



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

División Ciencias Biológicas y de la Salud

Unidad Iztapalapa

(Amaranthus hypochondriacus L.)
POR VÍA ENZIMÁTICA

TESIS

Para obtener el grado de
Especialista en Biotecnología

Presenta

**I.A. MONICA ALEJANDRA
ROBLES ARIAS**

Asesores

Dr. Gerardo Ramírez Romero

Dra. Hiran Moran Bañuelos

México D.F., 16 Julio 2015





Esta Tesis fue elaborada en el Departamento de Biotecnología de la
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.



Dedicatoria

Mamá, gracias por tu confianza, tu apoyo y tu amor incondicional por impulsarme a ser mejor cada día y a nunca rendirme, por todos esos momentos en los que has estado ahí para mí incluso cuando yo misma me aparto, gracias por enseñarme que la humildad, el agradecimiento, el trabajo constante y la dedicación son las bases para lograr todo lo que me propongo, te amo.

Hermanita, gracias por estar conmigo y nunca dejarme, por motivarme día a día, por hacerme reír para que me olvide un poco de mis preocupaciones y enojos, por tu amor incondicional, por nunca dejarme y por apoyarme siempre e incluso por soportarme cuando estoy de mal humor, te amo mucho pequeña.

A ti papá porque aunque no estés físicamente conmigo yo sé que nunca me has dejado sola, gracias por seguir siendo el mejor padre del mundo y sobre todo por esos hermosos momentos que pasamos como familia y que son los que me impulsan a seguir adelante.

A mi abuela, porque siempre que he necesitado algo ha estado para mí no importa si es de día o de noche o incluso si está lloviendo, gracias abuelita por todo.

A mis hermanos, Many, Dany y ahora Erihn por su apoyo en los malos y buenos momentos, por motivarme siempre, por todos los momentos divertidos que hemos pasado juntos, por todas esas risas y lágrimas compartidas, los quiero.

A mi tía y a mi tío porque en los momentos que más los necesite estuvieron conmigo, levantándose temprano para llevarme al colegio y por no dejar que me derrumbara.

Gracias madrina y padrino por estar al pendiente de mí y por haber compartido momentos tan especiales conmigo.

A mis amigos Enrique, Cristian y Carlos, que siempre han estado ahí cuando los he necesitado por enseñarme que los lazos de amistad pueden ser tan fuertes como los lazos de familia, los

Gracias Dios por la familia que me diste, porque me has puesto siempre en el momento y en el lugar indicado, por nunca desampararme incluso en los momentos más difíciles de mi vida.



Agradecimientos

Dr. Gerardo gracias por darme su apoyo y la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por compartir sus conocimientos, por motivarme a que siga creciendo, gracias por esas pláticas y por sus consejos cuando yo misma me saturó y quiero hacer tantas cosas.

Dra. Hirán por la motivación que me ha brindado desde que empecé este proyecto y por su apoyo y ayuda siempre que he necesitado algo.

Dra. Alma, gracias por su tiempo y sus consejos sobre este proyecto, porque a pesar del poco tiempo que conversamos sus consejos me fueron de gran ayuda, no solo sobre este trabajo sino por lo que sigue adelante en mi vida profesional.

Dra. Lilia muchas gracias por apoyarme, por siempre hacer que me supere y sobre todo por la confianza que me inyecta cada vez que platico con usted, gracias por sus palabras y los conocimientos que ha compartido conmigo porque el trabajar con usted fue el punto de partida para que me interesará por lo investigación.

Tomás muchas gracias por esas largas pláticas, porque el platicar conmigo siempre hizo que me tranquilizara, dejara los miedos atrás y aceptara lo bueno y lo malo de las cosas, porque con tus palabras me has hecho ver que es importante crecer profesionalmente y amar lo que haga pero más importante es crecer como persona y espiritualmente.

Les agradezco a todos los que me han ayudado a llegar hasta donde estoy.

Resumen

La alimentación es uno de los factores que más condiciona la salud de los individuos, ejerciendo un papel primordial sobre el desarrollo físico y el crecimiento, la reproducción y el rendimiento físico e intelectual. Actualmente la obesidad es uno de los problemas más importantes de salud pública en México. Coexistiendo paradójicamente con la desnutrición, una epidemia de sobrepeso y obesidad crece y afecta a la mayor parte del mundo, esto debido a que la dieta suele contener una cantidad excesiva de carbohidratos, específicamente los productos afines a maíz y trigo, los cuales son deficientes en lisina (Lys) y triptófano (Trp). El objetivo del presente trabajo es la extracción de la proteína de la semilla amaranto seguida de los lípidos que la componen, para lo que se realizó una hidrólisis enzimática empleando la proteasa de *Bacillus licheniformis*, al residuo obtenido se le realizó la extracción de aceite por el método de soxhlet usando hexano como solvente. La proteína extraída se agregó en diferentes proporciones a pan de caja elaborado con harina de trigo para evaluar el aumento en el contenido proteico, el perfil de textura y la aceptabilidad por parte de los consumidores. Al aceite se le cuantificó la capacidad antioxidante y se midió el índice de acidez para conocer si el pre-tratamiento enzimático tiene algún efecto en ello.

Al realizar una hidrólisis enzimática de 4 horas usando la proteasa en una concentración de 3.6U/g se obtuvo un rendimiento de extracción de proteínas de 84.4%; este extracto acuoso de proteína se empleó como el agua necesaria para la elaboración del pan, se adicionaron diversas proporciones de proteína hidrolizada:agua (0.5:1, 1:1) de proteína lo máximo que se puede adicionar al pan de caja para que sea aceptado por el consumidor, con un aumento hasta del 5% en el contenido proteico respecto al pan control.

Con la extracción del aceite a partir de harina pre-tratada por 4 horas empleando la proteasa a una concentración tanto del 2.4U/g como del 0.036 tiene una extracción de grasa del 20% en comparación con el control que es del 9%.

El aceite obtenido mediante soxhlet de la harina pre-tratada durante 4 horas con 3.6U/g de proteasa presenta un índice de acidez de 0.12, sin embargo el aceite obtenido a partir de la harina pre-tratada por 1 hora tanto con una concentración de enzima de 2.4 U/g y 3.6U/g muestra la mayor capacidad antioxidante (58%).

El aceite obtenido de la harina pre-tratada es de mejor calidad y se obtiene un mayor rendimiento de extracción del mismo.

Abstract

Food is one of the factors that affect the health of individuals, exerting a major role on the physical development and growth, reproduction and the physical and intellectual performance. Obesity is currently one of the most important public health problems in Mexico. Paradoxically coexisting with under nutrition, an epidemic of overweight and obesity is growing and affects most of the world that is because diet usually contains an excessive amount of carbohydrates, specifically related do maize and wheat products which are deficient in lysine (Lys) and tryptophan (Trp). The aim of this work is the extraction of the amaranth seed protein followed by lipids, for which an enzymatic hydrolysis is carried out using protease from *Bacillus licheniformis*, the residue obtained from this hydrolysis was subjected to soxhlet extraction using hexane as solvent.

The protein hidrolisate protein was added to wheat bread in different proportions to evaluate the increase in protein content, texture profile and acceptability. Antioxidant capacity and acid measure from the oil was quantified to determine whether enzymatic pre-treatment has any effect on it.

The hydrolysis using protease 3.6 U/g at 4 hours 84.4% yield of protein was reached; this aqueous protein hidrolisate was used as the water needed for making bread, different proportions protein hidrolisate/water were added (0.5:1 and 1:1). The most of protein hidrolisate:water that can be added to bread to be accepted is 0.5:1 which means an increase of 5% in protein content.

However the oil extracted from the pre-treated flour for 4 hour with 2.4 U/g and 3.6 U/g of protease have a fat removal of 20% compared to the control 9%.

The oil obtained from the pre-treated flour for 4 hours using protease at a concentration of 3.6 U/g has and acid value of 0.12, however the oil obtained from flour pre-treated for 1 hour with an enzyme concentration of 2.4 U/g and 3.6 U/g showed the highest antioxidant capacity (58%).

The oil obtained from the pre-treated flour is of better quality and higher yields of extraction.



Índice

Dedicatoria	iii
Agradecimientos.....	iv
Resumen	v
Abstract	vi
Índice	vii
Índice de cuadros	ix
Índice de figuras.....	ix
1 Introducción.....	1
2 Antecedentes	2
2.1 Características de la planta	2
2.2 Características de la semilla	3
2.3 Proteínas.....	4
2.4 Lípidos.....	5
2.5 Escualeno.....	6
2.6 Fitoesteroles.....	7
2.7 Antioxidantes	7
2.8 Hidrólisis enzimática	8
2.9 Proteasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	9
2.10 Calidad en el aceite	9
2.10.1 Índice de acidez	9
2.11 Análisis de perfil de textura (TPA).....	10
3 Justificación.....	12
4 Hipótesis	12
5 Objetivo General	13
5.1 Objetivos Particulares	13
6 Metodología.....	14
6.1.1 Proceso general de trabajo	14
7 Materiales y Métodos	15



7.1 Material biológico y químico	15
7.2 Obtención del extracto acuoso de proteína de amaranto.	16
7.2.1 Obtención de la harina	16
7.2.2 Inactivación de enzimas nativas de amaranto.....	16
7.2.3 Hidrólisis enzimática	16
7.2.4 Interrupción de la actividad enzimática	16
7.2.5 Centrifugación	16
7.2.6 Secado.....	16
7.2.7 Determinación de la efectividad de la extracción de proteínas	17
7.3 Obtención del aceite de amaranto.....	18
7.4 Análisis fisicoquímicos	18
7.4.2 Determinación de actividad antioxidante	19
7.5 Adición del extracto acuoso de proteína hidrolizada a un alimento	19
7.6 Análisis de textura.....	20
7.6.1 Preparación de las muestras de masa	20
7.6.2 Determinación del análisis de perfil de textura de la masa	20
7.6.3 Preparación de las muestras de miga.....	20
7.6.4 Determinación del análisis de perfil de textura de la miga de pan	20
7.7 Análisis físico del pan	21
7.8 Análisis sensorial	21
7.9 Cuantificación de proteínas del pan de caja.....	21
8 Resultados y discusiones.....	22
8.1 Obtención del extracto de proteína	22
8.2 Determinación del rendimiento de extracción de proteína.....	23
8.3 Extracción del aceite	24
8.4 Análisis fisicoquímico del aceite de amaranto.....	25
8.4.1 Índice de acidez	25
8.4.2 Actividad antioxidante	26
8.5 Pan de caja adicionado con proteína de amaranto.....	27
8.5.1 Análisis de perfil de textura de masa y de miga.....	27
8.5.2 Análisis físico del pan de caja	29
8.5.3 Cuantificación de proteína del pan	30
8.5.4 Análisis sensorial	31
9 Conclusiones	32
10 Bibliografía.....	33
11 Apéndice	36
11.1 Curva patrón de Bradford.....	36
11.2 Curva patrón de DPPH.....	37
11.3 Encuesta realizada para conocer la aceptación del pan adicionado con proteína	38

Índice de cuadros

Cuadro 1. Composición de la semilla de amaranto (INIAP, 2013).	4
Cuadro 2. Contenido de aminoácidos esenciales en el grano de amaranto y algunos cereales mg AA/g N (Bressani, 2006).	5
Cuadro 3. Contenido de ácidos grasos en el aceite de la semilla de amaranto y otros productos. 6	
Cuadro 4. Análisis de perfil de textura de la masa con y sin proteína hidrolizada de amaranto y su desviación estándar.	27
Cuadro 5. Análisis de perfil de textura en pan con y sin proteína hidrolizada de amaranto.	28
Cuadro 6. Análisis físico del pan de caja con y sin extracto de proteína.	29
Cuadro 7. ANOVA del agrado del pan de caja.	31

Índice de figuras

Figura 1. Planta de amaranto	2
Figura 2. Semilla de amaranto.	3
Figura 3. Estructura del escualeno	6
Figura 4. Estructura de los principales fitoesteroles y fitoestenoles	7
Figura 5. Mecanismo de reacción de reducción del radical DPPH.	8
Figura 6. Gráfica general del análisis de perfil de textura.	10
Figura 7. Extracto obtenido al usar las enzimas Viscozyme y pectinasa	22
Figura 8. Extracto obtenido al usar la proteasa de Bacillus licheniformis	22
Figura 9. Rendimiento de extracción de proteína en distintos tiempos de hidrólisis	23
Figura 10. Grasa extraída (%) del residuo de la hidrólisis enzimática del amaranto	24
Figura 11. Índice de acidez del aceite de amaranto obtenido del residuo de la hidrólisis enzimática.	25
Figura 12. Actividad Antioxidante (%) del aceite de amaranto obtenido a partir de la hidrólisis enzimática.	26
Figura 13. Rebanadas del pan de caja a) control, b) 40% de proteína y c) 50% de proteína.	29
Figura 14. Aumento de proteína (%) al adicionar el extracto de proteína de amaranto del pan control y los panes adicionados con proteína hidrolizada de amaranto.	30
Figura 15. Aceptación de las 3 muestras diferentes de pan de caja.	31

1 Introducción

La alimentación es uno de los factores que más condiciona la salud de los individuos, ejerciendo un papel primordial sobre el desarrollo físico y el crecimiento, la reproducción y el rendimiento físico e intelectual (Oliveras López et al., 2006).

Actualmente la obesidad es uno de los problemas más importantes de salud pública. Coexistiendo paradójicamente con la desnutrición, una epidemia de sobrepeso y obesidad crece y afecta a la mayor parte del mundo.

El incremento en la prevalencia de malnutrición suele contener una cantidad excesiva de carbohidratos, específicamente los productos afines a maíz y trigo, los cuales son deficientes en lisina (Lys) y triptófano (Trp). Cuando existe una disminución en los aminoácidos séricos, el organismo tiende a obtenerlos de la degradación de tejidos corporales, induciendo un retardo en el crecimiento de jóvenes y una pérdida de proteína corporal en adultos. La importancia del consumo de estos aminoácidos debe también ser considerada en relación a su función específica como precursores de la serotonina, neurotransmisor que tiene un papel importante como neuromediador involucrado en la regulación central de la ingestión alimentaria, el estado de ánimo, la ansiedad, depresión, agresión y el sueño (Alvarez , E . Horjales, E. de Gortari , P . Joseph-Bravo, 2006).

Recientemente la planta de amaranto ha despertado un gran interés por parte de la comunidad científica debido a sus características y propiedades. La mayoría de la población asocia el consumo de amaranto a sus propiedades nutricionales y más específicamente al alto contenido de proteína. Dentro de la diversidad de componentes en el amaranto existen algunos que son importantes en la reducción del colesterol, ya que contiene escualeno, tocotrienoles, isoprenoides y otros factores. Algunos efectos sobre los lípidos corporales consisten en una disminución del colesterol hepático y plasmático (Algara, P. Gallegos, J. Reyes, 2013).

Los ácidos grasos, en especial el omega-3 son esenciales para la formación y el adecuado funcionamiento del cerebro humano. La ingesta deficiente de ellos, produce diversas disfunciones en la neurotransmisión, lo que puede ser una de las causas de diversos trastornos psiquiátricos como la depresión mayor y la esquizofrenia (Hibbeln, Ferguson, & Blasbalg, 2006).

El fin de este trabajo fue extraer la mayor cantidad de proteína mediante hidrólisis enzimática para ser adicionado a los alimentos elevando su contenido proteico y extraer los lípidos del residuo de la hidrólisis enzimática para observar si hay cambios en el rendimiento de extracción y calidad del aceite en su comparación del método convencional.

2 Antecedentes

2.1 Características de la planta

El amaranto es un cultivo que se desarrolló en Mesoamérica desde antes de la llegada de los españoles, se mantuvo en el olvido hasta su redescubrimiento en los años 1970's.

El amaranto pertenece a la familia de las amarantáceas compuesta por 70 géneros. El género *Amaranthus* comprende alrededor de 60 especies. Es una planta dicotiledónea no gramínea que produce semillas tipo grano, por lo que se le ha denominado un pseudo cereal. Por el tipo de usos que tiene, el amaranto se clasifica también en amaranto de graneado y foliáceo, aunque también se usa con fines ornamentales. Los primeros se reconocen como originarios de América y comprenden tres especies: (*A. cruentus*, *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*, mientras que entre los amarantos productores de hoja, se encuentran *A. cruentus*, *A. dubius*, *A. hybridus* y *A. tricolor*, todos ellos cultivados principalmente en Asia y África (Espitia, 2012).

Del amaranto se pueden consumir tanto sus hojas como sus semillas, ambas con un elevado contenido de proteínas. Además la planta es capaz de crecer en un amplio rango de condiciones ambientales, incluida la acumulación de sales (Orosco, 2013).

La planta puede alcanzar una altura de 2-2.5 m. Las hojas pueden ser ovaladas o elípticas, de borde entero, con un tamaño que varía de los 6.5-15 cm. Sus inflorescencias pueden ser terminales o axilares, con colores que van del anaranjado, rosado, hasta el púrpura (Figura 1) (Orosco, 2013).



Figura 1. Planta de amaranto

2.2 Características de la semilla

Las semillas de amaranto son granos en forma de discos que tienen un diámetro de entre 1 y 2 mm. Su color varía del blanco al negro, pasando por el dorado y morado, dependiendo de la especie de la cual provengan (Figura 2)



Figura 2. Semilla de amaranto

El componente principal de la semilla de amaranto es el almidón, que representa entre el 50 y 60% (Cuadro 1) de su peso seco. El diámetro del gránulo de almidón posee un tamaño de entre 1-3 micrones, mucho menor que el de otras especies vegetales, motivo por el cual su digestión se ve facilitada (Orosco, 2013).

Las semillas de amaranto poseen niveles elevados de proteína total (12-18%), así como del aminoácido lisina generalmente deficiente en otros cereales. Este hecho convierte a las proteínas de amaranto en objetos muy atractivos desde el punto de vista nutricional, capaces de complementar proteínas de otras fuentes como cereales, leguminosas y oleaginosas. Las mismas podrían ser incluidas en la alimentación humana bajo la forma de harina, concentrados y/o aislados proteicos (Orsini, M; Tironi, V; Añon, 2011), mientras que los lípidos (5-8.1%) son una rica fuente de fitoesteroles, incluyendo escualeno. Por ello, se sugiere que su consumo puede ser benéfico en personas con problemas de hipertensión, enfermedades cardiovasculares asociadas a hiperlipidemias, diabetes y ofrece, además, el potencial de prevenir algunos tipos de cáncer (Espitia, 2012).

Cuadro 1. Composición de la semilla de amaranto (INIAP, 2013).

Componente	Contenido (%)
Carbohidratos	50 - 60
Proteína	12 - 18
Grasa	5 - 8.1
Fibra	2.2 - 5.8
Cenizas	2.8 - 4.4

2.3 Proteínas

El contenido promedio de proteína en la semilla de amaranto es del 18% mientras que en el trigo es de 10%, en el arroz 6% y en el maíz del 5.5%. El contenido de proteína varía dependiendo del tipo de amaranto y las condiciones de su cultivo. La semilla de amaranto contiene distintos tipos de proteína de las cuales, la mayoría de los resultados respaldan que la albúmina es la principal fracción (48.9 a 65%). La fracción de gluteninas es la segunda en abundancia (22.4 a 42.3%). Las globulinas representan el 13.7 a 18.1% de la proteína de la semilla. La mayoría de los datos señalan que las prolaminas son las de menor abundancia con valores entre 1.0 a 3.2% (Mokrejs, Janacova, Kolomaznik, Vasek, & Svoboda, 2010).

El amaranto cuenta con una proteína de excelente calidad, ya que es la única entre los vegetales de su tipo que contiene todos los aminoácidos esenciales: leucina, lisina, valina, metionina, fenilalanina, triptófano, treonina e isoleucina. Estos aminoácidos básicos para la buena salud del organismo, se encuentran en mayor proporción en la proteína del amaranto que en la de muchos otros cereales como el trigo, arroz, maíz, etc. (Cuadro 2). De hecho, casi todos los cereales tienen una deficiencia del amino ácido esencial lisina y por lo tanto se constituye en el amino ácido limitante para muchas de las proteínas de origen vegetal. El amaranto en cambio, contiene el doble de lisina que la proteína del trigo, el triple que la del maíz y es equiparable en contenido a la proteína de la leche de vaca, la cual se considera el "gold standard" de excelencia nutricional. El amaranto es, por lo tanto, un complemento nutricional óptimo y balanceado en comparación con los cereales convencionales (Bressani, 2006).

Cuadro 2. Contenido de aminoácidos esenciales en el grano de amaranto y algunos cereales mg AA/g N (Bressani, 2006).

Aminoácidos	Amaranto	Maíz	Trigo	Arroz	Sorgo	Patrón FAO
Lisina	358	180	160	235	170	340
Treonina	245	248	168	233	224	250
Metionina	124	116	89	107	108	-
Cistina	125	81	128	81	104	220
Valina	257	319	270	416	357	310
Isoleucina	230	289	253	279	340	250
Leucina	358	810	391	513	1004	440
Fenilalanina	272	284	288	299	311	-
Tirosina	227	382	218	272	172	380
Triptófano	86	38	72	64	70	60
Histidina	159	129	119	100	120	-
Arginina	534	220	279	343	237	-

2.4 Lípidos

Los lípidos son un constituyente nutritivo muy importante de las semillas de amaranto, con triacilgliceroles (TAGs), fosfolípidos, escualeno y vitaminas liposolubles como el tocoferol que son los principales componentes de la fracción lipídica. Varios compuestos menores como los fitoesteroles, ceras, y alcoholes terpenos también han sido reportados en diferentes especies de amaranto (Venskutonis & Kraujalis, 2013).

Se ha reportado que el contenido de aceite en semillas de amaranto oscila entre el 5 al 8% y depende de las condiciones ambientales, especies de planta y variedad, así como algunos otros factores. El aceite de amaranto es considerado como un aceite comestible de alta calidad debido a los remarcables porcentajes de ácidos grasos insaturados linoleico y oleico, los cuales constituyen del 70-80% (Kraujalis & Venskutonis, 2013). El aceite de amaranto es similar en composición al aceite de maíz y de soya (Cuadro 3), sin embargo no tiene los factores antinutricionales tan frecuentes en leguminosas como esta última (Camacho et al., 2008).

El aceite de amaranto promueve actividades biológicas interesantes gracias a sus componentes entre los que hay que destacar a los tocoferoles y tocotrienoles conocidos por su actividad antioxidante, a los fitoesteroles los cuales disminuyen el colesterol en suero y el escualeno el cual tiene actividad anticancerígena e hipolesterolemia. Además, varios de los componentes del aceite se han utilizado para el cuidado de la salud de la piel, o como cosméticos, lo cual amplía el campo de aplicación del aceite de amaranto además de su aplicación en alimentos funcionales. (González, 2012).

Cuadro 3. Contenido de ácidos grasos en el aceite de la semilla de amaranto y otros productos.

Ácido graso	Ácido graso (%)		
	Amaranto	Maíz	Soya
Palmítico	18.8	11.0	10.7
Esteárico	3.8	2.0	3.9
Oleico	24.1	24.1	22.8
Linoleico	51.0	61.9	50.8
Linolénico	0.8	0.7	6.8

Durante el proceso de expansión, el grano de amaranto es expuesto a temperaturas muy elevadas, aunque por corto tiempo, y en algunas ocasiones se expone a aire a contracorriente, para obtener un máximo rendimiento en volumen, lo que provoca la aparición de productos de oxidación proveniente de los ácidos grasos. Este proceso induce un aumento del 15.5% en el contenido de escualeno (Rodas & Bressani, 2009).

2.5 Escualeno

El escualeno (Figura 3) es un intermediario triterpeno en la ruta de la biosíntesis del colesterol, tiene actividades biológicas y farmacológicas así como usos potenciales en los cosméticos dermatológicos. El aceite de tiburón es considerado como la fuente más rica de escualeno, sin embargo cantidades razonables han sido también encontradas en aceites de olivo, germen de trigo, amaranto y arroz (Venskutonis & Kraujalis, 2013).

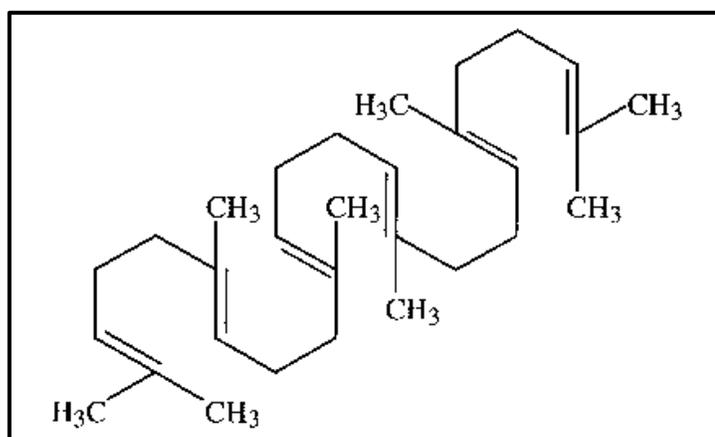


Figura 3. Estructura del escualeno

El escualeno muestra algunas ventajas para la piel como emoliente, antioxidante, hidratante y agente antitumoral. También es usado como un material tópicamente aplicado a formulaciones como emulsionantes lípidos y como vehículo de lípidos nanoestructurados.

El contenido de escualeno en *A. cruentus* es de 2.26% a 5.67% en *A. hypocondriacus* es de 3.6% y en *A. tricolor* es de 6.1% (Venskutonis & Kraujalis, 2013).

2.6 Fitoesteroles

Los fitoesteroles y fitoestanoles (Figura 4) son esteroides de origen vegetal y cuya estructura química es muy similar a la del colesterol. Sin embargo, los fitoesteroles difieren estructuralmente del colesterol (que posee 27 carbonos, C27) por la presencia de sustituyentes de tipo metilo o etilo en la cadena lateral de la molécula. Se estima que la ingesta diaria de fitoesteroles, la que obviamente es muy variable ya que depende de los hábitos alimentarios de la población, se encuentra en un rango que va desde los 160 mg/día hasta los 500 mg/día. Si bien los fitoesteroles químicamente identificados suman más de 25 estructuras diferentes, son tres los que están en mayor proporción en sus fuentes de origen: el α -sitosterol (C29), el campesterol (C28) y el estigmasterol (C29), quienes en su conjunto constituyen el 95%-98% de los fitoesteroles identificables en extractos vegetales.

La literatura científico-médica describe para los fitoesteroles y fitoestanoles una gran variedad de efectos fisiológicos. Se les atribuye propiedades antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y fungicidas (14). Sin embargo, el efecto mejor caracterizado y científicamente demostrado, es el efecto hipocolesterolémico, tanto a nivel del colesterol total como del colesterol-LDL (Palacio, 2012).

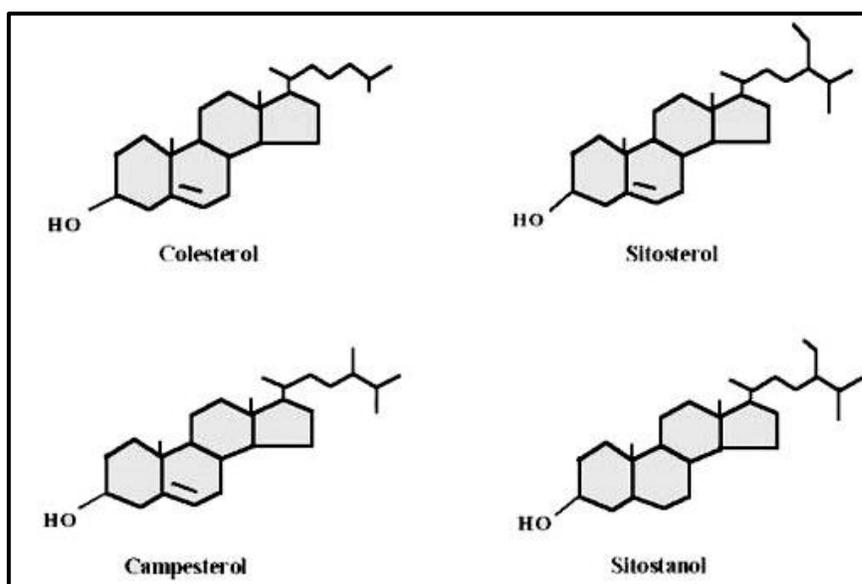


Figura 4. Estructura de los principales fitoesteroles y fitoestanoles

2.7 Antioxidantes

Son sustancias sintéticas o naturales que previenen la oxidación o inhiben reacciones promovidas por oxígeno y peróxidos. Muchas de estas sustancias son utilizadas como conservadores de varios productos para evitar su deterioro. Los antioxidantes son fuertes agentes reductores debido a las propiedades de óxido reducción de sus grupos hidroxilo. Ejercen sus propiedades protectoras previniendo la producción de radicales libres o

neutralizando los producidos en el cuerpo (Serrano-Maldonado, 2010). Por definición la actividad antioxidante es la capacidad de un compuesto de inhibir la degradación oxidativa, en general, la actividad antioxidante aumenta cuando existen grupos hidroxilo o grupos donadores de hidrógeno en la estructura molecular del compuesto, los principales compuestos que tienen actividad antioxidante son: carotenoides, fosfolípidos, tocoferoles (vitamina E), vitamina C, compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas y algunos aminoácidos.

El uso de antioxidantes naturales, como aditivos alimentarios para la inactivación de radicales libres tiene relevancia actual, no solo por las propiedades reductoras, sino porque son naturales y el consumidor los aprecia.

Una de las técnicas para determinar la actividad antioxidante es midiendo la reducción del radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), en su forma radical tiene color púrpura con una absorción máxima a 517 nm, en su forma reducida después de la acción de los antioxidantes sobre el radical, el DPPH se torna a color amarillo. La reacción de reducción del radical DPPH se observa en la Figura 5. El cambio de coloración de este compuesto se monitorea para determinar la concentración de antioxidantes en la muestra de estudio (Brand-Williams *et al.*, 1995).

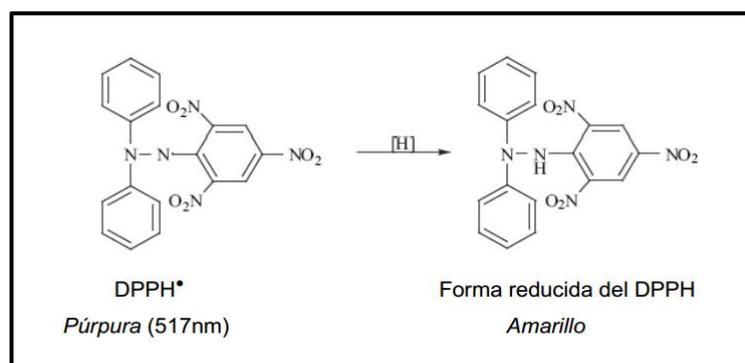


Figura 5. Mecanismo de reacción de reducción del radical DPPH

2.8 Hidrólisis enzimática

En la hidrólisis enzimática de proteínas por acción de enzimas proteolíticas, la composición final y por tanto el uso de los hidrolizados dependerá principalmente de la fuente proteica, del tipo de proteasa usada, de las condiciones de hidrolisis y del grado de la hidrolisis alcanzado en la reacción. Los hidrolizados se utilizan ampliamente en la tecnología alimentaria por sus propiedades nutricionales o funcionales (solubilidad, poder emulsificante, capacidad espumante, etc.) (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008)

Para ello, la hidrólisis enzimática presenta indudables ventajas frente a la tradicional hidrólisis química, ácida o alcalina, entre las que cabe mencionar las siguientes:

- Selectividad. Las enzimas son específicas para un tipo determinado de enlace y, por lo tanto no es frecuente la aparición de productos de degradación. En cambio, la poca selectividad de los ataques ácido y básico y su difícil control conduce inevitablemente a la aparición de productos de degradación que pueden llegar a ser tóxicos.
- Condiciones moderadas de temperatura y pH, lo que evita la desnaturalización de las proteínas.
- Se mantiene el valor nutritivo, ya que no se produce degradación de los componentes separados, mientras que la hidrólisis alcalina destruye los aminoácidos arginina y cisteína y la hidrólisis ácida elimina el triptófano y desamina los aminoácidos serina y treonina.

No obstante, en la hidrólisis enzimática de proteínas es necesario separar o desnaturalizar la enzima y trabajar en condiciones asépticas, ya que por ser un proceso relativamente lento, puede producirse contaminación microbiana de la mezcla reaccionante. (Guadix, 2010)

2.9 Proteasa de *Bacillus licheniformis*.

La proteasa de *B. licheniformis* es una enzima utilizada para romper las proteínas mediante la hidrólisis de los enlaces peptídicos, tiene una amplia especificidad de sustrato y puede hidrolizar la mayoría de los enlaces peptídicos dentro de una cadena de proteína. Es activa entre pH 6.5 y 8.5 y tiene una temperatura óptima de 60 °C.

La proteasa se utiliza para degradar las proteínas, para el estudio de inhibidores de la proteasa y para estudiar la cinética de la inactivación térmica. (Sigma-Aldrich, 2015)

2.10 Calidad en el aceite

2.10.1 Índice de acidez

El índice de acidez se define como los miligramos de NaOH o KOH necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres presentes en aceite o grasas y constituye una medida del grado de hidrólisis de una grasa.

Todos los aceites y las grasas tienen ácidos grasos libres y algunos los tienen en grandes cantidades. La causa de la existencia de ácidos grasos libres es la actividad enzimática de las lipasas. Todas las semillas y los frutos oleaginosos tienen presentes algunas de estas enzimas lipolíticas que se encuentran tanto en el embrión como en el mesocarpio del fruto. Por este motivo, el aceite de arroz y el de palma, por lo general, tienen una acidez muy alta. Los aceites extraídos de semillas descompuestas tienen acidez alta, al igual que los aceites almacenados durante mucho tiempo.

El índice de acidez es considerada como una medida del grado de descomposición del aceite o grasa, por acción de las lipasas o por alguna otra causa. La descomposición se acelera por la luz y el calor. Como la rancidez, se acompaña usualmente por la formación de ácidos grasos libres, entonces la determinación es, con frecuencia, usada como indicación general de la condición y comestibilidad de los aceites y grasas (Herrera, C. Bolaños, N. Lutz, 2003).

2.11 Análisis de perfil de textura (TPA)

El análisis de perfil de textura está basado en el reconocimiento de la textura como una propiedad multiparamétrica y en la clasificación de algunas de sus características.

La textura de los alimentos no tiene una definición exacta, precisa y satisfactoria, sin embargo se puede decir que posee las siguientes características: no está directamente relacionada con el olor o el gusto, no se trata de una propiedad sino de un conjunto de propiedades, estas relacionadas con la mecánica y la reología, y finalmente se trata de un grupo de propiedades físicas que derivan de la estructura del alimento (González, R. Cabeza R., 2005).

El perfil de textura está basado en el ensayo fuerza vs tiempo en que se logra curva como la representadas en las Figura 6.

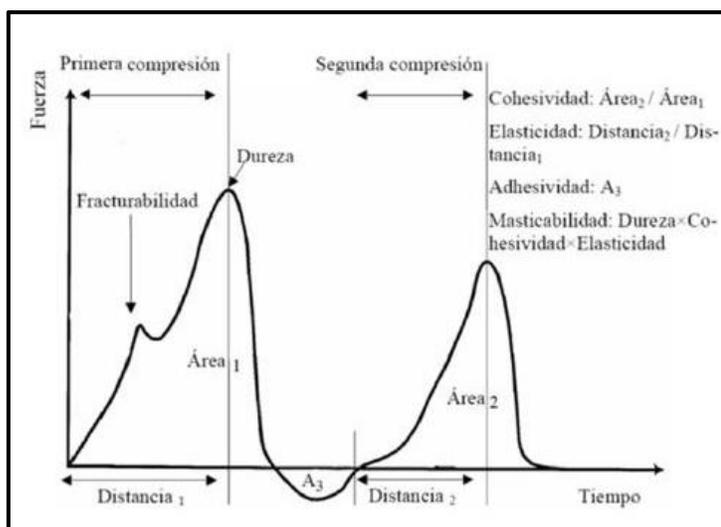


Figura 6. Gráfica general del análisis de perfil de textura.

Del análisis de la curva de la figura se logran siete parámetros texturales, de los cuales cinco se obtienen de medidas y dos se logran por medio de cálculo. (Osuna, 2013)

- Fracturabilidad. Es la fuerza en el primer quiebre significativo de la curva.
- Dureza. Es la fuerza máxima que tiene lugar, en cualquier tiempo durante el primer ciclo de compresión. Definida también como la fuerza necesaria para comprimir una rodaja de pan hasta un 50% del espesor original.
- Elasticidad. Es una medida de cuánto recupera su altura o forma original el alimento luego de ser sometido a una deformación. Estrictamente se define como la altura que el alimento recupera durante el lapso transcurrido entre el final de la primera mordida y el comienzo de la segunda.
- Masticabilidad. Sensorialmente se define como la fuerza requerida para desintegrar un alimento sólido hasta que esté listo para ser deglutido.
- Adhesividad. Es la energía necesaria para superar las fuerzas atractivas entre la superficie del alimento y la superficie del material con el que está en contacto.
- Cohesividad. La cohesividad representa el punto límite hasta el cual puede deformarse el material antes de romperse

3 Justificación

En México hay un incremento notable en los problemas de malnutrición como el sobrepeso, la obesidad y las enfermedades cardiovasculares debido principalmente a los malos hábitos de alimentación, esto es injustificable ya que en México contamos con alimentos que ofrecen los nutrientes necesarios para tener una buena salud, dentro de los cuales se encuentra el amaranto.

El amaranto es un alimento funcional que presenta no solo una cantidad considerable de proteínas, sino también una excelente calidad de las mismas al presentar todos los aminoácidos esenciales, en especial el aminoácido lisina el cual es el limitante en muchos cereales por lo que es una alternativa para complementar la alimentación. Sumado a esto el aceite de amaranto proporciona efectos benéficos a la salud al presentar altos niveles de escualeno, compuestos antioxidantes y un considerable balance de los ácidos omega 6 y omega 3.

Por esta razón, para combatir este creciente problema que afecta tanto a niños como adolescentes, adultos y ancianos sería importante incluir el amaranto en la alimentación diaria ya sea consumirlo directamente o en alimentos adicionados con amaranto. Desafortunadamente el amaranto no puede ser introducido directamente en su totalidad en todos los alimentos, debido a que no posee las propiedades reológicas necesarias para obtener las características deseadas en el producto final, es por ello que el presente trabajo busca extraer la mayor cantidad de proteínas y lípidos de la semilla de amaranto con el fin de que se puedan agregar a los alimentos y con ello elevar no sólo su contenido proteico sino adicionar los aminoácidos faltantes a la dieta, así como los compuestos antioxidantes que posee.

4 Hipótesis

La extracción del aceite y la proteína de la semilla de amaranto sin comprometer su funcionalidad así como la de los demás elementos que componen a la semilla, dará lugar a tener una grasa y una proteína con todos efectos benéficos para la salud y otros usos industriales además de tener listos el resto de los componentes para una posterior extracción.

5 Objetivo General

Obtener un extracto de aceite y proteína de amaranto mediante un método que no comprometa su funcionalidad y así adicionarlos a los alimentos para elevar su valor nutricional sin afectar la aceptabilidad del producto por los consumidores.

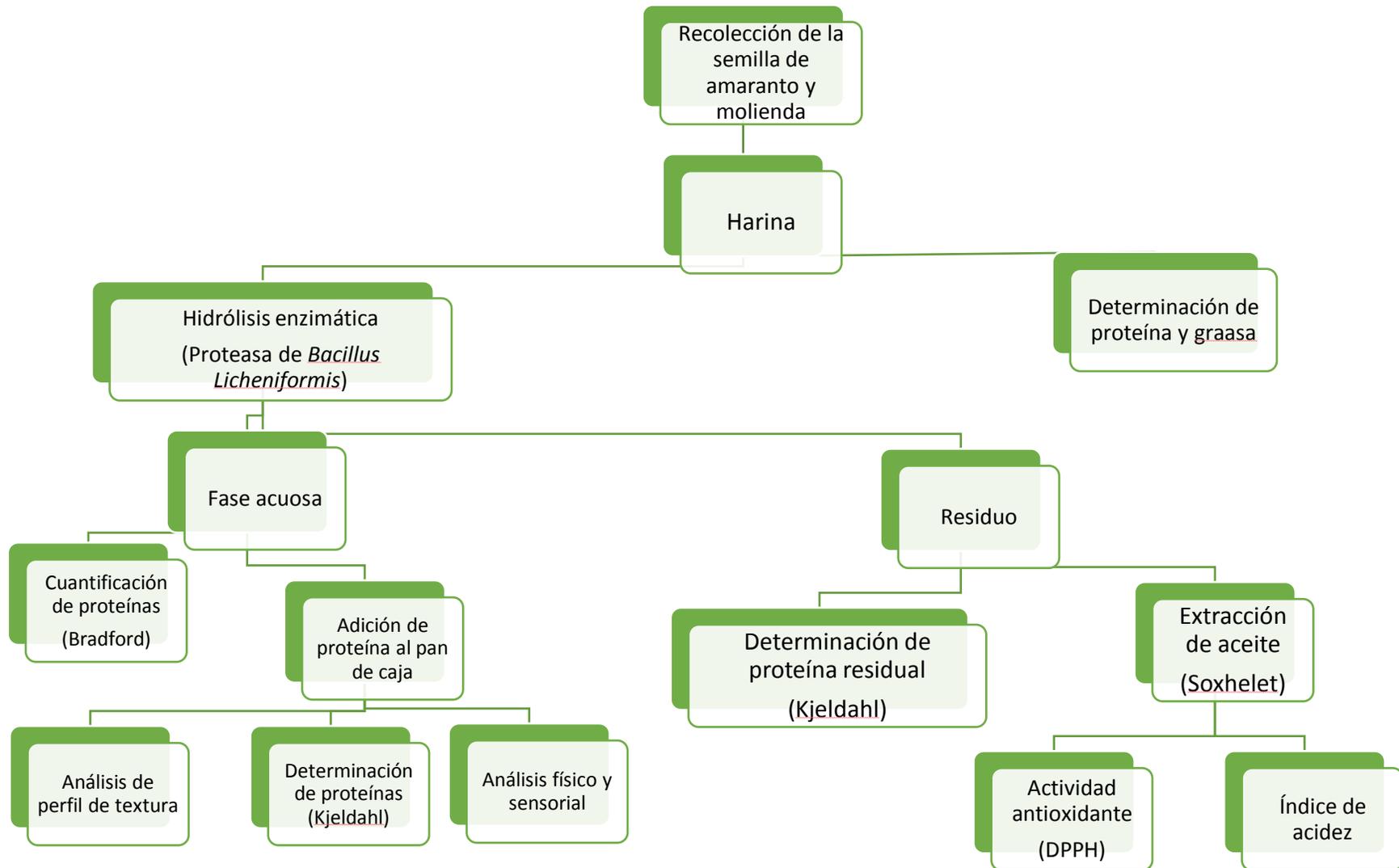
5.1 Objetivos Particulares

- ✚ Realizar la extracción de proteína mediante hidrólisis enzimática a semillas de amaranto.
- ✚ Cuantificar la cantidad de proteína extraída mediante hidrólisis enzimática.
- ✚ Cuantificar el aceite extraído del residuo sólido de la hidrólisis.
- ✚ Determinar la actividad antioxidante y el índice de acidez del aceite de amaranto.
- ✚ Adicionar el extracto de proteína al pan de caja determinar su contenido proteico.
- ✚ Verificar la aceptabilidad del producto adicionado con proteína de amaranto.



6 Metodología

6.1.1 Proceso general de trabajo



7 Materiales y Métodos

7.1 Material biológico y químico

Se obtuvieron semillas de amaranto (*Amaranthus hypocondriacus*) de la comunidad productora de Cuautla Morelos, las cuales fueron limpiadas para la eliminación de cualquier materia extraña.

Las enzimas empleadas fueron: proteasa de *Bacillus licheniformis*, pectinasa de *Aspergillus aculeatus* y *Vyscozyme* fueron proporcionados por Sigma-Aldrich

Los reactivos utilizados fueron:

- Hexano marca J.T. Baker.
- Hidróxido de sodio (NaOH) marca J.T. Baker.
- Etanol 96° G.L.
- Fenolfatelína marca J.T. Baker.
- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) marca Sigma-Aldrich.
- Trolox marca Sigma-Aldrich.
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3) marca Sigma-Aldrich.
- Ácido clorhídrico (HCl) marca J.T. Baker.
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) marca J.T. Baker.
- Ácido bórico ($\text{B}(\text{OH}_3)$) marca J.T. Baker.
- Verde de bromocresol marca Sigma-Aldrich.
- Rojo de metilo marca Hycel.
- Dióxido de selenio (SeO_2) marca Merk.
- Sulfato de potasio (K_2SO_4) marca J.T. Baker.
- Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) marca J.T. Baker.
- Reactivo de Bradford J.T. Baker.
- Albúmina de huevo.

7.2 Obtención del extracto acuoso de proteína de amaranto.

7.2.1 Obtención de la harina

La semilla de amaranto fue molida en un molino de café Kraups GX4100 y posteriormente se pasó a través de un tamiz de 80 mesh.

7.2.2 Inactivación de enzimas nativas de amaranto

Se realizó una suspensión de harina de amaranto en agua destilada en una proporción 1:4 (agua:amaranto) a 90°C y se mantuvo la temperatura durante 10 minutos, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente de acuerdo a lo reportado por (Hanmoungjai, Pyle, & Niranjana, 2001).

7.2.3 Hidrólisis enzimática

Se ajustó la temperatura de la suspensión a 50 °C para la proteasa y a 60°C para la pectinasa y Viscozyme, se agregaron las enzimas en una proporción 0.024 U/g y 0.036 U/g para favorecer la actividad enzimática la suspensión fue llevada a un baño termorregulado con agitación marca LabTech modelo LSB-015S durante 1 a 4 horas.

7.2.4 Interrupción de la actividad enzimática

Para detener la actividad enzimática, la suspensión se llevó a un baño a 90°C y se mantuvo esta temperatura en la suspensión durante 10 minutos.

7.2.5 Centrifugación

La suspensión fue centrifugada en una centrifuga Eppendorf modelo 5804R a 6000 rpm durante 40 minutos a 21 °C.

El sobrenadante fue separado de la fase sólida y se mantuvo almacenado en refrigeración hasta su uso.

7.2.6 Secado

El residuo sólido obtenido en la centrifugación fue secado en una estufa Riossa a 60 °C durante 24 horas, finalmente fue molido para obtener una harina y realizar la cuantificación de proteína residual y la posterior extracción del aceite.

7.2.7 Determinación de la efectividad de la extracción de proteínas

7.2.7.1 Cuantificación de proteína hidrolizada en medio acuoso

Para determinar la cantidad de proteínas en el medio acuoso obtenido se realizó su cuantificación mediante el método de Bradford.

A 1 ml de muestra se le agregó 1 ml del reactivo de Bradford, se mantuvo en obscuridad durante 1 hora y se procedió a su lectura en un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 20.

7.2.7.2 Cuantificación de proteína residual

Para conocer el contenido de proteína no extraída se realizó una determinación de proteína por el método de Kjeldahl.

Se pesaron aproximadamente 0.15 g de la harina en un matraz de micro-Kjeldahl, se añadieron 2.5 ml de H₂SO₄ y aproximadamente 1.0 g de mezcla catalizadora (2.5 g de dióxido de selenio, 100 g de sulfato de potasio y 20 g de sulfato de cobre pentahidratado).

Se sometió a digestión la muestra en el aparato de micro-Kjeldahl bajo una campana de extracción usando baja temperatura al inicio y aumentando el calor a medida que procede la digestión, rotando los matraces periódicamente para asegurar que se digiere toda la muestra. La digestión se llevó a cabo durante 1 hora hasta que el color de la muestra se tornó azul-verde claro.

Se enfrió el matraz y se añadieron 7 ml de agua destilada, la muestra se añadió a la cámara de ebullición de la unidad destiladora y se enjuagó el matraz con 5 ml de agua destilada. Se colocaron aproximadamente 10 ml de NaOH al 30% hasta que la mezcla se tornó café oscuro.

Se colectó aproximadamente 20 ml de destilado en un matraz que contenía 10 ml de Ácido bórico al 2% y 2 gotas de indicador y se tituló con HCl al 0.001N.

Para conocer el contenido de proteína se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%N = (NHCl) \left(\frac{\text{Volumen de ácido corregido}}{\text{g muestra}} \right) (14 \text{ g N})(100)(\text{Factor de conversión})$$

NHCl= Normalidad del HCl en moles/1000ml.

Volumen del ácido corregido = (ml. del ácido estandarizado para la muestra) - (ml. de ácido estandarizado para el blanco).

14 = Peso atómico del nitrógeno.

Se utiliza un factor para convertir el porcentaje de N a porcentaje de proteína cruda. El factor de conversión es de 5.70.

7.3 Obtención del aceite de amaranto

Se pesaron aproximadamente 20 g de harina del residuo sólido obtenido en un dedal de celulosa.

Se colocó hexano en una proporción 1:5 (muestra:hexano) en matraces de bola de peso constante conocido.

El aceite se extrajo en un equipo Soxhlet durante 4 horas, pasado este tiempo la muestra fue destilada en un rotavapor Han Shin Scientific 2000NS.

El matraz fue llevado a una estufa (Riossa) durante 1 hora a 130 °C y traspasado a un desecador durante 1 hora.

Los matraces fueron pesados en una balanza analítica Ohaus Voyager Pro para conocer el rendimiento de aceite extraído siguiendo la siguiente ecuación

$$\%Grasa = \frac{\text{Peso del matraz con grasa} - \text{Peso del matraz}}{g \text{ muestra seca}}$$

7.4 Análisis fisicoquímicos

7.4.1. Determinación de índice de acidez

Al aceite obtenido se le determinó el contenido de ácidos grasos libres, para ello se pesó 0.5 g de la muestra en un matraz Erlenmeyer y se registró su peso exacto.

En un segundo matraz se añadieron 5 ml de etanol, una gota de indicador de fenolftaleína y 2 perlas de ebullición, se calentó hasta que empezó a hervir el etanol y se retiró inmediatamente de la fuente de calor.

Se tituló en etanol caliente con NaOH 0.01N hasta la aparición de un rosa pálido, rápidamente se añadió el etanol neutralizado a la muestra, se mezcló y se tituló nuevamente.

Para determinar índice de acidez se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de acidez} = \frac{(ml \text{ NaOH})(N \text{ NaOH})(56.1)}{g \text{ muestra}}$$

ml NaOH= ml de NaOH gastados en la titulación

N NaOH= Normalidad del NaOH empleado

7.4.2 Determinación de actividad antioxidante

Para determinar la actividad antioxidante se siguió el método descrito por Salinas Moreno *et al.* (2012):

A 200 μL del aceite se le adicionaron 2800 μL de DPPH 60 μM , se midió la absorbancia a 517 nm al inicio, se dejó reaccionar en la obscuridad por 90 minutos y se midió la absorbancia, la actividad antioxidante se reporta como reducción del radical DPPH expresado en porcentaje utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{inhibición}_{\text{DPPH}}(\%) = \left[\frac{(\text{abs}_{t_0} - \text{abs}_{t_{90}})}{(\text{abs}_{t_0})} \right] \times 100$$

abs_{t_0} = absorbancia al inicio

$\text{abs}_{t_{90}}$ = absorbancia a los 90 minutos de reacción

7.5 Adición del extracto acuoso de proteína hidrolizada a un alimento

Se elaboró pan de caja sustituyendo la cantidad de agua por un extracto acuoso de proteína de amaranto con el fin de elevar el valor proteico, la base de las formulaciones es la siguiente:

Harina de trigo	330 g
Manteca	45 g
Azúcar	37 g
Sal	6 g
Leche en polvo	15 g
Levadura liofilizada	11.6 g
Extracto de malta	4 g
S500	4 g

Se sustituyó la cantidad de 170 ml de agua necesaria para elaborar el pan control por el extracto de proteína en las siguientes proporciones:

- Pan adicionado con proteína hidrolizada de amaranto en una proporción proteína hidrolizada agua (0.5:1): 68 ml de extracto de proteína y 102 ml de agua.
- Pan adicionado con proteína hidrolizada de amaranto en una proporción proteína hidrolizada agua (1:1): 85 ml de extracto de proteína y 85 ml de agua.

La harina se cernió con el fin de homogenizar el tamaño de partícula; los ingredientes secos se incorporaron primero y se fue agregando lentamente el agua tibia o la mezcla de agua/ extracto

de proteína tibia según sea el caso, se amasa esta mezcla durante 5 minutos en un mezcladora con el fin de incorporar todos los ingredientes, pasado este tiempo la masa se amasa a mano hasta la obtención de una masa elástica.

La masa obtenida se sometió a fermentación a 35 °C durante 40 minutos, posteriormente se pesaron 60 g de masa, se bolearon, se moldearon y se sometieron a una segunda fermentación en las mismas condiciones, finalmente se hornearon a 225 °C durante 20 minutos.

7.6 Análisis de textura

7.6.1 Preparación de las muestras de masa

Se pesaron aproximadamente 5 g de masa y se bolearon hasta obtener un tamaño aproximado de 20 mm de diámetro y 20 mm de altura.

7.6.2 Determinación del análisis de perfil de textura de la masa

El perfil de textura de la miga de pan fue determinado de acuerdo a lo reportado por Baños-Espíndola (Baños-Espíndola, B; et al, 2008). Se usó un texturómetro TA.XT2i (CT3 Brookfield) bajo las siguientes condiciones de compresión: celda de compresión de 2.5 N, velocidad del cabezal 1.7 mm/seg; 20% de deformación máxima; diámetro del émbolo de penetración 58 mm. El centro de cada rodaja de pan se sometió a dos ciclos de compresión-descompresión para obtener la curva de Perfil de Análisis de Textura (TPA).

7.6.3 Preparación de las muestras de miga

Las muestras se prepararon de acuerdo a lo reportado por Osuna (Osuna, 2013), se cortaron rodajas del pan del centro de la hogaza de un ancho de 20 mm con un cuchillo para pan y se eliminó la corteza. Se obtuvieron muestras de la miga del pan con un sacabocado de 20 mm de diámetro 25 mm de altura.

7.6.4 Determinación del análisis de perfil de textura de la miga de pan

El perfil de textura de la miga de pan fue determinado usando un texturómetro TA.XT2i (CT3 Brookfield) bajo las siguientes condiciones de compresión: celda de compresión de 2.5 N, velocidad del cabezal 0.5 mm/seg; 10% de deformación máxima; diámetro del émbolo de penetración 58 mm. El centro de cada rodaja de pan se sometió a dos ciclos de compresión-descompresión para obtener la curva de TPA.

7.7 Análisis físico del pan

El pan fue cortado en rebanadas de aproximadamente 1 cm de ancho, se les realizó un análisis físico en el que se midió el largo y ancho de la rebanada.

7.8 Análisis sensorial

La prueba (Apéndice 10.3) fue aplicada a 30 jueces sin entrenamiento de un rango de edad entre los 18 y 25 años de los cuales 12 jueces fueron hombres y 18 mujeres.

Para determinar si hay diferencia significativa de los parámetros de apariencia, sabor, color, textura y aroma; los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa NCSS mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza de 0.05, las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

H_0 = No hay diferencia entre muestras.

H_a = Hay diferencia entre muestras

7.9 Cuantificación de proteínas del pan de caja

Se realizó la cuantificación de proteínas en el pan de caja en base a lo descrito en la sección **7.2.7**.

8 Resultados y discusiones

8.1 Obtención del extracto de proteína

A la harina de amaranto obtenida se le realizó una hidrólisis enzimática con las enzimas proteasa de *Bacillus licheniformis*, Viscozyme y pectinasa de *Aspergillus aculeatus*, sin embargo con estas dos últimas enzimas se obtenía un líquido viscoso compuesto principalmente de almidón (Figura 7).



Figura 7. Extracto obtenido al usar las enzimas Viscozyme y pectinasa

Con la proteasa en cambio se obtenía un extracto acuoso (Figura 8) formado principalmente por proteínas, por lo que se estableció el uso de esta enzima.



Figura 8. Extracto obtenido al usar la proteasa de *Bacillus licheniformis*

8.2 Determinación del rendimiento de extracción de proteína

Al encontrar que con la proteasa de *B. licheniformis* se podía obtener un extracto acuoso de proteína se prosiguió a realizar la hidrólisis enzimática a diferentes tiempos y diferente U/g

Se cuantificó la cantidad de proteínas presentes en el extracto acuoso por el método de Bradford obteniéndose que la mayor concentración de proteínas en este medio fue de 0.08 g/ml de extracto.

Para determinar la cantidad de proteína residual en la harina de amaranto se realizó una cuantificación por el método de Kjeldahl, obteniéndose que en la harina sometida a hidrólisis enzimática con proteasa de *Bacillus licheniformis* por 4 horas permanecía 0.016 g de proteína por g de harina de amaranto

En base a los análisis realizados se encontró que el máximo rendimiento de extracción fue de 84.4% (**Figura 9**) a las 4 horas de hidrólisis con una concentración de enzima de 0.036 U/g, lo cual es un rendimiento de extracción mayor al reportado por Mokrejs quien logró un rendimiento de extracción del 50% usando la combinación de tres enzimas: BAN 480 L (α -amilasa), Celluclast (celulasa) y AMG 300L (glucoamilasa) (Mokrejs et al., 2010) .

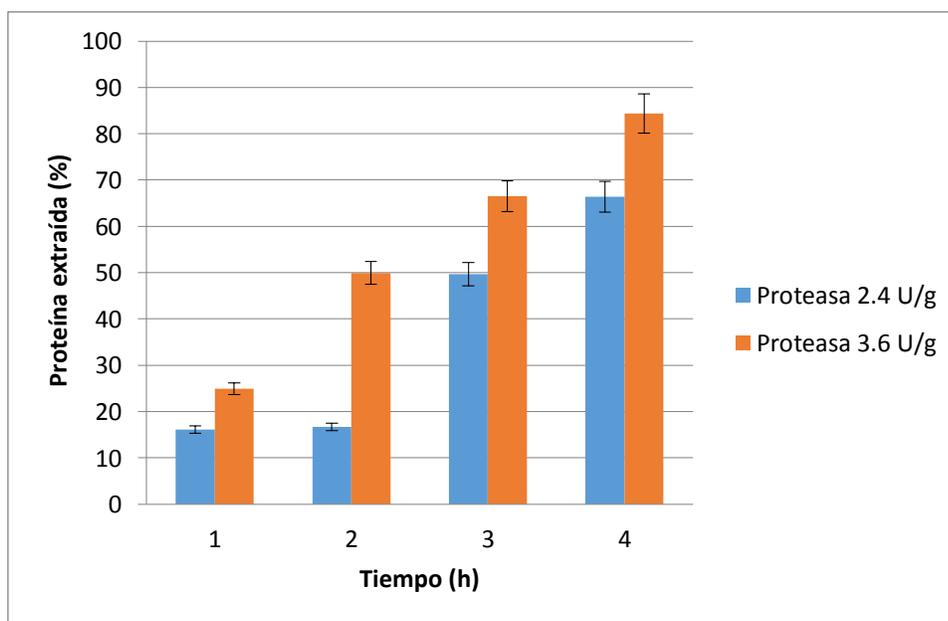


Figura 9. Rendimiento de extracción de proteína en distintos tiempos de hidrólisis

8.3 Extracción del aceite

La harina obtenida del residuo seco se sometió a una extracción en equipo Soxhlet (Figura 9) obteniéndose la mayor de aceite en 4 horas, sin diferencia significativa usando proteasa 2.4 U/g (20.44%) que 3.6 U/g proteasa (20.46%) (Figura 10), estos datos sobrepasan por mucho al rendimiento obtenido de la harina sin tratamiento enzimático con el cual se obtuvo una extracción de 9.6% de grasa, esto puede deberse a que se libera aceite extra enlazado a otras macromoléculas, que no puede extraerse cuando se utiliza el método convencional. (Graso, F. Maroto, B. Camusso, 2006)

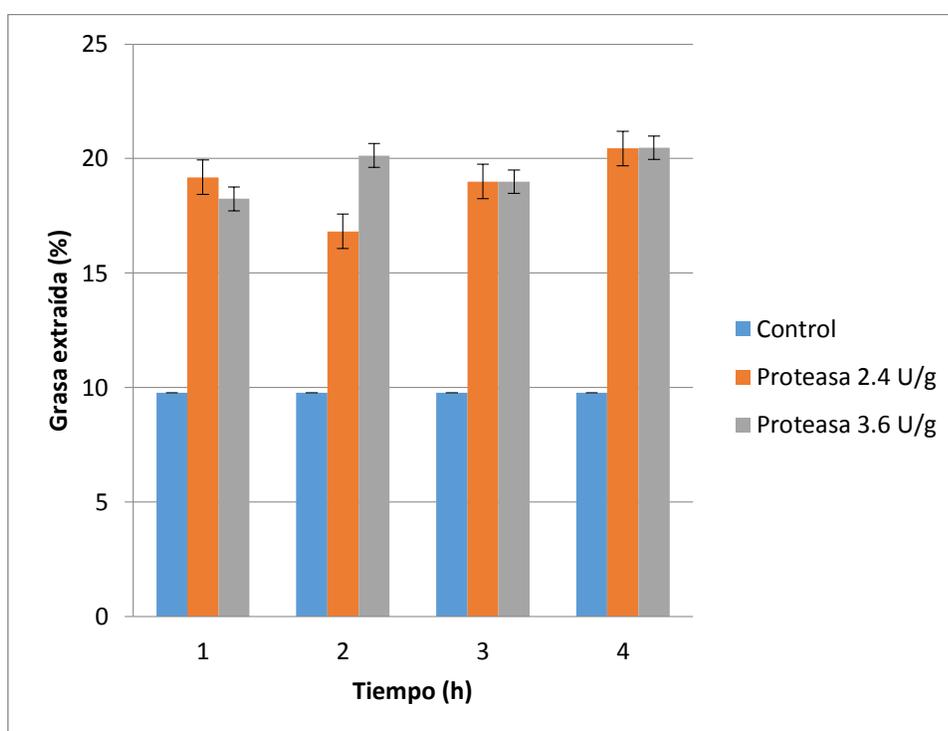


Figura 10. Grasa extraída (%) del residuo de la hidrólisis enzimática del amaranto

8.4 Análisis fisicoquímico del aceite de amaranto

8.4.1 Índice de acidez

El aceite de amaranto sin ser sometido a hidrólisis enzimática presentó un índice de acidez mayor (1.063) que la harina sometida a hidrólisis enzimática, obteniéndose un menor índice de acidez (0.1396) a las 4 horas usando proteasa 3.6U/g (Figura 11), esto puede deberse a que durante la hidrólisis enzimática se extraen los ácidos grasos libres los cuales son acarreados en la fase acuosa dejando en el residuo sólido ácidos grasos fuertemente enlazados.

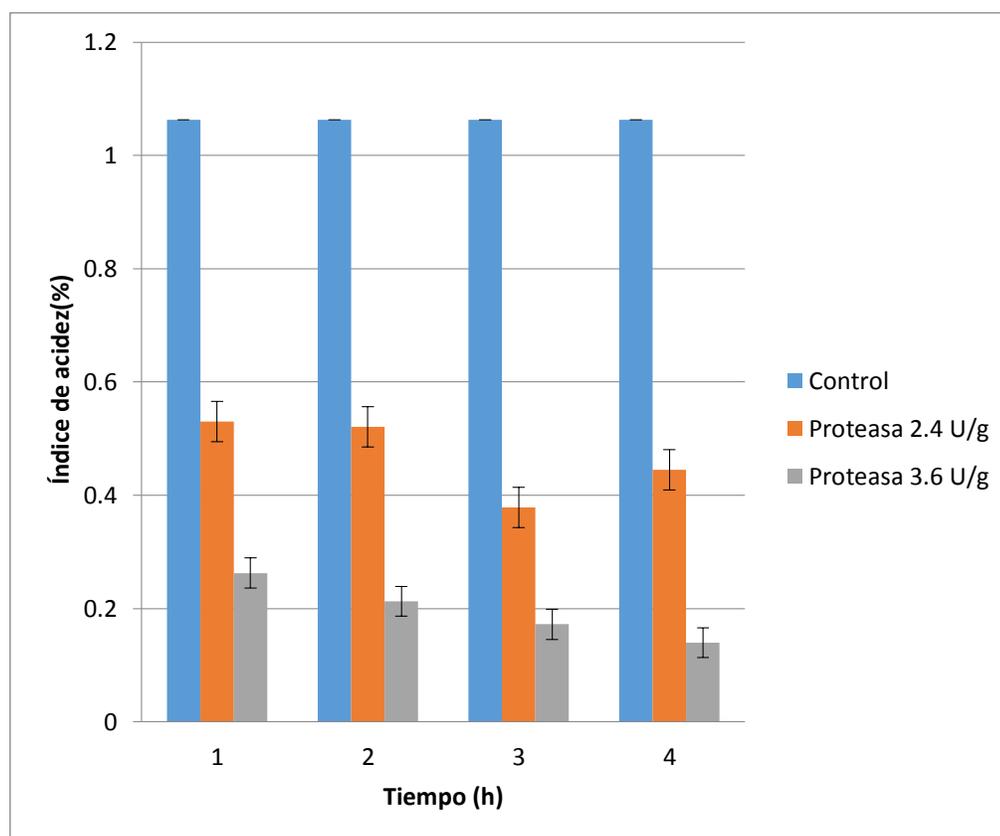


Figura 11. Índice de acidez del aceite de amaranto obtenido del residuo de la hidrólisis enzimática.

8.4.2 Actividad antioxidante

En la Figura 15 se muestra que la mayor actividad antioxidante (58.45%) se obtiene en el residuo obtenido a 1 hora de hidrólisis enzimática, se observa que al aumentar el tiempo de hidrólisis enzimática la actividad antioxidante disminuye a las 4 horas tanto en la hidrólisis realizada con proteasa 2.4 U/g y 3.6 U/g (Figura 12).

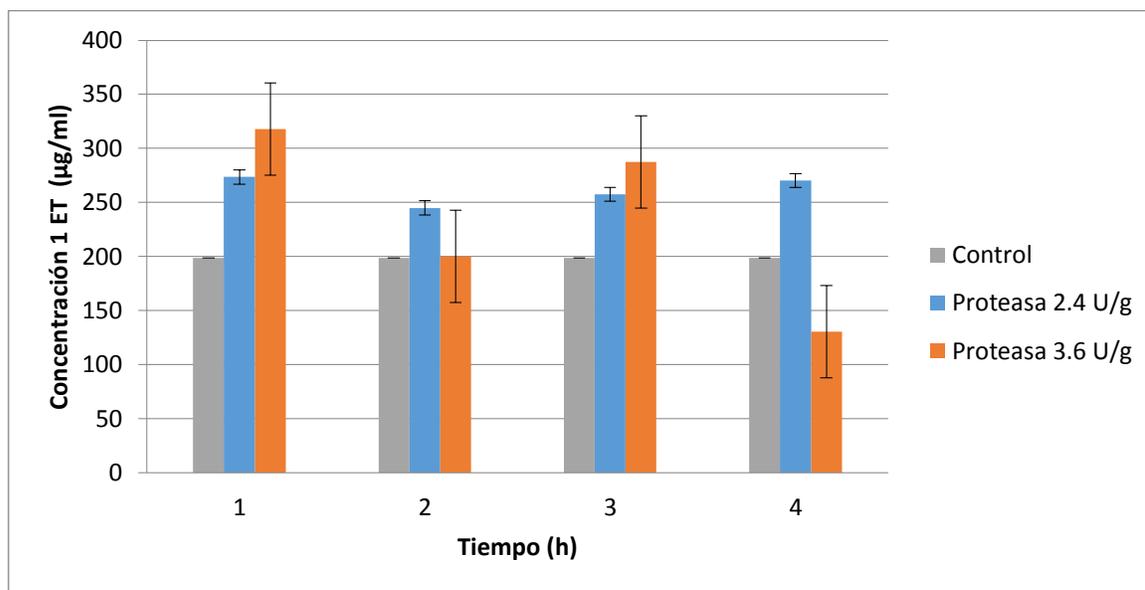


Figura 12. Actividad Antioxidante (%) del aceite de amaranto obtenido a partir de la hidrólisis enzimática

8.5 Pan de caja adicionado con proteína de amaranto

8.5.1 Análisis de perfil de textura de masa y de miga

En el cuadro 4 se muestran los resultados de adhesividad, cohesividad y extensibilidad de las masas, se observa que la fuerza de adhesividad aumenta si se agrega una mayor concentración de proteína de amaranto, mientras que la elasticidad disminuye, esto se debe a que las proteínas del amaranto intervienen con las proteínas presentes en la harina de trigo lo que impide que se forme la red de proteínas que se enlazan al adicionar el agua y una fuerza mecánica.

Cuadro 4. Análisis de perfil de textura de la masa con y sin proteína hidrolizada de amaranto y su desviación estándar.

Muestra	Fuerza de adhesividad (N)	Desv. estándar	Cohesividad	Desv. estándar	Elasticidad (mm)	Desv. estándar
Control	0.99	0.09	0.725	0	2.49	0
Pan con proteína hidrolizada de amaranto en proporción proteína hidrolizada:agua (0.5:1)	2.24	0.16	0.66	0.02	2.04	0.04
Pan con proteína hidrolizada de amaranto en proporción proteína hidrolizada:agua (1:1)	2.14	0.43	0.7	0.03	1.9	0.04

En el cuadro 5 se pueden observar los valores medios de fuerza de adhesividad, cohesividad, elasticidad y masticabilidad, respectivamente de las distintas migas de los panes analizados. La fuerza de adhesividad, la cohesividad y la elasticidad no cambian significativamente al agregar el extracto acuoso de proteína, mientras que el índice de masticabilidad aumenta al agregar un 50% de proteína lo cual se traduce en un aumento de la fuerza requerida para desintegrar el alimento.

Cuadro 5. Análisis de perfil de textura en pan con y sin proteína hidrolizada de amaranto.

Muestra	Fuerza de adhesividad (N)	Desv. estándar	Cohesividad	Desv. estándar	Elasticidad (mm)	Desv. estándar	Índice de masticabilidad (N)	Desv. estándar
Control	0.01	0	2.09	0	0.32	0.07	1.57	0.01
Pan con proteína hidrolizada de amaranto en proporción proteína hidrolizada :agua (0.5:1)	0	0	1.8	0.04	0.4	0	1.29	0
Pan con proteína hidrolizada de amaranto en proporción proteína hidrolizada :agua (1:1)	0.02	0	1.9	0.01	0.37	0.02	2	0.16

8.5.2 Análisis físico del pan de caja

La Figura 13 y Cuadro 6 muestran las características físicas de peso del pan, alto y ancho de la rebanada, se observa que estas propiedades no se ven afectadas por la adición del extracto de proteína.

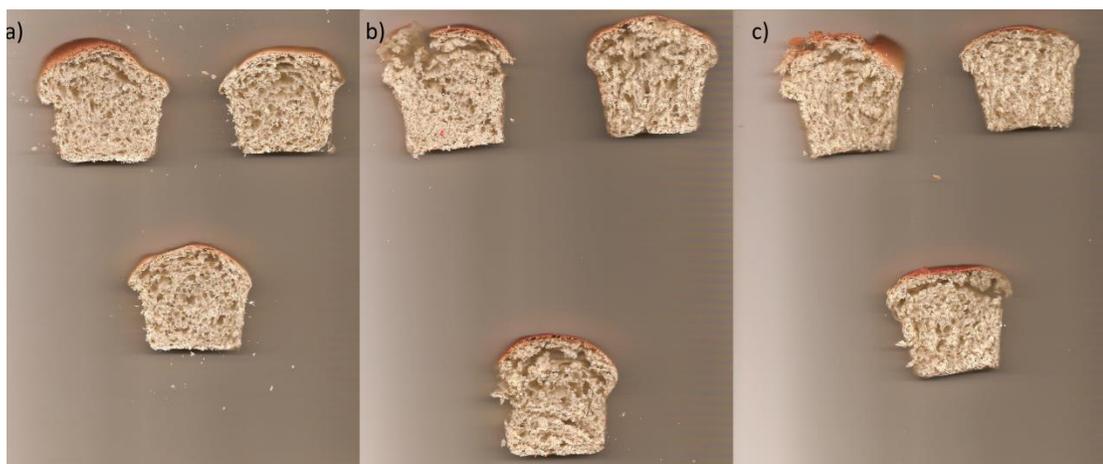


Figura 13. Rebanadas del pan de caja a) control, b) 40% de proteína y c) 50% de proteína.

Cuadro 6. Análisis físico del pan de caja con y sin extracto de proteína.

Muestra	Peso (g)	Desv. Estándar	Largo (cm)	Desv. estándar	Ancho (cm)	Desv. estándar
Control	51	0	6.1	0.21	6.3	0.21
Pan con proteína hidrolizada de amaranto en proporción proteína hidrolizada:agua (0.5:1)	53	0	5.75	0.21	6.6	0
Pan con proteína hidrolizada de amaranto en proporción proteína hidrolizada:agua (1:1)	53	0	5.5	0	6.7	0

8.5.3 Cuantificación de proteína del pan

La adición de extracto acuoso de proteína de amaranto en el pan de caja muestra el aumento esperado de proteína entre el pan control (11.8%) y el pan de adicionado con proteína hidrolizada de amaranto en una proporción proteína hidrolizada:agua (1:1) (16.87%) lo que representa un aumento del 5% en la cantidad de proteína en cantidad de proteína (Figura 13).

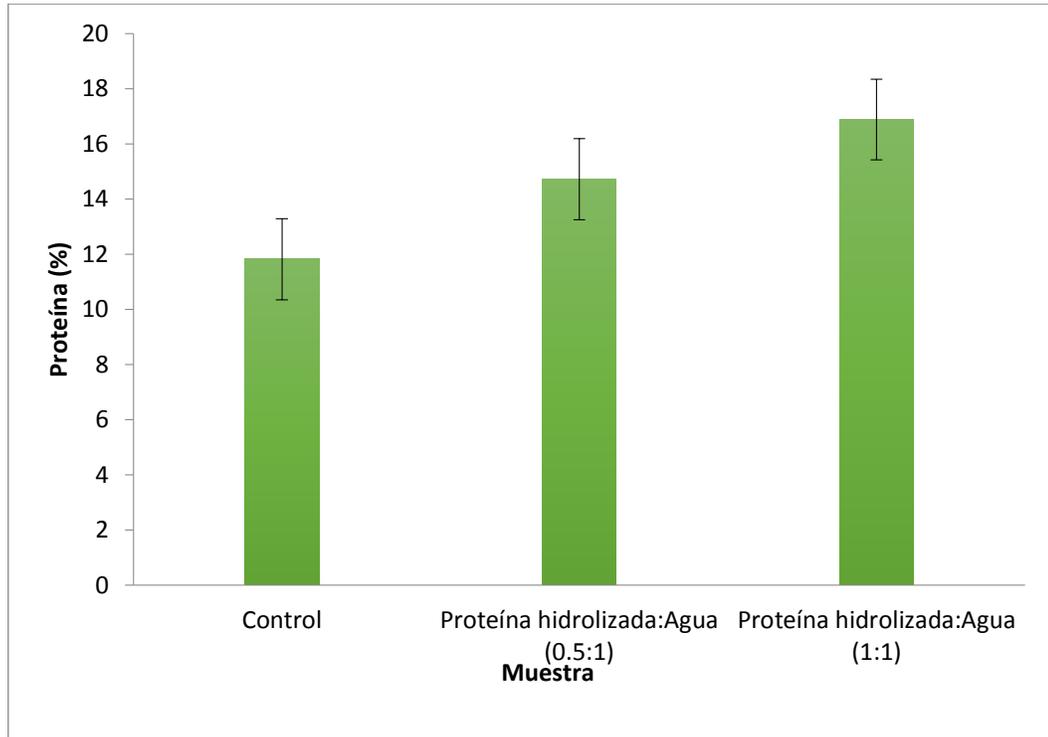


Figura 14. Aumento de proteína (%) al adicionar el extracto de proteína de amaranto del pan control y los panes adicionados con proteína hidrolizada de amaranto.

8.5.4 Análisis sensorial

El cuadro 7 muestra que no hay diferencia significativa entre el pan control y los panes adicionados con proteína hidrolizada de amaranto, sin embargo en cuanto a aceptación global el menos aceptado por los consumidores es el pan adicionado con proteína hidrolizada de amaranto en una proporción proteína hidrolizada:agua (1:1)

Cuadro 7. ANOVA del agrado del pan de caja.

Parámetro	Nivel de probabilidad corregido	Hipótesis aceptada
Apariencia	0.576211	H ₀ = No hay diferencia entre muestras
Sabor	0.575956	H ₀ = No hay diferencia entre muestras
Color	0.712279	H ₀ = No hay diferencia entre muestras
Textura	0.688573	H ₀ = No hay diferencia entre muestras
Aroma	0.317224	H ₀ = No hay diferencia entre muestras

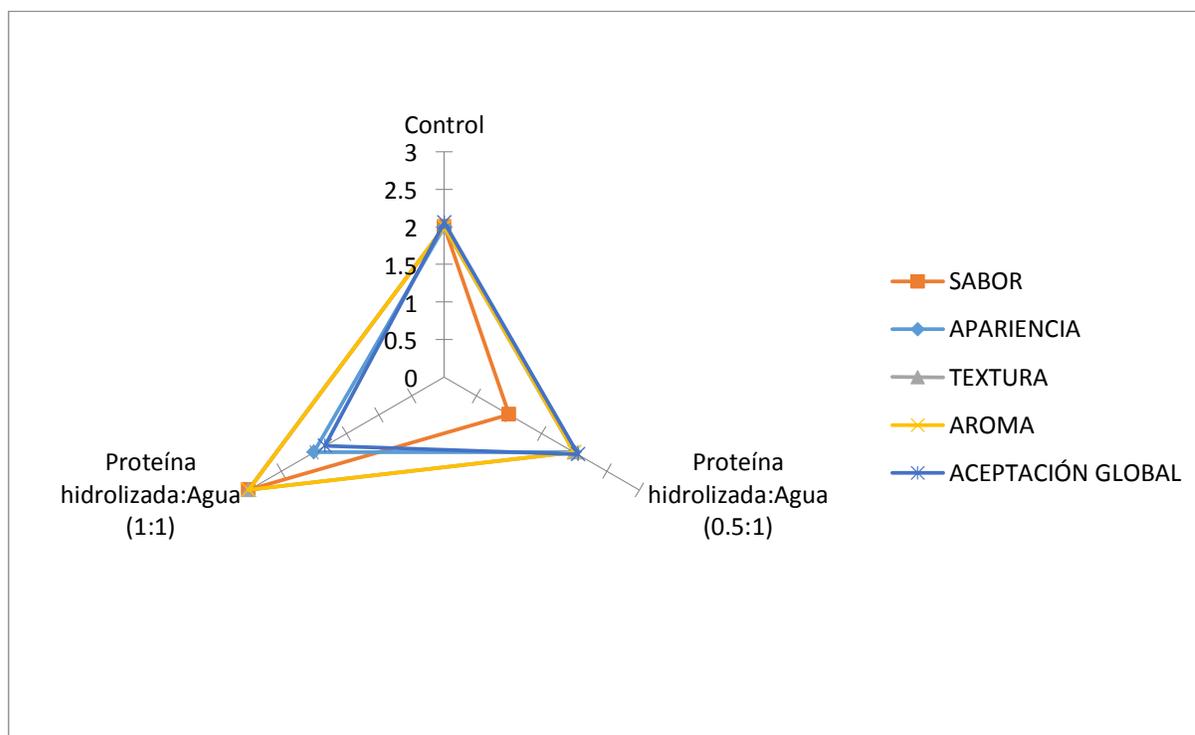


Figura 15. Aceptación de las 3 muestras diferentes de pan de caja.

9 Conclusiones

El método propuesto usando la proteasa de *Bacillus licheniformis* permitió extraer el 84.4% de proteína y el 20.46% de lípidos presentes en la semilla.

El aceite de amaranto extraído a partir del residuo sólido de la hidrolisis presenta un índice de acidez de 0.139 mientras que el aceite extraído de la harina sin tratar presentó un índice de 1.06 lo que disminuye el tiempo de refinación, además el aceite obtenido de la harina pretratada tiene una actividad antioxidante de 58% frente al obtenido de la harina sin tratamiento que tiene una actividad antioxidante de 41.25%

Al agregar el extracto de proteína de amaranto al pan de caja su contenido proteico no aumenta considerablemente, sin embargo sería oportuno realizar un análisis de perfil de aminoácidos para ver si hay un aumento considerable del aminoácido lisina el cual es limitante en la harina de trigo.

La adición de proteína de amaranto en cantidades menores o iguales al 50% no presenta cambios significativos en la aceptación del producto.

10 Bibliografía

- Algara, P. Gallegos, J. Reyes, J. (2013). Amaranto: Efectos en la nutrición y la salud. *Revista Académica de Investigación*, (12), 1–21. Retrieved from Abril
- Alvarez, E. Horjales, E. de Gortari, P. Joseph-Bravo, P. (2006). *EFFECTO DE LA CALIDAD PROTEICA EN EL METABOLISMO, LA DEPRESIÓN, LA ANSIEDAD Y SU RELACIÓN CON LA CONDUCTA ALIMENTARIA EN RATAS*.
- Baños-Espíndola, B; Hernández Chavéz, J; Martínez-Herrera, J; Reyes-Santamaria, M; Morales-Rodríguez, I; Güemes-Vera, N. (2008). Propiedades de textura, extensibilidad y adhesividad de masas elaboradas con mezclas de harinas de masas elaboradas con mezclas de harinas de *Jatropha curcas* y concentrado de cebada, 3–7.
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína : procesos y aplicaciones Resumen. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227–237.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Bressani, R. (2006). “ Estudios Sobre la Industrialización del Grano de Amaranto , Caracterización Química y Nutricional de Productos Intermedios y Finales del Procesamiento ,” (23).
- Camacho, M. C., Angelica, A., Rodriguez, M., Yanai, S., Perez, P., Hugo, H., ... Vazquez, R. (2008). *Exportación y los mercados internacionales*.
- Espitia, E. (2012). *Amaranto: Ciencia y Tecnología* (Primera). México: INIFAP.
- Gonzales, C. (2012). *Evaluación fisicoquímica y capacidad antioxidante del aceite de amaranto (Amaranthus hypocondriacus) y estabilidad oxidativa de diferentes sistemas de encapsulación*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- González, R. Cabeza, R. (2005). COMPRESIONES DE PLUTARCHIA CORONARIA.
- Graso, F. Maroto, B. Camusso, C. (2006). Pretratamiento enzimático de expandido de soja para la extracción de aceite con solvente. *Información Tecnológica*, 17(3), 41–46.
- Guadix, a. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79–89. <http://doi.org/10.4067/S0718-09342007000200003>
- Hanmoungjai, P., Pyle, D. L., & Niranjana, K. (2001). Enzymatic Process for Extracting Oil and Protein from Rice Bran.
- Herrera, C. Bolaños, N. Lutz, G. (2003). Química de alimentos: manual de laboratorio. In *Química de los alimentos: manual de laboratorio*. (1st ed., pp. 28–29). Costa Rica.

- Hibbeln, J. R., Ferguson, T. a, & Blasbalg, T. L. (2006). Omega-3 fatty acid deficiencies in neurodevelopment, aggression and autonomic dysregulation: opportunities for intervention. *International Review of Psychiatry (Abingdon, England)*, 18(2), 107–118. <http://doi.org/10.1080/09540260600582967>
- Kraujalis, P., & Venskutonis, P. R. (2013). Optimisation of supercritical carbon dioxide extraction of amaranth seeds by response surface methodology and characterization of extracts isolated from different plant cultivars. *Journal of Supercritical Fluids*, 73, 80–86. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.11.009>
- Mokrejs, P., Janacova, D., Kolomaznik, K., Vasek, V., & Svoboda, P. (2010). Isolation of Amaranth proteins by liquefaction with enzymes, 26(3), 781–788.
- Oliveras López, M. J., Nieto Guindo, P., Agudo Aponte, E., Martínez Martínez, F., López García de la Serrana, H., & López Martínéz, M. C. (2006). Nutritional assessment of a university population. *Nutricion Hospitalaria : Organo Oficial de La Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral Y Enteral*, 21(2), 179–183.
- Orosco, E. (2013). *Actividad biológica de péptidos de amaranto obtenidos por acción de microorganismos*. Universidad Nacional de La Plata.
- Orsini, M; Tironi, V; Añon, M. (2011). Antioxidant activity of amaranth protein on their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT*, 44, 1751–1760.
- Osuna, M. et al. (2013). Características texturales y de color en panes con mezclas de harinas. *Publitec S.A. Argentina*.
- Palacio, J. R. (2012). Fitoesteroles y Fitoestanoles : eficaces para disminución de lípidos plasmáticos, 3(2), 165–173.
- Rodas, B., & Bressani, R. (2009). Contenido de aceite , ácidos grasos y escualeno en variedades crudas y procesadas de grano de amaranto, 59(4).
- Salinas Moreno, Y., Cruz Chávez, F. J., Díaz, S. A., & Castillo, F. (2012). Granos de maíces pigmentados de Chiapas, características físicas, contenido de antocianinas y valor nutracéutico. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(1), 33–41.
- Serrano-Maldonado, M. J. (2010). *Evaluación de la actividad antioxidante para el aprovechamiento del muérdago que infesta la zona chinampera de Xochimilco*. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Sigma-Aldrich. (2015). Sigma-Aldrich. Retrieved from <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p4860?lang=es®ion=MX>



Venskutonis, P. R., & Kraujalis, P. (2013). Nutritional Components of Amaranth Seeds and Vegetables: A Review on Composition, Properties, and Uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(4), 381–412. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12021>

11 Apéndice

11.1 Curva patrón de Bradford

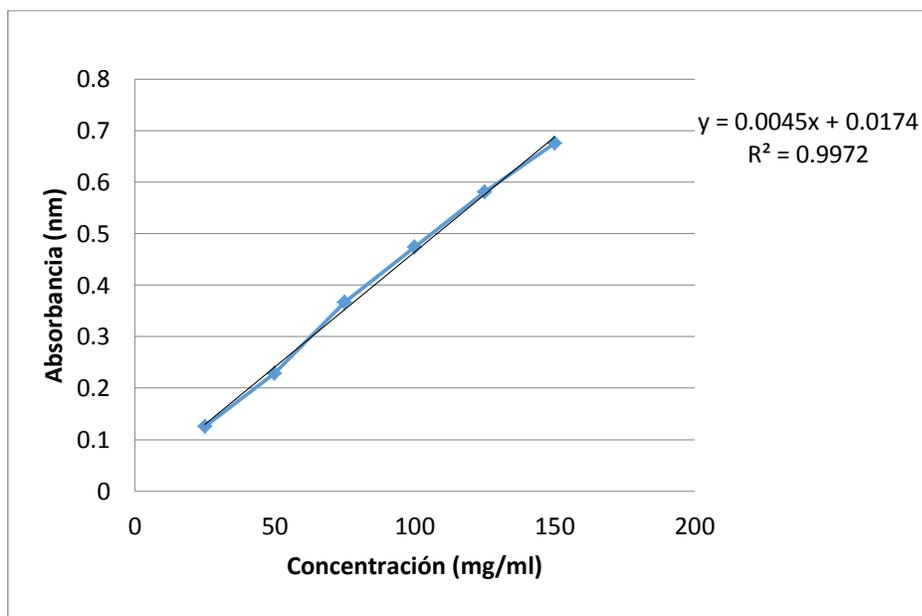


Gráfico 1a. Curva estándar de albúmina de huevo para la cuantificación de proteína

Tabla 1A. Datos para la curva estándar de proteínas

Concentración (μl)	Promedio Abs. (nm)
25	0.1255
50	0.229
75	0.367
100	0.4735
125	0.5805
150	0.6755

11.2 Curva patrón de DPPH

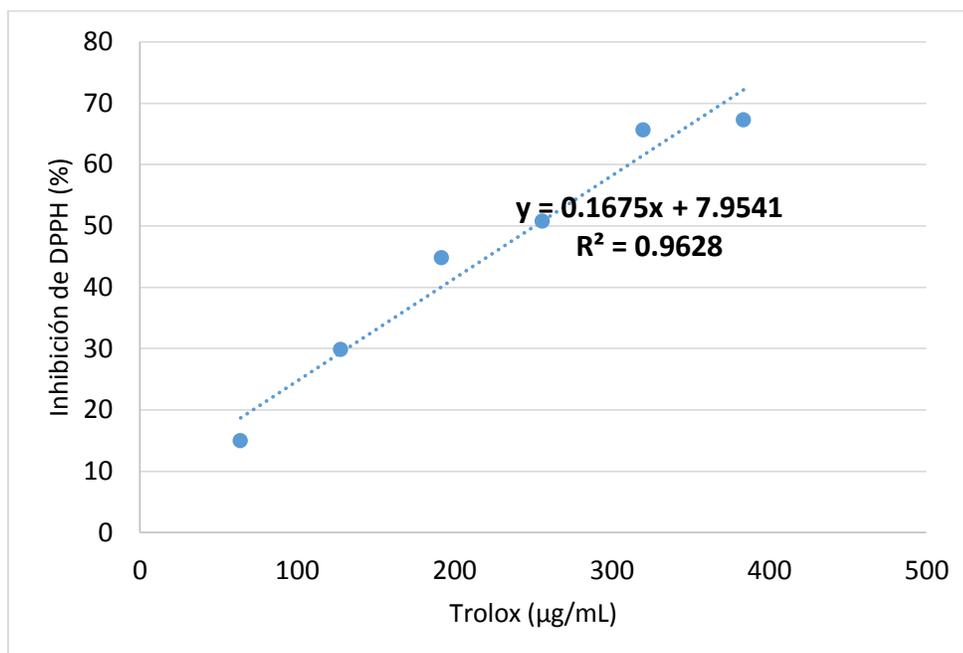


Gráfico 1B. Curva estándar de Trolox para la cuantificación de actividad antioxidante

Tabla 1B. Datos para la curva estándar de actividad antioxidante

Trolox (µg/mL)	% AA
64	14.9
128	29.7
192	44.7
256	50.7
320	65.6
384	67.2



11.3 Encuesta realizada para conocer la aceptación del pan adicionado con proteína

Nombre:

Fecha:

Instrucciones: A continuación se le presentan 3 muestras de pan, por favor coloque del 1 al 3 según su preferencia debajo del código de la muestra, donde 3 es el de mayor preferencia y 1 el de menor preferencia.

	567	782	967
Apariencia			
Sabor			
Color			
Textura			
Aroma			

¡Gracias por su ayuda!