

Bebida funcional de valor nutricional / nutracéutico alto elaborada a partir de una mezcla de granos integrales (maíz + garbanzo) extrudidos

Optimización de procesos

Jesús J. Rochín-Medina, Jorge Milán-Carrillo, Roberto Gutiérrez-Dorado, Edith O. Cuevas-Rodríguez, Saraid Mora-Rochín, Ángel Valdez-Ortiz, Francisco Delgado-Vargas, Cuauhtémoc Reyes-Moreno

Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB)

Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS)

Culiacán, Sin., México

[rochintec, jmilanc, edith.oliva, saraidmora]@gmail.com, robe399@hotmail.com, angelvaldezortiz@yahoo.com.mx, [fdelgado, creyes]@uas.uasnet.mx

Abstract— The objective of this investigation was to determine the best combination of extrusion processes variables for producing extruded whole maize and chickpea flours to prepare a high antioxidant activity mixture (proportion=60%:40%, respectively) suitable to produce a functional beverage. To the development of this investigation, response surface methodology was applied to obtain maximum values for antioxidant activity of the mixture and acceptability of the beverage. The optimized mixture had a high antioxidant activity and improvement in calculated-protein efficiency ratio. A 200 mL portion of a beverage prepared with the optimized mixture contributed with 40-66% of the recommended daily intake of antioxidants and could be used as an alternative to beverages with low nutritional/nutraceutical value.

Keywords- Antioxidant activity, extruded maize/chickpea flours, optimized mixture, functional beverage

Resumen— El objetivo de esta investigación fue determinar la mejor combinación de variables de los procesos de extrusión para producir harinas de maíz y garbanzo integrales extrudidos para preparar una mezcla (proporción 60%:40%, respectivamente) con actividad antioxidante alta adecuada para producir una bebida funcional. Para el desarrollo de esta investigación, se aplicó metodología de superficie de respuesta para obtener valores máximos de actividad antioxidante de la mezcla y aceptabilidad de la bebida. La mezcla óptima presentó una actividad antioxidante alta y una mejora en la relación de eficiencia proteínica calculada. Una Porción de 200 mL de la bebida preparada con la mezcla óptima contribuyó con 40-66% de las recomendaciones diarias de la ingesta de antioxidantes y puede utilizarse como alternativa a bebidas con valor nutricional/nutracéutico bajo.

Palabras claves- Actividad antioxidante, harinas de maíz/garbanzo extrudidos, mezcla óptima, bebida funcional

I. INTRODUCCIÓN

El consumo de granos integrales se ha asociado con la prevención de enfermedades cardiovasculares (ECV), diabetes tipo 2, y algunos tipos de cáncer, por lo que las guías alimentarias para los americanos del departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés), destacan la necesidad del consumo de cereales y leguminosas integrales [1].

El maíz (*Zea mays* L.) es el cereal más importante con una producción global que supera los 819 millones de toneladas (Mt) [2]. Este cereal proporciona alrededor del 50% de las proteínas y calorías en la dieta de los países en desarrollo. El grano de maíz contiene, en peso seco, 69.6-74.5 % carbohidratos, 7.7-13.6% proteínas, 3.2-7.7% lípidos, algunas vitaminas (complejo B) y ácidos grasos insaturados (Oleico, Linoleico). Las proteínas del maíz son deficientes en los aminoácidos esenciales Lisina y Triptófano. Diversos fitoquímicos, como compuestos fenólicos, han sido reportados en varios genotipos de maíz [3]. El maíz tiene una actividad antioxidante más alta que trigo, avena y arroz [4]. Las propiedades antioxidantes de maíz se han asociado con efectos anticancerígenos [5].

El garbanzo (*Cicer arietinum* L) es una de las leguminosas de mayor importancia en el mundo, con una producción mundial de 10,4 Mt [2]. Los granos de garbanzo contienen, en base seca, 61.1-67.4%, carbohidratos, 21.7-24.5% proteínas, vitaminas (Tiamina, Niacina) y ácidos grasos insaturados (Oleico, Linolénico). Las proteínas de garbanzo son deficientes en aminoácidos azufrados (Met+Cys). Los granos de garbanzo integrales contienen una amplia gama de compuestos fenólicos (flavonoles, glucósidos de flavona, proantocianidinas oligoméricas y poliméricas) que son considerados compuestos bioactivos debido a su capacidad antioxidante [6].

Cuando se mezclan, las proteínas de maíz y garbanzo se complementan entre sí para producir una proteína de mejor calidad [7]. Varios estudios han demostrado que la mezcla de cereales y leguminosas mejora significativamente la relación de eficiencia proteica (PER, por sus siglas en inglés). Paredes-López y col [8] reportaron el valor PER más alto para una mezcla 60:40 de maíz: frijol común; el valor PER aumentó de 1.0 en el maíz y de 1.4 en el frijol común a 2.4 en la mezcla.

La extrusión es una tecnología de temperatura alta/tiempo corto que no genera efluentes contaminantes y ofrece numerosas ventajas como versatilidad, productividad alta, costos de operación bajos, eficiencia energética, calidad alta de los productos resultantes y una mejora en la digestibilidad y valor biológico de las proteínas [9]. Este proceso ha encontrado numerosas aplicaciones, incluyendo un creciente número de cereales listos para comer, botanas saladas y dulces, productos expandidos, trozos de pan para sopas y ensaladas, materiales con textura similares a la carne a partir de harinas desgrasadas con contenido de proteínas alto, mezclas de alimentos nutritivos precocidos para la alimentación infantil, bebidas y productos de confitería [7,10,11].

En México, harinas instantáneas de maíz nixtamalizado, así como harinas de maíz crudo, tostado, germinado y fermentado se utilizan para la elaboración de las bebidas que se consumen tradicionalmente como atole, pinole, tesgüino y pozol [8]. Harinas de garbanzo precocidas también se han producido utilizando la tecnología de extrusión [7,12], garbanzos fragmentados se han acondicionado con disoluciones de sales de cationes monovalentes antes del proceso de extrusión con el fin de disminuir el tiempo de cocción.

Las bebidas nutracéuticas representan uno de los mercados de más rápido crecimiento anual en el mundo, alcanzando una tasa de crecimiento anual compuesta del 13.6% entre 2002 y 2007 [13]. El principal criterio para la aceptación de este tipo de bebidas es el sabor y su aceptabilidad. La formulación de bebidas de calidad alta, sensorialmente aceptables, es importante para que un nivel adecuado de consumo pueda favorecer la promoción de la salud y prevención de enfermedades.

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es una colección de técnicas utilizadas en estudios empíricos para determinar la relación entre una variable de respuesta y varias variables de proceso. Es un método de estadístico matemático efectivo para implementar modelos de evaluación de la importancia relativa de las variables y la determinación de las condiciones óptimas de las respuestas deseables [14]. La mayoría de las aplicaciones de la MSR en procesos y la mejora del producto implican más de una variables de respuesta. Para optimizar varias respuestas se ha sugerido el uso de los métodos de optimización, incluyendo método convencional gráfico, método gráfico mejorado, procedimiento de superficie de respuesta extendida y función de deseabilidad [15]. La función de deseabilidad (FD) es una técnica analítica para la optimización de las respuestas múltiples variables simultáneamente. Fue desarrollado por Harrington [16] y posteriormente modificado y ampliado por Derringer y Suich [17]. La FD, simple y fácil de aplicar, permite un juicio subjetivo sobre la importancia de las variables de respuesta [18]. La utilidad de MSR para la optimización extrusión-cocción ya ha sido reportado [19-21].

El objetivo de esta investigación fue determinar la mejor combinación de las variables de los procesos de extrusión para la producción de harinas de maíz (HME) y garbanzo integrales extrudidos

(HGE) para preparar una mezcla con actividad antioxidante alta apta para para producir una bebida funcional sensorialmente aceptable.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. *Reactivos*

El reactivo 2,2'-azobis (2-amidinopropano) se adquirió en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). El hidróxido de sodio, hexano, metanol, etanol y acetato de etilo se adquirieron en DEQ (México). Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

B. *Granos*

Maíz (*Zea mays* L var 30P49 Pioneer) y garbanzo (*Cicer arietinum* L var. Blanco Sinaloa 92) fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Culiacán, SIN, México.

C. *Producción de harinas de maíz (HME) y garbanzo extrudidos (HGE) y su mezcla [(60g HME+40g HGE)/100g mezcla] para la optimización*

Las harinas HME y HGE se prepararon según lo reportado por Milán-Carrillo y col [19]. Lotes de maíz y garbanzo integrales (1 kg lote), por separado, se colocaron en molino doméstico a velocidad alta para obtener fragmentos de granos que pasaron a través de malla 40-US (0.425 mm). Los fragmentos de maíz se mezclaron con cal (0.21 g cal/100 g) y agua, mientras que los de garbanzo se mezclaron con una disolución salina [(2.5g NaCl + 7.5g NaHCO₃)/L agua destilada], en ambos casos para alcanzar un contenido de humedad de 28g H₂O/100 g muestra. Cada lote se envasó en bolsa de polietileno y se almacenó (4°C/8h). Antes de la extrusión las muestras se atemperaron (25°C/1h). La extrusión-cocción se llevó a cabo en extrusor de tornillo simple Brabender 20 DN (CW Brabender Instruments, Inc, NJ, EUA) con diámetro de tornillo de 19 mm, relación longitud-diámetro 20:1, relación de compresión nominal 1:1 y un diámetro de salida de 3 mm. Las condiciones de operación del extrusor se obtuvieron a partir de una combinación factorial de temperatura de extrusión (TE=120-170°C) y velocidad del tornillo (VT=120-200 rpm). Se utilizó un diseño experimental de composición central rotatable con cuatro factores (TEM=temperatura de extrusión de maíz, VTM = Velocidad de tornillo para maíz, TEG=Temperatura de extrusión de garbanzo, VTG=Velocidad de tornillo para garbanzo) y cinco niveles de variación; se generaron 30 tratamientos (Cuadro 1). Los extrudidos se enfriaron, atemperaron (25°C), molturaron para pasar a través de malla 80-US (0.180 mm) y se empacaron en bolsas de plástico. Las harinas integrales de maíz (HME) y garbanzo (HGE) extrudidos provenientes de cada tratamiento se utilizaron para la preparación de las 30 mezclas diferentes [(60% HME + 40% HGE) / 100 g de mezcla]; las mezclas se utilizaron para la preparación de bebidas (30 bebidas). Las mezclas se evaluaron por actividad antioxidante (AAox) y las bebidas por aceptabilidad (A).

D. *Elaboración de la bebida*

A 22 g de muestra [(60g HME+40g HGE)/100g mezcla] se le adicionaron sacarosa (3.2 g), edulcorante bajo en calorías (Azúcar BC Metco ®, que contiene una mezcla de sacarosa, edulcorantes de intensidad alta, inulina, fructo-oligosacáridos con dos veces más poder edulcorante que la sacarosa) (4,8 g), vainilla en polvo (1 g) y agua purificada (168 ml). La suspensión se agitó en un homogenizador (velocidad media), refrigerada (8-10°C) y se evaluó sensorialmente por aceptabilidad (A). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

E. Extracción de fitoquímicos libres

Los fitoquímicos libres en las muestras se extrajeron según lo reportado por Dewato y col [22] con pequeñas modificaciones. Se utilizó 1.0 g de muestra la cual se mezcló con 10 ml de una etanol-agua (80:20, v / v) durante 10 min en un agitador a 50 rpm. A continuación, las mezclas se centrifugaron (3.000xg, 10 min) (Sorvall RC5C, Sorvall Instruments, Dupont, Wilmington, DE, EUA) con el fin de recuperar el sobrenadante. Los extractos se concentraron a 2 ml a 45°C usando un evaporador al vacío (Savant SC250 DDA Speed Vac Plus centrífugal, Holbrook, NY, EUA) y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Todas las extracciones se realizaron por cuadruplicado.

F. Extracción de fitoquímicos ligados

Los fitoquímicos ligados de las muestras se extrajeron acorde a Adom y Liu [4] con modificaciones menores. Después de la extracción de fitoquímicos libres, el sedimento se resuspendió en 10 ml de 2 mol/L de NaOH a temperatura ambiente; se utilizó nitrógeno para desplazar el aire presente en el espacio de cabeza del tubo antes de la digestión. Las muestras se hidrolizaron a 95°C y 25°C en un baño de agua con agitación a 60 rpm durante 30 y 60 min, respectivamente. El hidrolizado se neutralizó con una HCl antes de la eliminación de lípidos con hexano. La solución final se extrajo cinco veces con 10 ml de acetato de etilo, el cual se evaporó a sequedad. Los fitoquímicos resultantes se resuspendieron en 2 mL de metanol al 50% y se almacenó a -20°C hasta su uso. Todas las extracciones se realizaron por cuadruplicado.

G. Actividad antioxidante (ORAC)

La actividad antioxidante hidrofílica de fitoquímicos libres y ligados se evaluó mediante el ensayo de capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés). Los extractos se evaluaron frente a un estándar de Trolox con Fluoresceína como prueba según Cao y col [23] modificada posteriormente por Ou y col [24]. Se generaron radicales peroxilo por 2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro; la pérdida de fluorescencia se monitorió en un lector de microplaca (SynergyTM HT, BioTek, Inc., Winooski, VT, EUA). La absorbancia de excitación y de emisión se fijó en 485 y 538 nm, respectivamente. Los datos se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox (ET) por 100 g de la muestra (bs). Todas las mediciones se realizaron por cuadruplicado.

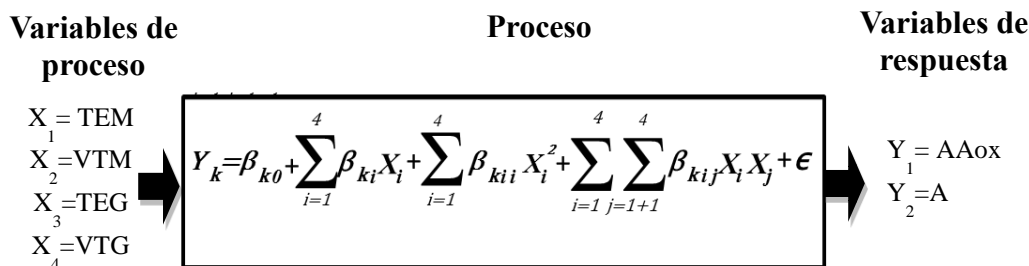
H. Evaluación sensorial

El volumen de la muestra utilizada para la evaluación sensorial de cada bebida fueron 20 litros y el número total de diferentes bebidas fueron 30, basado en las diferentes condiciones de extrusión utilizadas (Cuadro 1). Una bebida diferente se preparó y evaluó cada día. Las bebidas se evaluaron después de 30 min de preparación, a temperatura ambiente. La evaluación sensorial de cada bebida se realizó utilizando un panel de 60 jueces. Los panelistas se situaron en cabinas individuales en un espacio con temperatura (25°C) y humedad relativa (50-60%) controlados. Las muestras se calificaron utilizando una escala bidireccional LAM (labeled affective magnitude) de 100 mm [-100 (valor máximo de rechazo imaginable) a 100 (valor máximo de aceptación imaginable); cero (ni me gusta, ni me disgusta) como punto central] para el atributo: Aceptabilidad (A). Posteriormente estos valores se transformaron a una escala de cero a 100 [0 = valor máximo de rechazo imaginable, 100 = valor máximo de aceptación; 50 = Ni me gusta, ni disgusta]. Esta transformación se realizó para obtener modelos matemáticos de predicción para A [25].

I. *Diseño experimental, metodología de superficie de respuesta (MSR) y análisis estadístico*

La MSR se aplicó para determinar la mejor combinación de las variables de los procesos de extrusión para la obtención de harinas de maíz (HME) y garbanzo (HGE) extrudidos para producir una mezcla [(60% HME + 40% HGE) / 100 g mezcla] con actividad antioxidante alta y apta para elaborar una bebida sensorialmente aceptable. Las variables independiente de proceso fueron: temperatura de extrusión (TE, 120-170°C) y la velocidad del tornillo (VT, 120-200 rpm). Se utilizó un diseño de composición central rotatable con cuatro factores (TEM=Temperatura de y

El diseño generó 30 tratamientos (Tabla 1). Las harinas HME y HGE de cada tratamiento se utilizaron para la preparación de 30 mezclas [(60% HME + 40% HGE) / 100 g mezcla]. Las variables de respuesta dependientes elegidas fueron la actividad antioxidante (AAox) de las mezclas y la aceptabilidad (A) de las bebidas producidas a partir de ellas. El siguiente modelamiento empírico, representa las relaciones entre las variables de proceso (TEM, VTM, TEG, VTG) y las variables de respuesta (AAox, A):



La expresión dentro de la “caja negra” representa AAox y A cuando los valores de k cambia de 1 to 4; k_0 , k_{ii} y k_{ij} representan la constante y los coeficientes lineales, cuadráticas y los efectos de interacción, respectivamente; X_i , X_{ii}^2 y $X_i X_j$ representan el efecto lineal, cuadrático y la interacción de las variables independientes, respectivamente, mientras ϵ es el error aleatorio principalmente que indica la incapacidad para determinar el verdadero modelo. Aplicando el procedimiento de regresión paso a paso, los términos no significativos ($P > 0,1$) se eliminaron del polinomio de segundo orden y un nuevo polinomio se volvió a calcular para obtener un modelo de predicción para cada variable de respuesta [14]. El software de sistema de análisis estadístico Design Expert versión 7.0.0. se utilizó para el análisis y la evaluación [26].

J. *Optimización del proceso de extrusión*

El método de deseabilidad descrito por De la Vara y Domínguez [27] se utilizó para encontrar la mejor combinación de las variables de los procesos de extrusión (TEM=Temperatura de extrusión para el maíz / VTM=Velocidad de tornillo para maíz; TEG=Temperatura de extrusión de garbanzo / VTG=Velocidad de tornillo para garbanzo) el cual resultó en una mezcla [(60% HME + 40% HGE)/100 g mezcla] con los valores óptimos para las dos variables dependientes (AA_{ox}, A). Los dos modelos ajustados pueden ser evaluados en cualquier punto $X = (X_1, X_2, X_3, X_4)$ de la zona experimental y como resultado se predijeron dos valores para cada modelo, esto es $\hat{Y}_1(X)$ y $\hat{Y}_2(X)$. Luego cada $\hat{Y}_i(X)$ es transformado en un valor $d_i(X)$, el cual cae en el rango (0, 1) y mide el grado deseable de la respuesta en relación con el valor óptimo que se desea alcanzar (ecuación 1).

En esta investigación, hemos establecido que todas las variables de respuesta sean lo más alto posible. Por lo tanto, la transformación es:

$$\begin{aligned}
 & \check{y}_i(x) \leq y_{i*} \\
 d_i(x) = & \begin{cases} 0 & \check{y}_i(x) - y_{i*} \\ 1 & y_i^* - y_{i*} \end{cases} \\
 & y_{i*} \leq \check{y}_i(x) \leq \check{y}_i^* \\
 & \check{y}_i(x) \geq \check{y}_i^*
 \end{aligned} \tag{1}$$

Dónde: $d_i(X)$ =Valor de deseabilidad de la variable de respuesta, $\hat{Y}_i(X)$ =Variable de respuesta estimada, Y_{i*} =Valor máximo aceptable de la variable de respuesta, Y_i^* =Valor mínimo aceptable de la variable de respuesta. Una vez que se calculan las deseabilidades individuales, el siguiente paso es obtener la deseabilidad global (D) para las dos variables de respuesta, utilizando la función matemática de transformación $D = (d_1 d_2)^{1/2}$, en el que el valor óptimo ideal es $D = 1$; un valor aceptable para D puede ser entre 0,6 y 0,8 ($0,6 < D < 0,8$). Este valor aceptable se encontró utilizando el programa Design Expert versión 7.0.0. [26].

K. Composición proximal

Los siguientes métodos de la Asociación Americana de Químicos en Cereales (AACC, por sus siglas en inglés) [28] se utilizaron para determinar la composición proximal: Secado a 105°C durante 24 h, para humedad (método 925.09B); incineración a 550°C para cenizas (método 923.03); desgrasado en un equipo Soxhlet con éter de petróleo para lípidos (método 920.39C); y micro Kjeldahl para proteína (Nx6.25) (método 960.52). El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

L. Análisis de aminoácidos esenciales

La composición de aminoácidos esenciales se determinó acorde a López-Cervantes y col [29]. Una muestra de 50 mg se mezcló con 10 ml de HCl 6 mol / L y se incubó a 100°C/24 h. La muestra hidrolizada se filtró y el extracto se diluyó 200 veces con agua MilliQ. Una alícuota de 300 μ L de extracto se secó y se derivatizó con 300 μ l de 9 fluoronimetil-cloroformato (FMOC). Una alícuota de 20 μ L se analizó utilizando una balanza analítica (4,6 mm x 250 mm) SGE Hypersil ODS columna C18 (SGE, Dandenong, Australia) se mantuvo a 38 ° C y se conectó a un sistema de HPLC (GBC, Dandenong, Australia), equipado con detector de fluorescencia LC 5100. Las fases móviles utilizadas fueron las siguientes: (A) 30 nmol / L de fosfato de amonio (pH 6,5) en 15:85 (v / v) de metanol / agua; (B) 15:85 (v / v) de metanol / agua; (C) 90:10 (v / v) de acetonitrilo / agua. La relación de flujo fue de 1,2 ml / min. La detección de fluorescencia fue a 270 y 316 nm para la excitación y emisión, respectivamente. Se construyó una curva de calibración utilizando una mezcla de aminoácidos estándar. Los niveles de Triptófano se determinaron utilizando hidrólisis alcalina. Una mezcla de 25 mg se mezcló con 3 ml de 4.2 moles / L de NaOH y se incubó en tubos sellados (atmósfera de N₂) a 120°C durante 4 h. Después de la hidrólisis, la muestra se ajustó a pH 9, se lavó con tampón de borato (pH 9), se filtró al vacío y después se diluyó a 50 ml con tampón de borato. Después de la centrifugación, el sobrenadante se filtró (0,45 m) y a continuación, se analizó una alícuota de 20 μ l como se describió anteriormente. El Triptófano se detectó a 280 nm con un detector ultravioleta. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

M. Calificación química (CQ)

La calificación química es una medida de la calidad de las proteínas sobre la base de composición de aminoácidos. El contenido de cada uno de los aminoácidos esenciales en la muestra se comparó con el recomendado para niños mayores, adolescentes y adultos (3 años o más) [30] para identificar el aminoácido limitante. La puntuación química se calculó como se muestra en la ecuación 2:

$$CQ = \frac{\text{Contenido del aminoácido limitante}}{\text{RAER}} \times 100 \quad (2)$$

Dónde: CQ=Calificación química; AE=Aminoácido esencial y RAER=Requerimiento de AE recomendado. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

N. Digestibilidad proteínica *in vitro* (DP_{IV})

Se aplicó la metodología de Hsu y col [31]. Se seleccionó un sistema multienzimático (Sigma Chemical, St. Luis, MO, EEUU) constituido por 8 mg de Tripsina Pancreática Porcina tipo IX (Sigma T-0303) con 15600U/mg; 15.5 mg de Quimotripsina Pancreática Bovina tipo II (Sigma C-4129) con 83.9 U/mg y 6.5mg de Peptidasa Intestinal Porcina grado III (Sigma P-7500) con 102 U/g; todo en 5ml de agua destilada. Mientras se agitaba en un baño a 37°C, una cantidad específica de cada muestra se utilizó para preparar 50 ml de una suspensión acuosa de proteína (6.25 mg/ml) y se ajustó el pH de la suspensión a 8.0. A cada suspensión proteínica, mantenida a 37°C y en agitación constante, se le añadieron 5ml de solución multienzimática y se registró el pH a los 10 min. La DP se calculó como $DP = 210.46 - 18.10X$, donde X es el pH registrado 10min después de añadir el sistema multienzimático a la solución proteínica (Hsu y col, 1977).

O. Relación de eficiencia proteínica calculada (C-PER)

La C-PER se calculó según Satterlee y col [32], reportado como método 982.30 por la AOAC [28]. Para el cálculo se requiere conocer la digestibilidad proteínica *in vitro* y el contenido de aminoácidos esenciales de la muestra analizada. Se empleó caseína como proteína de referencia. El C-PER se determinó utilizando la ecuación de regresión (ecuación 3).

$$C\text{-PER} = -2,1074 + 2,8525 (Z) - 0,4030 (Z^2) \quad (3)$$

Donde Z se calculó en base al perfil de aminoácidos y a la digestibilidad proteínica *in vitro* de la muestra y de la proteína de referencia, así como en relación a los valores estándares para aminoácidos esenciales.

P. Análisis estadístico

Los resultados de las propiedades de la mezcla optimizada se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, y prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de significancia del 5%.

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A. Modelos de predicción para actividad antioxidante (AA_{ox})

Los resultados experimentales para AA_{ox} de las diferentes combinaciones de las variables de proceso (TEM=Temperatura de extrusión para el maíz; VTM=Velocidad de tornillo para maíz; TEG=Temperatura de extrusión de garbanzo; VTG=Velocidad de tornillo para garbanzo) son presentados en el tabla 1. La AA_{ox} de las mezclas [(60% HME + 40% HGE)/100 g mezcla, bs] varió de 6,509 a 10,369 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$ mezcla, bs. Los coeficientes de regresión y análisis de varianza de un modelo polinomial de segundo orden que muestra relación de las variables de proceso se muestran en el tabla 2.

Tabla I. Combinación de las variables de proceso de extrusión y resultados experimentales.

Trat	Variables de proceso				Variables de respuesta	
	TEM (°C)	VTM (rpm)	TEG (°C)	VTG (rpm)	AA_{ox}	A
1	120	120	120	120	8,572	90
2	170	120	120	120	7,949	76
3	120	200	120	120	9,618	74
4	170	200	120	120	8,682	80
5	120	120	170	120	9,402	66
6	170	120	170	120	7,838	62
7	120	200	170	120	8,282	66
8	170	200	170	120	6,506	70
9	120	120	120	200	8,999	82
10	170	120	120	200	7,451	78
11	120	200	120	200	10,340	74
12	170	200	120	200	8,088	84
13	120	120	170	200	10,369	60
14	170	120	170	200	8,137	60
15	120	200	170	200	8,024	64
16	170	200	170	200	7,167	64
17	95	160	145	160	10,174	88
18	195	160	145	160	6,710	70
19	145	80	145	160	9,096	68
20	145	240	145	160	8,805	70
21	145	160	95	160	9,833	64
22	145	160	195	160	8,708	40
23	145	160	145	80	9,596	80
24	145	160	145	240	8,518	80
25	145	160	145	160	9,735	82
26	145	160	145	160	9,341	78
27	145	160	145	160	9,060	80
28	145	160	145	160	9,792	84
29	145	160	145	160	9,307	88
30	145	160	145	160	9,635	86

El número de los tratamientos no corresponde al orden de procesamiento. TEM= Temperatura de extrusión de maíz, VTM= Velocidad de tornillo para maíz; usados para preparar harinas integrales de maíz extrudido (HME). TEG= Temperatura de extrusión de garbanzo, VTG= Velocidad de tornillo para garbanzo; usados para preparar harinas integrales de garbanzo extrudido (HGE). AA_{ox} = Actividad antioxidante [$\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ muestra, bs]; A = Aceptabilidad.

Tabla II. Coeficientes de regresión y análisis de varianza de modelos polinomiales de segundo orden

Coeficiente	Actividad antioxidante (YAAox)	Aceptabilidad (YA)
Intercepto		
β_0	9330.14	81.88
Lineal		
β_1	-779.76***	-1.58*
β_2	-107.97 ^{NS}	0.25 ^{NS}
β_3	-259.35**	-7.25***
β_4	-17.97 ^{NS}	-0.75 ^{NS}
Cuadrático		
β_{11}	-318.23***	-
β_{22}	-191.08**	-3.05***
β_{33}	-	-7.30***
β_{44}	-164.53**	-
Interacciones		
β_{12}	-	2.63**
β_{23}	-595.27***	1.88*
P	<0.0001	<0.0001
R²	0.8523	0.9035

* Nivel de significancia $P \leq 0.10$; ** Nivel de significancia $P \leq 0.05$; *** Nivel de significancia $P \leq 0.01$; NS No significativo ($P > 0.10$). AAox= Actividad antioxidante, A= Aceptabilidad.

El análisis de varianza mostró que la AA_{ox} dependió significativamente de los términos lineales of TEM ($P < 0.0001$) y TEG ($P = 0.0122$), términos cuadráticos TEM, VTM y VTG [$(TEM)^2$ ($P = 0.0015$); $(VTM)^2$ ($P = 0.0405$); $(VTG)^2$ ($P = 0.0741$)] y la interacción VTM-TEG [$(VTM)(TEG)$ ($P < 0.0001$)]:

Usando variables codificadas:

$$AA_{ox} = 9330.14 - 779.76 X_1 - 107.97 X_2 - 259.35 X_3 - 17.97 X_4 - 318.23 X_1^2 - 191.08 X_2^2 - 164.53 X_4^2 - 595.27 X_2 X_3$$

Usando variables originales:

$$AA_{ox} = -14344.67 + 116.47 ETM + 121.83 SSM + 84.87 ETC + 32.46 SSC - 0.51 (ETM)^2 - 0.12 (SSM)^2 - 0.10 (SSC)^2 - 0.59 (SSM)(ETC)$$

El modelo de regresión explica el 85.23% del total de la variabilidad ($P < 0.0001$) en la AA_{ox} de las mezclas (Cuadro 2).

B. Modelos de predicción para aceptabilidad (A)

Los valores de A de las bebidas preparadas a partir de las mezclas [(60% HME + 40% HGE)/100 g mezcla, bs] variaron de 40 a 90 (tabla1). El análisis de varianza mostró que A dependió significativamente en los términos lineales TEM ($P = 0.066$), y TEG ($P < 0.0001$), términos cuadráticos of VTM y TEG [$(VTM)^2$ ($P = 0.0006$); $(TEG)^2$ ($P < 0.0001$)] y las interacciones TEM-VTM, y VTM-TEG [$(TEM)(VTM)$ ($P = 0.0160$); $(VTM)(TEG)$ ($P = 0.0754$)]:

Usando variables codificadas:

$$A = 81.88 - 1.58 X_1 + 0.25 X_2 - 7.25 X_3 - 0.75 X_4 - 3.05 X_2^2 - 7.30 X_3^2 + 2.63 X_1 X_2 + 1.88 X_2 X_3$$

Usando variables originales:

$$A = 54.71 - 0.48 \text{ETM} - 0.037\text{SSM} - 2.80 \text{ETC} - 0.019 \text{SSC} - 1.90 (\text{SSM})^2 - 0.012 (\text{ETC})^2 + 0.0026 (\text{ETM})(\text{SSM}) + 0.0019 (\text{SSM})(\text{ETC})$$

El modelo de regresión explica el 90.35% de la variabilidad total ($P < 0.0001$) para A de las bebidas (tabla 2).

C. Optimización

Los valores máximos comunes para las dos variables de respuesta dependientes se obtuvieron mediante un valor de deseabilidad global (D) de 0.907, como resultado de la mejor combinación de las variables de proceso procesos de extrusión para la obtención de harinas de maíz (HME: TEM=109°C/VTM=158 rpm) y garbanzo (HGE: TEG=127°C/VTG=151 rpm) extrudidos para preparar una mezcla [(60% HME + 40% HGE) / 100g mezcla, bs] con actividad antioxidante alta, aptas para la elaboración de una bebida sensorialmente aceptable (Fig. 1). El valor D obtenido fue superior al considerado como aceptable ($0.6 < D < 0.8$) [27]. Esta mezcla, reconocida como mezcla optimizada, se evaluó por composición química, propiedades nutricionales y actividad antioxidante.

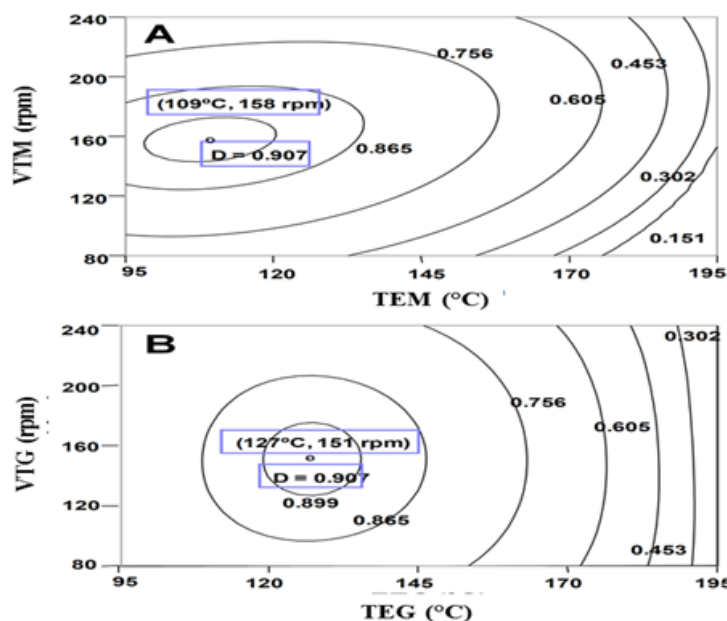


Fig. 1. Gráficas de deseabilidad mostrando la mayor combinación de las variables de los procesos de extrusión

D. Composición química y propiedades nutricionales de la mezcla optimizada

La mezcla optimizada contiene, en base seca, 16.57 g proteínas, 3.87 g lípidos, 76.24 g carbohidratos y 3.32 g de cenizas por 100 g de muestra (Tabla 3). El contenido de aminoácidos esenciales (AAE) de la mezcla optimizada fue mayor que lo recomendado para niños mayores, adolescentes y adultos (3 años o más), con una calificación química de 100 y sin AAE limitante. La digestibilidad proteínica *in vitro* (DPIV) y relación de eficiencia proteínica calculada (C-PER) de la mezcla optimizada fue de 89.1% y 2.35, respectivamente (Tabla 3). Serna-Saldívar y col [33] reportaron, para pan de trigo enriquecido con soya desgrasada valores y para un alimento de sésamo

DPIV y C-PER de 83.1-84.9 % y de 1.22 a 1.35, respectivamente. Alarcón-Valdez y col [34] prepararon un alimento para lactantes a base de una mezcla de harinas de maíz nixtamalizado (26.7%) y garbanzo extruido (73.3%); este alimento presentó valores de DPIV y C-PER de 87.9% y 1.86, respectivamente. La técnica C-PER predice las mismas diferencias observadas en el bioensayo en ratas. Se recomienda utilizar las técnicas *in vitro* como indicadores rápidos y precisos de la digestibilidad de la proteína y del PER.

E. Actividad antioxidante (AAox) de la mezcla optimizada

La AAox de la mezcla sin procesar y optimizada (60% HME + 40% HGE) se evaluó mediante el ensayo de capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés). La mezcla optimizada retuvo más de 91% [9,956 vs 10,897 μmol equivalentes de Trolox (ET) / 100 g de muestra, bs] de la AAox, evaluada por ORAC, con respecto a la mezcla sin procesar (Tabla 3). La AAox de compuestos fenólicos libres y ligados aumentó ($p < 0,05$) y disminuyó ($P < 0,05$) en mezcla optimizada extruida, respectivamente, en comparación con la mezcla sin procesar (Tabla 3). Este comportamiento puede atribuirse a (i) Rompimiento de fitoquímicos conjugados y liberación de libres [22], (ii) Prevención de la oxidación enzimática, (iii) Color más oscuro de la mezcla optimizada que indica la formación de productos de la reacción de Maillard los cuales poseen propiedades antioxidantes [36]. Nuestros resultados muestran que los fitoquímicos ligados fueron los principales contribuyentes (72.97-81.00%) a la AAox tanto en la mezcla sin procesar como en la mezcla optimizada (Tabla 3). Existen fitoquímicos bioactivos en forma libre, conjugada y ligada, sobre todo en los materiales de la pared celular, los cuales son difíciles de digerir en el tracto gastrointestinal y pueden ser digeridos por las bacterias en el colon para proporcionar beneficios en la salud y reducir el riesgo de cáncer de colon [4-5]. O'zer y col [37] estudiaron el efecto de la velocidad del tornillo, el contenido de humedad en la alimentación y la velocidad de flujo sobre la concentración de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de una botana extruida (garbanzo + maíz + avena + maicena + zanahoria + avellana cruda); ellos utilizaron una temperatura de extrusión de 110°C. Estos investigadores encontraron que las condiciones de extrusión no cambiaron la concentración de fenólicos totales en las muestras, pero la actividad antioxidante total disminuyó (33.8 a 45.11%) conforme aumentó la velocidad del tornillo (280-330 rpm) y se reduce el contenido de humedad (13-11%). Delgado-Licon y col [38] evaluaron la influencia del proceso de extrusión sobre compuestos bioactivos y la actividad antioxidante de mezclas frijol + maíz. La extrusión se llevó a cabo usando diferentes condiciones de humedad y temperatura. El mejor procedimiento de extrusión se logró utilizando contenidos de humedad, temperatura de extrusión y velocidad de tornillo de 16.3%, 142°C y 90 rpm, respectivamente, lo que resultó en un mayor contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante.

F. Formulación, composición nutrimental, contenido energético y actividad antioxidante de la bebida funcional

La formulación de porciones de 200 ml de 30 bebidas diferentes preparados a partir de diferentes mezclas de harina (Tabla 1) y la bebida preparada a partir de la mezcla optimizada se basa en formulaciones de bebidas tradicionales ampliamente consumidas en México, que se produce a partir de diferentes harinas de cereales (arroz, cebada, etc). La preparación de estas bebidas tradicionales consiste en la adición de alrededor de 150 g de cebada tostada o arroz (granos remojados y molidos) a un litro de agua (a veces podría ser añadido con una pequeña cantidad de leche), azúcar, algunas gotas de vainilla (opcional), y luego se mezcla para homogeneizar los ingredientes; estas bebidas son por lo general refrigeradas (4-8 °C) antes de su consumo. Presentan una considerable cantidad precipitada de harina en el fondo del recipiente, pero son muy demandadas en México a pesar del hecho de que necesitan ser agitadas antes de beber. Para la preparación de la bebida a partir de la mezcla de la harina optimizada, se llevaron a cabo pruebas sensoriales para definir las cantidades apropiadas para cada ingrediente (datos no mostrados). También se consideró la norma mexicana NMX-F-439-1983 para los

alimentos y bebidas no alcohólicas. Esta norma define una bebida nutritiva cuando contiene al menos 1.5% de proteína o hidrolizados de proteínas con una calidad equivalente a la de la caseína; también establece que la bebida debe contener 10 a 25% del ingrediente principal usado para prepararla. Estas bebidas también pueden contener etanol hasta un 2%, edulcorantes, aromatizantes, dióxido de carbono, jugos, pulpa de frutas, verduras o leguminosas y otros aditivos autorizados por la Secretaría de Salud y Asistencia de México. Todas las formulaciones utilizadas en este estudio contenían 11% de las proteínas de la mezclas de harinas. Además, estas bebidas contienen tanto sacarosa como edulcorante bajo en calorías, por dos razones: 1) para satisfacer las recomendaciones de la Secretaría de Salud y Asistencia de México, en relación con el hecho de que una porción de 200 ml de una bebida (alimentos) debe contener no más de 100 Cal, y 2) para mantener una alta aceptabilidad sensorial.

Tabla III. Composición química, propiedades nutricionales y actividad antioxidante de la mezcla

Propiedad	Mezcla sin procesar	Mezcla optimizada	Requerimientos para niños mayores, adolescentes y adultos (3 años y mayores)
Composición química (g/100 g muestra, bs)			
Proteínas	16.06±0.010 ^b	16.57±0.14 ^a	
Lípidos	6.06±0.03 ^a	3.87±0.05 ^b	
Minerales	2.10±0.02 ^b	3.32±0.09 ^a	
Carbohidratos	76.10±1.05 ^a	76.24±1.02 ^a	
Nutricional			
AAE(g/100 g proteína)			
His	2.87±0.06	2.81±0.05	1.60
Ile	3.07±0.09 ^a	3.18±0.04 ^a	3.00
Leu	7.94±0.05 ^b	8.32±0.07 ^a	6.10
Lys	5.08±0.08 ^a	4.81±0.02 ^b	4.80
Met+Cys	4.25±0.06 ^a	3.80±0.05 ^b	2.30
Phe+Tyr	7.75±0.03 ^a	7.43±0.06 ^b	4.10
Trp	0.92±0.01 ^a	0.91±0.01 ^a	0.66
Thr	3.50±0.01 ^a	3.51±0.06 ^a	2.50
Val	5.07±0.04 ^a	4.38±0.03 ^b	4.00
Calificación química	100	100	---
AAE limitante	ND	ND	---
DPIV (%)	78.98±1.02 ^b	89.1±1.01 ^a	---
C-PER	2.15	2.35	---
Actividad antioxidante [µmol ET/ 100 g (bs)]			
Fenólicos libres	2070±105 ^b	2695±135 ^a	
Fenólicos ligados	8827±238 ^a	7277±240 ^b	
Total	10897±387 ^a	9972±295 ^b	

^{a-b} Medias con diferentes superíndices en el mismo renglón son diferentes significativamente (Duncan, $p \leq 0.05$). Mezcla sin procesar = (60g harina de maíz crudo + 40g harina de garbanzo crudo)/100 g mezcla cruda; Mezcla óptima= (60g HME + 40g HGE)/100 g mezcla. HME = Harina de maíz extrudido; HGE = Harina de garbanzo extrudido. Requerimientos de aminoácidos para niños mayores, adolescentes y adultos (3 años y mayores) según la FAO (2013); AAE=Aminoácidos esenciales; DPIV= Digestibilidad proteínica *in vitro*; C-PER= Relación de eficiencia proteínica calculada. ND = No detectado.

La porción de 200 ml de la bebida preparada con 22 g de la mezcla optimizada contiene 3.31 g de proteínas, 0.77 g de lípidos, 19.5 g de carbohidratos y 98 Cal. Esta parte cubre 26.36% y 17.65% de las necesidades diarias de proteínas para los niños de 1-3 y 4-8 años de edad, respectivamente. Esta bebida funcional (200 ml) mostró una actividad antioxidante total de 1,994 µmol ET, lo que contribuye con 40-66% de la ingesta diaria recomendada (3,000 a 5,000 µmol ET) para antioxidantes (USDA, 2010).

Los panelistas asignaron un valor promedio de 86 en la aceptabilidad de la bebida (nivel de satisfacción entre "me gusta" y "me gusta extremadamente"). Se espera que esta aceptabilidad permita un consumo adecuado para proporcionar beneficios para la salud.

El valor nutricional y actividad antioxidante altos, así como la aceptabilidad sensorial de la bebida funcional se pueden atribuir a la utilización de la mezcla de granos integrales de maíz y garbanzo, así como la aplicación de las condiciones óptimas de procesamiento de extrusión. Esta bebida funcional podría ser utilizada para la promoción de salud y prevención de enfermedades, como alternativa a las bebidas con valor nutricional / nutracéutico bajo.

IV. CONCLUSIONES

Las mejores combinaciones de las variables de los procesos de extrusión para la producción de harinas integrales de maíz (HME) y garbanzo (HEG) extrudidos para preparar una mezcla [(60% HME + 40% HGE) / 100 g mezcla, bs] con actividad antioxidante alta, adecuada para la elaboración de una bebida sensorialmente aceptable fueron: Maíz: 109°C/158 rpm; Garbanzo: 127°C/151 rpm. La mezcla optimizada presentó una AAox y un C-PER de 9,972 ET/100g de muestra (bs) y de 2.35, respectivamente. Una porción de 200 ml de la bebida preparada con la mezcla optimizada contribuyó con 40 a 66% de la ingesta diaria recomendada de antioxidantes. Esta bebida funcional se podría utilizar como una alternativa a las bebidas con valor nutracéutico / nutricional bajo, tales como los preparados con agua, azúcares simples, y saborizantes artificiales y colorantes, que se ofrecen ampliamente en el mercado.

RECONOCIMIENTOS

Esta investigación fue apoyada por PROFAPI-UAS (Programa de Fortalecimiento y Apoyo a Proyectos de Investigación, Universidad Autónoma de Sinaloa, México) desde 2011 hasta 2013, y Fundación Produce Sinaloa, México 2010-2012.

REFERENCIAS

- [1] USDA (2010) Antioxidants and Health. ACES publications.4 pp.
- [2] FAOSTAT (2011) Statistical database; Online Reference <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Accessed 28/10/2011.
- [3] López-Martínez LX, Oliart-Ros RM, Valerio-Alfaro G, Lee CH, Parkin KL, García HS (2009) Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. LWT - Food Sci Technol 42: 1187 – 1192.
- [4] Adom KK, Liu RH (2002) Antioxidant activity of grains. J Agric Food Chem 50: 6182-6187.
- [5] Liu RH (2007) Whole grain phytochemicals and health. J Cereal Sci 46: 207-219.
- [6] Han H, Baik BK (2008) Antioxidant activity and phenolic content of lentils (*Lens culinaris*), chickpeas (*Cicer arietinum* L.), peas (*Pisum sativum* L.) and soybeans (*Glycine max*), and their quantitative changes during processing. Int J Food Sci Tech 43: 1971–1978.
- [7] Milán-Carrillo J, Valdez-Alarcón C, Gutiérrez-Dorado R, Cárdenas-Valenzuela OG, Mora-Escobedo R, Garzón-Tiznado JA, Reyes-Moreno C (2007) Nutritional properties of quality protein maize and chickpea extruded based weaning food. Plant Foods Hum Nutr 62: 31-37.
- [8] Paredes-López O, Guevara-Lara F, Bello-Pérez LA (2006) Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. Fondo de Cultura Económica. ISBN 968-16-7567-3 México, DF pp 32-34, 81-8812.

- [9] Gutiérrez-Dorado R, Ayala-Rodríguez AE, Milán-Carrillo J, López-Cervantes JA, Garzón-Tiznado JA, López-Valenzuela JA, Paredes-López O, Reyes-Moreno C (2008) Technological and nutritional properties of flours and tortillas from nixtamalized and extruded quality protein maize (*Zea mays* L). *Cereal Chem* 85: 808-816.
- [10] Harper JM (1981) Extrusion of Starches and Starch Materials. In "Extrusion of Foods", Boca Raton, FL, USA.
- [11] Reyes-Moreno C, Argüelles-López OD, Rochín-Medina JJ, Milán-Carrillo J, Rivera-López J, Valdez-Ortiz A, López-Valenzuela JA, Gutiérrez-Dorado R (2012) High antioxidant activity mixture of extruded whole quality protein maize and common bean flours for production of a nutraceutical beverage elaborated with a traditional mexican formulation. *Plant Foods Hum Nutr* 67: 450-456.
- [12] Milán-Carrillo J, Reyes-Moreno C, Camacho-Hernández IL, Rouzaud-Sandez O (2002) Optimization of extrusion process to transform hardened chickpeas (*Cicer arietinum* L) into a useful product. *J Sci Food Agric* 82: 1718-1728.
- [13] Heckman MA, Sherry K, González de Mejía E (2010) Energy drinks: An assessment of their market size, consumer demographics, ingredient profile, functionality, and regulations in the United States. *Compr Rev Food Sci F* 9: 303-307
- [14] Khuri AA, Cornell JA (1987) Response Surfaces: Designs and Analyses. Marcel Dekker Inc, New York, NY, USA pp 1-17, 254.
- [15] Fichtali J, Van DeVoort FR, Khuri AI (1990) Multiresponse optimization of acid casein production. *J Food Process Eng* 12: 247-258.
- [16] Harrington EC (1965) The desirability function. *Industry Quality Control* 21: 494-498.
- [17] Derringer G, Suich R (1980) Simultaneous optimization of several response variables. *J Qual Tech* 12: 214- 219.
- [18] Guillou AA, Floros JD (1993) Multiresponse optimization minimizes salt in natural cucumber fermentation and storage. *J Food Sci* 58: 1381-1389.
- [19] Milán-Carrillo J, Gutiérrez-Dorado R, Perales-Sánchez JXK, Cuevas-Rodríguez EO, Ramírez-Wong B, Reyes Moreno C (2006) The optimization of the extrusion cooking process when using maize flour with a modified amino acid profile for making tortillas. *Int J Food Sci Technol* 41: 727-736.
- [20] Milán-Carrillo J, Montoya-Rodríguez A, Gutiérrez-Dorado R, Perales-Sánchez JXK, Reyes-Moreno C (2012) Optimization of extrusion process for producing high antioxidant instant amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L) flour using response surface methodology. *Appl Math* 3: 1516-1525.
- [21] Altan A, McCarthy KL, Maskan M (2008) Extrusion cooking of barley flour and process parameter optimization by using response surface methodology. *J Sci Food Agric* 88: 1648-1659.
- [22] Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH (2002) Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 3010-3014.
- [23] Cao G, Alessio HM, Culter R (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assays for antioxidants. *Free Radical Biol Med* 1: 303-311.
- [24] Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL (2001) Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49: 4619-4926.
- [25] Cardello AV, Schutz HG (2004) Research note numerical scalepoint locations for constructing the LAM (labeled affective magnitude) scale. *J. Sens. Stud.* 19: 341-346.
- [26] Design Expert (2007) *Version 7.0.0.* by Stat-Ease. Minneapolis, MN, USA, Design Expert Inc.
- [27] De la Vara SR, Domínguez DJ (2002) Métodos de Superficie de Respuesta; un Estudio Comparativo. *Revista de Matemáticas: Teoría y Aplicaciones* 1: 47-65.
- [28] AOAC (1999) Official Methods of Analysis. 16th edn. Association of Analyst Chemists, Washington, DC.

- [29] Lopez-Cervantes J, Sanchez-Machado DI, Rosas-Rodriguez JA (2006) Analysis of free amino acids in fermented shrimp waste by high-performance liquid chromatograph. *J Chromatogr* 1105: 106-110.
- [30] FAO (2013) Findings and recommendations of the 2011 FAO Expert Consultation on protein quality evaluation in human nutrition. In: *Dietary Protein Quality Evaluation in Human Nutrition: Report of an FAO Expert Consultation*. FAO Food and Nutrition Paper 92. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, chapter 4, pp. 29.
- [31] Hsu HW, Vavak DI, Satterlee ID, Miller GA (1977) A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J Food Sci* 42: 1269-1273.
- [32] Satterlee LD, Kendrick JG, Marshall HF, Jewell DK, Alí RA, Heckman MM, Fred-Steinke H, Larson P, Phillips RD, Sarwar G, Slum P (1982) In vitro assay for predicting protein efficiency ratio as measured by rat bioassay: Collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 65: 798-809.
- [33] Serna-Saldívar SO, Abril-Domínguez JR, López-Ahumada G, Ortega-Ramírez R (1999) Nutritional evaluation of table bread fortified with defatted soybean and sesame meals. *Arch Latinoam Nutr* 49: 260-264.
- [34] Alarcón-Valdez C, Milán-Carrillo J, Cárdenas-Valenzuela OG, Mora-Escobedo R, Bello-Pérez A, Reyes Moreno C (2005) Infant food from quality protein maize and chickpea: Optimization for preparing and nutritional properties. *Int J Food Sci Nutr* 56: 273-285.
- [35] Fares C, Menga V (2012) Effects of toasting on the carbohydrate profile and antioxidant properties of chickpea (*Cicer arietinum* L) flour added to durum wheat. *Food Chem* 131: 1140-1148.
- [36] Özer EA, Herken EN, Güzel S, Ainsworth P, İbanoğlu S (2006) Effect of extrusion process on the antioxidant activity and total phenolics in a nutritious snack food. *Int J Food Sci Tech* 41: 289-293.
- [37] Delgado-Licon E, Martínez-Ayala AL, Rocha-Guzmán NE, Gallegos-Infante JA, Atienzo-Lazos M, Drzewiecki J, Martínez-Sánchez CE, Gorinstein S (2009) Influence of extrusion the bioactive compounds and the antioxidant capacity of the bean/corn mixtures. *Int J Food Sci Nutr* 60: 522-532.