



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Método de secado en frío (liofilización) y secado en calor (spray dryer) para la obtención de concentrados proteicos de haba (*Vicia faba*).

Trabajo de Titulación. Modalidad: Proyecto de Investigación. Previo a la obtención del Título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Este trabajo es parte del proyecto: "Aislamiento y caracterización de nuevos ingredientes funcionales a partir de proteínas de Amaranto y Quinoa para la elaboración de un alimento funcional" aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por la Dirección de Investigación y Desarrollo (DIDE) de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución 1373-CU-P-2014. Coordinado por el Dr. Wilman Ismael Carrillo Terán.

AUTORA: Yosmahara Carolina Puruncajas Panta

TUTOR: Dr. Freddy Geovanny Del Pozo León

Ambato - Ecuador
Marzo-2017

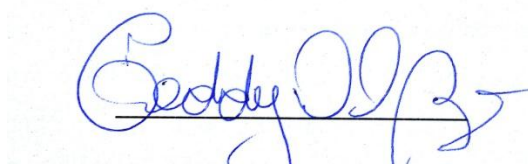
APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Freddy Geovanny Del Pozo

CERTIFICO:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 9 de febrero de 2017



Dr. Freddy Geovanny Del Pozo León

C.I. 180244627-6

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo Yosmahara Carolina Puruncajas Panta, manifiesto que los resultados obtenidos en el proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos son absolutamente auténticos y personales a excepción de las citas.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Yosmahara Panta', is written over a solid horizontal line.

Yosmahara Carolina Puruncajas Panta
CI.172357933-8
AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores calificadores aprueban el presente trabajo de titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato

Para Constancia, firman:



PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Dr. Milton Rubén Ramos Moya

CI. 180111963-5



Dr. Orestes Darío López Hernández

CI.1754784864

Ambato, 27 de marzo de 2017

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando ésta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Yosmahara Carolina Puruncajas Panta', is written over a solid horizontal line.

Yosmahara Carolina Puruncajas Panta
CI. 172357933-8

AUTORA

DEDICATORIA

A mis padres Marian y Armando, por todo el cariño, la paciencia, el apoyo y el amor que me brindado.

Por resguardarme con sus oraciones y ayudarme a ser cada día una mejor persona.

A mis hermanos Tamara, Christopher, Marlon por todo el amor que me tienen y estar siempre presentes acompañándome a realizar mis sueños.

AGRADECIMIENTO

GRACIAS DIOS POR TODAS TUS BENDICIONES.

A mi familia por su apoyo y confianza que han depositado en mí. Los amo

A mi primer tutor, Doc. Ismael Carrillo que me dio la oportunidad de ser parte de su proyecto, ya que sin su ayuda nada de esto hubiese sido posible, gracias por confiar en mí y apoyarme desde un inicio, por ayudarme siempre con sus consejos, por su paciencia y su valiosa guía.

A la Doc. Dayana Morales quien con su ayuda desinteresada me brindo sus conocimientos para que sea realidad este sueño, por brindarme su amistad y su tiempo. Su manera de trabajar, sus conocimientos, su paciencia y su orientación han sido fundamentales para ser posible el desarrollo de mi tesis. Por la cual le quedare eternamente agradecida.

A mi segundo tutor Doc. Freddy del Pozo por ser parte de mi proyecto, gracias por su dedicación, tiempo y por los conocimientos que me ayudaron a resolver dudas en este trabajo.

A todos los maestros de la FCIAL por el apoyo brindado a lo largo de mi carrera, por su amistad y los conocimientos que me ayudarán durante mi vida profesional.

A mi confidente Ángel Andrés Brito por todo el amor incondicional, por su compañía en los momentos más difíciles y alegres de mi vida, por el apoyo y ante todo por brindarme una amistad verdadera. <3

Y por último, pero no el menos importante, gracias a mis amigas LAS LADYS, por brindarme momentos maravillosos durante toda mi vida universitaria, por su linda amistad y que Dios nos permita ser amigas por siempre.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

Páginas Preliminares

APROBACIÓN DEL TUTOR	2
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	3
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO	4
DERECHOS DE AUTOR.....	5
DEDICATORIA.....	6
AGRADECIMIENTO	7
INDICE GENERAL DE CONTENIDO	8
Páginas Preliminares	8
CAPITULO I	18
EL PROBLEMA.....	18
1.1 Tema de investigación	18
1.2 Justificación	18
1.3 Objetivos	20
1.3.1 Objetivo general	20
1.3.2 Objetivos específicos	20
CAPITULO II	21
MARCO TEÓRICO.....	21
2.1 Antecedentes investigativos.....	21
2.1.1 Métodos de secado.....	22
2.1.2 Haba	23
2.1.3 Proteínas y polifenoles.....	25
2.1.4 Aislados proteicos	25
2.1.5 Métodos de cuantificación.....	26
2.1.6 Digestión de las proteínas	27
2.1.7 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	28

2.2 Hipótesis.....	29
2.2.1 Rendimiento de la proteína de haba aislada a diferentes pHs	29
2.2.2 Secado en frío y en calor de aislados proteicos de haba	29
2.3 Señalamiento de las variables de la hipótesis	29
2.3.1 Variable independiente.....	29
2.3.2 Variable dependiente.....	29
CAPÍTULO III	30
3.1 Materiales	30
3.1.1 Materia prima.....	30
3.1.2 Materiales de laboratorio	30
3.1.3 Equipos de laboratorio.....	30
3.1.4 Reactivos	31
3.2 Métodos.....	31
3.2.1 Análisis proximal	31
3.2.2 Obtención de aislados proteicos de la harina de haba	31
3.2.3 Determinación de Fenoles Totales (FT)	31
3.2.4 Caracterización de los aislados proteicos:	32
3.2.5 Simulación de la digestibilidad gastrointestinal de las proteínas de haba in vitro	35
3.2.6 Análisis RP-UHPLC	36
CAPÍTULO IV	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1 Análisis y discusión de resultados.....	37
4.1.1 Análisis proximal de la harina de haba.....	37
4.1.2 Rendimientos de los aislados proteicos de la harina de haba	37
4.1.3 Caracterización de aislados proteicos	40
4.1.3.1 Cuantificación proteica por método de BCA y Dumas.....	40
4.1.3.2 Determinación de Fenoles Totales	42
4.1.3.3 Caracterización de la proteína por Electroforesis	44

4.1.4 Digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i>	48
4.1.5 HPLC	50
CAPITULO V	56
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	56
5.1 Conclusiones	56
5.2 Recomendaciones.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	58
ANEXOS	61
.....	61
ANEXO A.....	62
FASE EXPERIMENTAL (FOTOGRAFÍAS)	62
ANEXO B.....	71
ANÁLISIS PROXIMAL.....	71
ANEXO C.....	73
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	73
ANEXO D.....	82
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LA CUANTIFICACIÓN PROTEICA Y CONTENIDO DE FENOLES TOTALES	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de precipitación de proteínas a partir de harina de haba.	37
Figura 2. Rendimientos de concentrados de proteína de haba	38
Figura 3. Concentración de proteína de haba entre los dos métodos de secado Liofilización y SD aplicando Dumas y BCA.	41
Figura 4. Promedios de contenido de fenoles totales solubles extraídos de los sobrenadantes	43
Figura 5. Técnica de electroforesis NATIVE-PAGE para muestras liofilizadas.....	44
Figura 6. Técnica de electroforesis NATIVE-PAGE para muestras secadas por Spray Dryer.	45
Figura 7. Técnica de electroforesis en ausencia de 2-mercaptoetanol para muestras secadas por Liofilización (Parte A) y spray dryer (Parte B).....	46
Figura 8. Técnica de electroforesis con 2-mercaptoetanol para muestras Liofilizadas (Parte A) y Spray Dryer (Parte B).....	46
Figura 9. Técnica de electroforesis 2D SDS-PAGE de proteína de haba a pH 5,0.	48
Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE con 2 mercaptoetanol para muestras liofilizadas. Comparación de la simulación gástrica de aislados proteicos (pH 5,0) a diferentes pHs de digestión 1,2; 2,0 y 3,2 y Simulación duodenal (pH 3,2).	49
Figura 11. Electroforesis SDS-PAGE con 2 mercaptoetanol para muestras secadas por Spray Dryer. Comparación de la simulación gástrica de aislados proteicos (pH 4,0) a diferentes pHs de digestión 1,2; 2,0 y 3,2 y Simulación duodenal (pH 3,2).	50
Figura 12. Perfil cromatográfico comparativo entre Liofilización y Spray Dryer a pH 2,0. ...	51
Figura 13. Perfil cromatográfico comparativo entre Liofilización y Spray Dryer a pH 3,0. ...	51
Figura 14. Perfil cromatográfico comparativo entre Liofilización y Spray Dryer a pH 4,0. ...	52
Figura 15. Perfil cromatográfico comparativo entre Liofilización y Spray Dryer a pH 5,0. ...	52
Figura 16. Perfil cromatográfico comparativo de los dos métodos de secado Spray Dryer y Liofilización para digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> a pH 1,2; 2,0; 3,0.....	53
Figura 17. Perfil cromatográfico comparativo en dos métodos de secado Spray Dryer y Liofilización para digestión duodenal a pH 3,2.....	54
Figura 18. Rendimientos de concentrados de proteína mediante el secado por Liofilización	75
Figura 19. Rendimientos de concentrados de proteína mediante el secado por Liofilización	76
Figura 20. Curva estándar de BCA a diferentes concentraciones y con una absorbancia de 562 nm.....	83
Figura 21. Concentración de proteína mediante el secado por Liofilización	85

Figura 22. Curva estándar de BCA a diferentes concentraciones y con una absorbancia de 562 nm 86

Figura 23. Concentración de proteína mediante el secado por Spray Dryer 87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición proteica (% de Albúmina, Globulina y Glutelina) de leguminosas. ..	24
Tabla 2. Aminoácidos esenciales presentes en la soja y haba g/16 g de N.....	24
Tabla 3. Porcentajes de rendimiento de concentrados de proteína de haba.....	38
Tabla 4. Cuantificación proteica por el método BCA	40
Tabla 5. Contenido de fenoles totales solubles (mg GAE/100g de muestra).....	43
Tabla 6. Análisis proximal de la harina de haba (PRODICEREAL)	72
Tabla 7. Análisis proximal del concentrado proteínico de haba (Liofilizado pH 4,0)	72
Tabla 8. Análisis estadístico del rendimiento obtenido de la proteína de haba por lioofilización a diferentes pHs.....	74
Tabla 9. Análisis de varianza de Rendimiento por Liofilización.....	74
Tabla 10. Cuadro de Análisis de Varianza de Rendimientos por Liofilización	74
Tabla 11. Test de Tukey para Rendimientos de muestras por Liofilización.	74
Tabla 12. Análisis estadístico del rendimiento obtenido de la proteína de haba por Spray Dryer a diferentes pHs.....	75
Tabla 13. Análisis de varianza de Rendimiento por Spray Dryer.....	75
Tabla 14. Cuadro de Análisis de Varianza de Rendimientos por Spray Dryer	76
Tabla 15. Test de Tukey para Rendimientos de muestras por Spray Dryer	76
Tabla 16. Cálculos del diseño experimental A*B para la determinación del mejor tratamiento.....	78
Tabla 17. Tabla de doble entrada del diseño experimental A*B.	79
Tabla 18. Análisis de varianza del diseño experimental A*B	80
Tabla 19. Tabla de doble entrada para el factor A.....	80
Tabla 20. Tabla de doble entrada para el factor B	81
Tabla 21. Absorbancias de las muestras de proteína de haba en la aplicación del método BCA para muestras Liofilizadas.....	82
Tabla 22. Desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración de proteína por medio de BCA para muestras Liofilizadas.....	84
Tabla 23. Análisis de varianza de concentración de proteína BCA por Liofilización	84
Tabla 24. Cuadro de Análisis de Varianza de concentración de proteína BCA por Liofilización	84
Tabla 25. Test de Tukey para la concentración proteica de muestras por Liofilización.	84
Tabla 26. Absorbancias de las muestras de proteína de haba en la aplicación del método BCA para muestras secada por Spray Dryer	85
Tabla 27. Desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración de proteína por medio de BCA para muestras secadas por Spray Dryer.....	86

Tabla 28. Análisis de varianza de concentración de proteína BCA por Spray Dryer	86
Tabla 29. Cuadro de Análisis de Varianza de concentración de proteína BCA por Spray Dryer	87
Tabla 30.. Test de Tukey para la concentración proteica de muestras por Spray Dryer	87
Tabla 31. Análisis de varianza del contenido de polifenoles totales.....	88
Tabla 32. Cuadro de Análisis de Varianza del contenido de polifenoles totales.	88
Tabla 33. Test de Tukey para el contenido de polifenoles totales.....	88

RESUMEN

En la presente investigación se caracterizó las proteínas de harina de haba (Vicia Faba) mediante precipitación isoeléctrica a diferentes pHs: 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; y con dos tipos de secado: liofilización y spray dryer, obteniendo mayor rendimiento por liofilización a pH 4,0 con 13,34% y menor rendimiento a spray dryer con 4,41%. El contenido de proteína se determinó mediante BCA y Dumas, con mayor porcentaje en muestras liofilizadas a pH 5,0. Además se evaluó el contenido de polifenoles obteniendo valores entre 159,87-371,53 mg GAE/100g. Mediante la electroforesis SDS-PAGE se observaron polipéptidos entre pesos moleculares de 14-97 kDa correspondientes a globulinas y albúminas. En la electroforesis 2D se encontró el punto isoeléctrico a pH 5,0 con bandas de alta expresión en rango de 66-97 KDa.

Los concentrados proteicos fueron sometidas a digestión gástrica a pH 1,2; 2,0 y 3,2; para los pHs 1,2 y 2,0, se identificó presencia de bandas correspondientes a proteínas globulinas 7S, globulinas 11S ácidas y básicas y albúminas; para el pH 3,2 se identificó albúminas resistentes a la acción de los jugos estomacales de la fase gástrica. En la digestión duodenal se continua la simulación digestiva gracias a la acción de las pancreatinas a pH 3,2, donde las bandas desaparecen al ser hidrolizados totalmente, excepto la banda de 6,5 kDa perteneciente a las albúminas. Se analizó la diferencia entre concentrados proteicos por Liofilización y Aspersion, indicando el grado de intensidad de las proteínas reflejadas en los picos cromatográficos RP-HPLC tanto para los concentrados e hidrolizados.

Palabras clave: Métodos de secados, leguminosas, proteína, electroforesis, digestibilidad.

ABSTRACT

In the present study, the bean flour proteins (*Vicia Faba*) are characterized by isoelectric precipitation at different pHs: 2.0; 3.0; 4.0; 5.0; And with two types of drying: lyophilization and spray drying, obtaining a higher lyophilization yield at pH 4.0 with 13.34% and a spray dryer with 4.41% less efficiency. The content of the protein was determined by BCA and Dumas, with the highest percentage in lyophilized samples at pH 5.0. In addition, the content of polyphenols was evaluated, obtaining values between 159.87-371.53 mg GAE / 100g. SDS-PAGE electrophoresis showed polypeptides between molecular weights of 14-97 kDa corresponding to globulins and albumins. In 2D electrophoresis the isoelectric point was found at pH 5.0 with high expression bands in the range of 66-97 KDa.

Protein concentrates were subjected to gastric digestion at pH 1.2; 2.0 and 3.2; For pHs 1,2 and 2,0, the presence of bands corresponding to 7S globulin proteins, acidic and basic 11S globulins and albumins was identified; For pH 3.2, it was identified albumins resistant to the action of the stomach juices of the gastric phase. In the duodenal digestion, digestive simulation is continued thanks to the action of the pancreatins a pH 3.2, where the bands disappear when totally hydrolyzed, except the band of 6.5 kDa pertaining to the albumins. The difference between protein concentrates by lyophilization and spray was analyzed, indicating the degree of intensity of the proteins reflected in RP-HPLC chromatograms for both concentrates and hydrolysates.

Keys word: Drying methods, legumes, protein, electrophoresis, digestibility.

INTRODUCCIÓN

La harina de haba es uno de los alimentos básicos con gran facilidad de conservación y riqueza nutricional **(Salas Salvadó, 2005)**.

El haba es un cultivo tradicional de la sierra ecuatoriana, de gran interés desde el punto de vista nutricional ya que aporta energía y nutrientes debido a la presencia de almidón y proteína. Su composición química varía en función del cultivo y condiciones de desarrollo. **(Augustin J., 1989)** Las habas también aportan con vitaminas (B₉, B, C, B₃), fibra, magnesio, potasio, fosforo, hierro y cinc **(Neira Mosquera, 2015)**.

Dentro de la composición química de haba (*vicia faba*), los cotiledones poseen más del 90% de las proteínas, carbohidratos, lípidos y minerales, mientras que la testa del haba contiene 9% aproximadamente de fibra y taninos **(Jorba, Elorrieta, & Juana, 2005)**.

Las semillas presentan alrededor de un 30% de proteína, cantidad que está directamente influida por la variedad o cultivar de haba, por condiciones climatológicas, zona de cultivo y nivel de maduración **(Jorba et al., 2005)**.

Las proteínas de haba presentan una buena capacidad emulsionante, están constituidas por dos fracciones principales que son las albúminas y las globulinas. Las albúminas son ricas en aminoácidos azufrados y lisina, mientras que las globulinas presentan convicilina, vicilina y legumina. Las albúminas constituyen del 10-20% y las globulinas alrededor del 70% de las proteínas que se encuentran en las semillas de las leguminosas como las habas. En menor proporción se encuentran las gluteninas y prolaminas **(Pasqualini S, 1991)**.

La relación entre el contenido de las proteínas presentes en aislados proteicos como globulinas, albúminas y vicilinas puede presentar diferencias en sus propiedades funcionales, físicas y térmicas, esto se debe al método que se aplica para la extracción.

Su aplicabilidad, funcionalidad y estabilidad dependerá de propiedades como retención y adsorción de agua y propiedades térmicas, siendo características de interés en el estudio de las proteínas para ser incorporadas en sistemas alimenticios **(Hernández García J.I. et al., 2016)**.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema de investigación

“MÉTODO DE SECADO EN FRÍO (LIOFILIZACIÓN) Y SECADO EN CALOR (SPRAY DRYER) PARA LA OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS PROTEICOS DE HABA (*Vicia faba*)”.

1.2 Justificación

Las leguminosas cumplen un rol primordial en la nutrición humana, ya que poseen un elevado contenido de proteína, y son excelentes fuentes de hidratos de carbono de digestión y asimilación lenta, fibra soluble, micronutrientes (vitaminas y minerales) y algunos componentes bioactivos minoritarios como ácido fólico, ascórbico y bajo contenido en grasa **(Arias & Sthepanie, 2012)**.

Una de las leguminosas con alto contenido proteico (24-32%) son las habas (*vicia faba*), aunque dependiendo del tipo, variedad, nivel de maduración, condiciones climáticas y zona de cultivo, dicho contenido puede variar. Las proteínas de leguminosas, como el haba son deficientes en aminoácidos como metionina y cisteína, pero ricas en lisina (6-7%). Las proteínas mayoritarias de reserva son las globulinas (60%), las albúminas (20%), las gluteninas (15%) y en menor proporción las prolaminas (5%) **(López, 1991)**.

A pesar de que las leguminosas tienen un alto valor nutricional y proteínico, son pocos los estudios que se han realizado en estas matrices, especialmente para las habas, siendo ésta una leguminosa de alto consumo a nivel del país. Por lo tanto en este estudio se quiere promover el uso de esta leguminosa para la obtención de aislados proteicos, a los cuales se les puede dar diversos usos a nivel industrial.

Los concentrados proteicos que se obtengan de esta leguminosa no solo deben poseer una buena calidad nutricional, sino además presentar una serie de características que permitan su inclusión en sistemas alimenticios y la consecuente obtención de productos funcionales. En este sentido, el proceso de secado puede resultar una etapa crítica para la

conservación de las propiedades funcionales de las proteínas, motivo por el cual se plantea el estudio comparativo de dos procesos diferentes de secado: liofilización y secado por aspersion (spray dryer).

Se busca promover el uso de nuevos métodos que permitan obtener buenos rendimientos del proceso, sin la modificación de las características de las proteínas y en último término aportar nuevos conocimientos en el área de alimentos funcionales y así contribuir al mejoramiento socio-económico de la población ecuatoriana.

Existen estudios comparativos de los procesos de secado, como el reportado por **(Modercay & Bermúdez, 1994)**, en el cual obtienen concentrados de haba mediante una extracción en base húmeda, utilizando solventes como agua y ácido clorhídrico, y aplicando métodos de secado por liofilización y rodillos paralelos calentados con vapor de agua y aire caliente, siendo más factible el secado por liofilización.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Obtener concentrados proteicos de haba (*Vicia faba*) mediante el uso de dos procesos de secado: liofilización y secado por aspersion (spray dryer).

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de rendimiento en la obtención de concentrados proteicos de haba (*Vicia faba*) aplicando dos métodos de secado (liofilización y spray dryer).
- Cuantificar el contenido de proteína por (BCA) ácido bicinonínico y Dumas, de los concentrados proteicos obtenidos.
- Caracterizar por peso molecular las proteínas de haba mediante la técnica de electroforesis (SDS-PAGE) sodio dodecil sulfato.
- Identificar la presencia de fenoles totales en la harina de haba.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos

El haba (*Vicia faba*) es la séptima legumbre de grano más importante del mundo, y se la utiliza tanto para alimentación humana como para la alimentación animal. Es originaria de Asia central, y su cultivo se ha extendido en varios países de Europa y de América Latina como Bolivia, Ecuador y Perú, especialmente en las zonas frías y templadas.

En el Ecuador se produce en áreas con una altitud de 2600 a 3500 ms.n.m, abarcando provincias como Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar, Chimborazo, Cañar, Azuay y Loja **(Rocha Espinoza & Vasquez Arreaga, 2011)** .

El contenido proteico del haba, es de alrededor de 24-32% y puede variar según las condiciones de su cultivo, variedad y nivel de maduración. Las proteínas mayoritarias de reserva son las globulinas (60%); albúminas (20%); gluteninas (15%) y en menor proporción las prolaminas 5% **(López, 1991)**.

Pocos estudios se han realizado en torno a esta leguminosa, **(Modercay & Bermúdez, 1994)**; obtuvieron concentrados proteicos de haba para que puedan ser empleados en productos alimenticios aptos para el consumo humano, consiguiendo más del 60% de proteína en base seca en las siguientes condiciones, suspensión de harina-agua con relación de 1:6 a pH 8 en agitación constante por 1h a 40°C y acidificando con HCl 1N hasta pH 5.5. Secaron la proteína aislada con el método de rodillos paralelos calentados con vapor de agua a 40 psi. El contenido proteico se cuantificó por el método de Kjeldahl. Con este método se obtuvo un rendimiento en el proceso del 78%, y la harina con un contenido de 30% de proteína.

Por otra parte,**(Cepeda, Villaran, & Aranguiz, 1998)**; obtuvieron concentrados de haba mediante dos métodos de secado, por pulverización o spray drying y secado por congelación. Estudiaron propiedades funcionales como solubilidad, emulsificación, retención de agua, viscosidad e hidrólisis enzimática. Para el aislado de la proteína utilizaron agua destilada y ajustaron el pH de la solución a 9, manteniendo en agitación durante 20 min y luego centrifugando para descartar el sólido residual. En la segunda fase el sobrenadante de proteínas se ajustó a pH 4 con agitación durante 20 min hasta obtener

el concentrado de proteína por medio de la centrifugación. Para el secado de la proteína se ajustó el pH a 7 tanto para liofilización y para secado por spray drying. Analizaron que el método de secado por pulverización es menos perjudicial en un 100% de la proteína original; mientras que con secado por congelación existe una desnaturalización de la proteína en un 10%, debido a que la solubilidad disminuye con la concentración de proteína, concluyendo que estas proteínas no serán muy eficaces en los procesos de gelificación, emulsificación o para la formación de espumas. El polvo de la proteína obtenida por pulverización presentó una higroscopicidad de 20.31% y en secado por liofilización de 0.78% esto se debe a que la absorción del agua total se incrementa con la concentración de proteína, es decir el concentrado producido por pulverización tiene mayor higroscopicidad por su mayor contenido de proteína.

(Macarulla et al., 2001) analizaron los efectos de la proteína aislada de haba sobre el metabolismo del colesterol de las ratas con hipercolesterolemia. Se suministraron dietas altas en grasa y ricas en caseína (contiene colesterol) también aislado de proteína de habas como fuente de proteína, durante 2 semanas. Los aislados de proteína fueron preparados por precipitación isoelectrica y secado por pulverización. Las ratas alimentadas con dietas de proteína de haba mostraron menor peso corporal e ingesta de energía que las ratas alimentadas con dietas de caseína. El aislado de proteína de haba mejora las alteraciones metabólicas inducidas por la alimentación con una dieta hipercolesterolémicos en comparación con la caseína.

2.1.1 Métodos de secado

2.1.1.1 Liofilización

Es un proceso de conservación de alimentos y materiales biológicos mediante sublimación. La liofilización evita pérdidas de compuestos volátiles o termo-sensibles y es una forma de desecado en frío. Conserva el alimento sin daños en los materiales biológicos y mantiene estables sus propiedades al rehidratarse.

La principal ventaja es la calidad del producto final, al prevenir el daño térmico, retener los volátiles diferentes del agua, facilitar el transporte fácil de los alimentos, inhibir microorganismos y recuperar propiedades del alimento. Sus principales desventajas son el alto costo y tiempo de procesamiento, alto consumo de energía y en consecuencia alto precio del producto final **(Ramírez Navas, 2006)**.

2.1.1.2 Spray dryer

Permite obtener productos en polvo a partir de líquidos y se lleva a cabo mediante el secado por atomización o aspersión, este proceso es capaz de transformar una disolución, emulsión, suspensión, o dispersión líquida en un producto seco **(Lozano Berna, 2009)**.

Los alimentos que son sensibles al calor se pueden secar a una presión atmosférica y a temperaturas bajas. El equipo es relativamente simple y el proceso permite la producción de grandes cantidades en operación continua. La temperatura de funcionamiento puede graduarse en función de la calidad deseada del producto en seco, siendo muy eficaz como otros tipos de secadores directos pero con el inconveniente de la alta inversión inicial.

2.1.2 Haba

El haba es miembro de la familia de las leguminosas, su cultivo es tradicional en la Sierra ecuatoriana y resulta de gran importancia en la dieta de la población rural y urbana. Generalmente se cultiva en asociación con otras especies como maíz, melloco, quinua, etc.; y se consume tanto en verde (vainas) como en seco (granos, harinas, etc.) **(Tipán & Fernando, 2014)**.

Esta leguminosa es típica por su doble función, usándose para la alimentación humana por su gran aporte de proteína en la dieta y en la alimentación animal. Por su importante rol en la fijación de nitrógeno atmosférico, el haba es utilizado en rotación de cultivos, además aporta nitrógeno, reduce plagas, enfermedades, malezas y mejora la retención de humedad en el suelo **(Valdivia & Jaramillo, 2011)**.

El grano de haba, tiene gran interés desde el punto de vista nutricional debido a la presencia de proteína y almidón. Es rico en vitaminas y microelementos y su composición química varía por su localización geográfica, función de cultivar y condiciones de desarrollo. Los cotiledones del grano de haba poseen más del 90% de las proteínas, carbohidratos, lípidos y minerales, mientras que la testa contiene la mayoría de la fibra 9% y restos de taninos **(Jorba et al., 2005)**.

Las proteínas de las leguminosas se clasifican en tres grupos: albúminas, globulinas y gluteninas y son deficitarias en aminoácidos azufrados (Tabla 1).

Tabla 1. Composición proteica (% de Albúmina, Globulina y Glutelina) de leguminosas.

Fracción	Soja	Cacahuete	Guisante	Frijol mungo	Haba
Albúmina	10	15	21	4	20
Globulina	90	70	66	67	60
Glutelina	0	10	12	29	15

Fuente: (Burraco, 2005)

En la Tabla 2 se puede observar que los aminoácidos azufrados como la metionina y cisteína son los valores más bajos en g/16 g de N.

Tabla 2. Aminoácidos esenciales presentes en la soja y haba g/16 g de N.

Aminoácido	Soja	Haba
Cisteína	1,3	0,8
Fenilalanina	4,9	4,3
Isoleucina	4,5	4,0
Leusina	7,8	7,1
Lisina	6,4	6,5
Metionina	1,3	0,7
Tirosina	3,1	3,2
Treonina	3,9	3,4
Triptófano	1,3	Sin analizar
Valina	4,8	4,4

Fuente: (Burraco, 2005)

El valor nutritivo de las habas depende de su estado, es decir si está fresca o seca, siendo el porcentaje de proteína más alto en habas secas, aunque la calidad nutricional de la proteína de haba es incompleta, ya que son deficitarias de aminoácidos azufrados como la metionina, cistina, triptófano, los cuales debe ser suplementados con el aporte de otros componentes en la dieta. Según (Gaytán Sánchez, 2014) las proteínas de habas se encuentran entre 26-34% de proteína por cada 100 gramos de haba seca, superando a los garbanzos, guisantes y lentejas con 17-21%; 20-26% y 20-28%, respectivamente; pero menor que las proteínas de soja que se encuentra entre 38-42%.

2.1.3 Proteínas y polifenoles

Las proteínas representan uno de los componentes principales de los alimentos, desde el punto de vista tanto funcional como nutricional. La consistencia y textura de algunos alimentos depende en gran parte de la naturaleza de las proteínas que lo constituyen **(Vioque et al., 2000)**.

La calidad de la proteína depende de la composición de aminoácidos esenciales presentes. Las proteínas de origen vegetal pueden ser extraídas para obtener aislados proteicos que generalmente contienen 90% de proteínas, este hecho convierte a los aislados proteicos en objeto muy atractivo desde el punto de vista nutricional, ya que podrían ser incluidos en la alimentación humana como ingredientes alimentarios en la medida que posean propiedades funcionales adecuadas **(Avanza & Añon, 2004)**.

Los polifenoles poseen la capacidad de formar complejos primordialmente con las proteínas, haciéndolas resistentes a la acción de las enzimas digestivas, y pueden por si mismos inactivar estas enzimas. En las leguminosas de granos, los polifenoles condensados se encuentran en la cascarilla de las semillas **(Brenes & Brenes, 1993)**.

Los polifenoles también reducen la expresión de la NADPH-oxidasa, una enzima que genera aniones superóxido en las células arteriales, sus efectos antioxidantes se extienden a las proteínas relacionadas con la inflamación, reduciendo la vasoconstricción y respuestas proinflamatorias y promoviendo la salud vascular, reduciendo el estrés oxidativo inducido por la degradación de óxido nítrico **(Aparicio Fernández & Alonsob, 2015)**

Los compuestos fenólicos se caracterizan por poseer anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos, están presentes ampliamente en frutas, verduras, leguminosas y algunas bebidas, son potentes antioxidantes indispensables para el funcionamiento de las células vegetales **(Kinsella, 1993)**.

2.1.4 Aislados proteicos

Existen diferentes métodos para la obtención de concentrados proteicos. Uno de ellos es la extracción de compuestos no proteicos mediante el uso de agua ajustada al punto isoeléctrico de las proteínas. Este método elimina la mayor parte de compuestos antinutricionales, sales y algunos compuestos nitrogenados no proteicos.

Las aplicaciones de tales aislados tienen lugar en alimentos tradicionales gracias a los parámetros de utilización y calidad, como color, aroma, textura, composición química y

nutricional; estos requerimientos determinan el grado de sustitución de proteína en los alimentos.

Los aislados proteicos también pueden ser modificados químicamente para mejorar propiedades como solubilidad, mediante la acilación y propiedades funcionales por desamidación. Entre otras aplicaciones funcionales está aclarar el color, mejorar textura (carnes, salchichas, productos de panadería y pastas), mejorar la funcionabilidad y procesado de pates y quesos, entre otras **(Vioque et al., 2000)**

2.1.5 Métodos de cuantificación

Existen diversos métodos para la cuantificación del contenido de proteína en aislados proteicos, entre ellos se encuentran:

2.1.5.1 DUMAS

El método de análisis por combustión o método Dumas, se lleva a cabo mediante pirólisis en una cámara de combustión, con la utilización del nitrógeno que es transportado con la ayuda de un gas hacia el detector donde iniciará la medición. Consta de una cámara de oxígeno donde se lleva a cabo la combustión a 850°C, una celda de termoconductividad y un microprocesador; los gases que se utilizan son oxígeno, aire comprimido y helio. El tiempo de análisis es de aproximadamente 3 minutos y se representa como porcentaje de proteína **(Cruz Lugo, 2013)**.

2.1.5.2 BCA

La cuantificación de proteína por el método BCA es altamente sensible, combina la reacción de las proteínas con Cu^{+2} en un medio alcalino produciendo Cu^+ , utilizando un reactivo altamente sensible y específico para la detección de Cu^+ llamado ácido bicinconómico (BCA). La reacción se presenta de color púrpura intenso, formado por la interacción de las dos moléculas del BCA con el ion Cu^+ , exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm y es soluble en agua permitiendo su cuantificación espectrofotométrica en solución acuosa **(Duhalt, 1998)**.

2.1.5.3 Electroforesis

La electroforesis se basa en la migración de solutos iónicos por medio de un campo eléctrico, en donde las partículas migran hacia electrodos negativos y positivos. Esta técnica tiene alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirve para separar mezclas complejas de proteínas, permitiendo además conocer parámetros como peso molecular, punto isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas **(Pérez, 2000)**.

La técnica de electroforesis PAGE- SDS permite el cálculo de parámetros moleculares, resulta diferente a otros tipos de electroforesis (PAGE en condiciones desnaturalizantes, PAGE en condiciones no desnaturalizantes) debido a que los complejos de proteína se separan estrictamente según su tamaño molecular. El detergente SDS interacciona con las proteínas y forman complejos de características comunes independientemente de cada proteína. Generalmente esta técnica es la más utilizada debido a que la mayoría de proteínas son solubles en SDS, todos los complejos SDS-proteína tienen carga negativa y migran, la separación depende de un parámetro físico-químico como la masa molecular en (kDa) que se puede calcular por medio de estándares, los complejos SDS- proteína se tiñen fácilmente, la densidad de carga resulta muy elevada y su velocidad de migración también lo que favorece a que la técnica de electroforesis sea más rápida. Este método de electroforesis exige tratar a la proteína con el detergente iónico SDS y mercaptoetanol o ditioneitol que permite desnaturalizar la estructura de la proteína para formar un complejo estándar. El detergente SDS se une con una molécula de proteína confiriéndole una carga neta negativa al quedar expuestos los iones sulfatos; mientras que el mercaptoetanol rompe los enlaces disulfuros en las proteínas. Este procedimiento cambia la estructura de la proteína deshaciendo el enroscamiento aleatorio del complejo y convirtiéndose en forma de una cadena de ancho constante. La movilidad de la proteína es en función del tamaño de la misma, la carga superficial del complejo es constante independientemente de la cadena que tenga el polipéptido **(Portillo, 2012)**.

2.1.6 Digestión de las proteínas

Las proteínas tienen un gran tamaño molecular, que no les permite ser absorbidas directamente por el proceso de digestión, sino que deben ser descompuestas por las enzimas proteolíticas en aminoácidos constituyentes, estas enzimas que degradan son producidas en el estómago, páncreas e intestino delgado. Las proteínas globulares se desnaturalizan a pHs ácidos permitiendo que la hidrólisis sea más accesible.

La digestión inicia en el estómago gracias a la acción del ácido clorhídrico que se sintetiza en las células parietales del estómago, desnaturaliza a las proteínas y activa el pepsinógeno (MW 40kDa) para convertirlo en pepsina y así iniciar la hidrólisis enzimática proteica. El pepsinógeno es un zimógeno o proenzima, es inactivo hasta que tenga un cambio bioquímico en su estructura por medio del ácido.

La segunda fase es la digestión por enzimas pancreáticas. Este comienza en el intestino delgado donde los péptidos producidos por las pepsinas son fragmentados a oligopéptidos y aminoácidos libres por acción de las proteasas de origen pancreático como la tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasas A y B y continúa a nivel de las células de la mucosa intestinal, que contiene también enzimas proteolíticas **(Hernández García J.I. et al., 2016; Pérez, 2000)**

Se define la digestibilidad de un alimento como la proporción de nitrógeno que es absorbido tras su digestión. A partir de balances de nitrógeno se mide la digestibilidad de las proteínas, basándose en su degradación tanto en péptidos como en aminoácidos libres. Este valor se encuentra para carne y leguminosas entre 94 y 78%, respectivamente.

La calidad de la proteína depende de la forma en que los aminoácidos son utilizados y aprovechados por el organismo, otros factores que influyen son los factores antinutrimientales, los cuales hacen referencia a sustancias presentes en los alimentos que reaccionan o interfieren con el nutrimento disminuyendo su disponibilidad en el organismo.

En algunos casos, en los concentrados y refinados de proteínas vegetales se encuentran inhibidores de tripsina y quimotripsina que inhiben la hidrólisis total de las proteínas de las leguminosas. Los factores antinutrimientales como taninos y fitatos se encuentran también en las proteínas de alimentos vegetales, siendo estos quienes intervienen con las proteínas y minerales **(Cerón Herrera, 2006)**.

2.1.7 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficiencia presenta varias ventajas como su alta sensibilidad, fácil manejo, exactitud en los resultados, tiempos cortos de análisis, entre otros; y es ideal para el análisis de compuestos volátiles o termolábiles **(Crouch, 2008)**.

En la actualidad, la técnica más comúnmente empleada es la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HLC) ya que permite la separación simultánea, identificación y cuantificación de diversos tipos de compuestos. Las columnas utilizadas son mantenidas a temperatura ambiente y para los sistemas de elusión binarios, se usa solventes acidificados acuosas (como ácido acético, ácido fórmico o perclórico) en metanol o acetonitrilo como solvente orgánico **(Aguilera Ortiz, 2011)**.

2.2 Hipótesis

2.2.1 Rendimiento de la proteína de haba aislada a diferentes pHs

Hipótesis Nula (H0): El pH no influye en el rendimiento de la proteína de haba y en su contenido proteico.

Hipótesis alternativa (H1): El pH influye en el rendimiento de la proteína de haba y en su contenido proteico.

2.2.2 Secado en frío y en calor de aislados proteicos de haba

Hipótesis Nula (H0): Los diferentes procesos de secado ensayados no afectan significativamente sobre la calidad y rendimiento de los aislados de proteína de haba.

Hipótesis Alternativa (H1): Los diferentes procesos de secado ensayados afectan significativamente sobre la calidad y rendimiento de los aislados de proteína de haba.

2.3 Señalamiento de las variables de la hipótesis

2.3.1 Variable independiente

Procesos de secado de la proteína de haba (método en frío y en calor).

Cuantificación de la proteína de haba por método de Dumas y BCA.

2.3.2 Variable dependiente

Rendimiento de los aislados de proteína de haba obtenidos.

Cantidad de proteína obtenida en los aislados proteicos.

Calidad de las proteínas obtenidas.

Efectos del pH sobre la digestibilidad gástrica y duodenal de las proteínas de haba.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Materia prima

Harina de haba marca PRODUCEREAL.

3.1.2 Materiales de laboratorio

- Vasos de precipitación
- Balones de aforo
- Probetas
- Varillas de agitación
- Magneto
- Espátula
- Kit de micropipetas
- Tubos para centrifugar
- Cajas Petri
- Puntas para micropipetas
- Tubos eppendorf
- Envases herméticos
- Tiras de pH
- Goteros
- Rotuladores
- Guantes látex

3.1.3 Equipos de laboratorio

- Balanza analítica precisa gravimétrica AG Pietikon
- Balanza analítica OHAUS Modelo V71P30T
- Balanza VWR-224AC
- Centrífuga, eppendorf Modelo 5702
- Congelador Mabe
- Congelador Panasonic Healthcare ultra-low Temperature freezer
- Destilador de agua, Easy Linea 150
- Equipo de electroforesis, mini-protean, Tetra System, BIO-RAD
- Espectrofotómetro convencional de haz simple Modelo DR-500
- Estufa incubador Modelo In-010
- Liofilizador Bench Top Pro Modelo BTP-3ES0VW
- Microcentrifuga Labnet Modelo C2400-B
- Microincubador, Esco, Provolcell Shaking
- pHmetro Mettler Toledo y Thermo scientific
- Plancha de calentamiento y agitación VWR
- Refrigerador Indurama Modelo RI-470
- Vortex Mixer VWR
- Equipo para cuantificación de proteína DUMAS nitrogen analyzer NDA 701, VELP SCIENTIFICA
- Equipo para RP-UHPLC de Agilent Technologies modelo 1260 Infinity

3.1.4 Reactivos

- Hidróxido de sodio
- Ácido clorhídrico
- Cloruro de sodio
- Bicarbonato de sodio
- Enzimas
- Sales biliares
- Mercaptoetanol
- Tris-HCl
- Acrilamida
- SDS (dodecil sulfato sódico)
- Temed
- PSA (persulfato de amonio)
- Glicina
- Pepsina Gástrica Folin-Ciocalteu
- Glicerol
- Azul de bromofenol
- DMSO
- Azul de coomassie
- Agua desionizada
- Reactivo de Biuret
- Reactivo BSA
- Ácido acético glacial 100 %
- Metanol
- Pancreatina

3.2 Métodos

3.2.1 Análisis proximal

El análisis proximal se realizó en el laboratorio de control y análisis de los alimentos (LACONAL) de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos. Los análisis realizados se determinaron de acuerdo a los métodos **AOAC (2012)**.

3.2.2 Obtención de aislados proteicos de la harina de haba

Se obtuvieron los aislados proteicos de haba siguiendo el método descrito por Martínez y Añon (1996) con modificaciones. La harina de haba fue suspendida en agua en una relación 10:100 y se ajustó el pH de solubilización a pH 8,0 manteniendo en agitación en una plancha Isotemp (Fisher Scientific) durante una hora. Luego, la solución fue llevada a una centrífuga marca Labnet a 4400 rpm por 30 minutos, del resultante se descartó el precipitado y se trabajó con el sobrenadante. Se ajustó el pH de precipitación a pH 2,0; 3,0; 4,0; y 5,0. Se trabajó con tres réplicas. Los aislados proteicos obtenidos a diferentes pHs se secaron en un liofilizador Vir Tis SP SCIENTIFIC. Para el secado mediante el Spray Dryer (Labplant), la cantidad de harina y agua se triplicó y se procedió con el mismo procedimiento detallado anteriormente.

3.2.3 Determinación de Fenoles Totales (FT)

La determinación de fenoles totales se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Vasco et al., (2008) con modificaciones. Se utilizó los sobrenadantes obtenidos a los diferentes pHs de precipitación (2,0; 3,0; 4,0; y 5,0). En un matraz de 5 mL se colocó 100 ul

del sobrenadante y se mezcló con 0,1 mL del reactivo Folin-Ciocalteu, el matraz se mantuvo en agitación en un vórtex durante 3 min, luego se añadió 2 mL de carbonato de sodio al 7.5% y se aforó con agua destilada hasta tener un volumen de 5 mL, se mantuvo en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 750 nm, y los valores obtenidos se expresaron como equivalentes de ácido gálico (GAE).

3.2.4 Caracterización de los aislados proteicos:

3.2.4.1 Cuantificación proteica:

La cuantificación de proteínas de haba en los aislados proteicos se realizó por dos métodos: BCA y Dumas.

Método de BCA (ácido bicinonínico)

Se utilizó un kit comercial de la marca Thermo Fisher Scientific catálogo N°23252.

- Preparación de las muestras a diferentes concentraciones.

En un tubo eppendorf se pesó 1 mg de la muestra secada por liofilización para cada uno de los diferentes pHs y se añadió 1 mL de agua para la primera concentración de 1000; la segunda disolución de 750 se añadió 0,75 mL de la primera concentración y 0,25 de agua; la tercera disolución es de 500 se añadió 0,67 mL de la segunda concentración y 0,33 de agua, y la última disolución de 250 es con 0,5 mL de la tercera concentración y 0,5 de agua.

- Preparación del reactivo BCA

Para preparar el reactivo BCA se mezcló la parte del Reactivo A y Reactivo B del Kit BCA Protein Assay. Se inició con la suma del número de muestras totales más el número de estándar, esta cantidad es multiplicada por 2 mL de solución del reactivo blanco y azul. El resultado se dividió por 51 partes del reactivo AB para obtener la cantidad de volumen a usar de reactivo B y la diferencia constituye el reactivo A.

- Preparación de los estándares y muestras

Se prepararon los nueve estándares siguiendo los pasos del protocolo, luego en tubos eppendorf se agregó 100 µl de cada estándar y 2 mL de la mezcla del reactivo AB. El mismo procedimiento se hizo con las muestras a concentraciones de 1000, 750, 500 y 250.

Todas las muestras de estándares y concentraciones con reactivo AB se mantuvieron en la estufa a 60°C por 30 min.

- Análisis en el espectrofotómetro

Se midió la absorbancia a 562 nm con un espectrofotómetro marca Hach. Se realizaron tres réplicas y los resultados se compararon con una curva de estándares del Kit. Se repitió la misma metodología para las muestras obtenidas mediante el secado por spray dryer.

Método de Dumas

El método dumas permite obtener el porcentaje de proteína de haba de los diferentes asilados, secados por liofilización y por spray dryer, se utilizó un equipo Vel Scientifica-NDA Series. Para ello se pesó 50 mg de la muestra liofilizada y secada por spray dryer para formar una especie de pastilla y ubicarla dentro del equipo para su análisis.

Se seleccionó una curva de calibración con EDTA, adecuada para el rango de concentración de proteína de la muestra, luego se ajustaron los siguientes factores:

- Factor de oxígeno (mL O₂ / mg de muestra): 1,8.
- Caudal de oxígeno (mL O₂ / min): 400.
- Factor de proteína: (% N = xpf PROT): 5,7.

3.2.4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE y Native-PAGE:

Para caracterizar la proteína de haba se utilizó la técnica de electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970) con modificaciones; se usó el equipo Bio-Rad, modelo Mini Protean II (Bio-Rad Life Science, USA).

- Preparación de la muestra:

Se pesó 10 mg de proteína de haba en tubos eppendorf y se añadió 1 mL de agua destilada. Se mezcló hasta obtener una solución proteica. Se prepararon tres muestras: para el primer tubo se tomó 200 µl de la solución proteica y se añadió 200 µl del buffer con mercaptoetanol; en el segundo tubo se colocó 200 µl de la solución y 200 µl del buffer sin mercaptoetanol y en el tercer tubo se añadió 200 µl de la solución y 200 µl del buffer native. Al tener preparados las diferentes muestras se procedió a calentarlas a 90°C por 5 minutos a 500 RM en un microencubador.

El buffer con mercaptoetanol contiene: agua destilada (4,8 mL), Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (1,2 mL); glicerol puro (1,0 mL), SDS al 10% (2,0 mL), mercaptoetanol (0,6 mL) y azul de bromofenol.

El buffer sin mercaptoetanol contiene: agua destilada (4,8 mL), Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (1,2 mL); glicerol puro (1,0 mL), SDS al 10% (2,0) y azul de bromofenol.

El buffer Native-PAGE contiene: 1M Tris-HCl pH 6,8 (3,1 mL); azul de bromofenol (0,5 mL); H₂O destilada (1,4 mL) y glicerol (5 mL). Y el Buffer running: Tris (1,5 g); glicina (1,5 g); H₂O destilada (500 mL).

- *Preparación de los geles de poliacrilamida*

Gel inferior al 16%: se utilizó agua destilada (1,2 mL); Tris- HCl pH 8,8 (1,3 mL); Acrilamida (2,7 mL); SDS 10% (75 µl); Temed (tetrametiletilenediamina) (10 µl); PSA (persulfato de amonio) al 10% (20 µl). Se añadió agua destilada hasta el tope superior y se esperó a que gelifique.

Gel superior al 4%: se utilizó agua destilada (2,2 mL); Tris- HCl (1,5 M) pH 6,8 (0,42 mL); Acrilamida 30% (0,7 mL); SDS 10% (3,3 µl); Temed (6 µl); PSA 10% (20 µl). Antes que gelifique el gel superior se colocó el formador de pocillos hasta que gelifique, el mismo que se lo retira para armar el equipo.

Los dos geles forman uno solo gel al colocarlos dentro de dos placas de vidrio formando un gel de 1 mm de espesor. Los geles pasan al equipo de electroforesis, donde se añadió en cada pocillo 15 µl de las muestras antes preparadas. Cabe resaltar que en el primer pocillo se coloca el estándar de pesos moleculares Dual Color de Bio Rad # 161-03734, el cual abarca un rango de 10 a 250 kDa.

Se añadió en el equipo de electroforesis con los geles preparados el buffer running: Tris-HCl (3 g/L), Glicina (15 g/L) y SDS (15 g/L) cubriendo todos los geles dentro y fuera de esta.

Para el Gel Native-PAGE es la misma preparación del gel superior e inferior mencionada anteriormente, pero se omite el SDS al 10%.

La corrida de los geles se realizó a 200 Voltios durante un tiempo aproximado de 30 min. Los geles ya listos pasaron a ser teñidos con una solución de Coomassie brilliant blue R-250 durante 2 horas y posteriormente sumergidos en una solución de desteñido compuesta de 50% metanol, 5% ácido acético y 45% agua. Finalmente, se lavaron los geles con agua destilada para tomar las fotografías.

Este procedimiento se realizó para los aislados proteicos tanto liofilizados y secados por Spray Dryer a los diferentes pH de precipitación.

3.2.4.3 Aplicación de la técnica analítica de electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D PAGE)

La técnica de electroforesis 2D-PAGE se emplea para la separación de proteínas sin actividad enzimática. Consiste en la combinación de una primera separación en gel de poliacrilamida SDS en función del punto isoeléctrico de las proteínas y una segunda separación en función del tamaño. Las proteínas se muestran mediante una tinción con plata y son comparadas con los patrones que se obtienen para cada muestra. Esta técnica es menos utilizada debido a su coste superior y a la complicación de la interpretación de resultados (Jiménez & Collada, 2000).

La muestra con mayor cantidad proteínica (muestra liofilizada a pH 5,0) fue analizada mediante la técnica 2D-PAGE que permitió identificar isoformas de las proteínas de haba a través de su punto isoeléctrico y patrones de peso molecular. Para su procedimiento se siguió el método descrito por O'Farrell, (1975). Se pesó 0,5 mg de la muestra liofilizada para proceder con la rehidratación por 21 horas a 50 voltios a 20°C. Se colocó la muestra en un pocillo de la bandeja IEF (Isoelectroenfoque). Luego una tira de IPG (immobilized pH gradient) de un rango de pH 3,0 a pH 10,0 fue colocada sobre la muestra con el gel hacia abajo evitando la formación de burbujas. La cara posterior del gel se cubre totalmente con aceite mineral (0,5 mL) y se da inicio a la rehidratación. Posteriormente, las tiras fueron puestas en la parte superior de un gel de poliacrilamida al 12% y las proteínas fueron separadas por su peso molecular a 200 V durante 30 minutos.

EL equipo PROTEAN i12 IEF System de Bio-Rad realiza la separación por carga y luego se procede a la separación por pesos moleculares. Por último, se realizó la electroforesis SDS-PAGE en presencia de mercaptoetanol preparado un gel concentrador al 4 % de acrilamida y un gel separador al 20 %.

3.2.5 Simulación de la digestibilidad gastrointestinal de las proteínas de haba in vitro

Según los resultados obtenidos por cuantificación proteica, se realizó la simulación de la digestibilidad gastrointestinal in vitro simulando las condiciones fisiológicas de la digestión humana, se ocupó el pH de precipitación en el que se obtuvo mayor cantidad de proteína en las muestras liofilizadas, resultando el pH 5,0 y para las muestras secadas por Spray Dryer el pH 4,0. Se siguió el método propuesto por Jiménez-Saiz et al. (2011).

Digestión gástrica: Se pesó 10 mg del aislado proteico de las muestras liofilizadas y secadas por Spray Dryer a pH 5,0 y pH 4,0, respectivamente. Se prepararon tres muestras para cada caso, añadiéndose 1 mL de fluido gástrico simulado SGF NaCl (0,35M) de pH 1,2 al primer tubo; 1 mL de SGF NaCl (0,35M) de pH 2,0 al segundo tubo; y finalmente 1 mL de SGF NaCl (0,35M) de pH 3,2 al tercer tubo. A cada muestra se le añadió 100 µl de solución de pepsina a una concentración de 2000 U/mg, y para comenzar la reacción se colocaron los tubos en el microincubador Esco, Provolcell Shaking a 37°C por 60 minutos a 500 RPM. Para detener la reacción se adicionó 200 µl de bicarbonato de sodio y se mantuvo a 90°C por 10 min.

El grado de hidrólisis de la proteína se determinó mediante electroforesis SDS-PAGE, para lo cual se tomó 200 µl de la muestra y 200 µl del buffer con β-mercaptoetanol, se calentó a 90°C por 5 minutos y se realizó el gel de la fase gástrica.

Digestión duodenal: Se repitió el mismo procedimiento de la digestión gástrica únicamente con el pH 3,2 de SGF NaCl (0,35M). Al finalizar los 60 min de la digestión, se toma 1 mL de la solución (digestión gástrica) y 1 mL de la solución de pancreatina a una concentración de 100 U/mg, la mezcla se incubó a 37°C por 120 minutos a 500 RPM. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción manteniéndola a 90°C por 10 minutos a 500 RPM. Para el gel de la fase duodenal se tomó 200 µl de la muestra y 200 µl del buffer con β-mercaptoetanol, se calentó por 90°C por 5 minutos para su análisis en electroforesis SDS-PAGE.

3.2.6 Análisis RP-UHPLC

Preparación de la muestra: Se pesó 5 mg de los aislados de proteína para todos los pH tanto en muestras liofilizadas como secadas por Spray Dryer en tubos eppendorf donde se añadió 1 mL de agua destilada, se agitó con un Vortex (VWR Analog Vortex Mixer) hasta homogenizar la solución.

La muestra se centrifugó por 1 minuto y por medio de unas jeringas totalmente desinfectadas con doble enjuague en agua y doble enjuague en metanol se tomó el sobrenadante de las muestras y se pasaron en los viales ámbar por medio de un filtro desechable. Luego se cerró y se colocó dentro del equipo que consiste en dos fases: (fase A) compuesto por agua Milli-Q + 0,27 % (v/v) de ácido trifluoroacético TFA y la (fase B) compuesto por metanol + 0,27 % de TFA. El gradiente de trabajo fue de 0 % B hasta 70 % B en una rampa de 12 minutos y con un flujo de 1 mL/min. Se utilizó una columna EC C18 de 4,6 mm y 2,5 µm de tamaño de partícula (Zorbax). La detección se realizó a 280 nm y los datos fueron procesados mediante el uso del equipo para RP-UHPLC de Agilent Technologies modelo 1260 Infinity.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis y discusión de resultados

4.1.1 Análisis proximal de la harina de haba

En las tablas 6 y 7 se muestra los análisis proximales de la harina de haba y del concentrado de harina de haba, respectivamente. Se puede observar que el contenido de proteína del concentrado (63,6%) es muy alto con respecto a la harina (16,1%).

4.1.2 Rendimientos de los aislados proteicos de la harina de haba

Para la determinación del rendimiento, los concentrados proteicos que se obtuvieron por precipitación isoelectrica a pH 2,0; 3,0; 4,0 y 5,0, fueron secados por el método de liofilización y spray dryer (SD). Se puede observar en la figura 1 la diferencia de cantidad de la proteína a los distintos pHs, se evidencia en el pH4 mayor cantidad mientras que a pH 2 no se observa precipitación.

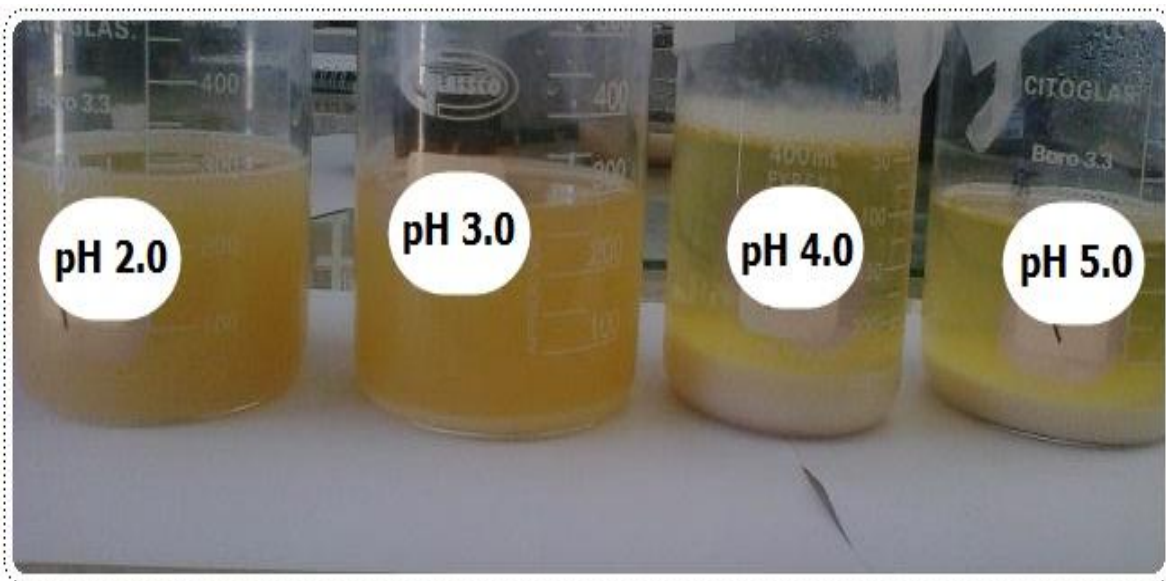


Figura 1. Proceso de precipitación de proteínas a partir de harina de haba.

Fuente: Laboratorio BIO- PROPEPTI

La diferencia entre las muestras se comprueba mediante un análisis estadístico Tukey que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Porcentajes de rendimiento de concentrados de proteína de haba.

pH	Liofilización (%)	Spray dryer (%)
2	0,51 ^a ± 0,047	1,59 ^a ± 0,064
3	2,94 ^{ab} ± 0,045	3,25 ^b ± 0,006
4	13,34 ^c ± 0,201	4,41 ^d ± 0,018
5	5,10 ^b ± 0,095	3,90 ^c ± 0,057

Los valores en la tabla representan la media en porcentaje de 3 mediciones con la desviación estándar. Las letras diferentes muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cada pH del grupo de rendimientos en muestras Liofilizadas y en Spray dryer.

Elaborado por: Puruncajas, Y. 2016

Fuente: Laboratorio de alimentos funcionales (Biopropepti) FCIAL-UTA

El análisis de varianza indica que los rendimientos de la proteína de haba están influenciados por el método de secado, tal como se representa en la figura 2

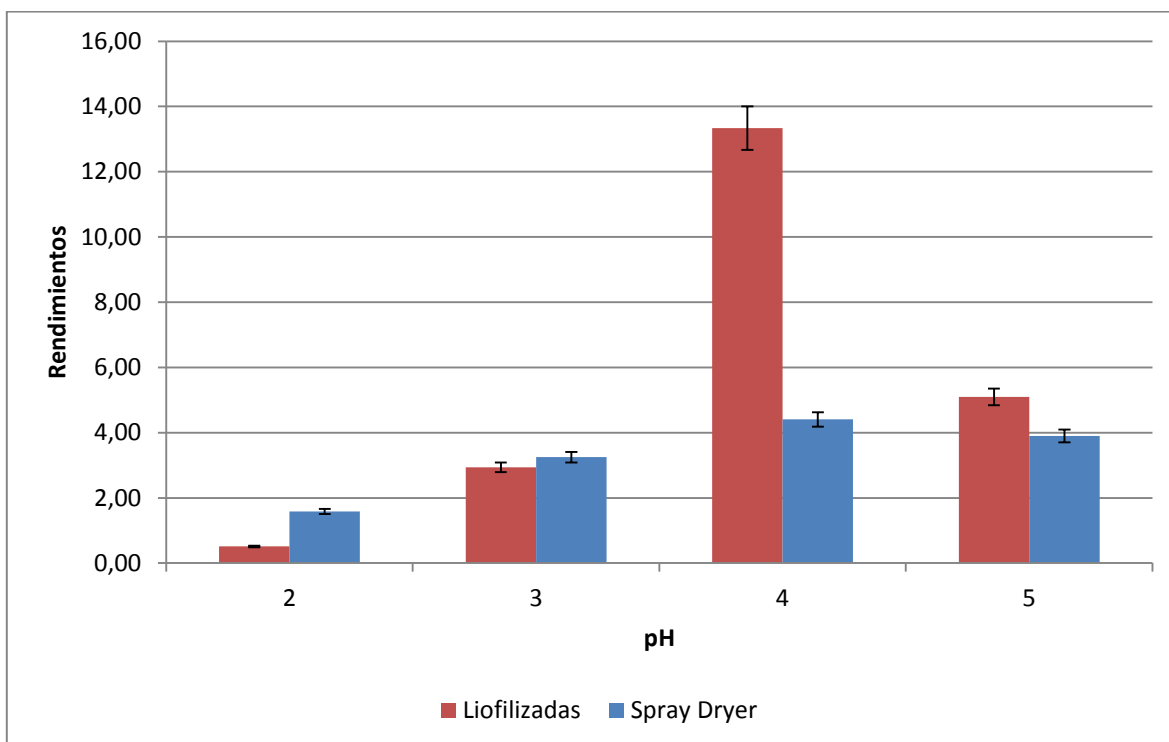


Figura 2. Rendimientos de concentrados de proteína de haba

Tanto con el método de secado por Liofilización, como por spray dryer el tratamiento a pH 4,0 contiene mayor porcentaje de proteína 13.34% y 4.41%, respectivamente; obteniendo diferencias entre los dos procesos de secado analizados. El método de spray dryer presenta muchas pérdidas por la acumulación de material en las paredes del equipo, lo que reduce el rendimiento. Por otra parte, la cantidad de muestra con la que se debe iniciar es mayor en comparación al proceso de secado por liofilización. Existen factores que se deben considerar para conseguir un adecuado secado por spray dryer como son: la naturaleza de la emulsión, es decir el contenido de sólidos, la viscosidad y la temperatura. En la figura 1 se observa que a pH 2 no se precipita la proteína pero al secar por SD, éste tratamiento contiene el mayor rendimiento, esto se puede deber a una mayor homogenización de la emulsión, lo cual facilita el proceso **(Gómez Cruz & Jiménez Munguía, 2014)**

(Hernández García J.I. et al., 2016; Modercay & Bermúdez, 1994) mencionaron que el pH isoeléctrico de la proteína de haba está entre un rango de pH 4,0-5,5 donde se observa mayor precipitación y mayor contenido proteico de aproximadamente un 70%. En este estudio se obtuvo mejores rendimientos a pH 4,0 encontrándose dentro de los límites reportados bibliográficamente. El medio de extracción que se utilice influye en las velocidades de precipitación y sedimentación de las mismas, debido a residuos de aminoácidos o puentes disulfuros que puedan encontrarse en las proteínas de haba y puedan ser disociados o no en las soluciones acuosas.

Existen diferencias intrínsecas en los procesos de secado, objetos de este estudio. Es así que en el SD el producto final es muy propenso a la humedad, es decir que rápidamente forma costras sobre la superficie, ocurre pardeamiento y pérdida de volátiles. Mientras que el proceso de liofilizado permite obtener un producto con menor contenido de humedad, al eliminar el agua libre y el agua débilmente ligada obteniendo concentrados de mejor calidad, evita el rápido pardeamiento no enzimático y las pérdidas de volátiles.

El tipo de producto (en polvo, en gránulos o aglomerados) a obtenerse mediante secado por SD depende de las propiedades físicas y químicas del material, el diseño y la operación del equipo. La velocidad del secado es un factor importante para la calidad y la estabilidad del producto, si esta es muy rápida puede que las partículas sean deformes y si es lento puede producir partículas húmedas, el control está en la temperatura de entrada y salida, en la presión de atomización y el caudal de la alimentación sea en solución, suspensión, emulsión, etc. **(Hernández, 2006)**.

4.1.3 Caracterización de aislados proteicos

4.1.3.1 Cuantificación proteica por método de BCA y Dumas.

El método de BCA se basa en la conversión del Cu^{+2} a Cu^{+1} en condiciones alcalinas. Esta reacción es influenciada por cuatro aminoácidos que son: cisteína, cistina, tirosina, triptófano y por la cadena peptídica. El BCA es específico para Cu^{+1} , reaccionan dos moléculas de BCA con una de ion Cu^{+1} . La cantidad de Cu^{+2} reducido es una función de las concentraciones de las proteínas y su coloración cambia a púrpura la que es determinada a 562 nm por un espectrofotómetro. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución y es estimada por comparación de un estándar conocido.

El método BCA es uno de los más sensibles, es decir que se puede detectar proteínas en concentraciones bajas como de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y puede ser utilizado para medir un amplio rango de concentraciones de proteína.

La concentración de proteína en porcentaje se muestra en la tabla 4 para liofilizado y spray dryer, donde se observa que a pH 5,0 se obtiene 93,412% de proteína en las muestras liofilizadas, mientras que en el spray dryer al mismo pH solo se obtiene 48,59%. La reducción del contenido de proteína entre estos dos métodos de secado es aproximadamente del 52%.

Tabla 4. Cuantificación proteica por el método BCA

MUESTRAS	BCA	
	LIOFILIZADO (%)	SPRAYDRYER (%)
2	74,310 \pm 0,23 ^b	5134 \pm 0,06 ^a
3	71,812 \pm 0,11 ^a	70,43 \pm 0,11 ^d
4	76,522 \pm 0,11 ^c	44,66 \pm 0,06 ^b
5	93,412 \pm 0,32 ^d	48,59 \pm 0,11 ^c

Las diferencias estadísticas fueron expresadas como $P < 0,05$ usando un ANOVA y test Tukey. Letras diferentes muestran las diferencias estadísticas.

Elaborado por: Puruncajas, Y. 2016

Fuente: Laboratorio de alimentos funcionales (Biopropepti) FCIAL-UTA

Para la determinación de la concentración de proteína en haba se realizó una curva estándar dando valores de coeficiente de correlación de 0,9979 para liofilizadas y spray dryer. Mediante un análisis de varianza por Tukey (Tabla 24 y 29) se muestra que los resultados de concentración de proteína a diferentes pHs presentan diferencias significativas tanto para las muestras liofilizadas como para las muestras secadas por SD.

Debido a los cambios de coloración, se puede decir que los concentrados proteicos de haba contienen los cuatro aminoácidos específicos que son cisteína, cistina, triptófano y tirosina.

Por otra parte, el método Dumas se basa en una reacción de combustión donde se mide la concentración de nitrógeno por medio de los gases de combustión.

A pH 5,0 las muestras liofilizadas presentan mayor concentración de proteína de 85,63%; seguidas por el pH 3,0 con 77,86%; pH 4,0 con 70,15% y por ultimo con menor concentración el pH 2,0 con 68,25%.

Las muestras secadas por SD presentan una mayor concentración a pH 4,0 con 42,77%; seguido a pH 2,0 con 41,83%; pH 5,0 con 41,46% y a menor concentración el pH 3,0 con 39,79%.

En la figura 3 se muestra las diferencias de concentración de proteína entre los dos métodos de secado Liofilización y SD aplicando Dumas y BCA a pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0.

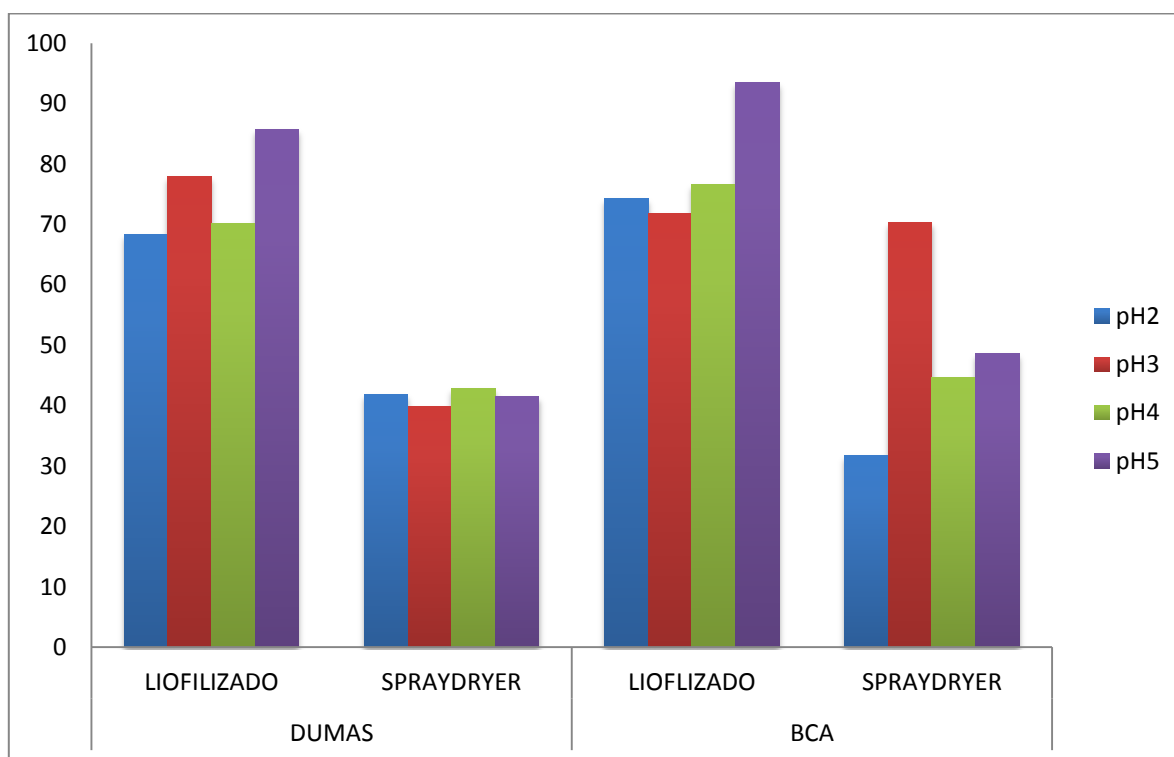


Figura 3. Concentración de proteína de haba entre los dos métodos de secado Liofilización y SD aplicando Dumas y BCA.

Elaborado por: Puruncajas, Y. 2016

Fuente: Laboratorio de alimentos funcionales (Biopropepti) FCIAL-UTA

Aplicando el secado por SD la concentración de la proteína se reduce a la mitad (52%) en comparación con el secado por Liofilización según los datos arrojados por Dumas. Mientras que aplicando el método BCA existe una reducción del 63% de la concentración proteica con el secado por Spray Dryer.

Además, se puede observar que el contenido de proteína de las muestras obtenidas por liofilización a través de los dos métodos de cuantificación ensayados, se mantienen en un mismo rango de porcentajes (68% - 93%). Mientras que las muestras secadas por spray dryer se encuentran en un rango aproximado de contenido de proteína de 45%.

Al realizar el análisis proximal de las muestras liofilizadas al mejor pH de rendimiento 4,0 se obtuvo una cantidad de proteína de 63,6% con el método kjeldhal, mientras que por Dumas y BCA está a 70,156% y 76,522%, respectivamente.

El contenido de proteína de la harina de haba PRODICEREAL según el análisis proximal se encuentra a 16,1%, este tipo de harina tiene mayor contenido proteico que otras harinas comerciales, por ejemplo harina de haba Camari que tiene 13,81% de proteína.

4.1.3.2 Determinación de Fenoles Totales

Los polifenoles son compuestos con capacidad de atrapar radicales libres e inhiben procesos de oxidación lipídica, muchos de estos compuestos presentan actividad antioxidantes; forman parte de los constituyentes de extractos vegetales y alimentos. Existen varios componentes naturales que previenen la oxidación celular que han sido estudiados en frutas como la uva, chirimoya, tomates, guayabas, granadilla entre otros. **(Castañeda, 2008).**

Se encontró el mayor contenido de polifenoles en las muestras de los sobrenadantes a pH 2,0 con valores de 371,53 mg GAE/100g como se muestra en la Tabla N.5. A este pH no se observó mayor presencia de precipitación proteica y se obtuvo un alto contenido de sobrenadante y polifenoles. El contenido de fenoles encontrados en la harina de haba tratada a diferentes pHs, se encuentra en un rango de 159,87- 371,53 mg GAE/100g, siendo valores intermedios que superan al rango detallado para algunas frutas como granadilla, naranjilla, tomates, mango, maracuyá, pepino, entre otros de (26±12 - 91±43 mg GAE/100g). Es de considerar que, la cantidad de polifenoles depende de factores de pre cosecha, factores agronómicos, factores de post cosecha y del proceso mismo de elaboración de la harina.

Tabla 5. Contenido de fenoles totales solubles (mg GAE/100g de muestra)

CONTENIDO DE FENOLES TOTALES SOLUBLES (mg GAE/100g de muestra FW)	
pH2.0	371,53±0,79 ^d
pH3.0	187,65±0,14 ^b
pH4.0	159,87±0,28 ^a
pH5.0	211,25±0,28 ^c

Promedios de contenido de fenoles totales solubles extraídos de los sobrenadantes con tratamiento en agua ± desviación estándar. Se realizó un ANOVA y comparación de medias por prueba del test de Tukey al 95% de confianza, las distintas letras indican que son significativamente diferentes.

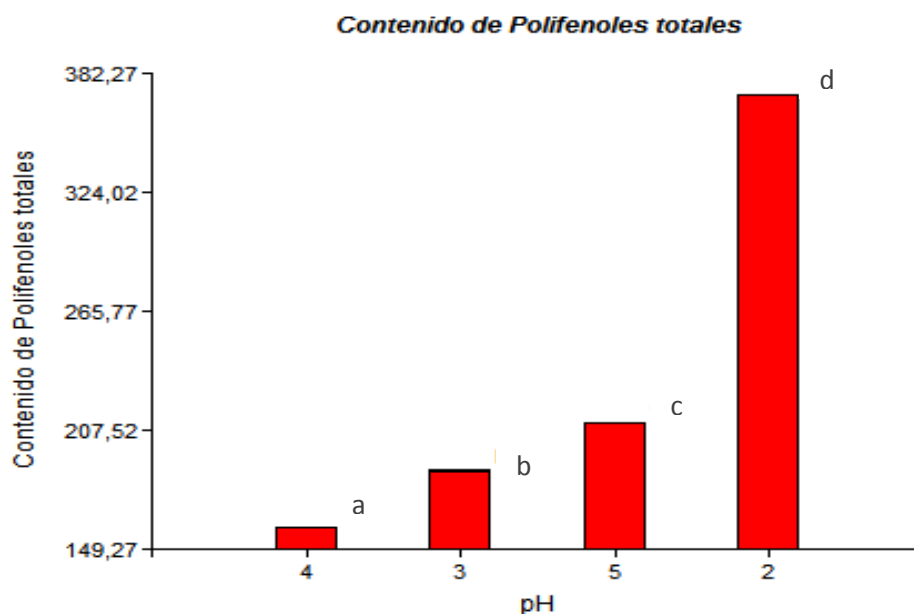


Figura 4. Promedios de contenido de fenoles totales solubles extraídos de los sobrenadantes

Según (Arias & Sthepanie, 2012) un perfil polifenólico del haba en grano seco es diferente entre cotiledones y testa de las semillas y varía el contenido de taninos en función del color de la testa. Indicando una alta actividad antioxidante en el grano, aunque podría ser diferente en el grano verde del haba ya que tiene alto contenido de humedad y la testa es de color verde. Los compuestos fenólicos presentes en las habas son de tipo flavonoide, estos compuestos dependen de la diversidad biológica de la planta (Porrás Loaiza & López Malo, 2009)

No hay investigaciones específicas sobre el contenido de polifenoles totales en la harina de haba, pero el rango de polifenoles obtenido por este estudio supera a la harina de

arroz y de trigo que contienen alrededor de 85,6 mg/100 g de ácidos fenólicos. Las legumbres con mayor contenido fenólico son las de color oscuro como las judías rojas y negras. (Martínez, Periago, & Ros, 2000)

4.1.3.3 Caracterización de la proteína por Electroforesis

Las proteínas de almacenamiento se clasifican de acuerdo a sus características de solubilidad, en albúminas, globulinas, prolaminas, y glutelinas. Las albúminas son solubles en agua, las globulinas en soluciones salinas, las prolaminas en agua-alcohol y las glutelinas en soluciones acidas o alcalinas. En semillas como las dicotiledóneas (leguminosas) predominan las albúminas y globulinas, en cereales (monocotiledóneas) las gluteninas y prolaminas (Guardiola & García, 1990).

Los concentrados proteicos se analizaron con electroforesis SDS-PAGE. En la figura 5 se muestran el perfil de las proteínas mediante Native-PAGE para muestras liofilizadas.

Electroforesis Native-PAGE: La electroforesis Native-PAGE de muestras secadas con liofilización y obtenidas a pH 4,0 presenta bandas comprendidas entre 41,5-198,2 KDa. Mientras que en los pHs: 2,0; 3,0 y 5,0 presentan una banda única con un peso molecular de 198,2 KDa. Por otro lado, la electroforesis Native-PAGE de muestras secadas por spray dryer permite observar bandas de proteínas con peso molecular de 198,2 KDa a todos los pHs y únicamente a pH 4,0 una banda comprendida entre 66-97 KDa, como se observa en la figura 6.

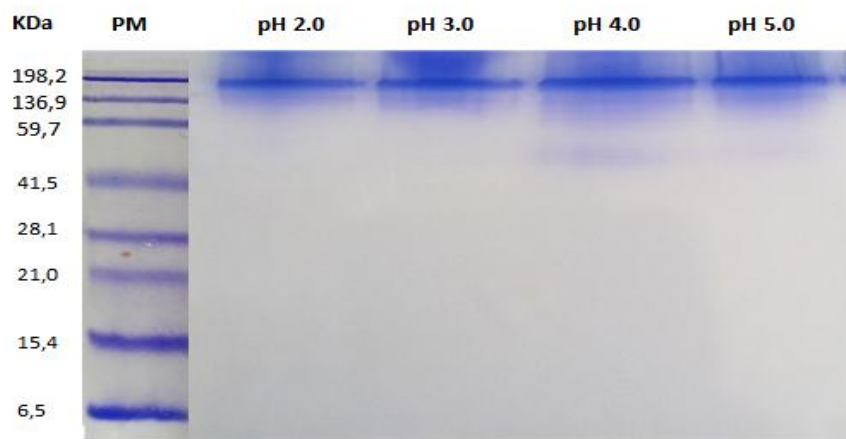


Figura 5. Técnica de electroforesis NATIVE-PAGE para muestras liofilizadas.

Pocillo 1: peso molecular; pocillo 2: pH 2,0; pocillo 3.0: pH 3,0; pocillo 4.0: pH 4,0; pocillo 5: pH 5.0.

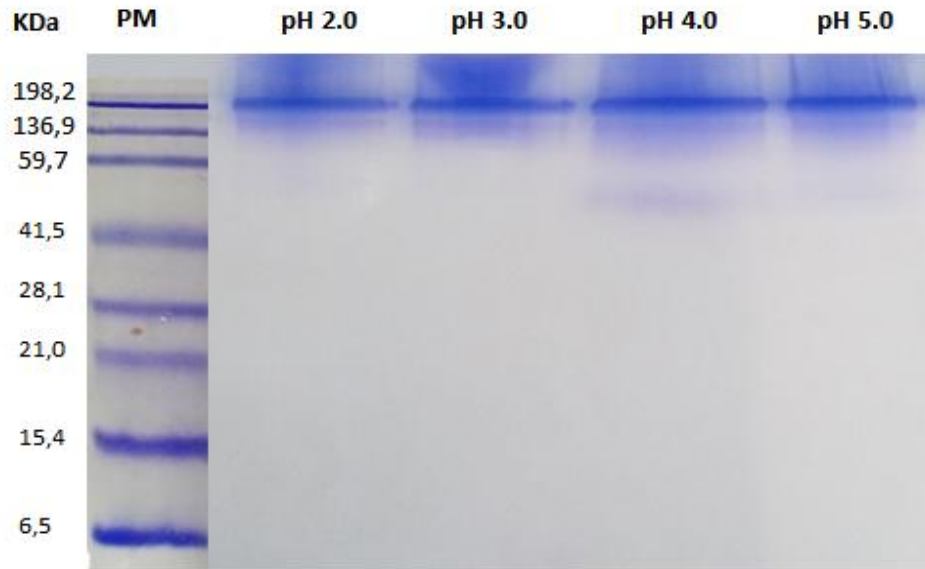


Figura 6. Técnica de electroforesis NATIVE-PAGE para muestras secadas por Spray Dryer.
 Pocillo 1: peso molecular; pocillo 2: pH 2,0; pocillo 3: pH 3,0; pocillo 4: pH 4,0; pocillo 5: pH 5,0.

Electroforesis SDS-PAGE: En los dos métodos de secado (liofilización y spray dryer) se observaron globulinas 7S que corresponde al rango de proteínas mayores a 50KDa. En la figura 6 se presenta el perfil proteico por electroforesis SDS-PAGE sin 2 mercaptoetanol para liofilización y spray dryer parte A y B, respectivamente. En la Figura 7A, se identificaron bandas definidas de albúminas 2S y bandas de mayor expresión desde proteínas de peso 37 a 100 kDa correspondiente a globulinas sub unidad 7S y proteínas de subunidad ácida 11S; entre 20 y 25 kDa se presenta proteínas de subunidad básica 11S.

En la Figura 7B (spray dryer) se identifican bandas con poca expresión y no muy definidas en comparación con las bandas observadas para las muestras liofilizadas (Figura 7A). Sin embargo y aunque aparentemente en menor proporción se observó la presencia de globulinas sub unidad 7S, globulina ácida 11S y globulinas básica 11S para todos los pHs aunque a pH 5 no son tan claras como a pH 2, 3 y 4.

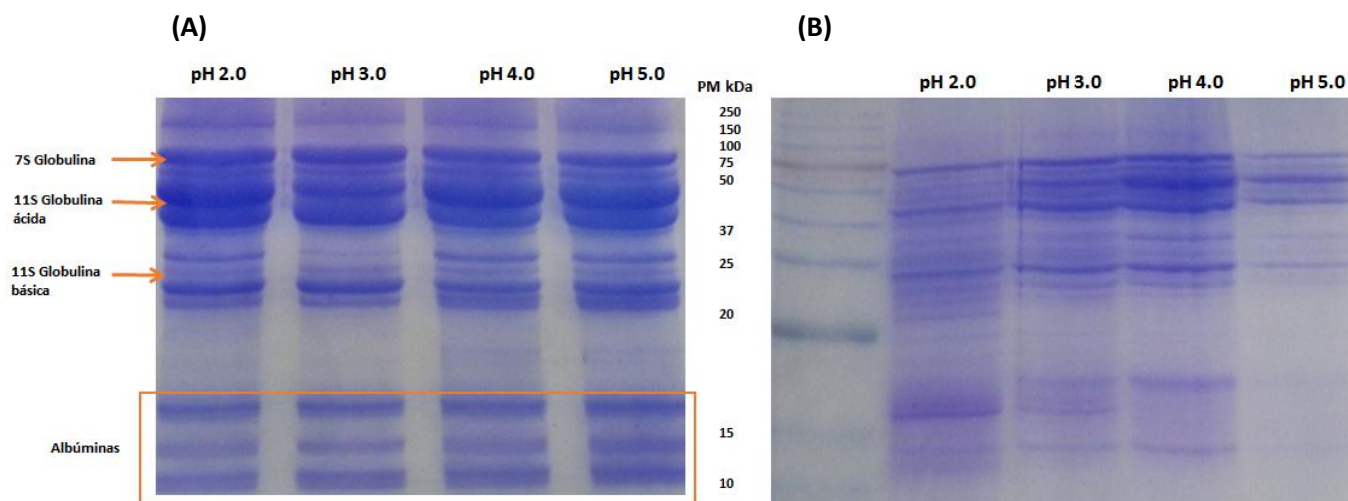


Figura 7. Técnica de electroforesis en ausencia de 2-mercaptoetanol para muestras secadas por Liofilización (Parte A) y spray dryer (Parte B).

Pocillo 1: peso molecular; pocillo 2: pH 2,0; pocillo 3: pH 3,0; pocillo 4: pH 4,0; pocillo 5: pH 5,0.

En la figura 8 se presenta el perfil de proteínas obtenido mediante electroforesis con 2-mercaptoetanol. En la parte A, se identificaron bandas con alta expresión (50KDa) para todos los pHs, pertenecientes a las globulinas sub unidad 7S; y a 15 KDa correspondientes a las albúminas y bandas definidas de globulinas 11 S ácidas y básicas.

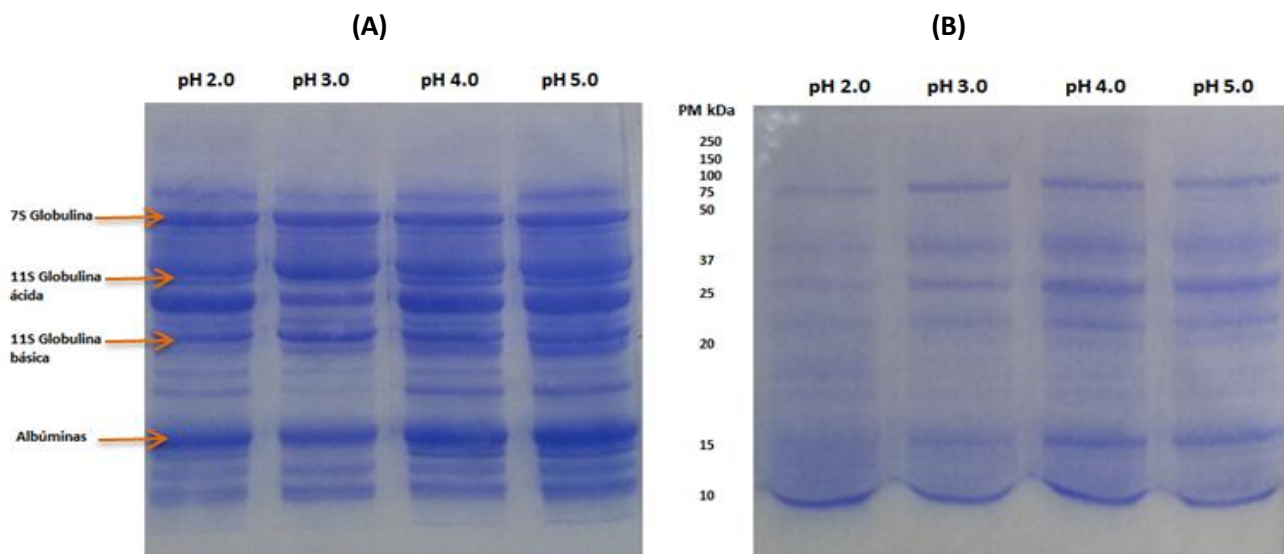


Figura 8. Técnica de electroforesis con 2-mercaptoetanol para muestras Liofilizadas (Parte A) y Spray Dryer (Parte B).

Pocillo 1: peso molecular; pocillo 2: pH 2,0; pocillo 3: pH 3,0; pocillo 4: pH 4,0; pocillo 5: pH 5,0.

En el perfil de las proteínas por electroforesis con 2-mercaptoetanol para muestras secadas por spray dryer (Figura 8B), se puede observar que para todos los pHs se encuentran globulinas sub unidad 7S. Entre 20 y 37 KDa se encuentran bandas poco intensas correspondientes a las globulinas subunidades de naturaleza ácida 11S y globulinas sub unidad básica 11S.

Entre un 45 y 50% de las globulinas subunidad 11S tienen naturaleza ácida y sus pesos moleculares se encuentran entre 37-40 KDa; mientras que las globulinas de sub unidades básicas 11S conforman un 50 y 55% y sus pesos se encuentran entre 18 y 20 KDa. Las globulinas 7S pertenecen al grupo de las glicoproteínas que se encuentran en pesos moleculares entre 150-200 KDa (**Amigo Benavent, 2010**). Los pesos moleculares reportados en este estudio están acordes a los reportados en la literatura para las leguminosas comunes.

Las fracciones más importantes de las leguminosas son albúminas y globulinas. La fracciones de globulinas son las que más predominan en los granos de leguminosas como en haba, frijol común, chícharo y en mayor cantidad la soya llegando hasta 90% de globulinas (**Guerrero, Ríos, & Ancona**).

Las prolaminas forman parte de la familia de las albúminas compuestas por polipéptidos de baja masa molecular, se encuentran bandas con poca intensidad correspondiente a pesos de 10-22KDa (**Brinegar y Goundan, 1993**).

Las proteínas obtenidas mediante liofilización muestran bandas mejor definidas y con mayor expresión en comparación a lo observado en los perfiles de electroforesis de las muestras secadas por spray dryer; esto se debe a factores externos que afectan directamente a la calidad de las proteínas, como es la temperatura. Según (**López, 1991**) las leguminosas están formadas por un 70% de globulinas, un 10-20% de albúminas, un 10-15% de glutelinas y el resto de prolaminas, predominando las globulinas y las albúminas y siendo estas dos proteínas las más propensas a coagularse por efecto de las altas temperaturas. En los cereales las proteínas más abundantes son las prolaminas y las gluteninas, las cuales no se coagulan fácilmente con el calor y por lo tanto resultarían más resistentes al secado por Spray Dryer.

Para caracterizar mejor las proteínas de haba los aislados proteicos obtenidos por liofilización a un pH de precipitación de pH 5,0 fueron analizados mediante electroforesis bidimensional 2D-SDS-PAGE en un rango de pH de 3,0 a 10,0 (para el punto isoeléctrico).

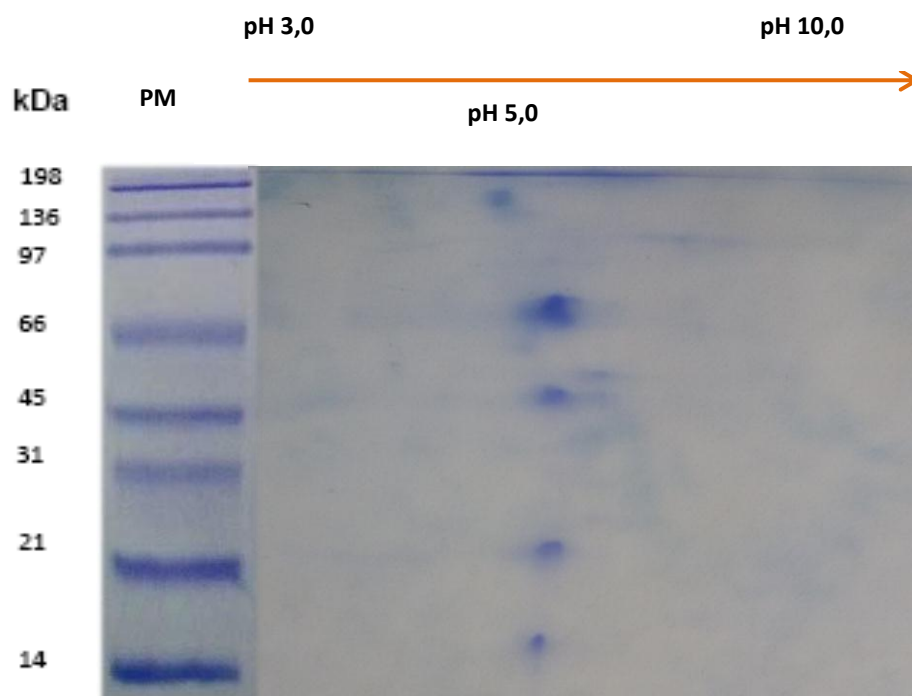


Figura 9. Técnica de electroforesis 2D SDS-PAGE de proteína de haba a pH 5,0.

En la figura 9 se puede observar la presencia de las cuatro proteínas principales en la harina de haba. Las globulinas 7S (proteínas con mayor expresión), globulinas ácidas y básicas 11S y albúminas 2S con una banda delgada y poca intensidad. Todas estas proteínas presentan un punto isoeléctrico de 5,0. Mediante esta técnica se puede obtener un análisis global y una separación específica de cientos o miles de proteínas en un solo gel.

4.1.4 Digestibilidad gastrointestinal *in vitro*

El grado de digestibilidad gastrointestinal *in vitro* simula condiciones fisiológicas humanas en diferentes tipos de personas; es así que para la hidrólisis de las proteínas de haba se utilizaron diferentes pHs. Para simular la condición de personas con enfermedades gástricas se trabajó a un pH 1,2; para el caso de personas adultas en condiciones sanas el pH del estómago es de 2,0; y para el caso de niños no lactantes se utilizó un pH cercano a 3,2.

En la figura 10 se observan los hidrolizados proteicos de la muestra liofilizada utilizando un pH 5.0 de precipitación. A pH 1,2 y 2,0 de digestión se muestran bandas de globulinas subunidad 7S, subunidad ácida 11S y subunidad básica 11S; las bandas de proteína a pH 1,2 son de mayor expresión que las bandas a pH 2,0; mientras que a pH 3,2 solo se muestran albúminas 2S. La segunda fase es la digestión duodenal donde actúan un coctel de enzimas (proteasas, amilasas, lipasas) y sales biliares dando como resultado la hidrólisis final de la proteína y la formación de pequeños péptidos (Thomas y col., 2004). Como se observa en la figura, no aparecen bandas asignables a las proteínas, para las muestras liofilizadas. Sin embargo, a pesos de 6,5 KDa se puede apreciar bandas muy finas que podrían ser albúminas que han resultado resistentes a la acción de las enzimas pancreáticas, pero también, podrían ser péptidos de pequeño tamaño molecular producto de la hidrolisis con las enzimas.

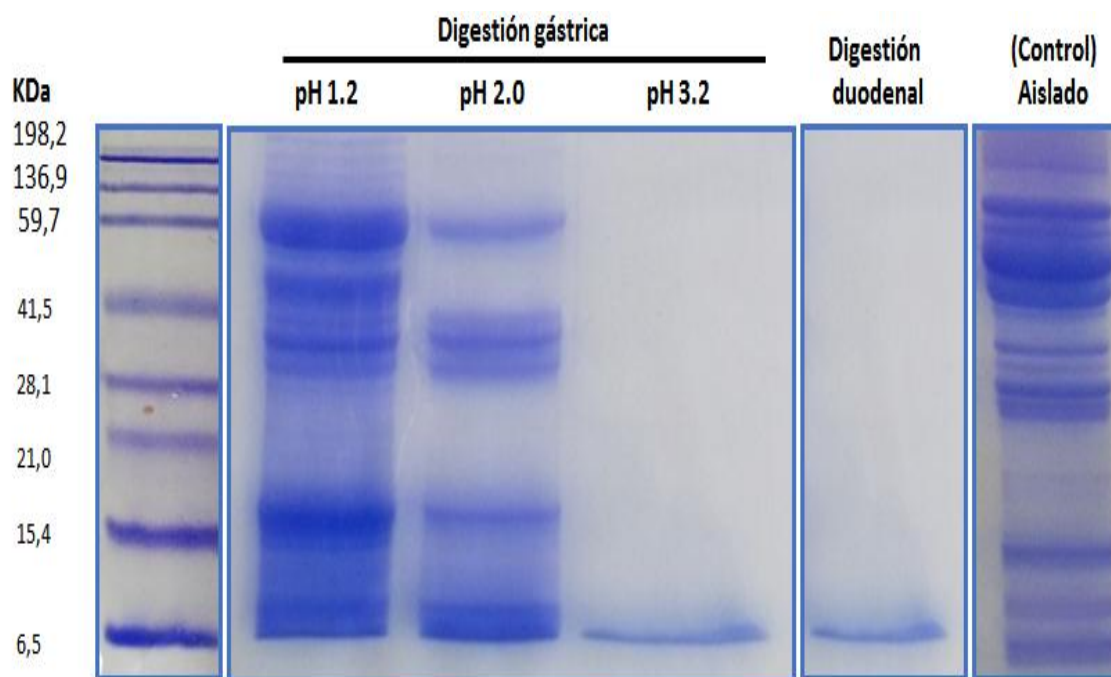


Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE con 2 mercaptoetanol para muestras liofilizadas. Comparación de la simulación gástrica de aislados proteicos (pH 5,0) a diferentes pHs de digestión 1,2; 2,0 y 3,2 y Simulación duodenal (pH 3,2).

Los hidrolizados proteicos de muestras secadas por spray dryer (pH 4.0 de precipitación) se muestran en la figura 11. Las bandas presentes a pH 1,2 muestran la existencia de globulinas subunidad 7S (entre 41,5 y 59,7 KDa); las proteínas observadas a pH 2,0 (50,6; 28,1; 15,4 y 6,5 KDa) corresponde a globulinas sub unidad ácidas 11S, básicas 11S y albúminas 2S, respectivamente, pero con menor intensidad. Finalmente, a pH 3,2 se

observan únicamente las albúminas correspondientes a pesos moleculares de 6,5 y que presentan resistencia a la acción de la pepsina. En la fase duodenal no aparecen bandas asignables a las proteínas, para las muestras secadas por Spray Dryer. Sin embargo, se puede apreciar bandas muy finas pertenecientes a las albúminas. Esta resistencia puede deberse a los puentes disulfuro que forman estructuras inter e intra moleculares que limita la acción de las enzimas sobre los enlaces peptídicos. (Sen y col, 2002). Se utilizó el pH de 3,2 que simula el tracto intestinal infantil, porque las condiciones de digestibilidad son menos agresivas. La proteína de haba es digerible en este pH por lo cual también lo será en el tracto digestivo de un adulto y de un estómago con enfermedad gástrica.

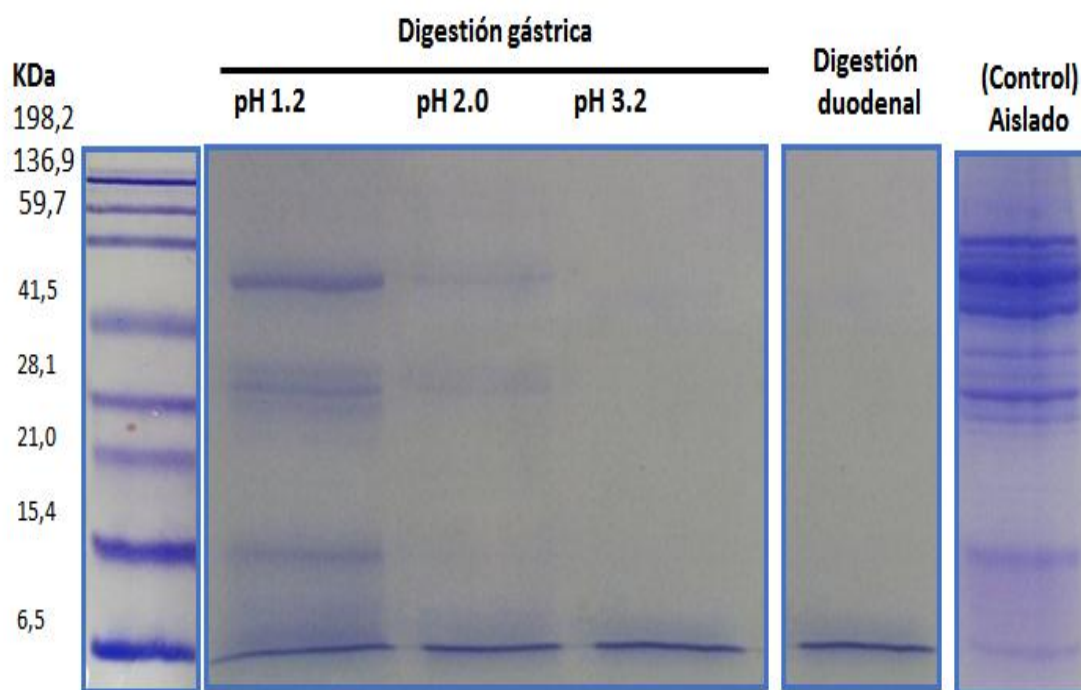


Figura 11. Electroforesis SDS-PAGE con 2 mercaptoetanol para muestras secadas por Spray Dryer. Comparación de la simulación gástrica de aislados proteicos (pH 4,0) a diferentes pHs de digestión 1,2; 2,0 y 3,2 y Simulación duodenal (pH 3,2).

4.1.5 HPLC

Las muestras obtenidas mediante liofilización y secadas por spray dryer a los pHs de precipitación (pH 2,0; 3,0; 4,0 y 5,0) se analizaron cualitativamente mediante perfiles cromatográficos (RP-UHPLC); con tiempos de análisis de hasta 12 min.

En la figura 12 se puede observar una clara diferencia de intensidad en los picos de la muestra liofilizada y la muestra secada por spray dryer. A un tiempo de retención de 3,7 min se presenta un pico común en las dos muestras analizadas, lo cual indica la presencia de una proteína que no se ha visto afectada por el proceso de secado.

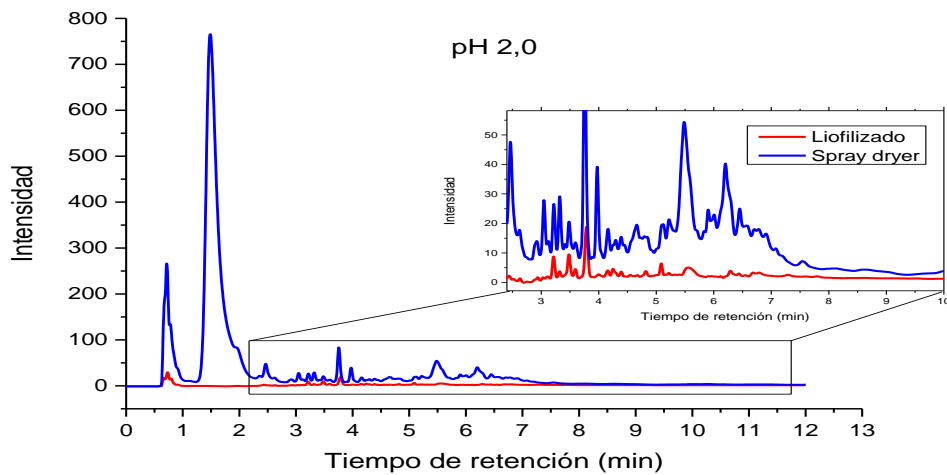


Figura 12. Perfil cromatográfico comparativo entre Liofilización y Spray Dryer a pH 2,0.

En la figura 13 se presenta el perfil cromatográfico de los aislados a pH 3,0 donde se observa el producto de los dos procesos de secado estudiados, se obtienen grandes diferencias en cuanto al tipo de proteínas presentes en los aislados. Sin embargo, el pico observado a un tiempo de retención de 3,7 min es común para las dos muestras analizadas.

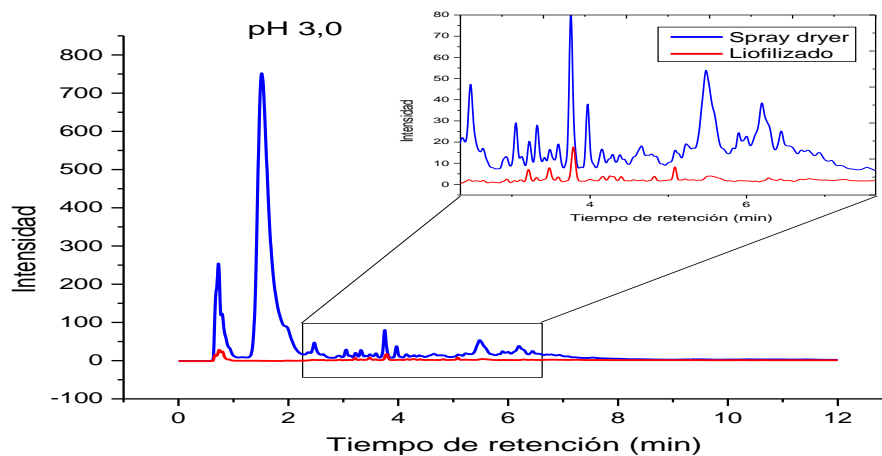


Figura 13. Perfil cromatográfico comparativo entre Liofilización y Spray Dryer a pH 3,0.

A pH 4,0 la diferencia de intensidad de los picos obtenidos es notable y se observa la aparición y desaparición de algunos de ellos. El pico a un tiempo de retención de 3,7 min sigue siendo constante en las dos muestras, lo que indica que corresponde a una proteína resistente a los dos métodos de secado.

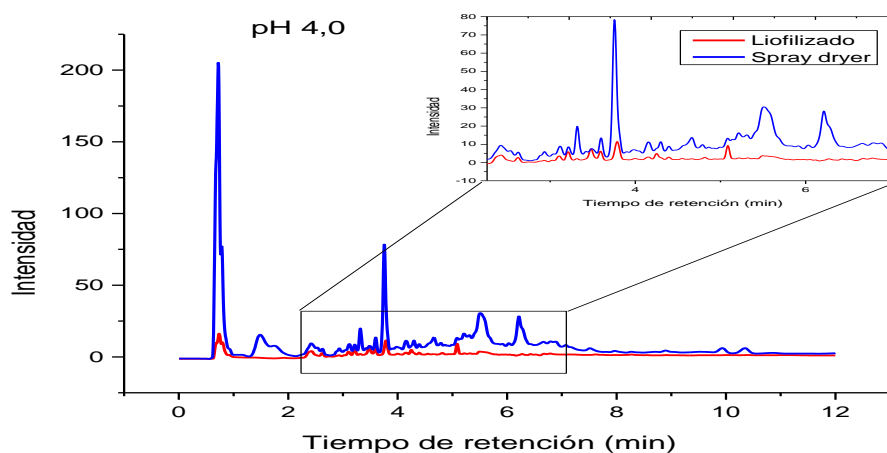


Figura 14. Perfil cromatográfico comparativo entre Liofilización y Spray Dryer a pH 4,0.

La presencia de proteínas también es más notoria en los dos métodos presentando picos a los mismos tiempos de retención como a 3,7 min y tiempos aproximadamente de 4; 4,2; 4,3; 5; 5,5; 6,2 min.

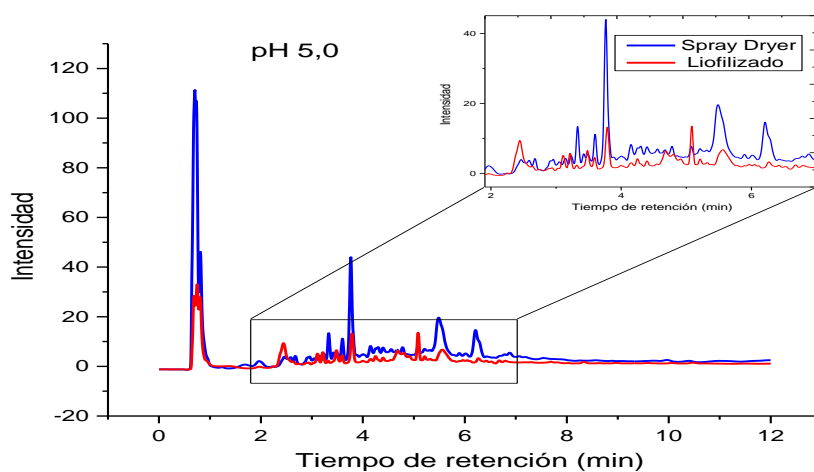


Figura 15. Perfil cromatográfico comparativo entre Liofilización y Spray Dryer a pH 5,0.

Los perfiles cromatográficos para digestibilidad gastrointestinal *in vitro* se presentan en la figura 16.

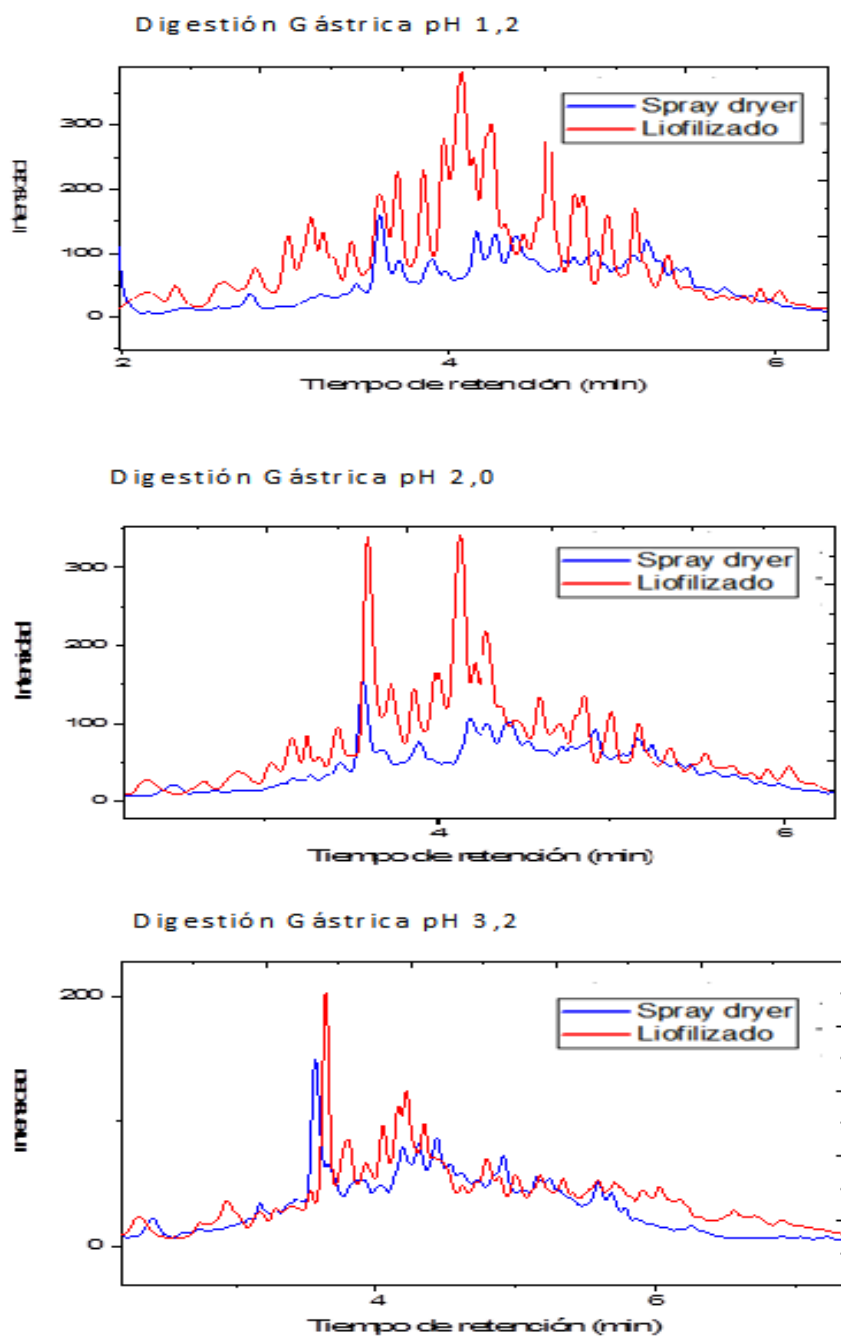


Figura 16. Perfil cromatográfico comparativo de los dos métodos de secado Spray Dryer y Liofilización para digestibilidad gastrointestinal *in vitro* a pH 1,2; 2,0; 3,0.

La digestión gástrica se simula a tres diferentes pHs, para cada pH se observa un perfil cromatográfico distinto tanto en forma como en intensidad de los picos en comparación a

los obtenidos para los aislados puros. Es de esperar que los cromatogramas de los hidrolizados presenten un mayor número de picos debido a la presencia de péptidos, productos de la degradación de las proteínas.

A pH 1,2; pH 2,0 y pH 3,2 se observa perfiles cromatográficos parecidos con picos similares en los dos tipos de secado para cada tiempo de retención. A pH 1,2 y 2,0 el perfil cromatográfico de liofilización y Spray Dryer se muestra intensidades distintas predominando el perfil de muestras liofilizadas, pero a pH 3,2 los perfiles cromatográficos continúan a una misma intensidad y los picos sobresalen a los mismos tiempos de retención.

En la fase duodenal las proteínas se hidrolizan en péptidos más pequeños gracias a la acción de un coctel de enzimas pancreáticas mostrándose mayor número de picos. En el análisis por medio de electroforesis las bandas de globulina ácidas, básicas y globulinas 7S desaparecen y solo se presencié bandas de albúminas que resultaron resistentes a la acción de las enzimas por lo cual las proteínas que se muestran en el perfil cromatográfico podrían ser albúminas 2S. En el perfil cromatográfico representado en la figura 17 se observan picos con similar intensidad para las muestras obtenidas por los dos métodos de secado, mostrando presencia de proteína pero en menor cantidad (100 ua) en comparación a los picos observados en la digestión gástrica (350-400ua). Esto puede estar relacionado con la acción enzimática sobre las proteínas analizadas.

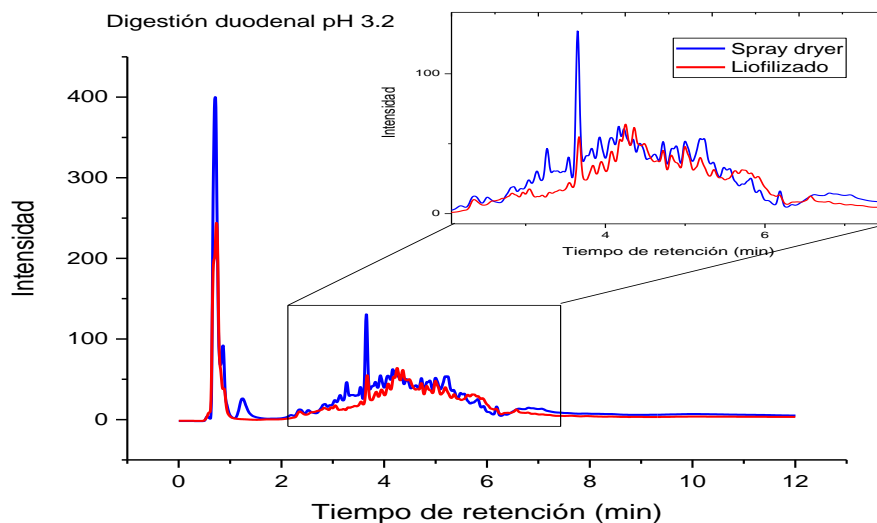


Figura 17. Perfil cromatográfico comparativo en dos métodos de secado Spray Dryer y Liofilización para digestión duodenal a pH 3,2.

Por medio de este estudio se identificó que a pH 4,0 se obtiene mejores rendimientos de proteína para los dos tipos de secado Liofilización y Spray Dryer. El contenido de proteína es más alto para las muestras que fueron Liofilizadas debido a que no se generó muchas pérdidas del producto, y por medio de análisis cualitativo (Electroforesis y RP-HPLC) y cuantitativo (Dumas y BCA) se identifica la presencia de las proteínas predominantes en la harina de haba que son las globulinas y albúminas. El secado por Spray Dryer genera muchas pérdidas del producto debido al diseño del equipo y a condiciones que influyen como la temperatura, el ambiente, el contenido de sólidos, entre otros, que resulta en valores reducidos de contenido proteico identificados por Dumas y BCA, por ende estas diferencias se reflejan en el análisis de electroforesis mostrando bandas menos definidas y con poca expresión que las bandas de geles con muestras liofilizadas, y por medio del RP-HPLC se identificó que los perfiles cromatográficos tienen una intensidad diferente al comparar entre los dos tipos de secados, identificando picos de proteínas a los mismos tiempos de retención.

CAPITULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se obtuvieron concentrados proteicos de harina de haba por medio de dos métodos diferentes de secado: Spray Dryer y Liofilización.

Se determinó el porcentaje de rendimiento en la obtención de concentrados proteicos de haba (*vicia faba*), mediante los dos métodos de secado, obteniendo mejores resultados con el método de Liofilizado.

Se cuantificó la cantidad de proteína de haba por dos métodos: Dumas y BCA, determinando el mayor contenido para muestras a pH5 y liofilizadas (85,63% y 93,41%, respectivamente). En el caso de las muestras secadas por Spray Dryer se obtuvo un contenido de 42,77% a pH 4,0 y 70,32% a pH 2,0.

Se observó la presencia de polifenoles totales en todos los sobrenadantes obtenidos de la precipitación isoeléctrica de las proteínas de haba, encontrando valores, comprendidos entre 159,87- 371,53 mg GAE/100g.

Se identificó la presencia de diferentes tipos de proteínas en los aislados obtenidos bajo los dos métodos de secado mediante perfiles cromatográficos y por RP-UHPLC.

Se identificó proteínas predominantes en la harina de haba como las globulinas 7S, globulinas sub unidades ácidas y básicas 11 S y las albúminas 2S por medio de electroforesis SDS-PAGE para geles a diferentes pHs 2,0; 3,0; 4,0 y 5,0 para concentrados de proteínas secadas por Spray Dryer y Liofilización, mostrando bandas con mayor expresión en muestras liofilizadas. A las mismas condiciones de secado y pHs, se analizó las proteínas en su estado nativo por medio de electroforesis Native identificando bandas pertenecientes a globulinas 7S. Para la digestión gástrica se determinó la presencia de todas las proteínas predominantes globulinas y albúminas con bandas delgadas y a todos los pHs ácidos mientras que en la fase duodenal las proteínas resistentes a las enzimas pancreáticas fueron las albúminas. Con la técnica de electroforesis 2D se pudo observar claramente la presencia de globulinas y albúminas obtenidas por liofilización a pH 5,0.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda mejorar las condiciones de secado para obtener un producto final con menos humedad y menos pérdidas. Y continuar con estudios de secado por aspersión de aislados proteicos para diferentes matrices alimenticias.

Para mejorar el análisis de aislados proteicos de haba mediante RP-HPLC se recomienda que el equipo esté conectado con un espectrómetro de masas para la identificación del tipo de proteína presente.

Analizar el perfil de aminoácidos que posee la proteína de haba.

Se considera ampliar la investigación de este estudio en cuanto a otros tipos de secado para obtener concentrados proteicos donde existan menos pérdidas del producto y no se desnaturalice la proteína por las altas temperaturas.

Analizar los tipos de hidrolizados obtenidos mediante la digestión gástrica y duodenal para clasificarlos según su citotoxicidad, alergenicidad y conocer las propiedades biológicas que poseen los péptidos de proteína de haba.

Se recomienda la utilización de los concentrados proteicos de haba en el desarrollo de un nuevo producto para conseguir mejorar el valor nutricional y funcional.

Se recomienda utilizar otro tipo solvente como el NaCl 1 M para lograr obtener proteínas que sean solubles a este tipo de reactivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aguilera Ortíz, M. d. C. R. V., María Chew Madinaveita, Rodolfo Gerardo Meza Velázquez, Jorge Armando. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *BIOtecnia*, 13(2), 16-22.
- Amigo Benavent, M. (2010). Efecto de la desglicosilación enzimática en la antigenicidad del alérgeno beta-conglicinina (7S globulina) de soja.
- Aparicio Fernández, X., & Alonsob, L. G. E. (2015). El consumo de leguminosas y sus efectos sobre la salud.
- Arias, A., & Sthepanie, E. (2012). Análisis de compuestos antioxidantes presentes en haba (*Vicia faba* L.) para su consumo hortícola.
- Augustin J., K. B. P. (1989). Nutrient composition of raw, cooked, canned, and sprouted legumes En: Legumes: chemistry, technology, and human nutrition. . *Matthews R.H. (Ed.), 187-217.*
- Avanza, M., & Añon, M. (2004). Modificaciones de las proteínas de amaranto por tratamiento térmico. *Universidad Nacional del Nordeste/Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.*
- Brenes, A., & Brenes, J. (1993). Tratamiento tecnológico de lo granos de leguminosas: influencia sobre su valor nutritivo. *IX Curso de especialización FEDNA. Barcelona, España.*
- Burraco, A. B. (2005). Avances Recientes en Biotecnología Vegetal e Ingeniería Genética de Plantas. *Editorial Reverté, S.A.*
- Castañeda, B. C., Llica, E. R., & Vasquez, L. I (2008). "Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas". *Horizonte Médico, 1.*
- Cepeda, E., Villaran, M., & Aranguiz, N. (1998). Functional properties of faba bean (*Vicia faba*) protein flour dried by spray drying and freeze drying. *Journal of Food Engineering, 36(3), 303-310.*
- Cerón Herrera (2006). Determinación de la digestibilidad "in vitro" de la proteína, contenido de fitatos y lisina disponible en variedades criollas de maíz del estado de Hidalgo.
- Crouch, D. (2008). *Principios de análisis instrumental (Vol.).* México, D, F: Cengage Learning.
- Cruz Lugo, A. L. (2013). Correlación del método Kjeldahl con el método de combustión Dumas automatizado para determinación de proteína en alimentos.
- Duhalt, R. V. (1998). Cuantificación de proteínas: una revisión. *Biotecnología Unam, Volumen 3.*
- Gaytán Sánchez, M. C. (2014). Determinacion del porcentaje de proteína en diferentes alimentos de origen vegetal.
- Gómez Cruz, N., & Jiménez Munguía, M. (2014). Métodos de secado de emulsiones alimentarias.

- Guardiola, J., & García, A. (1990). Acumulación y movilización de las reservas. *Fisiología vegetal I: Nutrición y transporte. Síntesis, Madrid*, 379-394.
- Guerrero, L. A. C., Ríos, L. C., & Ancona, D. A. B. Estructura y propiedades funcionales de proteínas de leguminosas.
- Hernández García J.I., Orozco Villafuerte J., Cuenca Mendoza F., Pérez Alonso C & Carrillo Navas H (2016). EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y TÉRMICA DE AISLADOS DE PROTEÍNA DE HABA (Vicia faba). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*.
- Hernández, J. P. C. (2006). Desarrollo de una metodología mediante secado por atomización (Spray Drying) para el secado de una formulación de niosomas.
- Jiménez, P., & Collada, C. (2000). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Forest Systems*, 9(4), 237-248.
- Jorba, C. G., Elorrieta, M. M., & Juana, C. B. (2005). *Estudio de factores no nutritivos en vicia faba I: influencia de la germinación sobre su valor nutritivo*: Universidad Complutense de Madrid.
- Kinsella, J., E. Frankel, B. German y J. Kanner (1993). Possible Mechanisms for the Protective Role of Antioxidants in Wine and Plant Foods. . *Food Technology University of California, College of Agricultural environmental*.
- López, E. S. D. J. B. (1991). Valor nutritivo de las leguminosas grano en la alimentación humana y animal.
- Lozano Berna, M. (2009). Obtención de mircapsulados funcionales de zumo de "Opuntia stricta" mediante secado por atomización.
- Macarulla, M. T., Medina, C., De Diego, M. A., Chavarri, M., Zulet, M. Á., Martínez, J. A., Portillo, M. P. (2001). Effects of the whole seed and a protein isolate of faba bean (*Vicia faba*) on the cholesterol metabolism of hypercholesterolaemic rats. *British Journal of Nutrition*, 85(05), 607-614.
- Martínez, V. I., Periago, M. J., & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(1), 5-18.
- Modercay, L., & Bermúdez, A. S. (1994). Preparación y determinación de propiedades funcionales de Concentrados proteicos de haba (Vicia faba). *Revista Colombiana de Química*, 23(1), 73-86.
- Neira Mosquera, J. A. (2015). Evaluación de los efectos del aceite de sacha INCHI (*Plukenetia volubilis*), harina de haba (*Vicia faba*) y proteína de soja (*Glycine max*) en la obtención de galletas fortificadas, con fines alimentarios.
- Pasqualini S, L. C., Antonielli M. (1991). Seed storage proteins in several genetic lines of Viciafaba. *Plant Physiology and Biochemistry* 29: 507-515
- Pérez, H. M. G. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*, 1(2), 31-34.
- Porrás Loaiza, A., & López Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 121-134.

- Portillo, P. (2012). Aislamiento y caracterización de las fracciones proteicas de la semilla de *Moringa oleifera*.
- Ramírez Navas, J. S. (2006). *Liofilización de alimentos*: Revista ReCiTeIA.
- Rocha Espinoza, M & Vasquez Arreaga, M (2011). Utilización de harina de haba (*vicia faba L.*) en la elaboración de pan.
- Salas Salvadó, J., García Lorda, P., & Sánchez i Ripollès, J. (2005). La alimentación y la nutrición a través de la historia. *Editorial Glosa, S.L.*
- Tipán, C., & Fernando, B. (2014). Evaluación de la fijación de nitrógeno de cepas de *Rhizobium spp.* en invernadero, para arveja (*Pisum sativum*), chocho (*Lupinus mutabilis*), fréjol (*Phaseolus vulgaris*), haba (*Vicia faba*) y vicia (*Vicia sp.*), Cutuglagua-Pichincha.
- Valdivia, R & Jaramillo, M. (2011). Evaluación agronómica de la fecha de siembra en habas determinadas (*Vicia faba L.* var. Major).
- Vioque, J., Sánchez Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M & Millán, F. (2000). Péptidos bioactivos en proteínas de reserva.

ANEXOS

ANEXO A
FASE EXPERIMENTAL
(FOTOGRAFÍAS)

OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS PROTEICOS DE HABA

HARINA DE HABA (PRODICEREAL)



ADICION DE AGUA- AGITACIÓN DE LA MUESTRAS



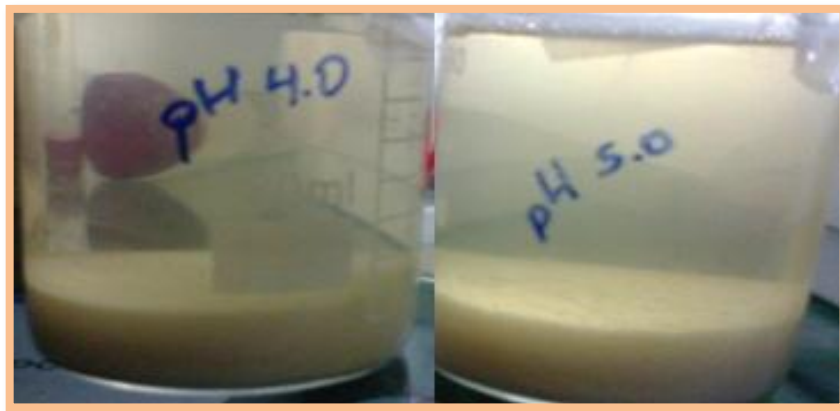
AJUSTE DE pH



CENTRIFUGACIÓN



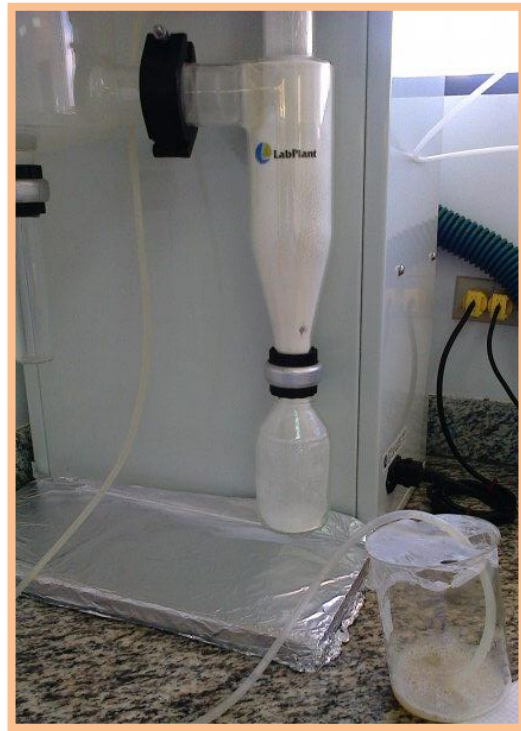
SEPARACION DE LA PROTEINA DEL SOBRENADANTE



SECADO POR LIOFILIZACIÓN



SECADO POR SPRAY DRYER



SECADO POR SPRAY DRYER



EQUIPO SPRAY DRYER



SEPARACIÓN DE LA PROTEINA DE HABA (MEJOR RENDIMIENTO pH 4,0)



CONCENTRADO DE PROTEÍNA (LIOFILIZADO)



CARACTERIZACIÓN DE LOS CONCENTRADOS PROTEICOS

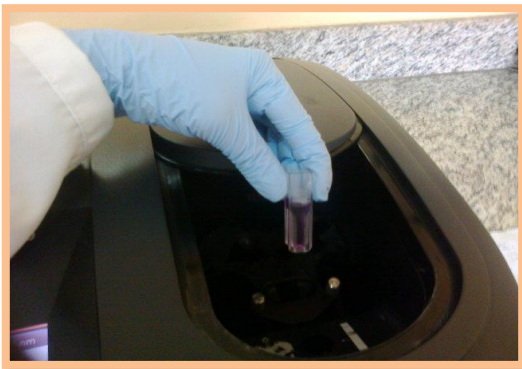
MÉTODO DE BCA- CONCENTRACIONES



MÉTODO BCA- CAMBIO DE COLOR



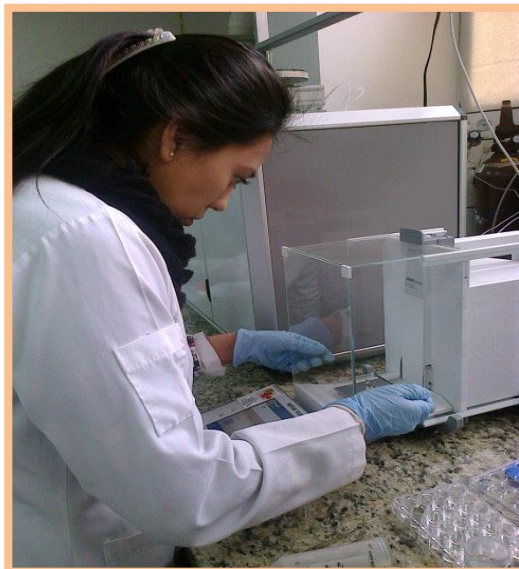
MEDICION DE LAS ABSORBANCIAS



MÉTODO DUMAS- EQUIPO



ELABORACION DE LA MUESTRA-DUMAS



MUESTRAS POLIFENOLAS



MEDICIÓN DE ABSORBANCIA



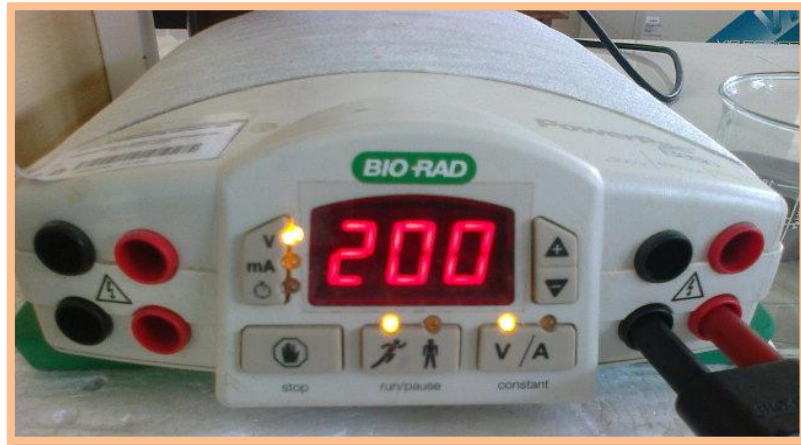
AGITACION DE MUESTRAS



CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA EN FASE DE FASE INVERSA (RP-HPLC) – EQUIPO



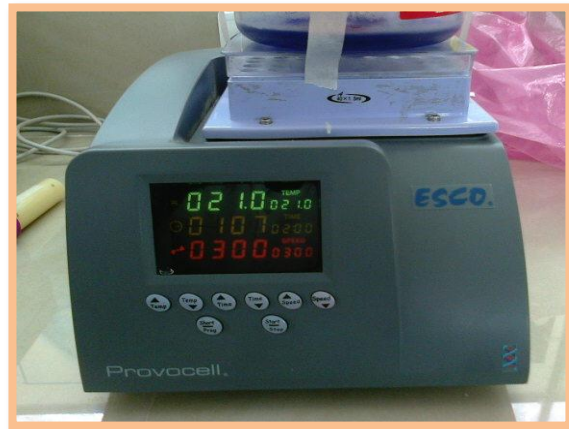
TECNICA DE ELECTROFORESIS SDS-PAGE



CORRIDA DE GELES



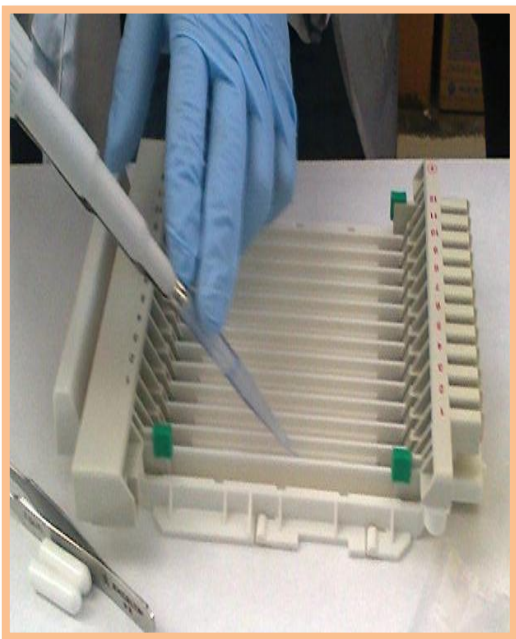
AGITACION DE GELES (TEÑIDO)



SDS-PAGE (2 DIMENSIONES)- EQUIPO



ELABORACION DEL GEL 2D



COLOCACIÓN DE TIRAS 2D



CORRIDA DEL GEL 2D



ANÁLISIS PROXIMAL

DETERMINACIÓN DE GRASA



CENIZAS



CONGELADOR -84°C



CONGELADOR -20°C



ANEXO B

ANÁLISIS PROXIMAL

Tabla 6. Análisis proximal de la harina de haba (PRODICEREAL)

Análisis Proximal de la harina de haba	
Componentes	Porcentaje (%)
Cenizas	2,53
Proteína %(N*6,25)	16,1
Humedad	7,65
Grasa	10,39

Proteína se midió con el método AOAC Ed 20, 2016 2001,11 a 18,4°C; 45% HR

Tabla 7. Análisis proximal del concentrado proteínico de haba (Liofilizado pH 4,0)

Análisis Proximal del concentrado proteínico de haba	
Componentes	Porcentaje (%)
Cenizas	6,50
Proteína %(N*6,25)	63,6
Humedad	7,00
Grasa	0,571

Proteína se midió con el método AOAC Ed 20, 2016 2001,11 a 18,4°C; 45% HR

ANEXO C

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Tabla 8. Análisis estadístico del rendimiento obtenido de la proteína de haba por liofilización a diferentes pHs

N°	pH	% Rendimientos			prom	σ^2	σ	CV
		R1	R2	R3				
1	2	0,5	0,532	0,505	0,51	0,00059267	0,02434475	0,0475174
2	3	2,9	2,873	3,048	2,94	0,01775267	0,13323913	0,0453143
3	4	11,44	13,341	15,242	13,34	7,227602	2,68841998	0,20151563
4	5	5,444	4,752	5,098	5,10	0,239432	0,48931789	0,09598232

Tabla 9. Análisis de varianza de Rendimiento por Liofilización

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rendimientos	12	0,98	0,96	17,96

Tabla 10. Cuadro de Análisis de Varianza de Rendimientos por Liofilización

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	280,89	5	56,18	58,12	0,0001
pH	279,21	3	93,07	96,29	<0,0001
Columna2	1,69	2	0,84	0,87	0,4650
Error	5,80	6	0,97		
Total	286,69	11			

Tabla 11. Test de Tukey para Rendimientos de muestras por Liofilización.

Error: 0,9665 gl: 6				
pH	Medias	n	E.E.	
2	0,51	3	0,57	A
3	2,94	3	0,57	A B
5	5,10	3	0,57	B
4	13,34	3	0,57	C
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)				

Alfa= 0,05 DMS=2,77877

Rendimientos de concentrados de proteína por Liofilización

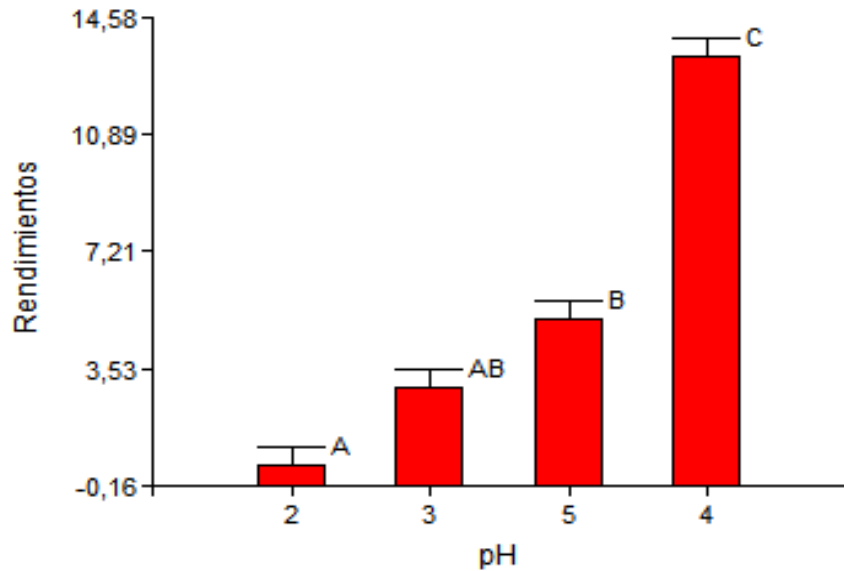


Figura 18. Rendimientos de concentrados de proteína mediante el secado por Liofilización

Tabla 12. Análisis estadístico del rendimiento obtenido de la proteína de haba por Spray Dryer a diferentes pHs

N°	pH	R1	R2	R3	prom	σ^2	σ	CV
1	2	1,677	1,542	1,542	1,59	0,01215	0,11022704	0,06945623
2	3	3,239	3,267	3,239	3,25	0,0005103	0,02258974	0,00695449
3	4	4,475	4,375	4,375	4,41	0,00657807	0,08110533	0,01839772
4	5	4,082	3,805	3,805	3,90	0,05102963	0,22589739	0,05796369

Tabla 13. Análisis de varianza de Rendimiento por Spray Dryer

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rendimientos	12	1,00	1,00	2,12

Tabla 14. Cuadro de Análisis de Varianza de Rendimientos por Spray Dryer

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	13,61	5	2,72	561,83	<0,0001
pH	13,56	3	4,52	933,53	<0,0001
Columna2	0,04	2	0,02	4,28	0,0701
Error	0,03	6	4,8E-03		
Total	13,63	11			

Tabla 15. Test de Tukey para Rendimientos de muestras por Spray Dryer

Error: 0,0048 gl: 6				
pH	Medias	n	E.E.	
2	1,59	3	0,04	A
3	3,25	3	0,04	B
5	3,90	3	0,04	C
4	4,41	3	0,04	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Alfa= 0,05 DMS=0,19671

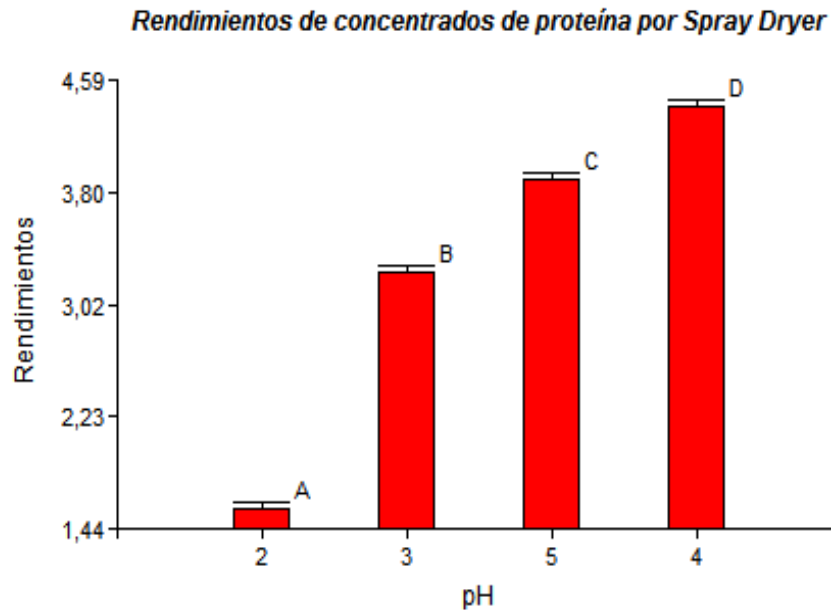


Figura 19. Rendimientos de concentrados de proteína mediante el secado por Liofilización

APLICACIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL A*B PARA LA DETERMINACIÓN DEL MEJOR TRATAMIENTO DE LOS AISLADOS PROTEICOS DE HARINA DE HABA EN BASE A SU RENDIMIENTO.

Mod. Mat:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (A*B)_{ij} + R_k + E_{ijk}$$

HIPÓTESIS

Ho: $A_i = 0$

Ha: $B_j = 0$

Ha: $A_i = 0$

Ho: $(A*B)_{ij} = 0$

Ho: $B_j = 0$

Ha: $(A*B)_{ij} = 0$

FACTORES DE ESTUDIO

Factor A: Tipo de secado

Factor B: pHs

Niveles:

Niveles:

a1: Liofilizados (LIO)

b1: 2

a2: Spray Dryer (SD)

b2: 3

b3: 4

b4: 5

INTERACCIONES

- Lio- pH2

- Lio- pH5

- SD- pH4

- Lio- pH3

- SD- pH2

- SD- pH5

- Lio- pH4

- SD- pH3

Tabla 16. Cálculos del diseño experimental A*B para la determinación del mejor tratamiento.

		%Rendimientos		
Muestra	Tratamientos	R1	R2	R3
Lio- pH2	a0b0	0,5	0,532	0,505
Lio- pH3	a0b1	2,9	2,873	3,048
Lio- pH4	a0b2	11,44	13,341	15,242
Lio- pH5	a0b3	5,444	4,752	5,098
SD- pH2	a1b0	1,677	1,542	1,542
SD- pH3	a1b1	3,239	3,267	3,239
SD- pH4	a1b2	4,475	4,375	4,375
SD- pH5	a1b3	4,082	3,805	3,805

		%Rendimientos			yij.	prom Yij
Muestra	Tratamientos	R1	R2	R3		
Lio- pH2	a0b0	0,5	0,532	0,505	1,537	0,512
Lio- pH3	a0b1	2,9	2,873	3,048	8,821	2,940
Lio- pH4	a0b2	11,44	13,341	15,242	40,023	13,341
Lio- pH5	a0b3	5,444	4,752	5,098	15,294	5,098
SD- pH2	a1b0	1,677	1,542	1,542	4,761	1,587
SD- pH3	a1b1	3,239	3,267	3,239	9,745	3,248
SD- pH4	a1b2	4,475	4,375	4,375	13,225	4,408
SD- pH5	a1b3	4,082	3,805	3,805	11,692	3,897
y..K		33,757	34,487	36,854	105,098	Y...

SUMA $\sum Y_{ijk}^2$ 789,274208

SUMA

$\sum Y_{ij}^2$ 2345,15501

SUMA $\sum Y_{..k}^2$ 3687,10553

24

SCT= $\sum \sum Y_{ijk}^2 - \sum Y_{..k}^2 / (a*b*r)$

329,041308

$$SCTr = \frac{1}{r} \sum \sum Y_{ij}^2 - \frac{Y_{...}^2}{(a*b*r)}$$

321,485437

$$SCR = \frac{1}{(a*b)} \sum Y_{..k}^2 - \frac{Y_{...}^2}{(a*b*r)}$$

0,65529158

$$SCE = SCT - SCTr - SCR$$

6,90057975

Tabla 17. Tabla de doble entrada del diseño experimental A*B.

	b0	b1	b2	b3	Yi..	prom Yi..
a0	1,537	8,821	40,023	15,294	65,675	16,41875
a1	4,761	9,745	13,225	11,692	39,423	9,85575
Y.j.	6,298	18,566	53,248	26,986	105,098	
prom Y.j.	3,149	9,283	26,624	13,493		

suma Yi..² 5867,37855

suma Y.j..² 3947,95486

$$SCA = \frac{1}{(b*r)} \sum Yi..² - \frac{Y_{...}^2}{a*b*r}$$

28,7153127

$$SCB = \frac{1}{(a*r)} \sum Y.j..² - \frac{Y_{...}^2}{a*b*r}$$

197,759577

$$SC(A*B) = SCTr - SCA - SCB$$

95,0105473

Tabla 18. Análisis de varianza del diseño experimental A*B

FV	Gl	SC	CM	Fc	Ft
R	2	0,65529158	0,32764579	0,71221362	3,8853
A	1	28,7153127	28,7153127	62,4193482	4,5431
B	3	197,759577	65,9198588	143,292001	3,2874
A*B	3	95,0105473	31,6701824	68,8424384	3,2874
Error	15	6,90057975	0,46003865		
Total	23	329,041308			

$$\begin{aligned} \text{Tukey} &= q_{\max} * \text{raiz}(\text{CME}/n) \\ &= 3,01 * \sqrt{0,46/8} \\ &= 0,7217 \end{aligned}$$

Tabla 19. Tabla de doble entrada para el factor A

		a0	a1
		16,41875	9,85575
a0	16,41875	0,000	-6,563
a1	9,85575		0,000

No presenta diferencias significativas.

$$\begin{aligned} \text{Tukey} &= q_{\max} * \text{raiz}(\text{CME}/n) \\ &= 4,08 * \sqrt{0,46/8} \\ &= 0,9783 \end{aligned}$$

Tabla 20. Tabla de doble entrada para el factor B

		b0	b1	b2	b3
		3,149	9,283	26,624	13,493
b0	3,149	0,000	6,134*	23,475*	10,344*
b1	9,283		0,000	17,341*	4,21*
b2	26,624			0,000	-13,131
b3	13,493				0,000

El factor b3 no presentan diferencias significativas con el factor b2 (pH5 y pH4) respectivamente. Los dos métodos de secado Spray Dryer y secado por Liofilización presentan diferencias significativas a un nivel de confianza de 95%.

ANEXO D

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LA CUANTIFICACIÓN PROTEICA Y CONTENIDO DE FENOLES TOTALES

Tabla 21. Absorbancias de las muestras de proteína de haba en la aplicación del método BCA para muestras Liofilizadas.

Conc. µg/mL	Absorbancia 562 nm		
	1	2	3
2000	3,696	3,696	3,698
1500	2,929	2,937	2,947
1000	1,869	1,867	1,868
750	1,508	1,509	1,510
500	0,923	0,924	0,925
250	0,468	0,468	0,469
125	0,261	0,261	0,262
25	0,089	0,090	0,090

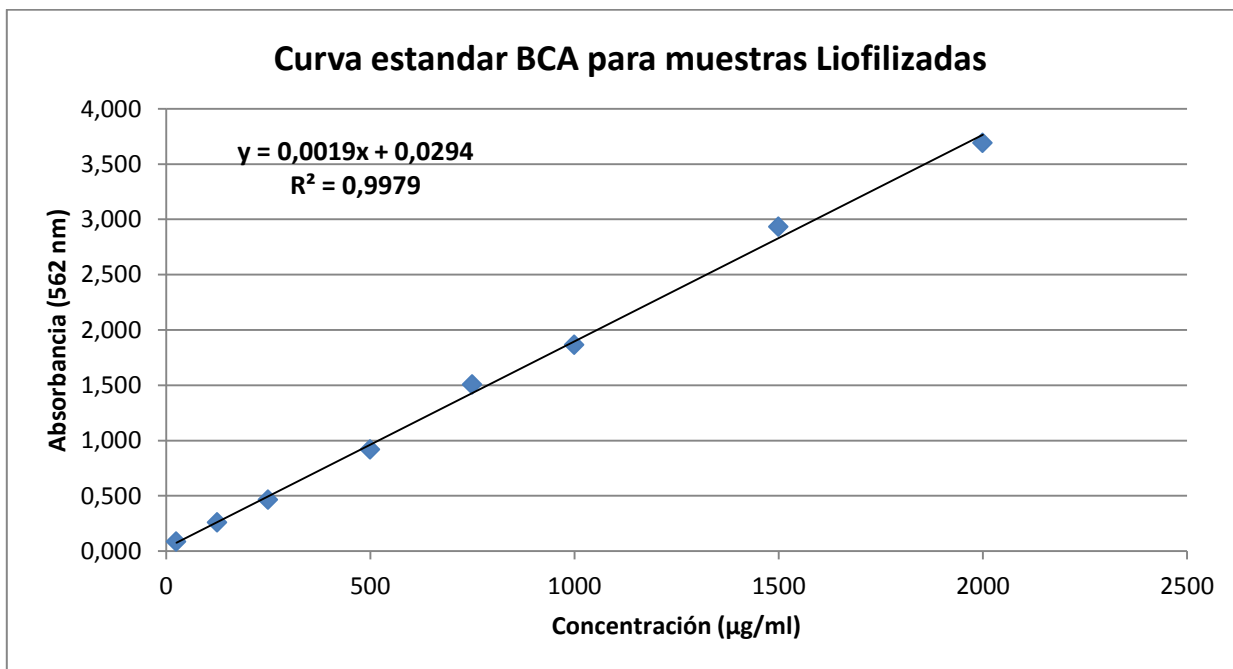


Figura 20. Curva estándar de BCA a diferentes concentraciones y con una absorbancia de 562 nm

Tabla 22. Desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración de proteína por medio de BCA para muestras Liofilizadas.

Muestra	Conc. (µg/mL)	Proteína R1 (%)	Proteína R2 (%)	Proteína R3 (%)	Proteína promedio (%)	Desv. Est.	C.V.
pH 2	750	74,048	74,404	74,476	74,309	0,229	0,308
pH 3	750	71,692	71,835	71,906	71,811	0,109	0,151
pH 4	750	76,403	76,545	76,617	76,522	0,109	0,142
pH 5	750	93,103	93,388	93,74	93,412	0,321	0,344

Tabla 23. Análisis de varianza de concentración de proteína BCA por Liofilización

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CONC. PROTEINA	12	1,00	1,00	0,14

Tabla 24. Cuadro de Análisis de Varianza de concentración de proteína BCA por Liofilización

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	862,86	5	172,57	14183,98	<0,0001
pH	862,56	3	287,52	23631,90	<0,0001
método	0,29	2	0,15	12,09	0,0079
Error	0,07	6	0,01		
Total	862,93	11			

Tabla 25. Test de Tukey para la concentración proteica de muestras por Liofilización.

Error: 0,0122 gl: 6				
pH	Medias	n	E.E.	
3	71,81	3	0,06	A
2	74,31	3	0,06	B
4	76,52	3	0,06	C
5	93,41	3	0,06	D
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)				

Alfa= 0,05 DMS=0,31177

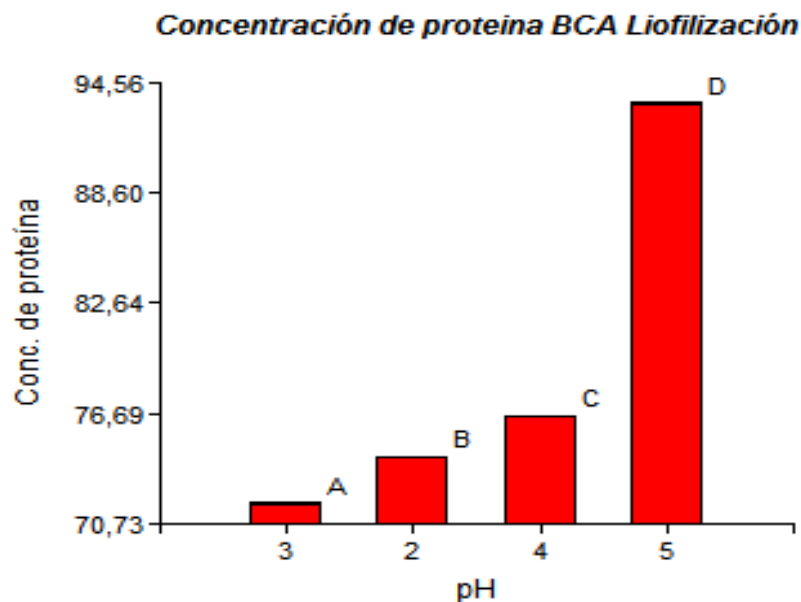


Figura 21. Concentración de proteína mediante el secado por Liofilización

Tabla 26. Absorbancias de las muestras de proteína de haba en la aplicación del método BCA para muestras secada por Spray Dryer

Conc. µg/mL	Absorbancia 562 nm		
	1	2	3
2000	3,696	3,696	3,698
1500	2,929	2,937	2,947
1000	1,869	1,867	1,868
750	1,508	1,509	1,510
500	0,923	0,924	0,925
250	0,468	0,468	0,469
125	0,261	0,261	0,262
25	0,089	0,090	0,090

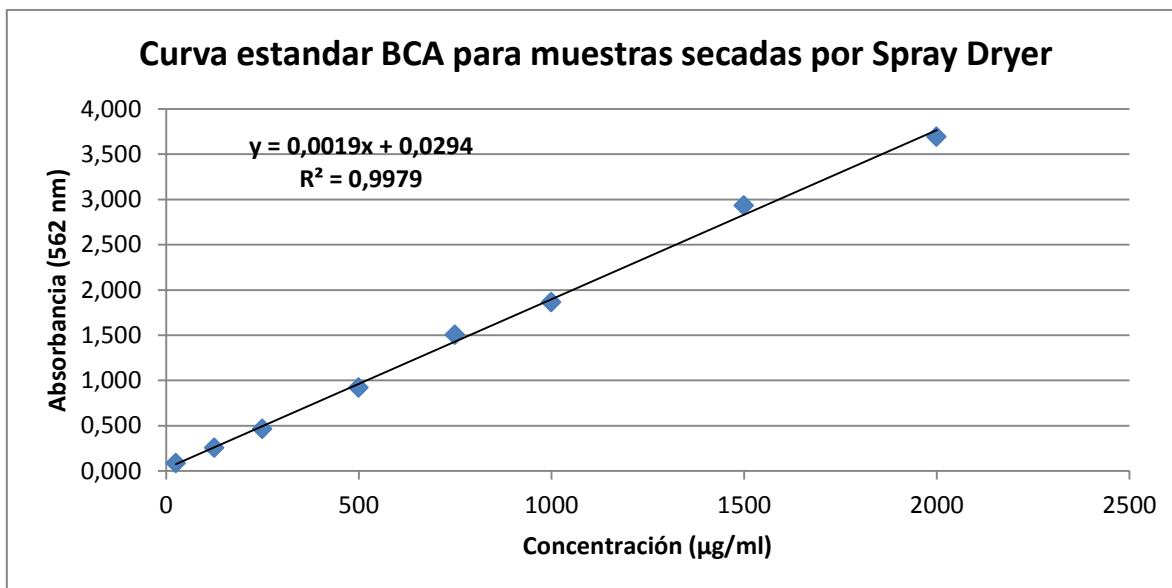


Figura 22. Curva estándar de BCA a diferentes concentraciones y con una absorbancia de 562 nm

Tabla 27. Desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración de proteína por medio de BCA para muestras secadas por Spray Dryer.

Muestra	Conc. (µg/mL)	Proteína R1 (%)	Proteína R2 (%)	Proteína R3 (%)	Proteína promedio (%)	Desv. Est.	C.V.
pH 2	500	51,37	51,27	51,37	51,34	0,06	0,12
pH 3	500	70,32	70,43	70,54	70,43	0,11	0,15
pH 4	500	44,63	44,74	44,63	44,66	0,06	0,14
pH 5	500	48,59	48,70	48,48	48,59	0,11	0,22

Tabla 28. Análisis de varianza de concentración de proteína BCA por Spray Dryer

Variable	N	R²	R² Aj	CV
Conc. Proteína	12	1,00	1,00	0,18

Tabla 29. Cuadro de Análisis de Varianza de concentración de proteína BCA por Spray Dryer

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1179,54	5	235,91	25044,87	<0,0001
pH	1179,54	3	393,18	41741,21	<0,0001
Réplicas	0,01	2	3,3E-03	0,35	0,7174
Error	0,06	6	0,01		
Total	1179,60	11			

Tabla 30.. Test de Tukey para la concentración proteica de muestras por Spray Dryer

Error: 0,0094 gl: 6				
pH	Medias	n	E.E.	
4	44,67	3	0,06	A
5	48,59	3	0,06	B
2	51,34	3	0,06	C
3	70,43	3	0,06	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Alfa= 0,05 DMS=0,27432

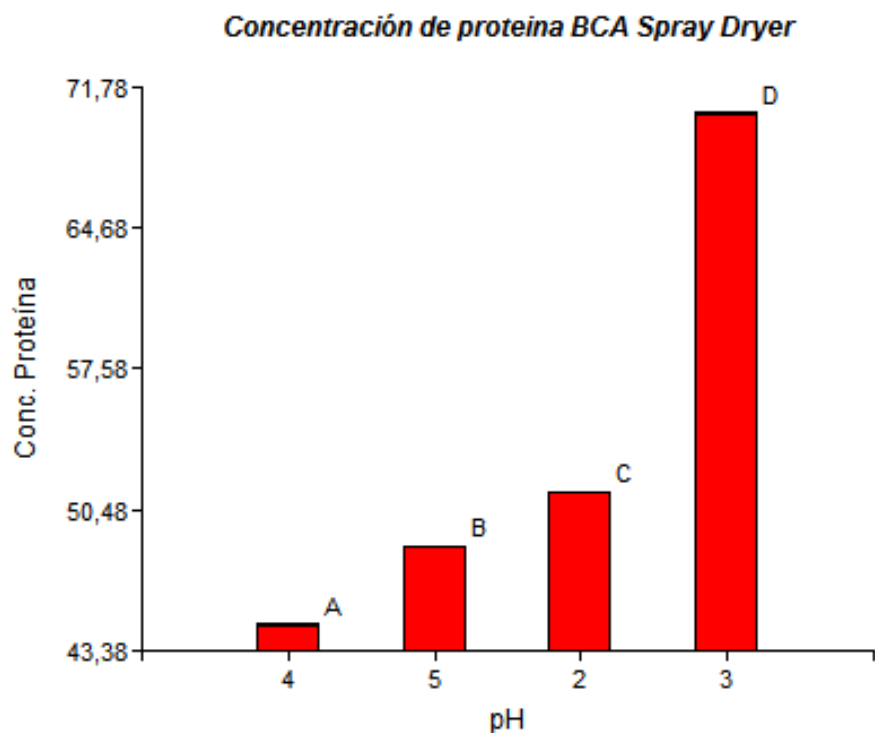


Figura 23. Concentración de proteína mediante el secado por Spray Dryer

CONTENIDO DE FENOLES TOTALES SOLUBLES

Tabla 31. Análisis de varianza del contenido de polifenoles totales.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Contenido de Polifenoles t..	12	1,00	1,00	0,11

Tabla 32. Cuadro de Análisis de Varianza del contenido de polifenoles totales.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	81203,56	5	16240,71	232395,93	<0,0001
Réplicas	0,09	2	0,04	0,63	0,5654
pH	81203,47	3	27067,82	387326,12	<0,0001
Error	0,42	6	0,07		
Total	81203,98	11			

Tabla 33. Test de Tukey para el contenido de polifenoles totales

Error: 0,0699 gl: 6					
pH	Medias	n	E.E.		
4	159,87	3	0,15	A	
3	187,65	3	0,15		B
5	211,25	3	0,15		C
2	371,53	3	0,15		D
<i>Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)</i>					

Alfa= 0,05 DMS=0,74719