



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Propiedades funcionales, capacidad antioxidante y contenido de
fitoquímicos en hidrolizados proteínicos de amaranto germinado
(*Amaranthus hypochondriacus*)**

TESIS

Que presenta

LN. MARIBEL DOMINGUEZ RODRIGUEZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIA

Y

TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores

DR. JORGE MILÁN CARRILLO

DR. ALVARO MONTOYA RODRIGUEZ

Culiacán, Sinaloa, México

Febrero de 2019

El siguiente trabajo titulado “Propiedades funcionales, capacidad antioxidante y contenido de fitoquímicos en hidrolizados proteínicos de amaranto germinado (*Amaranthus hypochondriacus*)” se desarrolló en el laboratorio de alimentos nutraceuticos, perteneciente al programa en Ciencia y Tecnología de Alimentos, de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Los C. Dr. Jorge Milán Carrillo, Dr. Alvaro Montoya Rodríguez fungieron como directores de tesis. Las C. Dra. Ada Keila Milán Noris, MC. Eslim Suguey Sandoval Sicairos fungieron como asesoras académicas. El proyecto conto con el financiamiento de PROFAPI2015/186. La tesista C. LN. Maribel Domínguez Rodríguez recibió como apoyo la Beca Nacional para Estudios de Posgrado (Maestría en Ciencias) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 7 del mes Julio del año 2020, la que suscribe Maribel Domínguez Rodríguez, alumna del Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología en Alimentos con número de cuenta 07026986, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los doctores, Jorge Milán Carrillo y Alvaro Montoya Rodríguez y cede los derechos del trabajo titulado “ Propiedades funcionales, capacidad antioxidante y contenido de fitoquímicos en hidrolizados proteínicos de amaranto germinado (*Amaranthus hypochondriacus*)”, a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maribel Domínguez Rodríguez', written over a horizontal line.

Nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

Gracias a **Dios** por todo lo que me ha dado y por permitirme estar aquí en compañía de todos de mis seres queridos.

Muchas gracias a mis padres, **Jesús Octavio** y **Martina** por todo el apoyo que me han brindado siempre más allá de lo indispensable. Los quiero mucho.

Gracias a mis hermanas **Raquel, Ana** y **Melissa** por su apoyo y cariño; a mis sobrinitos **Jaqueline, Elizabeth, Luis Octavio, Luis Antonio** y **José Luis** por su cariño y su alegría. Los quiero mucho.

Muchas gracias a mi novio **Moisés**, por apoyarme y acompañarme durante todo este recorrido. Te quiero mucho.

Agradezco al **Dr. Jorge Milán Carrillo** por la oportunidad y la confianza para participar en este proyecto, por su apoyo y facilidades otorgadas. Muchas gracias.

Muchas gracias **Dr. Alvaro Montoya Rodríguez**, por su confianza, disponibilidad, apoyo, consejos y amistad brindados durante todo este tiempo.

Agradezco a la **Dra. Ada Keila Milán Noris** por guiarme, apoyarme, aconsejarme y su disponibilidad para la realización de este proyecto y a la **MC. Eslim Sugey Sandoval Sicaños** por todas las enseñanzas, por guiarme, apoyarme, por los consejos y sugerencias pero sobre todo por tu amistad, Muchas gracias.

Muchas gracias a la **Dra. Edith Oliva Cuevas Rodríguez** por todo su apoyo, sus consejos y facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

Muchas gracias al **Dr. Luis Martín Sánchez Magaña** y la **Dra. Liliana León López** por su disponibilidad para ayudar y resolver cualquier duda respecto al proyecto.

Muchas gracias a todos los **maestros** del posgrado maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos por compartir sus conocimientos, disponibilidad y facilidades otorgadas durante todo este proceso.

Muchas gracias a los laboratorios del posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos y del posgrado en Biotecnología por permitir el uso de sus equipos para el desarrollo de los experimentos.

También agradezco a todos mis compañeros de generación de la maestría, **Yudith, Aliette, Demis, Martín, Fernanda, Yazmin, Yesenia, Cynthia, Carlos, Julio, Samuel, Santos, Jordi, Carolina**, muchas gracias por su amistad y apoyo, por compartir sus conocimientos, alegrías y sobre todo por su amistad. Los quiero.

Agradezco también a mis compañeros del laboratorio 18, **Eslim, Astrid, Joselyn, Melissa, Oscar, Eduardo, Masiel, Evelyn y Jeanett** por todo apoyo, sus enseñanzas, su compañía, sus alegrías y sobre todo su amistad. También a **Aliette y Yudith** quienes han compartido conmigo muchos momentos de felicidad y tristeza, gracias por sus consejos, su apoyo y su amistad, las quiero mucho. También agradezco a los compañeros del laboratorio 20 por su disponibilidad y apoyo para la utilización de los equipos y resolver dudas. A cada uno de ustedes muchas gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE CUADROS	vi
I RESUMEN	1
ABSTRACT	3
II INTRODUCCIÓN.....	5
III REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	9
A. AMARANTO	9
1. Generalidades	9
2. Composición nutricional del grano de amaranto	16
a. Composición química	16
1) Carbohidratos	16
2) Lípidos	19
3) Proteínas.....	19
b. Composición fitoquímica.....	20
1) Ácidos fenólicos	21
2) Flavonoides.....	24
3) Antocianidinas.....	24
4) Taninos	26
c. Compuestos fenólicos en el grano de amaranto.....	28
d. Propiedades nutracéuticas de los fitoquímicos del amaranto	30
B. MÉTODOS DE PROCESAMIENTO DEL AMARANTO	32
1. Nixtamalización.....	32
2. Expansión	33
3. Extrusión.....	33
4. Germinación	34
a. Absorción de agua.....	34
b. Inicio de la actividad metabólica	35
c. Crecimiento y división celular.....	35

d. Factores que afectan el proceso de germinación	36
e. Efecto de la germinación sobre la composición química del grano de amaranto	37
f. Efecto de la germinación sobre el contenido de fitoquímicos y capacidad antioxidante del grano de amaranto	38
5. Hidrolizados proteicos.....	39
6. Propiedades funcionales del grano de amaranto.....	41
a. Efecto del procesamiento sobre las propiedades funcionales del grano de amaranto	43
1) Tostado y reventado	43
2) Extrusión.....	44
3) Germinación.....	44
4) Hidrolizados proteicos.....	45
III JUSTIFICACIÓN	47
IV HIPÓTESIS.....	48
V OBJETIVOS.....	49
A. OBJETIVO GENERAL.....	49
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
VI MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
A. MATERIALES.....	51
B. MÉTODOS	51
1. Obtención de harina de amaranto germinado.....	51
2. Extracción total de proteínas de harina de amaranto germinado y amaranto sin procesar	52
a. Medición de proteína soluble (DC-Protein Assay)	53
3. Hidrólisis enzimática	54
4. Grado de hidrólisis (GH)	54
5. Preparación de extractos metanólicos	55
6. Determinación de compuestos fenólicos	55
a. Compuestos fenólicos totales (CFT).....	55
b. Determinación de flavonoides totales (FT)	56
c. Determinación de antocianinas totales (ANT).....	56

d. Determinación de taninos condensados.....	57
7. Medición de la capacidad antioxidante (CAOX).....	57
8. Determinación de las propiedades funcionales de las harinas e hidrolizados proteicos de amaranto sin procesar y germinado	58
a. Índice de absorción (IAA) y solubilidad en agua (ISA).....	58
b. Índice de absorción de aceite (IAAc)	59
c. Índice de actividad de emulsión (EAI).....	59
d. pH.....	60
9. Análisis estadístico	60
VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
1. Efecto de la germinación sobre el contenido de proteína soluble, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de la harina de amaranto sin procesar y germinada.....	61
a. Cambios en el contenido de proteína soluble	61
b. Cambios en el contenido de compuestos fenólicos totales	61
c. Cambios en el contenido de flavonoides totales	63
d. Cambio en el contenido de antocianinas totales.....	64
e. Cambios en el contenido de taninos condensados.....	65
f. Cambios en la capacidad antioxidante	66
2. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de proteína soluble en harina de amaranto crudo y germinado	67
3. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en harinas de amaranto crudo y germinado.....	69
a. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de compuestos fenólicos totales	69
b. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de flavonoides totales	72
c. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de taninos condensados	75
d. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de antocianinas totales	77
e. Capacidad antioxidante en hidrolizados de la harina de amaranto sin procesar y germinada	79

4. Efecto de la germinación y la hidrólisis enzimática en las propiedades funcionales de harinas de amaranto	82
a. Índice de absorción de agua (IAA).....	82
b. Índice de solubilidad en agua (ISA)	85
c. Índice de absorción de aceite (IAAc)	85
d. Índice de actividad de emulsión (EAI).....	86
e. pH.....	88
VIII CONCLUSIONES	90
IX BIBLIOGRAFÍA	93
ABREVIATURAS.....	108
ANEXOS	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Partes de la planta de amaranto	13
2	Usos de la planta de amaranto en alimentación humana y animal	14
3	Estructura del grano de amaranto	15
4	Esquema general de la biosíntesis de los compuestos fenólicos	22
5	Ejemplos de ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos	23
6	Estructura general de los flavonoides más comunes	25
7	Estructura de antocianidinas y antocianinas	27
8	Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de taninos condensados en harinas de amaranto sin procesar y germinado	76
9	Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de antocianinas totales en harinas de amaranto sin procesar y germinado	78
10	Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de capacidad antioxidante en harinas de amaranto sin procesar y germinado	80
11	Grado de hidrólisis de las harinas de amaranto sin procesar y germinado	111

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Clasificación taxonómica del amaranto	10
2	Producción de amaranto en México en el año 2016	11
3	Comparación nutricional del amaranto con otros granos	17
4	Composición química del grano de amaranto	18
5	Principales compuestos fenólicos reportados en granos sin procesar de <i>Amaranthus</i>	29
6	Actividad biológica de componentes nutracéuticos	31
7	Efecto de la germinación sobre proteína soluble, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en harinas de amaranto sin procesar y germinado	62
8	Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de proteína soluble en harinas de amaranto sin procesar y germinado	68
9	Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de compuestos fenólicos en harinas de amaranto sin procesar y germinado	70
10	Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de flavonoides en harinas de amaranto sin procesar y germinado	73
11	Efecto de la germinación e hidrólisis enzimática sobre las propiedades funcionales del grano de amaranto	83

I RESUMEN

El amaranto es un pseudocereal de alto contenido proteínico (13-19%) de alta calidad. La germinación del amaranto incrementa el contenido de proteínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, los cuales se pueden incrementar al aplicar una digestión gastrointestinal *in vitro*, mejorando el potencial nutracéutico de las harinas de amaranto. El objetivo de esta investigación fue evaluar la liberación de compuestos fitoquímicos con capacidad antioxidante y los cambios en las propiedades funcionales en hidrolizados de amaranto sin procesar y germinado.

Se obtuvieron dos harinas: Harina de Amaranto Sin Procesar (HASP) y Harina de Amaranto Germinado Optimizado (HAGO), posteriormente fueron hidrolizadas utilizando pepsina y pancreatina durante 3 h cada una, simulando una digestión gastrointestinal; Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos durante la hidrólisis completa; a éstas se les determinó Proteína Soluble (PS), Compuestos Fenólicos Totales (CFT), Flavonoides Totales (FT), Antocianinas (ANT), taninos condensados y Capacidad Antioxidante (CAOX). También se evaluó el Índice de Absorción de Agua (IAA), Índice de Solubilidad en Agua (ISA), Índice de Absorción de Aceite (IAAc), Índice de Actividad de Emulsión (EAI) y pH. Se realizó un ANOVA y la prueba LSD de Fisher para la comparación de medias ($p \leq 0.05$). El proceso de germinación en amaranto incrementó el contenido de fitoquímicos (PS: 37%, CFT: 17%, FT: 163%, ANT: 1417%); salvo el contenido de taninos (-50.6%). Mientras que la capacidad antioxidante aumentó (121%) por este bioproceso. Por otra parte la hidrólisis simultánea de pepsina+pancreatina (360 min) logro digerir 73% (HASP) y 63% (HAGO) del total de las proteínas, a su vez incrementando el contenido de PS. También liberó

significativamente el contenido de fitoquímicos (CFT, FT, taninos) y por lo tanto aumentó la capacidad antioxidante en ambos hidrolizados. Sin embargo el contenido de ANT disminuyó un 23% y un 317% al finalizar la hidrólisis de HASP y HAGO, respectivamente. La germinación de amaranto incrementó las propiedades funcionales de ISA (260%) y IAAC (26%), mientras el IAA y pH disminuyeron un 45% y 15%, respectivamente. Además, la hidrólisis enzimática con pepsina (90 min) y pancreatina (60 min) en HASP disminuyó las propiedades de IAA y EAI, mientras que ISA y IAAC aumentaron. En HAGO solo aumentó la solubilidad en agua por efecto de la hidrólisis enzimática.

El proceso de germinación en conjunto con la hidrólisis enzimática incrementa el contenido de PS, niveles de fitoquímicos y CAOX del grano de amaranto, así como también la solubilidad de las harinas. Estos resultados muestran el potencial de las harinas hidrolizadas de amaranto germinado como ingredientes en alimentos funcionales.

ABSTRACT

Amaranth is a pseudocereal with high quality protein content (13-19%). The germination of amaranth increases the content of proteins, phenolic compounds and antioxidant capacity. Also an *in vitro* gastrointestinal digestion can increase the nutraceutical potential of amaranth flours. The aim of this research was to evaluate the release of phytochemical compounds with antioxidant capacity and the effect in the functional properties of unprocessed and germinated amaranth hydrolysates. Two flours were obtained: Unprocessed Amaranth (HASP) and Germinated Amaranth (HAGO) Flours, after that flours were hydrolyzed using pepsin and pancreatin for 3 h each, simulating a gastrointestinal digestion; Aliquots were taken during hydrolysis. The samples were evaluated to Soluble Protein (PS), Total Phenolic Compounds (CFT), Total Flavonoids (FT), Anthocyanins (ANT), condensed tannins and Antioxidant Capacity (CAOX). The Water Absorption Index (IAA), Water Solubility Index (ISA), Oil Absorption Index (IAAc), Emulsion Activity Index (EAI) and pH were also evaluated. ANOVA and Fisher's LSD test were performed for the comparison of means ($p \leq 0.05$).

Germination process in amaranth increased the phytochemical content (PS: 37%, CFT: 17%, FT: 163%, ANT: 1417%); except to tannins content (-50.6%). Also antioxidant capacity increased (121%) by this process. Likewise simultaneous hydrolysis of pepsin+ pancreatin (306 min) digested 73% (HASP) y 63% (HAGO) of total proteins, increasing protein solubility. Also released significantly phytochemicals content (CFT, FT, tannins) and increased CAOX in both samples. However ANT content decreased by 23% (HASP) and 317% (HAGO) after hydrolysis. Moreover, amaranth germination increased functional properties as ISA (260%) and IAAc (26%), while IAA and pH

decreased by 45% and 15%, respectively. Additionally, enzymatic hydrolysis with pepsin (90 min) and pancreatin (60 min) in HASP decreased the functional properties of IAA and EAI, while ISA and IAAC increased. Though only water solubility increased in HAGO by effect of enzymatic hydrolysis.

The application of germination with enzymatic hydrolysis increased PS content, phytochemicals and CAOX in amaranth seeds, also flours water solubility. Herein the results showed the potential of hydrolyzed flours of germinated amaranth as ingredients in functional foods.

II INTRODUCCIÓN

El amaranto es un cultivo ancestral perteneciente a la familia AMARANTHACEA, género *Amaranthus*. México es uno de los países productores de amaranto reportando una producción de 6 547 toneladas en 2016 (SAGARPA-SIAP 2017). El alto valor nutricional de las semillas y la adaptabilidad de este cultivo a condiciones adversas han contribuido a la propagación y utilización de la planta con distintos fines (Pavlik 2012), entre los que se destaca la alimentación humana y animal, la industria, la medicina y la ornamentación (Montoya-Rodríguez 2015a). El grano de amaranto se puede consumir entero, ya sea molido o en forma de harinas, reventado o tostado y como ingrediente de diversos productos, como alegrías, tortillas, galletas, pan y pastas. También se utiliza para la elaboración de aceites comestibles, papillas para bebés, concentrados proteínicos, barras energéticas, bebidas y alimentos nutraceuticos especiales para enfermos que padecen diabetes, cáncer o enfermedad celiaca, debido a que el grano de amaranto no contiene gluten (Milán-Carrillo y col 2012).

El contenido de proteína del grano de amaranto (13-19%) es mayor que otros cereales de consumo habitual como el maíz (9.4%), el trigo (12.8%) y el arroz (5.6%). Sus proteínas son de alta digestibilidad y su composición equilibrada de aminoácidos se aproxima al patrón óptimo de referencia de proteínas en la dieta humana según los requerimientos de la FAO / OMS. Además, presenta dos veces más el contenido del aminoácido esencial lisina, el cual es limitante en otros cereales, más fibra dietética y de 5 a 20 veces el contenido de calcio y hierro que otros cereales (Venskutonis y Kraujalis 2013).

Por otra parte, también se ha destacado al grano de amaranto por ser fuente de minerales como Manganeso, Magnesio, Zinc, Potasio, Cobre, Selenio, Yodo, Cobalto y Vitaminas del complejo B (Czerwiński y col 2004; Pavlik 2012; Montoya-Rodríguez y col 2015b), así como flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas y taninos condensados (Paucar-Menacho y col 2017). El consumo de amaranto se ha asociado con la reducción en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas por la presencia de nutraceuticos (compuestos fenólicos, fibra dietética y ácidos grasos esenciales, entre otros) a los que se les han atribuido propiedades hipoglucemiantes, hipolipidémicas, inmunoestimulantes, antimutágenos, anticarcinógenos y antioxidantes (Birute y col 2009; Montoya-Rodríguez 2015a).

Los diferentes métodos de procesamiento aplicados al grano de amaranto influyen sobre las propiedades nutricionales y funcionales del grano. Uno de los métodos de procesamiento que ha demostrado incrementar el valor nutricional del grano es la germinación. Durante este bioproceso, ocurren cambios en la composición química del grano debido a la gran movilización de las reservas energéticas para ser utilizadas por el embrión (Gamel y col 2005; Chaparro-Rojas y col 2010). Se ha reportado que la germinación de amaranto incrementa el contenido de proteínas (40%) y fibra total (124%), así como también una disminución en el contenido de lípidos (30%) (Perales-Sánchez y col 2014b). Además, es una forma barata y eficaz de mejorar la calidad nutraceutica de los cereales, pseudocereales y leguminosas, ya que durante el bioproceso algunos compuestos con actividad antioxidante aumentan, principalmente polifenoles y flavonoides, que proporcionan protección contra el daño oxidativo en el organismo (Perales-Sánchez y col 2014b; Paucar-Menacho y col 2017). Otro método de

procesamiento que genera incrementos en el contenido de fenólicos y capacidad antioxidante es la hidrólisis proteica (Montoya-Rodríguez y col 2014; Sancho y col 2015). Durante este procesamiento, se genera una liberación de compuestos fenólicos que se encuentran unidos a carbohidratos y proteínas, incrementando de esa manera el contenido al hacerlos más extraíbles (Mtolo y col 2017). El grano de amaranto también se ha caracterizado por poseer propiedades funcionales, las cuales denotan características fisicoquímicas que afectan el comportamiento de las proteínas en la preparación, procesamiento, almacenamiento y consumo de los alimentos, por lo cual su evaluación es muy importante para determinar la calidad del producto durante el proceso y al final. El grano de amaranto tiene propiedades emulsionantes, espumantes y gelificantes, una buena capacidad de retención de agua y estabilización de emulsiones (aceite en agua), por lo que una alta concentración de proteínas es adecuada para usarla como transporte de diferentes compuestos bioactivos (Gonzalez y col 2002; Condés y Añon 2009; Bolontrade y col 2013; Shevkani y col 2014; Suarez y Añon 2018). Los métodos de procesamiento también tienen efecto sobre las propiedades funcionales. Durante la germinación ocurre una hidrólisis parcial de las proteínas de reserva y el almidón, lo que produce modificaciones estructurales de las proteínas y como consecuencia cambios en las propiedades funcionales. En el grano de amaranto germinado se han reportado incrementos en la dispersabilidad (11%) y la capacidad de formación de espuma (38%), así como también una disminución en la capacidad de absorción de agua (77%) y la estabilidad de emulsión (24%) en granos de *Amaranthus caudatus*. En el grano de *Amaranthus hypochondriacus* se han observado incrementos en la capacidad de absorción de agua de 81% (Perales-Sánchez 2014a) y 195% (Sánchez-Osuna 2018), incrementos en el índice de solubilidad en agua de

108%, 120% y 253% (Perales-Sánchez 2014a; Chauhan y col 2017; Sánchez-Osuna 2018) y aumentos de 52% (Chauhan y col 2015) y 900% (Sánchez-Osuna 2018) en la capacidad de absorción de aceite por efecto de la germinación. Sin embargo, una desventaja de las proteínas de amaranto es que muestran baja solubilidad en solventes acuosos por lo que limita su uso en la industria alimenticia. Una alternativa para mejorar la solubilidad es la hidrólisis enzimática controlada, la cual es utilizada frecuentemente para mejorar la funcionalidad y propiedades nutricionales de las proteínas alimentarias (Condés y Añón 2009; Ventureira y Añón 2009). Las propiedades funcionales que se ven mejoradas con la hidrólisis enzimática incluyen la solubilidad de las proteínas, la formación de espuma y la actividad de emulsión (Aluko y Monu 2003; Horax y col 2017). Dicho procesamiento es llevado a cabo en condiciones más leves, se tiene un mejor control de la reacción y una mínima formación de subproductos (Condés y Añón 2009; Castel 2010). El tratamiento previo de la proteína antes de la hidrólisis enzimática puede conducir al despliegue de la proteína y al aumento de la accesibilidad de la enzima a los enlaces peptídicos, por lo que se obtienen resultados más favorables. El proceso de germinación provoca cambios estructurales en las proteínas y la mejora de la calidad nutricional, por lo que la combinación de germinación e hidrólisis enzimática puede surgir como una nueva estrategia para el procesamiento de alimentos, y este enfoque puede afectar significativamente la calidad de las proteínas vegetales hidrolizadas (Yang y col 2017). En este sentido en el siguiente trabajo de investigación se evaluó la liberación de compuestos fitoquímicos con capacidad antioxidante y los cambios de las propiedades funcionales en hidrolizados de amaranto sin procesar y germinado.

III REVISIÓN DE LA LITERATURA

A. AMARANTO

1. Generalidades

El amaranto (*Amaranthus spp*) es un colorido pseudocereal procedente de la región andina de América del Sur (FAO 2016). Es un cultivo ancestral que se domesticó en América hace más de 5000 años y era la base en la alimentación de las civilizaciones precolombinas como la Azteca, Inca y Maya (Montoya-Rodríguez y col 2015b). Pertenece a la familia AMARANTHACEA, género *Amaranthus*, y tiene aproximadamente 70 géneros y más de 80 especies, de las cuales *Amaranthus hypochondriacus*, *Amaranthus caudatus* y *Amaranthus cruentus* son las principales especies domesticadas para la producción de granos (**Cuadro 1**) (Montoya-Rodríguez y col 2015b; Paucar-Menancho y col 2017). La especie *A. hypochondriacus* es la principal especie de amaranto cultivada en México desde la época precolombina (Montoya-Rodríguez y col 2015b).

La distribución del género *Amaranthus* es muy amplia, encontrándose en países como México, Estados Unidos, Guatemala, Ecuador, Perú, Bolivia, Argentina, Asia, India, Pakistán, Sri Lanka, Nepal, Birmania, Afganistán, Irán, China, África, Nigeria, Uganda, Oceanía, Malasia, Indonesia, entre otros (SAGARPA 2014; Montoya-Rodríguez y col 2015b). En México, durante el año 2016, se reportó una producción de 6 547 toneladas de amaranto, destacando como principal productor el estado de Tlaxcala, seguido de Puebla, Morelos, Estado de México y el Distrito Federal (**Cuadro 2**) (SAGARPA-SIAP 2017).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del amaranto

Clasificación taxonómica del amaranto	
Reino	Vegetal
División	Fanerogama
Tipo	<i>Embryophyta siphonogama</i>
Sub-Tipo	Angiosperma
Clase	<i>Dicotiledoneae</i>
Sub-Clase	<i>Archyclamidaeae</i>
Orden	<i>Centrosperceaemales</i>
Familia	AMARANTHACEA
Género	<i>Amaranthus</i>
Sección	<i>Amaranthus</i>
	<i>Amaranthus caudatus</i>
Especies	<i>Amaranthus cruentus</i>
	<i>Amaranthus hypocondriacus</i>

Fuente: FAO (2010)

Cuadro 2. Producción de amaranto en México en el año 2016

Entidad federativa	Volumen (Toneladas)
Total nacional	6547
Tlaxcala	3509
Puebla	2189
Morelos	301
México	301
Distrito federal	161
Oaxaca	68
Durango	7.8
Resto	10

Fuente: SAGARPA-SIAP (2017)

También se han reportado cultivos de amaranto en menores superficies en Aguascalientes, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Oaxaca, Querétaro, Nayarit, Veracruz y en huerto familiar en la zona serrana de Sinaloa, Sonora, Chihuahua y Durango (Garay y col 2014). La planta de amaranto se conforma principalmente por las raíces, tallo, hojas, inflorescencias y semillas (**Figura 1**) (Montoya-Rodríguez 2015a). El alto valor nutricional de las semillas y la adaptabilidad de este cultivo a condiciones adversas han contribuido al avivamiento, propagación y utilización de la planta con distintos fines (Pavlik 2012) entre los que se destaca la alimentación humana y animal, la industria, la medicina y la ornamentación (Montoya-Rodríguez 2015a). Para la alimentación humana se utiliza el grano entero, ya sea molido o en forma de harinas, reventado o tostado, con lo que se elaboran diversos productos, como alegrías, tortillas, galletas, pan y pastas. También se utiliza para la elaboración de aceites comestibles, papillas para bebés, concentrados proteínicos, barras energéticas, bebidas y alimentos nutraceuticos especiales para enfermos que padecen diabetes, cáncer o enfermedad celiaca, debido a que el grano de amaranto no contiene gluten (**Figura 2**) (Milán-Carrillo y col 2012) mientras que las hojas son consumidas en ensaladas y sopas (Montoya-Rodríguez y col 2015b). La semilla de amaranto está compuesta por 2 cotiledones (parte más rica en proteínas), el perispermo (rico en almidón), el endospermo, el procambium, el embrión, la radícula y la raíz (**Figura 3**). El tamaño de la semilla oscila entre 1 y 1,5 mm de diámetro y tiene forma circular. Las semillas varían en coloración, encontrándose en diferentes tonalidades como blanco, negro, amarillo, oro, rosa, rojo, entre otros (Montoya-Rodríguez y col 2015b).

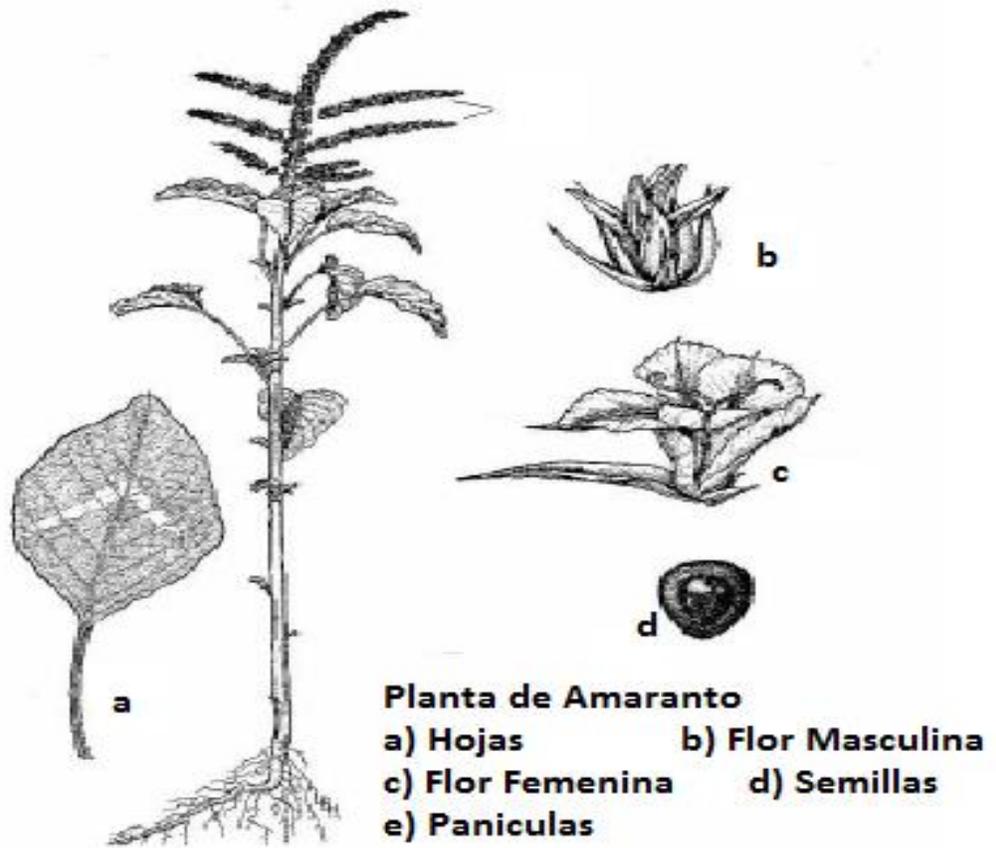


Figura 1. Partes de la planta de amaranto. **Fuente:** FAO (2010).

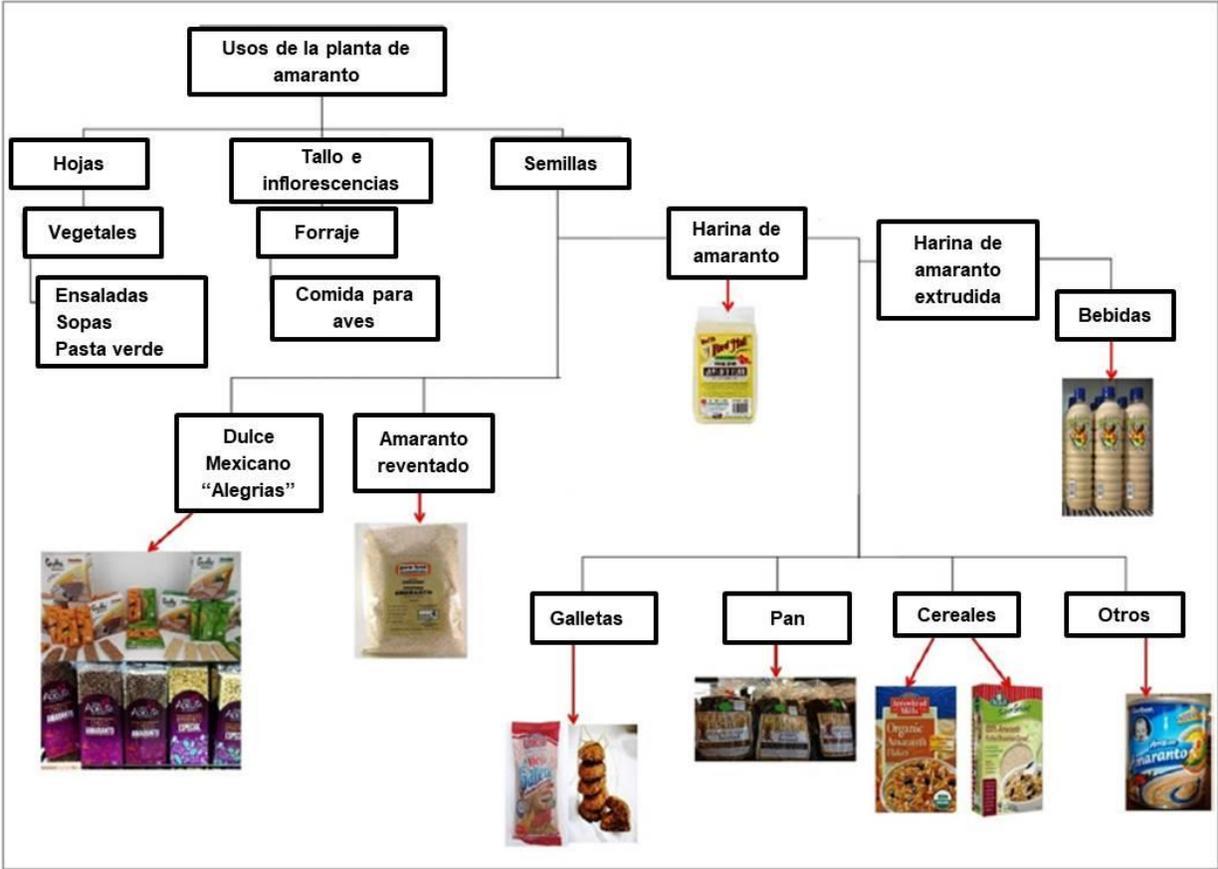


Figura 2. Usos de la planta de amaranto en alimentación humana y animal. **Fuente:** Montoya-Rodríguez (2015a)

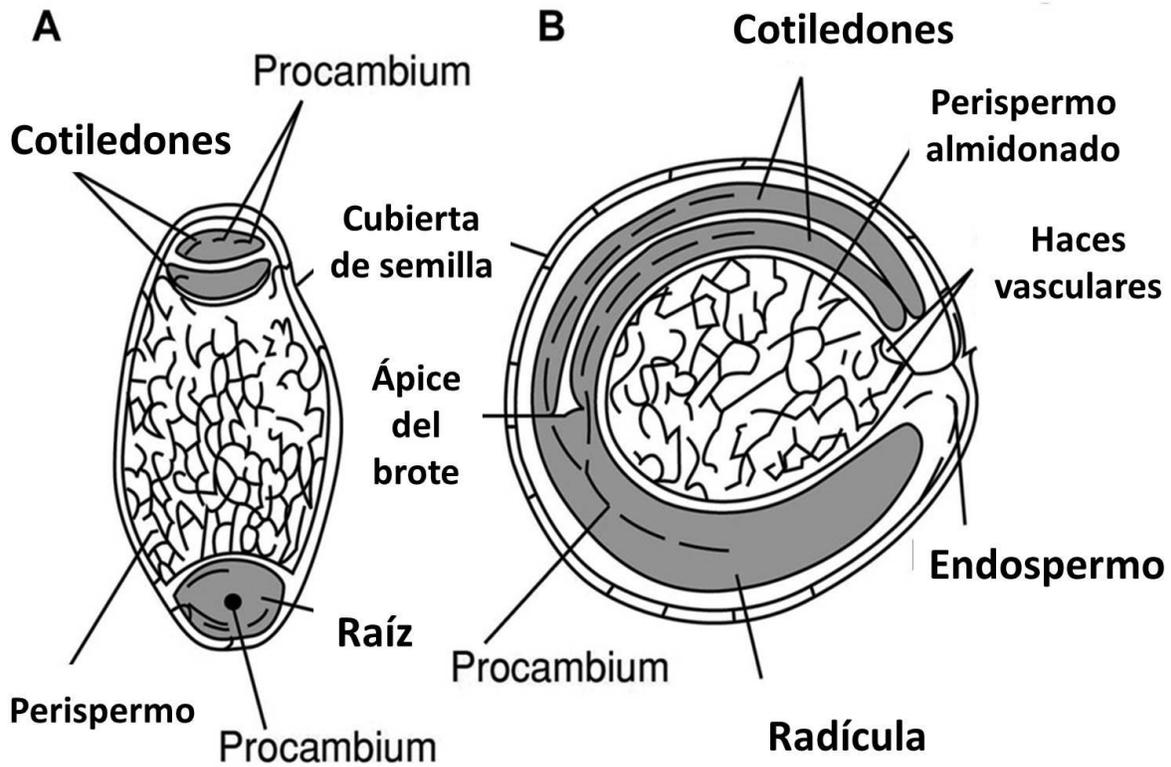


Figura 3. Estructura del grano de amaranto. A= semilla de amaranto sección transversal. B= semilla de amaranto sección longitudinal. **Fuente:** Montoya-Rodríguez (2015a) adaptado de Irving y col (1981).

2. Composición nutricional del grano de amaranto

a. Composición química

El grano de amaranto se ha distinguido de otros cereales por su contenido de proteínas (13-19%), el cual es mayor que otros cereales de consumo habitual como el maíz (9.4%) el trigo (12.8%) y el arroz (5.6%). Las proteínas del amaranto son de alta digestibilidad y se encuentran en el endospermo en un 35%, mientras que la proteína restante está presente en la capa y en el germen (Montoya-Rodríguez y col 2015b). Además, presenta dos veces más el contenido del aminoácido esencial lisina, el cual es limitante en otros cereales, más fibra dietética y de 5 a 20 veces el contenido de calcio y hierro que otros cereales (**Cuadro 3**) (Venskutonis y Kraujalis 2013). También es fuente de otros minerales como Manganeso, Magnesio, Zinc, Potasio, Cobre, Selenio, Yodo, Cobalto y vitaminas del complejo B (Czerwiński y col 2004; Pavlik 2012; Montoya-Rodríguez y col 2015b). En el **Cuadro 4** se muestra la composición química del grano de amaranto.

1) Carbohidratos

Los carbohidratos representan aproximadamente el 71% del grano de amaranto, siendo el almidón el principal componente (65-75%). El almidón de amaranto está compuesto en mayor parte por amilopectina, la cual al ser hidrolizada en el organismo provoca que la glucosa sea liberada y absorbida gradualmente, evitando de esta manera un incremento rápido postprandial de glucosa sanguínea. El contenido de amilosa del almidón de amaranto es considerablemente menos que en trigo lo cual trae

Cuadro 3. Comparación nutricional del amaranto con otros granos

Composición química*	Amaranto	Trigo	Maíz	Arroz	Avena
Proteína	19.0	12.8	9.4	5.6	15.8
Grasa Cruda	6	1.7	4.7	0.6	6.9
Carbohidratos	62	71	74	79.4	66
Fibra Cruda	5.6	2.3	3.0	0.3	3
Calcio	0.27	0.30	0.007	0.009	0.054
Hierro	0.015	0.004	0.003	0.005	0.005
Calorías	414	334	365	360	389

* = g/100 g de muestra en base seca. **Fuente:** Montoya-Rodríguez (2015a) adaptado de Malca y col (2001).

Cuadro 4. Composición química del grano de amaranto

Composición química*	Contenido	Promedio
Proteína	12-19	16.53
Carbohidratos	71.8	65.98
Lípidos	6.1-8.1	4.52
Fibra	3.5-5.0	10.38
Cenizas	3.0-3.3	2.59

* = g/100 g de muestra en base seca. **Fuente:** Montoya-Rodríguez (2015a) adaptado de Nieto (1990), FAO (2010) y Mendonca (2005).

como consecuencia de diferencias marcadas en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas (Montoya-Rodríguez 2015a). También se ha reportado que el grano posee un contenido de fibra de 4 a 7% principalmente insoluble (Pavlik 2012; Venskutonis y Kraujalis 2013). Debido a esto, se ha recomendado el consumo de amaranto a las personas con diabetes mellitus (Pavlik 2012). La sucrosa es el principal azúcar encontrado en amaranto, seguido de la rafinosa, mientras que la estaquiosa y la maltosa se han encontrado en pequeñas cantidades (Venskutonis y Kraujalis 2013).

2) Lípidos

El amaranto es una buena fuente de lípidos (6% a 8%). Las semillas contienen triacilglicérolos, fosfolípidos y vitaminas liposolubles tales como los tocoferoles, principales componentes de la fracción lipofílica. Los principales ácidos grasos encontrados en semillas de amaranto son ácido palmítico, oléico, linoléico (esencial) y esteárico. El amaranto también es una fuente rica de escualeno y tocoles como el α -tocoferol, β -tocotrienol y γ -tocotrienol. La presencia de fitosteroles, ceras y alcoholes terpénicos también se han reportado en diferentes especies de amaranto en cantidades menores (Venskutonis y Kraujalis 2013).

3) Proteínas

Existen varias formas para clasificar a las proteínas de la semilla de amaranto; según su morfología, función biológica, composición química y solubilidad; en base a esta última se han dividido en cuatro tipos: Albuminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), prolaminas (solubles en soluciones alcohólicas) y glutelinas (solubles en soluciones de hidróxido de sodio) (Segura-Nieto y col 1994). Las

principales proteínas de almacenamiento en amaranto son las globulinas y albúminas (Montoya-Rodríguez y col 2015b). Las globulinas constituyen la principal fracción proteica presente en los aislados de amaranto, con la globulina 11S, también llamada amarantina, como constituyente principal. Existen otras proteínas importantes presentes en el amaranto, como la proteína superóxido dismutasa, la cual participa en la destrucción de radicales libres producidos dentro de las células y que son tóxicos para los sistemas biológicos de la semilla (Montoya-Rodríguez y col 2015b). Las proteínas del amaranto se han destacado por ser de alta calidad debido a que su composición equilibrada de aminoácidos se aproxima al patrón óptimo de referencia de proteínas en la dieta humana según los requerimientos de la FAO / OMS. Otro aspecto importante de las proteínas de amaranto es que no contribuyen a intolerancias o reacciones alérgicas en personas con enfermedad celíaca (Montoya-Rodríguez y col 2015b).

b. Composición fitoquímica

Se denomina fitoquímico a aquellos compuestos orgánicos que son generados por el metabolismo secundario de plantas. Los fitoquímicos tienen una aparición restringida en grupos taxonómicos, cumpliendo con diversas funciones en las plantas, como resistencia y defensa contra plagas y enfermedades, virus, bacterias, hongos, herbívoros, insectos, protección ultravioleta, resistencia a sus membranas, entre otras funciones (Verpoorte 2000; Heldt 2011). Los fitoquímicos se pueden dividir en tres grandes grupos de acuerdo a su estructura química: terpenos, compuestos que contienen nitrógeno y compuestos fenólicos (Taiz y Zeiger 2002; Crozier y col 2008). El grano de amaranto contiene una variedad de compuestos fenólicos, los cuales se derivan de la fenilalanina y tirosina. La fenilalanina y la tirosina se sintetizan mediante

la vía del ácido shikimico. Una vez obtenida la fenilalanina, se inicia la síntesis de los compuestos fenólicos a través de la vía de los fenilpropanoides. En esta ruta, dos enzimas son clave para la síntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos: la Fenilalanina Amonio Liasa (PAL) y la enzima Chalcona Sintasa (CHS) (**Figura 4**) (Heldt 2011). Los compuestos fenólicos contienen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos unidos. Estos compuestos son los antioxidantes más abundantes en los alimentos vegetales de consumo humano (Heldt 2011; Campos-vega y Oomah 2013) y se han reportado alrededor de 10,000 compuestos (Taiz y Zeiger 2002; Crozier y col 2008). Se encuentran en altas concentraciones en la epidermis de hojas y piel de frutos y comúnmente están conjugados a azúcares como la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa y rutosa (Rice-Evans y col 1997; Crozier y col 2008). Se pueden considerar varias clases de compuestos fenólicos según la cantidad de anillos de fenol y los átomos de carbono que contengan. Algunos de los compuestos fenólicos encontrados en el grano de amaranto incluyen los ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas y taninos condensados.

1) Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se clasifican en dos grupos: los ácidos hidroxibenzóicos y los ácidos hidroxicinámicos. Los ácidos hidroxibenzóicos presentan un grupo carboxílico (COOH) y grupos hidroxilo (OH) (uno o más) en un anillo aromático (**Figura 5**). Los ácidos hidroxicinámicos se caracterizan por la presencia del grupo $CH = CH-COOH$ en remplazo del grupo COOH presente en los ácido hidroxibenzóico. Las principales fuentes de los ácidos fenólicos son las frutas, verduras y cereales (Peñarrieta y col 2014).

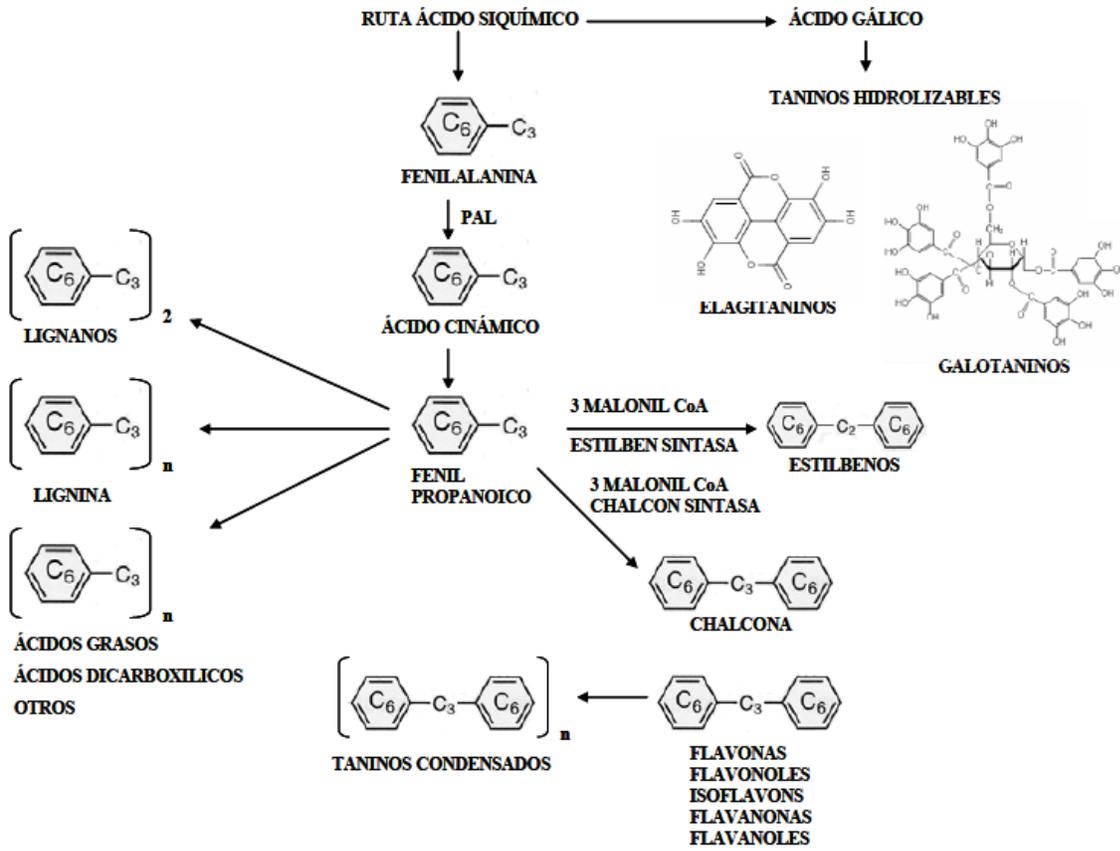


Figura 4. Esquema general de la biosíntesis de los compuestos fenólicos. **Fuente:** Shahidi y Naczk (2004).

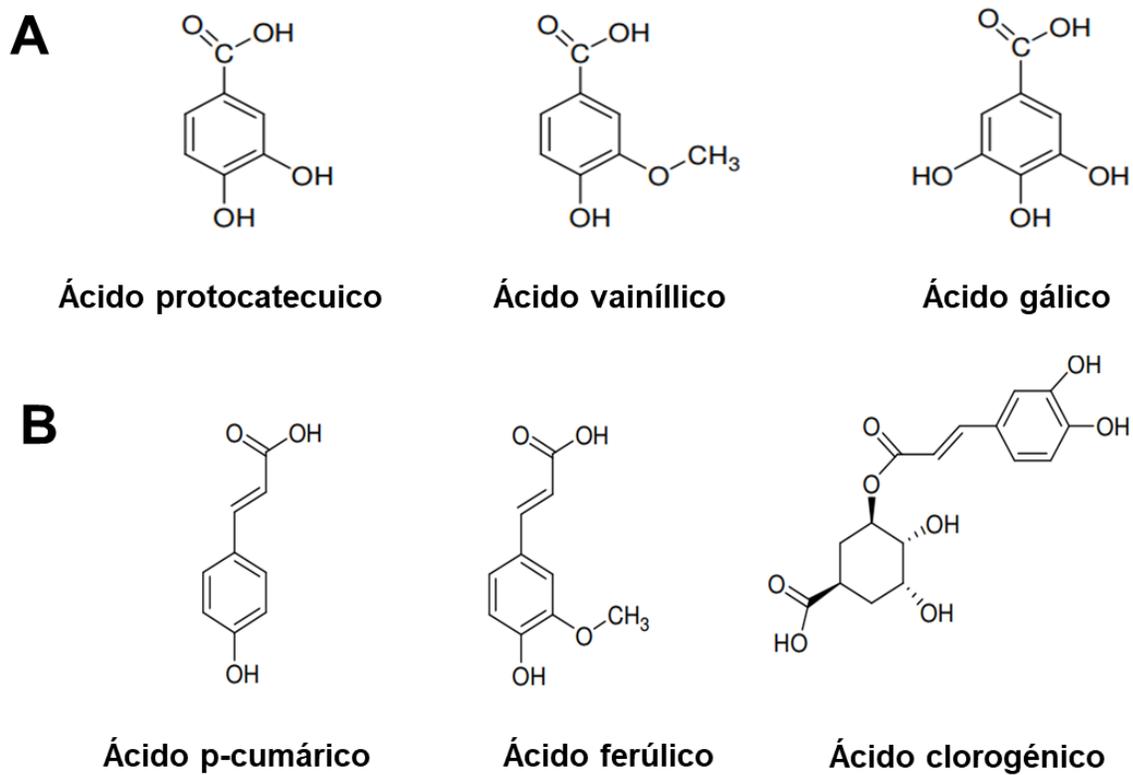


Figura 5. Ejemplos de ácidos hidroxibenzóicos (A) e hidroxicinámicos (B). **Fuente:** Peñarrieta y col (2014).

2) Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos que contienen en su estructura 15 carbonos, los cuales comprende 2 anillos aromáticos unidos mediante una cadena de 3 carbonos (**Figura 6**). Las principales subclases de flavonoides son las flavonas, flavonoles, flavan-3-oles, isoflavonas, flavanonas y antocianidinas (Crozier y col 2008).

También se consideran flavonoides otros grupos de fenólicos que se encuentran en menores cantidades en la dieta como los dihidroflavonoles, flavan-3-4 dioles, cumarinas, chalconas, dihidrochalconas y auronas. El esqueleto flavonoide básico puede tener numerosos sustituyentes. Los grupos hidroxilo generalmente están presentes en las posiciones 4', 5 y 7 y la mayoría contienen azúcares unidos como glucósidos. La unión a los flavonoides de los azúcares así como el contenido de grupos hidroxilo incrementan su solubilidad en agua, mientras que los grupos metilo y las unidades de isopentilo, hacen que los flavonoides sean lipófilos (Crozier y col 2008). Se ha reportado que los flavonoides son capaces de inhibir ciertos tipos de cáncer, demencia, enfermedades cardiovasculares y diabetes, así como también presentan actividades antioxidantes (steffensen y col 2011).

3) Antocianidinas

Las antocianidinas están ampliamente dispersas por todo el reino vegetal siendo responsables de las coloraciones rojas, azul y morado de las pieles de los frutos y flores. También se encuentran en hojas, tallos, semillas y tejido de raíz, sirviendo como protección de las plantas contra la luz excesiva al sombrear las células del mesófilo de

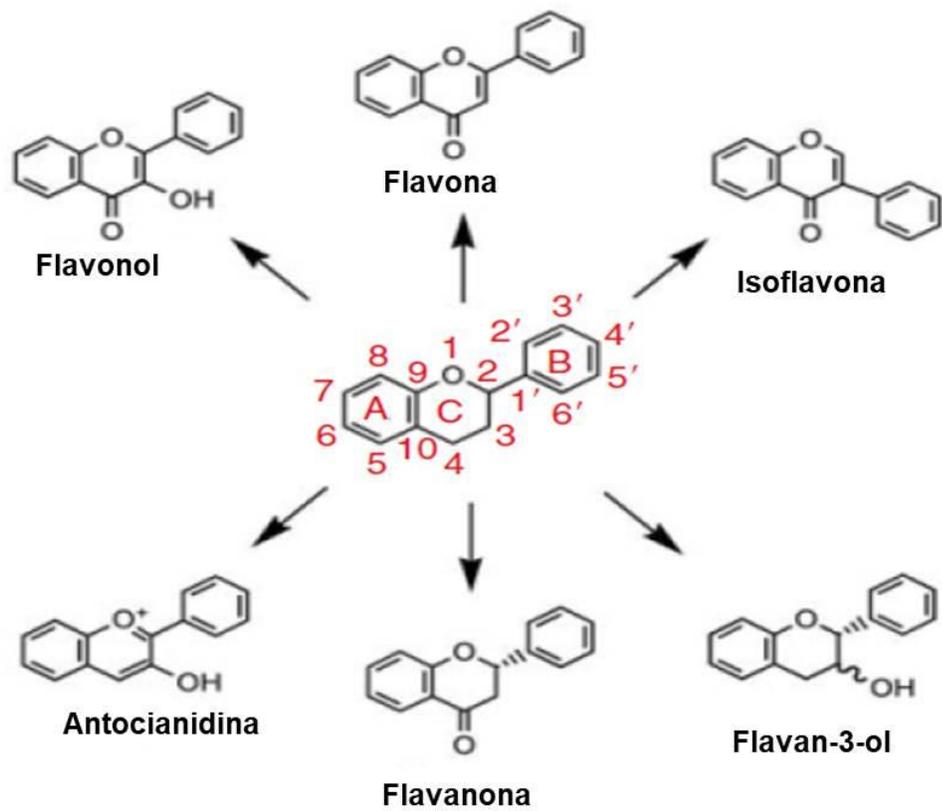


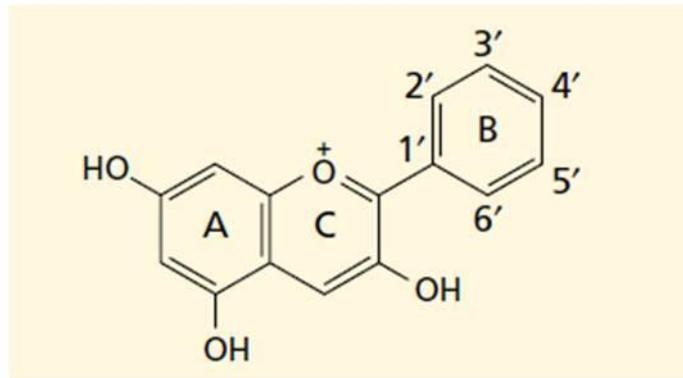
Figura 6. Estructura general de los flavonoides más comunes. **Fuente:** Crozier y col (2008).

la hoja y también tienen un papel importante en la atracción de insectos polinizadores. Dentro de la célula se almacenan en las vacuolas. Las antocianidinas más comunes son pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina. En los tejidos vegetales las antocianidinas se encuentran conjugados con azúcares, los cuales son por lo regular una o más hexosas, usualmente unido al grupo OH del anillo de pirilio, recibiendo el nombre de antocianinas (**Figura 7**). Las antocianinas también forman conjugados con hidroxicinamatos y ácidos orgánicos tales como ácidos málico y acético (Crozier y col 2008; Heldt 2011).

4) Taninos

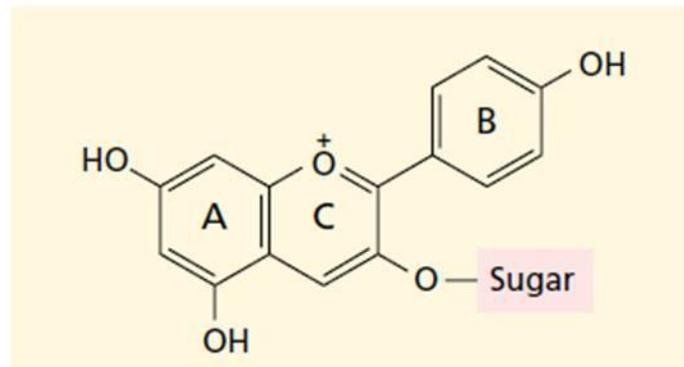
Los taninos son compuestos fenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en los alimentos, particularmente en leguminosas, granos de cereales, frutas, nueces y vegetales, así como también en algunas bebidas como el vino, té y cocoa. Los taninos se pueden clasificar de acuerdo a sus unidades monoméricas en 3 grupos: taninos hidrolizables, proantocianidinas o taninos condensados y taninos complejos. Los taninos hidrolizables están compuestos de esteres de ácido gálico (galotaninos) o ácido elágico (elagitaninos) con una molécula de azúcar como glucosa, fructosa, xilosa y sacarosa, tal como su nombre lo indica, son fácilmente hidrolizados por ácidos y enzimas a sus unidades monoméricas (Montes-Ávila y col 2017). Las proantocianidinas o taninos condensados son polihidroxi flavan oligómeros (soluble) que contienen de 2 a 6 unidades monoméricas o polímeros de alto peso molecular (insoluble). Los monómeros de proantocianidina son los diastómeros catequina(+) y epicatequina (-) (Montes-Ávila y col 2017).

(A)



Antocianidina

(B)



Antocianina

Figura 7. Estructura de antocianidina (A) y antocianina (B). **Fuente:** Crozier y col (2008).

Los taninos condensados y los taninos hidrolizables son capaces de unirse y precipitar las proteínas de colágeno en las pieles de animales, haciéndolas resistentes a la putrefacción, por lo que son ampliamente utilizados por la industria del curtido de pieles. Los taninos se unen a las proteínas salivales provocando el sabor astringente que los caracteriza. Muchas frutas inmaduras tienen un alto contenido de taninos que les ayuda a evitar ser consumidas hasta llegar a la maduración y una vez alcanzada, el contenido de taninos disminuye. Los taninos producen un impacto negativo en la nutrición de los seres vivos que los consuman debido a que se unen a las proteínas de la dieta en el intestino, incluidas las enzimas digestivas, provocando agregados de taninos y proteínas vegetales que son difíciles de digerir (Taiz y Zeiger 2002).

c. Compuestos fenólicos en el grano de amaranto

Diferentes estudios han evidenciado el potencial quimiopreventivo de los compuestos fenólicos como agentes contra las enfermedades crónicas asociadas al estrés oxidativo mediante una serie de acciones que incluyen actividades antioxidantes, anti-inflamatorias, anti-hipertensiva y anti-esclerótica (Paucar-Menancho y col 2017). Varios estudios han identificado la presencia de polifenoles en especies de *Amaranthus*, encontrándose ácidos fenólicos, como el ácido protocatecuico, vainílico, 4-hydroxybenzónico, syringico, p-cumárico, cafféico, ferúlico (Gorinstein y col 2008) algunos flavonoides como rutina, isoquercitrina, nicotiflorina y también taninos y antocianinas (**Cuadro 5**) (Czerwinski y col 2004; De la Rosa y col 2009; Steffensen y col 2011; Venskutonis y Kraujalis 2013). Los ácidos fenólicos son los compuestos más abundantes encontrados en el grano de amaranto y se encuentran en forma libre y ligada.

Cuadro 5. Principales compuestos fenólicos reportado en granos sin procesar de *Amaranthus ssp*

Compuesto	Cantidad	Referencia
Ácidos fenólicos		
Ácido genístico	5.26 mg/100 g bs	Li y col 2015
Acido 2-4 dihidrobenzóico	4.68 mg/100 g bs	Li y col 2015
Ácido ferúlico	0.39 mg/100 g bs	Li y col 2015
Ácido elágico	3.12 mg/100 g bs	Li y col 2015
Ácido siríngico	0.08 mg/100 g bs	Venskutonis y Kraujalis 2013
Ácido vainílico	3.79 µg/g bs	Paucar-Menacho y col 2017
Acido p-hidrobenzóico	0.17-0.22 mg/100g bs	Venskutonis y Kraujalis 2013
Acido p-cumárico	0.32 µg /g bs	Paucar-Menacho y col 2017
Ácido caféico	0.65 mg/100 g bs	Gorinstein y col 2008 Paucar-Menacho y col 2017
Ácido protocatecuico hexosido	0.56 µg/g bs	Paucar-Menacho y col 2017
Flavonoides		
Nicotiflorina	0.48-0.72 mg /100 g bs	Venskutonis y Kraujalis 2013
Isoquercetina	0.03-0.05 mg /100 g bs	Venskutonis y Kraujalis 2013
Kaempferol 3 rutinosido	6.94 mg/100 g bs	Li y col 2015
Rutina	7.49 mg/100 g bs	Li y col 2015
Quercetin-3-Rutinosido	2.15 µg/g bs	Paucar-Menacho y col 2017
Antocianinas	91 mg/ 100 g bs	Gorinstein y col 2007
Taninos	0.60% peso seco	Gorinstein y col 2008

Las formas libres de los fenólicos ácidos representan del 7 a 61% de la cantidad total de los compuestos fenólicos del grano (Paucar-Menancho y col 2017).

d. Propiedades nutraceuticas de los fitoquímicos del amaranto

Los alimentos nutraceuticos son aquellos alimentos o componentes nutricios con beneficios para la salud de los seres humanos, la prevención, tratamiento de enfermedades o malestares (Birujete y col 2009).

El consumo de granos integrales (cereales y leguminosas), sobre todo los pigmentados, se ha asociado con la reducción en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas(diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis y obesidad) debido a que en estos alimentos se encuentran fitoquímicos como los compuestos fenólicos, vitamina C y E, fibra dietética y ácidos grasos esenciales, a los cuales se les han atribuido propiedades hipoglucemiantes, hipolipidemicas, inmunoestimulantes, antimutágenos, anticarcinógenos y antioxidantes (**Cuadro 6**) (Birujete y col 2009; Montoya-Rodríguez 2015a).

El grano de amaranto además de ser fuente de flavonoides, ácidos fenólicos y antocianinas, también contiene compuestos que se consideran antinutricionales debido a que interfieren con la asimilación de los alimentos en el organismo como son los taninos, el ácido fítico, saponinas e inhibidores de proteasas (Montoya-Rodríguez 2015a). Sin embargo, algunos de estos compuestos antinutricionales presentan actividades biológicas benéficas sobre la salud cuando se ingieren en cantidades adecuadas (Montoya-Rodríguez 2015a).

Cuadro 6. Actividad biológica de componentes nutracéuticos

Actividad Biológica	Componentes
Antioxidante	Isoflavonas; ácido fólico; vitamina E; flavonoides; lignina, antocianinas, péptidos bioactivos
Anticancerígeno	Lectinas; inhibidores de proteasas; oligosacáridos; vitamina E; ácido fólico
Antitumorales	Flavonoides; omegas; saponinas; ácido ferúlico
Combaten cáncer de colon	Isoflavonas; fibra soluble
Combaten cáncer de mama	Isoflavonas
Combaten cardiopatías	Ácido fólico; oligosacáridos
Antimutágenos	Compuestos fenólicos
Hipocolesteromiantes	Ácido fólico; oligosacáridos; fibra soluble, tocotrienol, tocoferol
Hipoglucemiantes	Ácido fólico; fibra soluble; inhibidores de α -amilasa
Inmunoestimulantes	Lectinas
Antidiabéticos	Oligosacáridos; inhibidores de α -amilasa

Fuente: Montoya-Rodríguez (2015a).

B. MÉTODOS DE PROCESAMIENTO DEL AMARANTO

El procesamiento de un alimento se refiere al conjunto de fases sucesivas que involucra la transformación de materias primas en productos acabados. En la mayoría de los casos, dichos procedimientos alteran las propiedades fisicoquímicas y nutricionales de la materia prima original. Actualmente existe gran interés en el cultivo de amaranto por las características nutritivas que presenta y por los beneficios que puede brindar para solucionar los problemas de salud, tomando en cuenta el método de procesamiento que nos proporcione las mejores características de este pseudocereal. Al grano de amaranto se le puede aplicar distintos procesos, entre los que se incluyen la nixtamalización (cocción alcalina), expansión, extrusión, germinación e hidrolizados proteicos.

1. Nixtamalización

El proceso de nixtamalización, también llamado cocción alcalina consiste en cocinar el amaranto en presencia de cal. La concentración utilizada de cal varía de 0.4 a 1.3% del peso en grano y se aplica durante un periodo de tiempo, por lo general el tiempo de cocción es no mayor de 10 minutos. Este proceso lleva consigo cambios favorables como aumento en cenizas inducidos por la cal, aumentos altamente significativos en el contenido de calcio, incremento en la biodisponibilidad de la niacina, reduce en forma significativa los taninos y reduce el desarrollo de la rancidez de la grasa permitiendo una mejor vida de anaquel. Estos cambios son similares a los que se producen en el maíz nixtamalizado (Solano Jiménez 2002).

El grano de amaranto procesado por nixtamalización permite su uso como suplemento al maíz nixtamalizado para producir tortillas y otros productos. Se ha observado que el proceso de nixtamalización del grano de amaranto no afecta la calidad de su proteína (Bressani 2006).

2. Expansión

El método más común para procesar el grano de amaranto es a través de la expansión aplicando altas temperaturas por corto tiempo. Con este método se logra la expansión del grano de 5 a 6 veces en volumen y de esta forma es más fácil consumirlo. El proceso se puede realizar mediante dos métodos, utilizando aire caliente en reventadores de amaranto diseñados especialmente para ese fin o utilizando un método artesanal domestico que consiste en colocar el grano en una superficie caliente, hasta que la mayor parte de los granos ha tomado un color blanco, se observen expandidos y no se escuche más el ruido del reventado (Solano Jiménez 2002).

3. Extrusión

La extrusión de un alimento consiste en aplicar altas temperaturas y tiempos cortos en conjunto con un corte mecánico y calor para obtener la gelatinización parcial del almidón y la desnaturalización parcial de proteínas obteniéndose un producto plastificado y reestructurado con nuevas formas y texturas. Además, este proceso ofrece ciertas ventajas al minimizar la pérdida de nutrimentos, no genera efluentes y mejora la digestibilidad de las proteínas. Los productos de amaranto extrudidos

presentan un mejor valor nutrimental que el amaranto crudo y no necesita una cocción final por parte del consumidor (Montoya-Rodríguez 2015a).

4. Germinación

Está demostrado que las condiciones y el tipo de procesamiento influye en las características nutricionales de los granos de amaranto. La semilla es una unidad reproductiva compleja, característica de las plantas vasculares superiores, que se forma a partir del óvulo vegetal después de la fertilización. Las reservas energéticas de la semilla incluyen las grasas, carbohidratos y a veces proteínas, que sostendrán a la futura planta durante sus primeras etapas de vida (Doria 2010). Durante la germinación, cambios extensos han sido reportados en la composición de una variedad de granos, reflejando el complejo y dinámico flujo de nutrientes y fitoquímicos incluidos la movilización, degradación y acumulación de nutrientes (Paucar-Menancho y col 2017).

La germinación consiste en la reanudación de la actividad metabólica y el crecimiento activo de los tejidos del embrión, lo que resulta en la ruptura de la cubierta de la semilla y la emergencia de una plántula. El proceso de germinación comprende tres fases importantes.

a. Absorción de agua

La primera consiste en la absorción de agua por imbibición, en la se lleva a cabo una intensa absorción de agua por parte de los distintos tejidos que forman la semilla, que en conjunto con un aumento proporcional en la actividad respiratoria provocan su hinchamiento y ruptura final de la testa. La cantidad de agua que absorbe la semilla

está en función directa de su tamaño, de la permeabilidad de la cubierta, cantidad y disponibilidad de agua y composición química.

b. Inicio de la actividad metabólica

En la segunda fase se inicia de la actividad enzimática y del metabolismo respiratorio, llevándose a cabo una translocación y asimilación de las reservas alimentarias en las regiones en crecimiento del embrión. Los compuestos de reserva que se encuentran en las semillas son glúcidos, proteínas y lípidos. La movilización de estas reservas, durante la germinación es un proceso esencial que permite la supervivencia de la semilla hasta que la plántula se desarrolla lo suficiente para realizar la fotosíntesis. Se produce un incremento en los niveles de metabolitos intermediarios y enzimas, asociados con la producción de energía, particularmente el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, reflejado por el aumento en la velocidad de intercambio gaseoso. En esta fase la absorción de agua se reduce considerablemente, llegando incluso a detenerse. La hidrólisis previa del almidón es imprescindible para obtener la energía necesaria para activar el metabolismo. El proceso se inicia con la liberación por el embrión de gibrelinas, las cuales inducen la síntesis de enzimas glucolíticas y proteolíticas. La movilización de proteínas provee a la semilla de aminoácidos, a partir de los que se obtiene la energía necesaria cuando existe una deficiencia de glúcidos.

c. Crecimiento y división celular

La última fase consiste en el crecimiento y la división celular, que provoca la emergencia de la radícula y posteriormente de la plúmula. En la mayoría de las

semillas, el agua penetra inicialmente por el micrópilo y la primera manifestación de la germinación exitosa es la emergencia de la radícula (Doria 2010).

d. Factores que afectan el proceso de germinación

Existen factores internos y externos que afectan el proceso de germinación. Los factores internos a considerar incluyen la maduración de la semilla y su viabilidad (período de tiempo durante el cual las semillas conservan su capacidad para germinar). Los factores externos consideran la humedad, debido a que la absorción de agua es el primer paso y el más importante que tiene lugar durante la germinación y esta puede afectar la entrada de agua en el interior de la semilla. La temperatura es un factor decisivo en el proceso de germinación ya que influye sobre las enzimas que regulan la velocidad de las reacciones bioquímicas que ocurren en la semilla después de la rehidratación. La actividad de cada enzima tiene lugar entre un máximo y un mínimo de temperatura, existiendo un óptimo intermedio. Por ello, las semillas solo germinan dentro de un cierto margen de temperatura. La temperatura mínima sería aquella por debajo de la cual la germinación no se produce, y la máxima aquella por encima de la cual se anula igualmente el proceso. De este modo, es importante establecer una temperatura óptima, intermedia entre ambas, en la cual se consiga el mayor porcentaje de germinación en el menor tiempo posible. La presencia de gases también es un factor externo a considerar. La mayor parte de las semillas requieren un medio suficientemente aireado para la germinación, que permita una adecuada disponibilidad de O_2 y CO_2 y así obtener la energía para mantener sus actividades metabólicas. Durante la respiración tres rutas respiratorias son funcionales, la glucólisis, el ciclo de las pentosas fosfato y ciclo de Krebs y están encargadas de producir compuestos

intermediarios del metabolismo vegetal, así como considerables cantidades de energía y poder reductor. En conjunto, todos los factores determinan el contenido nutricional de los granos de amaranto durante la germinación, por lo que es importante determinar condiciones óptimas de germinación (Doria 2010).

e. Efecto de la germinación sobre la composición química del grano de amaranto

Durante el proceso de germinación, ocurren cambios en la composición química del grano debido a la gran movilización de las reservas energéticas para ser utilizadas por el embrión. Algunos investigadores han reportado cambios en el contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos. Perales-Sánchez y col (2014b) establecieron condiciones óptimas ($T=30^{\circ}\text{C}$ y $t= 72$ h) de germinación de *Amaranthus hypochondriacus* encontrando un incremento en el contenido de proteínas (40%), fibra dietaria soluble (655%), insoluble (99%) y total (124%), así como también una disminución en el contenido de lípidos (30%) por efecto de la germinación. Chauhan y col (2015) germinaron amaranto (20 horas, 32°C), encontrando un incremento en el contenido de proteína. Gamel y col (2005) estudiaron el efecto de la germinación (32°C , 48 h) de dos especies de amaranto (*A. caudatus*, *A. cruentus*) sobre el contenido de almidón del grano, observando una disminución en ambas especies luego de la germinación. Los autores señalan que el incremento en el contenido de proteínas es atribuido a la pérdida de materia química y a la síntesis de enzimas durante la germinación dando como resultado la liberación de aminoácidos para la síntesis de proteínas. La pérdida del contenido de lípidos se atribuye a su utilización por el embrión como fuente de energía y el contenido de carbohidratos se ve afectado por el aumento

en la actividad de la enzima α amilasa que rompe los carbohidratos complejos en azúcares simples (Gamel y col 2005; Perales-Sánchez y col 2014b; Chauhan y col 2015).

f. Efecto de la germinación sobre el contenido de fitoquímicos y capacidad antioxidante del grano de amaranto

Se ha sugerido que la germinación es una forma barata y eficaz de mejorar la calidad nutracéutica de los cereales, pseudocereales y leguminosas, ya que durante este bioproceso algunos compuestos con actividad antioxidante aumentan, principalmente polifenoles y flavonoides, que proporcionan protección contra el daño oxidativo en el organismo. Estos cambios están estrechamente relacionados con el tipo de grano y condiciones de germinación (tiempo de remojo, temperatura y tiempo de germinación) (Perales-Sánchez y col 2014b). Existen algunas investigaciones donde se han optimizado las condiciones de germinación para obtener un mayor contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del grano de amaranto. Perales-Sánchez y col (2014b) optimizaron el proceso de germinación en función de la temperatura y el tiempo de *Amaranthus hypochondriacus*, logrando un incremento en el contenido de proteínas, lípidos, fibra dietética, Compuestos Fenólicos Totales (CFT) y flavonoides, en comparación con las semillas crudas.

Paucar-Menacho y col (2017) optimizaron condiciones de germinación (temperatura, tiempo) de granos de *Amaranthus caudatus* para incrementar el contenido de CFT y Capacidad Antioxidante (CAOX), logrando un incremento de CFT y CAOX de 4.0 y 6.4 veces, respectivamente. Además, se analizó la composición fenólica individual de los

germinados de amaranto obtenidos en las condiciones óptimas por HPLC-DAD-ESI/MS, encontrando que la germinación de granos de amaranto en condiciones optimizadas incrementó, principalmente, las concentraciones de los ácidos 4-O-Cafeoilquínico, 4-O-Feruloilquínico y del flavonoide Quercetina-3-O-Rutinósido.

Álvarez-Jubete y col (2010) examinaron la presencia de compuestos fenólicos y propiedades antioxidantes de extractos metanólicos de amaranto, quinoa, trigo sarraceno y trigo durante el proceso de germinación y el horneado. En general, el contenido de CFT y la CAOX tuvo un impacto positivo con la germinación y negativo con el horneado (Álvarez-Jubete y col 2010). Los cambios en el contenido de compuestos fenólicos podrían deberse a la liberación y biosíntesis de nuevos compuestos, ya que las enzimas que degradan las paredes celulares durante la germinación (principalmente esterasas) se encuentran activas y contribuyen a la modificación de la estructura de la pared celular del grano, contribuyendo a la liberación de los compuestos fenólicos que se encontraban unidos. Por otra parte, también se ha observado la activación de la enzima PAL durante la germinación de las semillas (Guardado-Felix y col 2017).

5. Hidrolizados proteicos

Los hidrolizados proteicos son un procedimiento que se ha aplicado a diversos alimentos mediante la acción externa y aislada de enzimas. La hidrólisis proteica consiste en la rotura del enlace peptídico, ya sea mediante métodos químicos (tratamientos con ácidos o bases) o biológicos (mediante la utilización de enzimas proteolíticas). En nuestro organismo, existen enzimas que tienen como función

hidrolizar los alimentos hasta sus unidades monoméricas, siendo las enzimas digestivas principales tripsina, quimotripsina y pepsina las encargadas de la hidrólisis de las proteínas. La tripsina escinde las cadenas peptídicas principalmente en el lado carboxilo de los aminoácidos lisina y arginina, excepto cuando sigue una prolina. En consecuencia, se generan péptidos de menor tamaño. Los péptidos bioactivos son secuencias de entre 2 y 15 aminoácidos que se liberan durante la digestión del alimento en el organismo del individuo o por un procesado previo del mismo y al liberarse se activan para cumplir con alguna función biológica (Montoya-Rodríguez y col 2014). Se ha reportado la presencia de péptidos bioactivos en proteínas de origen animal como los derivados de la leche y pescado y en algunos cereales como la soya, arroz, garbanzo, frijol y amaranto con actividades opioides, inmunomoduladoras, transportadores de minerales, antitrombóticas, antihipertensivas, antioxidantes, antimicrobianas e hipocolesterolémicas. Las proteínas representan uno de los componentes principales de los alimentos, tanto desde un punto de vista funcional como nutricional, ya que determinan las propiedades físicas y organolépticas de muchos alimentos y constituyen un aporte nutricional importante, representando una fuente de energía, nitrógeno y aminoácidos esenciales (Vioque y Millán 2005). Los hidrolizados proteicos buscan explotar o mejorar las características nutricionales de las proteínas de origen animal y vegetal para ser usados como suplemento proteico en la dieta y para el tratamiento de enfermedades o síndromes específicos. Estos se utilizan como parte de los suplementos alimenticios debido a su elevada solubilidad, permitiendo su utilización en alimentos líquidos. Los sectores de la población a los que van dirigidos estos alimentos son diversos, siendo utilizados principalmente por aquellos que necesitan un sobreaporte proteico, por ejemplo para alimentación de la

tercera edad, la alimentación enteral y parenteral y la nutrición deportiva, sobre todo en ejercicios de resistencia. Respecto a las aplicaciones medicinales de los hidrolizados proteicos, sin duda la más conocida e importante por su impacto en nutrición haya sido la producción de hidrolizados hipoalergénicos (Vioque y Millán 2005).

El grano de amaranto se ha distinguido por poseer un alto contenido de proteínas, que al hidrolizarse, liberan péptidos con diversas actividades biológicas, como por ejemplo actividad antioxidante. Silva-Sánchez y col (2008) encontraron el péptido lunasina en proteínas de semilla de amaranto, el cual tiene actividad anticancerígena. También encontraron otros péptidos bioactivos con actividades biológicas como antioxidante, antihipertensiva, antiinflamatoria.

Además de la generación de péptidos bioactivos a partir de la hidrólisis de las proteínas, está demostrado que la hidrólisis enzimática genera una liberación de compuestos fenólicos que se encuentran unidos a macromoléculas tales como carbohidratos y proteínas, incrementando de esa manera el contenido al hacerlos más extraíbles (Mtolo y col 2017). Por otro lado, los compuestos fenólicos pueden ser afectados de manera negativa debido a los cambios de pH, sobre todo alcalino, disminuyendo su detección al modificar su estructura o ser degradados (Sancho y col 2015).

6. Propiedades funcionales del grano de amaranto

El uso de proteínas vegetales como ingredientes en sistemas alimenticios se basa principalmente en sus propiedades funcionales, las cuales se definen como aquellas características que proporcionan información del comportamiento físico-químico de las proteínas en un sistema alimenticio. Dichas propiedades denotan características

fisicoquímicas que afectan el comportamiento de las proteínas en la preparación, procesamiento, almacenamiento y consumo de los alimentos, por lo cual su evaluación es muy importante para determinar la calidad del producto durante el proceso y al final. Algunas de estas propiedades incluyen la capacidad de retención de agua, solubilidad, viscosidad, gelificación, emulsificación, formación de espuma, entre otras. Estas propiedades están determinadas por factores intrínsecos propios de la molécula (conformación, relación y disposición de los aminoácidos, hidrofobicidad, carga eléctrica, forma, peso molecular, etc.), así como de factores extrínsecos del medio que los rodea y que en ocasiones pueden modificarse (pH, fuerza iónica, temperatura, actividad acuosa, constante dieléctrica, etcétera) (Castel 2010). La capacidad de absorción en agua es uno de los parámetros más importantes a tomar en consideración para el desarrollo de alimentos, particularmente para los productos lácticos y alimentos que son expuestos a altas temperaturas tales como los horneados y productos extrudidos. El índice de solubilidad en agua (ISA) es la propiedad funcional más importante porque afecta otras características funcionales tales como la actividad de emulsión y la actividad de formación de espuma. La capacidad de absorción de aceite es la habilidad de las proteínas vegetales y cereales de unir los lípidos mediante atracción capilar. Este parámetro es de importancia en el desarrollo de productos, debido a que las grasas actúan como retenedores de sabor y también incrementan la palatabilidad de los alimentos. La capacidad de emulsión es ampliamente utilizada para evaluar su uso en alimentos tales como mayonesa, crema, salsas, postres, productos cárnicos deshebrados y bebidas (Soria-Hernández y col 2015). Las proteínas de almacenamiento del grano de amaranto se han caracterizado por poseer propiedades de emulsión, espumantes y gelificantes, así como también una buena capacidad de

retención de agua (Gonzalez y col 2002; Condés y Añon 2009; Bolontrade y col 2013; Shevkani y col 2014; Suarez y Añon 2018).

Las proteínas del amaranto tienen un punto isoeléctrico en promedio de 4.5, lo cual significa que presentan baja solubilidad a pH cercanos a la neutralidad y en condiciones de alta fuerza iónica, tales características representan una limitación para el uso de esas proteínas en la industria alimentaria debido a que la mayoría de los alimentos es casi neutro (Bolontrade y col 2013; Suarez y Añon 2018). Adicionalmente, las proteínas de amaranto tienen la capacidad de formar y estabilizar emulsiones (aceite en agua), por lo que una alta concentración de proteínas es adecuada para usarla como transporte de diferentes compuestos bioactivos (Suarez y Añon 2018).

a. Efecto del procesamiento sobre las propiedades funcionales del grano de amaranto

Al grano de amaranto se le pueden aplicar diferentes procesos, entre los más comunes se incluyen el tostado, el reventado, la extrusión, la germinación y los hidrolizados proteicos.

1) Tostado y reventado

Se ha reportado que el tostado del grano de amaranto incrementa la CAOX y el ISA en un 60 y 58% respectivamente (Milán-Carrillo y col 2012). El proceso de reventado del grano incrementa la capacidad de absorción de agua (122%) debido a la gelatinización del almidón y la desnaturalización de las proteínas. También produce un incremento de la absorción de aceite (38%) y de la dispersabilidad (118%), mientras que parece tener efectos negativos en la capacidad de formación de espuma ya que el

procesamiento produjo una reducción del 264% y de 19% en la estabilidad de emulsión, así como también una disminución de los factores antinutricionales (Gamel y col 2006).

2) Extrusión

El proceso de extrusión del grano de amaranto incrementa la solubilidad en agua, por lo que los extrudidos son muy versátiles para utilizarse en la elaboración de bebidas. Milán-Carrillo y col (2012) reportan un incremento del 353% en el ISA por efecto de la extrusión del grano de *Amaranthus hypochondriacus* y del 15 % en la CAOx, mientras que el mismo proceso produjo una disminución del 7% y 17% el Índice de Absorción de Aceite (IAAc) y la dispersabilidad respectivamente.

3) Germinación

Durante la germinación ocurre una hidrólisis parcial de las proteínas de reserva y el almidón, lo que produce modificaciones estructurales de las proteínas y como consecuencia cambios en las propiedades funcionales. Gamel y col (2006) reportaron un incremento en la dispersabilidad (11%) y en la capacidad de formación de espuma (38%), así como también una disminución en la capacidad de absorción de agua (77%) y de la estabilidad de emulsión (24%) por efecto de la germinación de granos de *Amaranthus caudatus*. En el grano de *Amaranthus hypochondriacus* se han observado incrementos en el Índice de Absorción de Agua (IAA) de 81% (Perales-Sánchez 2014a) y 195% (Sánchez-Osuna 2018), incrementos en el ISA de 108%, 120% y 253% (Perales-Sánchez 2014a; Chauhan y col 2017; Sánchez-Osuna 2018) y aumentos de 52% (Chauhan y col 2015) y 900% (Sánchez-Osuna 2018) en el IAAc por efecto de la germinación.

4) Hidrolizados proteicos

Una desventaja de las proteínas de amaranto es que muestran una solubilidad bastante baja en solventes acuosos por lo que limita su uso en la industria alimenticia. Una alternativa para mejorar la solubilidad es la hidrólisis enzimática controlada, la cual es utilizada frecuentemente para mejorar la funcionalidad y propiedades nutricionales de las proteínas alimentarias (Condés y Añón 2009; Ventureira y Añón 2009). Las propiedades funcionales que se benefician con la hidrólisis enzimática incluyen la solubilidad de las proteínas, la formación de espuma y la actividad de emulsión (Aluko y Monu 2003; Horax y col 2017). Dichos cambios se deben a que la hidrólisis enzimática disminuye el peso molecular e incrementa el número de grupos ionizables de las proteínas y expone los grupos hidrofóbicos los cuales cambian las interacciones químicas (Meinlschmidt y col 2016). Además es un procedimiento llevado a cabo en condiciones más leves, se tiene un control más fácil de la reacción y una mínima formación de subproductos (Condés y Añón 2009; Castel 2010) Las modificaciones dependen fuertemente de la enzima proteolítica utilizada, las condiciones de hidrólisis y el grado de hidrólisis alcanzado. Estas condiciones deben ser cuidadosamente seleccionadas para su aplicabilidad en la formulación de alimentos (castel 2010). Por ejemplo, los hidrolizados de proteínas con bajo Grado de Hidrólisis (GH) (<10%) se utilizan para mejorar las propiedades físicas de los alimentos, mientras que los hidrolizados de proteínas extensos (>10%) se reemergen como suplementos de proteínas o formas nutricionales especializadas (Condes y Añón 2009; Castel 2010). El tratamiento previo de la proteína antes de la hidrólisis enzimática puede conducir al despliegue de la proteína y al aumento de la accesibilidad de la enzima a los enlaces

peptídicos. El proceso de germinación causa cambios estructurales en las proteínas y la mejora de la calidad nutricional, por lo que la combinación de germinación e hidrólisis enzimática puede surgir como una nueva estrategia para el procesamiento de alimentos, y este enfoque puede afectar significativamente la calidad de las proteínas vegetales hidrolizadas (Yang y col 2017).

III JUSTIFICACIÓN

Existe una creciente demanda de nuevos productos alimenticios con alta calidad nutricional y baja alergenicidad, por lo que las proteínas vegetales han llamado la atención debido a sus propiedades funcionales, nutricionales y nutraceuticas. El amaranto es un cultivo que se ha popularizado debido a sus características agronómicas, su elevado contenido de proteínas de alta calidad y bajo costo. El contenido de proteína del grano de amaranto varía de 12-19% y tienen una composición de aminoácidos que es mejor que la de los cereales y leguminosas, además no contiene gluten, por lo que su consumo es apropiado para las personas con enfermedad celiaca. Está demostrado que el procesamiento del grano influye en sus características nutricionales, funcionales y nutraceuticas. Tal es el caso de la germinación, la cual incrementa el contenido de proteínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. Además, también resulta eficaz para mejorar algunas propiedades funcionales de las harinas y así su uso se pueda diversificar en una variedad de productos alimenticios. De manera adicional se pueden mejorar aún más las propiedades nutraceuticas y funcionales de las harinas al utilizar enzimas comerciales para producir hidrolizados. El efecto de la germinación en conjunto con una hidrólisis proteica ya ha sido evaluado sobre las propiedades nutricionales y funcionales de algunas semillas como quinua y soya. Sin embargo, existe escasa información sobre el impacto de esos procesamientos sobre el grano de amaranto, por lo que se plantea evaluar el efecto de la germinación e hidrólisis enzimática sobre el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, así como también los cambios que ocurren en las propiedades funcionales.

IV HIPÓTESIS

El proceso de germinación del grano de amaranto mejora la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y propiedades funcionales en hidrolizados de harinas de amaranto sin procesar y germinado.

V OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la liberación de compuestos fitoquímicos con capacidad antioxidante y los cambios de las propiedades funcionales en hidrolizados de amaranto sin procesar y germinado.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar proteína soluble, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en harina de amaranto sin procesar y germinado.
2. Obtener hidrolizados de las harinas de amaranto sin procesar y germinado.
Determinar proteína soluble.
3. Evaluar el efecto de la hidrólisis enzimática sobre los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante en la harina de amaranto sin procesar y germinado.
4. Determinar el efecto de la germinación e hidrólisis enzimática en propiedades funcionales de las harinas de amaranto.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

Se utilizó grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) color crema con buenas características agronómicas, procedente de Temoac, Morelos, México. El grano se limpió y almacenó en recipientes herméticos en refrigeración (5-10°C) hasta su utilización.

B. MÉTODOS

1. Obtención de harina de amaranto germinado

Para la obtención de Harina de Amaranto Germinado Optimizado (HAGO) se aplicó la metodología reportada por Perales-Sánchez y col (2014b) con algunas modificaciones. Lotes de 100 g de semillas de amaranto, limpias y sin defecto, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.1% por 10 min, esto para desinfectar y eliminar cualquier contaminante que pudiera traer en la superficie de la semilla. Los granos desinfectados se retiraron de la solución y fueron lavados con agua purificada para eliminar el cloro residual, para luego dejarse en remojo por 6 horas en agua destilada. Transcurridas las 6 horas de remojo, el agua fue decantada y se removió el exceso de agua superficial con papel absorbente, para posteriormente colocar las semillas homogéneamente en una cama de algodón y tela de gasa, previamente humectadas con una solución a 200 ppm de hipoclorito de sodio, para mantener humedad alta constante y evitar el crecimiento de microorganismos en los germinados. Después las camas de algodón con los granos tratados se colocaron en una cámara de germinación empleando fotoperiodos de luz/oscuridad (12h:12h)

durante el tiempo de germinación empleado. Las condiciones de operación del germinador fueron: temperatura de germinación 30 °C y tiempo de germinación 78 horas; una vez transcurrido el tiempo se colectaron los germinados en charolas de plástico perforadas y fueron secados mediante liofilización.

Para obtener las harinas de HAGO y Harina de Amaranto Sin Procesar (HASP), los germinados liofilizados y granos de amaranto crudo fueron sometidos a molienda (UD Cyclone Sample Mill, UD Corp, Boulder, CO, EUA) hasta pasar a través de malla 80 (0.180 mm). Las harinas obtenidas (HASP Y HAGO) fueron empacadas en bolsas de polietileno y almacenadas a 4°C hasta su utilización.

2. Extracción total de proteínas de harina de amaranto germinado y amaranto sin procesar

Se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Silva-Sánchez y col (2008) con algunas modificaciones. El extracto de proteína fue preparado usando una solución de Buffer de Fosfatos (PBS) a un pH de 7.4, en una relación de 50 mg de harina en 1 mL de buffer. Una vez agregado el buffer a la harina, se agitó en un vortex para homogeneizar la muestra. Posteriormente se procedió a la extracción de proteínas colocando las muestras en el baño ultrasónico durante 70 minutos a 40°C, mezclando cada 10 minutos en un vortex. La mezcla se centrifugó a 13,000g durante 20 minutos a 24°C y una vez listos se colectaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Todas las fracciones se obtuvieron por triplicado.

a. Medición de proteína soluble (DC-Protein Assay)

La Proteína Soluble (PS) se determinó siguiendo la metodología de Oseguera-Toledo y col (2011), con algunas modificaciones, utilizando el kit DC-Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA) para microplacas. Este es un ensayo colorimétrico para la concentración de proteína después de la solubilización con detergente. La cantidad de proteína soluble se calculó utilizando una curva estándar de albumina de suero bovino. La preparación de la curva estándar se realizó de la siguiente forma: 15 mg de albumina de suero bovino se disolvieron en 10 mL de PBS y se hicieron 7 diluciones posteriores. La curva estándar se preparó el mismo día de la medición para obtener mejores resultados. Antes de cargar la muestra en la microplaca, se realizó una dilución 1:20 para bajar la concentración de la proteína y así no tener problemas en la medición. Una vez realizada la curva estándar y las diluciones se procedió a llenar la placa de la siguiente forma: se agregaron 5 μ L de cada uno de los puntos de la curva estándar y 5 μ L de la muestra en una microplaca (transparente) limpia y seca. Posterior a esto se agregaron 25 μ L de reactivo A (solución de tartrato de cobre alcalino) y 200 μ L de reactivo B (reactivo folin diluido) (Bio Rad 500-0116). Después de agregar los reactivos, se dejó en reposo durante 15 minutos para posteriormente leer su absorbancia en un espectrofotómetro a 690 nm. Esta reacción se basa en la interacción de los aminoácidos aromáticos con los reactivos A y B. Altos niveles de aminoácidos aromáticos nos indican mayor contenido de proteína soluble. El color de la muestra cambia de claro a azul, un color azul más intenso indica mayor contenido de proteína soluble.

3. Hidrólisis enzimática

La digestión proteínica *In vitro* simulada se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento de Mejía y col (2009), con algunas modificaciones (Montoya-Rodríguez y col 2014). Primeramente la harina de amaranto se suspendió en agua (1:20 p/v) y se agitó con ayuda de un agitador magnético para disolverla completamente y eliminar los grumos. Posteriormente se ajustó la temperatura (37°C) y el pH (pH 2 para pepsina). Una vez ajustadas las condiciones de temperatura y pH, se añadió la enzima pepsina [EC 3.4.23.1, ≥ 250 unidades/mg; enzima/sustrato, 1:20 (p/p)] y se dejó llevar a cabo la hidrólisis durante 3 horas. Una vez transcurrido el tiempo se detuvo la hidrólisis incrementando el pH a 7.5 para iniciar una subsecuente hidrólisis con pancreatina [4x USP; enzima/sustrato, 1:20 (p/p)] a 37° C durante 3 horas. La hidrólisis se detuvo calentando los hidrolizados a 75 °C durante 20 minutos y se procedió a centrifugarlos a 20,000g durante 15 minutos a 4 °C y el sobrenadante fue recolectado y liofilizado. Para determinar la PS, Grado de Hidrólisis (GH), Contenido de Fenólicos Totales (CFT), Flavonoides Totales (FT), Antocianinas Totales (ANT), taninos condensados y Capacidad Antioxidante (CAOX) se tomaron alícuotas a los 10, 25, 60, 90, 120 y 180 minutos durante la hidrólisis con ambas enzimas.

4. Grado de hidrólisis (GH)

El GH se determinó de acuerdo a la metodología de Hoyle y Merr LTt (1994). El método consiste en medir el contenido total de nitrógeno (N) soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Se tomaron 5 mL de los hidrolizados y se mezclaron con 5 mL del TCA al 20%, se homogeneizó y posteriormente se centrifugó a 10000 rpm, por

20 minutos a 10 °C; se recuperó el sobrenadante y se le determinó el N soluble en el TCA por el método de Kjeldahl. El grado de hidrólisis se calculó mediante la ecuación:

$$\% \text{ GH} = (\text{N soluble en TCA de la muestra} / \text{N total de la muestra}) \times 100$$

5. Preparación de extractos metanólicos

La preparación de extractos metanólicos de los hidrolizados se llevó a cabo siguiendo la metodología de Milán-Noris y col (2018) con algunas modificaciones. Se tomaron 0.05 g de las harinas/hidrolizado liofilizado y se resuspendieron en 1 mL de metanol al 80%. Posteriormente fueron sonicados durante 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugados a 4°C, 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se recolectó y a la pastilla restante se le volvió a repetir el mismo procedimiento para obtener al final 2 mL de extracto el cual se llevó a sequedad en un concentrador y fue almacenado a -4 °C hasta su posterior uso.

6. Determinación de compuestos fenólicos

a. Compuestos fenólicos totales (CFT)

Para la determinación de los CFT se utilizó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y col (1999). Esta prueba consiste en mezclar ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico que se reduce, por la acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno en un medio altamente básico (carbonato de sodio) al 7%. Los polifenoles son fácilmente oxidables en medio básico, formando O₂, los productos de oxidación reaccionan con el molibdato formando óxido de molibdeno, este compuesto puede ser identificado y cuantificado por espectroscopia de UV/visible debido a que absorbe a una longitud de 750 nm. Primeramente se colocaron

20 μ L de la curva/muestra en una placa limpia y seca, posteriormente se añadieron 180 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu y 50 μ L de carbonato de sodio al 7%. Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 90 minutos y una vez finalizado el tiempo se tomó la lectura a 750 nm. La cuantificación se llevó a cabo utilizando una curva de ácido gálico y los resultados se expresaron en mg Equivalentes de Ácido Gálico (EAG) por 100 g de muestra.

b. Determinación de flavonoides totales (FT)

Para la determinación de FT se siguió la metodología descrita por Heimler y col (2005). Primeramente se colocaron 20 μ L del extracto metanólico de la curva/muestra en una placa de 96 pocillos limpia y seca. Posteriormente se agregaron 100 μ L de agua destilada, 6 μ L de nitrito de sodio al 5%, 12 μ L de cloruro de aluminio, 40 μ L de hidróxido de sodio 1 M y 22 μ L de agua destilada. Se dejó reposar 30 minutos y se procedió a tomar la lectura al 510 nm. Para determinar la concentración de flavonoides se utilizó una curva de catequina. Los resultados fueron expresados como mg Equivalentes de Catequina (CE) por 100 g de muestra.

c. Determinación de antocianinas totales (ANT)

Para la determinación de ANT se siguió la metodología propuesta por Abdel-Aal y Hucl (1999). Se tomaron 0.050 g de muestra y se mezclaron con 1 mL de metanol acidificado frío (95% metanol, 1N HCl 85:15, v/v). Las muestras fueron agitadas por 30 minutos y centrifugadas a 3000g durante 5 minutos, posteriormente se recolectó el sobrenadante y se leyó la absorbancia de la muestra a 535 y 700 nm. El contenido de antocianinas se calculó utilizando el coeficiente de absorción molar de 25,965 Abs/M x

cm y el peso molecular de cianidina 3 glucosido de 449.2 g/mol. Los resultados se expresaron como mg Equivalentes de Cianidina 3 Glucosido (CGE) por 100 g de muestra.

d. Determinación de taninos condensados

Se determinaron acorde a los procedimientos reportados por Broadhurts y Jones (1978) y Xu y Chang (2007) con modificaciones. Este método se basa en la condensación de la vainillina con proantocianidinas en una solución acidificada. La vainillina protonada, un electrófilo débil, reacciona con el anillo del flavonoide en la posición C 6 u 8. El producto de esta reacción se deshidrata fácilmente para dar un color rosa ligero a un intenso rojo cereza. Se procedió a tomar 20 μ L de la muestra (extracto metanólicos al 80%) y de una solución de estándar de catequina (+) las cuales se mezclaran con 1200 μ L de vainillina al 4% en metanol y 600 μ L de HCL concentrado y se dejaron reposar 15 minutos. La absorbancia se midió a 500 nm en un espectrofotómetro visible UV. Los resultados se calcularon y expresaron como mg equivalentes de Catequina (CE) por 100 gramos de muestra.

7. Medición de la capacidad antioxidante (CAOX)

La CAOX de las muestras fue evaluada utilizando el método de Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC) (Ou y col 2001). Se adicionaron los reactivos en el siguiente orden: 20 μ L del estándar de trolox, 20 μ L de los hidrolizados diluidos previamente en PBS, 120 μ L de solución de fluoresceína (concentración final de 70 nM/pozo); y 60 μ L de 2,2'-azo-bis (2 amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH) (concentración final 12 mM/pozo). Las placa fue incubada durante 15 minutos a 37 °C

previo a la adición de AAPH e inmediatamente después de la adición de AAPH, la placa se colocó en el lector de placas FL 800x para fluorescencia (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT), con una excitación de 485 nm y una emisión de filtro de 520 nm, y se monitorearon las absorbancias cada 2 minutos durante 2 h. Los resultados se calcularon basándose en las diferencias de área bajo la curva cayente fluorescente entre el blanco y las muestras y se expresaron como micromoles de equivalentes de trolox ($\mu\text{mol ET}$) /mg de proteína soluble. El trolox (4-240 μM) un análogo de vitamina E, se utilizó como estándar.

8. Determinación de las propiedades funcionales de las harinas e hidrolizados proteicos de amaranto sin procesar y germinado

a. Índice de absorción (IAA) y solubilidad en agua (ISA)

El IAA y el ISA fueron determinados de acuerdo con la metodología reportada por Du y col (2014). Primeramente, 0.250g de muestra y 3 mL de agua destilada se colocaron en un tubo para centrifuga de 50 mL y se agitaron levemente. Posteriormente los tubos se colocaron en baño maría a 70°C durante 30 minutos y después fueron centrifugados a 3000 xg por 10 minutos. El Sobrenadante se decantó en un vial de vidrio previamente pesado para determinar el contenido de solidos secos después de haberse dejado en un horno una noche a 105°C. El IAA y el ISA se calcularon de acuerdo con las formulas siguientes:

$\text{IAA (g/g)} = \text{Peso del sedimento} / \text{peso de la muestra}$

$\text{ISA (\%)} = (\text{Peso de los sólidos secos en el sobrenadante} / \text{peso de la muestra}) \times 100$

b. Índice de absorción de aceite (IAAc)

El IAAc de las harinas/hidrolizados se determinó aplicando la metodología reportada por Ordorica-Falomir (1988). Muestras de 0.5 g de harina más 3 mL de aceite vegetal se colocaron en un tubo graduado para centrífuga, se agitaron durante 1 min en un vortex, se dejaron reposar durante 30 min y finalmente, se centrifugaron a 1,600xg por 25 min. Se midió el volumen de aceite libre. La cantidad de aceite absorbido se calculó restando el volumen de aceite libre al volumen de aceite inicial y se expresó como mL de aceite absorbido/g de harina. La prueba se realizó por triplicado.

c. Índice de actividad de emulsión (EAI)

El EAI fue determinado mediante un método turbidimétrico reportado por Pearce y Kinsella (1978). Las emulsiones de aceite en agua fueron preparadas justo antes del análisis dispersando 25% (v/v) aceite de canola en un buffer de fosfatos (100 mM;pH 7) el cual contenía 1%(p/v) de proteína, seguido de una homogenización usando un ultraturrax a 14 000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Para la determinación del EAI, 100 µL fueron añadidos a 3 ml de 0.1% (p/v) sodium docecyl sulfate (SDS) y mezclado en un vortex. La absorbancia de la emulsión diluida fue medida a 500 nm con un espectrofotómetro. La turbidez de la emulsión y el EAI fueron calculados con las siguientes ecuaciones:

$$T = 2.303 \times (A/L) \times D$$

$$EAI = (2 \times T) / (\emptyset \times C \times 1000)$$

Donde T es la turbidez de la emulsión en m, A es la absorbancia a 500 nm de la emulsión diluida, D es el factor de dilución, L es el ancho de la celda en m. EAI es el

índice de actividad de emulsión expresado en m^2/g , \emptyset es la fracción de volumen de aceite y C es la concentración de la dispersión de proteína (mg/mL).

d. pH

Se llevó a cabo de acuerdo con la metodología propuesta por Espinosa-Ramírez y col (2016). Se realizó una dispersión de 0.3 g de harina/hidrolizado en 7.5 mL de agua destilada e incubada durante 30 minutos a 25°C con agitación continua. Posteriormente se procedió a determinar el pH utilizando un potenciómetro el cual fue calibrado con buffers de 4, 7 y 10. La prueba se realizó por triplicado.

9. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software Statgraphics centurión 15. El grupo de medias fue analizado utilizando comparación de medias LSD, considerando diferencia estadística significativa con un valor $p \leq 0.05$ basado en diferencias significantes mínimas en base al análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. Todos los análisis se llevaron a cabo en al menos tres replicas independientes.

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Efecto de la germinación sobre el contenido de proteína soluble, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de la harina de amaranto sin procesar y germinada

a. Cambios en el contenido de proteína soluble

En el **Cuadro 7** se reporta el contenido de PS, el proceso de germinación incrementó un 37% ($p < 0.05$) la PS en las muestras de amaranto. Se han reportado valores mayores en el contenido de proteína soluble en granos sin procesar de *Amaranthus hypochoondriacus* con 5.3 mg/mL (Montoya-Rodríguez y col 2014) y 6.23 mg/mL para *Amaranthus mantegazzianus* (Delgado y col 2011). Se han observado incrementos en el contenido de proteína soluble por el proceso de germinación, como el caso de la soja (5%) (Vernaza y col 2012) y frijol chino (8%) (*cowpea bean*) (De Sousa Rocha y col 2014). Se sugiere que los cambios en la proteína soluble se deben a la acción de las enzimas endopeptidasas, las cuales son activadas en las proteínas de reserva para sintetizar nuevos tejidos durante la germinación y esas proteínas degradadas son más solubles que las proteínas intactas (de Souza Rocha y col 2014).

b. Cambios en el contenido de compuestos fenólicos totales

En el **Cuadro 7** se reporta el contenido de fenólicos totales (CFT), el proceso de germinación incrementó un 17% ($p < 0.05$) de CFT en las muestras de amaranto. Se han reportado mayores incrementos en el contenido de CFT por efecto de la germinación de

Cuadro 7. Efecto de la germinación sobre proteína soluble, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en harinas de amaranto sin procesar y germinado

PARÁMETRO	HASP	HAGO
Proteína soluble ¹	3.31 ±0.34 ^b	4.55 ±0.10 ^a
Compuestos Fenólicos Totales ²	23.34± 1.25 ^b	27.29± 0.78 ^a
Flavonoides ³	4.6 ± 0.2 ^b	12.1 ± 0.1 ^a
Antocianinas totales ⁴	0.58 ± 0.04 ^b	8.80 ± 0.04 ^a
Taninos condensados ⁵	133.11 ±3.67 ^a	65.72 ± 5.29 ^b
Capacidad antioxidante ORAC ⁶	415.97 ±34.72 ^b	920 ±70.90 ^a

HASP= Harina de Amaranto Sin Procesar, HAGO= Harina de Amaranto Germinado Optimizado. ¹: mg/mL de proteína soluble, ²: mg equivalentes de ácido gálico/100 g base seca, ³: mg equivalentes de catequina (CE)/100 g base seca, ⁴: mg equivalentes de cianidina-3-glucosido/100 g base seca, ⁵: mg equivalentes de catequina(CE)/100 g base seca, ⁶: μmol equivalentes de Trolox (ET)/mg de proteína soluble. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar; Medias con letra superíndice diferente en el mismo renglón indican diferencia significativa (LSD p≤0.05).

1103% (Perales-Sánchez y col 2014b) y 1123% (Sánchez-Osuna 2018) en granos de *Amaranthus hypochondriacus*, valores de 287% (Paucar-Menacho y col 2017) y 307% (Álvarez-Jubete y col 2010) en granos de *Amaranthus caudatus* y de 42% en frijol mungo y 26% frijol rojo (Sangsukiam y col 2017). Los cambios en el contenido de compuestos fenólicos durante la germinación son atribuidos a la liberación de estos compuestos de matrices celulares y proteínas, ya que las enzimas que degradan las paredes celulares (principalmente esterases) se encuentran activas y contribuyen a la modificación de la estructura de la pared celular del grano. También se relaciona el incremento a la biosíntesis de nuevos compuestos, ya que se ha informado sobre la activación de la enzima PAL durante la germinación de las semillas (Perales-Sánchez y col 2014b; Paucar-Menacho y col 2017). Los compuestos fenólicos son producto del metabolismo secundario de las plantas y estos son sintetizados en respuesta a estímulos ambientales tales como la luz, humedad, condiciones del suelo y agua, presencia de microorganismos en el ambiente o predadores, clima, condiciones geográficas etc. Estos metabolitos tienen como principal función proveer de protección a las plantas, confiriéndoles resistencia y defensa, por lo que su contenido se ve afectado por los factores ambientales tanto bióticos como abióticos (Taiz y Zeiger 2002).

c. Cambios en el contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales (FT) en la harina de amaranto sin procesar y germinada fue de 4.6 y 12.1 mg CE/100 g bs respectivamente, lo cual corresponde a un incremento del 163% ($p < 0.05$) por efecto de la germinación (**Cuadro 7**). Otros investigadores han reportado cantidades mayores de FT en especies de amaranto

crudo, con valores de 18.66 (Lucero López y col 2011) y 16.86 mg CE/100 g bs (Perales-Sánchez y col 2014b) en *A. hypochondriacus*. Por otra parte, Li y col (2015) reportan un contenido de flavonoides en la semilla de amaranto sin procesar de 3 especies diferentes (*A hypochondriacus*, *A. caudatus* y *A. cruentus*) de 0.37, 0.53 y 0.35 mg CE/g bs respectivamente.

El incremento de FT por germinación (206%) ha sido observado previamente en *Amaranthus hypochondriacus* (Perales-Sánchez y col 2014b). Sin embargo, efecto contrario se observó en *A. Caudatus* presentado una ligera disminución del 32.5% en los FT (Li y col 2015). También se han reportado incrementos por efecto de la germinación en otras semillas como el garbanzo y maíz blanco, en los cuales se reflejó un incremento del 109% (Domínguez-Aispuro y col 2018) y del 186% (ZILIC y col 2015) respectivamente. El incremento en el contenido de flavonoides se relaciona con la síntesis novo y la liberación de estos de matrices celulares que ocurre durante la germinación (Perales-Sánchez y col 2014b; Zilic y col 2015).

d. Cambio en el contenido de antocianinas totales

El contenido de antocianinas totales (ANT) fue de 0.58 mg CGE/100 g para la harina de amaranto sin procesar y de 8.80 mg CGE/100 g para la harina germinada (**Cuadro 7**). Esta diferencia representa un incremento del 1417%($p < 0.05$) atribuido al proceso de germinación. Se han reportado valores mayores de ANT que van de 0.9 a 103.6 mg CGE/100g en harinas de amaranto sin procesar (Pasko y col 2009; Lucero López y col 2011; Rocchetti y col 2017). El efecto de la germinación del grano de amaranto sobre el contenido de antocianinas ya ha sido observado por algunos investigadores. La

germinación incrementó el contenido de ANT en 200% en *A. hypochondriacus* (Osuna y col 2017) y un 26% en *A. cruentus* (Pasko y col 2009). Sin embargo, efecto contrario se observó en maíz morado y quinua, en donde la germinación produjo una disminución del 132% y 565% respectivamente (Valencia Bustamante 2015).

Se ha sugerido que el incremento en el contenido de antocianinas por la germinación puede ser debida a la síntesis de novo y polimeración de los compuestos fenólicos durante ese bioproceso (Khoddami y col 2017). Además, también se ha observado que la exposición a la luz de los granos durante la germinación afectaba positivamente el contenido de antocianinas (Pasko y col 2009).

e. Cambios en el contenido de taninos condensados

Se encontró una disminución en el contenido de taninos condensados de 50.62% ($p < 0.05$) por efecto de la germinación (**Cuadro 7**). Dicho efecto concuerda con lo observado por otros autores en semillas de amaranto. Kanesi y col (2011) reportaron un contenido de taninos del 0.8% Equivalentes de Catequina en muestras de amaranto sin procesar, mientras que en los germinados no fueron detectados. Olawoye y col (2017) y Kumari y col (2015) reportaron una disminución de taninos condensados del 54% y 68% por efecto de la germinación en semillas de *Amaranthus viridis* y soja respectivamente, mientras que Hejazi y col (2016) reportó un incremento del 47% en semillas de *A. caudatus* por efecto de la germinación. Los autores refieren que la disminución del contenido de taninos condensados pudo ser debida a la actividad enzimática presente durante el bioproceso, en donde varios componentes como los carbohidratos, proteínas, fibra, lípidos así como también los compuestos fenólicos son degradados,

concluyendo que la germinación es un proceso eficaz para disminuir estos compuestos antinutricionales (Kumari y col 2015).

f. Cambios en la capacidad antioxidante

La germinación de amaranto causó un incremento en la Capacidad Antioxidante (CAOX) de 121% (**Cuadro 7**). El efecto de la germinación sobre la CAOX ha sido previamente evaluado. Se han reportado incrementos significativos en la CAOX de 300% en amaranto (Perales-Sánchez y col 2014b), 8% en soja (Vernaza y col 2012), 178% en garbanzo (Domínguez-Aispuro y col 2017) y 83% en frijol chino (De Sousa Rocha y col 2014) mientras que López-Barríos y col (2016) no encontraron cambios significativos al germinar frijol negro. La concentración de compuestos fenólicos se ha relacionado con una mayor CAOX (Guardado-Félix y col 2017). Por otra parte, se ha hipotetizado que durante la germinación ocurre un incremento en la actividad de la enzima PAL la cual promueve la biosíntesis de compuestos fenólicos (Domínguez-Aispuro y col 2017; Guardado-Félix y col 2017). Además, la activación de la respiración de la semilla y la degradación enzimática de las proteínas, almidón y de la pared celular contribuye a la liberación de los compuestos fenólicos ligados (Acosta-Estrada y col 2014). Adicionalmente, otros elementos presentes en las harinas como los aminoácidos aromáticos y azufrados son capaces de donar electrones y neutralizar a los radicales libres (Vernaza y col 2012). Como se reportó anteriormente, el contenido de CFT, FT, ANT y PS incrementó en la muestra germinada ($p < 0.05$), lo cual pudo haber contribuido con la CAOX.

2. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de proteína soluble en harina de amaranto crudo y germinado

El uso de pepsina para la elaboración de los hidrolizados de amaranto sin procesar incrementó significativamente ($p < 0.05$) el contenido de PS de 3.31 a 5.25 mg/mL durante los 180 min, este incremento corresponde al 48.7% de la proteína digerida total (GH; valores en anexos) (**Cuadro 8**). Al continuar la hidrólisis con la enzima pancreatina observamos un máximo de PS a los 240 minutos (5.53 mg/mL). Después de este tiempo el contenido de PS se mantiene estadísticamente constante. Al tiempo 360 minutos con las dos enzimas tenemos hidrolizados con 73% total de la proteína digerida. La hidrólisis de harina de amaranto germinado con pepsina incrementó significativamente ($p < 0.05$) la PS de 4.55 a 6.07 mg/mL. Dicho incremento corresponde al 46.03% de la proteína digerida total. Durante la hidrólisis con pancreatina se observó un máximo de PS a los 205 minutos (6.37 mg/mL). Al finalizar la hidrólisis con las dos enzimas (360 minutos), obtuvimos hidrolizados con un 63% total de la proteína digerida.

Los cambios en el contenido de PS en hidrolizados proteicos ya han sido evaluados en amaranto y otras semillas. Montoya-Rodríguez y col (2014) reportaron que la hidrólisis enzimática de *A. hypochondriacus* sin procesar aumentó la PS 75% luego de 360 minutos de hidrólisis con pepsina y pancreatina, encontrando un máximo valor a los 205 minutos (9.8 mg/mL) de hidrólisis. Vernaza y col (2012) reportan una disminución de PS (17%) en hidrolizados de soja sin procesar ($p < 0.05$), mientras que en los hidrolizados de soja germinada (72 horas, 25°C) la PS se mantuvo sin cambios significativos. Por otro lado, de Sousa Rocha y col (2014) germinaron e hidrolizaron durante 4 horas semillas de frijol chino (*cowpea bean*), encontrando una disminución de

Cuadro 8. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de proteína soluble en harinas de amaranto sin procesar y germinado

Enzima	Tiempo de hidrólisis (min)	Contenido de proteína soluble*	
		HASP	HAGO
Pepsina	0	3.31 ± 0.34 ^f	4.55 ± 0.10 ^{ef}
	10	3.25 ± 0.24 ^f	4.41 ± 0.40 ^f
	25	3.41 ± 0.20 ^f	4.72 ± 0.15 ^e
	60	3.89 ± 0.17 ^e	5.26 ± 0.18 ^d
	90	4.30 ± 0.19 ^d	5.37 ± 0.26 ^d
	120	4.57 ± 0.18 ^c	5.79 ± 0.18 ^c
Pepsina+ Pancreatina	180	5.25 ± 0.27 ^b	6.07 ± 0.27 ^b
	190	5.47 ± 0.34 ^a	6.17 ± 0.25 ^{ab}
	205	5.46 ± 0.31 ^{ab}	6.37 ± 0.34 ^a
	240	5.53 ± 0.12 ^a	6.21 ± 0.18 ^{ab}
	270	5.41 ± 0.28 ^{ab}	6.17 ± 0.39 ^{ab}
	300	5.39 ± 0.15 ^{ab}	6.04 ± 0.31 ^b
	360	5.34 ± 0.16 ^{ab}	5.99 ± 0.26 ^{bc}

HASP= Harina de Amaranto Sin Procesar; HAGO= Harina de Amaranto Germinado Optimizado; *= mg/mL. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar; Medias con letras superíndice diferentes dentro de cada columna indican diferencia significativa (LSD p≤0.05).

la PS en hidrolizados sin procesar (71.7 a 69.2%) y germinados (77.6 a 69%) ($p < 0.05$). Se ha sugerido que el incremento en el contenido de PS luego de la hidrólisis enzimática es debido a la generación de péptidos con pequeñas masas moleculares (Montoya-Rodríguez 2014), ya que se ha encontrado que la hidrólisis de aislados protéicos de *Amaranthus mantegazzianus* tenía mayor contenido de proteína soluble (98% vs 74% de proteína soluble) y de péptidos con masas menores de 3 KDa (80% vs 22% de péptidos) que los aislados sin hidrolizar (Tironi y Añon 2009).

3. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en harinas de amaranto crudo y germinado.

a. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de compuestos fenólicos totales

La hidrólisis con pepsina incrementó significativamente ($p < 0.05$) el contenido de CFT, con valores de 23.34 a 346.08 mg EAG/100g bs en la harina sin procesar, el cual es el valor máximo obtenido representando un incremento del 1383%. Sin embargo, durante la acción de pancreatina, el contenido de compuestos fenólicos fue disminuyendo conforme el tiempo de hidrólisis (180-360 minutos) variando de 346 a 176.97 mg EAG/100. A pesar de este efecto, la hidrólisis total causó un incremento del 658% con respecto al contenido inicial sin hidrolizar ($p < 0.05$) (**Cuadro 9**). Un comportamiento similar se pudo apreciar en las harinas de amaranto germinado, donde los CFT incrementaron de 27 a 426 mg EAG/100 g (1462%, por 180 min) debido a la acción de la pepsina. Cabe resaltar que a los 10 min de hidrólisis tenemos valores similares que la hidrólisis completa con pepsina de la harina de amaranto sin procesar.

Cuadro 9. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de compuestos fenólicos en harinas de amaranto sin procesar y germinado

Enzima	Tiempo de hidrólisis (min)	Compuestos Fenólicos Totales	
		HASP	HAGO
Pepsina	0 ¹	23.34 ±1.25 ⁱ	27.29 ±0.78 ^f
	10 ²	193.31±14.8 ^f	349.20±6.12 ^d
	25 ²	213.40±3.34 ^e	368.83±6.74 ^c
	60 ²	266.92±3.68 ^d	398.09±11.82 ^b
	90 ²	298.09±3.24 ^c	409.94±10.21 ^{ab}
	120 ²	325.32±16.08 ^b	420.22±24 ^a
Pepsina + Pancreatina	180 ²	346.08±1.7 ^a	426.33±9.73 ^a
	190 ²	172.65±11.97 ^g	335.50±5.94 ^d
	205 ²	178.66±5.57 ^g	337.54±9.27 ^d
	240 ²	171.80±2.72 ^g	279.11±3.61 ^e
	270 ²	155.65±7.41 ^h	267.54±2.16 ^e
	300 ²	153.21±3.68 ^h	262.72±17.01 ^e
	360 ²	176.97±6.26 ^g	268.37±14.63 ^e

HASP= Harina de Amaranto Sin Procesar; HAGO= Harina de Amaranto Germinado Optimizado; ¹: mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g base seca; ²:mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g muestra liofilizada. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar; Medias con letras superíndice diferentes dentro de cada columna indican una diferencia significativa (LSD p≤0.05).

De igual manera, la hidrólisis con pancreatina disminuye el contenido de CFT con el tiempo de hidrólisis de 426 a 268.37 mg EAG/100 g después de 360 minutos. Dicha cantidad representa un incremento de compuestos fenólicos del 883% con respecto al contenido inicial sin hidrolizar ($p < 0.05$). Es importante destacar que el efecto de la germinación en conjunto con una hidrólisis enzimática con pepsina generó el mayor contenido de CFT, lo que sugiere que estos tratamientos son la mejor combinación de procesos aplicados al grano de amaranto. Se ha reportado que los hidrolizados con pepsina y pancreatina (6 horas) de *Amaranthus cruentus* mostraron un incremento del 425% en el contenido de CFT (Pazinatto y col 2013). Resultados similares fueron observados por Sangsukiam y col (2017) quienes encontraron que los hidrolizados de frijol mungo (*Vigna radiata*) y frijol rojo (*Vigna angularis*) sin procesar incrementaron un 19 y 29% el contenido de CFT, mientras que los hidrolizados de los germinados mostraron un aumento del 77 y el 50% respectivamente ($p < 0.05$). Sancho y col (2015) evaluaron el efecto de la hidrólisis con pepsina y pancreatina (3 horas) de semillas de frijol negro y rojo, encontrando que los hidrolizados disminuyeron el contenido de CFT en 75 y 52 % respectivamente ($p < 0.05$). Pellegrini y col (2018), utilizaron un índice de recuperación, el cual relaciona el contenido de compuestos fenólicos luego de la hidrólisis gástrica (pepsina, 2 horas) o intestinal (pancreatina, 2 horas) con respecto a la muestra sin hidrolizar, para evaluar el efecto de la hidrólisis enzimática de semillas de chía blanca española sobre los CFT, encontrando que la hidrólisis con pepsina y pancreatina incrementó un 200% y 190% los CFT respectivamente ($p < 0.05$).

El comportamiento de los compuestos fenólicos durante la hidrólisis enzimática está relacionado el tipo de compuestos fenólicos que contienen las muestras a hidrolizar. En

los cereales, la mayoría de los compuestos fenólicos se encuentran de manera insoluble y ligada a otras moléculas, como proteínas, almidón y fibra (Acosta-Estrada y col 2014). Algunos autores atribuyen el incremento a la liberación de fitoquímicos debido a la acción proteolítica de las enzimas durante la germinación y la acción extensiva de la enzima durante la hidrólisis, ya que la hidrólisis puede modificar las uniones macronutrientes-fenólicos resultando en la liberación de estos compuestos (Acosta-Estrada y col 2014; Sangsukiam y Duangmal 2017; Pellegrini y col 2018). Por otra parte, una disminución de los fenólicos en la hidrólisis alcalina puede ser causada por el pH elevado ya que puede volver inestable a esos compuestos (Sancho y col 2015).

b. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de flavonoides totales

El contenido de FT incrementó de 4.6 mg CE/100 g en la harina de amaranto sin procesar a un máximo de 36.31 mg CE/100 g a los 190 minutos de la hidrólisis con pepsina y pancreatina ($p < 0.05$) (**Cuadro 10**). Sin embargo, a partir del minuto 205 a 360 no se observó una tendencia significativa. De cualquier forma la hidrólisis total incrementó 357% el contenido de FT en comparación a la harina de amaranto sin procesar y sin hidrolizar. Con respecto a la harina germinada, se obtuvieron valores en un rango de 54.36 a 82.20 mg CE/100 g. El valor más alto obtenido fue de 82.20 mg, el cual se obtuvo a los 240 minutos de hidrólisis con pepsina y pancreatina. Sin embargo a partir de ese tiempo, se observó una disminución en el contenido de FT para finalizar con una concentración de 50.82 mg CE/100 g, conservando un incremento del 322% con respecto a la harina germinada sin hidrolizar ($p < 0.05$).

Cuadro 10. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de flavonoides en harinas de amaranto sin procesar y germinado

Enzima	Tiempo de hidrólisis (min)	Flavonoides	
		HASP	HAGO
Pepsina	0 ¹	4.6 ±0.19 ⁱ	12.05 ±0.07 ^h
	10 ²	8.47±0.00 ^g	54.36±2.04 ^{fg}
	25 ²	8.08±0.68 ^{gh}	57.10±0.68 ^{ef}
	60 ²	12.39±0.68 ^f	59.45±0.68 ^{de}
	90 ²	9.25±0.68 ^g	56.32±0.68 ^{ef}
	120 ²	6.90±0.68 ^h	54.74±0.68 ^f
Pepsina + Pancreatina	180 ²	11.61±0.68 ^f	68.08±2.96 ^c
	190 ²	36.31±0.68 ^a	66.51±2.96 ^c
	205 ²	30.82±1.18 ^b	75.53±2.04 ^b
	240 ²	26.90±0.68 ^c	82.20±3.39 ^a
	270 ²	35.92±1.36 ^a	72±1.18 ^b
	300 ²	24.55±0.68 ^d	62.20±4.45 ^d
	360 ²	21.02±0.68 ^e	50.82±0.00 ^g

HASP= Harina de Amaranto Sin Procesar; HAGO= Harina de Amaranto Germinado Optimizado; ¹: mg equivalentes de catequina (CE)/100 g base seca; ²: mg equivalentes de catequina (CE)/100 g muestra liofilizada. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar; Medias con letras superíndice diferentes dentro de cada columna indican una diferencia significativas (LSD p≤0.05).

Como en el caso de los CFT, la muestra germinada obtuvo un mayor contenido de FT para todos los tiempos de la hidrólisis enzimática en comparación con la harina sin procesar, por lo que se puede atribuir al proceso de germinación. Podemos destacar que la mejor combinación de procesos aplicados al grano de amaranto fue la germinación en conjunto con la hidrólisis de 240 minutos con pepsina y pancreatina. Se ha evaluado el contenido de FT en hidrolizados de pseudocereales, leguminosas y otras semillas. El efecto sobre el contenido de FT varía de acuerdo a la semilla y las enzimas utilizadas. Por ejemplo la hidrólisis con alcalasa en frijol pinto (*Phaseolus vulgaris L*), no modificó el contenido de FT a ningún tiempo de hidrólisis (0 a 120 minutos) (García-Mora y col 2015), Mientras que la hidrólisis en semillas de *Prinsepia utilis* con pepsina y pancreatina (4 horas) causó un incremento significativo en el contenido de FT durante la digestión gástrica (9%) e intestinal (17%) (Huang y col 2017). Por otra parte, Sancho y col (2015) encontraron que la hidrólisis con pepsina y pancreatina (3 horas) produjo una disminución en el contenido de FT en el frijol negro (27%) ($p < 0.05$), mientras que no hubo cambios en el frijol rojo pequeño. Pellegrini y col (2017) reportaron incrementos significativos ($p < 0.05$) en índices de recuperación de flavonoides luego de la hidrólisis de quinua blanca española durante la hidrólisis con pepsina (250%) y pancreatina (180%) con respecto a la harina de quinua sin hidrolizar. Los cambios en el contenido de flavonoides durante la hidrólisis enzimática pueden ser atribuidos a la bioaccesibilidad de estos compuestos, la matriz alimentaria en la que se encuentren y la interacción que estos tengan con el medio (Huang y col 2017; Pellegrini y col 2017; 2018).

c. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de taninos condensados

La hidrólisis con pepsina (180 minutos) de la harina de amaranto sin procesar generó un incremento en el contenido de taninos de 84% (244 mg CE/100 g), mientras que al finalizar la hidrólisis con pancreatina (minuto 360) fue de 15.6% (153 mg CE/100 g) con respecto a la harina no procesada sin hidrolizar (133 mg CE/100 g) ($p < 0.05$) (**Figura 8**). En los hidrolizados de la harina germinada, se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) del 279% (249 mg CE/100 g) durante la hidrólisis con pepsina y de 88% (123 mg CE/100 g) luego de la hidrólisis total al compararse con la harina sin hidrolizar (65 mg CE/100 g). Por otra parte se evaluó el contenido de taninos al minuto 240 de hidrólisis con pepsina+pancreatina, el cual fue el tiempo con mayor contenido de FT, se encontraron valores más bajos que los obtenidos al finalizar la hidrólisis completa: (61.5 mg CE/100 g) HASP y (105.7 mg CE/100 g) HAGO. Se han reportado comportamientos similares en la hidrólisis enzimática de algunas semillas. Por ejemplo en sorgo rojo, se observó un incremento del 93% al hidrolizar con pepsina (2 horas) y de 71% empleando pancreatina (2 horas), mientras que en sorgo blanco ocurrió una disminución ($p < 0.05$) del 50% durante la hidrólisis con pepsina y un incremento ($p < 0.05$) del 211% durante el uso de pancreatina al compararse con la muestra sin hidrolizar (Adarkwah-Yiadom y col 2017). Por otra parte, Sancho y col (2015) reportan una disminución significativa ($p < 0.05$) del 1159% en frijol negro y 975% en frijol rojo pequeño luego de una hidrólisis enzimática con pepsina y pancreatina (3 horas) al compararse con la muestra sin hidrolizar. Se cree que durante la hidrólisis gástrica ocurre una liberación de las proantocianidinas que estaban unidas a las proteínas y carbohidratos, mientras que el incremento durante la fase pancreática es atribuido a la

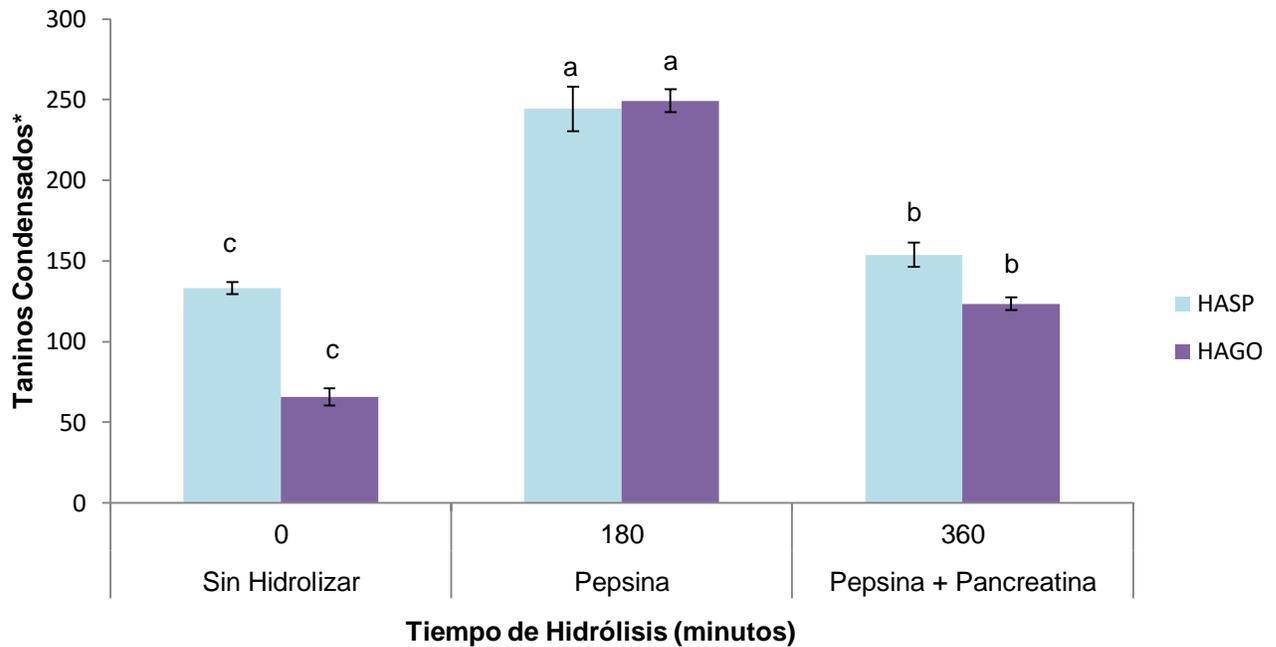


Figura 8. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de taninos condensados en harinas de amaranto sin procesar y germinado. HASP= Harina de Amaranto sin Procesar; HAGO= Harina de Amaranto Germinado Optimizado; *= mg equivalentes de catequina (CE)/100 g de muestra liofilizada. La comparación fue realizada por tipo de muestra. Medias con letras superíndice diferente de cada muestra indican una diferencia significativa ($p \leq 0.05$). Las barras verticales indican desviación estándar.

digestión adicional y al uso de más enzimas que facilitaron la liberación de los compuestos ligados a la matrices alimentarias (Sancho y col 2015; Adarkwah-Yiadom y Duodu 2017).

d. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de antocianinas totales

La hidrólisis enzimática con pepsina y pancreatina afectó de manera negativa el contenido de ANT en ambas harinas. En la harina sin procesar, el uso de la enzima pepsina ocasionó una disminución del 21% (0.58 a 0.48 mg CGE/100 g), mientras que durante la acción con pancreatina la disminución fue del 23% (0.58 a 0.47 mg CGE/100 g) ($p < 0.05$) al compararse con la HASP sin hidrolizar (0 min) (**Figura 9 A**). De manera similar ocurrió en la harina germinada, donde la hidrólisis con pepsina generó una disminución del 209% (8.8 a 2.85 mg CGE/ 100 g) y del 317% (8.8 a 2.11 mg CGE/100 g) con pancreatina ($p < 0.05$) (**Figura 9 B**). Comportamientos similares fueron reportados por algunos autores en semillas y frutos. Sancho y col (2015) reportó un contenido de ANT de 0.83 y 0.08 mg CGE/g en frijol negro y rojo, respectivamente, mientras que al concluir la hidrólisis enzimática con pepsina y pancreatina (3 horas) no fueron detectadas. Bouayed y col (2011) hidrolizaron extractos metanólicos de manzana variedad Jonaprinz y Jonagold con pepsina (1 hora) y pancreatina (2 horas), encontrando que la hidrólisis con pepsina no tenía efecto sobre el contenido de ANT, mientras que la acción de pancreatina hizo indetectable estos compuestos. Ryu y col (2018) evaluaron el contenido de antocianinas en extractos de *Rubus occidentalis* hidrolizados con pepsina y pancreatina, encontrando que la hidrólisis con pepsina no tuvo ningún efecto sobre las ANT, mientras que la pancreatina disminuyó un 45% el contenido de ANT.

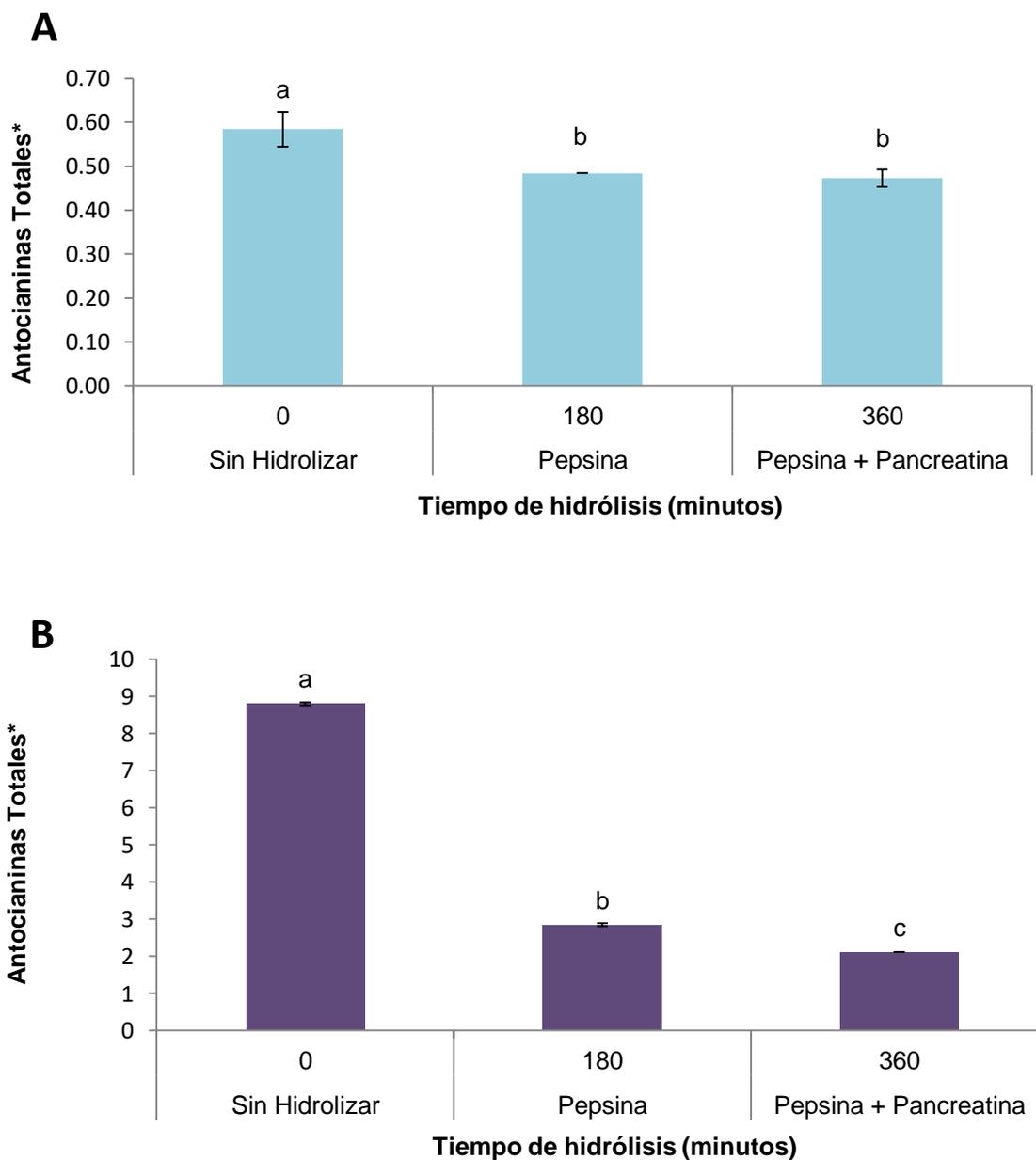


Figura 9. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de antocianinas totales en harinas de amaranto sin procesar (A) y germinado (B); *= mg equivalentes de cianidina-3-glucósido/ 100 g. Los resultados se expresan como media. Medias con letras diferentes indican una diferencia significativa ($p < 0.05$). Las barras verticales indican la desviación estándar.

Sun y col (2015) observaron que la hidrólisis de arroz purpura (*Oryza Sativa L.*) con pepsina (2 horas) no afectó el contenido de ANT, mientras que el uso de pancreatina (2 horas) disminuyó su contenido en un 76%. Se ha hipotetizado que las antocianinas son estables a condiciones gástricas (pH 1.2-2), mientras que a pH alcalino (semejante al empleado en la hidrólisis con pancreatina) son hidratadas para producir una pseudo-base carbinol incolora y luego transformada en una chalcona incolora. Algunos factores pueden influir en la estabilidad de las antocianinas tal como la estructura química, concentración, la matriz alimentaria, solventes, enzimas digestivas y proteínas (Bouayed y col 2011; Sun y col 2015; Ryu y Koh 2018).

e. Capacidad antioxidante en hidrolizados de la harina de amaranto sin procesar y germinada

El uso de pepsina para producir hidrolizados de harina de amaranto sin procesar incrementó ($p < 0.05$) la CAOX 51% (415.97 a 627.45 $\mu\text{mol ET/mg PS}$) (**Figura 10**). Recordemos que al finalizar la digestión con pepsina el GH fue de 48.7%. Al continuar la digestión con pancreatina se obtuvo un incremento máximo de 136% a los 270 minutos de hidrólisis (983.05 $\mu\text{mol ET/mg PS}$), a partir de entonces los valores se mantuvieron estadísticamente constantes hasta los 360 minutos. De manera similar el GH se mantuvo sin cambios a partir de los 205 minutos. Un comportamiento diferente se observó en la harina germinada, la digestión con pepsina provocó una disminución del 26% ($p < 0.05$) en la CAOX. Podemos destacar que a los 180 minutos de digestión, los hidrolizados de la harina germinada tenían el 46% de GH, menor que el obtenido en la hidrólisis de la harina sin procesar.

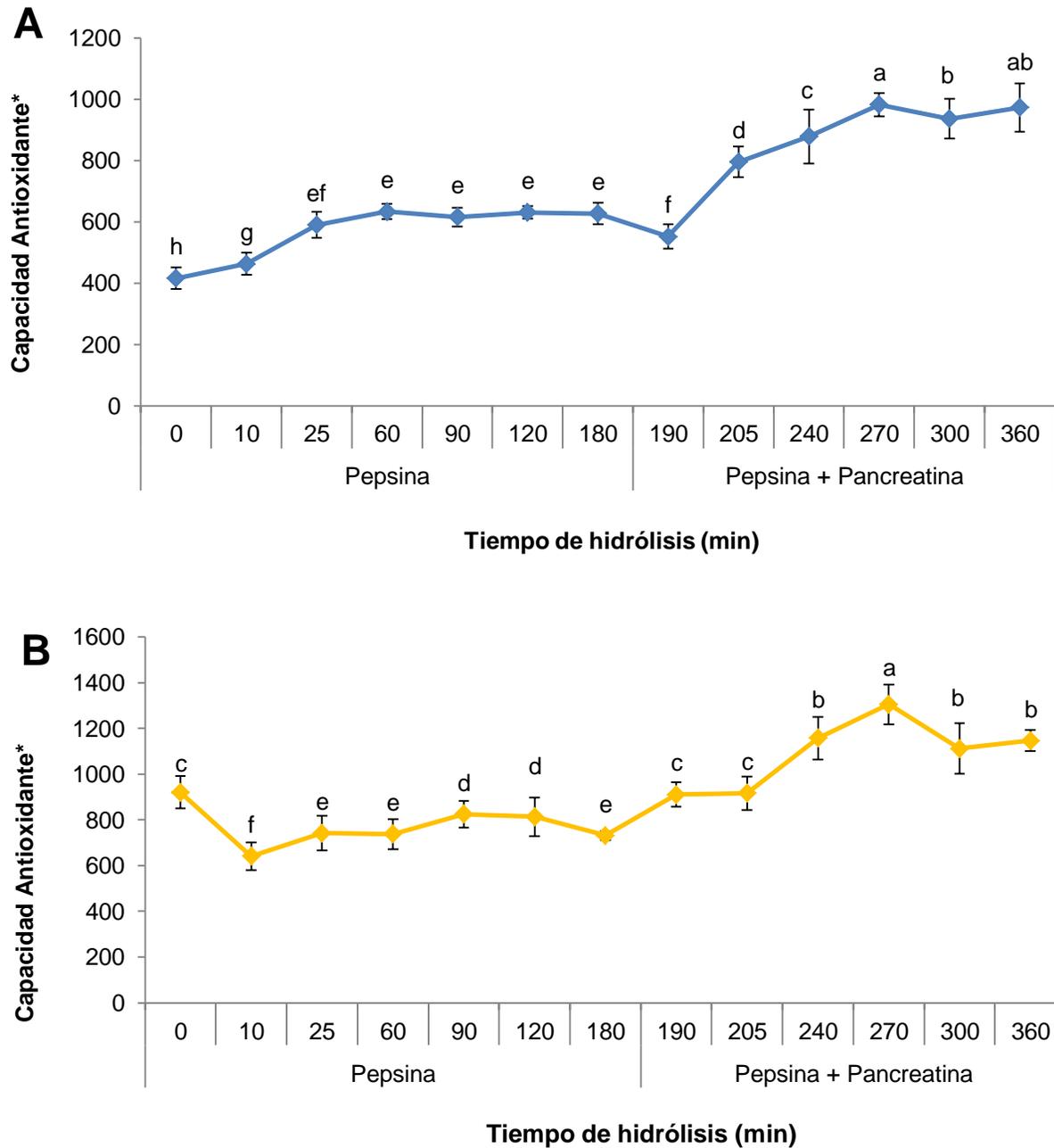


Figura 10. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre el contenido de Capacidad antioxidante en harinas de amaranto sin procesar (A) y germinado (B); *= $\mu\text{mol ET/mg}$ proteína soluble. Los resultados se expresan como media. Las barras verticales representan la desviación estándar.

Mientras que la digestión con pancreatina, se obtuvo un incremento máximo del 42% en la CAOX a los 270 minutos, mientras que al finalizar la hidrólisis (360 minutos) el incremento fue de 25%. Aun así, los hidrolizados de la harina germinada presentaron valores más altos de CAOX que los hidrolizados de la harina sin procesar con ambas enzimas, aunque el GH fue menor en los hidrolizados de harina germinada.

Comportamientos similares se han reportado en algunas semillas. Montoya-Rodríguez y col (2014) reporta un incremento en la CAOX en hidrolizados proteicos de *A. hypochondriacus* sin procesar con pepsina y pancreatina (6 horas), obteniendo un valor máximo de 217.3 $\mu\text{mol ET/mg PS}$ a los 120 minutos con pepsina, el cual es menor que el obtenido por nosotros a ese mismo tiempo de hidrólisis. Sin embargo al finalizar la digestión con pepsina (180 minutos) la CAOX fue de 126 $\mu\text{mol ET/mg PS}$. Al finalizar la hidrólisis con pancreatina, se obtuvo una CAOX de 119.3 $\mu\text{mol ET/mg PS}$. Pazinato y col (2013) encontraron que la digestión de *Amaranthus cruentus* con pepsina (2 horas) incrementaba la CAOX en 1000% y la hidrólisis con pancreatina (4 horas) en 117% ($p < 0.05$). Delgado y col (2011), hidrolizaron aislados proteínicos de *Amaranthus mantegazzianus* utilizando pepsina (1 hora) y pancreatina (2 horas), concluyendo que la hidrólisis enzimática es eficaz para incrementar la CAOX 175% ($p < 0.05$).

Vernaza y col (2012) hidrolizaron soja sin procesar y germinada (72 horas) con alcalasa (3 horas), encontrando un incremento ($p < 0.05$) en la CAOX de 10.4% luego de 1 hora de hidrólisis en las muestras sin procesar, mientras que en las siguientes 2 horas de hidrólisis no se encontraron cambios significativos. En las germinadas se observó un incremento significativo en la CAOX en cada una de las horas de hidrólisis, mostrando

un incremento máximo del 13% luego de 1 hora ($p < 0.05$). López Barrios y col (2016), evaluaron la CAOX en hidrolizados de frijol negro sin procesar y germinado (72 horas), encontrando que la hidrólisis del frijol negro sin procesar con pepsina y pancreatina incrementaba la CAOX en 489%, 361% y 433% a los 60, 120 y 180 minutos de hidrólisis respectivamente. De manera similar se observó en el frijol germinado, en donde se obtuvo un aumento de 378%, 335% y 300% a los 60, 120 y 180 minutos de hidrólisis. García-Mora y col (2015), hidrolizaron frijol pinto con alcalasa (2 horas) y encontraron un incremento en la CAOX conforme incrementaba el tiempo de hidrólisis ($p < 0.05$).

Se ha sugerido que la CAOX de los hidrolizados está relacionada con la composición y secuencia de aminoácidos de los péptidos liberados después de la hidrólisis enzimática, así como también por efecto de los compuestos fenólicos liberados presentes en el alimento (Sangsukiam y Duangmal 2017). La hidrólisis enzimática ha sido ampliamente utilizada para mejorar la CAOX de las proteínas alimentarias ya que de ella se han derivado péptidos con actividades antioxidantes de diferentes proteínas vegetales y animales (Pazinatto y col 2013).

4. Efecto de la germinación y la hidrólisis enzimática en las propiedades funcionales de harinas de amaranto

a. Índice de absorción de agua (IAA)

La germinación del grano de amaranto disminuyó ($p < 0.05$) el IAA en un 45% (5.47 a 3.77 g gel/g muestra) (**Cuadro 11**). Se han reportado aumentos en el IAA por efecto de la germinación de 81% (Perales-Sánchez 2014a) y 195% (Sánchez-Osuna 2018) en *Amaranthus hypochondriacus*, mientras que en semillas de *A. cruentus* y *A. caudatus*

Cuadro 11. Efecto de la germinación e hidrólisis enzimática sobre las propiedades funcionales del grano de amaranto

PARÁMETRO		SIN HIDROLIZAR	HIDROLIZADO
			Pepsina (60 minutos) Pancreatina (90 minutos)
IAA ¹	HASP	5.47±0.05 ^{Aa}	0.47±0.02 ^{Bb}
	HAGO	3.77±0.05 ^{Ab}	0.7±0.03 ^{Ba}
ISA ²	HASP	13.6±0.46 ^{Bb}	107.07±9.6 ^{Aa}
	HAGO	48.9±2.15 ^{Ba}	102.67±4.39 ^{Aa}
IAAc ³	HASP	1.23±0.03 ^{Bb}	1.41±0.01 ^{Aa}
	HAGO	1.55±0.06 ^{Aa}	0.86±0.08 ^{Bb}
EAI ⁴	HASP	2.24±0.08 ^{Aa}	1.62±0.04 ^{Ba}
	HAGO	2.38±0.21 ^{Aa}	1.69±0.04 ^{Ba}
pH	HASP	6.56±0 ^{Aa}	4.03±0 ^{Ba}
	HAGO	5.72±0.06 ^{Ab}	4.06±0 ^{Ba}

IAA= Índice de Absorción de Agua; ISA= Índice de Solubilidad en Agua; IAAc= Índice de Absorción de Aceite; EAI = Índice de Actividad de Emulsión. ¹g de gel/ g de muestra; ² g sólidos secos/100 g de muestra; ³ mL de aceite absorbido/ g de muestra; ⁴ m²/g. Los valores se expresan como medias ± desviación estándar; Letras mayúsculas diferentes en cada línea indican una diferencia significativa (hidrólisis) (p<0.05). Letras minúsculas diferentes por columna para cada parámetro indican diferencia significativa (germinación) (p<0.05).

se ha mostrado una disminución de un 80% y 77% respectivamente (Gamel y col 2006). El IAA determina el volumen ocupado por el almidón después de que se hidrata en exceso de agua e indica la integridad del almidón en dispersiones acuosas. Este índice se relaciona con la hidroficidad y la capacidad de gelificación del almidón y las proteínas que se encuentran en la harina de los granos de amaranto, por lo que su disminución puede ser atribuida a la hidrólisis enzimática parcial del almidón y las proteínas que ocurrieron durante la germinación. Durante este bioproceso, el contenido de almidón del grano de amaranto puede disminuir en un 30% (Gamel y col 2005; Gamel y col 2006). Los valores de IAA que presentaron las harinas de amaranto sin procesar y germinada en nuestro estudio sugieren su uso en la formulación de alimentos como salchichas, masas, quesos procesados, sopas y productos horneados (Jan y col 2017).

La hidrólisis enzimática con pepsina (90 minutos) y pancreatina (60 minutos) disminuyó ($p < 0.05$) el IAA en 1064% (5.47 a 0.47 g gel/g muestra) y 439% (3.77 a 0.7g gel/g muestra) de los hidrolizados de la harina de amaranto sin procesar y germinada respectivamente (**Cuadro 11**). Efectos similares fueron reportados por Soria-Hernández y col (2015), al observar que la hidrólisis proteica de mezclas de maíz y soya disminuyó el IAA en un 356%. Meinschmidt y col (2016) encontraron una disminución significativamente de la capacidad de absorción de agua de 189% en aislados proteicos de soya hidrolizados con pepsina. Se cree que la disminución en el IAA se debe a la generación de péptidos de pequeña masa molecular que son incapaces de retener agua y a la disrupción de la red proteínica provocada por la acción de las proteasas (Soria-Hernández y col 2015; Meinschmidt y col 2016).

b. Índice de solubilidad en agua (ISA)

El ISA incrementó ($p < 0.05$) un 260% (13.6 a 48.9 g sólidos secos/100 g muestra) luego de la germinación del grano (**Cuadro 11**). Milán-Carrillo y col (2012) evaluaron el ISA en granos de amaranto procesado, reportando valores de 13.42, 60.8 y 21.20 g sólidos secos/100 g de muestra en harina de *A hypochondriacus* sin procesar, extrudido y tostado respectivamente. En amaranto germinado se han reportado incrementos en el ISA de 108%, 120% y 253% (Perales-Sánchez 2014a; Chauhan y col 2017; Sánchez-Osuna 2018). Se ha sugerido que los cambios en los IAA y ISA se deben al incremento en el contenido de polisacáridos solubles y compuestos de bajo peso molecular generados durante la germinación (Du y col 2014; Chauhan y col 2015; Jan y col 2017).

El ISA se potencializó en ambas harinas luego de la hidrólisis enzimática, incrementando ($p < 0.05$) un 687% (13.6 a 107.07 g sólidos secos/100 g muestra) y 110% (48.9 a 102.67 g sólidos secos/100 g muestra) en los hidrolizados de la harina de amaranto sin procesar y germinado respectivamente. Soria-Hernández y col (2015) encontraron un incremento significativo en el ISA al hidrolizar concentrados de maíz y soya de 115%. El ISA es la propiedad funcional más importante debido a que depende de la habilidad de las proteínas de interactuar con el agua y esto afecta otras características funcionales tales como las propiedades de emulsión y formación de espuma (Soria-Hernández y col 2015).

c. Índice de absorción de aceite (IAAc)

Se observó un incremento ($p < 0.05$) en el IAAc del 26% (1.23 a 1.55 mL de aceite absorbidos / g muestra) por efecto de la germinación (**Cuadro 11**). Se han reportado

incrementos por efecto de la germinación en el IAAc de 52% (Chauhan y col 2015) y 900% (Sánchez-Osuna 2018) en amaranto y de 20% en quinua (Jan y col 2017). Otros métodos de procesamiento del grano de amaranto también influyen en el IAAc. Milán-Carrillo y col (2012) reportaron valores de 1.45, 1.35 y 1.32 mL aceite absorbido /g muestra en harinas de amaranto sin procesar, extrudido y tostado respectivamente. Valores de IAAc altos son deseables debido a que entre mayor sea la capacidad de absorción de aceite mejor es la retención de sabor y la palatabilidad, e incrementa la vida de anaquel, particularmente de los productos de panadería o cárnicos, en donde la absorción de aceite es deseada (Soria-Hernández y col 2015; Jan y col 2017).

El IAAc incrementó ($p < 0.05$) 15% (1.23 a 1.41 mL de aceite absorbidos/ g de muestra) después de la hidrólisis enzimática en la harina de amaranto sin procesar. Por otra parte se observó una disminución ($p < 0.05$) del 80% (1.55 a 0.86 mL aceite absorbido/ g de muestra) en la harina de amaranto germinada luego de la digestión (**Cuadro 11**). En otros estudios se reportan incrementos del 20% en hidrolizados de soya y maíz (Soria-Hernández y col 2015) y de 280% en hidrolizados de soya (Meinlschmidt y col 2016). Tal efecto se atribuye a que la hidrólisis enzimática expuso los grupos hidrófobos lo que permitió el atrapamiento físico del aceite (Meinlschmidt y col 2016).

d. Índice de actividad de emulsión (EAI)

El EAI aumentó un 6% (2.24 a 2.38 m^2/g) (no significativo) en la harina de amaranto germinado (**Cuadro 11**). El incremento en la actividad de emulsión por efecto de la germinación ya ha sido observado en algunas semillas como soya (41%), sorgo (33%),

trigo (20%) y arroz (14%) (Elkhalifa y col 2010; Sibian y col 2017; Yang y col 2017). Se ha hipotetizado que estos cambios se deben a la disociación y el despliegue parcial de los polipéptidos que exponen los sitios hidrofóbicos de los aminoácidos, lo que ayuda a la asociación hidrofóbica de las cadenas peptídicas con las gotitas de lípidos causando una mayor área de contacto con las proteínas, mejorando de esta manera la actividad de emulsión en las harinas germinadas. Además, durante la germinación ocurre una degradación de proteínas de reserva a moléculas más simples las cuales pueden ser más solubles. Las proteínas solubles son más activas en la superficie y se sabe que promueven la emulsión de aceite en agua. La capacidad de las proteínas para mejorar la formación y la estabilización de la emulsión es importante para muchas aplicaciones en pasteles y postres (Elkhalifa y col 2010; Shevkani y col 2014).

La hidrólisis enzimática disminuyó ($p < 0.05$) el EAI un 38% (2.24 a 1.62 m^2/g) y 41% (2.38 a 1.69 m^2/g) en la harina de amaranto sin procesar y germinada respectivamente. Yang y col (2017) encontraron incrementos significativos del EAI en aislados proteicos de soya germinada luego de la hidrólisis enzimática con alcalasa (19%). Por otro lado, Soria-Hernández y col (2015) observaron una disminución significativa en el EAI luego de la hidrólisis enzimática de concentrados de soya y maíz (158%). Horax y col (2017) no encontraron cambios en la actividad de emulsión de aislados de soya que fueron hidrolizados durante 4 horas con alcalasa, mientras que Castro y col (2014) encontraron que al hidrolizar aislados de soya con proteasas (6 horas) disminuía el EAI en un 20%. Se ha sugerido que los péptidos de bajo peso molecular generados durante la hidrólisis no favorecen la formación de películas estables alrededor de las gotas de aceite. Además, se ha observado que a mayores tiempos de hidrólisis y pH ácidos se

disminuye la capacidad de emulsión (Aluko y Monu 2003; Castro y col 2014; Cho y col 2014). Aunque los péptidos pequeños originados tienen la capacidad de difundir rápidamente hacia la interfaz, son menos eficientes en la estabilización de emulsiones porque no pueden aglomerarse fácilmente y producir una membrana globular grasa debido a las repulsiones de carga (Castro y Sato 2014).

e. pH

La germinación del grano de amaranto disminuyó en un 15% (6.56 a 5.72 pH) ($p < 0.05$) el pH (**Cuadro 11**). Estudios previos han reportado valores de pH que varía de 6.40 a 6.90 y de 5.50 a 5.71 en harinas de *A. hypochondriacus* sin procesar y germinadas respectivamente. Los valores obtenidos en nuestro estudio son similares a los reportados (Milán-Carrillo y col 2012; Perales-Sánchez 2014a; Sánchez-Osuna 2018). El pH es un parámetro importante debido a que está asociado con la solubilidad de las proteínas y las propiedades funcionales relacionadas a la solubilidad como la actividad de emulsión y formación de espuma. A pH menores o mayores al punto isoeléctrico de las proteínas de amaranto (pH 4.5 a 5) las repulsiones electrostáticas incrementan y como consecuencia se mejora la solubilidad de las proteínas (Janssen y col 2017). Este parámetro también está relacionado con la capacidad de absorción de agua, ya que los grupos de aminoácidos ionizados se unen a más al agua que los grupos no ionizados (Shevkani y col 2014).

Los hidrolizados proteicos de la harina de amaranto sin procesar y germinado fueron llevamos a pH 4 al finalizar la hidrólisis con pancreatina como parte del tratamiento para la inactivación enzimática. Los valores de pH de los hidrolizados

fueron de 4.06 y 4.03 para la harina sin procesar y germinada respectivamente. Las proteínas del amaranto tienen una baja solubilidad a pH cercanos a su punto isoeléctrico (4.5), sin embargo, podemos observar que los hidrolizados de la harina de amaranto sin procesar y germinado mostraron incrementos en el ISA de 687% y 110% respectivamente. Se ha sugerido que es posible mejorar la solubilidad de las proteínas de amaranto al realizar una hidrólisis proteica. Horax y col (2017) observaron valores de solubilidad de proteína menores a 10% a pH 4 en aislados proteínicos de soya, mientras que al ser hidrolizados con alcalasa durante 4 horas la solubilidad incremento a 40.4% en las mismas condiciones de pH. La mejora en la solubilidad de las proteínas gracias a la hidrólisis enzimática puede ampliar el uso de las proteínas de amaranto en productos con pH ácidos.

VIII CONCLUSIONES

1. El bioproceso de germinación de amaranto causó incrementos del 37%, 17%, 163%, 1417% Y 121% en el contenido de proteína soluble, compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, antocianinas y capacidad antioxidante respectivamente al compararse con la muestra cruda, así como también una reducción en el contenido de taninos condensados del 50.62% en comparación con el Amaranto Sin Procesar.
2. La hidrólisis enzimática completa incrementó un 61% y 32% el contenido de proteína soluble en Harina de Amaranto Sin Procesar y Harina de Amaranto Germinado respectivamente.
3. La hidrólisis enzimática completa incrementó un 658% y 883% el contenido de compuestos fenólicos en la Harina de Amaranto Sin Procesar y la Harina de Amaranto Germinado respectivamente.
4. La hidrólisis enzimática completa incrementó un 357% y 322% el contenido de flavonoides en la Harina de Amaranto Sin Procesar y la Harina de Amaranto Germinado respectivamente.
5. La hidrólisis enzimática completa incrementó un 15.6% y 88% el contenido de taninos condensados en la Harina de Amaranto Sin Procesar y la Harina de Amaranto Germinado respectivamente.
6. La hidrólisis enzimática completa disminuyó un 23% y 317% el contenido de antocianinas en la Harina de Amaranto Sin Procesar y la Harina de Amaranto Germinado respectivamente.

7. La hidrólisis enzimática completa incrementó un 134% y 25% la capacidad antioxidante en la Harina de Amaranto Sin Procesar y la Harina de Amaranto Germinado respectivamente.

8. La Harina de Amaranto Germinado presentó un aumento del 260% y 26% en el índice de solubilidad en agua y el índice de absorción de aceite respectivamente, así como también una reducción de 45 y 15% en el índice de absorción de agua y el pH respectivamente, en comparación con la Harina de Amaranto Sin Procesar.

9. La hidrólisis enzimática completa disminuyó un 1064 y 439% el índice de absorción de agua en la Harina de Amaranto Sin Procesar y la Harina de Amaranto Germinado respectivamente.

10. La hidrólisis enzimática completa incrementó un 687 y 110% el índice de solubilidad en agua en la Harina de Amaranto Sin Procesar y la Harina de Amaranto Germinado respectivamente.

11. La hidrólisis enzimática completa incrementó un 15% el índice de absorción de aceite en la Harina de Amaranto Sin Procesar, mientras que produjo una disminución del 80% en la Harina de Amaranto Germinado.

12. La hidrólisis enzimática completa disminuyó un 38 y 41% el índice de actividad de emulsión en la Harina de Amaranto Sin Procesar y la Harina de Amaranto Germinado respectivamente.

En general, el proceso de germinación en conjunto con la digestión gastrointestinal *in vitro* incrementó el contenido de fitoquímicos y capacidad antioxidante del grano de amaranto, así como también mejoró las propiedades de solubilidad en agua y de absorción de aceite, por lo que las harinas de amaranto germinadas e hidrolizadas pueden ser utilizadas como ingredientes en alimentos funcionales para ayudar a la prevención y reducción del riesgo de enfermedades crónicas.

IX BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Estrada BA, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO. 2014. Bound phenolics in foods, a review. *Food chemistry* 152:46-55.
- Adarkwah-Yiadom M, Duodu KG. 2017. Effect of extrusion cooking and simulated in vitro gastrointestinal digestion on condensed tannins and radical scavenging activity of type II and type III whole grain sorghum. *International journal of food science & technology* 52(10):2282-2294.
- Aluko R, Monu E. 2003. Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. *Journal of Food Science* 68(4):1254-1258.
- Alvarez-Jubete L, Arendt EK, Gallagher E. 2010. Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends in Food Science & Technology* 21(2):106-113.
- Biruete Guzmán A, Juárez Hernández E, Sieiro Ortega E, Romero Viruegas R, Silencio Barrita J. 2009. Los nutraceuticos. Lo que es conveniente saber. *Revista Mexicana de pediatria* 76(3):136-145.
- Bolontrade AJ, Scilingo AA, Añón MC. 2013. Amaranth proteins foaming properties: adsorption kinetics and foam formation—part 1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 105:319-327.
- Bouayed J, Hoffmann L, Bohn T. 2011. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry* 128(1):14-21.

- Bressani R. 2006. Estudios sobre la industrialización del grano de amaranto: caracterización química y nutricional de productos intermedios y finales del procesamiento. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Disponible de: www.glifos.concyt.gob.gt. Consultado el 27 de octubre de 2017.
- Campos-Vega R, Oomah BD. 2013. Chemistry and classification of phytochemicals. Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction. 5-48.
- Castel Maria Virginia. 2010. Estudio de las propiedades funcionales, tecnológicas y fisiológicas de las proteínas de amaranto [Magister en ciencia y tecnología de alimentos]. Universidad Nacional del Litoral. 152pp.
- Chaparro Rojas DC, Pismag Portilla RY, Elizalde Correa A, Vivas Quila NJ, Erazo Caicedo CA. 2010. Efecto de la germinación sobre el contenido y digestibilidad de proteína en semillas de amaranto, quinua, soya y guandul. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial 8(1): 35-42.
- Chauhan A, Saxena D, Singh S. 2015. Total dietary fibre and antioxidant activity of gluten free cookies made from raw and germinated amaranth (*Amaranthus spp.*) flour. LWT-Food Science and Technology 63(2):939-945.
- Cho DY, Jo K, Cho SY, Kim JM, Lim K, Suh HJ, Oh S. 2014. Antioxidant effect and functional properties of hydrolysates derived from egg-white protein. Korean journal for food science of animal resources 34(3):362-371.
- Condés MC, Scilingo AA, Añón MC. 2009. Characterization of amaranth proteins modified by trypsin proteolysis. Structural and functional changes. LWT-Food Science and Technology 42(5):963-970.

- Crozier A, Clifford MN, Ashihara H. 2008. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet: John Wiley & Sons.
- Czerwiński J, Bartnikowska E, Leontowicz H, Lange E, Leontowicz M, Katrich E, Trakhtenberg S, Gorinstein S. 2004. Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol-containing diets. The Journal of nutritional biochemistry 15(10):622-629.
- de Castro RJ, Sato HH. 2014. Antioxidant activities and functional properties of soy protein isolate hydrolysates obtained using microbial proteases. International journal of food science & technology 49(2):317-328.
- de La Rosa AB, Fomsgaard IS, Laursen B, Mortensen AG, 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(1):117-121.
- Delgado MCO, Tironi VA, Añón MC. 2011. Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. LWT-Food Science and Technology 44(8):1752-1760.
- de Souza Rocha T, Hernandez LMR, Chang YK, de Mejía EG. 2014. Impact of germination and enzymatic hydrolysis of cowpea bean (*Vigna unguiculata*) on the generation of peptides capable of inhibiting dipeptidyl peptidase IV. Food Research International 64:799-809.

- Domínguez-Aispuro D, Cuevas-Rodríguez E, Milán-Carrillo J, León-López L, Gutiérrez-Dorado R, Reyes-Moreno C. 2018. Optimal germination condition impacts on the antioxidant activity and phenolic acids profile in pigmented desi chickpea (*Cicer arietinum L.*) seeds. *Journal of food science and technology* 55(2):638-647.
- Doria J. 2010. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos tropicales* 31(1):74-85.
- Du Sk, Jiang H, Yu X, Jane JI. 2014. Physicochemical and functional properties of whole legume flour. *LWT-Food Science and Technology* 55(1):308-313.
- Elkhalifa AEO, Bernhardt R. 2010. Influence of grain germination on functional properties of sorghum flour. *Food Chemistry* 121(2):387-392.
- Espinosa-Ramírez J, Serna-Saldívar SO. 2016. Functionality and characterization of kafirin-rich protein extracts from different whole and decorticated sorghum genotypes. *Journal of Cereal Science* 70: 57-65.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2016. Disponible: <http://www.fao.org/traditional-crops/amaranth/es/?tions> (consultado el 16 de marzo del 2017).
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2014. www.fao.org/fileadmin/user_upload/rlc/utf017arg/valles_calchaquies/08.pdf
- Gamel TH, Linssen JP, Mesallem AS, Damir AA, Shekib LA. 2005. Effect of seed treatments on the chemical composition and properties of two amaranth species: starch and protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85(2):319-327.

- Gamel TH, Linssen JP, Mesallam AS, Damir AA, Shekib LA. 2006. Seed treatments affect functional and antinutritional properties of amaranth flours. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(7):1095-1102.
- Garay VA, Rivas Valencia P, Cortes Espinoza L, de la O Olán M, Escobedo-López D, Espitia Rangel E. 2014. La rentabilidad del cultivo de amaranto (*Amaranthus spp.*) en la región centro de México. *Ciencia ergo sum* 21(1):47-54.
- Garcia-Mora P, Frias J, Peñas E, Zieliński H, Giménez-Bastida JA, Wiczowski W, Zielińska D, Martínez-Villaluenga C. 2015. Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris L. var. pinto*) proteins by subtilisins. *Journal of Functional Foods* 18: 319-332.
- González RJ, Torres RL, De Greef DM, Tosi E, Re E. 2002. Effects of popping and extrusion processes on some hydration properties of amaranth. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 19(4):391-395.
- Gorinstein S, Lojek A, Číž M, Pawelzik E, Delgado Licon E, Medina OJ, Goshev I. 2008. Comparison of composition and antioxidant capacity of some cereals and pseudocereals. *International journal of food science & technology* 43(4):629-637.
- Green L, Wagner D, Glogowski J, Skipper P. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [N-15]-labeled nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 126:131–138.
- Guardado-Félix D, Serna-Saldivar SO, Cuevas-Rodríguez EO, Jacobo-Velázquez DA, Gutiérrez-Urbe JA. 2017. Effect of sodium selenite on isoflavonoid contents and antioxidant capacity of chickpea (*Cicer arietinum L.*) sprouts. *Food Chemistry* 226:69-74.

- Hejazi SN, 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.
- Heldt WH, Piechulla B, Heldt F. 2011. *Plant biochemistry*. Cuarta edición. USA. Elsevier Academic Press. 622pp.
- Horax R, Vallecios MS, Hettiarachchy N, Osorio LF, Chen P. 2017. Solubility, functional properties, ACE-I inhibitory and DPPH scavenging activities of Alcalase hydrolysed soy protein hydrolysates. *International journal of food science & technology* 52(1):196-204.
- Hoyle NT, Merritt JH. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of food science* 59(1):76-79.
- Huang S, Ma Y, Zhang C, Cai S, Pang M. 2017. Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolics in native and fermented *Prinsepia utilis* Royle seed during a simulated gastrointestinal digestion in vitro. *Journal of Functional Foods* 37:354-362.
- Jan R, Saxena D, Singh S. 2017. Effect of germination on nutritional, functional, pasting, and microstructural properties of chenopodium (*Chenopodium album*) flour. *Journal of Food Processing and Preservation* 41(3):1-10.
- Janssen F, Pauly A, Rombouts I, Jansens KJ, Deleu LJ, Delcour JA. 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.

- Kanensi OJ, Ochola S, Gikonyo NK, Makokha A. 2011. Optimization of the period of steeping and germination for amaranth grain. *Journal of Agricultural and Food Technology* 1:101-105.
- Khoddami A, Mohammadrezaei M, Roberts TH. 2017. Effects of Sorghum Malting on Colour, Major Classes of Phenolics and Individual Anthocyanins. *Molecules* 22(10):1713.
- Kumari S, Krishnan V, Sachdev A. 2015. Impact of soaking and germination durations on antioxidants and anti-nutrients of black and yellow soybean (*Glycine max. L*) varieties. *Journal of plant biochemistry and biotechnology* 24(3):355-358.
- Li H, Deng Z, Liu R, Zhu H, Draves J, Marccone M, Sun Y, Tsao R. 2015. Characterization of phenolics, betacyanins and antioxidant activities of the seed, leaf, sprout, flower and stalk extracts of three *Amaranthus* species. *Journal of Food Composition and Analysis* 37:75-81.
- López-Barrios L, Antunes-Ricardo M, Gutiérrez-Urbe JA. 2016. Changes in antioxidant and antiinflammatory activity of black bean (*Phaseolus vulgaris L.*) protein isolates due to germination and enzymatic digestion. *Food Chemistry* 203: 417-424.
- Lucero-López VR, Razzeto GS, Giménez MS, Escudero NL. 2011. Antioxidant Properties of *Amaranthus hypochondriacus* Seeds and their Effect on the Liver of Alcohol-Treated Rats. *Plant foods for human nutrition* 66(2):157-162.
- Mahajan A, Dua S. 2002. Salts and pH induced changes in functional properties of amaranth (*Amaranthus tricolor L.*) seed meal. *Cereal chemistry* 79(6):834-837.

- Meinlschmidt P, Sussmann D, Schweiggert-Weisz U, Eisner P. 2016. Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties. *Food science & nutrition* 4(1):11-23.
- Milán-Carrillo J, Montoya-Rodríguez A, Reyes-Moreno C. 2012. High-antioxidant capacity beverages based on extruded and roasted amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) flour. *Hispanic foods: chemistry and bioactive compounds* 1109:199-216.
- Milán-Noris AK. 2017. Nutraceutical properties of isolated starch, phytochemical compounds and bioactive peptides from pigmented chickpea cultivars influenced by cooking or germination process (Doctor of Philosophy in Engineering Sciences Major in Biotechnology). Monterrey, Nuevo León. Instituto tecnológico y de estudios superiores de Monterrey. 101 pp
- Milán-Noris AK, Gutiérrez-Urbe JA, Santacruz A, Serna-Saldívar SO, Martínez-Villaluenga C. 2018. Peptides and isoflavones in gastrointestinal digests contribute to the anti-inflammatory potential of cooked or germinated desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Food Chemistry* 268:66-76.
- Millán F, Vioque J. 2005. Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud. *52:132-136*.
- Montes-Ávila J, López-Angulo G, Delgado-Vargas F. 2017. Tannins in Fruits and Vegetables: Chemistry and Biological Functions en: Elhadi M. Yahia. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*. Vol 1. Segunda Edición. Wiley. 221-268 pp.

- Montoya-Rodríguez A, González de Mejía E, Dia VP, Reyes Moreno C, Milán Carrillo J. 2014. Extrusion improved the anti-inflammatory effect of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) hydrolysates in LPS-induced human THP-1 macrophage-like and mouse RAW 264.7 macrophages by preventing activation of NF- κ B signaling. *Molecular Nutrition & Food Research* 58:1028-1041.
- Montoya-Rodríguez A. 2015a. Identificación de Biopéptidos en Hidrolizados Proteínicos de Harina de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) Extrudido. Evaluación de la Actividad Biológica. [Tesis de Doctorado en Biotecnología de Alimentos]. Culiacán, México: Universidad Autónoma de Sinaloa. 244p. Disponible en la biblioteca de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas.
- Montoya-Rodríguez A, Gómez Favela MA, Reyes Moreno C, Milán Carrillo J, González de Mejía E. 2015b. Identification of bioactive peptide sequences from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed proteins and their potential role in the prevention of chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14(2):139-158.
- Mtolo M, Gerrano A, Mellem J. 2017. Effect of simulated gastrointestinal digestion on the phenolic compound content and in vitro antioxidant capacity of processed Cowpea (*V. unguiculata*) cultivars. *CyTA-Journal of Food* 15(3):391-399.
- Olawoye BT, Gbadamosi SO. 2017. Effect of different treatments on in vitro protein digestibility, antinutrients, antioxidant properties and mineral composition of *Amaranthus viridis* seed. *Cogent Food & Agriculture* 3(1):1296402.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. 2016. Enfermedades no transmisibles. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/> (consultado el 15 de marzo de 2017).

- Oseguera-Toledo ME, de Mejia EG, Dia VP, Amaya-Llano SL. 2011. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF- κ B pathways. *Food Chemistry* 127(3): 1175-1185.
- Ozuna C, Cerón-García A, Sosa-Morales ME, Salazar JAG, León-Galván MF, del Rosario Abraham-Juárez M. 2018. Electrically induced changes in amaranth seed enzymatic activity and their effect on bioactive compounds content after germination. *Journal of food science and technology* 55(2):648-657.
- Paśko P, Bartoń H, Zagrodzki P, Gorinstein S, Fołta M, Zachwieja Z. 2009. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry* 115(3):994-998.
- Paucar-Menacho LM, Peñas E, Dueñas M, Frias J, Martínez-Villaluenga C. 2017. Optimizing germination conditions to enhance the accumulation of bioactive compounds and the antioxidant activity of kiwicha (*Amaranthus caudatus*) using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology* 76:245-252.
- Pavlik V. 2012. The revival of amaranth as a third-millennium food. *Neuroendocrinology Letters* 33(37):3-7.
- Pazinatto C, Malta LG, Pastore GM, Maria Netto F. 2013. Antioxidant capacity of amaranth products: effects of thermal and enzymatic treatments. *Food Science and Technology* 33(3):485-493.
- Pellegrini M, Lucas-Gonzalez R, Fernández-López J, Ricci A, Pérez-Álvarez JA, Sterzo CL, Viuda-Martos M. 2017. Bioaccessibility of polyphenolic compounds of six quinoa seeds during in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods* 38:77-88.

- Pellegrini M, Lucas-Gonzalez R, Sayas-Barberá E, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA, Viuda-Martos M. 2018. Bioaccessibility of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Chia (*Salvia hispanica L.*) Seeds. *Plant foods for human nutrition* 73(1):47-53.
- Peñarrieta JM, Tejeda L, Mollinedo P, Vila JL, Bravo JA. 2014. Phenolic compounds in food. *Revista Boliviana de Química*. 31(2): 68-81.
- Perales-Sánchez JXK. 2014a. Capacidad Antioxidante, Propiedades Nutraceuticas y Compuestos Bioactivos de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus L.*). [Tesis Doctorado en Biotecnología de Alimentos]. Culiacan, Mexico: Universidad Autónoma de Sinaloa. 233p. Disponible en la biblioteca de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas.
- Perales-Sánchez JX, Reyes-Moreno C, Gómez-Favela MA, Milán-Carrillo J, Cuevas-Rodríguez EO, Valdez-Ortiz A, Gutiérrez-Dorado R. 2014b. Increasing the antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents by optimizing the germination conditions of amaranth seeds. *Plant foods for human nutrition*. 69(3): 196-202.
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science* 2(4):152-159.
- Rocchetti G, Chiodelli G, Giuberti G, Masoero F, Trevisan M, Lucini L. 2017. Evaluation of phenolic profile and antioxidant capacity in gluten-free flours. *Food Chemistry* 228: 367-373.
- Ryu D, Koh E. 2018. Stability of anthocyanins in bokbunja (*Rubus occidentalis L.*) under in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry* 267:157-162.

- SAGARPA-SIAP. 2015. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Sánchez-Osuna MF. 2018. Bebidas funcionales elaboradas con mezclas de granos integrales (Amaranto/Chía) procesados por extrusión y germinación. [Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos]. Culiacán, México: Universidad Autónoma de Sinaloa. 166p. Disponible en la biblioteca de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas.
- Sancho RAS, Pavan V, Pastore GM. 2015. Effect of in vitro digestion on bioactive compounds and antioxidant activity of common bean seed coats. *Food Research International* 76:74-78.
- Sangsukiam T, Duangmal K. 2017. A comparative study of physico-chemical properties and antioxidant activity of freeze-dried mung bean (*Vigna radiata*) and adzuki bean (*Vigna angularis*) sprout hydrolysate powders. *International journal of food science & technology* 52(9):1971-1982.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2016. Amaranto, conquista países de América y Europa. Disponible en: <http://www.gob.mx/sagarpa/prensa/amaranto-conquista-paises-de-america-y-europa>. Consultado el 23 de abril de 2017.
- Segura Nieto M, Barba de la Rosa AP, Paredes-López O. 1994. Biochemistry of Amaranth Proteins. En: "Amaranth: Biology, Chemistry and Technology". Paredes-López O (Ed). CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 76-95.
- Shevkani K, Singh N, Kaur A, Rana JC. 2014. Physicochemical, pasting, and functional properties of amaranth seed flours: effects of lipids removal. *Journal of Food Science* 79(7):1271-1277.

- Sibian MS, Saxena DC, Riar CS. 2017. Effect of germination on chemical, functional and nutritional characteristics of wheat, brown rice and triticale: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97(13):4643-4651.
- Silva-Sánchez C, González-Castañeda J, De León-Rodríguez A, De La Rosa AB. 2004. Functional and rheological properties of amaranth albumins extracted from two Mexican varieties. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)* 59(4):169-174.
- Silva-Sánchez C, de La Rosa AB, León Galván MF, De Lumen B, de León Rodríguez A, de Mejía EG. 2008. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of agricultural and food chemistry* 56(4):1233-1240.
- Solano Jiménez Roxana Patricia. 2002. Cuantificación del contenido de ácido fítico en cuatro harinas del grano de amaranto obtenidas con diferentes tratamientos y en el grano sin tratar. Tesis de licenciatura. San Salvador, El Salvador. Facultad de Química y Farmacia. Pp 34. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/6089/1/10103052.pdf>
- Soria-Hernández C, Serna-Saldívar S, Chuck-Hernández C. 2015. Physicochemical and functional properties of vegetable and cereal proteins as potential sources of novel food ingredients. *Food technology and biotechnology* 53(3):269.
- Steffensen SK, Rinnan Å, Mortensen AG, Laursen B, de Troiani RM, Noellemeier EJ, Janovska D, Dusek K, Délano-Frier J, Taberner A. 2011. Variations in the polyphenol content of seeds of field grown *Amaranthus* genotypes. *Food Chemistry* 129:131-138.

- Suarez SE, Añón MC. 2018. Comparative behaviour of solutions and dispersions of amaranth proteins on their emulsifying properties. *Food Hydrocolloids* 74:115-123.
- Sun D, Huang S, Cai S, Cao J, Han P. 2015. Digestion property and synergistic effect on biological activity of purple rice (*Oryza sativa L.*) anthocyanins subjected to a simulated gastrointestinal digestion in vitro. *Food Research International* 78:114-123.
- Taiz L, Zeiger E. 2002. *Plant Physiology*. Tercera edición. 690pp. Disponible en (books.google.com.mx/).
- Tironi VA, Añón MC. 2010. Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Research International* 43(1): 315-322.
- Valencia Bustamante PYE. 2015. Evaluación tecnológica de la germinación y clarificación de las bebidas tradicionales fermentadas y pasteurizadas de maíz morado (*Zea Mays*) y quinua (*Chenopodium Quinoa*) variedad inia 420 negra collana[Tesis para obtener el título de ingeniero en industrias alimentarias]. Arequipa, Perú. Universidad Nacional de San agustin. 116pp.
- Venskutonis PR, 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* 12:381-412.
- Ventureira J, Martinez EN, Añón MC. 2010. Stability of oil: Water emulsions of amaranth proteins. Effect of hydrolysis and pH. *Food Hydrocolloids* 24:551-559.

- Vernaza MG, Dia VP, de Mejia EG, Chang YK. 2012. Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. *Food Chemistry* 134(4):2217-2225.
- Verpoorte R. 2000. Secondary metabolism. In *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Springer. 29pp.
- Vioque J, Millán F. 2005. Los hidrolizados proteicos en alimentación: suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional. *CTC Alimentación* 26:96-102.
- Wink M. 2010. Introduction. *Annual Plant Reviews Volume 39: Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites* Second edition 1-20.
- Zilić S, Delić N, Basić Z, Ignjatović-Micić D, Janković M, Vančetović J. 2015. Effects of alkaline cooking and sprouting on bioactive compounds, their bioavailability and relation to antioxidant capacity of maize flour. *Journal of Food & Nutrition Research* 54(2):155-164.

ABREVIATURAS

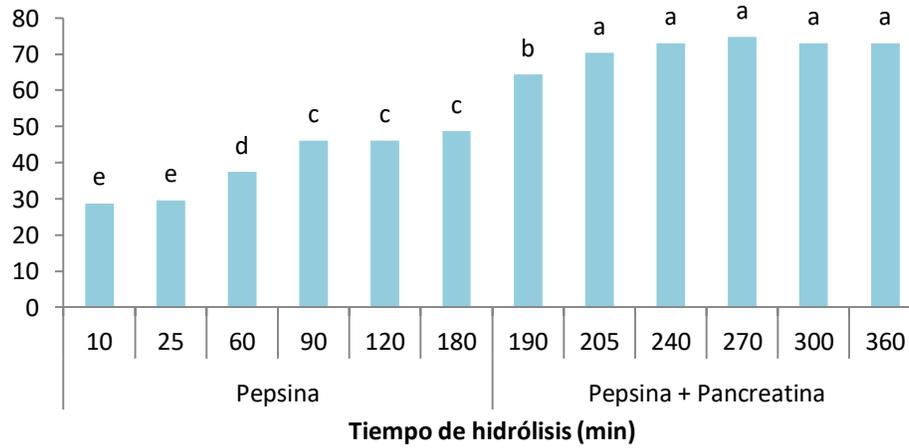
Abrev	Significado
AAPH	2,2`-azo-bis (2 amidino-propano) dihidrocloruro
ANT	Antocianinas Totales
bs	Base seca
°C	Grados Celsius
CAOX	Capacidad Antioxidante
CE	Equivalentes de Catequina
CFT	Compuestos Fenólicos Totales
CGE	Equivalentes de Cianidina-3-Glucósido
CHS	Chalcona Sintasa
COOH	Carboxilo
EAG	Equivalentes de Acido Gálico
EAI	Indice de Actividad de Emulsión
ET	Equivalentes de Trolox
FAO	Food and Agriculture Organization (Organización para los Alimentos y la Agricultura)
FT	Flavonoides Totales

GH	Grado de Hidrólisis
HAGO	Harina de Amaranto Germinado Optimizado
HASP	Harina de Amaranto Sin Procesar
HCL	Ácido Clorhidrico
IAA	Índice de Absorción de Agua
IAAc	Índice de Absorción de Aceite
ISA	Índice de Solubilidad en Agua
nm	Nanómetros
OH	Hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
p/v	Peso/Volumen
PAL	Fenilalanina Amonio Liasa
PBS	Buffer de Fosfatos
pH	Potencial de Hidrógeno
ppm	Partes por millon
PS	Proteína Soluble
rpm	Revoluciones por minuto

xg	Gravedades
SAGARPA	Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
μL	Microlitro (s)
μmol	Micromolar

ANEXOS

A



B

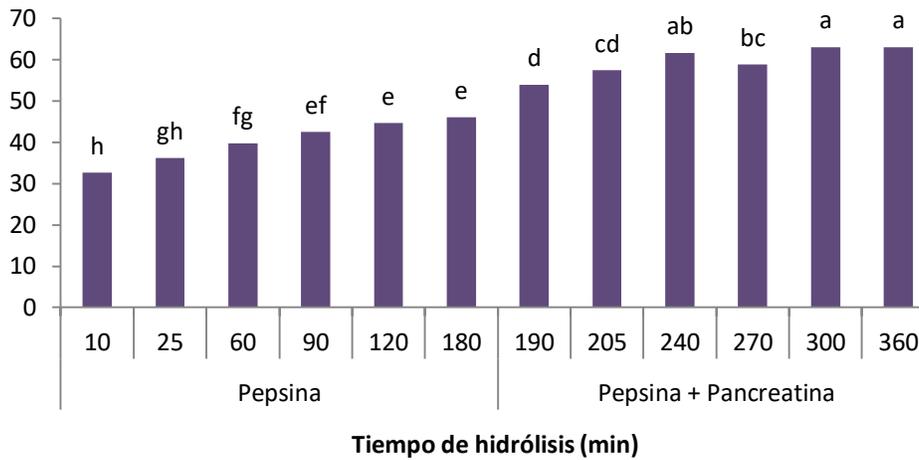


Figura 11. Grado de Hidrólisis (GH) de la harina de amaranto sin procesar (A) y germinado (B). Letras diferentes entre cada tiempo de hidrólisis indican una diferencia significativa ($p < 0.05$).