



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Programa de Posgrado en Alimentos del Centro
de la República
(PROPAC)

“Caracterización fisicoquímica y estudio de las propiedades
funcionales de aislado proteico de semillas de *Leucaena*
leucocephala (Lam. de Wit)”

Que como parte de los requisitos para
obtener el Grado de
Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

I.A. Lizbeth Rosas Ordoñez

Dirigida por

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Co-Director:

Dra. Diana Karina Baigts Allende

Querétaro, Qro. a Agosto 2020.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Caracterización fisicoquímica y estudio de las propiedades funcionales de aislado proteico de semillas de *Leucaena leucocephala* (Lam. de Wit)

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.A. Lizbeth Rosas Ordoñez

Dirigido por:

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz

Co-Dirigido por:

Dra. Diana Karina Baigts Allende

Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz
Presidente

Dra. Diana Karina Baigts Allende
Secretario

Dra. Roció Campos Vega
Vocal

Dra. Marcela Gaytán Martínez
Suplente

M. en C. Alexandra Cárdenas Hernández
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro. Fecha de aprobación por el Consejo Universitario (Agosto 2019) México

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que incluí los detalles metodológicos necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



Lizbeth Rosas Ordoñez

Nombre y Firma del Estudiante

Dirección General de Bibliotecas UAQ

RESUMEN

Las proteínas vegetales se utilizan en el desarrollo de productos alimenticios debido a su valor nutricional, propiedades funcionales y por ser una fuente sostenible y económica. Sin embargo, varios estudios han demostrado que los aislados de proteínas de las leguminosas tienen una aplicación limitada debido al bajo rendimiento funcional. Las proteínas de fuentes endémicas mexicanas como el frijol común y el amaranto se han utilizado para desarrollar productos alimenticios. En este contexto, *Leucaena leucocephala* (Lam. De Wit), comúnmente conocida como "guaje", es una leguminosa endémica mexicana que permanece como una planta subutilizada.

El objetivo de este trabajo de investigación es caracterizar la fracción proteica liofilizada del cotiledón del "guaje". Los aislados proteicos fueron obtenidos de muestras de Puebla (APGP) y Oaxaca (APGO), se caracterizaron fisicoquímicamente (determinación de la distribución del peso molecular, estabilidad térmica, hidrofobicidad superficial, interacciones intermoleculares y determinación de la estructura secundaria por espectroscopía infrarroja de la transformada Fourier), y se determinaron las propiedades funcionales (solubilidad, capacidad para unir agua/aceite, actividad emulsionante, capacidad y estabilidad de espuma y formación de gel). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en un diseño completamente al azar. Los resultados se expresaron como la media \pm DE y fueron analizados para determinar diferencia significativa entre medias usando un análisis de varianza (ANDEVA) y prueba de Tukey.

El APGP mostró la mayor concentración proteica y en ambos aislados las globulinas fueron la fracción mayoritaria. Se observaron bandas relacionadas con vicilina y legumina, lo que coincide con sus temperaturas de desnaturalización ($T_d = 124.46$ y 126.38 °C para APGP; 121.81 y 128.65 °C para APGO). Ambos aislados presentaron laminas β como su principal estructura secundaria y alta hidrofobicidad bajo condiciones ácidas. La solubilidad de los aislados fue de 61.48-99.56 %, con mayores valores en pH 8 a 12. El APGO demostró la mejor capacidad para ligar agua mientras que el APGP exhibió una mejor capacidad para ligar aceite, así como

una mejor capacidad y estabilidad espumante. El APGP y el APGO mostraron una concentración mínima de gelación de 6 y 8% respectivamente. Como conclusión, las propiedades funcionales de cada aislado proteico se ven afectadas tanto por sus fracciones proteicas que están relacionadas con la región de origen de las semillas, así como por las modificaciones de pH. Por su comportamiento en cada propiedad funcional en un rango de pH de 2, 3 y 6 a 12, se puede sugerir una aplicación potencial en matrices alimentarias como bebidas, batidos, salsas, formulaciones cárnicas o de salchichas, entre otros.

Palabras clave: *Leucaena leucocephala* (Lam. de Wit), guaje, aislado proteico, propiedades funcionales.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

SUMMARY

Vegetable proteins are used for food product development due to their nutritional value, functional properties and for being a sustainable and cheap source. However, several studies have shown that protein isolates from leguminous have limited application due to poor functional performance. Proteins from endemic Mexican sources such as common bean and amaranth have been used to develop food products. In this context, *Leucaena leucocephala* (Lam. De Wit), commonly known as “guaje”, is an endemic Mexican leguminous that remains as an underutilized plant.

The aim of this research work was to characterize the freeze-dried protein fraction of the “guaje” cotyledon. Protein isolates were obtained from samples of Puebla (APGP) and Oaxaca (APGO) and then physicochemical characterization (molecular weight distribution, thermal stability, surface hydrophobicity and secondary structure) and functional properties (solubility, ability to bind water/oil, emulsifying activity, foaming capacity and gel formation) were determined. The experimental treatments were performed by triplicate in a completely randomized design. The results are expressed as means \pm SD and were analyzed by a significant difference between means using an analysis of variance (ANOVA) and a Tukey test.

APGP showed the highest protein content where the albumin fraction was the major component. Were observed bands corresponding to vicilin and legumin, this coincided with their desaturation's temperatures ($T_d = 124.46$ and 126.38 °C for APGP; 121.81 and 128.65 °C for APGO). Both protein isolates have β -sheet as principal second structure and high hydrophobicity under acid conditions. The solubility of both was between 61.48-99.56 %, with the higher values at pH 8 to 12. APGP demonstrate the best water holding capacity while APGO the best oil holding capacity. APGP showed a better foam activity and stability. APGP and APGO showed a least gelation concentration endpoint of 6 and 8%, respectively. As a conclusion, the functional properties of each protein isolate are affected by their fraction composition that is related to the region of origin of the seeds. By their behavior of each functional property at a range of pH of 2, 3 and 6 to 12, have a

potential application in food matrixes like beverages, soups, meat and sausages formulations among others.

Key words: *Leucaena leucocephala* (Lam. de Wit), guaje, protein isolate, functional properties.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo como becaria en un programa del PNPC para la realización de los estudios de maestría.

Agradecimientos especiales al Centro de Estudios Académicos Sobre Contaminación Ambiental (CEACA, UAQ, México) y al técnico Areli Rodríguez Ontiveros, por su apoyo para la realización de los estudios de Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier.

Mi total gratitud a la Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz, quien me acepto como asesorada y me permitió formar parte de su equipo de trabajo. Siendo de las personas más comprometidas e interesadas en el desarrollo y bienestar de sus estudiantes. Solo me resta sentir una gran admiración y respeto por todo sus logros, fuerza, compromiso y determinación, siendo una completa inspiración para todo su alumnado. Así como a la Dra. Diana Karina Baigts Allende por todo su apoyo, atenciones y disponibilidad en hacerme participe de este proyecto de investigación.

A las Dras. Roció Campos Vega y Marcela Gaytán Martínez por todos su valiosos consejos, comentarios y observaciones a lo largo de la maestría. Siempre atesorare, valorare y recordare cada una de sus palabras que me han ayuda a crecer como profesional, como investigador y como ser humano, mismas que han sido un enorme impulso para la culminación del presente trabajo. Tengan por seguro que son una huella positiva en cada uno de los estudiantes que hemos tenido el privilegio de coincidir con sus enseñanzas.

A un agradecimiento al equipo de trabajo tanto estudiante de maestría y doctorado, por sus consejos y guía. Particularmente al Dr. Juan Alberto Resendiz Vazquez por sus disponibilidad y consejo a lo largo del trabajo, dando cabida al dialogo y análisis para un mejor desempeño del mismo.

A la UAQ y a cada una de las técnicas de los Laboratorios de Investigación quienes son parte importante del desarrollo de diversos proyectos de investigación. A los compañeros de curso de maestría, donde encontré a verdaderos colegas, hermanos y hermanas que nos acompañamos a lo largo de este proceso,

brindándonos palabras y acciones de apoyo para motivarnos a llegar a nuestra meta.

Agradecimientos especiales a mi novio Rodrigo Urbina por motivarme a continuar por este camino, por ser un pilar importante en el mismo y estar presente cada día desde el proceso de admisión hasta la culminación de la maestría. Gracias por cada palabra, cada gesto de cariño.

A mi familia. Mi mamá Rosa María, mi hermana Marlene, el Prof. José Carlos y mis tíos Adrián y Alfredo, son y será siempre mi mayor motor y una de las principales razones por las que cada día me despierto con ganas de lograr cosas maravillosas. Son la prueba viviente del trabajo en equipo, del trabajo con esfuerzo y que la familia siempre apoya a la familia. Gracias por coadyuvar a cumplir esta meta.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	ANTECEDENTES.....	2
2.1	Proteínas.....	2
2.1.1	Proteínas de leguminosas	2
2.1.2	Clasificación.....	3
2.1.3	Técnicas de extracción de proteínas mediante inducción de pH.....	4
2.1.4	Caracterización de proteínas.....	4
2.1.4.1	Determinación de peso molecular por electroforesis	4
2.1.4.1	Hidrofobicidad de la superficie	5
2.1.4.2	Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR).....	6
2.1.4.1	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	6
2.1.4.1	Funcionalidad de proteínas	7
2.1	Liofilización	12
2.2	Guaje (<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit)	12
2.2.1	Taxonomía.....	12
2.2.2	Generalidades	13
2.2.3	Estructura	14
2.2.4	Composición química.....	15
2.2.5	Proteína total soluble y composición de aminoácidos.....	15
2.2.6	Otros compuestos.....	17
2.2.6.1	Galactomanano.....	17
2.2.6.2	Compuestos antinutricionales	18
3	JUSTIFICACIÓN.....	19
4	OBJETIVOS.....	19
4.1	General.....	19
4.2	Particulares.....	19
5	METODOLOGÍA	20
5.1	Obtención del aislado protéico.....	20

5.2	Fraccionamiento de proteína soluble.....	20
5.3	Análisis proximales.....	21
5.3.1	Humedad.....	21
5.3.2	Cuantificación de aceite total.....	21
5.3.3	Cenizas.....	21
5.4	Técnicas de caracterización fisicoquímica.....	21
5.4.1	Distribución de peso molecular por electroforesis.....	21
5.4.2	Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR).....	22
5.4.3	Determinación de propiedades térmicas con calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	22
5.4.4	Hidrofobicidad de superficie (H ₀).....	23
5.5	Funcionalidad de proteínas.....	23
5.5.1	Solubilidad en agua.....	23
5.5.2	Capacidad de ligar el agua/aceite.....	24
5.5.3	Formación de espumas.....	24
5.5.4	Formación de geles.....	25
5.5.5	Diseño y análisis estadístico.....	25
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
6.1	Obtención del aislado proteico y análisis proximales.....	26
6.2	Fraccionamiento de proteína soluble.....	30
6.3	Caracterización fisicoquímica.....	31
6.3.1	Distribución de peso molecular por electroforesis.....	31
6.3.2	Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR).....	34
6.3.3	Determinación de propiedades térmicas con calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	38
6.3.4	Hidrofobicidad de superficie (H ₀).....	40
6.4	Funcionalidad de proteínas.....	41
6.4.1	Solubilidad en agua.....	41
6.4.2	Capacidad de ligar el agua/aceite.....	43
6.4.3	Actividad y estabilidad espumante.....	44
6.4.4	Concentración mínima de gelación.....	46

7 CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Taxonomía de <i>Leucaena leucocephala</i>	12
Cuadro 2 Composición química de las vainas, semillas y cáscaras de <i>Leucaena leucocephala</i> [g/kg de materia seca].....	15
Cuadro 3 Composición de aminoácidos de las vainas y semillas de <i>Leucaena leucocephala</i> [g/kg de materia seca].....	16
Cuadro 4 Distribución de la proteína total, proteína total soluble de las fracciones de proteína de granos de semilla <i>Leucaena leucocephala</i>	17
Cuadro 5 Desglose de rendimiento por kilogramo de guaje en vaina de Oaxaca. 26	
Cuadro 6 Contenido de humedad de las fracciones de guaje.....	27
Cuadro 7 Contenido lipídico de fracciones de la semilla de guaje.	28
Cuadro 8 Análisis proximales de los aislados proteicos de guaje.	29
Cuadro 9 Distribución de la proteína total soluble de las fracciones proteicas de granos de semilla <i>Leucaena leucocephala</i>	30
Cuadro 10 Análisis de correlación entre los porcentajes de estructura secundaria y solubilidad y el efecto de la solubilidad sobre las otras propiedades funcionales. 43	
Cuadro 11 Efecto de la concentración de proteína en la formación de geles de APGO y APGP a distintas concentraciones.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Producción nacional de leguminosas (SAGARPA, 2018).	14
Figura 2 (a) Racimo de vainas, (b) semillas y (c) estructura de semilla de <i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit (USDA, 2019).....	14
Figura 3 Gel de electroforesis de fracciones proteicas de (a) fracciones de harina de cotiledones de Oaxaca, (b) APGO y (c) APGP en condiciones (+) no reductoras y (-) reductoras de (A) albuminas, (B) globulinas y (C) glutelinas.	32
Figura 4 Espectros de IR para (A) APGO y (B) APGP a pH 2-12.	35
Figura 5 Conjunto de bandas de amida I para (A) APGO y (B) APGP a las distintas condiciones de pH. Y bandas ajustadas al modelo de gauss a condiciones de pH(1) 2 y (2) 3.....	36
Figura 6 Distribución de estructuras secundarias en (A) APGO y (B) APGP en distintas condiciones de pH.....	37
Figura 7 Termogramas de DSC del APGP y APGO.....	39
Figura 8 Perfil de H ₀ para (A) APGP y (B) APGO a pH de 2-12. ^{abc} Diferencia significativa en distintas condiciones de pH. * Diferencia significativa entre APGO y APGP a la misma condición de pH; para un nivel de significancia de 0.05 con la prueba de Tukey. Los resultados son la media ± la desviación estándar de tres réplicas.....	41
Figura 9 Perfil de solubilidad del APGO A) y APGP B) a pH de 2-12. ^{abcdde} Diferencia significativa en distintas condiciones de pH y *diferencia significativa entre APGO y APGP a la misma condición de pH; para un nivel de significancia de 0.05. Los resultados son la media ± la desviación estándar de tres réplicas.....	42
Figura 10 Actividad espumante de APGO y APGO en rango de pH de 2-12 a tiempo 0 y 30 minutos. Los resultados son la media ± la desviación estándar de tres replicas.....	45

1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, debido a las predicciones sobre el crecimiento poblacional, diversos estudios se centran en la producción y empleo de nuevas fuentes de alimentos que permitan satisfacer las necesidades poblacionales.

El caso de las proteínas no es una excepción. A nivel industrial son macromoléculas valoradas tanto por su aporte nutricional como por sus propiedades funcionales, ya que modifican las características organolépticas a los alimentos. Esta aplicación está relacionada con sus propiedades fisicoquímicas y estructurales que les permiten interactuar con otros componentes de la matriz alimentaria.

Además, la funcionalidad de las proteínas se ve afectada a su vez por los procesos o pretratamientos que se empleen durante su procesamiento, purificación o aislamiento. En este sentido, la liofilización es una de las técnicas más empleadas a nivel laboratorio por su menor impacto en las características fisicoquímicas de las proteínas, mientras que el secado por aspersion es el más común a nivel industrial. De este último, recientemente se ha reportado que su aplicación puede mejorar ciertas propiedades funcionales de las proteínas.

Aunado a ello, las tendencias globales indican un descenso en el consumo de alimentos y derivados de origen animal por aquellos de origen vegetal. Además, se sugiere el uso de especies poco explotadas comercialmente y que sean propias de cada región. Desde este punto de vista, en México se encuentra presente *Leucaena leucocephala* (Lam. de Wit), comúnmente denominada como guaje, la cual es una legumbre endémica. Se ha distribuido ampliamente por todo el país y el mundo debido a sus bajos requerimientos de desarrollo y rápida adaptabilidad. Sin embargo, en el país su comercio es de forma local y se limita a un consumo tradicional. Y aunque existen diversos estudios enfocados en los extractos lipídicos, así como de carbohidratos, poco se ha estudiado sobre su fracción proteica. Es por ello, que en el presente trabajo se considera identificar el potencial funcional del aislado proteico liofilizado del guaje a través de la caracterización fisicoquímica, determinación de propiedades funcionales.

2 ANTECEDENTES

2.1 Proteínas

Las proteínas son macromoléculas biológicas de constitución variada y con un alto nivel de complejidad. Para su formación se consideran 20 aminoácidos, llamados esenciales ya que de su degradación durante la digestión es posible liberar aminoácidos y péptidos que se absorben fácilmente; dichas unidades se distribuyen a través del torrente sanguíneo a los distintos tejidos donde ejercerán sus funciones biológicas (Shang, Chaplot y Wu, 2018).

El consumo de proteínas, ya sea de fuente animal o vegetal, es un requerimiento fundamental para la población. Además, considerando los requerimientos nutricionales necesarios para la alimentación de 10 billones de personas, que se estima será la población mundial para el 2050. Se espera que la producción y fuentes de obtención de nutrientes, como el caso de las proteínas, se incremente y se garantice cubrir con las necesidades de la población (FAO, 2018).

Para que una proteína pueda ser consumida debe de cumplir ciertas características como son: no ser tóxica, ser nutricionalmente adecuada, digerible, además que puede tener una función tecnológica para la elaboración de alimentos. Además, actualmente se busca que la fuente de donde se obtenga esté disponible en la zona y que los cultivos permitan un proceso sustentable (Ustunol, 2014).

2.1.1 Proteínas de leguminosas

Las legumbres son granos muy comunes a lo largo del mundo, mismas que han demostrado ser una buena fuente para la obtención de proteína. Dichas plantas se han empleado para la alimentación en zonas en donde es escaso o se dificulta el consumo de proteínas de origen animal. Lo anterior se debe a que, en general, el aporte de proteína de diversas harinas de la familia Leguminosae es de entre 160-350 g/Kg (Boye, Zare y Pletch, 2010).

En este sentido, en los últimos años se han realizado diversos estudios donde se busca obtener la proteína de dichos granos con el fin de cuantificarla y caracterizar sus propiedades nutracéuticas, funcionales y estructurales. Lo anterior con el fin de generar de nuevos acarreadores de compuestos nutricionales y/o obtener productos con un valor agregado (Aguilar-Vázquez, Loarca-Piña, Figueroa-Cárdenas y Mendoza, 2018; Aluko et al., 2015; Feyzi, Milani y Golimovahhed, 2018; Gumus, Decker y McClements, 2017; Klost y Drusch, 2018; Mojica y de Mejía, 2015; Rasoulpour, Afsharifar, Izadpanah y Aminlari, 2017; Reinkensmeier, Bußler, Schlüter, Rohn y Rawel, 2015; Rodriguez-canto, Chel-guerrero, Fernandez y Aguilar-vega, 2019; Yadav, Kumari y Yadav, 2011). Aunado a ello, actualmente se recomienda el uso de especies poco explotadas económicamente, que minimicen la reducción de la biodiversidad y la degradación de los suelos mediante sistemas sostenibles (FAO, FIDA, UNICEF, PMA y OMS, 2018).

2.1.2 Clasificación

Una de las formas más comunes de clasificar a las proteínas presentes en los alimentos es en función de su solubilidad, agrupándose en cuatro grupos que se describen continuación:

- ❖ **Albúminas:** son solubles en agua. Comprende proteínas enzimáticas y diversos inhibidores que limitan la absorción de los aminoácidos. Se ha descrito que tanto las albúminas como las globulinas tienden a tener en su estructura lisina y se ha reportado que su aporte de este aminoácido en algunos casos es el triple del que se consigue con las prolaminas y las glutelinas (Bean et al., 2019; Boye, Zare y Pletch, 2010).
- ❖ **Globulinas:** son solubles en soluciones salinas. En el caso particular de las legumbres, las más representativas son la legumina y vicilina (Aluko et al., 2015; Boye et al., 2010), están presentes entre el 18-25% y el 55-80% respectivamente (Stone, Karalash, Tyler, Warkentin y Nickerson, 2015).
- ❖ **Prolaminas:** son solubles en alcohol y su principal característica es una alta presencia de prolina, sus nombre proviene de dicho aminoácido, además de tener presente glutamina y sus derivados (Boye et al., 2010). Su principal

funcion en las platas es fungir como reserva de fuentes de nitrógeno y carbono; además de ser características según cada fuente de obtención (Shewry y Halford, 2002).

- ❖ **Glutelinas:** son solubles en soluciones con detergentes ácidos o alcalinos. Sus cadenas se caracterizan por una mayor concentración de metionina y cistina, es por eso que se sugiere que la generación de legumbres con un mayor contenido de este tipo de proteínas puede ayudar a compensar los aminoácidos limitantes de otras semillas (Boye et al., 2010).

2.1.3 Técnicas de extracción de proteínas mediante inducción de pH

La carga que presentan las proteínas es dependiente del pH del medio en que se encuentren. Esto se debe a que, las áreas más sensibles de la molécula adquieren modificaciones en sus cargas que incrementa la repulsión de estas, o por lo contrario la carga se puede perder y esto favorecerá el aglomeramiento. Las proteínas cuentan con un punto isoeléctrico (que es el pH al cual la carga neta de la proteína es cero, por lo que las proteínas tienden a agregarse y precipitar), el beneficio de emplear esta técnica es que la mayor parte de las reacciones inducidas por cambio de pH son reversibles (Scope, 1994; Ustunol, 2015).

Además, es común el empleo de tratamientos secuenciales con soluciones alcalinas y ácidas (Hou et al., 2017). Diversos estudios muestran que se puede lograr rendimientos de entre un 60-95% de extracción; aunque el grado de selectividad puede variar en función de los pasos empleados (Qin, Johansen y Mussatto, 2018).

Es importante considerar que el tratamiento con álcali/ácido tiene un efecto sobre la estructura de la molécula proteica, modificando propiedades químicas, funcionales y nutricionales (Z. Zhang, Wang, Dai, He y Ma, 2018).

2.1.4 Caracterización de proteínas

2.1.4.1 Determinación de peso molecular por electroforesis

La técnica de electroforesis ha tenido muchas aplicaciones en el ramo alimentario debido a que permite identificar y diferenciar proteínas. Para su desarrollo se

emplean geles de electroforesis de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) (Ustunol, 2014).

El principio básico de la técnica se basa en dos fenómenos, el primero implica la aceleración de las moléculas debido al campo eléctrico del gel y por otro lado las interacciones que tengan las moléculas proteicas con la estructura de la poliacrilamida. Además, el tamaño de poro de la red del gel y sus distribución influye en el desplazamiento de las proteínas a través de los geles y así las proteínas más pequeñas se mueven más rápidamente a través de la estructura (Buxbaum, 2003).

Dichos geles se someten a un campo eléctrico que permite que las proteínas queden en bandas, agrupándose en base a su peso molecular (Ustunol, 2014). Posteriormente, para visualizar las bandas, se emplean tinciones; y para poder conocer los pesos de las proteínas, se hace la separación de proteínas patrón de tamaño molecular conocido, contra las que se pueden comparar el tamaño de las muestras analizadas (Ustunol, 2014).

Los estudios de pesos moleculares en leguminosas son diversos. En el caso de aislado proteico de chícharo se ha reportado franjas entre 100-140 kDa (Feyzi, Milani y Golimovahhed, 2018), y estudios realizados en asilados proteicos de diversas especies de frijol mexicano mostraron bandas entre 10 y 150 kDa (Mojica y de Mejía, 2015). A demás estudios en aislado proteico de soya mostraron dos principales bandas; la 11S legumina o glicinina con un peso de 350 KDa y la 7S vicilina o β -coglicina a 180 kDa, que como se ha mencionado antes son proteínas características de las leguminosas (Chang, Alli, Molina, Konishi y Boye, 2012).

2.1.4.1 Hidrofobicidad de la superficie

La hidrofobicidad superficial de la proteína se determina para evaluar su funcionalidad (Ju, Hettiarachchy y Rath, 2001); esta propiedad depende de los tratamientos empleados para el asilamiento proteico (Boye et al., 2010; Stone et al., 2015). Algunos estudios relacionan altos valores de hidrofobicidad con mejores capacidades de retención de humedad pero menor capacidad de ligar grasas (Reinkensmeier, Bußler, Schlüter, Rohn y Rawel, 2015). Por otra parte, se ha

relacionado una alta hidrofobicidad superficial y buena solubilidad de la proteína con una excelente formación de espumas. Además, para aislados proteicos de gelatina se ha observado que, los procesos de liofilización y secado por aspersion modifican los valores de hidrofobicidad (Kanwate, B. W., Ballari y Kudre, 2019).

2.1.4.2 Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR)

En el último siglo se ha empleado ampliamente la FT-IR debido a que es posible caracterizar muestras en relación con su carga de superficie, hidrofobicidad y estructura química. El método permite determinar grupos funcionales y la formación de posibles enlaces químicos (Mohamed, Jaafar, Ismail, Othman y Rahman, 2017). Esta caracterización se basa en aplicar IR sobre una muestra, la cual absorbe o transmite un parte del espectro incidido; dichas intensidades son características de cada tipo de material, por lo que se considera como una huella digital propia de cada sustancia (Dutta, 2017).

2.1.4.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La técnica de calorimetría diferencial de barrido es una herramienta que nos permite determinar las características de un polímero (Drzeżdżon, Jacewicz, Sielicka y Chmurzyński, 2019). Es un método térmico fisicoquímico con el que se determinan cambios energéticos en sustancias sometidas a tratamientos térmicos, principalmente los que ocurren durante los cambios de fase (Ustunol, 2014).

Dentro de los parámetros que se pueden obtener de su aplicación se encuentran la temperatura de desnaturalización (Td), la entalpia de transición (ΔH), la temperatura y tiempo de cristalización, la capacidad calorífica y la temperatura de función (Drzeżdżon et al., 2019; Murray, Arntfield y Ismond, 1985).

Para la interpretación de dichos parámetros, las proteínas pueden mostrar dos comportamientos dependiendo de si la desnaturalización es o no reversible (Amani, Moosavi-Movahedi y Kurganov, 2017). Lo anterior debido a que los valores de (ΔH)

representan una combinación de reacciones exotérmicas relacionadas con las interacciones hidrofóbicas, y a su vez dicho valor se ve afectado por las condiciones de agregación de las moléculas proteicas (Murray et al., 1985), mientras que la medición de la Td nos indica la termo estabilidad de la proteína (Feyzi et al., 2018).

Este análisis se ha empleado para el estudio de proteínas de garbanzo, lenteja, guisantes, mostrando una disminución del ΔH al ser desnaturalizada la proteína, dichos valores varían entre 0.03 y 24 J (Arntfield y Maskus, 2011). Por otro lado, la técnica ha dado información sobre el efecto la aplicación del electro hilado en la estabilidad térmica y la temperatura de fundido de las proteínas de frijol (Aguilar-Vázquez et al., 2018). También se ha aplicado para verificar las modificaciones que ocurren según los métodos de almacenamiento al que se someten las proteínas (Ustunol, 2014).

2.1.4.1 Funcionalidad de proteínas

Independientemente del aporte nutricional que representan el consumo de proteínas, estas son valoradas en el ramo alimenticio debido a que son moléculas altamente funcionales que se emplean para a la elaboración de alimentos. Estas moléculas contribuyen en las características sensoriales como textura, incremento de viscosidad, capacidad emulsificante, incremento en estabilidad de la matriz, así como en el aporte de sabores y aromas (Arntfield y Maskus, 2011).

Las propiedades funcionales han sido definidas como *“Las propiedades físicas y químicas de las proteínas que influyen sobre el comportamiento de los sistemas alimentarios durante el procesamiento, almacenamiento, cocción y consumo”* (Moure, Sineiro, Domínguez y Parajó, 2006), una definición más completa es *“Son las propiedades fisicoquímicas de las proteínas que influyen sobre los alimentos dependiendo de su tamaño, forma, composición y secuencia de aminoácidos, carga neta, distribución de la carga, hidrofobicidad, hidrofobicidad, estructura (secundaria, terciaria y cuaternaria), flexibilidad molecular en respuesta al ambiente externo (pH,*

temperatura, concentración de sal), o interacciones con otros constituyentes de los alimentos” (Sathe, 2002) .

Las principales propiedades para la caracterización de una proteína en base a su funcionalidad y posible aplicación se describen a continuación.

2.1.4.1.1 Solubilidad

La solubilidad se considera como una de las propiedades más importantes para una proteína ya que de esta dependerán las demás funcionalidades. Diversas investigaciones han concluido que una proteína con buena solubilidad facilita su migración a la interfaz agua-aire o agua-aceite y a su vez favorece su reorganización, lo cual se refleja en una mejor capacidad emulsificante o espumante (Feyzi et al., 2018; Liceaga y Hall, 2018; Peter R. Shewry y Halford, 2002).

Existen diversos estudios sobre los aislados proteicos de leguminosas, donde se ha demostrado que la técnica de extracción tiene un efecto sobre la capacidad de solubilizarse. Stone et al. (2015) mostraron que el aislado proteico chícharo (por extracción salina) mostró una solubilidad semejante al que presentan aislados de proteínas de huevo o de suero de leche; lo cual se atribuyó a modificaciones en el acomodo y plegamiento de las proteínas debido al tipo de extracción empleado (Stone et al., 2015).

Por otra parte, se ha reportado que la presencia de unidades pequeñas de péptidos incrementa la solubilidad de los aislados (Peter R. Shewry y Halford, 2002). Mientras que el pH del medio tiene un efecto directo sobre las cargas de aminoácidos la cadena peptídica; por lo que si la molécula está conformada por un mayor número de aminoácidos hidrofílicos la solubilidad será mayor cuando el pH del medio sea distinto al del punto isoeléctrico (Moure et al., 2006). En relación a ello, la mayoría de las proteínas de frijol han mostrado una tendencia a precipitar en condiciones ácidas (pH 4-5) debido a su alto contenido en glutamina y ácido aspártico, y una mejor solubilidad en pH alcalinos (pH 8.5-10) (Sathe, 2002).

2.1.4.1.2 Capacidad de ligar el agua

La capacidad de ligar el agua se define como *“La cantidad de agua que puede ser absorbida por 1 g de proteína”* (Stone et al., 2015); y se relaciona con la capacidad de las moléculas proteicas de mantener unidas a las moléculas de agua contra la gravedad (Moure et al., 2006). La relevancia de esta propiedad dependen atributos como la humedad o jugosidad y la retrogradación o frescura de los alimentos (Sathe, 2002).

Esta capacidad depende tanto del tipo y cantidad de proteína, así como de la presencia de otros compuestos no proteicos como carbohidratos. Estos últimos han mostrado tener un efecto sinérgico para incrementar la capacidad de ligar el agua de las proteínas (Sathe, 2002).

Además, esta propiedad se ve influenciada por los pretratamientos que se den a las semillas antes de su extracción (por ejemplo: se mejora si la semilla es tratada con remojo, algún tratamiento térmico, sufre germinación o fermentación), así como por la técnica empleada para la obtención del aislado (Sathe, 2002; Stone et al., 2015).

2.1.4.1.1 Capacidad de ligar el aceite

La capacidad de ligar aceite es una propiedad importante para elaborar alimentos, ya que de esta depende la estabilidad del productos con componente lipídicos durante su almacenamiento (Moure et al., 2006). Técnicamente se puede definir como *“La cantidad de aceite que puede ser absorbida por 1 g de proteína “* (Stone et al., 2015). Algunos aislados proteicos, como el de soya y garbanzo, que han mostrado buena capacidad de ligar aceites son empleados para producir frituras ya que provén textura y crugencia al producto (Moure et al., 2006; Stone et al., 2015).

2.1.4.1.1 Emulsificación

Las moléculas proteicas comúnmente se encuentran conformadas por aminoácidos hidrofóbicos en su interior e hidrofílicos en el exterior; de su flexibilidad y apertura de la cadena péptica puede ocurrir que la proteína actúe anfifílicamente, lo que le permite actuar como un emulsificante (Liceaga y Hall, 2018). La capacidad de emulsificar varía en una proteína debido a diversos factores como son su

hidrofobicidad, masa molar, estabilidad conformacional y factores del medio como el pH, temperatura y fuerza iónica. El proceso por el cual se lleva a cabo la emulsificación depende de procesos intermedios: la formación de cremado, floculación o agregación y coalescencia (Moure et al., 2006).

Se ha visto que esta propiedad se ve influenciada por el grado de hidrólisis que presente una proteína. En este sentido, se ha reportado un incremento en la emulsificación cuando el rango de hidrólisis se encuentra entre un 3%-5% y una disminución conforme se incrementa aproximadamente a un 8%. Lo anterior debido a que las hidrólisis ligeras permiten exponer algunos de los residuos hidrófobos, pero un exceso de la misma impide la adecuada distribución e interacción de las cadenas en la interface (McCarthy, O'Callaghan y O'Brien, 2013).

La capacidad emulsificante de proteína de diversas leguminosas ha sido estudiada. En el caso del chícharo es comparable con la actividad emulsificante observada en aislados proteicos de origen animal (Stone et al., 2015). Por su parte la capacidad emulsificante de distintas especies de frijol mostró ser menor a las presentada por proteínas animales, lo cual se atribuye a las proteínas en dicha matriz se encuentran en forma empaquetada y rígida (Sathe, 2002).

2.1.4.1.2 Formación de espumas

La capacidad para formar espumas es de interés en la industria ya que de esta depende muchas veces la textura y palatabilidad que se obtendrá en el producto final. Aunado a ello, es una propiedad que nos permite incrementar los volúmenes del producto, dando un mayor rendimiento (McCarthy et al., 2013). La forma en la cual se determina la formación de espuma es por la capacidad que tiene la proteína para reducir la tensión superficial (Moure et al., 2006).

Se sabe que la capacidad para formar películas está dada por interacciones hidrófobas proteína-proteína, por lo que la presencia de zonas con baja repulsión electrostática favorece el acomodo de las moléculas en la interfaz. Dichas condiciones de las moléculas proteicas se ven influenciadas por condiciones tales como el grado de hidrólisis y el pH del medio (Klost y Drusch, 2019).

En el caso de la leguminosas, el aislado de soya ha mostrado una baja estabilidad en condiciones ácidas; mientras para la proteína de frijol, la formación de espumas depende de la forma en la que se encuentren las globulinas, ya que si estas son rígidas se dificultará su reacomodo (Sathe, 2002). Otra característica que afecta directamente la capacidad espumante es el contenido de moléculas de cadena larga, ya que de ello depende la estabilidad de la espuma, junto con la presencia de grupos cargados que favorezcan la interacción proteína-proteína (McCarthy et al., 2013; Moure et al., 2006).

2.1.4.1.1 Formación de geles

Un gel es un sistema alimentario donde una red proteica o de carbohidratos permite el atrapamiento de agua líquida, logrando un estado semi sólido donde puede contener además sabores y otros ingredientes alimentarios. Por característica general las proteínas presentan una mejor eficiencia para formar geles que los carbohidratos (Moure et al., 2006; H. Wu, Wang, Ma y Ren, 2009).

Además, la formación de un gel puede llevarse de dos formas, espontánea por una dispersión simple del compuesto gelante o mediante condiciones controladas que permitan la desnaturalización de la proteína. Cuando se forma un gel, este es producto de la formación de una red donde se presentarán diversas interacciones, tanto proteína-proteína como proteína con compuestos no proteicos. Por otra parte, las condiciones del medio como son pH y presencia de sales influyen en la capacidad para formar geles y el grado de ordenamiento de la red (Nazir, Asghar y Aslam Maan, 2016; Sathe, 2002).

Por otro lado, los volúmenes requeridos para formar un gel son de un 2% para proteína de origen animal y de un 5-20% para proteínas vegetales; además, las segundas requieren de la aplicación de calor como en el caso del tofu, el cual está formado a base de proteína de soya (Sathe, 2002). En el caso de las legumbres las dos principales proteínas responsables de la formación de geles son la legumina y la vicilina. De estas últimas, debido a sus diferencias estructurales, tienen la capacidad de formar geles con características distintas como son firmeza, elasticidad y fuerza de corte. Dichos cambios se deben a que la legumina presenta

primordialmente enlaces de puentes disulfuro, mientras que la vicilina se caracteriza por la generación de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Day, 2013).

2.1 Liofilización

La liofilización es un método para eliminar agua de diferentes matrices de alimentos (Kasper, Hedtrich, Friess y Christina, 2019). El principio de este proceso implica dos pasos: la sublimación y la desorción de agua. Para el primero, el material debe congelarse y exponerse a temperaturas y presiones por debajo del punto triple del agua (4.579 mm de Hg y 0.0099 ° C) (Gaidhani, Harwalkar, Bhambere y Nirgude, 2015). Esta es una de las técnicas más empleadas para el procesamiento y obtención de aislados proteicos (Gong et al., 2015; Oliete, Yassine, Cases y Saurel, 2019).

2.2 Guaje (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit)

2.2.1 Taxonomía

El perfil taxonómico del guaje es el siguiente:

Cuadro 1 Taxonomía de *Leucaena leucocephala*

Categoría	Nombre científico y nombre común
Reino	<i>Plantae</i> /Plantas
Subreino	<i>Tracheobionta</i> / Plantas vasculares
Supervisión	<i>Spermatophyta</i> / Plantas de semillas
División	<i>Magnoliophyta</i> / Planta de flores
Clase	<i>Magnoliopsida</i> / Dicotiledóneas
Subclase	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Fabales</i>
Familia	<i>Fabaceae</i> / <i>Leguminosae</i> - Familia de guisantes
Género	<i>Leucaena</i> Benth. <i>Leadtree</i>
Especie	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) De Wit

(USDA, 2019)

2.2.2 Generalidades

Leucaena leucocephala, es una leguminosa tropical endémica de México que ha sido domesticado internacionalmente de forma importante. Es un árbol multipropósito, muchas veces empleado como forraje y de forma minoritaria empleado en el país como fuente de alimentación humana (Hughes, Donovan Bailey y Harris, 2002).

Se encuentra en los estados de Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Coahuila, Durango, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Chiapas, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tampico, Tabasco, Yucatán y Veracruz. Su amplia distribución en el país se debe a su capacidad de adaptación y desarrollo en zonas secas (350 mm/año de agua) y húmedas (2300 mm/año de agua); además de ser un buen competidor por nutrientes frente a otras especies, razón por la cual es empleado con el fin de reforestar diversas zonas (Zárate, 1987; Allen *et al.*, 2009).

Su distribución mundial ha permitido su estudio como componente importante en la dieta de diversas especies de explotación, como es el caso del pez gato en África, así como como alimento para cerdos, aves de corral, cabras de malawi y vacas de doble propósito. Lo anterior debido a que se ha presentado como una buena fuente de nitrógeno (D'Mello y Acamovic, 1989; Ly *et al.*, 1998; Sotolu y Faturoti, 2008; Martens *et al.*, 2012).

En nuestro país se reportan una comercialización de 86000 toneladas, siendo la novena leguminosa más cosechada (Figura 1) (SAGARPA, 2018). Sin embargo, su producción comparada con la del frijol, el garbanzo y la soya es de aproximadamente una centésima parte de cada uno.

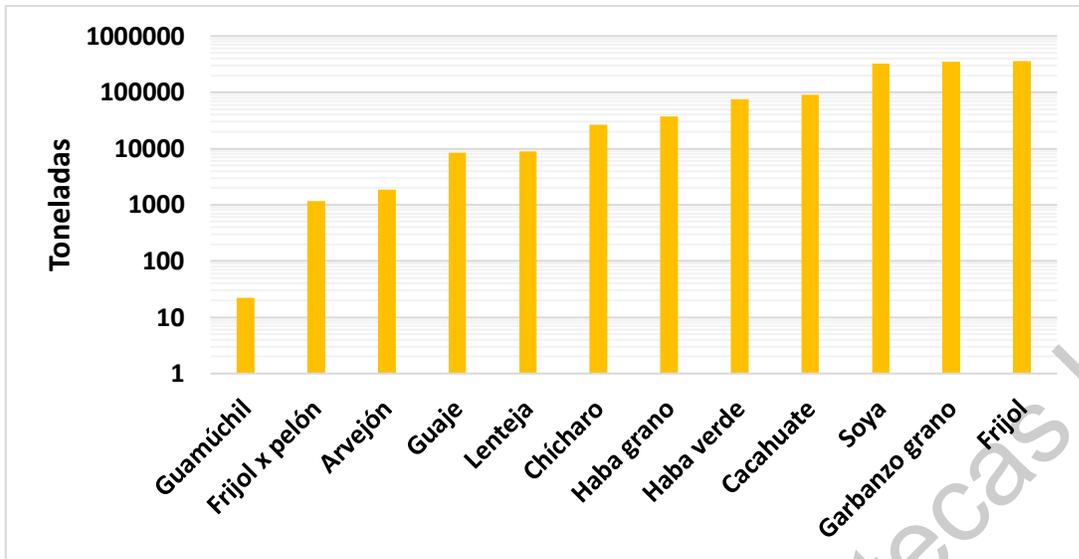


Figura 1 Producción nacional de leguminosas (SAGARPA, 2018).

2.2.3 Estructura

El árbol se caracteriza principalmente por la generación de inflorescencias color crema de forma globular, de las cuales se producen vainas planas de entre 13-18 mm de largo que pueden contener entre 15 y 30 semillas. La estructura de la semilla consta de una cubierta y un endospermo de dos cotiledones (Figura 2) (Shelton y Brewbaker, 1994).

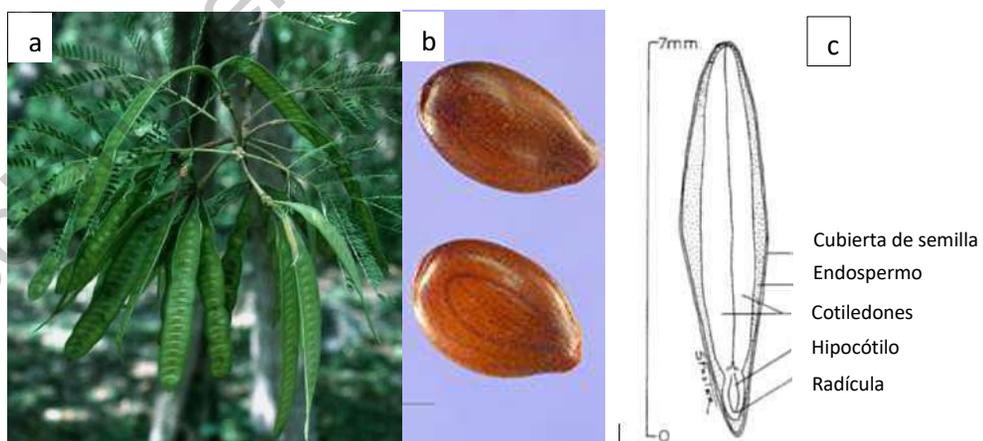


Figura 2 (a) Racimo de vainas, (b) semillas y (c) estructura de semilla de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (USDA, 2019).

2.2.4 Composición química

La caracterización del contenido de proteína, carbohidratos y micronutrientes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit varían deponiendo de la parte de la planta que se esté examinado (Cuadro 2). Los cotiledones de la semilla son los elementos con mayor contenido de proteína cruda, mientras que la cáscara o testa es la que contiene la mayor cantidad de fibra (Ngwa, Nsahlai y Bonsi, 2002). Razón por la que se recomienda emplear a los cotiledones como principal fuente de proteína y la testa como una fuente de carbohidratos para próximos estudios y aplicaciones.

Cuadro 2 Composición química de las vainas, semillas y cáscaras de *Leucaena leucocephala* [g/kg de materia seca].

	Vaina	Semilla (cotiledón)	Cáscara (Testa)
Contenido de humedad (secado al sol)	58.2 ^a	65.0 ^a	
Proteína cruda	246.9	303.5	84.1
Fibra detergente neutra	408.9	333.4	740.1
Fibra detergente acida	284.7	164.8	660.5
Cenizas	45.4	40.8	47.4
Lípidos	67.7	72.6	

a (D. Rao & Gouricharan, 2016)

(Ngwa, Nsahlai y Bonsi, 2002)

2.2.5 Proteína total soluble y composición de aminoácidos

En cuanto al perfil de aminoácidos (Cuadro 3) que contiene tanto la vaina como la semilla, se evidencia un mayor aporte de glutamina y ácido aspártico. El aporte de lisina permite que su ingesta pueda mezclarse con granos de cereal, ya que estos últimos son deficientes en este aminoácido (Ashton, 2007; FAO, 2007).

Cabe recalcar que los contenidos de triptófano y cisteína no fueron determinados en dicho estudio (Ngwa, Nsahlai y Bonsi, 2002). En el caso de la cisteína se ha

reportado que su presencia en proteínas de granos de leguminosas es nulo o limitado. Sin embargo determinar la presencia del mismo en la semilla es relevante ya que la ingesta es necesaria tanto para el crecimiento como para el mantenimiento de cuerpo humano (FAO, 2007).

Cuadro 3 Composición de aminoácidos de las vainas y semillas de *Leucaena leucocephala* [g/kg de materia seca].

Aminoácido	Vaina	Semilla
Ácido aspártico	25.8	31.63
Treonina	5.39	7
Serina	5.2	6.73
Glutamina	33.29	43.93
Prolina	9.37	10.95
Glicina	10.6	13.38
Alanina	8.43	10.97
Valina	10.13	12.22
Metionina	1.74	2.7
Isoleucina	8.36	10.45
Leucina	13.8	17.6
Tirosina	3.1	3.04
Fenilalanina	8.63	11.06
Histidina	5.47	7.24
Lisina	14.34	15.68
Arginina	14.55	19.56

(Ngwa, Nsahlai y Bonsi, 2002)

El perfil de constitución proteica, según su fraccionamiento por solubilidad, se muestra en el Cuadro 4, donde la mayor fracción presente en los granos de *Leucaena leucocephala* son las globulinas, lo cual es un comportamiento

característico de las proteínas de leguminosas tales como la soya y el frijol (Boye et al., 2010; Stone et al., 2015).

Cuadro 4 Distribución de la proteína total, proteína total soluble de las fracciones de proteína de granos de semilla *Leucaena leucocephala*.

Fracción proteica	g/100 g de grano de semilla	Porcentaje de proteína total	Porcentaje de proteína total soluble
Albúminas	14.3	28.4	29.3
Globulinas	21.9	43.5	44.9
Glutelinas	12.6	25	25.8
Residuo insoluble	1.57	3.11	

(Sethi y Kulkarni, 1993)

2.2.6 Otros compuestos

2.2.6.1 Galactomanano

El galactomanano es el segundo polisacárido de almacenamiento más importante presente en el reino vegetal, se relaciona principalmente con la estructura de la pared celular del endospermo de las semillas, particularmente leguminosas. Es un heteropolisacárido compuesto por una cadena principal de β - (1-4) -D-manano y una sola α - (1-6) D- galactosa (Figura 4) (Mittal, Mattu y Kaur, 2016).

Estudios previos muestran que la concentración de galactomanano presente en la semilla de *Leucaena leucocephala* es entre un 20-25% del peso de la semilla, y está presente principalmente en el endospermo (Nwokocha y Williams, 2012); algunos estudios señalan un contenido de 320 g/Kg de materia seca (D'Mello y Acamovic, 1989). Debido al contenido de carbohidratos en la semilla de *Leucaena leucocephala*, se ha valorado la obtención de galactomanano de esta. Este se caracteriza por una constitución de 57% de manosa y un 43% de galactosa. Se ha encontrado que es soluble en agua con una viscosidad intrínseca de 3.5 dL/g, dando una viscosidad en concentraciones del 3% a 25°C y a 65°C de 0.98 y 0.35 Pa*s, respectivamente (Nwokocha y Williams, 2012). Por lo que es capaz de incrementar

la viscosidad de líquidos, generar mejores dispersiones coloidales al estar hidratado; por lo que se ha empleado como espesante y estabilizador (Mirhosseini y Amid, 2012; Prajapati et al., 2013).

2.2.6.2 Compuestos antinutricionales

Los compuestos anti nutricionales son metabolitos secundarios que las plantas suelen producir como métodos de defensa para sobrevivir en medios adversos, pero en el ser humano afectan el metabolismo o inhiben la absorción de nutrientes (Mohan, Tresina y Daffodil, 2016). Entre los principales compuestos antinutricionales de *Leucaena leucocephala* se encuentran la mimosina (3.3-14.5%), taninos (1.3-4.4%) y saponinas (0.2-1.1%) (D'Mello y Acamovic, 1989).

2.2.6.2.1 Mimosina y 3-hidroxi-4(1H)-piridona

Se sabe que las hojas y semillas de *Leucaena leucocephala* contienen cantidades significativas de mimosina (ácido β -[N-(3-hidroxi-4-piridona)]-R-amino propiónico), un aminoácido no proteico que forma complejos con minerales y pirodoxalfosfatos, disminuyendo así la actividad de algunas enzimas (Martens et al., 2012). Dicho compuesto se relaciona con la pérdida de cabello en humanos (Bell, 2003; Sotolu y Faturoti, 2008). Sin embargo, se ha visto que con el uso del punto isoeléctrico como técnica de aislamiento de proteína de *Leucaena leucocephala* la mayor cantidad de mimosina se queda en el sobrenadante (89.74%) y una menor proporción en el precipitado proteico (2.63 % en las albuminas, 2.38% en las globulinas y 4.06% en las glutelinas) (Sethi y Kulkarni, 1993).

Por su parte la 3-hidroxi-4(1H)-piridona se obtiene de la degradación de mimosina, por acción enzimática. Esta molécula es un goitrogeno (sustancia que puede inhibir la función de la tiroides), únicamente degradable por rumiantes. Y su toxicidad en humanos se ha relacionado con el consumo periódico de brotes, vainas o semillas verdes sin cocinar (Bell, 2003).

2.2.6.2.2 Taninos

Los taninos se relacionan con efectos sobre el proceso de crecimiento, ya que disminuyen la absorción de proteínas y carbohidratos. En general, en las

leguminosas se encuentra un contenido entre 0.6-21 g/kg de materia seca, entre dichos valores se encuentran el frijol, garbanzo, judía y soya, por lo que el contenido de taninos en *Leucaena leucocephala* es semejante. Se sabe que el contenido de taninos se puede eliminar al emplear métodos como la decoloración, el remojo o tratamientos térmicos (Mohan et al., 2016)

3 JUSTIFICACIÓN

Las diversas aplicaciones tecnológicas que tienen las proteínas en los alimentos, así como el actual incremento del interés por obtener nuevas fuentes proteicas que permitan satisfacer las necesidades de la población, mediante sistemas sostenibles y funcionales hace necesario la búsqueda de fuentes de proteínas vegetales. El guaje es un árbol nativo que se distribuye ampliamente a lo largo del país por sus bajos requerimientos para su desarrollo, buena adaptabilidad y competitividad por nutrientes; sin embargo, son nulos los estudios sobre las propiedades nutraceuticas y tecnológicas de la semilla, y su empleo se limita a zonas regionales en platillos tradicionales.

El presente trabajo pretende aportar a la caracterización fisicoquímica del aislado proteico de guaje obtenidos por liofilización.

4 OBJETIVOS

4.1 General

Caracterizar fisicoquímicamente y estudiar la funcionalidad de la fracción proteica liofilizada de semillas de *Leucaena leucocephala* (Lam. de Wit).

4.2 Particulares

- Obtener y caracterizar fisicoquímicamente el aislado proteico de guaje por liofilización.
- Evaluar las propiedades funcionales del aislado proteico.

5 METODOLOGÍA

5.1 Obtención del aislado protéico

Las semillas de *Leucaena leucocephala* se obtuvieron de localidades de Oaxaca y Puebla, las cuales se remojaron por 24 horas, para la posterior remoción de la testa. Los cotiledones se secaron a 35°C durante 24 horas, seguido de una molienda (KRUPS GX4100). El polvo se tamizó en una malla No. 20 y se almacenó a 4° C hasta su posterior empleo.

La harina de *Leucaena leucocephala* (HLL) se desgrasó empleado hexano (J.T. Baker) mediante soxleth (1:10 p/v). Posteriormente el residuo fue secado, por una corriente de aire, en una campana extractora por 18 h. La harina desgrasada se almacenó a 4°C (Stone et al., 2015).

El aislado proteico (APP) desgrasado de *Leucaena leucocephala* (APGO y APGP) se obtuvo mediante una extracción por precipitación alcalina, empleando el método de Oseguera-Toledo et al. (2011), donde 50 gramos de la harina desgrasada se dispersaron en agua (1:15 w/v), ajustando con una solución 0.2 M de NaOH el pH a 8.5, manteniendo una agitación constante con una barra magnética durante 1 hora a temperatura de 25°C. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a 9000 g por 15 minutos a 4°; el precipitado se colectó y se repitió la extracción, ambos sobrenadantes se combinaron. Posteriormente el pH del sobrenadante se ajustó a 4.5 (HCl, 0.1 N) y se centrifugó a 10000 g por 20 min; el sedimento se colectó y liofilizó.

5.2 Fraccionamiento de proteína soluble

La HLL y APP se fraccionó aplicando dos lavados con distintos solventes (agua, cloruro de sodio al 5%, etanol al 70% e hidróxido de sodio 0.05 M) según la metodología de Ju, Hettiarachchy y Rath (2001). Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 9000 g por 15 minutos a 4°. Se ajustó el pH a 4.5 y se sometió a centrifugación a 10000 g por 20 min; el sedimento se colectó y se liofilizó. Se determinaron los rendimientos y el contenido proteico se obtuvo por la técnica de Bradford.

5.3 Análisis proximales

5.3.1 Humedad

La humedad se determinó a 2 g de muestra, colocándola a secado en un horno a vacío a 105°C hasta que en pesadas consecutivas (cada 2 h) el peso tuvo menos de 0.3% de variación. El contenido de humedad se expresó en términos de porcentaje de base húmeda ($100 \times \text{kg agua/kg materia húmeda}$) según el método 930.15 de la AOAC (AOAC, 2002).

5.3.2 Cuantificación de aceite total

Se siguió la metodología de 950.54 (AOAC, 2002). La cantidad de aceite total, se determinó por el método Soxhlet. 2 g de muestra de harina junto con 50 ml de éter de petróleo se colocaron en matraces a peso constante, y se efectuó la extracción por 4 h. Después, se evaporó el solvente del vaso, dejando únicamente la fracción lipídica en él. Este se colocó a peso constante, para ser pesado posteriormente. La cantidad de aceite total se calculó por la diferencia de pesos del vaso, antes y después de la extracción.

5.3.3 Cenizas

Se determinó siguiente el protocolo 936.07 de la AOAC (AOAC, 2002), para lo cual se pesó 1 g. de cada aislado en crisoles a peso constante y se eliminó materia orgánica calentando los crisoles a 400°C por 3 horas. Posteriormente las mezclas se pasaron a la mufla por 6 horas a 550°C. La cantidad de cenizas se calculó por la diferencia de pesos de las muestras, antes y después de la incineración.

5.4 Técnicas de caracterización fisicoquímica

5.4.1 Distribución de peso molecular por electroforesis

Se empleó un gel de poli(acrilamida) (BIO-RAD 4-15% Mini-PRO-TEAN® TGX™). Como estándar se empleó un marcador de peso molecular de 10-250 kDa (Precisión Plus Protein™ WesternC™ Standards).

Para SDS-PAGE se emplearon 20 mg del extracto proteico disuelto en 1 ml de hidróxido de sodio al 0.1 M. Posteriormente se mezclaron en proporción 1:1 con solución buffer (agua destilada, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 25%(v/v) de glicerol, 2% SDS, 0.01% azul de bromofenol en condiciones no reductoras y 5% de mercaptoetanol para condiciones reductoras), las muestras se calentaron a 95°C por 5 minutos. Posteriormente se colocaron 10 µL en cada pocillo del gel. Para la electroforesis se preparó una solución de corrida (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1% SDS). Los geles se colocaron junto con la solución en una cámara de electroforesis y se ejecutó la técnica a 100 V y 25°C durante 2 horas. Lo anterior según las especificaciones de uso del fabricante.

Para visualizar las bandas se realizó la tinción de los geles utilizando una solución con tinte azul brillante de coomassie (10% de ácido acético, 45% de agua ultra pura, 2g/L de coomassie, 45% de metanol), durante 4 horas. Se prosiguió con una decoloración de los geles con una solución (40% metanol, 10% de ácido acético, 50% de agua destilada), el proceso se llevó a cabo durante 6 horas, con cambios de la solución cada 2 horas. Posteriormente los geles se observaron en un fotodocumentador y se compararon las bandas con las del marcador de peso molecular.

5.4.2 Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR)

Se registraron los espectros de absorción del aislado proteico junto con sus distintos tratamientos empleando un intervalo de número de onda entre 4000 a 650 cm^{-1} con un espectrofotómetro de infrarrojo (Spectrum 100 FT-IR Spectrometer ATR, Perkin Elmer Precisely, CEACA, UAQ). Para su empleo la muestra se molió finamente y se colocaron 2-5 mg sobre el lector, se realizarán 20 escaneos por muestra, lo anterior siguiendo la metodología recomendada para el equipo. De los datos obtenidos se analizaron las bandas entre 1600-1700 cm^{-1} correspondiente a la banda amina tipo I en el software OriginPro8.

5.4.3 Determinación de propiedades térmicas con calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los aislado proteicos fueron resuspendidos en una solución amortiguadora de fosfato (pH7, 10 mM) a una concentración de 10% de proteína (basado en el

contenido de proteína del asilado proteico). De cada solución se pesaron de 5-8 mg en crisoles de aluminio y se cerraron herméticamente. Las muestras se calentaron de 25-140°C con una rampa de calentamiento de 10°C/min. Como referencia se empleó un crisol vacío. Las curvas de DSC, entalpia de desnaturalización (H), pico de transición o temperatura de desnaturalización (Td) y temperatura de inicio (Tm) se analizaron en el software Universal Analyser 2000 Versión 4.5 A. Los experimentos se realizaron por duplicado (C. Liu et al., 2011). (Liu, Zhao, Zhao, Ren y Yang; 2012)

5.4.4 Hidrofobicidad de superficie (H0)

Se prepararon soluciones proteicas con 4 mg de proteína/mL (pH 2,3 y de 6-12) y de 50 mg de proteína/mL (pH 4 and 5) en soluciones amortiguadoras de fosfatos (10 mM). Las soluciones se mantuvieron en agitación por 15 minutos a 25°C y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se determinó la concentración proteica de supernadante por el método de Bradford y se realizó una dilución seriada de cada solución para obtener concentraciones de 0.00125, 0.0025, 0.005, 0.01 y 0.02% de proteína con los amortiguadores de fosfato de cada pH. Posteriormente, 5 µl de solución de ANS al 8 mM (en solución amortiguadora de fosfatos a 10 mM, pH 7.0) fueron añadidos por cada mililitro de solución proteica, inmediatamente se vortexearon por 10 s y se mantuvieron en oscuridad por 5 minutos. Se midió la fluorescencia con una longitud de onda de excitación y de emisión de 390 y 470 respectivamente en un Varioskan Flash Thermo Scientific™. Se empleo como blanco y control muestras sin ANS y la solución amortiguadora sin ANS. Como índice de hidrofobicidad de superficie (H0) se consideró la pendiente de la intensidad de fluorescencia contra la concentración de la proteína (%) calculada por regresión lineal. Todos los experimentos se realizaron por triplicado (Gong, Shi, Liu, Liu, Hu, Adhikari y Wang, 2015).

5.5 Funcionalidad de proteínas

5.5.1 Solubilidad en agua

La solubilidad se determinó empleando el método de Wu et al. (2009), el APT se mezcló con agua en una proporción de 1/100, el pH se ajustó (2 hasta 12) con

soluciones al 1 N de NaOH y HCl. Las soluciones fueron agitadas a 25°C durante 1 hora; posteriormente se centrifugó a 3000g durante 20 min. Se determinó la concentración de cada sobrenadante mediante el método de Bradford. El porcentaje de solubilidad (PS) se obtuvo mediante la fórmula:

$$PS (\%) = \left(\frac{W1}{W0} \right) \times 100$$

Donde W1 es la cantidad de proteína en el sobrenadante (g) y W0 es la cantidad de proteína agregada a la muestra (g).

5.5.2 Capacidad de ligar el agua/aceite

Se pesaron 0.1 g del APT y colocaron en un tubo previamente pesado, y se mezcló con 1 ml de agua destilada/aceite. Se homogeneizó usando un VORTEX GENIE 2 a la velocidad más alta durante 10 s cada 5 min, repitiendo el proceso 6 veces. La muestra se centrifugó a 1800 g durante 20 minutos a 25°C. Se decantó el sobrenadante y los tubos se dejarán en reposo en un ángulo de 45° por 10 minutos para decantar el excedente; se pesó el tubo con el sedimento. La capacidad de ligar agua/aceite (CLA, CLO) se calculó por la fórmula:

$$CLA = \frac{(w2 - w1)}{w0} \times 100$$

Donde W0 es el peso de la muestra seca, W2 es el peso del tubo más la muestra seca y W2 es el peso más el sedimento. Se realizaron el análisis por triplicado para cada aislado proteico (dos Santos, Martins, Salas-Mellado y Prentice, 2011).

5.5.3 Formación de espumas

Se preparó una solución de proteína al 1% y se ajustó el pH (de 2 a 12). Se transfirieron 6 ml de la solución a tubos y se mezclaron empleando un homogeneizador (ULTRA TURRAX IKA T18 basic) a 13500 rpm por 2 minutos. Se midió el volumen antes (V0) y después (Vfoam) de homogeneizar y la capacidad de formar espuma (CF) en % se determinó mediante la fórmula, según la metodología de Lajnaf et al. (2018) con ligera modificación:

$$CF = \frac{V_{foam}}{V_0} \times 100$$

La estabilidad de espuma (ES) en % se puede definir como el tiempo requerido para drenar la espuma formada, por lo que se considera el volumen remanente a los 30 minutos después de aplicar el homogeneizador (Vft) y se determinó mediante la fórmula descrita por Stone et al. (2015):

$$ES = \frac{V_{ft}}{V_0} \times 100$$

5.5.4 Formación de geles

Se rehidrató el asilado proteico en concentraciones de 6, 8, 9, 10 y 12% (w/v) con agua destilada, se mantuvo en agitación constante y se ajustó el pH a 3 y 7 con soluciones de HCl y NaOH al 1N. Se sometió a calentamiento a 90°C durante 30 minutos; las soluciones se enfriaron inmediatamente en agua helada por 5 minutos, se almacenaron a 4°C y se revisaron a las 12 y 24 horas de su preparación y se indicó la concentración mínima gelante. Lo anterior siguiendo la metodología de Wu, Hua, Chen, Kong y Zhang (2017).

5.5.5 Diseño y análisis estadístico

Todos los experimentos se llevarán a cabo en un diseño completamente al azar. Los datos obtenidos se analizaron aplicando un análisis de varianza (ANDEVA) y prueba de medias de Tukey utilizando el software JMP 5.0.1. Los valores obtenidos se presentan como la media \pm la desviación estándar de tres réplicas. Se realizó un análisis simple de correlación de Pearson de las estructuras secundarias y la solubilidad, así como la solubilidad con la actividad y estabilidad espumante además del índice de actividad emulsificante.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Obtención del aislado proteico y análisis proximales

Durante el proceso de desvainado, pelado y secado se monitoreo el peso de cada una de las fracciones (vainas o fruto, cotiledón y testa o cascara). Estos datos (Cuadro 5) permitieron obtener el rendimiento (kilogramo de vaina de guaje fresco), necesario para calcular la cantidad de material vegetal a emplear.

Cuadro 5 Desglose de rendimiento por kilogramo de guaje en vaina de Oaxaca.

Fracción	Rendimiento (g fracción humedad /kg guaje fresco)	Rendimiento (g fracción seca/ kg de guaje fresco)
Cotiledón	122.45	44.21
Testa	185.02	66.30
Vaina	692.53	221.63

Dichos cálculos resultan en que por cada 2.261 kg de guaje (vainas, cotiledón y testa húmedos) se obtiene 100 g de harina de cotiledón, de la cual se puede obtener 14 ± 1.83 g de aislado proteico. Para poder comparar los valores de rendimiento se considera que de 1 kg de guaje fresco se obtienen 307.47 g de semilla verde (cotiledón más testa); y una vez procesada por secado se llega a un peso de 110.51 g. Los valores comparados con el peso promedio de las vainas de soya (1.71-4.15 g dependiendo del tamaño y número de semillas) y un peso de las semillas en fresco de 0.52 ± 0.09 g, se estima que por cada kilogramo de vaina de soya se pueden obtener 298.85-514 g de semilla fresca que al secarse se obtienen de 137.47-236.44 g (Rao, Bhagsari y Mohamed, 2002; Sirisomboon, 2007). Por lo que los rendimientos de vaina de guaje están cercanos a los que se producen de las vainas de soya frescas.

Por otra parte, aunque no fue motivo de estudio, para considerar el empleo de la semilla de guaje se debe valorar su productividad por unidad de terreno. Para lo

cual según los datos reportados por CONABIO se pueden obtener de 33.33-66.60 ton/ha, comparado con un rendimiento de 154.2-231.33 ton/ha que se obtiene de los plantíos de soya (Vibrans y Rojas-Chávez, 2011; Conley y Smith, n.d.; University of Arkansas System Division of agriculture, n.d.). Sin embargo, para comprender completamente los pros y contras de su empleo también se deben hacer diversas consideraciones ecológicas. Por ejemplo, si es viable el empleo de guaje en zonas de deforestación, así como los requerimientos de agua y estudios de niveles de nutrientes para obtener menores rendimientos por hectárea. Lo ya mencionado puede ser objeto de estudio para futuros proyectos.

En cuanto al contenido de humedad de las distintas fracciones del guaje para ambas localidades se muestran en el Cuadro 6. Hasta el momento los reportes encontrados de humedad de semillas de guaje son para aquellas que se han sometido a un tratamiento desecado al sol o en hornos, por lo que no es posible comparar los valores obtenidos en fresco para la materia prima.

Cuadro 6 Contenido de humedad de las fracciones de guaje.

Material	Humedad (%)
Cáscara húmeda (Oaxaca)	66.18 ± 0.68
Cotiledón húmedo (Oaxaca)	68.95 ± 0.63
Cáscara húmeda (Puebla)	69.06 ± 0.30
Cotiledón húmedo (Puebla)	70.17 ± 0.62
Testa deshidratada	7.06 ± 0.10
Cotiledón deshidratado	6.66 ± 0.13
Vaina deshidratada	7.27 ± 0.05

El contenido de lípidos para la harina se cuantificó como indicador para verificar la necesidad de someter o no a un proceso de desgrasado a las harinas (Cuadro 7). El contenido de dicha fracción en la harina de cotiledón fue semejante a la reportada por Ngwa, Nsahlai y Bonsi (2002) para muestra de distintas regiones de Sudáfrica.

Quienes para el cotiledón junto con la testa indican un contenido de 7.26% de lípidos. Debido al bajo contenido de esta fracción en la harina de la testa, ésta se almacenó directamente a 4 °C sin someter a desgrasado. La harina de cotiledón desgrasada de Puebla mostró un menor contenido de lípidos en comparación con el de Oaxaca. Dichas variaciones pueden estar relacionadas con las propiedades fisicoquímicas de cada aislado, así como las características del suelo, el clima y el grado de madurez de cada semilla, ya que se ha reportado que estos parámetros afectan la composición química de semillas de soya (Field y Nkumbula, 1986; Liu, Jensen y Andersen, 2004; Schon y Blevins, 1990). Sin embargo, para mantener el mismo número de etapas y procesos, y así evitar mayores modificaciones en las proteínas, no se realizó otro proceso de desgrasado en la harina de Oaxaca.

Cuadro 7 Contenido lipídico de fracciones de la semilla de guaje.

Material	Lípidos (%)
Harina cotiledón de Oaxaca	5.52 ± 0.56
Harina de testa de Oaxaca	0.56 ± 0.18
Harina de cotiledón desgrasada de Oaxaca	2.60 ± 0.66
Harina de cotiledón desgrasada de Puebla	0.37 ± 0.22

Los resultados se muestran con la media ± la desviación estándar de tres réplicas.

La caracterización proximal de los aislados se muestra en el Cuadro 8. El contenido de proteína del APGO se encuentran por debajo de lo reportado para otros aislados, mientras que el de APGP es similar al obtenido en aislados proteicos de frijol (77.2-89%) y de chícharo (71.5-94.7) (Wani, Sogi, Shivhare y Gill;2014; Stone, Karalash, Tyler, Warkentin y Nickerson; 2015). Debido a que ambos aislados presentan una concentración mayor al 40% de proteína entran en la denominación de producto de proteína vegetal (VPP por sus siglas en inglés) según el CODEX STAN 174-1989.

Por su parte el contenido de lípidos y cenizas del APGO es la fracción que causa una diferencia importante en la composición de ambos aislados, siendo valores mayores a los reportados para aislados proteicos de frijol (2.53-3.44% de lípidos y 4.32-5% de cenizas) (Wani et al., 2015; Shevkani, Singh, Kaur y Rana, 2015). En el caso de las cenizas el CODEX STAN 174-1989 indica que las VPP no deben contener más de un 10% de cenizas en base seca, por lo que los aislados obtenidos se encuentran dentro de los límites permisibles. Para el contenido de lípidos no se indica ningún límite más que la señalización de que el contenido debe ser compatible con las Buenas Prácticas de Manufactura.

Mientras que los valores de humedad obtenidos son menores a los reportados para estudios de aislados proteico de frijol de 7.3-9.55% y aislado proteico de chícharo de 7.67-9.49 (Wani et al., 2015; Shevkani, Singh, Kaur y Rana, 2015), lo cual puede favorecer la estabilidad de los aislados durante el almacenamiento. En el caso de la humedad el CODEX STAN 174-1989 indica que ésta debe ser lo suficientemente baja para garantizar la estabilidad del producto durante el almacenamiento, y aunque no indica un límite oficial la primera sesión del comité del CODEX para proteínas vegetales de 1980 sugiere una cantidad menor al 10%.

Cuadro 8 Análisis proximales de los aislados proteicos de guaje.

Muestra	Proteína (%)	*Lípidos (%)	*Humedad (%)	*Cenizas (%)
APGO	66.78 ± 0.31 ^a	17.92 ± 3.24 ^a	7.19 ± 0.25 ^a	7.81 ± 0.60 ^a
APGP	90.53 ± 4.55 ^b	0.15 ± 0.05 ^b	5.98 ± 0.20 ^b	4.05 ± 0.09 ^b

^{ab} Diferencia significativa entre APGO y APGP para un nivel de significancia de 0.05 con la prueba de Tukey. Los resultados se muestran con la media ± la desviación estándar de tres réplicas. * Los valores están en base seca.

En el caso de la normativa mexicana, las más cercana a considerar es la NMX-F-096-1970 Calidad para proteínas vegetales hidrolizadas. Donde por los valores obtenidos de composición química, los aislados se pueden considerar como proteína vegetal tipo III (polvo). Además, los valores mínimos de proteína (35%) y máximos de cenizas (38 - 44%) obtenidos están dentro de los límites establecidos.

6.2 Fraccionamiento de proteína soluble

El análisis de proteínas tanto en la harina de Oaxaca (HGO) como de Puebla (HGP) se muestra en el Cuadro 9. Para ambos aislados la fracción mayoritaria son las globulinas seguido de las glutelinas. Por su parte el contenido de albuminas y prolaminas fueron las fracciones con diferencia significativa entre ambas harinas; siendo las contenidas en la HGO las más semejante a lo reportado por Sethi y Kulkarni (1993). Las variaciones entre las harinas de distintas regiones puede deberse a diversos factores entre ellas la época de cultivo de las vainas así como el grado de madurez, ya que se ha reportado variaciones en las fracciones proteicas de soya dependiendo de cada semana en la que se cultive (Staswick, 1989).

Cuadro 9 Distribución de la proteína total soluble de las fracciones proteicas de granos de semilla *Leucaena leucocephala*.

Fracción proteica	Fracciones de HGO (%)	Fracciones de HGP (%)	*Fracciones reportadas (%)
Albúminas	24.89±0.99 ^A	8.32±1.53 ^B	28.4
Globulinas	46.67 ± 3.75 ^A	52.25±5.63 ^A	43.5
Glutelinas	27.47±4.72 ^A	39.17±6.80 ^A	25
Prolaminas	3.61±0.033 ^A	0.25±0.35 ^B	3.11

Diferencia significativa entre muestras para un nivel de significancia de 0.05. Los resultados se muestran con la media ± la desviación estándar de tres réplicas.
*(Sethi y Kulkarni, 1993)

El contenido de globulinas puede ser alto ya que se han reportado como las fracciones mayoritarias de las leguminosas, de las cuales las características son: legumina (18-25%) y vicilina (55-80%) (Aluko et al., 2015; Boye, Zare y Pletch, 2010; Stone et al., 2015). Por otra parte, el contenido de glutelinas es relevante debido a que se han reportado que son ricas en metionina y cistina. Dichos aminoácidos ayudan a compensar los contenidos limitantes en cereales (Boye et al., 2010). Finalmente, el contenido de albuminas es relevante ya que su diferencia significativa entre ambos aislados puede representar una variación en el contenido de lisina del

aislado lo que modificara las interacciones hidrofílicas cuando este residuo presente carga (Bean et al., 2019; Boye et al., 2010).

6.3 Caracterización fisicoquímica

6.3.1 Distribución de peso molecular por electroforesis

Se realizó la corrida de las fracciones proteicas del APGO en condiciones reductoras y no reductoras. Se observaron bandas entre 50-10 KDa (Figura 3), lo cual es semejante a otras investigaciones de leguminosas. Con aislados proteicos de especies de frijol mexicano se encontraron bandas entre 10 y 150 KDa (Mojica y de Mejía, 2015). La presencia de unidades de menor peso molecular se ha relacionado con incrementos en la solubilidad de aislados proteicos (Shewry y Halford, 2002).

De manera partícula, las principales proteínas de almacenamiento para las plantas comprenden a las albuminas y las globulinas. En el caso de las albúminas están ampliamente distribuidas en plantas dicotiledóneas (Shewry, Jenkins, Beaudoin y Mills, 2004), como el guaje. En el presente estudio se encontraron bandas extensas que comprenden de los ~12-20 KDa (Figura 4 A), que coinciden con polipéptidos de albúminas de lenteja (Barbana y Boye, 2011). Además se han identifican bandas de 25-37 KDa las cuales en condiciones reductoras (Figura 4 A-) disminuyen su intensidad pudiendo ser el resultado de protólisis en subunidades más pequeñas (4-5 KDa) (Shewry et al., 2004).

En el caso de las globulinas estas se clasifican principalmente en leguminas 11 S, vicilina 7 S y covicilina. La primera, comúnmente es un hexámero, donde cada subunidad (60 KDa) interacciona entre sí de forma no-covalente. Y cada subunidad está formada por dos subunidades unidas por puentes disulfuro. Estas se conocen como una unidad ácida o grade (legumina α) de 40 KDa y una unidad básica o chica (legumina β) de 20 KDa (Jarpa-Parra et al., 2015). En la Figura 4 B destacan bandas de 20-22, ~38 y ~46 KDa que pueden corresponder a las subunidades 11 S; Aguilar-Vázquez et al. (2018) reportaron bandas de 50, 39-40 y 19-22 KDa correspondientes a legumina, legumina α y legumina β en aislados proteicos de chícharo. Lo que es

similar para proteína de lenteja reportadas por Jarpa-Parra et al. (2015) con peso moleculares de 47, 42, 32, 20 y 18 KDa.

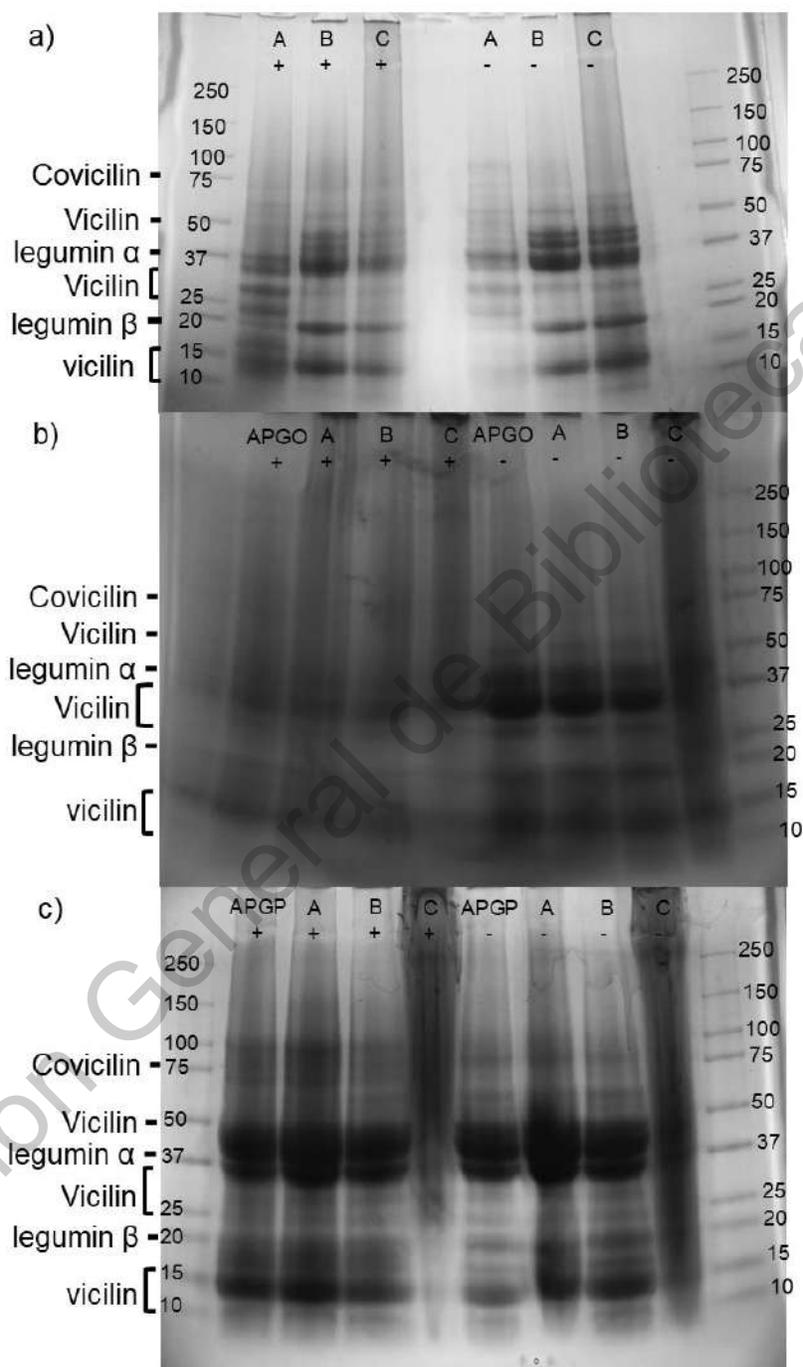


Figura 3 Gel de electroforesis de fracciones proteicas de (a) fracciones de harina de cotiledones de Oaxaca, (b) APGO y (c) APGP en condiciones (+) no reductoras y (-) reductoras de (A) albuminas, (B) globulinas y (C) glutelinas.

En el caso de las globulinas estas se clasifican principalmente en leguminas 11 S, vicilina 7 S y covicilina. La primera, comúnmente es un hexámero, donde cada subunidad (60 KDa) interacciona entre sí de forma no-covalente. Y cada subunidad está formada por dos subunidades unidas por puentes disulfuro. Estas se conocen como una unidad ácida o grade (legumina α) de 40 KDa y una unidad básica o chica (legumina β) de 20 KDa (Jarpa-Parra et al., 2015). En la Figura 4 B destacan bandas de 20-22, ~38 y ~46 KDa que pueden corresponder a las subunidades 11 S; Aguilar-Vázquez et al. (2018) reportaron bandas de 50, 39-40 y 19-22 KDa correspondientes a legumina, legumina α y legumina β en aislados proteicos de chícharo. Lo que es similar para proteína de lenteja reportadas por Jarpa-Parra et al. (2015) con peso moleculares de 47, 42, 32, 20 y 18 KDa.

La vicilina es un trímero de 150-170 KDa, deficiente de cisteína y metionina por lo que no puede formar puentes disulfuro; sus subunidades pueden variar comúnmente de 30-80 KDa (Baracá, Pešić, Stanojević, Kostić y Čabrilo, 2015; Shewry et al., 2004), aunque existen reportes de unidades de 13-19 KDa. Como se observa en la Figura 4 B se encontraron bandas fuertemente remarcadas de 13-15, 19, ~33 y 50, semejantes a las reportadas por Chang et al. (2012) en aislado proteico de chícharo (bandas de 15.5, 18.9, 33.6, 35.0 y 50.7 KDa); así como a la subunidad de vicilina de lenteja (~50 KDa) (Barbana & Boye, 2011).

Finalmente la covicilina, también denominada como subunidad α de vicilina, tiene un peso molecular de al redor de 71 KDa (Baracá et al., 2015). Se observó (Figura 4 B) una ligera banda cercana a los 70 KDa; coincidiendo con lo reportado para covicilina en proteína de chícharo (Aguilar-Vázquez et al., 2018; Chang et al., 2012), así como para covicilina de lenteja con un peso molecular de 65 KDa (Barbana y Boye, 2011).

Tanto la vicilina como la legumina se han reportado como las principales estructuras formadoras de geles; y dependiendo de la proporción de ellas se verá afectada la elasticidad, firmeza y fuerza de corte del gel (Day, 2013). Lo anterior debido a que la legumina mantiene unidas sus subunidades por medio de enlaces disulfuro, lo

cual pueden permitir la formación de la estructura tridimensional del gel (Jarpa-Parra et al., 2015).

6.3.2 Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros de FT-IR mostraron modificaciones en las interacciones de los grupos funcionales de la cadena polipeptídica (Figura 4). Se distinguieron las bandas características de amida I (a 1635 cm^{-1} , vibración de estiramiento C=O de la unidad acetilada -CONH₂), amida II (a 1533 cm^{-1} , combinación de flexión N-H y estiramiento C-N) y amida III (a 1232 cm^{-1} , vibración armónica de flexión N-H y estiramiento C-N), amida A (3277 cm^{-1}), amida B (2925 y 2852 cm^{-1}). Las bandas entre 3200 - 3500 cm^{-1} se relacionan con estiramientos de -OH, lo cual indica interacciones de puentes de hidrógeno (Lan, Xu, Ohm, Chen y Rao, 2019). La disminución en absorbancia de dichas bandas a pH 4 y 5 indica que en la región del pI los aislados disminuyen su capacidad de interactuar con las moléculas de agua; por ende se intensifica la interacción proteína- proteína lo cual causa la precipitación en dichas condiciones de pH.

En el caso de las bandas de amida I, II y III, se incrementó su absorbancia conforme las condiciones experimentales se alejaron del pI. Se presentaron casos particulares, donde la absorbancia disminuyó para el APGO a pH 9 y para APGP a pH 7 y 9. Lo anterior puede estar relacionado con algunas interacciones electroestáticas que se propicien en dichas condiciones con otros compuestos presentes (Lan et al., 2019). Además, al modificarse las interacciones en tales condiciones es posible que se modifiquen los balances de interacciones hidrofílicas, hidrofóbicas y proteína-proteína lo cual puede afectar las propiedades de emulsificación, formación de espuma y capacidad de gelificación en estas condiciones de pH.

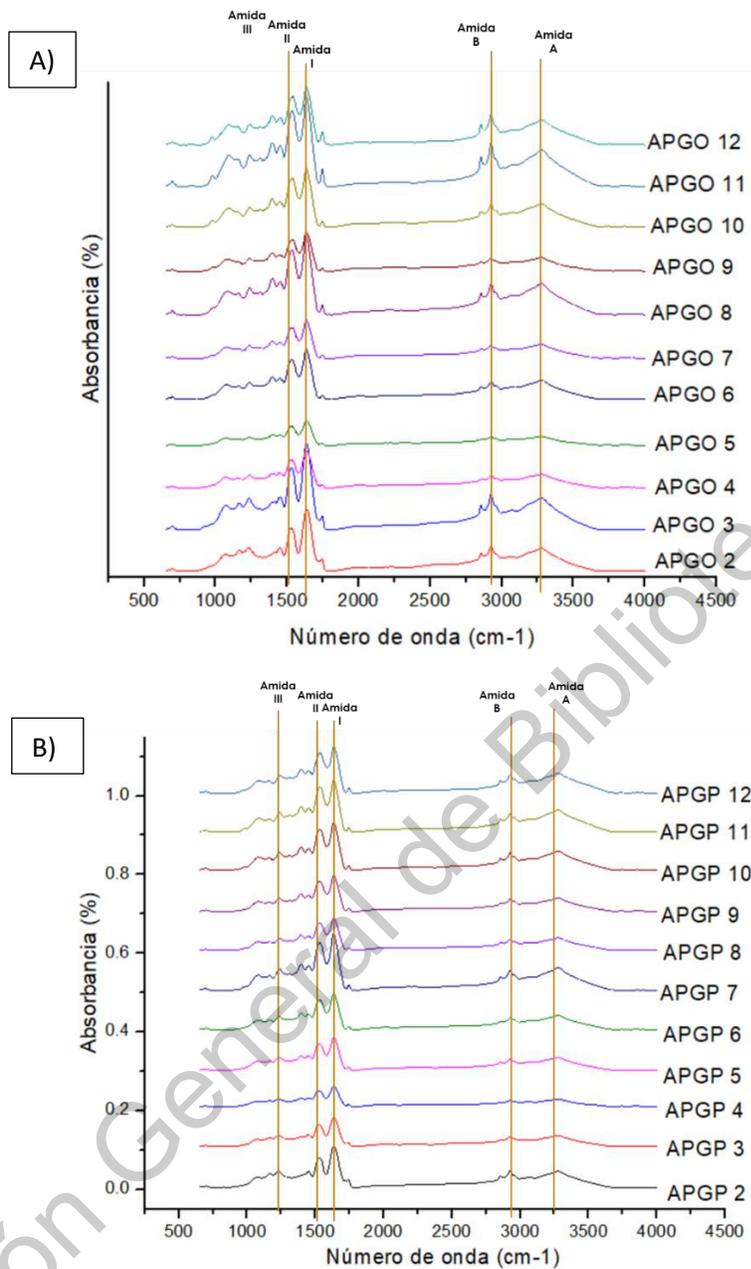


Figura 4 Espectros de IR para (A) APGO y (B) APGP a pH 2-12.

Del análisis del proceso de deconvolución de espectros de ambos aislados para la banda amida I (entre 1600 y 1700 cm^{-1}) a cada pH, se obtuvieron los modelos de ajuste. En la Figura 5 se ejemplifican los obtenidos para algunas condiciones.

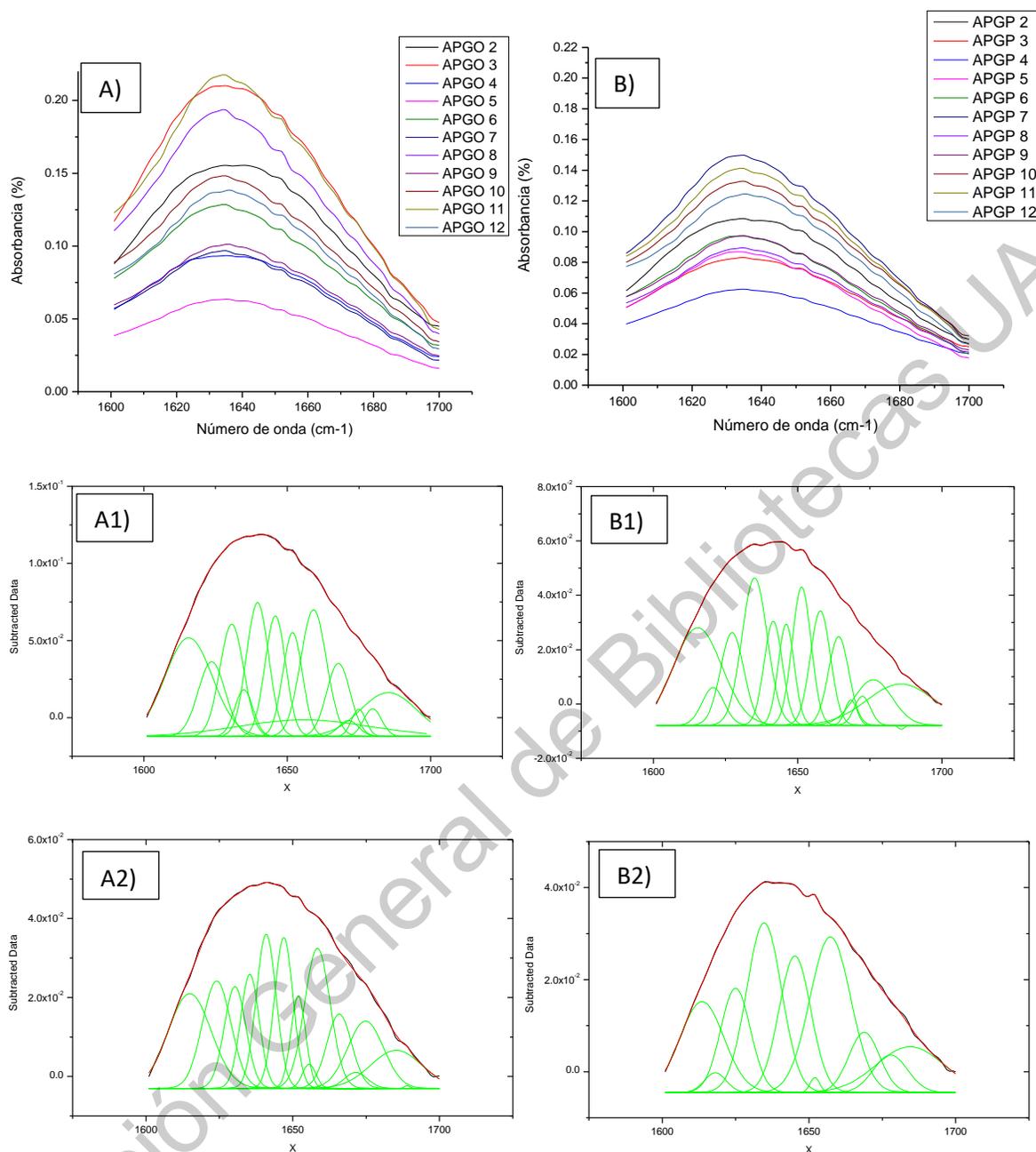


Figura 5 Conjunto de bandas de amida I para (A) APGO y (B) APGP a las distintas condiciones de pH. Y bandas ajustadas al modelo de gauss a condiciones de pH(1) 2 y (2) 3.

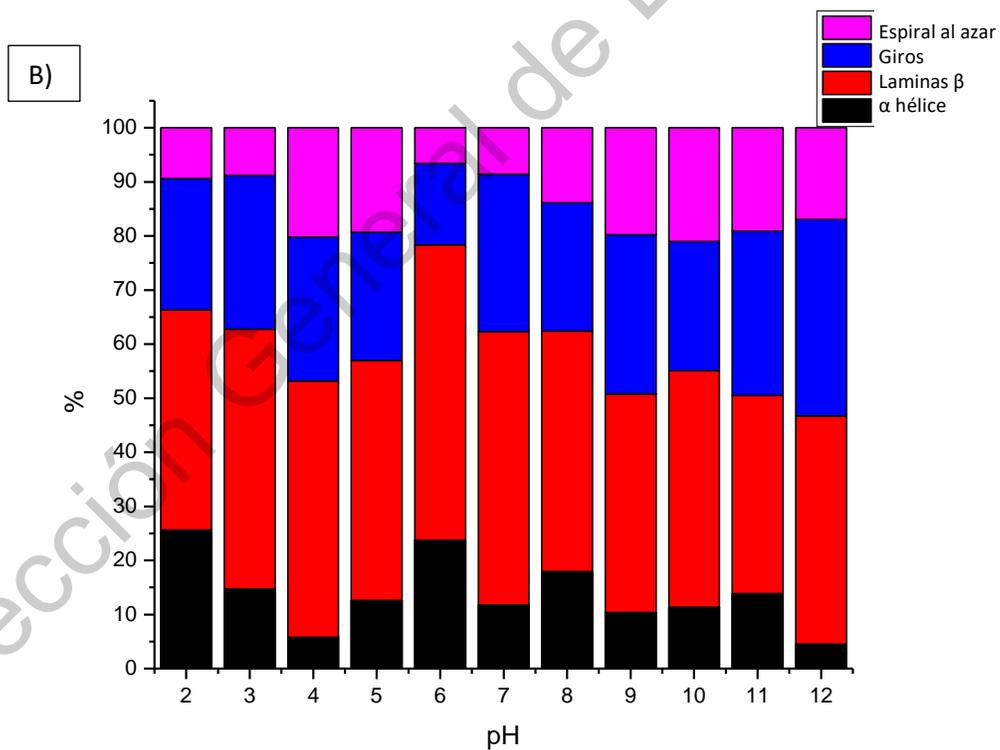
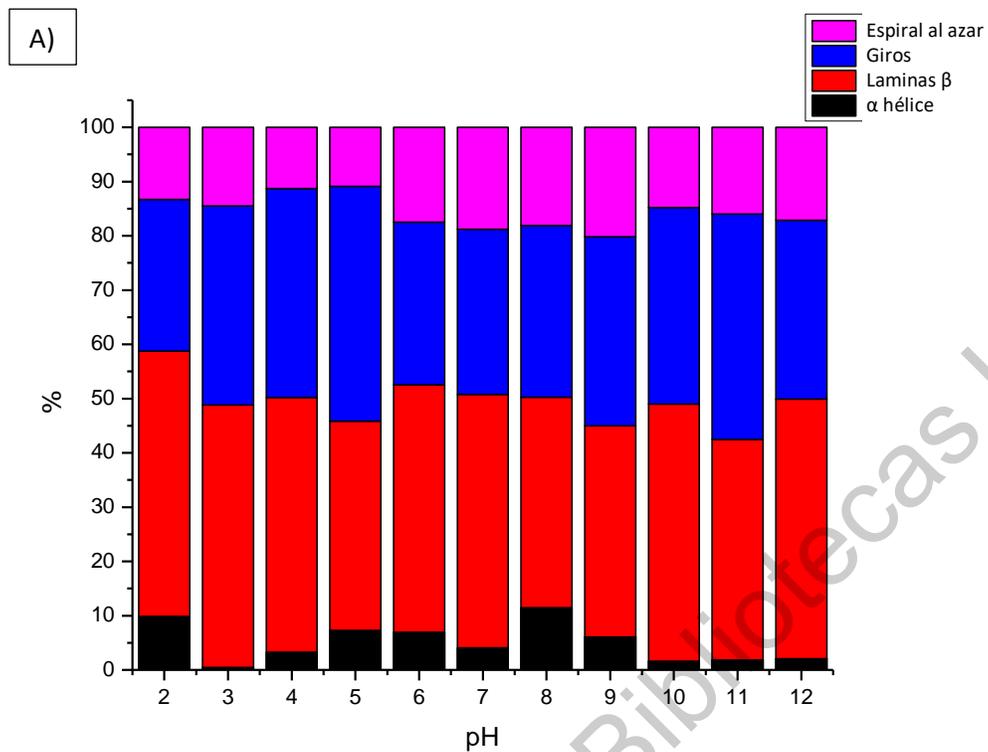


Figura 6 Distribución de estructuras secundarias en (A) APGO y (B) APGP en distintas condiciones de pH.

Del análisis de los picos de amina I (Figura 6), se encontró que el APGO presenta una mayor proporción de estructuras α -hélice en comparación al APGP, sin embargo, este último mostró una mayor tendencia a la presencia de giros en todas las condiciones de pH. En ambos casos el contenido de láminas β es importante, teniendo valores entre 36-54% y 38-49% para APGO y APGP. Por otra parte, se observó un efecto del pH sobre el contenido de α -hélice, giros β y estructuras desordenadas en ambos aislados.

Se ha reportado que la proporción de cada estructura tiene un efecto en las propiedades funcionales de los aislados proteicos. Lan et al. (2019) mencionan que a una mayor proporción de láminas β y una menor presencia de α hélice disminuye la solubilidad del aislado proteico de chícharo. Elsayy et al. (2016) indicaron que la proporción de láminas β afecta la fuerza y estabilidad de los geles. Y en este sentido, Wang y Damodaran (1991) mencionan que las láminas β son esenciales para la formación y estabilidad de la red de los geles debido a que funcionan como punto de unión ya que propician las interacciones proteína-proteína.

Por otra parte, una de las principales consideraciones que se debe tomar para el empleo de proteínas vegetales es su contenido de láminas β ; ya que desde el punto de vista nutricional una mayor presencia de estas se ha relacionado con una menor susceptibilidad a la digestión gastrointestinal. En el caso de legumbres y cereales se ha reportado contenidos de 22–44% contra un 7–11% de la proteínas de origen animal (Carbonaro, Maselli y Nucara, 2015).

6.3.3 Determinación de propiedades térmicas con calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los termogramas del APGO y el APGP se muestran en la Figura 7. En ambos aislados se presentan picos con una Td de 124.46 y 126.27 °C para el APGP y 121.81 y 126.64 °C para el APGO. Estudios previos de aislados proteicos reportan la presencia de dos picos, en donde el de menor Td se relaciona con la desnaturalización de vicilina y el de mayor Td con el de la legumina (Ladjal-Ettoumi, Boudries, Chibane y Romero, 2016; Mokni et al., 2015). La mayor resistencia

térmica de la legumina se relaciona con su estructura hexamérica compacta y mayor contenido de enlaces disulfuro que el trímero de la vicilina (Ladjal-Ettoumi et al., 2016).

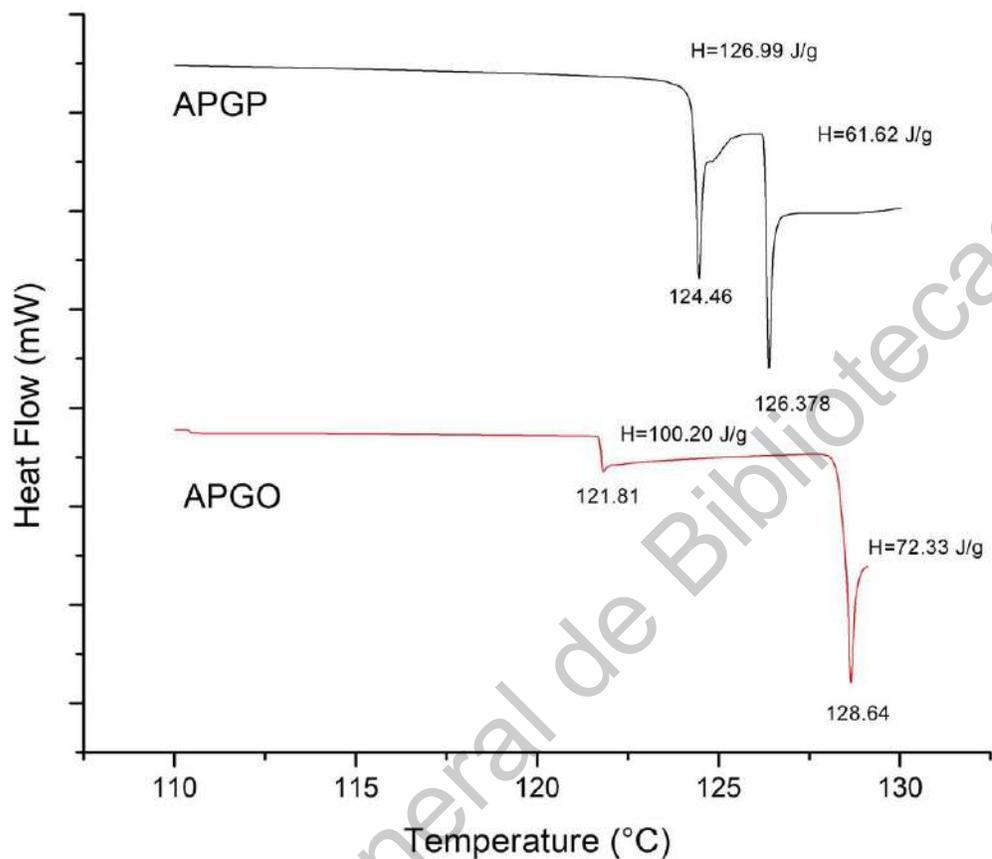


Figura 7 Termogramas de DSC del APGP y APGO.

Las Td reportadas para aislado proteico de soja (89.97 y 108.79 °C; 79.9 y 95.5 °C) y chícharo (83.3 y 104.6 °C; 127 y 215 °C) muestran valores diferentes a los del APGP y APGO. Lo anterior puede estar relacionado con la ejecución de la técnica (concentración de proteína en solución), ya que se ha reportado que el contenido de humedad afecta el valor de Td, incrementándose conforme se disminuye la humedad (Ladjal-ettoumi et al., 2016; Mokni et al., 2015; Ortiz y Añón, 2001; Tang, Choi y Ma, 2007). A su vez valores altos de Td se han relacionados con una mayor estabilidad misma que presentan las estructuras proteicas con un alto contenido de láminas β (Carbonaro et al., 2015), lo cual es una de las principales características de aislados proteicos de leguminosas. Algunas fracciones de leguminosas, como

legumina 11 S de la soya, vicilina 7 y 8 S de lenteja, comparte como principal característica su alta estabilidad térmica y han sido clasificadas como alérgenos de origen vegetal (Pauli, 2011).

Por su parte el valor de H se relaciona con el orden estructural de las fracciones proteicas, así como de la concentración presente en los aislados (Papalamprou, Doxastakis, Biliaderis y Kiosseoglou, 2009), por lo que los valores de H para APGP indican un mayor contenido de vicilina que el APGO así como una mayor cantidad de legumina en este último.

6.3.4 Hidrofobicidad de superficie (H₀)

En la figura 8 se muestran los perfiles de hidrofobicidad de superficie para APGP y APGO, en donde a pH 2 y 3 en ambos aislados se encontraron los mayores valores de H₀, lo cual indica un cambio conformacional de las proteínas. Esto puede estar relacionado con una desnaturalización de las fracciones de vicilina y legumina a pH 2, lo cual ha sido reportado por Sorgentini y Wagner (2002) para aislado proteico de soya.

A su vez, se debe considerar la composición de aminoácidos, ya que de los mayoritarios, únicamente los residuos de ácido aspártico en condiciones pueden presentar carga; lo cual puede estar favoreciendo la preponderancia de interacciones hidrofóbicas a pH 2 y 3 (Ngwa et al., 2002).

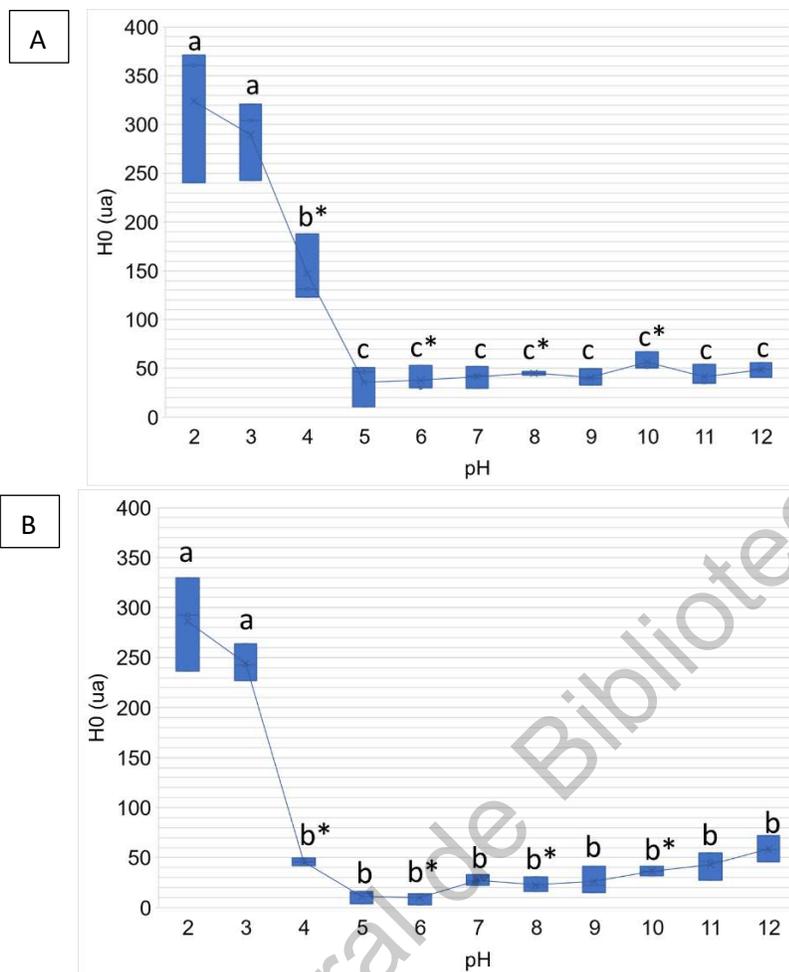


Figura 8 Perfil de H0 para (A) APGP y (B) APGO a pH de 2-12. ^{abc} Diferencia significativa en distintas condiciones de pH. * Diferencia significativa entre APGO y APGP a la misma condición de pH; para un nivel de significancia de 0.05 con la prueba de Tukey. Los resultados son la media \pm la desviación estándar de tres réplicas.

6.4 Funcionalidad de proteínas

6.4.1 Solubilidad en agua

Los perfiles de solubilidad a distintos pH del APGO y APGP se muestran en la Figura 9. Los porcentajes de solubilidad a pH 2,3 y de 6-12 para el APGO y APGP se encontraron entre 73.71-99.56% y 61.48-96.18% respectivamente.

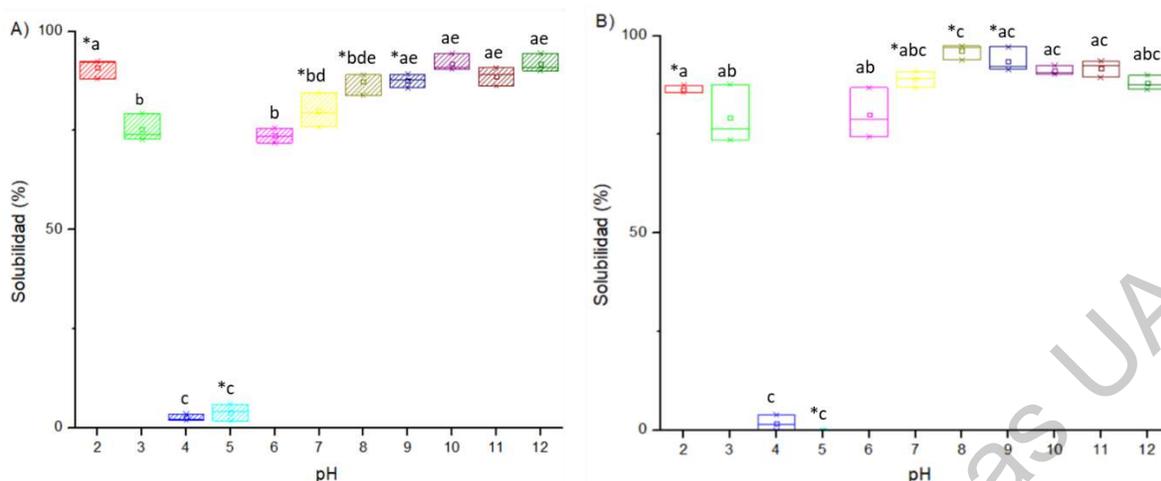


Figura 9 Perfil de solubilidad del APGO A) y APGP B) a pH de 2-12. ^{abcdde} Diferencia significativa en distintas condiciones de pH y *diferencia significativa entre APGO y APGP a la misma condición de pH; para un nivel de significancia de 0.05. Los resultados son la media \pm la desviación estándar de tres réplicas.

Los valores de solubilidad a las condiciones de pH experimentales pueden estar relacionadas con la presencia de aminoácidos polares y de cargas positivas o negativas según las condiciones del medio, tales como glutamina, ácido aspártico, arginina, lisina, histidina, treonina y serina. Los cuales se han reportado de presencia mayoritaria en semillas de *Leucaena leucocephala* (Ngwa et al., 2002).

Los resultados obtenidos fueron mayores a los reportados para aislados proteicos de soya comercial a pH 3,5,7 y 9 (25-45%) (Boostani, Aminlari, Moosavi-nasab, Niakosari y Mesbahi, 2017), así como para aislados de chícharo, haba y soya a pH 7 (38-40%) (Arntfield y Maskus, 2011). Aunque la solubilidad de APGP y APGO fue semejante a los reportados para aislados proteicos de distintos cultivares de frijol (73.22-93.26%) (Wani, Sogi, Shivhare, & Gill, 2014), y aislados proteicos de chícharo obtenidos por extracción alcalina-punto isoeléctrico (62.7%-64.4%) (Stone et al., 2015).

Lo anterior muestra que el aislado proteico liofilizado tiene un buen parámetro de solubilidad a pH 2,3, y de 6 a 12. Dicha característica es de importancia ya que se

relaciona con la facilidad de migración de las proteínas a las interfaces, lo que tiene un efecto directo en la capacidad emulsificante o espumante (Feyzi et al., 2018; Liceaga y Hall, 2018; Shewry y Halford, 2002).

Para correlacionar el efecto que tiene las modificaciones de la estructura secundaria sobre la solubilidad de los aislados se realizó un análisis de correlación (Cuadro 10). En él se encontró que la solubilidad tiende a incrementar conforme se disminuye el porcentaje de las láminas β ($r = -0.68$), así como por el incremento de los giros β ($r = 0.46$) y las espirales al azar ($r = 0.67$). Lo anterior concuerda con lo reportado por Lan et al. (2019), donde la proteína de chícharo tiende a una menor solubilidad debido a su mayor contenido de láminas β .

Cuadro 10 Análisis de correlación entre los porcentajes de estructura secundaria y solubilidad y el efecto de la solubilidad sobre las otras propiedades funcionales.

Variable independiente	Variable dependiente	A	b	r	r ²	Valor-P
*% de hélice α	Solubilidad	93.14	0.45	-0.43	18.23	0.08
*% laminas β	Solubilidad	124.62	0.86	-0.68	46.77	0.00
*% giros β	Solubilidad	71.85	0.55	0.46	21.42	0.05
*% espiral al azar	Solubilidad	74.35	0.87	0.67	44.68	0.00
Solubilidad	Actividad espumante	56.76	0.32	0.44	19.40	0.04
Solubilidad	Estabilidad de la espuman	29.63	0.53	0.59	34.80	0.00

(a) ordenada al origen; (b) pendiente, (r) factor de correlación

* Análisis con valores de cada variable fuera del punto isoeléctrico.

Resultados para un nivel de significancia de 0.05

6.4.2 Capacidad de ligar el agua/aceite

La capacidad de ligar agua y aceite se determinaron únicamente a una condición de pH (7), debido a la naturaleza de la metodología. Para la capacidad de ligar agua se obtuvieron valores entre 0.69 ± 0.25 g/g de proteína y 1.15 ± 0.13 g/g de proteína, para el APGP y APGO respectivamente. Dichos valores fueron menores a los reportados para aislado proteico de guaje tratado por ultrafiltración (3.03 - 3.28 g/g de proteína) (Rosida, Hapsari y Hidayah, 2016); así como para el aislado de frijol (5.83 ± 0.16 g/g de proteína); pero mayores al reportado para proteína de soya

(0.22 ± 0.01 g de proteína) y dentro del rango de obtenido con aislados proteicos de chícharo (0.3-3.6 g/g de proteína) (Boostani et al., 2017; Stone et al., 2015; Yousuf, Gul, Wani y Singh, 2016). Sin embargo que los resultados obtenidos para el APGO y el APGP estén en el intermedio de los obtenidos para otros aislados puede deberse a su alta solubilidad que propicia su pérdida en el sobrenadante; este fenómeno también se ha observado en proteína de suero y de huevo comercial altamente solubles (Stone et al., 2015).

La capacidad de ligar agua es de importancia ya que afecta característica en los alimentos como la jugosidad, frescura y humedad (Sathe, 2002), lo que delimita su aplicación en productos alimenticios como cárnicos o masas para hornear (Wani et al., 2015).

Por su parte, la capacidad de ligar aceite se encontró entre 3.57 ± 0.09 y 3.18 ± 0.18 g/g de proteína para el APGP y APGO respectivamente. Estos resultados fueron menores a los reportados para proteína de distintos cultivares de frijol (5.34-6.92 g/g de proteína), mayores a los reportados para aislado proteico de soya (1.8 g/g de proteína), proteína de suero y huevo comercial (2.0 ± 0.0 y 1.4 ± 0.1 de proteína respectivamente); y semejantes a los obtenidos con aislado proteico de chícharo (3.5-5.4 g/g de proteína) (Stone et al., 2015; Wani et al., 2014).

Determinar este atributo permite considerar la aplicación del aislado proteico en la formulación de productos fritos, ya que de ello depende la estabilidad del alimento durante su almacenamiento (Moure et al., 2006). Además, esta propiedad influye la sensación de textura en la boca al masticar y participa en la retención de compuestos relacionados con el sabor (Wani et al., 2015).

6.4.3 Actividad y estabilidad espumante

Los perfiles de actividad espumante para ambos aislados proteicos se presentan en la Figura 10. Los valores obtenidos fueron entre 30-78% y 71-117% para APGO y APGP al tiempo cero, mientras que a los 30 minutos los valores se encontraron entre 9-66% y 47-111% para APGO y APGP respectivamente. Los mayores valores para el APGP pueden estar relacionado con el menor contenido de compuestos no proteicos en dicho aislado, lo cual puede favorecer a la movilidad y disponibilidad

de las proteínas a la interface aire/agua. A su vez, por su la fracción proteica, el APGO puede estar interactuando con lípidos, lo cual afecta la capacidad de los grupos funcionales de las cadenas hidrofóbicas para interactuar y estabilizar la interfaz agua / aire. Aunado a ello, se ha reportado que la legumina presenta una menor solubilidad y menor capacidad espumante (Cui et al., 2020), por lo que al contener el APGO una mayor proporción de esta fracción que el APGP causa su menor actividad espumante.

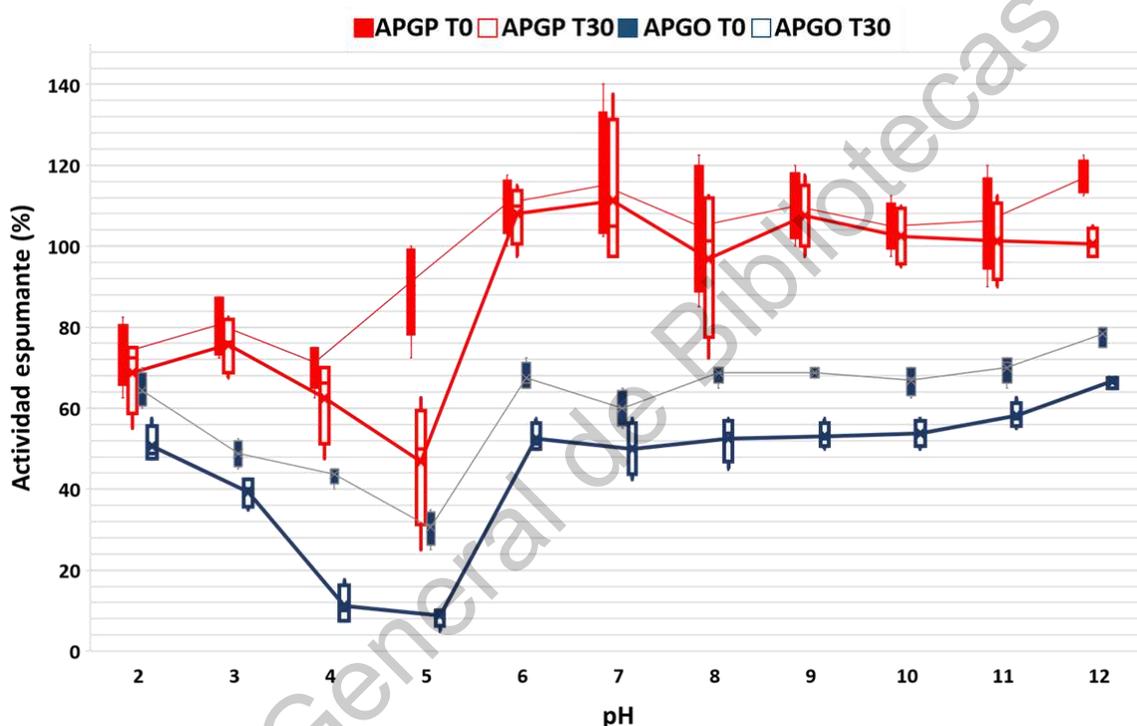


Figura 10 Actividad espumante de APGO y APGO en rango de pH de 2-12 a tiempo 0 y 30 minutos. Los resultados son la media \pm la desviación estándar de tres replicas.

Los resultado de ambos aislados fueron mayores a los reportados para aislado proteico de *Leucaena leucocephala* tratado por ultrafiltración (7.20-9.0%) (Rosida et al., 2016). Comparado con la capacidad de formar espuma de aislados proteicos de distintos cultivares de frijol (46-174%) y proteína de huevo (115.6 \pm 16.8%) fueron similares, aunque en el primer estudio se utilizó el doble de concentración proteica

que la del presente trabajo (Stone et al., 2015; Wani et al., 2014). Por otra parte, los resultados son menores a los obtenidos con aislados proteicos de chícharo con distintos cultivares y métodos de extracción (161.6-263.3%) y de suero de leche (276.7 ± 5.8) (Stone et al., 2015).

Se encontró una correlación entre la solubilidad y la actividad/estabilidad espumante (Cuadro 10). Diversos estudios han reportado un comportamiento similar; como en aislados proteicos de soya a distintos pH (Sorgentini y Wagner, 2002), aislado proteico de cacahuate (Jamdar et al., 2010) y aislados proteicos de chícharo (Tontul, Kasimoglu, Asik, Atbakan y Topuz, 2018).

La capacidad de formar espuma del APGO y el APGP puede estar relacionado con la presencia de aminoácidos hidrofóbicos que producen zonas de baja repulsión electrostática, tales como leucina, glicina, valina, alanina, prolina e isoleucina, así como grupos cargados que promueven las interacciones proteína-proteína (Klost y Drusch, 2018; McCarthy et al., 2013; Moure et al., 2006; Ngwa et al., 2002).

6.4.4 Concentración mínima de gelación

Las formulaciones empleadas para determinar la concentración mínima requerida para formar geles se muestran en el Cuadro 11. La gelación se llevó acabo en los distintos tratamientos, pero se ve una tendencia favorable a pH 7. Esto puede estar relacionado con la mayor presencia de láminas β a pH 7 que a pH 3 para el APGP APGO (48.01 y 50.53% respectivamente), lo que favorece la interacción proteína-proteína para formar la estructura del gel (Elsawy et al., 2016; Wang y Damodaran, 1991). Aunado a una mayor presencia de legumina en el APGO que favorece la formación del geles inducidos por calentamiento; esto debido a su capacidad de formar puentes disulfuro al desnaturalizarse (Day, 2013; Jarpa-Parra et al., 2015; Wu et al., 2017).

Se observó que la concentración tiene un efecto directo en el tiempo necesario para que se lleve a cabo la gelación de la fórmula. A su vez, los valores mínimos obtenidos se encuentran dentro de rango reportado para otros aislados proteicos de

leguminosas (5-20%) (Sathe et al., 1983; Zheng et al., 1991; Despande et al., 1982), lo cual demuestra una buena capacidad gelante para el APGO.

Cuadro 11 Efecto de la concentración de proteína en la formación de geles de APGO y APGP a distintas concentraciones

Muestras	pH	Concentración			
		6%	8%	10%	12%
APGO	3	-	+ ²⁴	+ ¹²	+*
	7	+*	+*	+*	+*
APGP	3	-	-	-	+ ²⁴
	7	-	+ ¹²	+*	+*

Resultado de la observación de dos réplicas.

* Gelación a los 5 minutos de haber iniciado el tratamiento térmico

¹² Gelación a las 12 h después del tratamiento térmico

²⁴ Gelación a las 24 h después del tratamiento térmico

7 CONCLUSIONES

- ❖ Las globulinas son las fracciones proteicas solubles predominantes en ambos aislados. Mientras que las albúminas son las de mayor variación entre ellos, lo cual puede afectar sus propiedades funcionales.
- ❖ La legumina y vicilina son las principales fracciones presentes de las globulinas en ambos aislados, siendo la primera la de mayor contenido en el APGO y la segunda en el APGP.
- ❖ La estructura secundaria de cada aislado se ve modificada en distintas condiciones de pH. Siendo las láminas β predominantes para ambos aislados en todas las condiciones de pH.
- ❖ La concentración láminas β y espiral al azar influyen en la solubilidad de los aislados, incrementando si la primera disminuye y la según aumenta.
- ❖ La solubilidad de ambos aislados afecta la capacidad y estabilidad espumante, siendo el APGP quien tiene mayor capacidad y estabilidad. Debido a estas propiedades se recomienda su empleo para la formulación de bebidas o batidos.

- ❖ La mayor presencia de láminas β así como el incremento de solubilidad del APGO a pH 7, facilita su capacidad de formar un gel con una menor concentración de proteína.
- ❖ Al tener una alta capacidad de ligar aceite los aislados pueden ser aplicados para materia de pared de compuestos de naturaleza lipídica; como los relacionados con el sabor en los alimentos.
- ❖ Tanto por su capacidad gelificante como de ligar lípidos ambos aislados pueden emplearse para la formulación de productos cárnicos como bases de carne o salchichas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Vázquez, G., Loarca-Piña, G., Figueroa-Cárdenas, J. D., & Mendoza, S. (2018). Electrospun fibers from blends of pea (*Pisum sativum*) protein and pullulan. *Food Hydrocolloids*, 83, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.051>
- Allen, E. B., Allen, M. F., Egerton-warburton, L., Corkidi, L., & Allen, E. (2009). Mexico Published by: Ecological Society of America IMPACTS OF EARLY- AND LATE-SERIAL MYCORRHIZAE DURING RESTORATION IN SEASONAL TROPICAL FOREST, MEXICO. *America*, 13(6), 1701–1717.
- Aluko, R. E., Girgih, A. T., He, R., Malomo, S., Li, H., Offengenden, M., & Wu, J. (2015). Structural and functional characterization of yellow field pea seed (*Pisum sativum* L.) protein-derived antihypertensive peptides. *Food Research International*, 77, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.029>
- Amani, M., Moosavi-Movahedi, A. A., & Kurganov, B. I. (2017). What can we get from varying scan rate in protein differential scanning calorimetry? *International Journal of Biological Macromolecules*, 99, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.010>
- Arntfield, S. D., & Maskus, H. D. (2011). Peas and other legume proteins. *Handbook of Food Proteins*, 233–266. <https://doi.org/10.1016/B978-1-84569-758-7.50009-5>
- Barać, M. B., Pešić, M. B., Stanojević, S. P., Kostić, A. Z., & Čabrilo, S. B. (2015). Techno-functional properties of pea (*Pisum sativum*) protein isolates-a review. *Acta Periodica Technologica*, 46, 1–18. <https://doi.org/10.2298/APT1546001B>
- Barbana, C., & Boye, J. I. (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. *Food Chemistry*, 127(1), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.093>

- Bean, S. R., Zhu, L., Smith, B. M., Wilson, J. D., Iroeger, B. P., & Tilley, M. (2018). Starch and Protein Chemistry and Functional Properties. In *Sorghum and Millets*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811527-5.00006-x>
- Bell, E. A. (2003). Nonprotein amino acids of plants: Significance in medicine, nutrition, and agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(10), 2854–2865. <https://doi.org/10.1021/jf020880w>
- Boostani, S., Aminlari, M., Moosavi-nasab, M., Niakosari, M., & Mesbahi, G. (2017). Fabrication and characterisation of soy protein isolate-grafted dextran biopolymer: A novel ingredient in spray-dried soy beverage formulation. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.019>
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, *43*(2), 414–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>
- Buxbaum, E. (2003). *Cationic electrophoresis and electrotransfer of membrane glycoproteins*. *314*, 70–76. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00639-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00639-5)
- Carbonaro, M., Maselli, P., & Nucara, A. (2015). Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Research International*, Vol. 76, pp. 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.007>
- Chang, Y. W., Alli, I., Molina, A. T., Konishi, Y., & Boye, J. I. (2012). Isolation and Characterization of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Seed Protein Fractions. *Food and Bioprocess Technology*, *5*(2), 618–625. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0303-y>
- Cui, L., Bandillo, N., Wang, Y., Ohm, J. B., Chen, B., & Rao, J. (2020). Functionality and structure of yellow pea protein isolate as affected by cultivars and extraction pH. *Food Hydrocolloids*, *108*(December 2019), 106008. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106008>
- D'Mello, J. P. F., & Acamovic, T. (1989). *Leucaena leucocephala* in poultry nutrition - A review. *Animal Feed Science and Technology*, *26*(1–2), 1–28. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(89\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0377-8401(89)90003-5)
- Day, L. (2013). Proteins from land plants e Potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology*, *32*(1), 25–42. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.05.005>
- Donahue, C. J., & Rais, E. A. (2009). Proximate Analysis of Coal. *Journal of Chemical Education*, *86*(2), 222. <https://doi.org/10.1021/ed086p222>
- dos Santos, S. D. A., Martins, V. G., Salas-Mellado, M., & Prentice, C. (2011). Evaluation of Functional Properties in Protein Hydrolysates from Bluewing Searobin (*Prionotus punctatus*) Obtained with Different Microbial Enzymes. *Food and Bioprocess Technology*, *4*(8), 1399–1406. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0301-0>

- Drzeżdżon, J., Jacewicz, D., Sielicka, A., & Chmurzyński, L. (2019). Characterization of polymers based on differential scanning calorimetry based techniques. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 110, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.037>
- Dutta, A. (2017). Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46140-5.00004-2>
- Elsawy, M., Smith, A. M., Hodson, N., Squires, A. M., Miller, A. F., & Saiani, A. (2016). Modification of β -sheet forming peptide hydrophobic face: effect on self-assembly and gelation. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03841>
- FAO. (2007). WHO Technical Report Series Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition. *WHO Int*, 935, 9–47. [https://doi.org/ISBN 92 4 120935 6](https://doi.org/ISBN%2092%204%20120935%206)
- FAO. (2018). *The future of food and agriculture– Alternative pathways to 2050. Summary version.* (Food and A). Roma.
- FAO, FIDA, UNICEF, PMA, & OMS. (2018). *El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo. Fomentando la resiliencia climática en aras de la seguridad alimentaria y la nutrición.* (FAO; FAO, Ed.). Roma: FAO.
- Feyzi, S., Milani, E., & Golimovahhed, Q. A. (2018). Grass Pea (*Lathyrus sativus* L.) Protein Isolate: The Effect of Extraction Optimization and Drying Methods on the Structure and Functional Properties. *Food Hydrocolloids*, 74, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.07.031>
- Field, R. J., & Nkumbula, S. (1986). Green beans (*Phaseolus vulgaris* cv . Gallatin 50): Effects of plant population density on yield and quality. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, 14 (4)(December 2014), 435–442. <https://doi.org/10.1080/03015521.1986.10423062>
- Gaidhani, K. A., Harwalkar, M., Bhambere, D., & Nirgude, P. S. (2015). LYOPHILIZATION / FREEZE DRYING – A REVIEW. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(8), 516–543.
- Gong, K., Shi, A., Liu, H., Liu, L., Hu, H., Adhikari, B., & Wang, Q. (2015). Emulsifying properties and structure changes of spray and freeze-dried peanut protein isolate. *Journal of Food Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.09.011>
- Goula, A. M., & Adamopoulos, K. G. (2012). A method for pomegranate seed application in food industries: Seed oil encapsulation. *Food and Bioprocess Processing*, 90(4), 639–652. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.06.001>
- Gumus, C. E., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2017). Impact of legume protein type and location on lipid oxidation in fish oil-in-water emulsions: Lentil, pea, and faba bean proteins. *Food Research International*, 100(August), 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.029>
- Heike Vibrans, & Sonia Rojas Chávez. (2011). *Leucaena leucocephala* - ficha

informativa. Retrieved June 12, 2020, from Malezas de México, CONABIO website: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/mimosaceae/leucaena-leucocephala/fichas/ficha.htm>

- Hou, F., Ding, W., Qu, W., Olayemi, A., Xiong, F., & Zhang, W. (2017). Alkali solution extraction of rice residue protein isolates : Influence of alkali concentration on protein functional , structural properties and lysinoalanine formation. *Food Chemistry*, 218, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.064>
- Hughes, C. E., Donovan Bailey, C., & Harris, S. A. (2002). Divergent and reticulate species relationships in *Leucaena* (Fabaceae) inferred from multiple data sources: Insights into polyploid origins and nrDNA polymorphism. *American Journal of Botany*, 89(7), 1057–1073. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.7.1057>
- Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121(1), 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.027>
- Jarpa-Parra, M., Bamdad, F., Tian, Z., Zeng, H., Temelli, F., & Chen, L. (2015). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Impact of pH on molecular structure and surface properties of lentil legumin-like protein and its application as foam stabilizer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 132, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.065>
- Ju, Z. Y., Hettiarachchy, N. S., & Rath, N. (2001). Extraction, denaturation and hydrophobic properties of rice flour proteins. *Journal of Food Science*, 66(2), 229–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb11322.x>
- Kanwate, B. W., Ballari, R. V., y Kudre, T. G. (2019). Influence of spray-drying, freeze-drying and vacuum-drying on physicochemical and functional properties of gelatin from *Labeo rohita* swim bladder. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.015>
- Kasper, J. C., Hedtrich, S., Friess, W., & Christina, J. (2019). Chapter 14 Lyophilization of Synthetic Gene Carriers. In *Nanotechnology for Nucleic Acid Delivery* (Vol. 1943, pp. 133–147). New York, NY.: Humana Press.
- Klost, M., & Drusch, S. (2018). Functionalisation of pea protein by tryptic hydrolysis – characterisation of interfacial and functional properties. *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.013>
- Ladjal-ettoumi, Y., Boudries, H., Chibane, M., & Romero, A. (2016). *Pea , Chickpea and Lentil Protein Isolates : Physicochemical Characterization and Emulsifying Properties*. 43–51. <https://doi.org/10.1007/s11483-015-9411-6>
- Lajnaf, R., Picart-Palmade, L., Cases, E., Attia, H., Marchesseau, S., & Ayadi, M. A. (2018). The foaming properties of camel and bovine whey: The impact of pH and heat treatment. *Food Chemistry*, 240, 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.064>

- Lan, Y., Xu, M., Ohm, J., Chen, B., & Rao, J. (2019). Solid dispersion-based spray-drying improves solubility and mitigates beany flavour of pea protein isolate. *Food Chemistry*, 278, 665–673. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.074>
- Liceaga, A. M., & Hall, F. (2018). Nutritional, Functional and Bioactive Protein Hydrolysates. In *Encyclopedia of Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.21776-9>
- Liu, C., Teng, Z., Lu, Q. Y., Zhao, R. Y., Yang, X. Q., Tang, C. H., & Liao, J. M. (2011). Aggregation kinetics and ζ -potential of soy protein during fractionation. *Food Research International*, 44(5), 1392–1400. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.054>
- Liu, F., Jensen, C. R., & Andersen, M. N. (2004). Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development: its implication in altering pod set. 86, 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(03\)00165-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(03)00165-5)
- Martens, S. D., Tiemann, T. T., Bindelle, J., Peters, M., & Lascano, C. E. (2012). Alternative plant protein sources for pigs and chickens in the tropics – nutritional value and constraints: a review. 113(2), 101–123.
- McCarthy, A., O’Callaghan, Y., & O’Brien, N. (2013). Protein Hydrolysates from Agricultural Crops—Bioactivity and Potential for Functional Food Development. *Agriculture*, 3(1), 112–130. <https://doi.org/10.3390/agriculture3010112>
- Mirhosseini, H., & Amid, B. T. (2012). A review study on chemical composition and molecular structure of newly plant gum exudates and seed gums. *Food Research International*, 46(1), 387–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.017>
- Mittal, N., Mattu, P., & Kaur, G. (2016). Extraction and derivatization of *Leucaena leucocephala* (Lam.) galactomannan: Optimization and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 831–841. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.046>
- Mohamed, M. A., Jaafar, J., Ismail, A. F., Othman, M. H. D., & Rahman, M. A. (2017). Spectroscopy. In *Membrane Characterization*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00001-2>
- Mohan, V. R., Tresina, P. S., & Daffodil, E. D. (2015). Antinutritional Factors in Legume Seeds: Characteristics and Determination. In *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed.). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00036-2>
- Mojica, L., & de Mejía, E. G. (2015). Characterization and Comparison of Protein and Peptide Profiles and their Biological Activities of Improved Common Bean Cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mexico and Brazil. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(2), 105–112. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0477-6>
- Mokni, A., Maklouf, I., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., & Besbes, S. (2015). Effect

of drying methods on physico-chemical and functional properties of chickpea protein concentrates. *JOURNAL OF FOOD ENGINEERING*, 165, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.06.021>

Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, 39(9), 945–963. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.07.002>

Murray, E. D., Arntfield, S. D., & Ismond, M. A. H. (1985). The influence of processing parameters on food protein functionality II. Factors affecting thermal properties as analyzed by differential scanning calorimetry. In *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* (pp. 158–162). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0315-5463\(85\)71774-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0315-5463(85)71774-9)

Nazir, A., Asghar, A., & Aslam Maan, A. (2016). Food Gels: Gelling Process and New Applications. *Advances in Food Rheology and Its Applications*, 8398, 335–353. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100431-9.00013-9>

Ngwa, A. T., Nsahlai, I. V., & Bonsi, M. L. K. (2002). The rumen digestion of dry matter, nitrogen and cell wall constituents of the pods of *Leucaena leucocephala* and some *Acacia* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(1), 98–106. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1008>

Nwokocha, L. M., & Williams, P. A. (2012). Rheological characterization of the galactomannan from *Leucaena leucocephala* seed. *Carbohydrate Polymers*, 90(2), 833–838. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.008>

Oliete, B., Yassine, S. A., Cases, E., & Saurel, R. (2019). Drying method determines the structure and the solubility of microfluidized pea globulin aggregates. *Food Research International*, 119(February), 444–454. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.015>

Ortiz, S. E. M., & Añón, M. C. (2001). *ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SOY PROTEIN ISOLATES DSC study*. 66, 489–499.

Oseguera-Toledo, M. E., De Mejia, E. G., Dia, V. P., & Amaya-Llano, S. L. (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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.121>

Papalamprou, E. M., Doxastakis, G. I., Biliaderis, C. G., & Kiosseoglou, V. (2009). *Food Hydrocolloids Influence of preparation methods on physicochemical and gelation properties of chickpea protein isolates*. 23, 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.03.006>

Pauli, G. (2011). Allergènes végétaux alimentaires identifiés (en dehors de l'arachide). *Revue Francaise d'Allergologie*, 51(1), 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2010.06.009>

Prajapati, V. D., Jani, G. K., Moradiya, N. G., Randeria, N. P., Nagar, B. J., Naikwadi, N. N., & Variya, B. C. (2013). Galactomannan : A versatile biodegradable seed

- polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.017>
- Qin, F., Johansen, A. Z., & Mussatto, S. I. (2018). Evaluation of different pretreatment strategies for protein extraction from brewer's spent grains. *Industrial Crops and Products*, 125(September), 443–453. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.017>
- Rao, D., & Gouricharan, T. (2016). Proximate analysis of coal. *Coal Processing and Utilization*, 19(1), 45–56. <https://doi.org/10.1201/b21459-9>
- Rao, M. S. S., Bhagsari, A. S., & Mohamed, A. I. (2002). *Fresh Green Seed Yield and Seed Nutritional Traits of Vegetable Soybean Genotypes*. 1950–1958.
- Rasoulpour, R., Afsharifar, A., Izadpanah, K., & Aminlari, M. (2017). Purification and characterization of an antiviral protein from prickly pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller) cladode. *Crop Protection*, 93, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.005>
- Reinkensmeier, A., Bußler, S., Schlüter, O., Rohn, S., & Rawel, H. M. (2015). Characterization of individual proteins in pea protein isolates and air classified samples. *Food Research International*, 76(P1), 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.009>
- Rodriguez-canto, W., Chel-guerrero, L., Fernandez, V. V. A., & Aguilar-vega, M. (2019). Delonix regia galactomannan hydrolysates: Rheological behavior and physicochemical characterization. *Carbohydrate Polymers*, 206, 573–582. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.028>
- Rosida, D. F., Hapsari, N., & Hidayah, T. (2016). Functional Properties of Leucaena Leucocephala Protein Concentrates Resulted Separation of Ultrafiltration Membrane. *MATEC Web of Conferences*, 58, 01012. <https://doi.org/10.1051/mateconf/20165801012>
- Sathe, S. K. (2002). Dry bean protein functionality. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(2), 175–223. <https://doi.org/10.1080/07388550290789487>
- Schon, M. K., & Blevins, D. G. (1990). *Foliar Boron Applications Increase the Final Number of Branches and Pods on Branches of Field-Grown Soybeans*. 602–607.
- Sethi, P., & Kulkarni, P. R. (1993). Fractionation of Leucaena seed-kernel proteins based on their solubility characteristics. *Food Chemistry*, 48(2), 173–177. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(93\)90053-I](https://doi.org/10.1016/0308-8146(93)90053-I)
- Shang, N., Chaplot, S., & Wu, J. (2017). Food proteins for health and nutrition. In *Proteins in Food Processing: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00013-9>
- Shawn P. Conley, & Damon Smith. (n.d.). The Soybean Seeding Rate Conundrum - Cool Bean. Retrieved June 12, 2020, from <https://coolbean.info/2019/04/19/the-soybean-seeding-rate-conundrum/>

- Shelton, H. M., & Brewbaker, J. L. (1994). *Leucaena leucocephala* -the Most Widely Used Forage Tree Legume. *Forage Tree Legumes in Tropical Agriculture*, 15–29.
- Shewry, P. R., & Halford, N. G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 53(370), 947–958. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11912237>
- Shewry, P. R., Jenkins, J. A., Beaudoin, F., & Mills, E. N. C. (2004). 2 *The Classification , Functions and Evolutionary Relationships of Plant Proteins in Relation to Food Allergies*.
- Sirisomboon, P. (2007). *Physical properties of green soybean : Criteria for sorting*. 79, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.01.022>
- Sorgentini, D. A., & Wagner, J. R. (2002). Comparative study of foaming properties of whey and isolate soybean proteins. *Food Research International*, 35(8), 721–729. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00067-4)
- Sotolu, A. O., & Faturoti, E. O. (2008). Digestibility and Nutritional Values of Differently Processed *Leucaena leucocephala* (Lam . de Wit) Seed Meals in the Diet of African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Water*, 3(4), 190–199.
- Staswick, P. E. (1989). *Preferential Loss of an Abundant Storage Protein from Soybean Pods during Seed Development*1. 1252–1255.
- Stone, A. K., Karalash, A., Tyler, R. T., Warkentin, T. D., & Nickerson, M. T. (2015). Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Research International*, 76(P1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.017>
- Tang, C., Choi, S., & Ma, C. (2007). *Study of thermal properties and heat-induced denaturation and aggregation of soy proteins by modulated differential scanning calorimetry*. 40, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.06.013>
- Tontul, İ., Kasimoglu, Z., Asik, S., Atbakan, T., & Topuz, A. (2018). Functional properties of chickpea protein isolates dried by refractance window drying. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1253–1259. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.135>
- University of Arkansas Sytem, & Dision of agriculture. (n.d.). Arkansas Soybean Production Handbook - MP197. Retrieved June 12, 2020, from <https://www.uaex.edu/publications/mp-197.aspx>
- Ustunol, Z. (2014). Overview of Food Proteins. In *Applied Food Protein Chemistry* (Vol. 9781119944). <https://doi.org/10.1002/9781118860588.ch2>
- Wang, C., & Damodaran, S. (1991). *Journal o f Chemistry*. 39(3).
- Wani, I. A., Sogi, D. S., Shivhare, U. S., & Gill, B. S. (2014). Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L .) protein isolates. *FRIN*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.027>

- Wu, C., Hua, Y., Chen, Y., Kong, X., & Zhang, C. (2017). Effect of temperature, ionic strength and 11S ratio on the rheological properties of heat-induced soy protein gels in relation to network proteins content and aggregates size. *Food Hydrocolloids*, 66, 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.12.007>
- Wu, H., Wang, Q., Ma, T., & Ren, J. (2009). Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein. *Food Research International*, 42(3), 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.006>
- Yadav, S. C., Kumari, A., & Yadav, R. (2011). Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation. *Peptides*, 32(1), 173–187. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.10.003>
- Yousuf, B., Gul, K., Wani, A. A., & Singh, P. (2016). Health Benefits of Anthocyanins and Their Encapsulation for Potential Use in Food Systems: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13), 2223–2230. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.805316>
- Zhang, Z., Wang, Y., Dai, C., He, R., & Ma, H. (2018). Alkali extraction of rice residue protein isolates: Effects of alkali treatment conditions on lysinoalanine formation and structural characterization of lysinoalanine-containing protein. *Food Chemistry*, 261(April), 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.027>