). Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 835-842. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.046>
- Lado, M. B., Burini, J., Rinaldi, G., Añón, M. C., & Tironi, V. A. (2015). Effects of the dietary addition of Amaranth (*Amaranthus mantegazzianus*)

- protein isolate on antioxidant status, lipid profiles and blood pressure of rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(4), 371-379. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0516-3>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.056>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.080>
- Mendonça, S., Saldiva, P. H., Cruz, R. J., & Arêas, J. A. (2009). Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. *Food Chemistry*, 116(3), 738-742. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.021>
- Muyonga, J. H., Andabati, B., & Ssepuuya, G. (2014). Effect of heat processing on selected grain amaranth physicochemical properties. *Food science & Nutrition*, 2(1), 9-16. <https://doi.org/10.1002/fsn3.75>
- Ozturk, O. K., & Mert, B. (2019). Characterization and evaluation of emulsifying properties of high pressure microfluidized and pH shifted corn gluten meal. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 52, 179-188. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.12.006>
- O'sullivan, J., Murray, B., Flynn, C., & Norton, I. (2016). The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. *Food Hydrocolloids*, 53, 141-154. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.009>
- Ren, X., Li, C., Yang, F., Huang, Y., Huang, C., Zhang, K., & Yan, L. (2020). Comparison of hydrodynamic and ultrasonic cavitation effects on soy protein isolate functionality. *Journal of Food Engineering*, 265, 109697. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109697>
- Salcedo-Chávez, B., Osuna-Castro, J. A., Guevara-Lara, F., Domínguez-Domínguez, J., & Paredes-López, O. (2002). Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6515-6520. <https://doi.org/10.1021/jf020522t>

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades del amaranto

El amaranto (*Amaranthus* spp) es un pseudocereal que probablemente se originó en América Central y del Sur. El amaranto ha atraído un gran interés en los últimos años (Capriles et al., 2008) debido a su potencial nutricional y funcional, su breve ciclo de crecimiento, su capacidad para soportar condiciones climáticas y del suelo desfavorables (Capriles, Coelho, Guerra-Matías, & Arêas, 2008) y su resistencia a la sequía y al calor (Quiroga, Aphalo, Ventureira, Martínez, & Añón, 2011).

El amaranto es una planta herbácea anual, dicotiledónea (los cereales son monocotiledóneas), de 40 cm a más de 3 m de altura, con un tallo rígido vertical y una gran inflorescencia. Las hojas del amaranto son alternas, simples y pecioladas, con un color rojo o verdoso y son en su mayoría comestibles. Las flores son muy pequeñas de color púrpura o rojo oscuro o amarillo verdoso. Las flores se reúnen en racimos agrupados en espigas y panículas. Al tener un ovario monocular, los frutos contienen una sola semilla pequeña y de forma lenticular (1.0 a 1.5 mm de diámetro). Las semillas tienen diferentes colores y, dependiendo de la especie de la planta, pueden ser blancas, doradas, rojas y oscuras. El peso estándar de 1 000 semillas de amaranto varía de 0.6 a 1.2 g (Amicarelli & Camaggio, 2012).

La familia de *Amaranthaceae*, a la que pertenece el amaranto, incluye más de 60 especies, pero solo 3 de ellas (Ballabio et al., 2011), que son además las especies más importantes que se originaron en América son *A. caudatus* L., *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* L (Ballabio et al., 2011; Reta, Bendavis, & Jacobsen, 2015) las cuales, se cultivan para sus semillas y se utilizan para la nutrición humana (Ballabio et al., 2011) (Figura 1). De la misma manera, estas especies son cultivadas en Guatemala (*A. cruentus*), México (*A.*

hypochondriacus), Perú y otros países andinos (*A. caudatus*) (Coelho et al., 2018).



Figura 1. Inflorescencia de tres especies de plantas de amaranto. a) *A. hypochondriacus*; b) *A. caudatus* y c) *A. cruentus* (Joshi et al., 2018).

El grano de *A. cruentus*, tiene aproximadamente 14.9% de proteína, 6.98% de lípidos y 4.5% de fibra, valores más altos que otras especies de granos de amaranto (Coelho et al., 2018; Joshi et al., 2018), pero no tanto, como el pseudocereal huauzontle, que tiene 20.4% de proteína, 10.0% de grasa y 3.6% de fibra cruda (López-Monterrubio, Lobato-Calleros, Alvarez-Ramirez, & Vernon-Carter, 2020) y más alto que otros granos generales como el trigo (12.3% de proteína, 8% de grasa y 2.3% de fibra), maíz (8.9% de proteína, 3.9% de grasa y 2.0% de fibra), arroz (7.5% de proteína, 1.9% de grasa y 0.9% de fibra) y avena (16.1% de proteína, 6.4% de grasa, 1.9% de fibra) (Coelho et al., 2018). Entre las especies de *A. hypochondriacus*, el cultivar más comercial es Nutrisol (Cuadro 1).

El principal productor de amaranto en México es el estado de Puebla con 3 743 t, lo cual representa el 66 % de la producción total nacional. En segundo lugar, se encuentra Tlaxcala con 999 t y en tercer lugar el Estado de México con 648 t (SIAP, 2018).

Cuadro 1. Composición químico proximal de diferentes especies de amaranto.

Componente	Especies de <i>A. hypochondriacus</i>		
	Nutrisol	Opaca	Cristalina
Proteína (%)	15.8	16.7	16.7
Grasa (%)	6.9	6.9	5.7
Fibra cruda (%)	2.4	3.5	3.9
Cenizas (%)	3.5	3.0	2.9
Carbohidratos (%)	71.4	69.9	70.9

Fuente: Bojórquez-Velázquez et al., 2018.

2.2. Proteínas de amaranto: composición y estructura

2.2.1 Aminoácidos

Las semillas de amaranto contienen de 11 a 17% de proteína, la cual tiene una composición de aminoácidos mejor que aquella de los cereales y las legumbres (Shevkani, Shing, Rana, & Kaur, 2014). Los contenidos de los principales aminoácidos presentes de manera general en el grano entero de amaranto (*Amaranthus cruentus*) y el aislado de proteína de amaranto comparados con los requerimientos diarios de aminoácidos en adultos de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) y la Universidad de las Naciones Unidas (UNU, por sus siglas en inglés) se presentan en el Cuadro 2. Cabe mencionar, que la variedad Nutrisol es rica en aminoácidos (g de aminoácidos por 100 g⁻¹) como isoleucina (3.5), leucina (6.6), lisina (6.7), treonina (4.6) y valina (3.9). La variedad Tulyehualco contiene isoleucina (3.2), leucina (5.8), lisina (6.9), treonina (3.8) y valina (3.4). Y la variedad Gabriela contiene isoleucina (3.1), leucina (6.5), lisina (6.7), treonina (4.6) y valina (3.6) (Barba et al., 2009).

2.2.2 Albúminas, globulinas y glutelinas

Las albúminas (49-65%), globulinas (22-42%) y glutelinas (14-18%) son las principales fracciones proteicas de la semilla de amaranto. Las albúminas son proteínas globulares citoplasmáticas de bajo peso molecular que

probablemente estén involucradas en diferentes funciones biológicas. (Avanza & Añón, 2007). Las albúminas están compuestas de dos tipos: albúmina-1 y albúmina-2, las cuales tienen fracciones de polipéptidos de 18 a 34 kDa y 22 a 56 kDa, respectivamente (Tovar-Pérez, Lugo-Rodillo & Aguilera-Aguirre, 2018). Además, la estructura secundaria de las albúminas está compuesta de 4% de hélice- α , 37% de láminas- β y 55% de estructura aperiódica (Janssen et al., 2017).

Cuadro 2. Composición de aminoácidos presentes en el grano entero y aislado de proteína de amaranto comparado con otros cereales y los estándares de la WHO/FAO/UNU recomendados para el consumo en etapa adulta.

Aminoácido	Grano entero	APA	Trigo	Arroz	Maíz	*WHO/FAO/UNU	
	Mendoza et al. (2009)		Bright (1983)			mg·100 g ⁻¹ de proteína	mg·100 g ⁻¹ de proteína
	mg·100 g ⁻¹ de proteína					día	día
Isoleucina	3.7	4.6	3.61	4.7	3.62	2.0	3.0
Leucina	6.1	7.1	6.74	8.5	11.64	3.9	5.9
Lisina	6.2	5.3	1.98	4.0	3.52	3.0	4.5
Metionina	2.0	2.4	1.34	2.2	2.04	1.0	1.6
Cisteína	4.3	4.1	2.62	2.2	3.13	0.4	0.6
Fenilalanina	4.6	5.1	5.07	5.4	4.88	2.5	3.8
Treonina	3.6	3.8	2.74	3.8	3.93	1.5	2.3
Triptófano	2.2	1.8	1.12	1.2	0.94	0.4	0.6
Valina	4.4	5.1	3.68	7.0	4.89	2.6	3.9

*Cantidad presente de aminoácidos en 100 g de proteína consumida y recomendada por día en la etapa adulta.

Las principales globulinas presentes en la semilla de amaranto son la globulina tipo 11S y la globulina altamente polimerizada denominada globulina-P (Avanza & Añón, 2007) o también conocida como fracción de albúmina-2 porque probablemente contiene globulinas (Gorinstein et al., 2005; Janssen et al., 2017).

Actualmente se ha identificado con mejores propiedades funcionales de solubilidad y emulsificantes a la globulina 7S, la cual es un componente menor

de las globulinas (Quiroga et al., 2011). La estructura secundaria de las globulinas de las semillas de amaranto consiste en 31% de hélice- α , 27% de láminas- β y 42% de estructura aperiódica (Drzewiecki et al., 2003), mientras que la globulina-P, conocida también como fracción de albúmina 2 (probablemente contiene globulinas) presenta 16% de hélice- α , 41% de láminas- β y 53% de estructura aperiódica (Tandang-Silvas et al., 2012). La globulina-P y la globulina 11S tienen un alto contenido de grupos sulfhidrilo/enlaces disulfuro (Avanza, Puppo, & Añón, 2005).

Las glutelinas también presentan características moleculares similares a las de las globulinas 11S de amaranto (Avanza & Añón et al 2007). Además, las glutelinas, proteínas agregadas por almacenamiento solo son solubles en medios alcalinos o ácidos (Tovar-Pérez, Guerrero-Legarreta, Farrés-González, & Soriano-Santos, 2009) y tienen un alto contenido de leucina, treonina e histidina (Tovar-Pérez et al., 2018).

2.3 Propiedades funcionales de las proteínas de amaranto

Las proteínas juegan un papel fundamental en la estructura de los alimentos a través de procesos como la emulsificación, la capacidad de formación de espuma, la gelificación, la formación de masa (López et al., 2018), la solubilidad, la hidrofobicidad superficial, el potencial Zeta (ζ) y la digestibilidad relativa de las proteínas.

2.3.1 Solubilidad

La solubilidad de las proteínas es función del pH; generalmente es mínima en el punto isoeléctrico. Las proteínas de amaranto tienen puntos isoeléctricos en un rango de pH de 4 a 6. Además, tanto el pH como la fuerza iónica afectan la solubilidad de las proteínas de amaranto. Cuando la fuerza iónica es baja a pH 8 la proteína de amaranto presenta una solubilidad alrededor del 70%, que disminuye hasta 11% cuando la fuerza iónica es alta. De manera similar, cuando la fuerza iónica es baja a pH 2, la solubilidad de la proteína de amaranto es de alrededor del 80%, y disminuye hasta 67% cuando la fuerza iónica es alta. Aunque las proteínas de amaranto están desplegadas, la carga positiva neta de las moléculas permite fuerzas electrostáticas repulsivas que favorecen la solubilidad (Bolontrade, Scilingo, & Añón, 2013). En otro estudio,

se encontró que la solubilidad de la proteína globular de amaranto fue menor en los extremos ácido a pH 3 (59.4%), pH 4 (47.3%) y alcalino a pH 8 (63.7%) y pH 9 (66%), siendo mayor que la solubilidad de la proteína globular de la soya a pH alcalino. La mayor solubilidad en la proteína globular de amaranto en medios ácidos, se debe a que los aminoácidos de la proteína globular de amaranto poseen menor hidrofobicidad aromática que los aminoácidos de la proteína globular de soya alrededor del pI. Por lo tanto, se incrementa el número de enlaces hidrogeno formados entre proteína y el agua en su pI, disminuyendo la interacción proteína-proteína que conduce a una mayor solubilidad. Mientras que en el medio alcalino la mayor solubilidad puede ser atribuido a un aumento mayor en la carga negativa superficial (debido a la desprotonación de los grupos carboxilo) de la globulina de amaranto en comparación con la globulina de la soya (Marcone & Karkuda, 1999). La solubilidad mínima de la proteína de amaranto cerca de su punto isoelectrónico, se debe a que las interacciones proteína-proteína incrementan conforme las cargas electrostáticas netas de las moléculas son mínimas y menos moléculas de agua interaccionan con las moléculas de las proteínas (Salcedo-Chávez et al., 2002).

2.3.2 Propiedades emulsificantes

La propiedad emulsionante es una de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas que afectan las aplicaciones de la proteína en las formulaciones de alimentos. El índice de capacidad emulsificante (ICE) y el índice de estabilidad emulsificante (IEE) son indicadores de las propiedades emulsionantes. El ICE refleja la capacidad de las proteínas para adsorberse rápidamente en el interfaz agua/aceite durante la formación de la emulsión, mientras que IEE refleja la capacidad de las proteínas para mantener una emulsión estable durante un período y así, evitar la floculación y la fusión de los glóbulos de aceite (Shevkani et al., 2014). Aislado de proteína de amaranto (APA) sometido a pH 2 y pH 8 fue utilizado para la preparación de emulsiones, usando el APA total (APA_t) y únicamente la fracción soluble (APA_s). Las emulsiones formadas con APA_t sometido a pH 2, presentaron valores de $D_{3,2}$ en el tiempo inicial, el día 1 y el día 7 (0.85 ± 0.06 , 0.85 ± 0.09 y 0.87 ± 0.07 μm , respectivamente) mayores a aquellos de la emulsión formada con APA_s

(0.73 ± 0.10 , 0.74 ± 0.11 y 0.75 ± 0.09 μm para el tiempo inicial, el día 1 y el día 7, respectivamente). En contraste, los valores de $D_{3,2}$ de las emulsiones formadas con APA_t y APA_s sometidos a pH 8, no presentaron diferencias significativas entre sí. Las emulsiones APA_t y APA_s sometidas a pH 8 fueron las únicas que presentaron coalescencia y aquellas formadas con APA_t a ambos valores de pH, presentaron mayor índice de floculación (Ventureira et al., 2012). La coalescencia es el proceso por el cual dos o más gotas se fusionan durante el contacto para formar una sola gota grande (Qamar, Bhandari, & Prakash, 2019). La floculación se refiere al proceso en el que las gotas de la fase dispersa se agrupan para formar agregados, lo que hace que la emulsión sea inestable (Qamar, Bhandari, & Prakash, 2019).

Suárez & Añón (2018) informaron que emulsiones aceite-en-agua preparadas con APA (0.8%) a pH 2, mostraron un tamaño de partícula ($D_{4,3}$) de 2.3 ± 0.0 μm , el cual no varió significativamente entre el tiempo inicial y el día 1. Por su parte, emulsiones preparadas con 0.8% de APA a pH 6.3 presentaron un tamaño de partícula mayor (2.7 ± 0.0 μm) que tampoco varió con el tiempo. Cuando las emulsiones se prepararon usando una concentración de APA de 1.7 % mostraron valores de $D_{4,3}$ de 1.2 ± 0.0 y 1.1 ± 0.1 μm (pH 2) y de 0.9 ± 0.0 y 0.9 ± 0.1 μm (pH 6.3) para el tiempo inicial y el día 1, respectivamente. Una concentración de APA de 1.7% rindió emulsiones con mayores índices de floculación (18.3 y 24.8 a pH 2 y pH 6.3, respectivamente) en comparación con aquellos presentados por las emulsiones formuladas con 0.8% de APA (6.1 y 9.9 a pH 2 y pH 6.3, respectivamente). Ninguna de las emulsiones presentó coalescencia.

Emulsiones de aceite de girasol-en-agua (20:80 preparadas con aislado e hidrolizados de la proteína de amaranto a concentraciones de 1 y 2% p/v, presentaron un excelente IEE, al menos por 8 días continuos. Además, se observó una disminución del índice de floculación de 8.2 a 5.9 a la mayor concentración de proteína (Suárez & Añón, 2019).

Aislados de proteína de amaranto obtenidos por precipitación isoelectrica (PI) y por micelización (M) se utilizaron para fabricar emulsiones aceite de oliva-en-agua a valores de pH de 2, 4, 6, 8 y 10. La proteína de amaranto PI mostró una actividad emulsionante de 86% (pH 2), 36% (pH 4), 40% (pH 6), 45% (pH 8) y 50% (pH 10). Mientras que los valores de actividad emulsionante de la

proteína de amaranto M fueron de 57% (pH 2 y pH 4), 40% (pH 6), 38% (pH 8), y 60% (pH 10). La estabilidad emulsionante de la proteína PI presentó altos valores de 90% (pH 2), 88 % (pH 4), 63% (pH 6), 90% (pH 8) y 86% (pH 10). La proteína M mostró una estabilidad emulsionante más elevada a pH 2 (98%) y menor (38%) a pH 8 (Cordero-De-Los-Santos, Osuna-Castro, Borodanenko, & Paredes-López, 2005).

2.3.3 Propiedades espumantes

La capacidad espumante y la estabilidad de la espuma son factores limitantes de las propiedades funcionales de las proteínas (Elsouhaimy, Refaay, & Zaytoun, 2015). Por ejemplo, la capacidad de muchas proteínas que contienen una gran cantidad de proteínas globulares para formar y estabilizar espumas es limitada y no se puede lograr el rendimiento funcional requerido para muchas aplicaciones comerciales. La desnaturalización parcial de las proteínas globulares se puede utilizar para exponer los aminoácidos hidrofóbicos en sus superficies, lo que puede mejorar sus propiedades espumantes al aumentar el equilibrio hidrofóbico-hidrofílico (Ye et al., 2021). La espuma es un sistema de dos fases donde las burbujas de aire están separadas por una capa líquida continua. Tal sistema es inestable y requiere algún agente activo de superficie para orientarse en la interfaz aire-agua (Shevkani et al., 2014). En espumas fabricadas con surfactantes de pequeño tamaño molecular, la desorción es rápida. En contraste, las proteínas se desadsorben muy lentamente. La adsorción y orientación de las proteínas están limitadas por el esquema de distribución de grupos hidrófobos e hidrófilos en la superficie y por la rigidez estructural de la molécula. Como las moléculas proteicas son voluminosas y están plegadas, una parte considerable de la molécula permanece, después de su adsorción, en la fase dispersante y solo una pequeña porción de la misma se encuentra anclada en la superficie de las burbujas de aire. Finalmente, las espumas estabilizadas por las proteínas son más estables que aquellas preparadas con agentes tensoactivos de bajo peso molecular; por esta razón, las proteínas se usan mucho para estos fines (Damodaran et al., 2010).

La capacidad espumante (CE) está relacionada con la formación de espuma, la cual está influenciada por la adsorción del agente espumante (emulsionante) en la interfaz aire-agua y su capacidad para reducir la tensión superficial (Rodríguez, Sánchez & Rodríguez, 2008), la flexibilidad molecular y las propiedades fisicoquímicas como la hidrofobicidad, carga neta y distribución de carga, propiedades hidrodinámicas (Moure, Sineiro, Domínguez, & Parajó, 2006). Además, la CE indica el aumento porcentual en el volumen después del batido (Shevkani et al., 2014). La estabilidad de espuma (EE) es una propiedad importante de las espumas para los alimentos, debido a que la percepción de la calidad por parte del consumidor está influenciada por la apariencia de estos sistemas coloidales. Las burbujas de gas están encerradas dentro de una red de bordes denominados de Plateau. Estas últimas estructuras se forman donde se encuentran tres películas delgadas o láminas de espuma, que constituyen las paredes de la burbuja. Son las propiedades de la interfaz aire/agua de las películas delgadas las que forman o rompen una espuma. La estabilidad se ve afectada por factores como el drenaje del líquido previamente presente en la espuma, la desproporción y la coalescencia (Rodríguez, Sánchez, & Rodríguez, 2008).

Fidantsi & Doxastakis, (2001) evaluaron la CE y la EE en espumas elaboradas usando APA bajo dos métodos de extracción, por precipitación isoeléctrica (PI) y diálisis, a valores de pH de 5.5 y 7.0. La proteína obtenida por PI presentó valores de CE de 150 y 100% a pH 5.5 y pH 7, respectivamente; y un valor de EE de 40% a ambos valores de pH. El APA que se extrajo por el método de diálisis mostró incrementados valores de CE y EE. Así, los valores de CE fueron 405 y 235% a pH 5.5 y 7, respectivamente; en tanto, aquellos de EE fueron de 60 y 65% a pH 5.5 y 7, respectivamente. La alta CE de la proteína obtenida por el método de diálisis puede ser atribuida a cambios estructurales que conducen a una mayor adsorción, cambio conformacional y reordenamiento en la interfaz aire-agua. Por el contrario, los valores bajos de EE en proteína obtenida por el método de PI es baja y, por lo tanto, la película formada no es lo suficientemente cohesiva y viscoelástica. Silva-Sánchez et al. (2004) evaluaron la CE y EE de las albúminas de dos variedades mexicanas de amaranto (Tlaxcala y San José) comparadas con las albúminas

de huevo a diferentes valores de pH. La CE de la variedad Tlaxcala a pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 presentó valores de 113, 132, 200, 97, 67, 52 y 49%, respectivamente. Mientras que en la variedad San José la CE exhibió valores de 100 (pH 3), 110 (pH 4), 193 (pH 5), 120 (pH 6), 58 (pH 7), 42 (pH 8) y 45 % (pH 9). Las albúminas del huevo presentaron valores de CE de 95 (pH 3), 101 (pH 4), 148 (pH 5), 66 (pH 6), 29 (pH 7), 19 (pH 8) y 20 % (pH 9). La EE de las albúminas de APA Tlaxcala fueron de 50 (pH 3), 60 (pH 4), 73 (pH 5), 70 (pH 6), 100 (pH 7), 57 (pH 8) y 80 % (pH 9). Mientras que en la variedad San José se presentaron valores EE de 73, 86, 151, 91, 36, 26 y 25% a pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, respectivamente. La EE en las albúminas de huevo exhibieron valores de 80% (pH 3), 78% (pH 4), 75% (pH 5 y pH 9), 85% (pH 6), 77% (pH 8) y 63% (pH 8). Para el aislado de proteína del pseudocereal huauzontle se reportó una EE (después de 1 h de formada la espuma) del 100, 97.7, 92.6 y 91.3% a concentraciones de aislado de 3, 1, 0.5 y 0.1 g·100 mL⁻¹, respectivamente (López-Monterrubio et al., 2020).

2.3.4 Propiedades gelificantes

La gelificación se ha considerado como una de las características funcionales más importantes de los sistemas alimentarios, que pueden alterarse o mejorarse por diferentes tipos de enfoques (Mir, Riar, & Singh, 2019). Desde el punto de vista estructural, un gel consta de una matriz continua de material interconectado y una gran cantidad de disolvente retenido en los intersticios. Los principales tipos de geles que se dan en los sistemas alimenticios son: gel polimérico (entrecruzamientos covalentes, 5 nm), gel polimérico (microcristalitos, 10 nm) y gel particulado (2 µm). La gelificación es consecuencia de la formación de enlaces cruzados intermoleculares. Estos enlaces cruzados pueden ser covalentes, puentes salinos o regiones microcristalinas. Los enlaces covalentes se logran mediante determinados reactivos, o aumentando la temperatura. Es incrementando la temperatura como se forman algunos geles proteicos, para los que es fundamental el establecimiento de enlaces –S-S- durante el calentamiento. En el caso de polielectrólitos; es decir, polímeros cargados como las proteínas, la gelificación puede ser inducida por la formación de puentes salinos. Algunas proteínas globulares forman geles irreversibles inducidos por el calor. Las

proteínas se desnaturalizan; es decir, se despliegan y luego reaccionan entre sí. Los enlaces responsables de la formación del gel son $-S-S-$ (o posiblemente otros enlaces covalentes), puentes salinos, y/o interacciones hidrofóbicas. Para obtener geles rígidos se necesita una concentración bastante alta de proteína. Las estructuras, y por tanto las propiedades reológicas de los geles, varían mucho con el tipo de proteína, el pH, la fuerza iónica y la velocidad de calentamiento (Damodaran et al., 1985).

Se evaluó la capacidad de gelificación de fracciones globulares de amaranto (globulina 11S y la 11S + M) mediante reología oscilatoria a una temperatura de 90 °C a pH 7.6. La prueba de gelificación de la globulina 11S arrojó valores de G' que variaron de 9 000 a 19 000 Pa; mientras que la gelificación de la fracción 11S + M (proglubulina modificada) resultó en valores que variaron de 130 a 300 Pa, en ambas fracciones. G' fue mayor que G'' en todo el barrido de frecuencia. Este comportamiento y los valores reológicos están asociados con geles fuertes (Carrasco-Peña et al., 2013). Las propiedades gelificantes en el aislado de proteína de huauzontle se evaluaron usando una rampa de temperatura de 20 °C a 90 °C, se mantuvo a 90 °C por 5 min y se dejó enfriar hasta regresar a la temperatura inicial. Los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') disminuyeron a medida que la temperatura aumentó de 20 a 55 °C aproximadamente y ambos módulos aumentaron conforme se incrementaba la temperatura hasta llegar a los 90 °C. Los valores de G' fueron mayores que los valores de G'' en todo momento. En la etapa de enfriamiento, los módulos G' y G'' presentaron un aumento en sus respectivos valores y esto fue atribuido al endurecimiento del gel y a un aumento de la elasticidad (López-Monterrubio et al., 2020).

2.3.5 Hidrofobicidad superficial

La hidrofobicidad superficial (H_o) de las proteínas es una de las propiedades relacionadas con la superficie más importante. Esta propiedad permite la detección de cambios en la distribución de grupos hidrofóbicos en la superficie, causados por cambios en la estructura molecular de los aislados de proteína tras la desnaturalización (Wang et al., 2014) y es un criterio para evaluar las propiedades funcionales de las proteínas (Hettiarachchy, Griffin, &

Gnanasambandam, 1996). Además, por medio de H_o se estudian la agregación y la desnaturalización, los cuales son procesos que ocurren con frecuencia en las proteínas (López et al., 2018).

Abugoch, Martínez, & Añón (2010) informaron que la H_o de APA aislado a valores de pH 9 y 11 varió con el pH de determinación, presentando los valores más bajos a pH 4 (25 para pH de aislamiento 9 y 60 para pH de aislamiento 11). Lo anterior pudiera ser atribuido al despliegue parcial y a la disociación de proteínas. A pH 7, la H_o de los APA fue mayor (150 y 80 para pH 9 y 11 de aislamiento, respectivamente) y finalmente, a pH 9 la H_o presentó los valores más elevados: 170 (pH 9) y 270 (pH 11). Incrementos en H_o se deben a un grado mayor de despliegue de la estructura molecular. Gorinstein et al. (2001) determinaron la H_o de albúminas (fracciones Alb-1 y Alb-2) y globulinas (Glo) de la proteína de amaranto. La H_o presentó valores de 138 para la Alb-1, de 60 para la Alb-2 y de 38 para Glo. Los autores correlacionaron el aumento de H_o con el grado de desnaturalización de las proteínas, el cual fue de 55.2, 36.7 y 29% para Alb-1, Alb-2 y Glo, respectivamente. La fracción Glo posee una estructura terciaria más compacta, una superficie menos hidrófoba que las albúminas y un menor grado de desnaturalización que explica su menor valor de H_o .

2.3.6 Potencial Zeta (ζ)

El potencial ζ describe la carga que reside en la superficie o cerca de la superficie de una partícula. Las proteínas llevan carga superficial que surge principalmente de la ionización de grupos superficiales. La carga superficial es un factor importante para determinar la magnitud de la interacción entre las partículas coloidales. El potencial ζ también refleja el grado de repulsión o atracción entre los coloides cargados contiguos. Los coloides con potencial ζ positivo o negativo elevado se estabilizan eléctricamente, mientras que aquellos con valores de ζ bajos son inestables y tienden a flocular (Shevkani et al., 2014).

Se han reportado valores de potencial ζ para APA de 25 mV a pH 2 y de – 30 mV a pH 8 (Ventureira, Martínez, & Añón, 2012) y en APA (pH 6.5-7.0) de diferentes líneas/cultivares se encontró un potencial de – 40.6 mV a – 42.8

mV el valor negativo en APA puede atribuirse a la repulsión electrostática entre proteínas cargadas negativamente (Shevkani et al., 2014). Suárez & Añón (2018) informaron un potencial ζ de 31.2 mV para APA a pH 2 y de – 37.8 mV a pH 6.3. Kierulf et al. (2020) investigaron la actividad emulsificante de almidones de amaranto ricos en proteína, encontrando que los valores de potencial ζ variaron de – 4 mV a – 22.5 mV al incrementarse el contenido de proteína de 0.5 % a 2.5 %. Estos autores concluyeron, que un mayor contenido de proteína en el almidón no solo aumenta su hidrofobicidad favoreciendo la formación de emulsiones estables con tamaño de gota pequeño, sino también, otorga a las emulsiones una carga superficial neta más negativa debido a la presencia de grupos COO. Esta carga permite la estabilización de las gotas de emulsión por repulsión electrostática. Asimismo, se demostró que a medida que se aumentó el pH más lejos del punto isoeléctrico (pH 4 – 6) de las proteínas residuales en el almidón, la carga de estas proteínas residuales se volvió más negativa, confiriendo al almidón mayor carácter hidrófilo y menor capacidad emulsificante.

2.3.7 Propiedades de digestibilidad

Durante la digestión, las diferentes proteínas se hidrolizan en péptidos (pequeños) y casualmente en aminoácidos que luego pueden ser fácilmente asimilados por el cuerpo humano. Las enzimas que participan en este proceso se denominan peptidasas. Las peptidasas humanas se encuentran en el estómago, el páncreas y el intestino delgado. Después del proceso de hidrólisis, los pequeños péptidos y aminoácidos deben ser absorbidos rápida y eficazmente por los enterocitos en el intestino delgado (Joye, 2019).

La digestibilidad relativa de la proteína (DRP) promedio del amaranto es de 75.4%, lo que se ha considerado una buena digestibilidad en comparación con otras proteínas del mismo origen (Coelho et al., 2018). Se estudió la DRP de la proteína de amaranto en crudo (harina integral) y del concentrado calentado a 100 °C por 10 min. Los diferentes genotipos en crudo presentaron DRP que variaron de 73.0 a 76.2%. La DRP de los concentrados incrementó hasta 2.7% después del calentamiento, presentando valores de DRP que variaron de 76.1 a 80.3 %. El resultado de una menor digestibilidad de las proteínas en la harina

integral probablemente se deba a componentes (almidón, fibra y grasa) distintos de la proteína misma, que interfieren con la capacidad de acción de las enzimas (Bejosano & Corke, 1998). Hejazi, Orsat, Azadi, & Kubow (2016) investigaron la DRP de las proteínas de amaranto después de la germinación por 24, 36 y 48 h a temperaturas de 22, 26 y 30 °C. Aumentos en el tiempo y la temperatura de germinación causaron incrementos en la DRP, observándose valores de 81.03 a 83.58% comparados con el grano de amaranto sin germinar (76.06%). El aumento observado en la digestibilidad de las proteínas de los granos de amaranto malteado puede estar asociado a un aumento en las actividades amilolíticas del grano durante la germinación. Es probable que el aumento de la actividad de la α -amilasa rompa los gránulos del almidón en la estructura de la semilla, liberando así la proteína empaquetada incrustada (Hejazi, Orsat, Azadi, & Kubow, 2016). Cornejo, Novillo, Villacrés, & Rosell (2019) determinaron la DVP de harinas de grano nativo y harinas de grano de amaranto germinado (32 °C por 24 h, con una humedad relativa del 100 %) de las especies *A. caudatus* (de color blanco) y *A. quitensis* (de color negro). La DRP para *A. caudatus* nativo y germinado fue de 75.04 y 77.18%, respectivamente. Las DRP de la harina de grano nativo (79.42%) y de grano germinado (80.12%) de *A. quitensis* fueron mayores a aquellas de *A. quitensis*. Para la proteína de otro tipo de pseudocereales como el huauzontle se reportó 83.0% de DRP (López-Monterrubio et al., 2020) y para quinoa 78.37% (Elsohaimy et al., 2015).

2.4 Técnicas de modificación de las propiedades funcionales de las proteínas

2.4.1 Cambios de pH

Esta tecnología de modificación de la estructura se considera importante porque el proceso es simple y fácilmente adaptable y se puede utilizar para convertir proteínas poco solubles de un estado agregado en monómeros fuertemente hidrófilos y tensoactivos que son adecuados para aplicaciones comerciales. Además, la tecnología de cambio de pH se ha desarrollado sobre la base del principio de que, al exponer una molécula de proteína a un nivel de pH muy por debajo o superior del punto isoeléctrico (pI) de la proteína

creará una estructura cargada altamente positiva o negativamente. Esto se debe, respectivamente, a la protonación de grupos amino ($-\text{NH}_2$ a $-\text{NH}_3^+$) y, por el contrario, a la desprotonación de grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$ a $-\text{COO}^-$) (Jiang et al., 2018). Asimismo, el exponer a las proteínas a un pH ácido o alcalino extremo, seguido de la neutralización, puede inducir a la conformación de proteínas en un estado de glóbulos fundidos (Jiang, Xiong, Newman, & Rentfrow, 2012).

Las proteínas aisladas de cebada y modificadas mediante cambios de pH, tuvieron una solubilidad de 51.4% en condiciones ácidas (pH 3), 16.1% a pH neutro y 64.3% en condiciones alcalinas (pH 9). El tamaño de partícula solamente fue analizado a pH 7 con un valor de $1.4\ \mu\text{m}$ (Silventoinen & Sozer, 2020).

La mayor parte de trabajo realizado y enfocado en cambios de pH para la modificación de proteínas vegetales ha sido dirigido a leguminosas como la soya (Jiang et al., 2009; Jiang, Xiong, & Chen, 2010; Jiang et al., 2012; Jiang, Zhu, Liu, & Xiong, 2014) y el guisante (Jiang et al., 2017). En proteína de origen animal, destaca el aislado de proteína de lactosuero (Chen et al., 2019).

2.4.2 Ultrasonido

El ultrasonido (US) es una de las tecnologías emergentes que se desarrollaron para minimizar el procesamiento, maximizar la calidad y garantizar la seguridad de los productos alimenticios. En los últimos años, la tecnología de US se ha utilizado como una opción de procesamiento alternativa a los enfoques térmicos convencionales. Asimismo, las técnicas de US son relativamente baratas, simples y ahorran energía, por lo que se convirtieron en una tecnología emergente para investigar y modificar productos alimenticios (Madhu, Srinivas, Srinivas, & Jain, 2019). El US es un campo de investigación y desarrollo en rápido crecimiento para la industria alimentaria (Jambrak, Mason, Lelas, Herceg, & Herceg, 2008) y se puede clasificar en dos tipos según la combinación de frecuencia de energía. El primero consiste en el US de baja energía y alta frecuencia que tiene intensidades inferiores a $1\ \text{W}/\text{cm}^2$ y frecuencias superiores a 100 kHz. En tanto, el segundo tipo se denomina US de alta energía y baja frecuencia con intensidades superiores a

1 W/cm² y una frecuencia finita que varía de 20 a 500 kHz (Kehinde, Sharma, & Kaur, 2020). El US de baja intensidad o alta frecuencia se utiliza en la evaluación de ciertas características de los alimentos, como la determinación de las características de calidad de los productos alimenticios y la inspección de los sistemas de envasado, mientras que el US de alta intensidad o baja frecuencia se utiliza para alterar las características fisicoquímicas y funcionales de diferentes tipos de constituyentes alimentarios (Mir et al., 2019). Durante el tratamiento de US, las burbujas producidas se dividen en dos tipos en función de su estructura: a) no lineal, formando grandes nubes de burbujas con un tamaño de equilibrio durante los ciclos de presión y se conocen como burbujas de cavitación estable, b) las transitorias o burbujas de cavitación internas, se les denomina así, porque se colapsan y se desintegran rápidamente en burbujas más pequeñas, por lo tanto, estas pequeñas burbujas se disuelven rápidamente (Majid, Nayik, & Nanda, 2015). Cabe mencionar, que la cavitación es un fenómeno que incluye la formación, el crecimiento y el colapso rápido de burbujas. El colapso de las burbujas genera algunos efectos de cavitación extremas, altas fuerzas de corte, ondas de choque, turbulencias y radicales reactivos, que pueden inducir o acelerar cambios químicos y físicos en una sustancia. El tratamiento de US en proteínas se debe principalmente a los efectos de cavitación que inducen cambios conformacionales en las moléculas de las proteínas (Ren et al., 2020) y alteran o modifican las propiedades funcionales de las proteínas, la reducción de la viscosidad aparente, el aumento de la hidrofobicidad y mejoras en la formación y estabilidad de la emulsión (O'Sullivan et al., 2017) así como la mejora de la formación de espuma y las propiedades de gelificación (Ren et al., 2020). Además, el tratamiento con US en las proteínas afecta el comportamiento asociativo de las proteínas, interrumpiendo las fuerzas no covalentes que mantienen la estructura del agregado de proteínas y reduciendo el tamaño del agregado (O'Sullivan et al., 2017).

Nazari et al. (2018) estudiaron y encontraron que la aplicación de diferentes intensidades (18.4, 29.58 y 73.5 W/cm²) y tiempo (5, 12.5 y 20 min) de US al concentrado de proteína de mijo (CPM), mejoró su solubilidad a pH 7.0. Así, a una intensidad de 18.4 W/cm² se reportó una solubilidad de 78% (5 min),

76% (12.5 min) y 88% (20 min). Mientras que a una intensidad de 29.5 W/cm² se exhibió una solubilidad de 80, 78 y 85% para 5, 12.5 y 20 min, respectivamente. La intensidad de 73.5 W/cm² y distintos tiempos de exposición, se obtuvieron los siguientes valores de solubilidad 85% (5 min), 97% (12.5 min) y 93% (20 min), comparados con 68% del concentrado control sin tratar. La proteína nativa ($271.0 \pm 4.5\%$) disminuyó a $114.7 \pm 3.0\%$ (5 min), $193.7 \pm 4.0\%$ (12.5 min) y $148.4 \pm 6.7\%$ (20 min) con la aplicación de intensidades de (18.4 W/cm²) US y de $82.3 \pm 5.5\%$ (5 min), $127.7 \pm 2.0\%$ (12.5 min), pero aumentó a $435.4 \pm 2.5\%$ (20 min) a intensidades de 29.5 W/cm² de US. Al aumentar la intensidad (73 W/cm²) se incrementa la capacidad espumante a 346.4 ± 2.1 , 749.7 ± 2.0 y $716.0 \pm 3.5\%$ para los tiempos de 5, 12.5 y 20 min, respectivamente. La capacidad emulsionante de $27.9 \pm 1.9\%$ del control, se incrementó al aplicar intensidad de 18.4 W/cm², 29.5 W/cm² y 73 W/cm² a valores de 32.9 ± 2.6 a $39.2 \pm 1.1\%$, 32.9 ± 2.0 a $45.8 \pm 1.4\%$ y 42.1 ± 2.0 a $56.3 \pm 1.3\%$, respectivamente. También la estabilidad emulsionante del control $10.9 \pm 1.50\%$ mejoró a valores entre $20.0 \pm 0.6\%$ a $22.4 \pm 1.1\%$ (18.4 W/cm²), $32.1 \pm 2.3\%$ a $33.8 \pm 2.2\%$ (29.5 W/cm²) y $40.1 \pm 1.1\%$ a $48.1 \pm 1.0\%$ (73 W/cm²) mediante la aplicación de US. La mejora en la estabilidad emulsionante puede atribuirse a una mayor exposición de los grupos hidrofóbicos de las proteínas, bajo el efecto del tratamiento con ultrasonido y la adsorción de las proteínas a la superficie de las gotitas de aceite. Sun et al. (2019) observaron en aislado de proteína de salvado de arroz (APSA) una solubilidad baja de 5% (pH 4.0) y de 6% (pH 5.0) y aumentaba de 50 a 78% conforme se incrementaba el pH por encima de 6.0. Además, se prepararon emulsiones (aceite-en-agua) de APSA a pH 8.0, tratadas con US al 10, 20 y 30% de potencia por 20 minutos. Las diferentes emulsiones exhibieron un potencial ζ de -32, -35 y -32.5 mV para las potencias de 10, 20 y 30% de US, respectivamente. La concentración de proteína interfacial fue de 5.9 mg/m² (10 y 30%) y 6.2 mg/m² (20%). La distribución del tamaño de partícula fue mayor en APSA a las que se les aplicó una potencia de 10% (1531 nm) y 30% (1885 nm) y a 20% el tamaño de partícula fue de 1231 nm.

Mir et al. (2019) variaron el tiempo de tratamiento de US de alta intensidad a aislados de proteína de quinua (APQ), se observó que la actividad

emulsificante de esta proteína fue afectada, presentando valores de 66, 78, 100 y 94%, correspondientes a tiempos de 5, 15, 25 y 35 min de exposición, respectivamente. La estabilidad emulsificante del APQ también dependió del tiempo de aplicación del US de alta intensidad y fue de 62, 70, 94 y 92% para tiempos de 5, 15, 25 y 35 min, respectivamente. La disminución de la actividad y estabilidad emulsificante después de 35 min de exposición a US de alta intensidad se atribuyó a un extenso despliegue y agregación de las proteínas. Geles de APQ más elásticos y más fuertes se produjeron mediante su previa sonicación por 35 min.

Extractos de fracciones de proteína de cebada (EFPC) se sometieron a distintos valores de pH, presentando tamaños de partícula de 23.3, 27.5 y 18.6 μm a pH 3, pH 7 y pH 9, respectivamente. Cuando las mismas muestras (EFPC), inmediatamente después de los cambios de pH se sonicaron por 5 min presentaron valores de tamaño de partícula de 4.5, 4.9 y 4.3 μm a valores de pH de 3, 7 y 9, respectivamente. En contraste, aislado de proteína de cebada (APC) presentó un tamaño de partícula de 51.7 μm a pH 7 y de 1.4 μm al aplicar ultrasonido subsecuentemente (Silvestoinen & Sozer, 2020).

Yuanqing et al. (2020) reportaron los cambios en la estructura secundaria de proteínas de arroz y avena resultantes de la aplicación de US a una potencia de 500 W/L durante 5 y 10 min y de proteínas de maíz al aplicar US a una potencia de 800 W·L⁻¹ por 10 min los cuales se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Cambios en la estructura secundaria y digestibilidad relativa de la proteína (DRP) en arroz, avena y maíz.

Cereal	Tratamiento	Hélice- α (%)	Lámina- β (%)	Giros- β (%)	Espiral aleatorio (%)	DRP (%)
Arroz ^a	Control	29.45	16.60	20.15	34.90	88.69
	Ultrasonido	25.65	18.25	18.25	38.70	97.11
Avena ^a	Control	54.25	5.50	16.70	21.05	86.58
	Ultrasonido	49.75	9.05	17.40	20.40	95.21
Maíz ^a	Control	80.25	0.75	6.25	15.45	84.63
	Ultrasonido	80.30	0.50	5.90	15.20	91.56
Haba ^b	Control	19.3	39.3	10.2	---	68.42
	Ultrasonido	19.7	41.9	12.2	---	65.98
Frijol ^c	Control	20.8	33.1	19.4	24.2	---
	pH 2.0	17.8	40.5	18.1	23.6	---
Arroz ^d	Control	---	29.1	60.2	3.4	---
	US/pH12	---	18.1	69.5	0.6	---

Fuente: Yuanqing et al. (2020) ^a; Martínez-Velasco et al. (2018) ^b; He et al. (2020) ^c; Zhang et al. (2018) ^d.

2.5 Literatura citada

- Abugoch, L. E., Martínez, N. E., & Añón, M. C. (2010). Influence of pH on structure and function of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates. *Cereal Chemistry*, 87(5), 448-453. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-09-09-0125>
- Amicarelli, V., & Camaggio, G. (2012). *Amaranthus*: a crop to rediscover. In *Forum Ware International* (Vol. 2, pp. 4-11). Vienna: International Society of Commodity Science and Technology (IGWT).
- Avanza, M. V., & Añón, M. C. (2007). Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(4), 616-623. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2751>
- Avanza, M. V., Puppo, M. C., & Añón, M. C. (2005). Rheological characterization of amaranth protein gels. *Food Hydrocolloids*, 19(5), 889-898. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.12.002>
- Ballabio, C., Uberti, F., Di Lorenzo, C., Brandolini, A., Penas, E., & Restani, P. (2011). Biochemical and immunochemical characterization of different varieties of amaranth (*Amaranthus L. ssp.*) as a safe ingredient for

- gluten-free products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 12969-12974. <https://doi.org/10.1021/jf2041824>
- Barba, de la R. A., Fomsgaard, I. S., Laursen, B., Mortensen, A. G., Olvera-Martínez, L., Silva-Sánchez, C., & De León-Rodríguez, A. (2009). Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science*, 49(1), 117-121. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.07.012>
- Bejosano, F. P., & Corke, H. (1998). Protein quality evaluation of *Amaranthus* wholemeal flours and protein concentrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(1), 100-106. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199801\)76:1<100::AID-JSFA931>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199801)76:1<100::AID-JSFA931>3.0.CO;2-B)
- Bojórquez-Velázquez, E., Velarde-Salcedo, A. J., De León-Rodríguez, A., Jimenez-Islas, H., Pérez-Torres, J. L., Herrera-Estrella, A., & de la Rosa, A. P. B. (2018). Morphological, proximal composition, and bioactive compounds characterization of wild and cultivated amaranth (*Amaranthus* spp.) species. *Journal of Cereal Science*, 83, 222-228. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.09.004>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.039>
- Bright, S. W., Shewry, P. R., & Kasarda, D. D. (1983). Improvement of protein quality in cereals. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1(1), 49-93. <https://doi.org/10.1080/07352688309382171>
- Capriles, V. D., Coelho, K. D., Guerra-Matias, A. C., & Arêas, J. A. G. (2008). Effects of processing methods on amaranth starch digestibility and predicted glycemic index. *Journal of Food Science*, 73(7), H160-H164. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00869.x>
- Carrasco-Peña, L., Osuna-Castro, J. A., De León-Rodríguez, A., Maruyama, N., Toro-Vázquez, J. F., Morales-Rueda, J. A., & Barba de la Rosa, A. P. (2013). Modification of solubility and heat-induced gelation of amaranth 11S globulin by protein engineering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(14), 3509-3516. <https://doi.org/10.1021/jf3050999>
- Chen, X., Luo, J., Fu, L., Cai, D., Lu, X., Liang, Z., & Li, L. (2019). Structural, physicochemical, and digestibility properties of starch-soybean peptide complex subjected to heat moisture treatment. *Food Chemistry*, 297, 124957. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124957>
- Coelho, L. M., Silva, P. M., Martins, J. T., Pinheiro, A. C., & Vicente, A. A. (2018). Emerging opportunities in exploring the nutritional/functional

value of amaranth. *Food & Function*, 9(11), 5499-5512.
<https://doi.org/10.1039/C8FO01422A>

Cordero-De-Los-Santos, M. Y., Osuna-Castro, J. A., Borodanenko, A., & Paredes-López, O. (2005). Physicochemical and functional characterisation of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellisation. *Food Science and Technology International*, 11(4), 269-280.
<https://doi.org/10.1177/1082013205056491>

Cornejo, F., Novillo, G., Villacrés, E., & Rosell, C. M. (2019). Evaluation of the physicochemical and nutritional changes in two amaranth species (*Amaranthus quitensis* and *Amaranthus caudatus*) after germination. *Food Research International*, 121, 933-939.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.022>

Damodaran, S., Parkin, K. L. y Fennema O. R. (2010). Fennema química de los alimentos. Editorial Acribia. 3ª edición. Zaragoza, España. 1154 p.

Drzewiecki, J., Delgado-Licon, E., Haruenkit, R., Pawelzik, E., Martin-Belloso, O., Park, Y. S., & Gorinstein, S. (2003). Identification and differences of total proteins and their soluble fractions in some pseudocereals based on electrophoretic patterns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7798-7804. <https://doi.org/10.1021/jf030322x>

Elsahaimy, S. A., Refaay, T. M., & Zaytoun, M. A. M. (2015). Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 297-305. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2015.10.007>

Fidantsi, A., & Doxastakis, G. (2001). Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21(1-3), 119-124. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(01\)00165-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(01)00165-5)

Gorinstein, S., Delgado-Licon, E., Pawelzik, E., Permady, H. H., Weisz, M., & Trakhtenberg, S. (2001). Characterization of soluble amaranth and soybean proteins based on fluorescence, hydrophobicity, electrophoresis, amino acid analysis, circular dichroism, and differential scanning calorimetry measurements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5595-5601. <https://doi.org/10.1021/jf010627g>

Gorinstein, S., Drzewiecki, J., Delgado-Licon, E., Pawelzik, E., Ayala, A. L. M., Medina, O. J., & Trakhtenberg, S. (2005). Relationship between dicotyledone-amaranth, quinoa, *fagopyrum*, soybean and *monocots-sorghum* and rice based on protein analyses and their use as substitution of each other. *European Food Research and Technology*, 221(1-2), 69-77. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-1208-2>

He, S., Zhao, J., Cao, X., Ye, Y., Wu, Z., Yue, J., ... & Sun, H. (2020). Low pH-shifting treatment would improve functional properties of black turtle bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate with immunoreactivity

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.11.007>
- Hettiarachchy, N. S., Griffin, V. K., & Gnanasambandam, R. (1996). Preparation and Functional Properties of a Protein Isolate. *Cereal Chemistry*, 73(3), 363-367.
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Herceg, Z., & Herceg, I. L. (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 86(2), 281-287. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.10.004>
- 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(1), 39-58. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12240>
- Jiang, J., Chen, J., & Xiong, Y. L. (2009). Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7576-7583. <https://doi.org/10.1021/jf901585n>
- Jiang, S., Ding, J., Andrade, J., Rababah, T. M., Almajwal, A., Abulmeaty, M. M., & Feng, H. (2017). Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 835-842. doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.046
- Jiang, J., Wang, Q., & Xiong, Y. L. (2018). A pH shift approach to the improvement of interfacial properties of plant seed proteins. *Current Opinion in Food Science*, 19, 50-56. doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.002
- Jiang, J., Xiong, Y. L., Newman, M. C., & Rentfrow, G. K. (2012). Structure-modifying alkaline and acidic pH-shifting processes promote film formation of soy proteins. *Food Chemistry*, 132(4), 1944-1950. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.030>
- Jiang, J., Xiong, Y. L., & Chen, J. (2010). pH shifting alters solubility characteristics and thermal stability of soy protein isolate and its globulin fractions in different pH, salt concentration, and temperature conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 8035-8042. <https://doi.org/10.1021/jf101045b>
- Jiang, J., Zhu, B., Liu, Y., & Xiong, Y. L. (2014). Interfacial structural role of pH-shifting processed pea protein in the oxidative stability of oil/water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7), 1683-1691. <https://doi.org/10.1021/jf405190h>

- Joshi, D. C., Sood, S., Hosahatti, R., Kant, L., Pattanayak, A., Kumar, A., & Stetter, M. G. (2018). From zero to hero: the past, present and future of grain amaranth breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 131(9), 1807-1823. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3138-y>
- Joye, I. (2019). Protein digestibility of cereal products. *Foods*, 8(6), 199. <https://doi.org/10.3390/foods8060199>
- Kehinde, B. A., Sharma, P., & Kaur, S. (2020). Recent nano-, micro-and macrotechnological applications of ultrasonication in food-based systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-23. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1740646>
- Kierulf, A., Whaley, J., Liu, W., Enayati, M., Tan, C., Perez-Herrera, M., & Abbaspourrad, A. (2020). Protein content of amaranth and quinoa starch plays a key role in their ability as Pickering emulsifiers. *Food Chemistry*, 315, 126246. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126246>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.080>
- López-Monterrubio, D. I., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2020). Huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.) protein: Composition, structure, physicochemical and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 106043. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106043>
- Madhu, B., Srinivas, M. S., Srinivas, G., & Jain, S. K. (2019). Ultrasonic technology and its applications in quality control, processing and preservation of food: A review. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 1-11. <https://doi.org/10.9734/CJAST/2019/46909>
- Majid, I., Nayik, G. A., & Nanda, V. (2015). Ultrasonication and food technology: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 1(1), 1071022. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1071022>
- Marccone, M. F., & Kakuda, Y. (1999). A comparative study of the functional properties of amaranth and soybean globulin isolates. *Food/Nahrung*, 43(6), 368-373. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3803\(19991201\)43:6<368::AID-FOOD368>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3803(19991201)43:6<368::AID-FOOD368>3.0.CO;2-R)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.007>

- Mendonça, S., Saldiva, P. H., Cruz, R. J., & Arêas, J. A. (2009). Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. *Food Chemistry*, 116(3), 738-742. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.021>
- Mir, N. A., Riar, C. S., & Singh, S. (2019). Structural modification of quinoa seed protein isolates (QPIs) by variable time sonification for improving its physicochemical and functional characteristics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 58, 104700. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104700>
- Nazari, B., Mohammadifar, M. A., Shojaee-Aliabadi, S., Feizollahi, E., & Mirmoghadaie, L. (2018). Effect of ultrasound treatments on functional properties and structure of millet protein concentrate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 41, 382-388. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.10.002>
- O'Sullivan, J. J., Park, M., Beevers, J., Greenwood, R. W., & Norton, I. T. (2017). Applications of ultrasound for the functional modification of proteins and nanoemulsion formation: a review. *Food Hydrocolloids*, 71, 299-310. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.037>
- Qamar, S., Bhandari, B., & Prakash, S. (2019). Effect of different homogenisation methods and UHT processing on the stability of pea protein emulsion. *Food Research International*, 116, 1374-1385. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.005>
- Quiroga, A. V., Aphalo, P., Ventureira, J. L., Martínez, E. N., & Añón, M. C. (2012). Physicochemical, functional and angiotensin converting enzyme inhibitory properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) 7S globulin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(2), 397-403. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4590>
- Ren, X., Li, C., Yang, F., Huang, Y., Huang, C., Zhang, K., & Yan, L. (2020). Comparison of hydrodynamic and ultrasonic cavitation effects on soy protein isolate functionality. *Journal of Food Engineering*, 265, 109697. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109697>
- Reta, A. F., Bendevis, M. A., & Jacobsen, S. E. (2015). The potential for utilizing the seed crop amaranth (*Amaranthus* spp.) in East Africa as an alternative crop to support food security and climate change mitigation. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 201(5), 321-329. <https://doi.org/10.1111/jac.12108>
- Rodríguez, P. J. M., Sánchez, C. C., & Rodríguez, N. M. R. (2008). Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations. *Advances in Colloid and Interface Science*, 140(2), 95-113. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2007.12.007>
- Salcedo-Chávez, B., Osuna-Castro, J. A., Guevara-Lara, F., Domínguez-Domínguez, J., & Paredes-López, O. (2002). Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein isolates from amaranth

(*Amaranthus cruentus*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6515-6520. <https://doi.org/10.1021/jf020522t>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2013. Cierre producción agrícola por cultivo y por estado. [Consultado el 2/05/2020]. Disponible en línea: <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>

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(2), 541-550. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12335>

Silva-Sánchez, C., De La Rosa, A. B., León-Galván, M. F., De Lumen, B. O., de León-Rodríguez, A., & De Mejía, E. G. (2008). Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1233-1240. <https://doi.org/10.1021/jf072911z>

Silventoinen, P., & Sozer, N. (2020). Impact of ultrasound treatment and pH-shifting on physicochemical properties of protein-enriched barley fraction and barley protein isolate. *Foods*, 9(8), 1055. <https://doi.org/10.3390/foods9081055>

Suárez, S. E., & Añón, M. C. (2018). Comparative behaviour of solutions and dispersions of amaranth proteins on their emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, 74, 115-123. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.07.042>

Suárez, S., & Añón, M. C. (2019). Amaranth proteins emulsions as delivery system of Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides. *Food Hydrocolloids*, 90, 154-161. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.046>

Sun, L. C., Lin, Y. C., Liu, W. F., Qiu, X. J., Cao, K. Y., Liu, G. M., & Cao, M. J. (2019). Effect of pH shifting on conformation and gelation properties of myosin from skeletal muscle of blue round scads (*Decapterus maruadsi*). *Food Hydrocolloids*, 93, 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.026>

Tandang-Silvas, M. R., Cabanos, C. S., Peña, L. D. C., De La Rosa, A. P. B., Osuna-Castro, J. A., Utsumi, S., & Maruyama, N. (2012). Crystal structure of a major seed storage protein, 11S proglubulin, from *Amaranthus hypochondriacus*: Insight into its physico-chemical properties. *Food Chemistry*, 135(2), 819-826. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.135>

Tovar-Pérez, E. G., Guerrero-Legarreta, I., Farrés-González, A., & Soriano-Santos, J. (2009). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth

grain. *Food Chemistry*, 116(2), 437-444.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.062>

- Tovar-Pérez, E. G., Lugo-Radillo, A., & Aguilera-Aguirre, S. (2018). Amaranth grain as a potential source of biologically active peptides: a review of their identification, production, bioactivity, and characterization. *Food Reviews International*, 35(3), 221-245.
<https://doi.org/10.1080/87559129.2018.1514625>
- Ventureira, J. L., Martínez, E. N., & Añón, M. C. (2012). Effect of acid treatment on structural and foaming properties of soy amaranth protein mixtures. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 272-279.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.03.013>
- Wang, Z., Li, Y., Jiang, L., Qi, B., & Zhou, L. (2014). Relationship between secondary structure and surface hydrophobicity of soybean protein isolate subjected to heat treatment. *Journal of Chemistry*, 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/475389>
- World Health Organization, & United Nations University. (2007). *Protein and amino acid requirements in human nutrition* (935), 284 pages. Geneva, Switzerland.
- Ye, J., Deng, L., Wang, Y., McClements, D. J., Luo, S., & Liu, C. (2021). Impact of rutin on the foaming properties of soybean protein: Formation and characterization of flavonoid-protein complexes. *Food Chemistry*, 130238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130238>
- Yuanqing, H., Min, C., Lingling, S., Quancai, S., Pengyao, Y., Rui, G., & Haile, M. (2020). Ultrasound pretreatment increases the bioavailability of dietary proteins by dissociating protein structure and composition. *Food Biophysics* (7). <https://doi.org/10.1007/s11483-020-09634-y>
- Zhang, L., Pan, Z., Shen, K., Cai, X., Zheng, B., & Miao, S. (2018). Influence of ultrasound-assisted alkali treatment on the structural properties and functionalities of rice protein. *Journal of cereal science*, 79, 204-209.
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.10.013>

3 MODIFYING THE STRUCTURE, PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES, AND FOAMING ABILITY OF AMARANTH PROTEIN BY DUAL pH-SHIFTING AND ULTRASOUND TREATMENTS

3.1 Abstract

Native amaranth protein (AP_N) is a nutritional ingredient with potential applications for the structuration and functionalization of food products. However, its solubility is poor, which limits its use in the food industry. The effect of ultrasonication (US) at 50% amplitude for 10 min (AP_{US}), pH-shifting at pH 2 and 12 (AP_{pH2} and AP_{pH12}), and the combination of both (AP_{pH2US} and AP_{pH12US}) on the structural, physicochemical, and functional properties of AP_N were investigated. Alkaline pH-shifting combined with US decreased the hydrodynamic diameter of AP_N from 1167.0 ± 15.6 nm to 438.3 ± 8.4 nm (AP_{pH12US}), whereas acidic pH-shifting increased the hydrodynamic diameter up to 2490.0 ± 5.3 nm (AP_{pH2}). Fractions of α -helix, β -sheet, β -turn, and random coil structures of AP_N were affected by pH12-shifting and US, but pH2-shifting did not. Exposed sulfhydryl groups of the AP_N diminished, while disulfide bonds increased as a result of pH-shifting alone or combined with US. Zeta potential values revealed that the isoelectric point of AP_N (4.0) was increased by AP_{pH12} (4.2) and AP_{pH12US} (4.5) and decreased for AP_{US} (3.5). AP_N highest solubility was achieved by AP_{pH12US} . Foaming capacity and stability were significantly increased by all treatments, except for AP_{pH2} .

Keywords: pH-shifting, ultrasound, amaranth protein, secondary structure, foaming ability

3.2 Introduction

The interest in replacing animal proteins with vegetable proteins in food products has grown in recent years. In general, vegetal proteins have lower production costs, higher potential benefits for consumer's health, and are highly available in nature and renewable (Pojić, Mišan, & Tiwari, 2018; Fasolin et al., 2018). Amaranth (*Amaranthus spp.*) is a rediscovered “new crop”. It was under cultivation 5000-7000 years ago as a staple food by the Aztecs, but was prohibited as food by the conquering Spanish in the new world due to religious issues (Corke, Cai, & Wu, 2016). It is a pseudocereal with relatively high protein content (15-17%) (López, Galante, Robson, Boeris, & Spelzini, 2018), with a healthy balance of the essential amino acids (Lado, Burini, Rinaldi, Añón, & Tironi, 2015). It also possesses an unusual quality of starch, and high-quality oil (including squalene) (Corke et al., 2016). The consumption of amaranth and its derived products has been propelled by the demand for healthy functional foods by health-conscious consumers (Grand View Research, 2021). Amaranth seeds are increasingly used in the fabrication of cookies, cakes, sweets, pancakes, and pasta (Rastogi & Shukla, 2013). The traditional use of amaranth in Mexico and other countries is to mix popped amaranth with honey to make a kind of snack bar or snack cake (Martínez-López et al., 2020). Nowadays, it is cultivated mainly in Canada, Mexico, Central and South America, some areas of Asia, especially in China, Africa, and Australia. The main worldwide producer is China with an annual output of about 800,000 metric tons per year (Feed Navigator, 2017). The global amaranth market size was estimated at 5.88 billion USD in 2017, and forecasted (2021-2029) to have a compound annual growth rate of 11.3% (Grand View Research, 2021). It has been claimed that amaranth protein (AP_N) can help mitigate the growing demand for food in some developing countries (Constantino & García-Rojas, 2020). AP_N is composed basically of albumin, 7S globulin, 11S globulin, P globulin and glutelin (Condés et al., 2009; Bolontrade, Scilingo, & Añón, 2013). Its quality is superior to that of the proteins of other cereals such as rice, wheat, and corn (Das et al., 2021), which makes it a good candidate for use as a nutritional supplement and for providing adequate structural, functional and nutritional properties to processed foods.

The solubility of AP_N is moderate in the acidic region, and minimum around the isoelectric point (Cordero-de-Los-Santos, Osuna-Castro, Borodanenko, & Paredes-López, 2005), which limits its application in food products. The foaming capacity and stability of amaranth globulin isolate (pH 3-9) are higher than those of soybean isolate, with maximum foaming capacity occurring around its isoelectric point (Marccone & Kakuda, 1999). Emulsions prepared with amaranth protein were more stable than those made with quinoa protein (Gürbüz, Kauntola, Diaz, Jouppila, & Heinonen, 2018).

The structural characteristics of the proteins, including amino acid composition and sequence, molecular size, and configuration, determine their surface hydrophobicity, net charge, presence of sulfhydryl groups and hydroxyl groups (Ismail, Senaratne-Lenagala, Stube, & Brackenridge, 2020). pH-shifting is a simple and effective chemical modification for improving the functional properties of the proteins and endowing them with diversified applicability. For instance, the solubility of poorly soluble vegetable proteins can be greatly improved for application in diverse food products (e.g., dairy and beverages) (Jiang, Wang, & Xiong, 2018). Acidic and alkaline pH-shifting have been applied to soy protein isolate, imparting it with an improved emulsifying activity (Jiang, Chen, & Xiong, 2009). β -conglycinin (7S) of soybean exhibited increased solubility when subjected to pH12-shifting. Bolontrade et al. (2013) showed that treatment at pH 2.0 significantly improved the foaming properties of amaranth proteins. Amaranth protein interfacial films showed higher viscoelasticity and flexibility at acid pH than at alkaline pH (Bolontrade, Scilingo, & Añon, 2016). The functional properties of amaranth protein significantly improved when the extraction was carried out at a pH of 9 (Das et al., 2021).

Ultrasound (US) is a physical, low-cost, and environmentally friendly approach to improve the functionality of proteins. Cavitation, local heating, agitation, shear stress and turbulence induce chemical and physical changes in the protein molecules (Martínez-Velasco et al., 2018). Quinoa protein subjected to US exhibited a reduction in particle size, higher solubility, stronger gelling behavior, better foaming capacity and foam stability (Mir, Riar, & Singh, 2019a,

2019b). US treatment modified the secondary and tertiary structure and improved the solubility of quinoa proteins (Vera, Valenzuela, Yazdani-Pedram, Tapia, & Abugoch, 2019). US (30, 60 and 90% amplitude; 15 and 30 min) applied to AP_N significantly increases surface free sulfhydryl groups, surface hydrophobicity and solubility, and decreases particle size (Constantino & García-Rojas, 2020). Physical methods can be combined with pH-shifting to reach further conformational changes on the proteins (Jiang et al., 2017). Results in this line for amaranth protein are scarce and the knowledge is still limited. In this regard, this work aims to investigate the individual and combined effects of pH-shifting and ultrasound treatments on the structure and physicochemical properties of AP_N, and to determine their impact on solubility, foaming ability and relative digestibility.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Materials

Amaranth (*Amaranthus* spp.) grains of the Nutrisol variety were obtained from INIFAP, Valley of Mexico Experimental Field, Texcoco (19° 26' 51.12" N and 98° 53 '48.76 W, elevation above sea level of 2,261 m), State of Mexico, Mexico. Enzymes were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA). Distilled water (DW) was used in all the experiments.

3.3.2 Obtention of the amaranth protein

Amaranth flour (AF) was obtained by grinding the amaranth grains in a food processor (Nutribullet™, NB-101B, Hong King, Ltd., Guandong, China) and sieved in a No. 80 mesh screen (Manufacturers of Industrial and Commercial Supplies, St. Louis, MO, USA). AF was degreased with hexane in a Soxhlet apparatus for 5 h, dispersed in DW (1:8 w/v) and the protein was solubilized by adjusting the pH to 11.0 (2.5 N NaOH) under constant stirring for 2 h, and centrifuged (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburg, Germany) at 7168 ×g at 20 °C for 15 min. The supernatant was filtered through Whatman No. 1 filter paper and stored at 4 °C for 16 h. Afterward, supernatant was shaken (Magnetic stirrer RO15, IKA-WERKE, Staufen, Germany) at a speed of 500

rpm for 10 min and the protein was precipitated adjusting the pH to 4.0 (AP_N isoelectric point) with 2.5 N HCl under constant stirring for 2 h. The suspension was centrifuged at $7168 \times g$ at 20 °C for 15 min. The precipitate was washed three times with previously acidified DW to pH 4 with 2.5 N HCl, using a precipitate:DW ratio of 1:5 w/v, and centrifuged under the mentioned conditions. The protein precipitate was dispersed in DW (1:5 w/v ratio), neutralized at pH 7 by adding 2.5 N NaOH, and dried at 35 °C for 45 h in an air circulation oven (HCF-62, Riossa Digital, Mexico City, Mexico). The native amaranth protein isolate (AP_N) was finely ground with a mortar and stored at room temperature (22 ± 2 °C) in amber bottles. AP_N protein with a conversion factor of 5.85 (Paredes-López, 2018), fat, ash and fiber were determined (AOAC, 1995). The defatted AF presented ash, protein, fat, fiber and carbohydrate contents of 3.45 ± 0.46 , 18.08 ± 0.65 , 0.42 ± 0.05 , 3.31 ± 0.08 and $73.50 \pm 0.63\%$ w/w (dry weight basis, d.b.), respectively. The yield AP_N was $5.02 \pm 0.48\%$ w/w and had a protein content of $83.29 \pm 1.02\%$ w/w d.b.

3.3.3 Modification of the amaranth protein by pH-shifting and ultrasonication

Five AP variations were obtained by applying pH-shifting (AP_{pH2} and AP_{pH12}) (Jiang et al., 2021), sonication (AP_{US}), and pH-shifting followed by sonication (AP_{pH2US} and AP_{pH12US}). To this end, a stock dispersion of AP_N in DW (30 mg/mL, pH 7.0) was stirred at room temperature for 1 h, after pH was adjusted to 2.0 (AP_{pH2}) and 12.0 (AP_{pH12}) (pH-Meter H1221, Hanna Instruments, Mexico City, Mexico) with 2.5 N HCl and 2.5 N NaOH, respectively. The AP was kept at room temperature (22 ± 2 °C) for 1 h before adjusting pH back to 7 (2.5 N NaOH or 2.5 N HCl) and maintained under stirring for 1 h more. AP_{pH2US} and AP_{pH12US} variations were obtained from AP_{pH2} and AP_{pH12} dispersions subjected to ultrasonication with an 8 mm diameter stainless steel probe (Ultrasonic Processor, VCX 130 PB 500/750 W, Sonics and Materials, Inc., Newton, CT, USA) for 10 min at an amplitude of 50%, using an ice bath. AP_{pH2US} and AP_{pH12US} dispersions were stirred at room temperature for 1 h, then pH was adjusted to 7.0 with 0.5 N HCl and/or 0.5 N NaOH. AP_{US} variation was obtained by ultrasonication of the AP_N dispersion under the same conditions mentioned above. AP dispersions were dried at 35 °C for 45 h in

the oven, ground to a fine powder, and stored (22 ± 2 °C) in glass amber containers until required. At these drying conditions amaranth protein denaturation is deemed to be non-significant (Avanza & Añón, 2017).

3.3.4 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The FTIR spectrum (10 mg dried sample) was obtained with Frontier, Perkin Elmer equipment (CDMX, Mexico), endowed with a universal attenuated total reflectance accessory. The sample was brought into contact with the diamond crystal using a geometry adjustment (60 units of force gauge) and the absorbance at wavelengths $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ with 40 cm^{-1} of resolution (López-Monterrubio, Lobato-Calleros, Alvarez-Ramirez & Vernon-Carter, 2020). A quantitative analysis of the FTIR spectrum was carried out by numerical least-squares deconvolution using Gaussian basis functions with the OriginLab® (version 2018) package. For all cases, the baseline was removed. In particular, the Amide I region ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) was analyzed to assess the protein secondary structure, and the identification of the peaks was made according to Kong and Yu (2007). The fraction of each peak contribution was obtained as the ratio of the individual peak area and the total area of the deconvoluted peaks.

3.3.5 Electrophoresis (SDS-PAGE)

The protein profile of AP variations was conducted by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to (Laemmli, 1970). An acrylamide separating gel (12%) was used overlaid with an acrylamide concentration gel (4%). The sample runs were loaded into gel wells mounted in electrophoresis equipment (Mini-PROTEAN®, Tetra Cell, 4-Gel System, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). The gel was stained with Coomassie R-250 (Cat. 161-0400, Bio-Rad). A standard curve of distances of migration of protein MW standards in a range of 17.4 to 102.6 kDa (Cat. 161-0305, Bio-Rad®) versus the log of the molecular weight values was obtained and used for estimating the MW of the amaranth protein subunits (Shapiro, Viñuela, Maizel, 1967; Westermeier, 2016).

3.3.6 Sulfhydryl groups (SH) and disulfide bonds (SS)

The sulfhydryl groups of the AP variations were determined as follows. A DTNB solution was prepared 0.1 M sodium chloride, pH = 7). Fifteen mg of AP were dissolved in 10 mL of 8M urea and 50 μ L of DTNB solution for the determination of exposed sulfhydryl groups (SH_e). Additional 50 μ L of mercaptoethanol were added to the previous solution for the determination of total sulfhydryl groups (SH_t). The respective solutions were stirred for 1 h at room temperature and then centrifuged at $7168 \times g$ at 15 $^{\circ}C$ for 15 min. The absorbance of the supernatant was measured at 412 nm. The SH content was calculated using the DTNB extinction coefficient ($13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and the values were expressed as $\mu\text{mol/g}$ of protein. The content of disulfide bonds (SS) was obtained as $(SH_t - SH_e)/2$ (Valenzuela, Abugoch, Tapia, & Gamboa, 2013).

3.3.7 Particle size

AP dispersions (30 mg/mL) were diluted in DW (1:2 ratio v/v), then one mL aliquots were used for measuring the particle size as hydrodynamic diameter (d_h), with a Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). A refractive index of 1.335 and an absorption index value of 0.001 were used (Martínez-Velasco et al., 2018).

3.3.8 ζ -potential

The ζ -potential of AP dispersions (30 mg/mL) was measured with the Zetasizer Nano ZS90. The sample was placed in a capillary cell during the analysis. Determinations were made at different pH values (from 2 to 10) at 25 $^{\circ}C$.

3.3.9 Solubility

About 100 mg of protein sample were dispersed in 10 mL of 0.01 mol/L phosphate buffer prepared at pH 5, 7, and 9. The dispersions were centrifuged ($2800 \times g$, 20 $^{\circ}C$, 15 min), and the protein content in the supernatant was determined by the Lowry method using bovine serum albumin (Sigma Aldrich, A2153) as standard (Jiang et al., 2014). Solubility of the protein was reported as the % of protein remaining in the solution.

3.3.10 Foaming properties

Twenty mL of protein dispersions (0.1, 0.5, 1 and 3 g/L, pH 5.0, 7.0 y 9.0) were whipped at high speed (10,000 rpm, 1 min) with an Ultra-Turrax® homogenizer (T50 basic IKA Works, Inc., Wilmington, USA) to incorporate air, and transferred to a 50 mL cylinder. The total foam 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, while foam stability was expressed as foam expansion at 60 min after whipping. The foams were visualized with an Olympus BX45 optical microscope (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) at a magnification of 4×. Images were captured with an AxioCam ERc 5 s camera (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Germany). The mean length number diameter ($d_{1.0}$) of the foam bubbles was estimated using the ImageJ-Fiji-win32 2012 package (Fiji: an open-source platform for biological-image analysis).

3.3.11 Relative protein digestibility (RPD)

The RPD was determined as reported by Hsu, Vavak, Satterlee, and Miller (1977). Pancreatic trypsin (Type IX, 15,310 units/mg protein), bovine pancreatic chymotrypsin (Type II, 48 units/g solid), porcine intestinal peptidase (P-7500, 115 units/mg solid) and bacterial protease (Type XIV, 4.4 units/mg solid) were used. Sample (about 64 mg) was added to 10 mL of DW and ground with the help of the Ultra-Turrax homogenizer operated at 6,000 rpm for 90 s. An ice bath was used to avoid temperature increase. Subsequently, the pH of the obtained mixture was adjusted to 8.0 with 1 N NaOH. About 1 mL of enzyme aqueous solution (1.58 mg of trypsin, 3.65 mg of chymotrypsin and 0.45 mg of peptidase) was added to the protein sample and digestion was allowed to proceed for 10 min at 37 °C. After the addition of 168 mL (1.48 mg) of bacterial protease solution, the digestion was continued for 9 min at 55 °C. The pH was registered after a further 1 min and used to estimate the RPD according to the following equation:

$$RPD (\%) = 234.84 - 22.56pH$$

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

3.3.12 Statistical analysis

All determinations were done in triplicate from three independent experiments. Results were reported as mean values $\pm$ standard deviation. Data were subjected to ANOVA and when was appropriate to means comparison analysis of Tukey. Significance was established at $p < 0.05$ (SAS version 9.4, SAS Institute Inc., NC, USA).

3.4 Results and discussion

3.4.1 FTIR analysis

The FTIR analysis of the AP variations is shown in Figure 2. The peak at 3285 cm^{-1} is linked to -NH stretching of Amide A (Carbonaro & Nucara, 2010; Mir, Riar, & Singh, 2020), free hydroxyl groups and the interactions of protein molecules with water molecules (Mir et al., 2020). The peak at 2933 cm^{-1} is attributed to Amide B, reflecting symmetric and asymmetric vibrations of the $-\text{CH}_2$ and $-\text{CH}_3$ groups (López-Monterrubio et al., 2020). The two peaks at 1232 and 1065 cm^{-1} represent the vibration of $\text{C}-\text{C}$ and $\text{C}-\text{O}$ bonds of starch (Lin, Bean, Tilley, Peiris, & Brabec, 2021). The Amide I band ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) is mainly due to the $\text{C}=\text{O}$ stretching of the peptide group and is sensitive to different conformations of the secondary structure of the protein (Shevkani, Singh, Rana, & Kaur, 2014).

In general, β -sheet followed by the α -helix, represents the highest proportion of the secondary structure of AP (Figure 3). Alkaline pH-shifting, and ultrasound affected the distribution of α -helix, β -sheet, β -turn, and random coil in AP_N (Table 4). In contrast, acid pH-shifting did not alter significantly the secondary structure of the AP_N . It has been reported that alkaline pH-shifting has a greater ability to cause protein structural changes than acid pH-shifting (Jiang et al., 2009). The β -sheet and α -helix proportions of AP_N decreased, while random coil increased significantly with alkaline pH 12-shifting, and pH2 or pH12-shifting/US treatments. US alone increased the β -sheet and random coil, but decreased the α -helix proportions. The increase in the random coil has been attributed to the unfolding of the protein structure and the conversion of β conformations to disordered structures (Singh, Siddiqi, & Sogi, 2021).

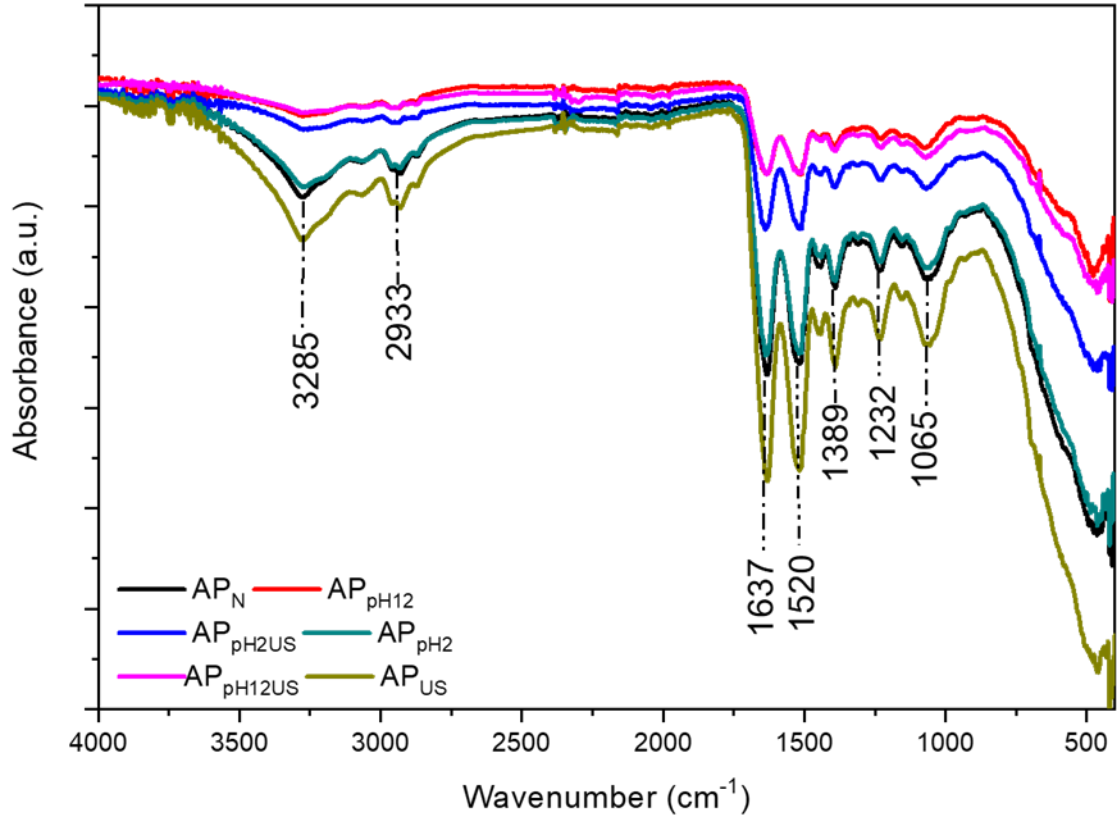


Figure 2. FTIR spectra for amaranth protein subjected to pH-shifting (AP_{pH2} , AP_{pH12}), ultrasonication (AP_{US}), and combined pH-shifting/ultrasonication (AP_{pH2US} , AP_{pH12US}). AP_N is the untreated native amaranth protein.

Decreases in β -sheet can be attributed to the instability of the proteins when subjected to acidic and alkaline conditions and ultrasound (Wang, Wu, & Betti, 2013). Similar results were reported for ultrasound-treated faba bean protein, which showed an increase of β -sheet proportion (Martínez-Velasco et al., 2018). Hu et al. (2013) found that α -helix and random coil structures of soy protein isolate decreased after ultrasonic treatment.

AP_N presented higher values (58.7-69.2%) of β -sheet than huauzontle protein (37.6 to 45.9%) at different pH values (López-Monterrubio et al., 2020). Proteins with high values of β -sheet exhibited greater thermal stability than those with high values of α -helix (Shevkani et al., 2014). The α -helix values of the AP variations were significantly lower than for AP_N , except AP_{pH2} . The β -turn component in AP_{pH12US} was ten-fold lower than for AP_N , due to a possible synergic effect between the alkaline pH/US treatment that could disrupt hydrogen bonds, causing some α -helix or β -turn structures to become β -sheet or random coil structures (Zhu et al., 2018).

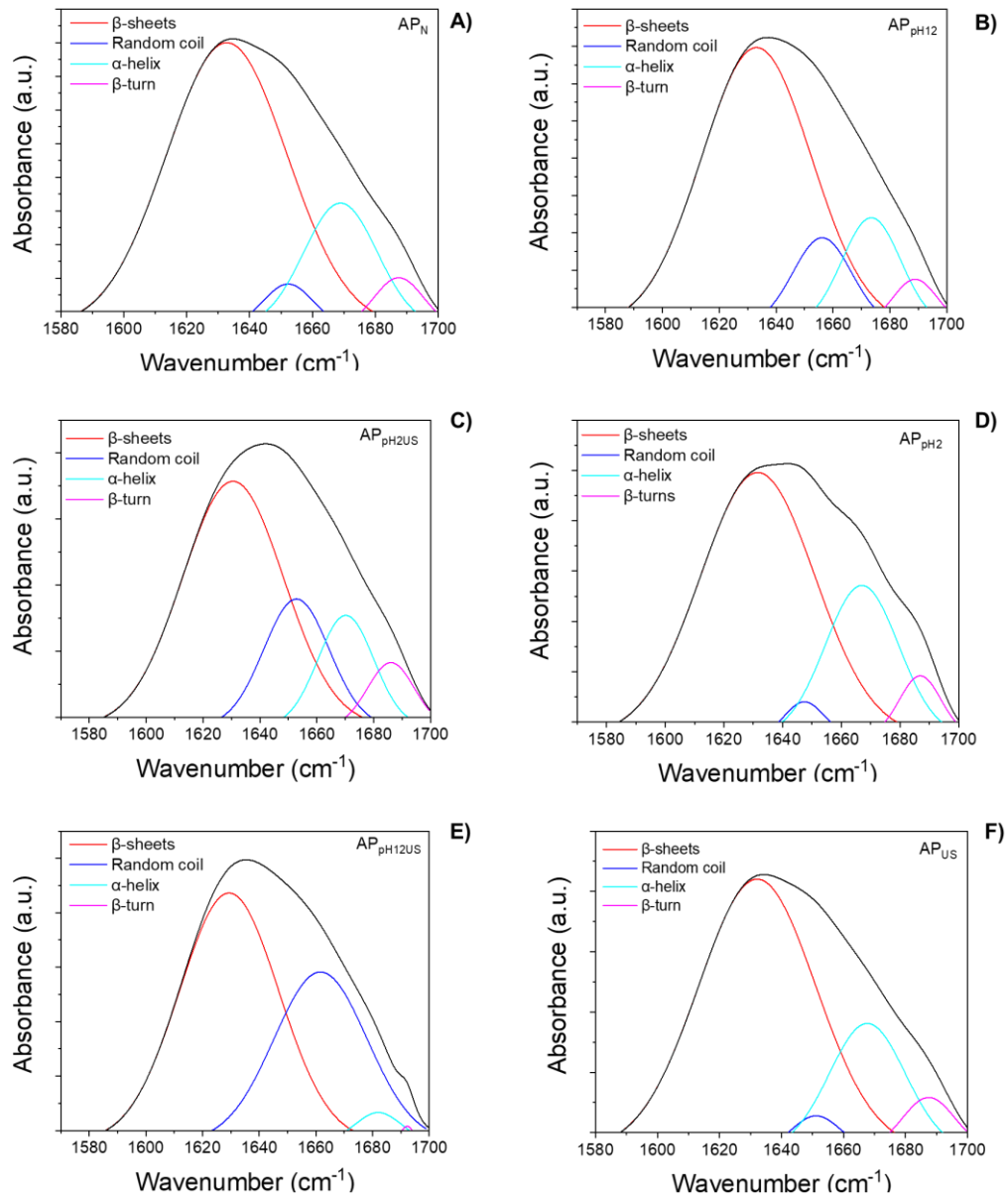


Figure 3. Illustration of Gaussian deconvolution of FTIR signals in the Amide I region for AP_N (a), AP_{pH2} (b), AP_{pH2US} (c), AP_{pH12} (d), AP_{pH12US} (e) and, AP_{US} (f).

Protein secondary structure is linked to hydrogen bonding between protein molecules, leading to a higher degree of hydration (Mir et al., 2020). Modifications of the protein structure by pH treatment and ultrasound are linked to the formation/disruption of non-covalent bonds, including electrostatic interactions, hydrophobic interactions, and hydrogen bonding (Jiang et al., 2021). On the other hand, Hu et al. (2013) indicated that ultrasound treatment could disrupt some of the non-covalent interactions of protein (e.g., hydrogen bonds and hydrophobic interactions) similar to denaturation. It has been

postulated that ultrasound forces leading to the disassociation of native protein complexes into individual subunits, allowed for improved interactions between non-covalent bonds (Jiang, Xiong, & Chen, 2011).

Table 4. The relative content of the components of the secondary structure of the amaranth protein variations.

Variation	Secondary structure component (%)			
	β -sheet	Random coil	α -helix	β -turn
AP _N	67.1 $\pm$ 0.2 ^c	2.9 $\pm$ 0.3 ^a	24.5 $\pm$ 0.7 ^d	5.4 $\pm$ 0.5 ^c
AP _{pH2}	66.5 $\pm$ 0.7 ^c	3.3 $\pm$ 0.4 ^a	24.0 $\pm$ 0.8 ^d	5.8 $\pm$ 0.2 ^c
AP _{pH2US}	58.7 $\pm$ 1.6 ^a	19.8 $\pm$ 2.2 ^d	14.7 $\pm$ 1.6 ^b	6.7 $\pm$ 0.3 ^d
AP _{pH12}	64.4 $\pm$ 0.0 ^b	16.9 $\pm$ 0.0 ^c	14.4 $\pm$ 0.0 ^b	4.3 $\pm$ 0.0 ^b
AP _{pH12US}	58.8 $\pm$ 1.2 ^a	37.5 $\pm$ 2.8 ^e	3.1 $\pm$ 0.4 ^a	0.5 $\pm$ 0.0 ^a
AP _{US}	69.2 $\pm$ 0.0 ^d	3.6 $\pm$ 0.1 ^b	21.1 $\pm$ 2.0 ^c	6.0 $\pm$ 0.9 ^d

Different letters in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$) between means.

3.4.2 Sulfhydryl groups (SH) and disulfide bonds (SS)

The values of the total sulfhydryl (SH_t) were in the range from 43.7 $\pm$ 0.1 to 45.3 $\pm$ 0.1 μ mol/g of protein. On the other hand, the values of the exposed sulfhydryl (SH_e) were in the range from 3.3 $\pm$ 0.1 to 7.0 $\pm$ 0.2 μ mol/g of protein. These values were significantly ($p < 0.05$) lower than that of AP_N (9.0 $\pm$ 0.2 μ mol/g of protein) (Figure 4), which might be due to the oxidation of these groups, and the formation of new disulfide bonds intra- or intermolecularly (Hu, Wang, & Li, 2017). SH_e values of 9.0 to 19.2 μ mol/g have been reported for quinoa protein (Valenzuela et al., 2013). The content of the SH_t group can seriously affect the functional performance of the protein and plays a key role in the production of a relatively rigid structure. Furthermore, the increase in SH_t can be attributed to the unfolding of molecules, which promoted the exposure of buried SH groups or buried thiol groups (Zou et al., 2019). Disulfide bonds presented values of 19.5 $\pm$ 0.1 to 20.9 $\pm$ 0.9 μ mol/g of protein, which were significantly higher ($p < 0.05$) than the value for AP_N (17.4 $\pm$ 0.1 μ mol/g). SS bonds in soy protein isolate subjected to pH 12 increased between 15.6 to 21.4 μ mol/g as ultrasonication time increased (1 to 5 min) compared to the control (14.7 μ mol/g) (Lee et al., 2016). Mano-thermo sonication combined with pH 12 shifting had the same effect in SS bonds of soy protein, varying from 14.8 $\pm$

0.1 up to 21.97 $\mu\text{mol/g}$ (Yildiz, Andrade, Engeseth, & Feng, 2017). The increase of SS bonds may be due to SH/SS interchange reactions, SH oxidation, and to the susceptibility of thiol groups to form mercaptide ion species (S^-). The rate at which these phenomena take place increases with higher alkalinity (Chen et al., 2019).

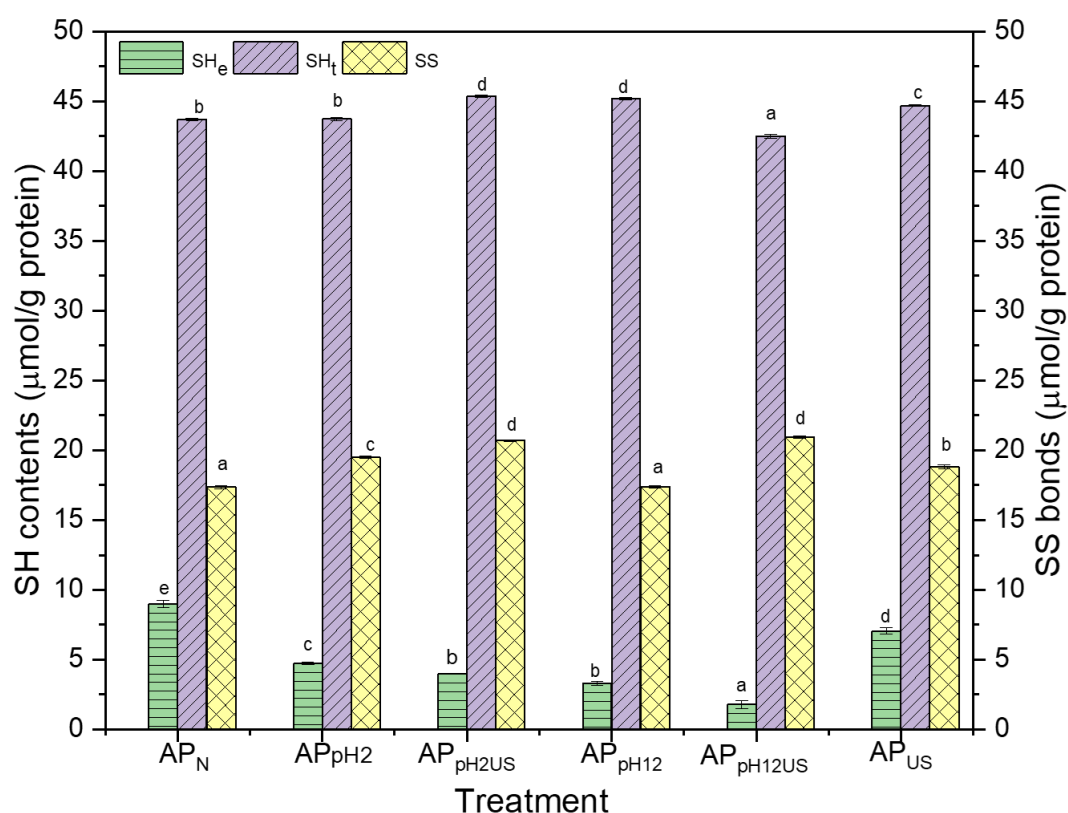


Figure 4. Exposed (SH_e) and total (SH_t) sulfhydryl groups, and disulfide bonds (SS). Vertical bars indicate SD. Different lowercase letters indicate significant differences $p < 0.05$.

3.4.3 Molecular weight distribution (MW)

AP presented major bands with molecular weights of ~ 54 kDa up to ~ 17 kDa (Figure 5), which agrees well with previous reports (Ventureira, Martínez, & Añón, 2012). The bands at ~ 46.3 kDa can be ascribed to 11S globulin precursors and were hardly detectable for AP_N, AP_{US} and AP_{pH12US}. The lack of detection of 11S globulin fractions can be due to the formation of high molecular weight protein polymers and aggregates (He et al., 2020). The low intensity of the bands in the AP variations was similar to that of modified pea protein treated with changes in pH, probably due to the crosslinking or

formation of subunit aggregates (Jiang et al., 2017). A band was observed at ~37 kDa corresponding to soluble subunits of 7S globulin (Barba de la Rosa et al., 2009). 11S globulin is composed of an acid chain (~30 kDa) and a basic chain (~22 kDa). The albumins present in the AP are seen in the bands with apparent molecular weights of ~ 18 kDa (Barba de la Rosa et al., 2009), which was not affected by the different pH and ultrasound treatments. Overall, the PAGE analysis showed that, except at the 11S globulin precursor band, the pH and ultrasound treatment did not have visible effects on the molecular weight structure of amaranth protein.

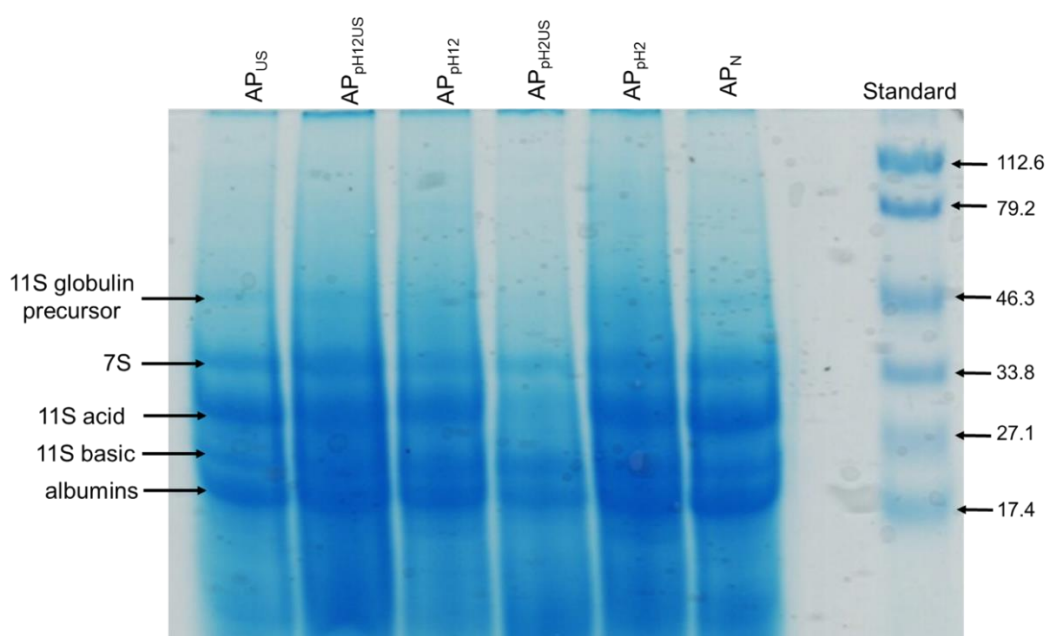


Figure 5. SDS-PAGE of the amaranth protein variations. MW standards (kDa).

3.4.4 Particle size

The hydrodynamic diameter (d_h) of AP_N (1167.0 ± 15.6 nm) increased to 2268.7 ± 54.9 nm (AP_{pH2US}) and 2490.0 ± 5.3 nm (AP_{pH2}) (Figure 6). Gao et al. (2020) found that soybean 11S protein at pH 1.0 had greater hydrophobicity, and particle size in between the native state and fully denatured state. On the other hand, ultrasound treatment can promote extensive protein denaturation and favor the formation of aggregates, via non-covalent bonds, such as hydrophobic interactions of regions exposed during the process (Constantino & García-Rojas, 2020). In contrast, AP variations treated under alkaline conditions (AP_{pH12}), ultrasonication (AP_{US}), or under combined alkaline/US

(AP_{pH12US}) showed smaller d_h values than AP_N (Figure 4A). Li et al. (2020) reported that peanut protein isolates subjected to pH-shifting (pH 10) showed particle size decreases. This behavior can be ascribed to the fact that the contact space between the proteins and the water molecules was greater, and therefore the interaction between them was stronger. Soy protein isolates with pH shifting (pH 12) and ultrasound (5 min), showed a significantly lower ($p < 0.05$) particle size, than when pH shifting was done at pH 7, under the same US conditions. This result can be attributed to the stronger electrostatic repulsions arising between the proteins moieties at pH 12 (further from the isoelectric point) than at pH 7, hindering the formation of protein aggregates. In the case of the US-treated AP, cavitation and shear force induce the breaking of non-covalent bonds in protein aggregates, and particle size decreases. The combined application of pH shifting, and ultrasound is likely to lead to a reduction in particle size (Fang et al., 2021).

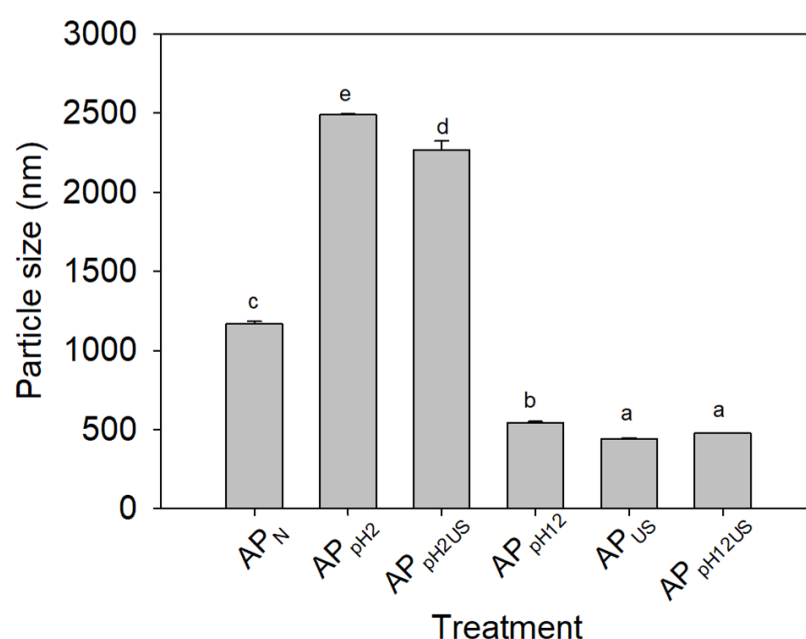


Figure 6. Particle size. Vertical bars indicate the SD. Different lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.4.5 ζ -potential

The ζ -potential or surface charge is one of the most important characteristics of the proteins, due to its influence on the solubility and functional properties such as their emulsifying and foaming properties (Shevkani et al., 2014). Positive ζ -potential values were presented at a pH below 4 by AP_N, AP_{pH2US}

and AP_{US}, and at a pH below 4.5 for AP_{pH2}, AP_{pH12}, AP_{pH12US} (Figure 7). The ζ -potential for AP ranged from 19.6 ± 1.6 mV at pH 2 to -37.5 ± 1.5 mV at pH 10. Positive charges have been reported for AP at pH values below 4.7 and negative charges above pH 4.7, with ζ -potential values ranging from 30 mV at pH 3 to -30 mV at pH 10 (Constantino & García-Rojas, 2020) and from 25 mV at pH 2 to -30 mV at pH 8 (Ventureira et al., 2012). The isoelectric point (pI) of the AP variations was of 3.5 (AP_{US}), 4.0 (AP_N, AP_{pH2} and AP_{pH2US}), 4.2 (AP_{pH12}) and 4.5 (AP_{pH12US}). Constantino and García-Rojas (2020) reported pI values of 4.6 for native AP and of 4.8 for US-treated AP. Ventureira et al. (2012) reported pI values for various AP isolates in the range of 4.5 to 6.5. It has been reported that US promotes changes in the pI to alkaline or acid pH levels depending on the time of the treatment, and this may be related to structural changes of the protein (Zhao et al., 2021). On the other hand, pH 12 is farther away from the pI value of AP_N than pH 2 and therefore could cause stronger intramolecular electrostatic repulsions. In turn, this effect resulted in a more extensive unfolding of the protein structure and groups exposure (Chen et al., 2019).

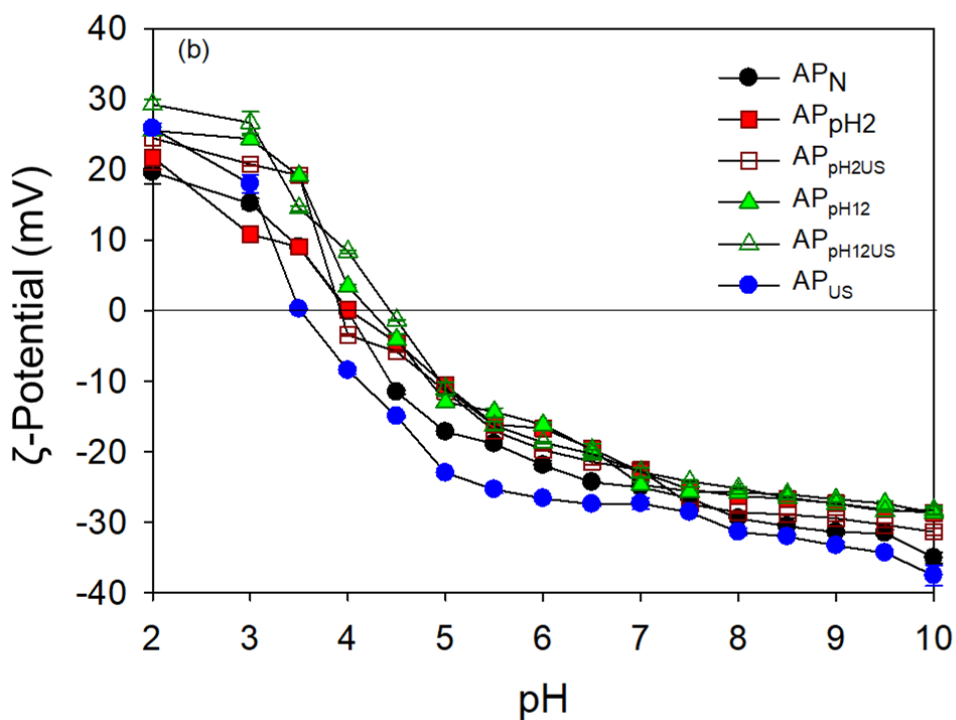


Figure 7. ζ -potential (mV). Vertical bars indicate the SD.

3.4.6 Protein solubility

The solubility of the AP variations at pH 5 (near the pI) was significantly lower than at pH 7 and pH 9 (Figure 8). The solubility at pH 5 fluctuated between 26.1 ± 0.8 to $68.6 \pm 2.1\%$, at pH 7 between 33.3 ± 1.2 to $74.7 \pm 0.7\%$ and at pH 9 between 55.7 ± 1.5 to $97.1 \pm 0.4\%$. Solubility of AP_N was significantly improved in AP_{pH12US}, AP_{pH12} and AP_{US}, and the best solubility was displayed by AP_{pH12US}. Increases in protein solubility have been related to conformational changes and the formation of soluble protein aggregates (Jiang et al., 2017), the reduction in particle size and the consequent increase in the contact area between the protein molecules and water (Constantino & García-Rojas, 2020).

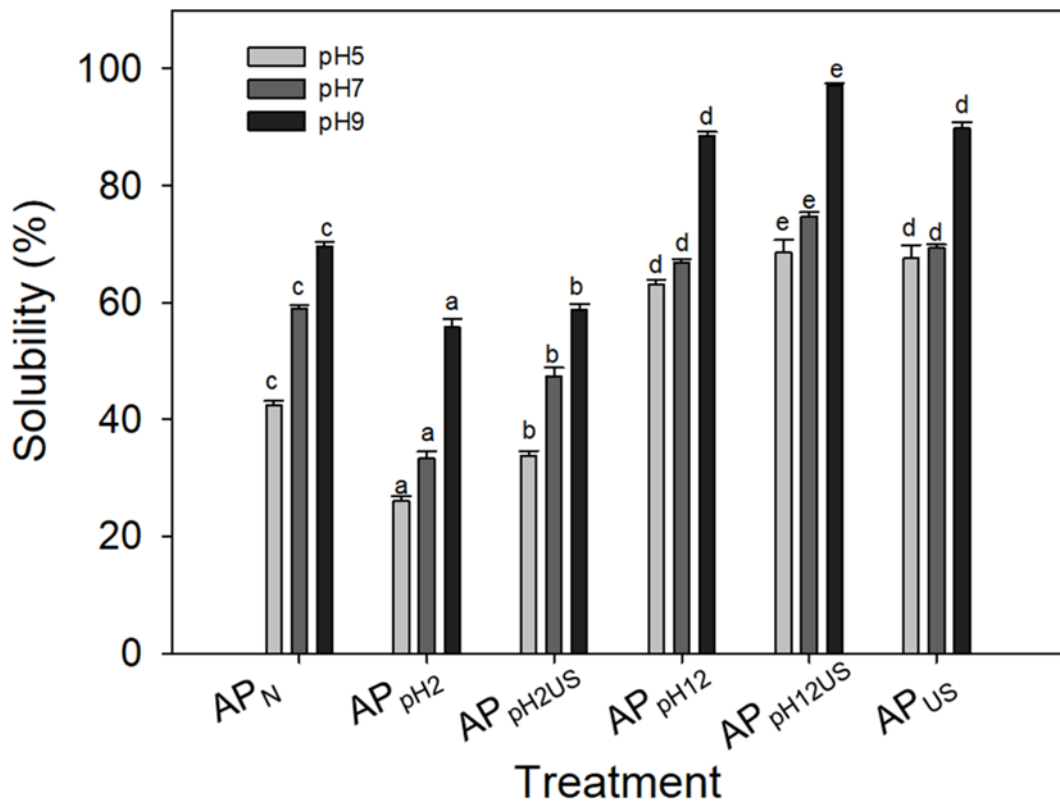


Figure 8. AP solubility (%). Vertical bars indicate the SD. For each pH, different lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Likewise, extreme alkaline conditions lead to an increase of ionic strength, which in turn produce partial unfolding of the protein, also known as structure or molten globule (MG) state. Proteins in MG can lose some side-chain interactions and become more flexible (Xu et al., 2021). Therefore, the increase in solubility can be related to an increase in ionic interactions of charged proteins and water (Jiang et al., 2017). In contrast, the solubility was

significantly lower for AP_{pH2US} and AP_{pH2} in comparison to AP_N. A similar trend was found for soy protein, which was attributed to the protein denaturation induced by the acidic conditions. As protein denatures, more hydrophobic amino acids will become free to interact with the different proteins, which induces aggregation and lowering of solubility (Jiang et al., 2009).

3.4.7 Foaming properties

Foaming capacity (FC) is related to the ability of the proteins to form liquid/air dispersions while foaming stability (FS) represents the percentage volume of foam remaining from the initial foam volume after a determined time and is an important parameter to evaluate the stability of whipped foods (Pezeshk, Rezaei, Hosseini, & Abdollahi, 2021). FC ranged from 213.3 ± 3.1 to $310.0 \pm 3.2\%$ for pH 5, from 206.3 ± 4.5 to $303.3 \pm 1.1\%$ for pH 7 and from 203.5 ± 4.2 to $296.6 \pm 3.7\%$ for pH 9 (Table 5). Thus, the FC decreased significantly as the pH was increased from 5 to 9. Also, the treatment to which the AP was subjected had a significant effect on FC, independently of the pH used to form the foams (Table 5). Highest FC was exhibited by AP_{pH12US} followed by AP_{US} and AP_{pH12} (Table 5). In contrast, AP_{pH2} presented lower FC than AP_N, and AP_{pH2US} a similar FC than AP_N at pH 5 and 9. Silva-Sánchez et al. (2004) reported FC values of 200, 67 and 49% for proteins from Tlaxcala amaranth variety, and of 193, 58 and 45% for proteins from San Jose amaranth variety, at pH 5, pH 7 and pH 9, respectively. These values are much lower than those found in this work. The higher FC found at pH 5 can be attributed to its nearness to the pI of AP_N, where relatively low repulsive interactions between protein moieties occur. In this way, protein-protein interactions are favored, higher hydrophobicity is exhibited by these protein aggregates, and stronger adsorption of the proteins at the air/water interface takes place, favoring the formation of more viscous films (Marcone & Karkuda, 1999). Additionally, the effect of alkaline pH shifting and US, increased the exposure of the hydrophobic regions due to the unfolding of molecules (Nazari et al., 2018), while pH 2 shifting could favor an extensive aggregation of the protein chains. As a consequence, their ability to spread on the water/air interface to form bubbles is severely limited (Pezeshk et al., 2021).

Table 5. Foaming capacity (FC) and foaming stability (FS) of the amaranth protein variations at different pH values.

Property		AP _N	AP _{pH2}	AP _{pH2US}	AP _{pH12}	AP _{pH12US}	AP _{US}
FC (%)	pH 5	250.0 ± 4.7 ^{Bc}	213.3 ± 3.1 ^{Ab}	260.0 ± 5.1 ^{BCb}	295.3 ± 4.7 ^{Dc}	315.0 ± 3.2 ^{Fc}	303.3 ± 2.3 ^{Ec}
	pH 7	236.7 ± 8.1 ^{Bb}	206.3 ± 4.5 ^{Aa}	256.7 ± 3.1 ^{Cb}	282.0 ± 6.7 ^{Db}	304.3 ± 1.1 ^{Fb}	293.0 ± 3.0 ^{Eb}
	pH 9	221.6 ± 2.3 ^{Ba}	203.5 ± 4.2 ^{Aa}	220.0 ± 3.0 ^{Ba}	273.3 ± 4.7 ^{Ca}	295.6 ± 3.7 ^{Ea}	286.3 ± 4.7 ^{Da}
Foaming stability (%) at different times (min)							
FS (%)	15 min	pH 5	73.0 ± 2.3 ^{ABc}	70.6 ± 1.1 ^{Ac}	75.8 ± 0.9 ^{Bb}	87.4 ± 0.6 ^{Cb}	91.4 ± 0.1 ^{Dc}
		pH 7	69.1 ± 1.0 ^{Ab}	65.3 ± 0.7 ^{Ab}	75.3 ± 2.9 ^{Bb}	85.1 ± 1.4 ^{CDb}	86.2 ± 1.5 ^D
		pH 9	62.1 ± 1.3 ^{Aa}	60.3 ± 1.4 ^{Aa}	71.2 ± 2.1 ^{Ba}	81.2 ± 0.3 ^{Ca}	82.0 ± 0.3 ^{Ca}
	30 min	pH 5	63.4 ± 2.1 ^{Bb}	58.6 ± 1.1 ^{Abc}	61.3 ± 0.0 ^{Bb}	74.2 ± 0.4 ^{Cc}	78.0 ± 0.8 ^{Dc}
		pH 7	60.6 ± 2.0 ^{Bb}	56.9 ± 1.5 ^{Ab}	58.8 ± 1.0 ^{ABa}	67.2 ± 1.3 ^{Cb}	71.3 ± 0.1 ^{Db}
		pH 9	49.7 ± 0.5 ^{Ba}	44.5 ± 1.0 ^{Aa}	56.8 ± 1.7 ^{Ca}	62.9 ± 0.2 ^{Da}	65.2 ± 1.0 ^{Ea}

Values are presented as means ± SD. Different capital letters in rows indicate significant differences $p < 0.05$. Different lowercase letters in columns indicate significant differences ($p < 0.05$).

The AP foams were made up of spherical bubbles whose size, expressed as mean length number diameter ($d_{1,0}$), was significantly influenced by the treatment applied to AP (Figure 9).

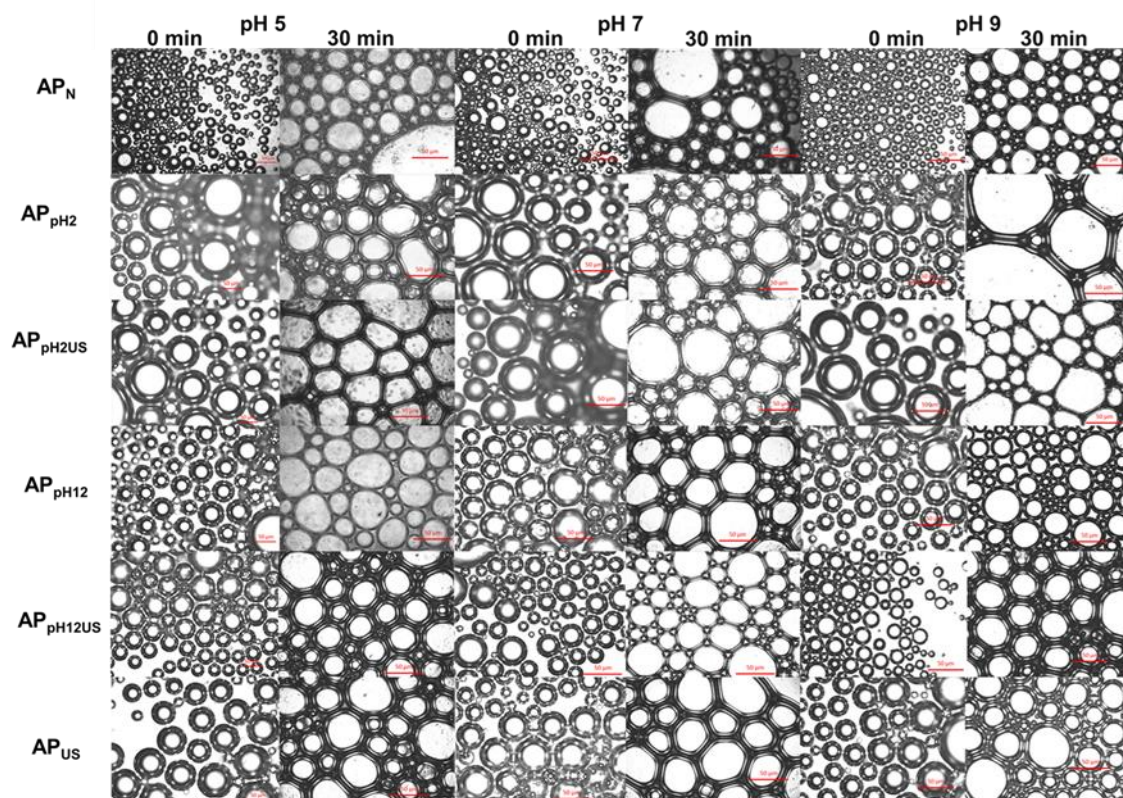


Figure 9. Morphology of the air bubbles made with AP.

The initial size of the air bubbles tended to vary as follows: $AP_N < AP_{pH12} = AP_{pH12US} < AP_{US} < AP_{pH2US} < AP_{pH2}$. For pH 5, the mean bubble diameter showed a marked reduction for all foam variations, except for AP_N (Figure 10.a). Similar results were exhibited for pH 7, although with a less visible reduction in bubble diameter (Figure 10.b). In contrast, for pH 9 the mean bubble diameter exhibited a significant increase for all foam variations (Figure 10.c). These results agree with the FS values of the foams determined after 15 and 30 min after their preparation (Table 5). FS was higher as a function of pH of formation in the following order: $pH5 > pH7 > pH9$, independently of aging time (15 or 30 min). The AP variations treated with US and/or alkaline pH shifting exhibited a higher FS than the rest of the AP variations which showed a lower FS. The higher stability of AP_{US} , AP_{pH12} and AP_{pH12US} could be related to a relatively thick lamella surrounding the air bubbles (Fig. 9). It seems that the AP variation processing condition, coupled to the pH of formation of the foams, leads to a greater protein

unfolding, higher surface hydrophobicity and solubility. Also, smaller particles tended to diffuse at a faster rate to and adsorb more strongly at the air-water interface, forming a more cohesive network by both covalent and noncovalent interactions (Van der Plancken, Van Loey, & Hendrickx, 2007). Martínez-Velasco et al. (2018) modified faba bean protein by US and found that smaller initial bubble sizes could contribute to improved foams stability.

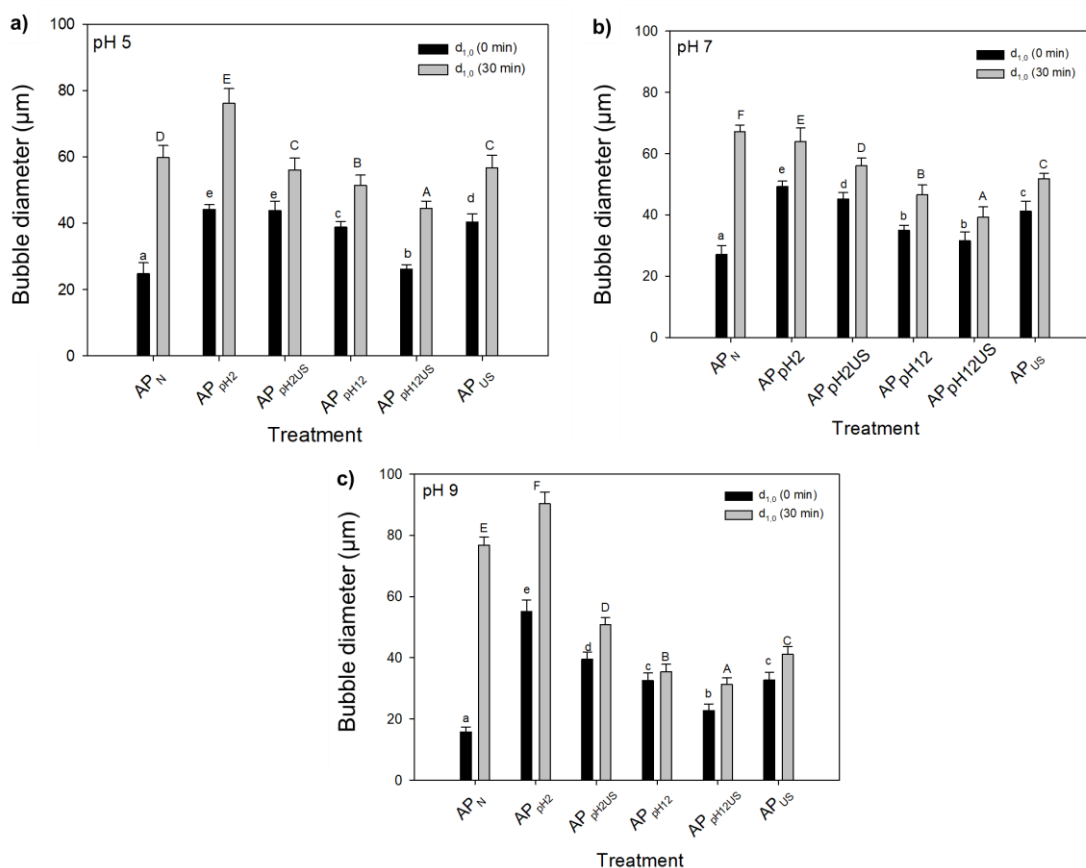


Figure 10. Diameter of air bubbles made with AP at 0 min, aged 30 min and made at: (a) pH 5, (b) pH 7 and (c) pH 9. Vertical bars indicate the SD. Different capital letters (gray bars) and different lowercase letters (black bars) indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.5 Relative protein digestibility (RPD)

The RPD of AP_N ($85.4 \pm 0.9\%$) was significantly increased by treatments AP_{US} ($88.9 \pm 1.1\%$), AP_{pH12US} ($89.1 \pm 1.9\%$) and AP_{pH2} ($90.2 \pm 0.6\%$), remained significantly the same for AP_{pH12} ($87.1 \pm 1.4\%$), and significantly decreased for AP_{pH2US} ($83.3 \pm 0.5\%$). The increase in RPD can be attributed to the effect of ultrasound on the molecular conformation and microstructure of AP, thus increasing its accessibility to digestive enzymes (Jin, Okagu, Yagoub, &

Udenigwe, 2021). Also, the increase of random coil has been linked to increased values of RPD (Sullivan, Pangloli, & Dia, 2018). On the other hand, the 4.8% increase of the RPD of AP_{pH2} can be attributed to the fact that pH-shifting in acidic conditions exposes more trypsin cleavage sites, which makes the protein more susceptible to proteolytic attack, improving digestive properties (He et al., 2020). The low value of RPD in AP_{pH2US} can be attributed to denaturation-renaturation of the protein due to certain external factors; denaturation is beneficial for digestion, while renaturation causes resistant digestion in the protein. Therefore, since protein denaturation-renaturation is in equilibrium, adequate ultrasonication can lead to denaturation (Jin et al., 2021). Other RPD studies showed $83.0 \pm 0.2\%$ digestibility for the huauzontle protein isolate (López-Monterrubio et al., 2020) and $78.3 \pm 1.1\%$ for quinoa protein isolates (Elsahaimy et al., 2015). From our results, it may be concluded that pH shifting, ultrasonication, and combined pH shifting/US treatment of amaranth protein isolate is not deleterious to its nutritional value.

3.6 Conclusions

The pH-shifting alone had an important effect in the modification of the amaranth protein secondary structure. However, such modification only produced a moderate effect on the solubility, foam formation and stability, and relative protein digestibility of amaranth protein. When pH-shifting was combined with ultrasound, the solubility, foam formation and stability and relative protein digestibility tended to be improved. In particular, the improvement in protein digestibility could be probably attributed to the disaggregation of complex protein units into simpler subunits. Overall, amaranth protein is still a sub-utilized commodity for food products but is increasingly considered a suitable ingredient for developing functional foods. As this work demonstrates, the techno-functional properties of amaranth protein may be significantly improved by selecting appropriate processing conditions such as the pH-shifting/ultrasound treatments considered in this work. Finally, low-cost, sustainability and high-protein content make amaranth seeds attractive for extensive applications; however, its use should confront the cost of conditioning the protein to satisfy strict requirements in solubility, foam formation capacity and bioavailability. An important issue for

consideration in future work is to consider the use of green acids/alkalis for pH-shifting.

3.7 References

- AOAC. (1995). *Official methods of analysis of the AOAC international* (16th ed.). Association of Official Analytical Chemists International. Washington, DC.
- Avanza, M. V. & Añón, M. C. (2017). Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87(4), 616-623. doi.org/10.1002/jsfa.2751.
- Barba de la Rosa, A. P., Fomsgaard, I. S., Laursen, B., Mortensen, A. G., Olvera-Martínez, L., Silva-Sánchez, C., Mendoza-Herrera, A., González-Castañeda, J., & De León-Rodríguez, A. (2009). Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science*, 49, 117-121. doi.org/10.1016/j.jcs.2008.07.012.
- 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. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.039.
- 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. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.10.061.
- Carbonaro, M., & Nucara, A. (2010). Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. *Amino acids*, 38(3), 679-690. doi.org/10.1007/s00726-009-0274-3.
- Chen, W., Wang, W., Ma, X., Lv, R., Watharkar, R. B., Ding, T., & Liu, D. (2019). Effect of pH-shifting treatment on structural and functional properties of whey protein isolate and its interaction with (–)-epigallocatechin-3-gallate. *Food Chemistry*, 274, 234-241. doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.
- Condés, M. C., Scilingo, A. A., & Añón, M. C. (2009). Characterization of amaranth proteins modified by trypsin proteolysis. Structural and functional changes. *LWT-Food Science and Technology*, 42(5), 963-970. doi.org/10.1016/j.lwt.2008.12.00.
- Constantino, A. B. T., & Garcia-Rojas, E. E. (2020). Modifications of physicochemical and functional properties of amaranth protein isolate (*Amaranthus cruentus* BRS Alegria) treated with high-intensity ultrasound. *Journal of Cereal Science*, 95, 103076. doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103076.

- Cordero-de-Los-Santos, M. Y., Osuna-Castro, J. A., Borodanenko, A., & Paredes-López, O. (2005). Physicochemical and functional characterisation of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellisation. *Food Science and Technology International*, 11(4), 269-280. doi.org/10.1177%2F1082013205056491.
- Corke, H., Cai, Y. Z., & Wu, H. X. (2016). Amaranth: Overview. In C. Wrigley, H. Corke, K. Seetharaman, & J. Faubion (Eds.), *Encyclopedia of food grains*, Vol. 1, 2nd Ed. (pp. 287-296). Elsevier. doi.org/10.1016/B978-0-12-394437-5.00032-2.
- Das, D., Mir, N. A., Chandla, N. K., & Singh, S. (2021). Combined effect of pH treatment and the extraction pH on the physicochemical, functional and rheological characteristics of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed protein isolates. *Food Chemistry*, 353, 129466. doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129466.
- Elsahaimy, S. A., Refaay, T. M., & Zaytoun, M. A. M. (2015). Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 297-305. doi.org/10.1016/j.aos.2015.10.007.
- Fang, Z., Cai, X., Wu, J., Zhang, L., Fang, Y., & Wang, S. (2021). Effect of simultaneous treatment combining ultrasonication and pH-shifting on SPI in the formation of nanoparticles and encapsulating resveratrol. *Food Hydrocolloids*, 111, 106250. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106250.
- Fasolin, L. H., Pereira, R. N., Pinheiro, A. C., Martins, J. T., Andrade, C. C. P., Ramos, O. L., & Vicente, A. A. (2019). Emergent food proteins—Towards sustainability, health and innovation. *Food Research International*, 125, 108586. doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108586.
- Gao, J., Li, X. M., Chen, F. L., Piekoszewski, W., Yang, Y., Wang, B., & Zhang, N. (2020). The effect of extreme acid-induced soybean glycinin molten globules state on foaming ability. *Food Hydrocolloids*, 105, 105819.
- Gürbüz, G., Kauntola, V., Diaz, J. M. R., Jouppila, K., & Heinonen, M. (2018). Oxidative and physical stability of oil-in-water emulsions prepared with quinoa and amaranth proteins. *European Food Research and Technology*, 244(3), 469-479. doi.org/10.1007/s00217-017-2973-4.
- He, S., Zhao, J., Cao, X., Ye, Y., Wu, Z., Yue, J., & Sun, H. (2020). Low pH-shifting treatment would improve functional properties of black turtle bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate with immunoreactivity reduction. *Food Chemistry*, 330, 127217. doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127217.
- 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. doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb14476.x.
- Hu, H., Wu, J., Li-Chan, E. C., Zhu, L., Zhang, F., Xu, X., Fan, G., Wang, L., Huang, X., & Pan, S. (2013). Effects of ultrasound on structural and physical

- properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. *Food Hydrocolloids*, 30(2), 647-655. doi.org/10.1016/j.foodhyd. 2013.01.016.
- Hu, Y., Wang, L., & Li, Z. (2017). Modification of protein structure and dough rheological properties of wheat flour through superheated steam treatment. *Journal of Cereal Science*, 76, 222-228. doi.org/10.1016/j.jcs.2017.06.013.
- Ismail, B. P., Senaratne-Lenagala, L., Stube, A., & Brackenridge, A. (2020). Protein demand: review of plant and animal proteins used in alternative protein product development and production. *Animal Frontiers*, 10(4), 53-63. doi.org/10.1093/af/vfaa040.
- Jiang, J., Chen, J., & Xiong, Y. L. (2009). Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7576-7583. doi.org/10.1021/jf901585n.
- Jiang, J., Xiong, Y. L., & Chen, J. (2011). Role of β -conglycinin and glycinin subunits in the pH-shifting-induced structural and physicochemical changes of soy protein isolate. *Journal of Food Science*, 76(2), C293-C302. doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.02035.x.
- Jiang, J., Wang, Q., & Xiong, Y. L. (2018). A pH shift approach to the improvement of interfacial properties of plant seed proteins. *Current Opinion in Food Science*, 19, 50-56. doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.002.
- Jiang, J., Zhu, B., Liu, Y., & Xiong, Y. (2014). Interfacial structural role of pH-shifting processed pea protein in the oxidative stability of oil/water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7), 1683-1691. doi.org/10.1021/jf405190h.
- Jiang, S., Ding, J., Andrade, J., Rababah, T. M., Almajwal, A., Abulmeaty, M. M., & Feng, H. (2017). Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 835-842. doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.046.
- Jiang, L., Ren, Y., Shen, M., Zhang, J., Yu, Q., Chen, Y., Zhang, H., & Xie, J. (2021). Effect of acid/alkali shifting on function, gelation properties, and microstructure of *Mesona chinensis* polysaccharide-whey protein isolate gels. *Food Hydrocolloids*, 117, 106699. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106699.
- Jin, J., Okagu, O. D., Yagoub, A. E. A., & Udenigwe, C. C. (2021). Effects of sonication on the in vitro digestibility and structural properties of buckwheat protein isolates. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105348. doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105348.
- Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), 549-559. doi.org/10.1111/j. 1745-7270.2007.00320.x.

- Lado, M. B., Burini, J., Rinaldi, G., Añón, M. C., & Tironi, V. A. (2015). Effects of the dietary addition of Amaranth (*Amaranthus mantegazzianus*) protein isolate on antioxidant status, lipid profiles and blood pressure of rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(4), 371-379. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0516-3>.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Lee, H., Yildiz, G., Dos Santos, L. C., Jiang, S., Andrade, J. E., Engeseth, N. J., & Feng, H. (2016). Soy protein nano-aggregates with improved functional properties prepared by sequential pH treatment and ultrasonication. *Food Hydrocolloids*, 55, 200-209. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.022>
- Li, J., Wu, M., Wang, Y., Li, K., Du, J., & Bai, Y. (2020). Effect of pH-shifting treatment on structural and heat induced gel properties of peanut protein isolate. *Food Chemistry*, 325, 126921.
- Lin, H., Bean, S. R., Tilley, M., Peiris, K. H. S., & Brabec, D. (2021). Qualitative and quantitative analysis of sorghum grain composition including protein and tannins using ATR-FTIR spectroscopy. *Food Analytical Methods*, 14(2), 268-279. doi.org/10.1007/s12161-020-01874-5.
- 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. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.080.
- López-Monterrubio, D. I., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2020). Huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.) protein: Composition, structure, physicochemical and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 108, 106043. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106043.
- Marcone, M. F., & Kakuda, Y. (1999). A comparative study of the functional properties of amaranth and soybean globulin isolates. *Food/Nahrung*, 43(6), 368-373. [doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3803\(19991201\)43:6%3C368::AID-FOOD368%3E3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3803(19991201)43:6%3C368::AID-FOOD368%3E3.0.CO;2-R).
- Martínez-López, A., Millan-Linares, M. C., Rodríguez-Martin, N. M., Millan, F., & Montserrat-de la Paz, S. (2020). Nutraceutical value of kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.). *Journal of Functional Foods*, 65, 103735. doi.org/10.1016/j.jff.2019.103735
- 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. doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.007.
- Mir, N. A., Riar, C. S., & Singh, S. (2019a). Structural modification of quinoa seed protein isolates (QPIs) by variable time sonification for improving its

physicochemical and functional characteristics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 58, 104700. doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104700.

- Mir, N. A., Riar, C. S., & Singh, S. (2019b). Physicochemical, molecular and thermal properties of high-intensity ultrasound (HIUS) treated protein isolates from album (*Chenopodium album*) seed. *Food Hydrocolloids*, 96, 433-441. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.052.
- Mir, N. A., Riar, C. S., & Singh, S. (2020). Structural modification in album (*Chenopodium album*) protein isolates due to controlled thermal modification and its relationship with protein digestibility and functionality. *Food Hydrocolloids*, 103, 105708. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105708.
- Nazari, B., Mohammadifar, M. A., Shojaee-Aliabadi, S., Feizollahi, E., & Mirmoghtadaie, L. (2018). Effect of ultrasound treatments on functional properties and structure of millet protein concentrate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 41, 382-388. doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.10.002.
- Paredes-López, O. (2018). Amaranth biology, chemistry and technology. CRC Press. ISBN: 9781351078054.
- Pezeshk, S., Rezaei, M., Hosseini, H., & Abdollahi, M. (2021). Impact of pH-shift processing combined with ultrasonication on structural and functional properties of proteins isolated from rainbow trout by-products. *Food Hydrocolloids*, 118, 106768. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106768.
- Pojić, M., Mišan, A., & Tiwari, B. (2018). Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 93-104. doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.010.
- Rastogi, A., & Shukla, S. (2013). Amaranth: a new millennium crop of nutraceutical values. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(2), 109-125. doi.org/10.1080/10408398.2010.517876.
- Shapiro, A. L., Viñuela, E., & Maizel, J. V. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 28(5), 815-820.
- 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(2), 541-550. doi.org/10.1111/ijfs.12335.
- Silva-Sánchez, C., González-Castañeda, J., De León-Rodríguez, A., & De La Rosa, A. B. (2004). Functional and rheological properties of amaranth albumins extracted from two Mexican varieties. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59(4), 169-174. doi.org/10.1007/s11130-004-0021-6.
- Singh, T. P., Siddiqi, R. A., & Sogi, D. S. (2021). Enzymatic modification of rice bran protein: Impact on structural, antioxidant and functional properties.

- Sullivan, A. C., Pangloli, P., & Dia, V. P. (2018). Impact of ultrasonication on the physicochemical properties of sorghum kafirin and in vitro pepsin-pancreatin digestibility of sorghum gluten-like flour. *Food Chemistry*, 240, 1121-1130. doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.046.
- Valenzuela, C., Abugoch, L., Tapia, C., & Gamboa, A. (2013). Effect of alkaline extraction on the structure of the protein of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and its influence on film formation. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(4), 843-849. doi.org/10.1111/ijfs.12035.
- Van der Plancken, I., Van Loey, A., Hendrickx, M.E. (2007). Foaming properties of egg white proteins affected by heat or high pressure treatment. *Journal of Food Engineering*, 78, 1410–1426. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.01.013.
- Ventureira, J. L., Martínez, E. N., & Añon, M. C. (2012). Effect of acid treatment on structural and foaming properties of soy amaranth protein mixtures. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 272-279. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.03.013.
- Vera, A., Valenzuela, M.A., Yazdani-Pedram, M., Tapia, C., Abugoch, L. (2019). Conformational and physicochemical properties of quinoa proteins affected by different conditions of high-intensity ultrasound treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 51, 186–196. doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.10.026.
- Wang, H., Wu, J., & Betti, M. (2013). Chemical, rheological and surface morphologic characterisation of spent hen proteins extracted by pH-shift processing with or without the presence of cryoprotectants. *Food Chemistry*, 139(1-4), 710-719. doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.123.
- Westermeyer, R. (2016). Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations (5th ed.). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. doi.org/10.1002/9783527695188.
- Xu, L., Xia, Q., Cao, J., He, J., Zhou, C., Guo, Y., & Pan, D. (2021). Ultrasonic effects on the headspace volatiles and protein isolate microstructure of duck liver, as well as their potential correlation mechanism. *Ultrasonics Sonochemistry*, 71, 105358. doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105358.
- Yildiz, G., Andrade, J., Engeseth, N. E., & Feng, H. (2017). Functionalizing soy protein nano-aggregates with pH-shifting and mano-thermo-sonication. *Journal of Colloid and Interface Science*, 505, 836-846. doi.org/10.1016/j.jcis.2017.06.088.
- Zhao, Ch., Yin, H., Yan, J., Niu, X., Qi, B., & Liu, J. (2021). Structure and acid-induced gelation properties of soy protein isolate–maltodextrin glycation conjugates with ultrasonic pretreatment. *Food Hydrocolloids*, 112, 106278. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106278.

- Zhu, Z., Zhu, W., Yi, J., Liu, N., Cao, Y., Lu, J., & McClements, D. J. (2018). Effects of sonication on the physicochemical and functional properties of walnut protein isolate. *Food Research International*, 106, 853-861.
- Zou, Y., Yang, H., Li, P. P., Zhang, M. H., Zhang, X. X., Xu, W. M., & Wang, D. Y. (2019). Effect of different time of ultrasound treatment on physicochemical, thermal, and antioxidant properties of chicken plasma protein. *Poultry Science*, 98(4), 1925-1933. doi.org/10.3382/ps/pey502.

Web references

- Feed Navigator (2017). Chinese amaranth deal: 'The start of a new fodder industry for Australia'. Retrieved from <https://www.feednavigator.com/Article/2017/11/06/Chinese-amaranth-deal-The-start-of-a-new-fodder-industry-for-Australia>. Author: Lynda Searby. Accessed September 15, 2021.
- Grand View Research (2021). Europe market size, share & trends analysis report by application (personal care, food & beverages, pharmaceuticals), by product (seed, oil, leaf, flour), by region, and segment forecasts, 2021-2029. Retrieved from <https://www.marketresearch.com/Grand-View-Research-v4060/Europe-Amaranth-Size-Share-Trends-14840790>. Accessed September 15, 2021.

4 CONCLUSIONES GENERALES

La proteína de amaranto todavía es un ingrediente subutilizado para la manufactura de alimentos procesados; sin embargo, el interés por su uso en la formulación de alimentos funcionales ha incrementado en los últimos años. En este trabajo se buscó mejorar las propiedades tecnofuncionales de la proteína de amaranto con la finalidad de ampliar su aplicación en la industria alimentaria. La aplicación de cambio de pH a aislado de proteína de amaranto tuvo un efecto importante en la modificación de la estructura secundaria de la proteína. No obstante, dicha modificación produjo un efecto moderado sobre la solubilidad, la formación y estabilidad de espuma y la digestibilidad relativa de la proteína. Cuando el cambio de pH se combinó con la aplicación de ultrasonido, la solubilidad, la formación y estabilidad de espuma y la digestibilidad relativa de la proteína de amaranto mejoraron sensiblemente. En particular, el mejoramiento de la digestibilidad puede ser posiblemente atribuido a la disgregación de unidades complejas de proteína a subunidades más simples. Los resultados de este trabajo mostraron que las propiedades tecnofuncionales de proteína de amaranto pueden ser significativamente mejoradas mediante la selección de condiciones de procesamiento adecuadas, tales como tratamientos de cambio de pH/ultrasonido. Un importante tema a considerar en trabajos futuros es el uso de ácidos/álcalis “verdes” para los tratamientos de cambio de pH.