



CYTAL-ALACCTA 2019
Buenos Aires, 20 – 22 noviembre 2019

RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS Y COMPUESTOS FENÓLICOS DE RAÍCES DE *Pachyrhizusahipa* PARA ENRIQUECER ALMIDONES LIBRES DE GLUTEN

M. Malgor¹, S.Z. Viña¹, C.Dini¹.

¹ CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos),
Facultad Ciencias Exactas UNLP – CONICET La Plata - CICPBA, 47 y 116 S/Nº,
La Plata (1900), Buenos Aires, Argentina.
E-mail: martinamalgor@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo principal del presente trabajo fue obtener almidones de *Pachyrhizusahipa* (ahipa) y de *Manihotesculenta* (mandioca) enriquecidos con proteínas provenientes de ahipa. Dicha obtención se realizó modificando ligeramente la extracción convencional de almidón, y los productos obtenidos fueron caracterizados. Inicialmente se realizó una extracción de las proteínas de raíces de ahipa peladas. Se utilizó buffer fosfato salino y se precipitaron las proteínas por punto isoeléctrico (pI=3,64, determinado por medida de potencial Z a pH entre 3 y 4) y centrifugación. Su baja masa molecular y alta polaridad condujo a muy bajos rendimientos de extracción, por lo que se planteó la obtención conjunta de las proteínas y el almidón. Así, la solubilización de proteínas se acopló al proceso de extracción de almidón: la pulpa de raíces de ahipa se trituroó con agua destilada (1 kg/l; 12 h de contacto). Luego se filtró, separando la lechada de almidón que se dejó decantar 12 h a 4°C. El residuo (bagazo) se sometió a una segunda extracción con agua, asistida en este caso con ultrasonido (5 pulsos de 1 min a 600 W). Se repitieron 4 pasos más de contacto entre el sobrenadante obtenido luego de decantar el almidón y el bagazo. Finalmente, el sobrenadante rico en proteínas y el almidón de ahipa obtenidos se combinaron en una relación de 35 g/l. Este proceso también se realizó con almidón de mandioca comercial para enriquecerlo con proteínas de ahipa. Los sobrenadantes en contacto con los almidones se llevaron a pH=3,64. Se dejaron decantar 72 h, obteniendo finalmente dos tortas de almidón enriquecido que se secaron 24 h a 40°C y se caracterizaron en base a su color (colorímetro Konica Minolta CR400), contenido de proteínas totales (método Kjeldahl), compuestos fenólicos (método Folin-Ciocalteu), propiedades térmicas medidas por DSC y análisis estructural mediante FTIR. El almidón de ahipa enriquecido presentó 3 veces más proteína que el nativo (1,91 y 0,63% respectivamente). El almidón de mandioca enriquecido presentó casi 30 veces más proteínas que el comercial (1,92 y 0,07% respectivamente). Los almidones controles (ahipa nativo y mandioca comercial) presentaron mayor índice de blancura (95,7 y 95,5) que los enriquecidos (91,2 y 90,9). Respecto al contenido de compuestos fenólicos, no hubo diferencias significativas ($P>0,05$) para los almidones de ahipa (19,2 µgGAE/g nativo y 20,3 µgGAE/g enriquecido) pero sí para los de mandioca (3,2 µgGAE/g comercial y 17,9 µgGAE/g enriquecido). Las propiedades térmicas no fueron significativamente diferentes en ninguno de los casos. Los espectros FTIR mostraron

que, aunque los almidones nativos exhiben un pico que se superpone al de la banda amida I de las proteínas de ahípa (1633 cm^{-1}), se observa un aumento del área de esta banda para ambos almidones enriquecidos, producto de su mayor contenido de proteínas. Los resultados mostraron que mediante una modificación sencilla y de bajo costo en el proceso de obtención de almidón de ahípa es posible enriquecerlo en proteínas y lograr un ingrediente potencialmente apto para obtención de productos horneados libres de gluten.

Palabras clave: cultivos no tradicionales, almidones enriquecidos, ingredientes libres de gluten, compuestos fenólicos.

1. Introducción

Con el fin de sustituir el gluten en la formulación de productos aptos para celíacos, se han utilizado proteínas de diferentes orígenes, hidrocoloides, emulsionantes, etc.(Onyango *et al.*, 2009). Además de mejorar la textura, las proteínas también mejoran la calidad nutricional de los alimentos libres de gluten (LG).

Las raíces y tubérculos (R&T) son una buena alternativa para mejorar las propiedades tecno-funcionales de los productos LG, ya que sus almidones presentan una gran diversidad en sus características (Moorthy, 2002). La mandioca es un ingrediente común en la producción de productos horneados LG, pero tiene una baja cantidad de proteínas. Por el contrario, las raíces de *Pachyrhizusahípa* (ahípa) muestran una cantidad de proteínas en el rango 7,9-11,5% (Dini *et al.*, 2013), superior al de la mayoría de las R&T (generalmente entre el 1-2%)(Chandrasekara y Kumar, 2016).

La mejora de las propiedades nutricionales y bioactivas de los ingredientes LG es importante ya que las dietas LG normalmente acarrearán insuficiencias en este aspecto. Particularmente, los compuestos fenólicos han demostrado disminuir los niveles de colesterol y prevenir la aterogénesis y la diabetes tipo II (Rocchetti *et al.*, 2019).

El objetivo del presente trabajo fue la obtención de almidones de ahípa y mandioca enriquecidos con proteínas de *P.ahípa*, factibles de ser utilizados como ingredientes para formular productos LG, y su caracterización desde un punto de vista tecnológico.

2. Materiales y Métodos

2.1. Material vegetal.

Las plantas de *ahípa* se cultivaron en el Paraje Esperanza, Misiones, Argentina. Las raíces se lavaron con agua corriente, se desinfectaron en solución de NaClO (250 ppm, 10 min), se cortaron en rodajas y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

2.2. Rendimiento de extracción de proteínas.

La primera extracción de proteínas se realizó como se muestra en la figura 1 a) usando buffer fosfato salino (PBS, pH 7,4) en vez de H₂O como solvente, aplicando ultrasonido (5 pulsos de 1 min a 600 W) con un sonicador de punta Vibra-Cell™. Las lechadas se dejaron decantar, y la torta de almidón se secó a 40°C y se molió. El bagazo restante se secó a 105°C y se molió. Los contenidos de nitrógeno de las raíces de ahípa peladas (secadas a 105°C y molidas), de los almidones y del bagazo seco se determinaron mediante el método Kjeldahl (AOAC, 1990), tal como todas las demás determinaciones de nitrógeno total realizadas en este trabajo. El rendimiento se calculó como:

$$\text{Rendimiento de extracción (\%)} = (N_{RA} - N_A - N_B) \times 100 / N_{RA}$$

N_{RA} : g de nitrógeno en la masa inicial de raíces de ahípa peladas

N_A : g de nitrógeno en el almidón

N_B : g de nitrógeno en el bagazo

2.3 Determinación del punto isoeléctrico (pI) y porcentaje de recuperación de proteínas.

Se realizó la extracción de proteínas con PBS como se describió anteriormente, y el sobrenadante se centrifugó (3500×g, 5 min) para eliminar el almidón restante, se trasvasó, se ajustó a pH 3,5 con HCl 0,5M y se centrifugó a 9000×g durante 20 min obteniendo un precipitado floculento. El sobrenadante se retiró casi en su totalidad, y los concentrados de proteínas de cada tubo se combinaron, se mezclaron, se tomaron alícuotas de 100 µl y se ajustaron a pHs entre 3 y 4 ($\Delta\text{pH}=0,1$) con HCl 0,5M. Se llevaron a 2 ml con agua desionizada, se dejaron reposar 30 min a T_{amb} y se determinó el valor de potencial Z utilizando un equipo Nano Particle Analyzer SZ-100 (Horiba Scientific). El pI se estimó interpolando para potencial Z=0 la curva de potencial Z vs pH. El concentrado proteico restante se llevó al pI determinado (3,64) y se centrifugó (9000×g, 20 min). El precipitado se resuspendió en agua desionizada y se liofilizó. Se determinó el contenido de nitrógeno y el porcentaje de recuperación se calculó como:

$$\text{Recuperación (\%)} = (N_p / N_{AR}) \times 100$$

N_p : g de nitrógeno en el polvo liofilizado

N_{AR} : g de nitrógeno en la masa inicial de raíces de ahípa peladas

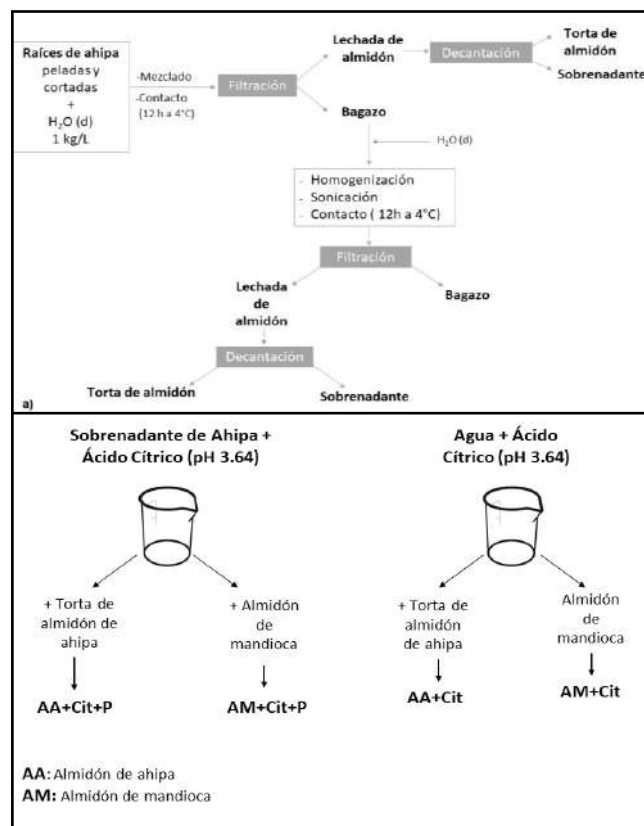
El perfil de aminoácidos del liofilizado proteico fue realizado por Covance Lab., EEUU. Para corroborar la eficiencia de la precipitación de proteínas al pI se realizó una nueva extracción como se describe en la Sección 2.2. Se tomaron alícuotas del sobrenadante antes y después de acidificar y centrifugar y se analizó el contenido de nitrógeno.

2.4. Efecto del pH en la interacción almidón-proteína.

Para estudiar la interacción entre el almidón y las proteínas, se extrajo almidón de ahípa utilizando PBS y la suspensión se dividió en cuatro partes, tres de ellas se ajustaron con ácido cítrico 1M a pH 3,06; 3,64 y 7,00, en agitación. Se dejó decantar el almidón y se secó a 40°C. La cuarta parte (sin ajuste de pH), se dejó decantar, se lavó con PBS y con H₂O, se dejó decantar nuevamente y se secó, siendo el control sin proteínas (almidón lavado). Se analizó el contenido de nitrógeno y el % de proteína se estimó utilizando 5,1 como factor de conversión. Este factor se calculó a partir del perfil de aminoácidos.

2.5. Uso de agua como disolvente de extracción de proteínas.

La extracción de proteínas se realizó como se describe en la Sección 2.2 usando PBS o



H₂O y los rendimientos de extracción se calcularon como se indica en esta sección.

2.6. Obtención de almidones de ahípa y mandioca enriquecidos en proteínas.

Figura 1. Obtención del almidón de ahípa y el sobrenadante rico en proteínas (a) y proceso de enriquecimiento de los almidones de ahípa y de mandioca con dicho sobrenadante, además de los controles con ácido cítrico (b)

La obtención se resume en la Figura 1 cuyos dos primeros pasos se describen en la Fig. 1a). Los sobrenadantes de ambos pasos se combinaron y se pusieron en contacto con el bagazo. Los siguientes cuatro pasos de extracción se realizaron como se describe para el primer paso de la Fig. 1a), pero usando los sobrenadantes combinados en lugar de agua. El almidón ahípa (AA) obtenido se dividió en tres fracciones iguales y el volumen del sobrenadante, en dos porciones. Una porción del sobrenadante se añadió a una fracción

de AA, y la otra a la misma cantidad de almidón de mandioca comercial (AM) hidratado. Las mezclas se llevaron a pH 3,64 (pI) con ácido cítrico 1M, se agitaron 2 h y se dejaron decantar a 4°C, obteniéndose los almidones enriquecidos de ahípa y mandioca: AA+Cit+P y AM+Cit+P, respectivamente (Figura 1B). A otra fracción del AA y a la misma cantidad de AM, se les agregó agua destilada y se llevaron a pH 3,64 con ácido cítrico, se agitaron y se dejaron decantar, correspondiendo a los controles tratados con ácido cítrico (AA+Cit y AM+Cit) (Fig. 1B). La tercera fracción de AA, sin ningún tratamiento, correspondió al almidón nativo (AA) de ahípa. Todas las muestras fueron secadas a 40 °C, molidas y tamizadas con tamiz de 35 mesh.

2.7. Caracterización de los almidones

2.7.1. Color, proteínas y compuestos fenólicos.

El color de los almidones nativos y enriquecidos se midió usando un colorímetro CR-400 Konica Minolta. Se registraron los valores de luminosidad (L^*) y cromaticidad (a^* y b^*) y se calculó el índice de blancura (WI) como se describe en Díaz *et al.* (2016):

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}}$$

El porcentaje de proteínas se estimó con el contenido de nitrógeno total usando un factor de conversión de 5,1. Los compuestos fenólicos se extrajeron con metanol:agua:HCl (80:19:1) y se cuantificaron por el método Folin-Ciocalteu, expresados como equivalentes de ácido gálico (GAE) por g.

2.7.2. Propiedades térmicas

Las propiedades térmicas de los almidones (suspensiones 20% p/p) se determinaron por DSC según Dini *et al.* (2013), en un equipo Q100 (TA Instruments), registrándose las temperaturas de inicio y de pico (T_o y T_p) y la entalpía del proceso (ΔH , J/g).

2.7.3. Espectroscopía ATR-FTIR

Los espectros FTIR del liofilizado proteico y de los almidones se obtuvieron usando un accesorio de diamante de reflectancia total atenuada, se les corrigió la línea de base y se normalizó la escala utilizando el software Omnic (v.9.2). Para los almidones, el área del pico centrado en 1633 cm^{-1} se determinó en el rango de 1550 a 1720 cm^{-1} . Se realizó una autodeconvolución de Fourier en el rango de 2500 - 3500 cm^{-1} (ancho de banda 80 cm^{-1} , resolución 3 y apodización NB fuerte) para determinar la posición de los picos, y luego se ajustaron al espectro original usando un ajuste gaussiano. El % de área de la

banda a 2851 cm^{-1} obtenida por deconvolución se calculó como la relación de su área respecto a la suma de las áreas de todos los picos en el rango, multiplicado por 100.

2.8. Análisis estadístico

Las determinaciones se llevaron a cabo al menos por triplicado. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) seguido de un test de Fisher de comparación de medias con el nivel de significación especificado ($P < 0,05$ o $P < 0,01$).

3. Resultados y discusión

3.1. Obtención de los almidones enriquecidos

La extracción del almidón de ahípa, en un proceso similar al utilizado regularmente para mandioca, produjo un sobrenadante con apreciable cantidad de proteínas. Estas proteínas se caracterizaron como pequeñas y altamente hidrofílicas (Dini *et al.*, 2015) por lo que se extrajeron fácilmente de los tejidos vegetales. La extracción de proteínas con PBS y sonicación generó un buen rendimiento de extracción: $91,3 \pm 0,5\%$. El pI estimado de las proteínas de ahípa a partir del gráfico del potencial Z fue de 3,64, que es particularmente bajo considerando que el pI de la mayoría de las proteínas alimentarias está en el rango de 4,5-5,5. La alta polaridad de estas proteínas deriva principalmente de su estructura primaria, que resultó rica en ácido aspártico (59,1%).

Aunque la extracción de proteínas fue eficiente, la recuperación por precipitación al pI fue muy baja ($2,3 \pm 0,1\%$), a pesar de que el precipitado de proteínas se observó a dicho valor de pH. Esto se corroboró analizando el contenido de proteína del sobrenadante antes y después de acidificar y centrifugar, lo que resultó en valores que no difirieron estadísticamente ($P > 0,05$): 65 ± 7 y 60 ± 5 mg/ml, respectivamente. Esto se atribuyó al pequeño tamaño y la alta polaridad de estas proteínas. Considerando que el contenido de proteínas del sobrenadante de extracción de almidón de ahípa no es lo suficientemente alto como para emplear procesos de recuperación más costosos, el desarrollo de almidones enriquecidos es una buena estrategia para aprovechar estas proteínas.

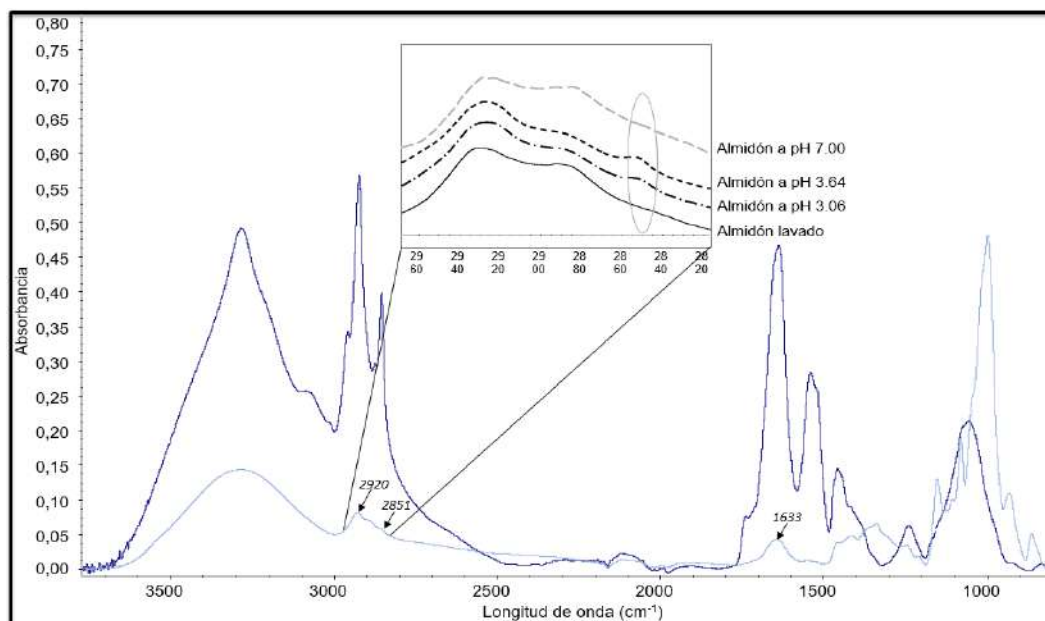
En un trabajo previo, el almidón de ahípa extraído con agua mostró un contenido de proteínas de $\sim 0,5\%$ y presencia de compuestos fenólicos (Díaz *et al.* (2016). Para determinar la naturaleza de la interacción entre las proteínas y el almidón, éste se llevó a diferentes pHs (3,06, 3,64=pI y 7,00), y se comparó con un almidón previamente lavado para eliminar las proteínas unidas. Como se observa en la Tabla 1, la cantidad máxima de proteínas se registró para los almidones en el pI, lo que sugiere una interacción física y no electrostática entre las proteínas y los gránulos de almidón. A pH 7, la cantidad de

proteínas fue aproximadamente el 25% de la obtenida en el pI y el lavado provocó una pérdida adicional de alrededor del 80% de las proteínas unidas, lo que demuestra una interacción débil entre las proteínas de ahipa y el almidón.

Tabla 1. Contenido de proteínas en los almidones de ahipa obtenidos a los diferentes pH.

Muestra	Proteínas (% p/p)
Almidón lavado	$0,12 \pm 0,04^a$
Almidón a pH 3,06	$1,96 \pm 0,04^c$
Almidón a pH 3,64	$2,37 \pm 0,08^d$
Almidón a pH 7,00	$0,65 \pm 0,01^b$

Las variaciones en el contenido de proteína de los almidones a diferentes pHs también se evidenciaron en sus espectros ATR-FTIR por la aparición de un pequeño pico en la zona de 2851 cm^{-1} (Fig. 2). Las proteínas de ahipa muestran bandas intensas en las zonas de 2920 y 2851 cm^{-1} debido a las vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas -



CH_2 de las cadenas laterales del ácido aspártico.

Figura 2. Espectros ATR-FTIR de los almidones de *P. ahipa* enriquecidos con proteínas (—) a diferentes pH, y de un concentrado de proteínas de ahipa (—)

La acidificación de los almidones al pI de las proteínas permite obtener un producto novedoso mediante un proceso fácil y de bajo costo. Sin embargo, el uso de PBS para la extracción de proteínas conlleva el problema de eliminar las sales de los almidones decantados sin perder las proteínas débilmente unidas, por lo que la extracción en dos

pasos con ultrasonido se analizó en un nuevo lote de raíces comparando agua versus PBS.

No se observaron diferencias significativas ($P>0,05$) en los rendimientos de extracción con PBS y agua: $88,43\pm 0,24$ y $87,46\pm 0,46\%$, respectivamente. Por lo tanto, las proteínas de ahípa extraídas con agua se usaron para enriquecer almidón de ahípa nativo y almidón comercial de mandioca, los cuales fueron caracterizados.

3.2. Caracterización de los almidones enriquecidos en proteínas.

En la Tabla 2 se observa que el contenido de proteína de los almidones enriquecidos resultó aproximadamente 3 y 17 veces mayor al de los controles para ahípa y mandioca, respectivamente ($P<0,01$). Los almidones enriquecidos de ambas fuentes exhibieron el mismo contenido final de proteína ($P>0,05$), indicando que la interacción proteína-almidón fue independiente del origen botánico del almidón. El contenido de proteína impactó directamente en el WI de los almidones, que se redujo significativamente ($P<0,05$) en comparación con el de los almidones nativos (Tabla 2). Sin embargo, el WI de todos los almidones fue mayor a 90, por lo que se consideran valores aceptables.

Tabla 2. Contenido de proteínas, compuestos fenólicos e índice de blancura (WI) para los almidones nativos y enriquecidos de ahípa y mandioca.

Muestra	Proteínas (% p/p)	TPC ($\mu\text{g GAE/g}$)	WI
AA	$0,63 \pm 0,00^c$	$19,2 \pm 0,6^{c,d}$	$95,7 \pm 0,2^{b,c}$
AA+Cit	$0,24 \pm 0,04^b$	$11,4 \pm 1,1^b$	$96,0 \pm 0,1^c$
AA+Cit+P	$1,91 \pm 0,06^d$	$20,3 \pm 0,9^d$	$91,2 \pm 0,3^a$
AM	$0,07 \pm 0,05^a$	$3,2 \pm 0,3^a$	$95,5 \pm 0,1^b$
AM+Cit	$0,06 \pm 0,03^a$	$2,2 \pm 0,7^a$	$97,0 \pm 0,0^d$
AM+Cit+P	$1,92 \pm 0,01^d$	$17,9 \pm 1,0^b$	$90,9 \pm 0,2^a$

El contenido de fenólicos totales (TPC) no varió significativamente para los almidones de ahípa enriquecido y nativo ($P>0,05$), por lo que la interacción almidón-fenólicos no se afectó con el pH. El contenido de TPC también resultó independiente del contenido de proteína, y no se relacionó directamente con su WI (Tabla 2). El contacto del almidón de mandioca con el sobrenadante de ahípa causó un incremento en TPC para AM+Cit+P, que resultó apenas inferior al del almidón nativo de ahípa (Tabla 2).

Los espectros ATR-FTIR de los almidones de ahípa y mandiocapresentan un pico que se superpone al de la banda amida I de las proteínas de ahípa (1633 cm^{-1}) (Fig. 2). Sin embargo, un aumento del contenido de proteína derivó en un aumento de esta banda

para ambos almidones (Tabla 3). Además, tal como se observó para el AA a diferentes pHs (región ampliada en la Fig. 2), en la deconvolución de las bandas en el rango 2500-3500 cm^{-1} de los almidones conteniendo proteínas (los enriquecidos AA+Cit+P y AM+Cit+P, y el almidón ahipa nativo), se reveló un pico característico de estas proteínas a 2851 cm^{-1} , que no se observó para las otras muestras.

La posición de otra banda de los almidones (ubicada a 2930 cm^{-1}) también se desplazó hacia números de onda más bajos con un contenido creciente de proteínas, lo que indica una contribución de la banda intensa de proteínas de ahipa a 2920 cm^{-1} (Fig. 2, Tablas 2 y 3).

Tabla 3. Espectro ATR-FTIR y propiedades térmicas de los almidones nativos y enriquecidos de ahipa y de mandioca.

Muestra	Área de pico 1633 cm^{-1}	Posición del pico (2920-2930 cm^{-1})	T_o (°C)	T_p (°C)	Entalpía (J/g)
AA	4,3 ± 0,3 ^{a,b}	2927,3 ± 0,8 ^b	63,3 ± 0,6 ^a	67,8 ± 0,3 ^a	14,1 ± 0,6 ^b
AA+Cit	4,0 ± 0,1 ^a	2929,7 ± 0,2 ^c	62,0 ± 0,5 ^a	66,8 ± 0,7 ^a	13,5 ± 1,2 ^b
AA+Cit+P	4,7 ± 0,3 ^b	2926,6 ± 0,8 ^a	63,4 ± 0,4 ^a	68,2 ± 0,3 ^a	10,7 ± 0,5 ^a
AM	4,3 ± 0,2 ^b	2930,1 ± 0,7 ^b	61,9 ± 0,4 ^b	67,0 ± 0,5 ^a	12,9 ± 0,9 ^a
AM+Cit	3,7 ± 0,3 ^a	2929,0 ± 1,1 ^b	57,2 ± 0,9 ^a	67,0 ± 0,3 ^a	13,2 ± 1,0 ^a
AM+Cit+P	6,1 ± 0,4 ^c	2926,1 ± 1,0 ^a	60,2 ± 0,8 ^b	68,7 ± 0,9 ^a	10,8 ± 0,8 ^a

Los parámetros térmicos de los almidones se muestran en la Tabla 3. Se observa que la acidificación redujo la temperatura de inicio (T_o) en el AM, pero la presencia de proteínas contrarrestó este efecto (Tabla 3), en concordancia con Yang *et al.* (2019) quienes informaron un aumento de T_o en el almidón de maíz con la adición de proteína de suero lácteo. Las muestras de AA exhibieron la misma tendencia, pero las diferencias fueron más leves y no resultaron significativas ($P > 0,05$). La T_p no se vio afectada para ninguna de las muestras pero sí se observó que el enriquecimiento con proteínas redujo significativamente ($P < 0,05$) la entalpía de gelatinización para el almidón ahipa. Aunque se ha informado que los compuestos fenólicos pueden modificar las propiedades térmicas de los almidones (Zhu, 2015), ello no se observó en este caso ya que la cantidad de fenoles totales fue similar para los almidones de ahipa nativo y enriquecido. La disminución en la entalpía de gelatinización se atribuyó a las proteínas, ya que esto

también se reportó para almidón de maíz con proteína de suero lácteo (Yang *et al.*, 2019) y para almidón de trigo con cantidades crecientes de proteínas del gluten (Mohamed y Rayas-Duarte, 2003).

4. Conclusiones

El ultrasonido en medio acuoso permitió un buen rendimiento de extracción de las proteínas de *P. ahipa*. La acidificación al pI (pH 3,64) generó almidones enriquecidos con WI >90, 18-20 µg GAE/gde fenoles totales y ~2% de proteínas, cuyos espectros ATR-FTIR revelaron bandas características de estas últimas. Respecto a las propiedades térmicas, la T_p no se vio afectada, pero el enriquecimiento con proteínas redujo la entalpía de gelatinización para el almidón de ahipa. Los almidones enriquecidos representan ingredientes LG novedosos, obtenidos en forma simple económica.

5. Agradecimientos

El trabajo fue realizado en el marco de los proyectos: PICT 2015-0921, PICT 2015-3249 (ANPCyT), y PIP 0555 (2013-2015, prorrogado).

6. Bibliografía

- AOAC. (1990). *Official methods of analysis, 15th edn. Vols I and II*. Arlington, Virginia, USA - Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Inc.
- Chandrasekara, A. & Josheph Kumar, T. (2016). Roots and Tuber Crops as Functional Foods: A Review on Phytochemical Constituents and Their Potential Health Benefits. *International Journal of Food Science*.
- Díaz, A., Dini, C., Viña, S.Z. & García, M.A. (2016). Starch extraction process coupled to protein recovery from leguminous tuberous roots (*Pachyrhizus ahipa*). *Carbohydrate Polymers*, **152**, 231–240.
- Dini, C., Doporto, M.C., García, M.A. & Viña, S.Z. (2013). Nutritional profile and anti-nutrient analyses of *Pachyrhizus ahipa* roots from different accessions. *Food Research International*, **54**, 255–261.
- Dini, C., Quiroga, A. V., Viña, S.Z. & García, M.A. (2015). Caracterización de un concentrado proteico obtenido a partir de harina de *pachyrhizus ahipa*: potenciales aplicaciones en la industria alimentaria. San Rafael, Mendoza, Argentina.: Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas (CLICAP).
- Mohamed, A.A. & Rayas-Duarte, P. (2003). The effect of mixing and wheat protein/gluten on the gelatinization of wheat starch. *Food Chemistry*, **81**, 533–545.
- Moorthy, S.N. (2002). Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches: A review. *Starch/Staerke*.
- Onyango, C., Mutungi, C., Unbehend, G. & Lindhauer, M.G. (2009). Creep-recovery parameters of gluten-free batter and crumb properties of bread prepared from pregelatinised cassava starch, sorghum and selected proteins. *International Journal of Food Science and Technology*.

- Rocchetti, G., Lucini, L., Rodriguez, J.M.L., Barba, F.J. & Giuberti, G. (2019). Gluten-free flours from cereals, pseudocereals and legumes: Phenolic fingerprints and in vitro antioxidant properties. *Food Chemistry*, **271**, 157–164.
- Yang, C., Zhong, F., Douglas Goff, H. & Li, Y. (2019). Study on starch-protein interactions and their effects on physicochemical and digestible properties of the blends. *Food Chemistry*, **280**, 51–58.
- Zhu, F. (2015). Interactions between starch and phenolic compound. *Trends in Food Science & Technology*, **43**, 129–143.