



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS



Obtención de un hidrolizado enzimático de harina de chocho (*Lupinus mutabilis*
Sweet)

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previa la obtención del Título de Ingeniera en Alimentos otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos.

Autor: Vanessa Alexandra Navas Enríquez

Tutor: Ph.D. Orestes Darío López Hernández

Ambato - Ecuador

Agosto - 2017

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Orestes Darío López Hernández

CERTIFICA:

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 a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 19 de Junio del 2017.



Ph.D. Orestes Darío López Hernández
C. I. 1754784864
TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Vanessa Alexandra Navas Enríquez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.

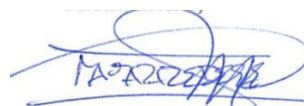


Vanessa Alexandra Navas Enríquez
C.I. 172264333-3
AUTORA

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:



Dra. Mayra Paredes
Presidenta del Tribunal



Mg. Cecilia Mercedes Carpio
C.I. 170462765-0



Ph.D. Milton Rubén Ramos Moya
C.I. 180111963-5

Ambato, 19 de Julio del 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 esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Srta, Vanessa Alexandra Navas Enríquez
C. I. 172264333-3
Autora

DEDICATORIA

A mi madre Carmita E., quien siempre creyó en mí, me ayudó con su ejemplo, amor y paciencia, a perseguir mis sueños y a alcanzarlos, y aunque ya no esté en mi camino, ella es y será mi fuerza para seguir adelante.

A mi padre Jorge N., quien ha sido mi apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, ha sido mi ejemplo de esfuerzo, de constancia, gracias por ser ese pilar fundamental y ese gran padre y amigo.

A mi abuelita Laura E. gracias por su sacrificio y amor que nos ha brindado a mí y a mis hermanos, por ser una segunda madre para nosotros, por sus consejos y cuidados.

A mis hermanos Paúl y Jorge por ser quienes han estado conmigo en los momentos en que los he necesitado, por ayudarme a cumplir mis objetivos y con su ejemplo, a ser una mejor persona cada día.

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia gracias por todo el amor que me han brindado, los amo. A mi tutor, Ph.D. Orestes López por su gran apoyo y guía en la realización de mi proyecto de investigación. A la Mg. Cecilia Carpio y a la Ph.D. Dayana Morales por su apoyo, tiempo y dedicación en este trabajo de investigación. A Joshua por su tiempo y motivación en la conclusión de mi trabajo, a mis amigos Roberto, Jessica, Estefanía, David, Israel, Fátima, Jose, Jorge, Nancy, Stalin, Allem, a mis amigas Mishel y Samy gracias por su amistad incondicional, a todos mis buenos profesores y compañeros a quienes los he conocido a lo largo de mi carrera universitaria. A la Dra. Jacqueline Ortiz, a la Dra. Mayra Paredes, al Ph.D. Milton Ramos, a Tarsis y Paola por su colaboración en el desarrollo de mi proyecto de investigación.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
EL PROBLEMA	3
Tema.....	3
Justificación.....	3
Objetivos	4
General	4
Específicos	4
CAPÍTULO II	5
MARCO TEÓRICO.....	5
Antecedentes investigativos	5
Hipótesis.....	8
Señalamiento de variables de la hipótesis	8
Variables Independientes	8
Variable Dependiente.....	8
CAPÍTULO III.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Materiales.....	9
Materia prima y reactivos.....	9
Equipos.....	10
Métodos.....	11
Obtención de harina de chocho	11
Condiciones de operación para el proceso de hidrólisis	11
Análisis del hidrolizado.....	11
Determinación de sólidos totales	11
Determinación de nitrógeno amínico	12
Elaboración del hidrolizado de chocho en laboratorio.....	12
Secado del hidrolizado	13
Escalado del proceso de obtención del hidrolizado a nivel industrial	13
Electroforesis SDS-PAGE	13
Cromatografía líquida de ultra eficiencia UHPLC.....	15

Actividad enzimática.....	16
Análisis proximal	17
Diseño Experimental.....	17
CAPÍTULO IV	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
Análisis y discusión de los resultados	18
Análisis del hidrolizado.....	18
Determinación de sólidos totales	18
Determinación de nitrógeno amínico	20
Condiciones óptimas de deseabilidad del proceso de hidrólisis	22
Determinación del tiempo óptimo para la hidrólisis	23
Electroforesis SDS-PAGE	25
Cromatografía UHPLC	26
Análisis proximal	28
Actividad enzimática.....	29
Verificación de hipótesis.....	30
CAPÍTULO V	31
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	31
Conclusiones	31
Recomendaciones.....	32
MATERIAL DE REFERENCIA	33
Referencias Bibliográficas	33
Anexos	37

ÍNDICE GENERAL DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de aminoácidos en la semilla cruda del chocho.....	5
Tabla 2. Pesos moleculares de moléculas nitrogenadas a partir de proteínas.....	6
Tabla 3. Análisis de Varianza para el tiempo de hidrólisis.....	22
Tabla 4. Análisis proximal del grano de chocho desamargado y pasteurizado.....	29
Tabla 5. Actividad enzimática de la bromelina medidas en unidades de digestión de la gelatina.....	30
Tabla 6. Actividad enzimática valores de NaOH gastados.....	37
Tabla 7. Valores de porcentaje de humedad, sólidos totales y nitrógeno amínico a diferentes concentraciones y pH.....	37
Tabla 8. Porcentaje de nitrógeno amínico promedio de dos réplicas en diferentes tiempos de hidrólisis.....	37

ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS

Figura 1. Resultados estadísticos para el rendimiento del hidrolizado de chocho.....	18
Figura 2. Relación entre el rendimiento, el pH y la concentración de sustrato.....	19
Figura 3. Resultados estadísticos para el porcentaje de nitrógeno amínico del hidrolizado de chocho.....	20
Figura 4. Relación entre el porcentaje de nitrógeno amínico, el pH y la concentración de sustrato.....	21
Figura 5. Optimización de la deseabilidad en relación al pH y a la concentración de sustrato.....	22
Figura 6. Relación entre porcentaje de nitrógeno amínico y el tiempo de hidrólisis...	24
Figura 7. Electroforesis en gel de Poliacrilamida-SDS.....	25
Figura 8. Cromatograma de la proteína de chocho.....	26
Figura 9. Cromatograma del hidrolizado de chocho.....	27
Figura 10. Comparación de cromatogramas del hidrolizado y de la proteína de chocho.....	27
Figura 11. Tamizado de harina de chocho.....	38
Figura 12. Hidrólisis a diferentes pH y relación sustrato agua.....	38
Figura 13. Hidrólisis a condiciones de deseabilidad en laboratorio.....	38
Figura 14. Secado del hidrolizado en Spray Dryer	39
Figura 15. Hidrolizado de chocho a nivel de laboratorio.....	39
Figura 16. Obtención de harina de chocho en la industria.....	39
Figura 17. Proceso de hidrólisis en condiciones de deseabilidad.....	40
Figura 18. Recolector del Spray Dryer	40
Figura 19. Hidrolizado en polvo.....	40
Figura 20. Mezcla de harina de chocho y agua.....	41
Figura 21. Solubilización de la proteína de chocho a pH 10,5.....	41
Figura 22. Precipitación ácida de la proteína a pH 4,5.....	41
Figura 23. Centrifugado del precipitado de proteína de chocho.....	42
Figura 24. Tubos de ensayo con proteína precipitada.....	42
Figura 25. Preparación del gel de acrilamida.....	42

Figura 26. Electroforesis SDS-PAGE.....	43
Figura 27. Muestras de proteína e hidrolizado de chocho migrando por acción de la carga.....	43
Figura 28. Gel de acrilamida con muestras sometidas a electroforesis.....	43
Figura 29. Preparación de las muestras para la cromatografía.....	44
Figura 30. Equipo UHPLC.....	44

RESUMEN

La finalidad de este trabajo fue obtener un hidrolizado enzimático de harina de chocho para lo cual se utilizó jugo de piña como fuente de la bromelina. Se estudiaron dos factores el pH entre 5 y 6, y la relación sustrato-agua entre 1/10 y 1/20. Se obtuvieron las ecuaciones de predicción para el rendimiento y el grado de hidrólisis medido en porcentaje de nitrógeno amínico y las condiciones óptimas para la máxima deseabilidad que fueron pH 5 y relación sustrato-agua 1/10,3, a partir de las cuales se realizó un escalado a nivel industrial. Se realizó la caracterización del hidrolizado mediante electroforesis SDS PAGE y UHPLC, lo que permitió concluir que efectivamente la proteína se fraccionó en péptidos y como propiedad tecno-funcional mejoró su solubilidad pudiéndose aplicar el hidrolizado como ingrediente funcional.

Palabras clave: chocho, hidrólisis enzimática, bromelina, electroforesis, ingrediente funcional

ABSTRACT

The purpose of this investigation was to obtain an enzymatic hydrolyzate from andean lupin flour. For which pineapple juice was used as the source of bromelain. Two factors were studied: pH 5 and 6, and substrate-water ratio 1/10 and 1/20. The prediction equations for the yield and the degree of hydrolysis measured as amino nitrogen percentage were obtained as well as the optimum conditions for the maximum desirability which were pH 5 and substrate-water ratio 1/10,3, from which an scale up for industrial production was performed. The hydrolyzate characterization was carried out by SDS-PAGE electrophoresis and UHPLC, which allowed to conclude that the protein was fractionated in peptides and as a techno-functional property, its solubility improved and the hydrolyzate could be applied as a functional ingredient.

Key words: andean lupin, enzymatic hydrolysis, bromelain, electrophoresis, functional ingredient

INTRODUCCIÓN

En el mercado actual se está aprovechando la variedad de alimentos con alto contenido proteico para transformarlos, proveerles de un valor añadido y ampliar su empleo en la industria **(Drago et al., 2013)** debido a que las proteínas tienen ciertas propiedades funcionales y nutricionales que pueden servir para mejorar la calidad de productos alimenticios y farmacéuticos.

La hidrólisis es un proceso que permite mejorar la biodisponibilidad de proteínas de las oleaginosas en comparación con los granos no procesados. Los hidrolizados son utilizados como ingredientes funcionales que tienen varias aplicaciones en el procesamiento de los alimentos, algunos de ellos son fundamentales para la dieta de personas con Alzheimer, con síndrome de intestino corto, entre otras enfermedades que impiden la absorción adecuada de la proteína **(Evangelho et al., 2016)**. Los hidrolizados proteicos también sirven para mejorar características organolépticas de los alimentos.

El chocho es un grano andino cuyo porcentaje de proteína bordea el 50 %, en Ecuador esta oleaginosa es cultivada en la región sierra y se la consume en un 80 % como grano desamargado sin someter a otro tipo de procesos mientras que su consumo en la costa es del 19 % **(Caicedo, Peralta, Villacrés & Rivera, 2001)**.

Para el proceso de hidrólisis de proteínas generalmente se utilizan enzimas proteasas las cuales en su mayoría son obtenidas mediante microorganismos, sin embargo, las proteasas de fuentes vegetales no pueden ser reemplazadas. Dentro de este tipo de proteasas está la bromelina que es eficaz para obtener hidrolizados a nivel industrial **(Hernández et al., 2005)**. La bromelina es extraída de la piña y comercializada en polvo, sin embargo, la pulpa de piña contiene esta enzima y podría aportar características organolépticas al hidrolizado como un sabor dulce y cítrico sin necesidad de añadir saborizantes ni edulcorantes artificiales.

La finalidad de este proyecto de investigación fue someter a la harina de chocho a un proceso que le dé un valor agregado, incrementando la absorción de las proteínas en el organismo y sirva como ingrediente funcional mediante la hidrólisis enzimática

aprovechando los beneficios que brinda la pulpa de piña y las propiedades nutricionales del chocho.

CAPÍTULO I EL PROBLEMA

Tema

OBTENCIÓN DE UN HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE HARINA DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis Sweet*).

Justificación

El chocho o tarwi de nombre científico *Lupinus mutabilis Sweet* es una leguminosa cultivada principalmente en Ecuador, Perú y Bolivia y, aunque por años ha sido relegado a personas de escasos recursos económicos, en la actualidad va ganando importancia por su valor nutritivo y su alto rendimiento agrícola. La planta de chocho fija el nitrógeno en el suelo, por lo que la semilla tiene un alto contenido de proteína entre 41 y 51 %. Sin embargo, la biodisponibilidad de las proteínas vegetales es baja en comparación con la proteína animal, es por ello que para mejorar su absorción en el organismo, las industrias utilizan procesos de hidrólisis (**Acuña & Caiza, 2010; Borja Lozano, 2014**).

Las proteínas al someterse al proceso de hidrólisis, adquieren ciertas características, entre las cuales están: alta solubilidad y dispersión, bajo peso molecular, baja viscosidad. Debido a estas propiedades los hidrolizados de proteína son utilizados en dietas enterales y en una diversidad de productos dentro del ámbito de tecnología alimentaria (**Benítez, Ibarz Ribas & Pagan Gilabert, 2008**). Los hidrolizados tienen una gran versatilidad y pueden ser utilizados como ingredientes funcionales tanto en alimentos sólidos como en bebidas, podemos citar su uso en la dieta de la tercera edad ya que hay una disminución de apetito y los alimentos enriquecidos con hidrolizados proteicos pueden suplir cierto déficit de aminoácidos dependiendo del grado de hidrólisis y calidad de la proteína (**De la Barca, Medrano, Hernández & Miranda, 2004; Pérez, 2012**).

Los principales métodos para obtener hidrolizados de proteína son la hidrólisis ácida y la enzimática, la primera puede destruir aminoácidos: triptófano serina, treonina, transformar la cisteína, glutamina, asparagina, entre otros, por lo que es recomendable el método biológico, en el que se utilizan proteasas que rompen las cadenas de las

proteínas en péptidos y aminoácidos. Las enzimas vegetales de mayor uso son la bromelina, papaína y la ficina las cuales no han podido ser reemplazadas por su especificidad en la ruptura de las moléculas de proteína y se las obtiene de su fuente natural (**Hernández et al., 2005; Manninen, 2004**).

La bromelina se encuentra en la piña, a diferencia de la papaína, su concentración se mantiene elevada cuando la fruta madura, en este estado los niveles de azúcares de las frutas se elevan y la acidez baja (**Lluguín Sánchez & Quinde Fuentes, 2015**). La piña tiene un tiempo de vida útil de 2 a 4 semanas mientras que la papaya de 1 a 3 semanas (**Velazquez & Hevia, 2007**). Según estudios realizados la papaya reduce la calidad organoléptica en cuanto a sabor y aroma en productos alimenticios al contrario de los frutos cítricos, como la piña que tiene mayor aceptación (**Viquez Rodríguez & González Leiva, 2002**). Los hidrolizados enzimáticos de proteína generalmente tienen péptidos de sabores amargos (**Gil, 2010**) por lo que un sabor cítrico como el de la piña puede enmascarar su amargor mejorando su calidad organoléptica.

El presente proyecto de investigación tiene como propósito obtener un hidrolizado de harina de chocho que pueda aplicarse a nivel industrial y pueda servir como ingrediente funcional en la industria alimentaria.

Objetivos

General

- Obtener un hidrolizado enzimático de harina de chocho.

Específicos

- Determinar las condiciones óptimas para la hidrólisis enzimática de las proteínas.
- Realizar un escalado del hidrolizado de chocho a nivel industrial.
- Caracterizar cualitativamente el hidrolizado obtenido mediante electroforesis SDS-PAGE y por cromatografía líquida de alta resolución.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

Antecedentes investigativos

Las proteínas son macromoléculas complejas cuya estructura tridimensional define sus propiedades. Su estructura puede ser modificada por diferentes factores: una variación de pH, presencia de químicos, enzimas, aumento de temperatura, etc. lo cual hace que existan modificaciones de las proteínas, en cuanto a solubilidad, viscosidad, capacidad espumante, entre otras (Carrillo, 2014).

El chocho tiene un alto contenido de proteína de buena calidad debido a los aminoácidos esenciales que contiene (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de aminoácidos en la semilla cruda del chocho

Aminoácidos	Contenido mg/ g de proteína
Isoleucina	40
Leucina	70
Lisina	57
Metionina + cisteína	23
Fenilalanina + tirosina	75
Treonina	37
Triptófano	9
Valina	38

Tomado de: **Poveda (2015)**

El proceso de hidrólisis se puede dar mediante métodos químicos con ácidos o álcalis o por métodos biológicos utilizando enzimas. En cuanto a la hidrólisis química tiene la desventaja que se pueden formar varios compuestos no necesariamente aptos para la salud, el uso de álcalis degrada la cisteína y la arginina y el uso de ácidos el triptófano, la treonina y la serina (Guadix, Guadix, Páez, González & Camacho, 2000).

Las enzimas actúan como catalizadores permitiendo que los enlaces, entre el grupo amino de un aminoácido y el carboxilo de otro, se rompan dando lugar a una molécula de agua y a cadenas cortas de aminoácidos pudiendo ser estas proteínas, proteosomas, peptonas, péptidos y aminoácidos (Tabla 2).

Tabla 2. Pesos moleculares de moléculas nitrogenadas a partir de proteínas

Molécula nitrogenada	Peso molecular (g/mol)
Proteínas	Mayor a 20000
Proteosomas	5000 - 10000
Peptonas	1000 - 6000
Péptidos	200 - 500
Aminoácidos	75 - 200

Tomado de: (Prieto, 2007)

La hidrólisis enzimática es un proceso en el que se utilizan enzimas endopeptidasas y exopeptidasas que no causan daños a los aminoácidos presentes en las proteínas debido a su especificidad y a las condiciones de operación en las que se trabaja, al contrario de una hidrólisis ácida y básica, las proteínas son divididas en péptidos y aminoácidos libres. La hidrólisis puede ser parcial o extensiva dependiendo si se obtienen péptidos de alto peso molecular o aminoácidos y péptidos de cadenas cortas, respectivamente **(Gil, 2010)**.

La bromelina es una enzima cisteinproteasa proveniente de la piña, el rango de temperatura en que actúa es de 20-65 °C y el intervalo de pH es de 5-8, su sitio de acción catalítica es en la fenilalanina y en las uniones entre AA hidrofóbicos **(Borja Lozano, 2014)**.

Generalmente para hidrolizar aislados proteicos de vegetales se controla el pH y la temperatura, se utilizan reactores, en los cuales hay sistemas de agitación para agitar el proceso. Después de un tiempo establecido para la hidrólisis se suele inactivar las enzimas mediante calor o ajustando a un pH bajo, si el proceso lo requiere, se realiza una filtración en la que las enzimas son separadas del hidrolizado. En el proceso de hidrólisis la carga de las proteínas aumenta, su peso molecular disminuye y se liberan sus grupos hidrofóbicos; en cuanto a la parte nutricional, su digestibilidad aumenta debido al fraccionamiento en péptidos bioactivos mientras que disminuye su

alergenicidad. Debido a estos cambios las propiedades tecno-funcionales también varían **(Benítez et al., 2008)**.

El grado de hidrólisis es una medida de la ruptura de las moléculas utilizadas como sustrato en este caso de las proteínas a péptidos y a aminoácidos por la acción de las proteasas. El grado de hidrólisis va a estar limitado por ciertos factores como son: el tiempo de hidrólisis, el pH, la concentración del sustrato, la relación enzima-sustrato y la temperatura, así como también el tipo de enzima y la actividad enzimática sobre el sustrato **(Hernández Ledesma, 2002)**.

Debido a la hidrólisis las moléculas se modifican en cuanto a tamaño, carga, solubilidad, etc. Estos cambios se pueden medir mediante la caracterización de los hidrolizados que contempla distintos métodos para medir una propiedad específica en las moléculas; las técnicas más usuales son la electroforesis, la cromatografía, la medición del grado de hidrólisis (DH) **(Benítez et al., 2008)**.

La electroforesis es una técnica que permite separar moléculas biológicas como las proteínas para poder identificarlas, ésta separación se da debido a la diferencia de peso, tamaño y carga neta de las moléculas dependiendo del tipo de reactivos y medio utilizados. Mientras mayor sea la carga y menor peso y tamaño molecular, la migración de dichas moléculas se realizará con mayor rapidez **(Gammopathies, 2005)**.

La cromatografía es una técnica físico química que permite separar los componentes de alguna sustancia, existen varios tipos de cromatografía que se han ido actualizando a través del tiempo, como la cromatografía líquida de ultra eficiencia (UHPLC) que permite obtener cromatogramas en los cuales se puede observar la absorbancia de algún componente y el tiempo de retención de una manera rápida y eficaz **(Maldaner & Jardim, 2012)**.

Hipótesis

Señalamiento de variables de la hipótesis

La relación del sustrato - agua y el pH tienen influencia significativa sobre el porcentaje de nitrógeno amínico del hidrolizado.

Variables Independientes

Relación sustrato - agua

pH

Variable Dependiente

Porcentaje de nitrógeno amínico

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Varillas de agitación

Espátulas

Vasos de precipitación (100, 250, 500, 1000 y 2000 ml)

Probetas graduadas (10, 50, 500 y 1000 ml)

Pipetas graduadas (1, 2, 10 ml)

Balones de aforo (250 ml y 1000 ml)

Matraces (125 y 250 ml)

Bureta graduada (50 ml)

Soporte universal

Pinzas

Cernidor

Tamiz N° 100 HUMBOLDT

Papel aluminio

Magnetos de agitación

Materia prima y reactivos

Chocho desamargado adquirido en la empresa INDUNEVALL de Ambato

Piña de variedad Cayena Lisa

Agua destilada

Agua miliQ

NaOH 0,05 N, 0,1 N, 2 N, 50 %

HCl 0,1 N, 2 N

Formaldehído

Gelatina marca Gelada

Aceite de girasol

Ácido acético glacial

Cloruro de sodio

Peróxido de hidrógeno al 3 %

TRIS HCl 1 M pH 8,8

TRIS HCl 1,5 M pH 6,8

Acrilamida al 30 %

Dodecilsulfato SDS

TEMED

PSA al 10 %

Equipos

Cámara de secado Intertek

Plancha de calentamiento Thermo

Agitador vertical eléctrico IKA CD-160

Microcentrífuga Labnet 24D

Centrífuga Hettich Rotina 380

Microincubadora ProvoCell

Equipo UHPLC

Brixómetro

pH-metro EUTECH OAKTON

Spray dryer BÜCHI B-290

Balanza Analítica (precisión: $\pm 0,0001$ g) OHAUS PA313

Marmita de cocción

Licuadora

Refrigeradora

Molino eléctrico

Equipo para electroforesis BIO-RAD Power Pac Basic

Vórtex FISHER 945404

Balanza de humedad KERN MLS 50-3

Extractor de jugo en espiral

Métodos

Obtención de harina de chocho

El chocho desamargado y pasteurizado se adquirió en la empresa INDUNEVALL, se seleccionaron los granos, se colocaron en mallas metálicas y se los secó por 10 h a 60 °C en una cámara de secado marca Intertek modelo CD-160. Se molió el chocho seco en un molino eléctrico. Se tamizó la harina de chocho utilizando un tamiz N° 100 y se colocó en bolsas plásticas con cierre hermético.

Condiciones de operación para el proceso de hidrólisis

Se utilizó una concentración de jugo de piña y harina de chocho en relación a 10 gramos de bromelina contenida en el jugo por cada kilogramo de harina.

Para la obtención del jugo, la piña se lavó, se peló y se retiró el corazón, se licuó la pulpa y se tamizó en un tamiz N° 80.

Se estudiaron 2 factores, la relación harina – agua con dos variaciones 1:10 y 1:20 es decir al 10 y 5 % de concentración de la harina respecto al agua y el pH con los tratamientos a pH 5 y 6. Estas muestras se colocaron en un vaso de precipitación de 250 ml sobre una plancha de calentamiento en la que se mantuvo la temperatura de las muestras en un rango de 55 a 60 °C en agitación mediante magnetos durante dos horas. El pH se ajustó con NaOH 0,1 N y HCl 0,1 N durante cada hora, posteriormente se hirvió el hidrolizado durante 5 min.

Análisis del hidrolizado

Determinación de sólidos totales

Se pesaron 3 gramos de muestra en la balanza de humedad marca KERN, modelo MLS 50-3, y se obtuvieron los sólidos totales de la diferencia del 100 % y el porcentaje de humedad de la muestra. La determinación se realizó para los cuatro tratamientos por duplicado.

Determinación de nitrógeno amínico

Se realizó una dilución, con agua destilada, del hidrolizado de chocho al 2 % v/v, se neutralizó con NaOH 0,1 N, se agregaron 2 mililitros de solución de formaldehído neutralizado. Se tituló la solución con NaOH 0.1N hasta alcanzar un pH entre 9,1 y 9,2. Las muestras se analizaron por triplicado.

Para el cálculo del nitrógeno amínico se utilizó la fórmula:

$$\% \text{ N Amínico} = \frac{v \text{ NaOH } 0,1 \text{ N} * 1,4 * k}{v \text{ Muestra} * 1000} * 100 * \frac{95}{st}$$

v= mililitros gastados de hidróxido de sodio en concentración 0,1 N

k= la concentración práctica dividida para la concentración teórica de la solución de NaOH

% st= Porcentaje de sólidos totales de la muestra

Estudio del tiempo de hidrólisis

Se realizó el mismo proceso de hidrólisis con las condiciones óptimas utilizando un pH de 5 y relación sustrato-agua 1/10. Se tomaron muestras para la determinación del nitrógeno amínico y sólidos totales cada 30 min hasta llegar a 3 horas. Las mediciones se realizaron por duplicado.

Elaboración del hidrolizado de chocho en laboratorio

Se realizó un ensayo a escala de laboratorio de la mejor variante del diseño en el cual se siguió el mismo proceso de hidrólisis durante una hora utilizando pH 5 y la relación sustrato-agua 1/10. Se colocaron 100 g de harina de chocho, 770 ml de jugo de piña y

el agua en relación a la concentración del mejor tratamiento. Obteniendo un volumen total de 1,9 litros de hidrolizado.

Secado del hidrolizado

El hidrolizado obtenido a escala de laboratorio se sometió a secado por aspersión en un equipo BÜCHI Mini Spray Dryer, modelo B-290 a 150 °C con un porcentaje de aspiración del 100 %, la temperatura de entrada fue de 50 °C y la de salida de 85 °C. El flujo de aire de atomización fue de 500 l/h Se utilizó un cepillo para retirar el hidrolizado en polvo del recipiente del equipo y se guardó el polvo en bolsas plásticas herméticas.

Escalado del proceso de obtención del hidrolizado a nivel industrial

Se realizó el proceso de hidrólisis de la harina de chocho en la industria ANDES KINKUNA S.A para lo cual se utilizaron las condiciones de pH 5, relación sustrato-agua 1:10,3 según los mejores resultados del diseño experimental realizado. Se secó el chocho a 60 °C durante 10 h en una cámara de secado. Se procedió a moler el chocho seco desamargado en un molino industrial eléctrico de cuchilla 9 modelo FC-260. Para la obtención del jugo, se descascaró la piña manualmente con cuchillos de acero inoxidable, se extrajo la pulpa con un extractor de jugo en espiral.

Se colocó la harina de chocho y agua en relación 1/10,3 en un reactor de acero inoxidable, se añadió la pulpa de piña, se ajustó el pH a 5. Se procedió a calentar en un rango de 55 a 60 °C y se mantuvo en agitación durante una hora después de la cual se hirvió la mezcla durante 5 min y se secó en una cámara de secado en Spray Dryer a las mismas condiciones realizadas en el laboratorio.

Electroforesis SDS-PAGE

Se extrajo la proteína del chocho mediante una solubilización a pH 10,5 con una solución de NaOH 1N, posteriormente se realizó una centrifugación a 14 000 min⁻¹ en

la centrífuga de marca Hettich durante 5 min, al sobrenadante se añadió HCl 2 mol/l hasta ajustar a pH 4,5, se realizó una segunda centrifugación y se secó el precipitado mediante secado por aspersion.

Se pesaron 10 mg de aislado de proteína de chocho y del hidrolizado, se colocaron en tubos eppendorf, se agregó 1 ml de agua destilada a cada tubo con una micropipeta de 1000 µl.

Cada muestra fue agitada en un vortex, se tomó una alícuota de 200 µl de ambas muestras y se colocaron en tubos eppendorf, a los cuales se adicionó 200 µl de buffer para la muestra, el cual contenía 4,8 ml de agua destilada, 1,2 ml de TRIS-HCL 0,5 M, 1 ml de glicerol, 1,2 ml de SDS al 10 % y 0,6 ml de 2-mercaptoetanol, se mezcló cada tubo en un vortex, los tubos se colocaron en la Microincubadora a 90 °C durante 5 min y 500 min⁻¹. Se realizó el mismo proceso pero con buffer sin 2-mercaptoetanol.

Se prepararon dos gels uno inferior y otro superior.

Gel inferior:

1,2 ml de H₂O destilada

1,3 ml de TRIS-HCl de pH 8,8

2,7 ml de acrilamida al 30 %

75 µl de SDS

10 µl de TEMED

20 µl de PSA

Se agitó y con una pipeta, se tomaron 4,75 ml de la mezcla y se colocó entre los cristales, se llenó con agua destilada, se dejó en reposo hasta que se forme el gel y se retiró el agua.

Se preparó el gel de arriba

2,2 ml de H₂O destilada

0,42 m de TRIS HCl de pH 6,8

0,7 ml de acrilamida al 30 %

3,3 µl de SDS

6 µl de TEMED

20 µl de PSA

Se llenó el espacio entre los cristales con este gel y se colocó la peinilla, se dejó en reposo hasta que se gelificó y se retiró la peinilla, se colocó sobre el equipo de electroforesis y se llenó el recipiente con buffer running, el cual contenía 15 g/l de glicina, 3 g/l de Tris-HCl y 1 g/l de SDS.

Se agregaron 15 µl de las muestras en los pocillos del gel, posteriormente se colocó la tapa del equipo, se ajustó el voltaje a 200 V y se encendió, se apagó el equipo cuando las muestras llegaron al nivel inferior marcado en los cristales.

Los geles se colocaron en el colorante azul de Coomassie durante 2 horas y en agitación a 300 min⁻¹ sobre la microincubadora.

Se retiró el colorante y se destiñó el gel en una solución que contiene 45 % de agua destilada, 50 % de metanol y 5 % de ácido acético, durante 24 horas.

Cromatografía líquida de ultra eficiencia UHPLC

Se pesaron 10 miligramos de aislado de proteína de chocho y del hidrolizado en tubos eppendorf, se añadió con la micropipeta en cada tubo 1 ml de agua desionizada, tipo 1 con 18 MΩ.cm de resistividad, producida en un MiliQ. Las muestras fueron agitadas en el vortex por 2 min y en la microincubadora por 50 min a 40 °C y a 300 min⁻¹, posteriormente se centrifugaron a 13000 min⁻¹ durante 5 min, se recogió el sobrenadante con una jeringa sin punta, se colocó un filtro en la jeringa y se filtraron las muestras en viales.

Se utilizó el equipo de UHPLC, con dos fases móviles: agua miliQ y metanol a las cuales se les agregó ácido trifluoroacético (TFA) al 0,27 % y se filtraron; estas fases pasaron a través de una columna de fase reversa C18 con un diámetro interno de 250 x 4,6 nm. El tiempo de análisis fue de 12 min y se trabajó en modo gradiente. Se inició

con 0 % de metanol el cual fue incrementado hasta un 70 % durante los primeros 5 min y se mantuvo por 6 min hasta finalmente tener un 0 % de metanol.

Actividad enzimática

La actividad enzimática se expresó en GDU (unidades de degradación de gelatina, por sus siglas en inglés Gelatin Digestion Unit). Se colocaron 25 g de gelatina sin sabor de marca Gelada en un vaso de precipitación de 800 ml y se añadieron 400 ml de agua destilada a 90 °C. Se agregó una gota de aceite de girasol como antiespumante y se mezcló. La solución de gelatina se mantuvo a 85 °C por 5 min y se enfrió en refrigeración hasta los 45 °C, se ajustó a pH 4,5 con HCl 2 mol/l y se aforó a 500 ml con agua destilada en un matraz aforado.

Para la solución buffer se añadieron 5,7 ml de ácido acético glacial y 150 g de cloruro de sodio a 700 ml de agua destilada, se mezcló la solución, se ajustó a pH 4,5 con NaOH al 50 % y se ajustó a 1000 ml en un matraz aforado de 1 litro.

Para la solución con la enzima se vertieron 77 ml de pulpa de piña que equivalen a 100 mg de bromelina y 20 ml de la solución buffer y se llevó a volumen de 100 ml en un matraz aforado. Se realizaron dos soluciones con una piña de 17 °Brix y pH 3,66 y otra de 18 °Brix y pH 3,74.

Se colocaron 25 ml de solución de gelatina en un vaso de precipitación a 45 °C sobre una plancha de calentamiento, se agregó 1 ml de la solución con la enzima, se colocó un magneto y se agitó en la plancha durante 20 min, después se añadieron dos gotas de peróxido de hidrógeno al 3 % y se mezcló. Se ajustó el pH a 6 con NaOH de 2 mol/l y se añadieron 10 ml de formaldehído. Se tituló hasta llegar a pH 7,8 con NaOH de 0,05 mol/l.

Para el blanco se realizó el mismo procedimiento a excepción de que se añadieron las 2 gotas de peróxido de hidrógeno antes de añadir 1 ml de solución con la enzima.

Se anotaron los mililitros de NaOH 0,05 N gastados para titular la muestra y el blanco T y B, respectivamente y se utilizó la siguiente fórmula para calcular la actividad enzimática en GDU/ ml:

$$\frac{GDU}{ml} = \frac{(T - B) * 14 * N}{ml \text{ jugo de piña}}$$

N = Molaridad del NaOH utilizado en la titulación en mEq/ml

T = ml de NaOH gastado en la muestra

B = ml de NaOH gastado en el blanco

14 = mg de Nitrógeno por mEq de nitrógeno

Análisis proximal

Se tomaron muestras de 200 g del hidrolizado de chocho elaborado en la planta de procesamiento y se enviaron al Laboratorio de Análisis y Aseguramiento de Calidad Multianálityca Cía. Ltda. de Quito para los respectivos análisis físico-químicos de la muestra.

Diseño Experimental

Se realizó un diseño experimental de 2², cuyos factores fueron el pH con 2 niveles pH 5 y 6 y la concentración de sustrato con dos niveles 1:10 y 1:20, se halló la ecuación del modelo ajustado utilizando el programa STATGRAPHICS versión 15.205 mediante el cual se seleccionaron las condiciones óptimas para la realización del hidrolizado de chocho.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis y discusión de los resultados

Análisis del hidrolizado

Determinación de sólidos totales

Los resultados de la medición de sólidos totales permitieron calcular el rendimiento del hidrolizado. A continuación se presenta la figura 1, la cual contiene los resultados de rendimiento obtenidos del programa estadístico STATGRAPHICS, se muestra en la parte superior la tabla correspondiente a la tabla ANOVA, seguida de la ecuación para determinar el rendimiento en base al pH y a la relación sustrato-agua y el diagrama de Pareto para el rendimiento.

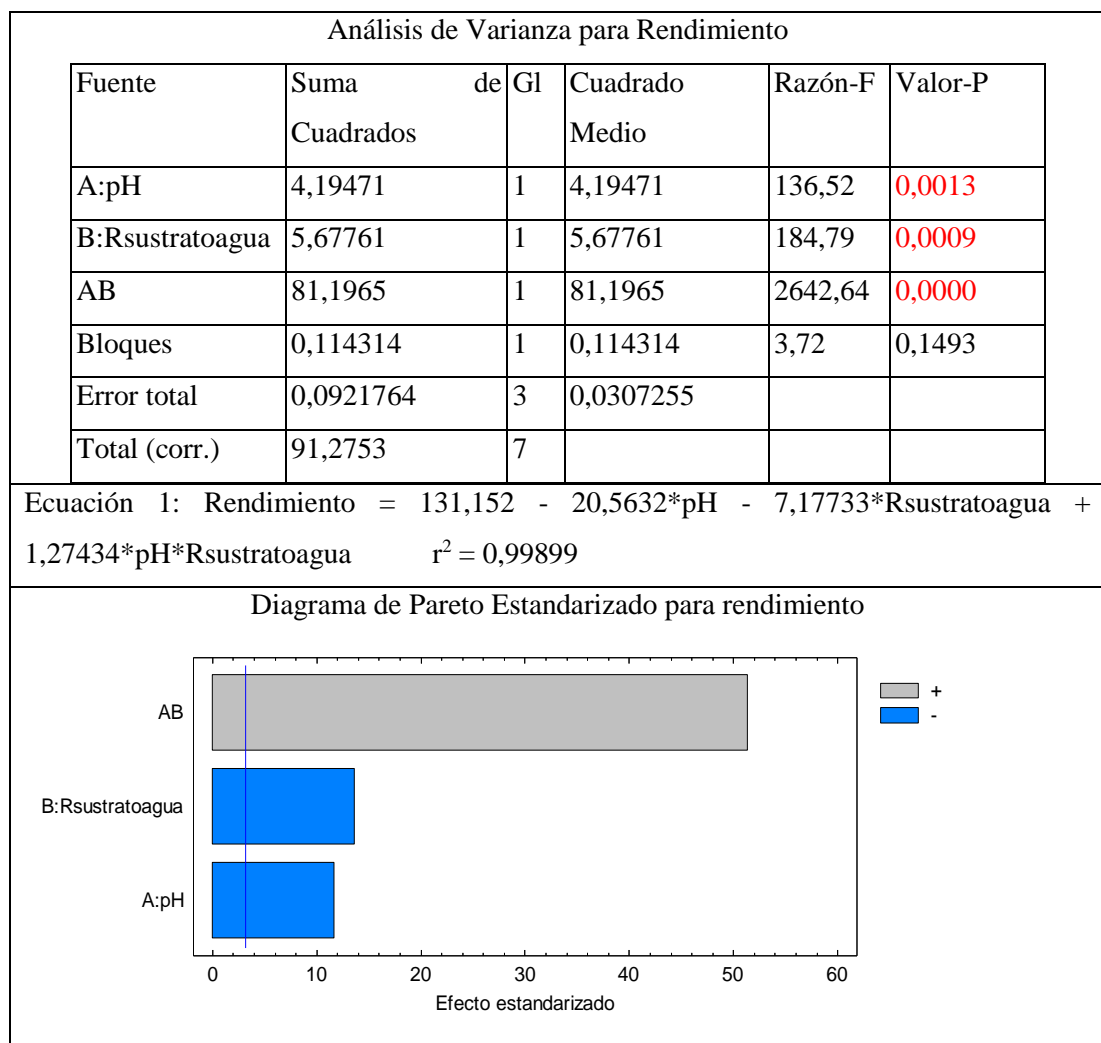


Figura 1. Resultados estadísticos para el rendimiento del hidrolizado de chocho.

Fuente: STATGRAPHICS 15.205

Según el análisis de varianza para el rendimiento, los valores de probabilidad (P) menores que 0,05 corresponden al pH, la relación sustrato-agua y la interacción entre ambos factores, lo cual indica que existe diferencia estadísticamente significativa y las variaciones del valor de rendimiento se deben a estos tres factores. La ecuación de rendimiento del hidrolizado de chocho en función del pH y la relación sustrato-agua se ajusta a un coeficiente de determinación r^2 de 99,89 % por lo que es óptima para la predicción de rendimiento.

La figura correspondiente al diagrama de Pareto estandarizado permitió verificar el grado de incidencia que tienen los factores analizados respecto al rendimiento confirmando la significancia de los tres factores.

Optimizar Respuesta

En la siguiente figura se muestra la variación del rendimiento en relación al pH y la relación sustrato agua. En la parte superior se encuentran los valores de los factores que optimizan el rendimiento, en la parte inferior el gráfico de superficie de respuesta.

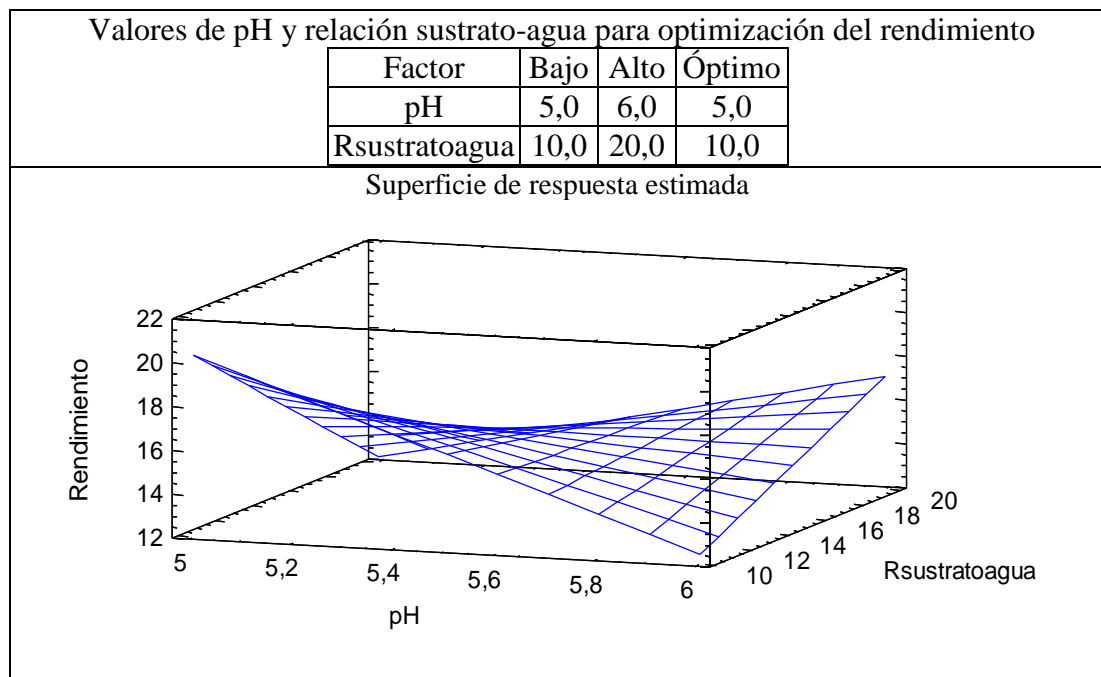


Figura 2. Relación entre el rendimiento, el pH y concentración de sustrato.

Fuente: STATGRAPHICS 15.205

Los valores óptimos de pH y relación sustrato-agua fueron de 5 y 1/10 respectivamente (ver figura 2), obteniéndose un máximo rendimiento de 20,27 %.

Estos valores de rendimiento se deben a que el hidrolizado es secado y para el proceso de hidrólisis se requiere mayor porcentaje de agua en relación a la cantidad de sólidos.

La superficie de respuesta estimada permite predecir y estudiar el efecto que tiene la relación sustrato-agua y el pH dentro de los límites con respecto al rendimiento del hidrolizado de chocho; como se puede observar mientras más se acerca el pH a 5 y la relación sustrato-agua a 1/10 el rendimiento es mayor.

Determinación de nitrógeno amínico

A continuación se muestran los resultados arrojados por el programa estadístico respecto al nitrógeno amínico, en la parte superior se encuentra la tabla ANOVA, seguida de la ecuación para el cálculo del nitrógeno amínico en relación al pH y a la concentración de sustrato, en la parte inferior se observa el diagrama de Pareto para el nitrógeno amínico.

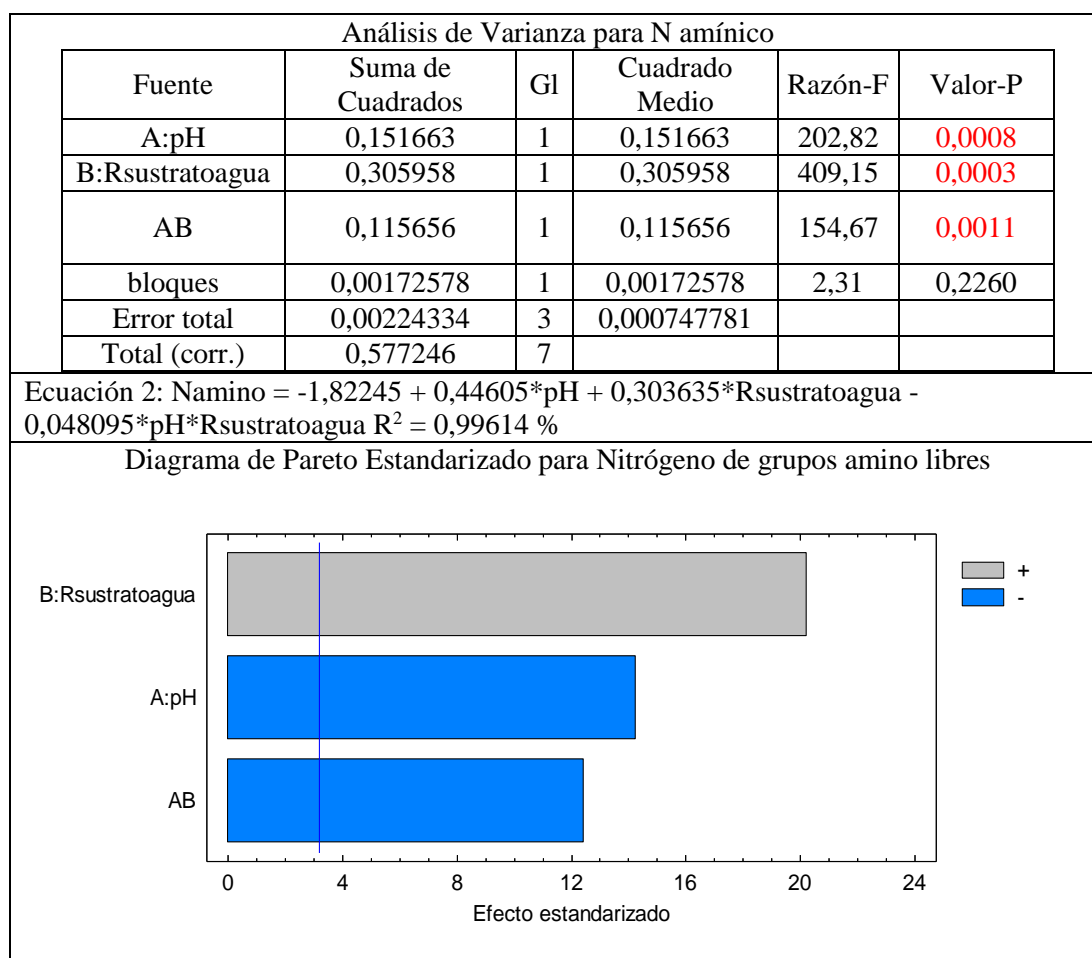


Figura 3. Resultados estadísticos para el porcentaje de nitrógeno amínico del hidrolizado de chocho. Fuente: STATGRAPHICS 15.205

Según el análisis de varianza para el nitrógeno amínico (ver figura 3), los valores P que son menores al límite del grado de significancia 0,05; corresponden al pH, la relación sustrato-agua y la interacción entre ambos, lo cual indica que existe diferencia estadística significativa y las variaciones del valor de nitrógeno amínico se deben a estos tres factores. La ecuación de nitrógeno amínico en función del pH y la relación sustrato-agua, tiene un coeficiente de determinación r^2 de 99,614 % por lo que se ajusta a los datos obtenidos para la predicción del porcentaje de nitrógeno amínico del hidrolizado de chocho. El diagrama de Pareto estandarizado permitió verificar que los tres factores estudiados tienen una influencia significativa sobre el nitrógeno amínico.

Optimizar Respuesta

A continuación se muestran los resultados para la optimización del nitrógeno amínico y la superficie de respuesta estimada.

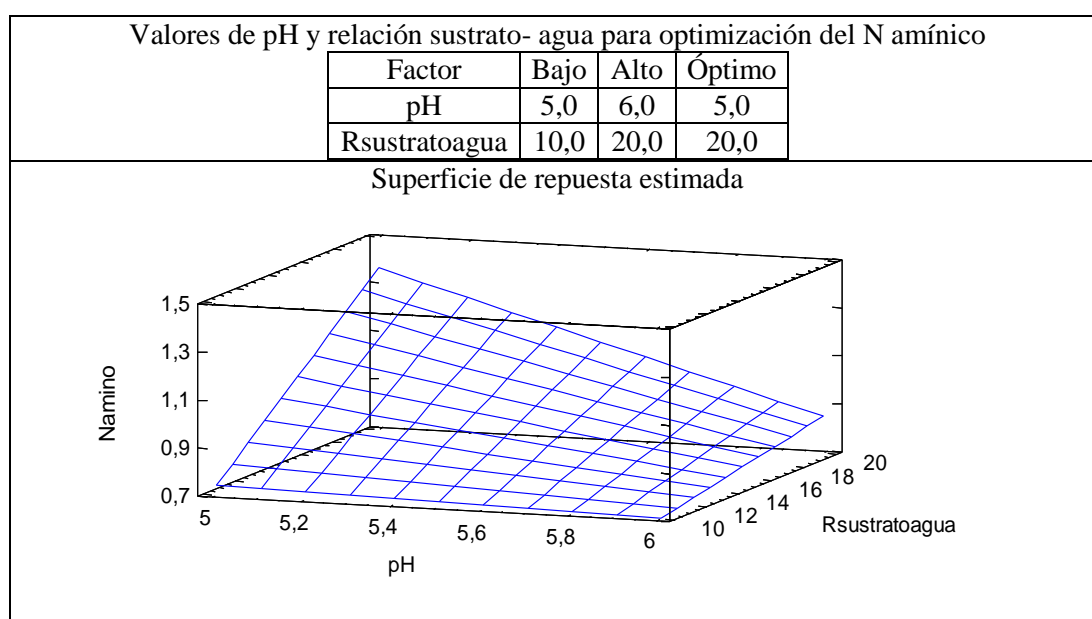


Figura 4. Relación entre el porcentaje de nitrógeno amínico, el pH y concentración de sustrato. Fuente: STATGRAPHICS 15.205

El porcentaje de nitrógeno amínico permite medir el grado de hidrólisis del hidrolizado, por lo que mientras mayor sea, más enlaces de la cadena polipeptídica se habrán separado. El valor máximo de nitrógeno amínico alcanzado fue 1,37 % a pH 5 y relación sustrato-agua de 1/20. Esto se debe a que estas condiciones ayudan a una más eficiente acción de la bromelina, debido a que la mezcla de jugo de piña, agua y

harina de chocho forman una suspensión en la cual se dificulta la agitación por tanto la interacción entre enzima y sustrato.

El gráfico de la superficie de respuesta estimada muestra como la interacción entre el pH y la relación sustrato-agua varían el porcentaje de nitrógeno amínico siendo el más bajo el tratamiento de pH 6 y la relación 1/10 y el más alto el de pH 5 y la relación entre la harina de chocho y el agua de 1/20.

Condiciones óptimas de deseabilidad del proceso de hidrólisis

A continuación se muestran los resultados para optimizar el porcentaje de nitrógeno amínico y el rendimiento del hidrolizado.

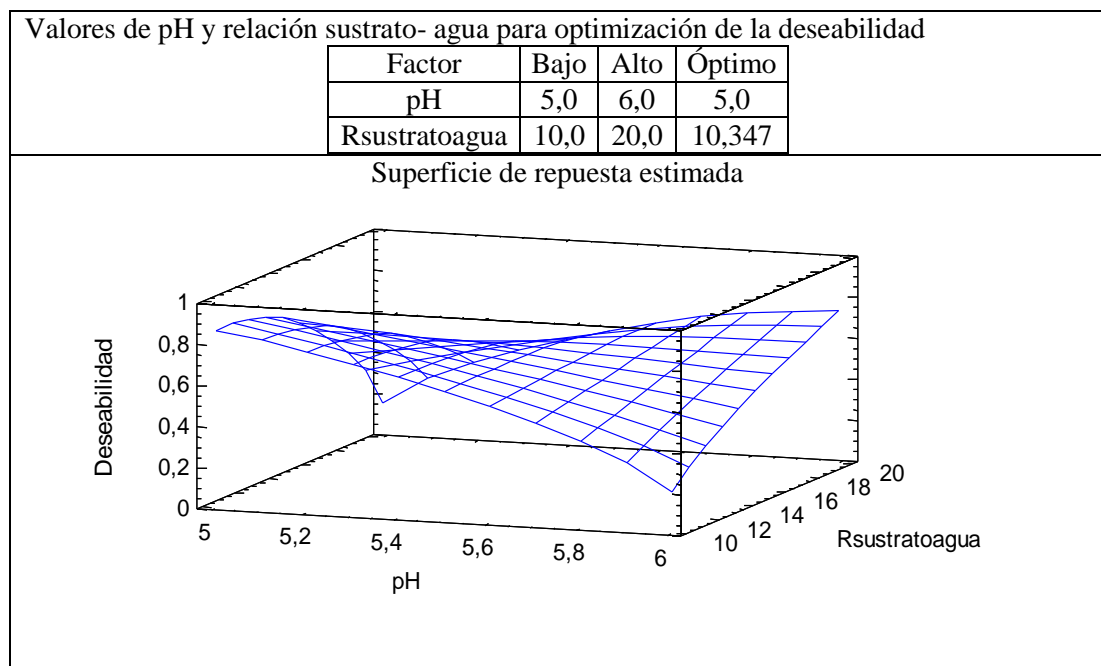


Figura 5. Optimización de la deseabilidad en relación al pH y a la concentración de sustrato. Fuente: STATGRAPHICS 15.205

La deseabilidad es optimizar el proceso para que tenga a la par un alto rendimiento y nitrógeno amínico. La máxima deseabilidad fue de 0,87; y los valores óptimos fueron pH 5 y relación sustrato-agua 1/10,3. Se seleccionaron estas condiciones para realizar el escalado.

Según el gráfico de superficie estimada de deseabilidad (ver figura 5), la mayor deseabilidad se obtiene con valores de pH de 5 y de relación sustrato-agua 1/10,3 mientras que la menor deseabilidad a los valores de pH 5 y relación sustrato-agua 1/20.

Determinación del tiempo óptimo para la hidrólisis

Tabla 3. Análisis de Varianza para el tiempo de hidrólisis

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,2007	5	0,04014	83,05	0,0000
Intra grupos	0,0029	6	0,000483333		
Total (Corr.)	0,2036	11			

Fuente: STATGRAPHICS 15.205

Según la tabla ANOVA, en la variable tiempo de hidrólisis entre grupos, existe diferencia significativa (ver tabla 3), ya que el valor F es menor que el límite crítico y el valor de P es inferior a 0,05. Esto indica que el tiempo de hidrólisis tiene influencia sobre la cantidad de nitrógeno mas no indica el mejor tiempo por lo cual se realizó la prueba múltiple de rangos.

Hubo diferencia significativa entre los tiempos 30, 60, 90, 120 y 150 min. Los grupos homogéneos fueron los de 150 y 180 min, la diferencia entre ellos fue de 0,035 siendo inferior al límite de 0,053, por lo que no existe diferencia significativa entre ambos (ver figura 6); lo cual quiere decir que entre el tiempo 30 y 150 min se podría escoger los tiempos según el grado de hidrólisis que se necesite y la disponibilidad de los equipos.

En la figura 6 se puede observar las distancias entre los diferentes tiempos estudiados en relación al porcentaje de nitrógeno amínico, las distancias entre tiempo y tiempo son similares a excepción del tiempo 150 y 180 las cuales se acercan, es decir, que la cantidad de nitrógeno amínico no varía significativamente, esto se debe a que la enzima actúa sobre el sustrato y a medida que pasa el tiempo éste se va terminando y las interacciones disminuyendo.

En la figura 6 se presentan los resultados estadísticos del nitrógeno amínico en relación al tiempo de hidrólisis.

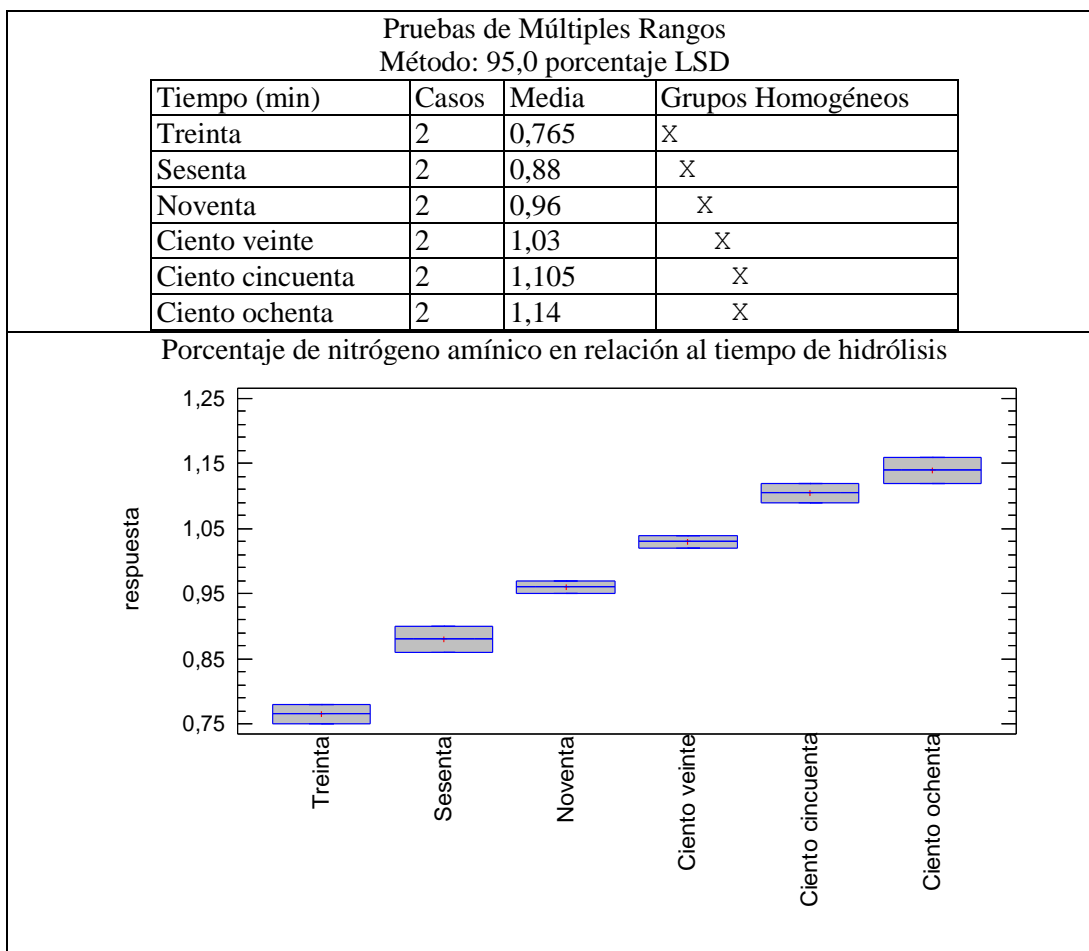


Figura 6. Relación entre porcentaje de nitrógeno amínico y el tiempo de hidrólisis
Fuente: STATGRAPHICS 15.205

En el escalado se utilizó el tiempo de 60 min y el resultado fue un grado de hidrólisis del 0,83 % y un rendimiento de 20 %, a diferencia del escalado a nivel de laboratorio que tuvo un grado de hidrólisis de 0,88 % y un rendimiento de 20 %. Esta mínima diferencia de 0,047 se puede deber al estado de la piña ya que a nivel de laboratorio se verificó que la cantidad de grados Brix esté entre 14 y 16 °B, mientras que para realizar el escalado se compró piña al por mayor, encontrándose piñas en diferentes estados de madurez con lo que la cantidad de bromelina presente puede variar, sin embargo, los resultados fueron similares mientras que el rendimiento fue el mismo para el escalado y el de nivel de laboratorio.

Electroforesis SDS-PAGE

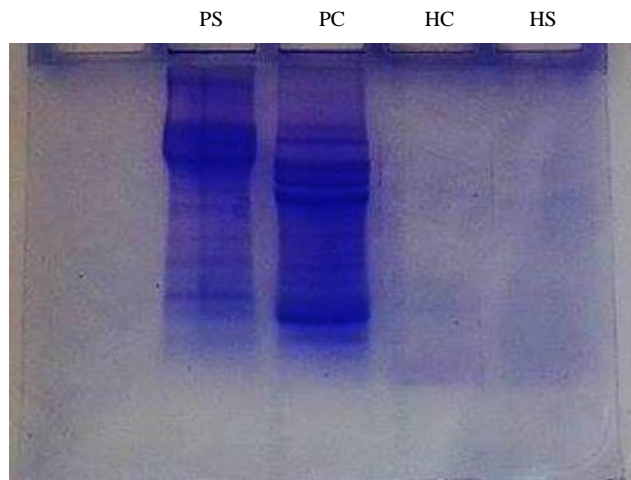


Figura 7. Electroforesis en gel de Poliacrilamida-SDS de la proteína aislada de chocho y del hidrolizado

***P proteína, H hidrolizado, S sin 2-mercaptoetanol y C con 2-mercaptoetanol.**

La electroforesis es un método muy utilizado para la caracterización de proteínas. La electroforesis SDS de una dimensión permite neutralizar y hacer negativas las cargas de las proteínas logrando una separación según su peso molecular (**Peña Castro, Gregorio-Ramírez & Barrera-Figueroa, 2013**). En el caso del hidrolizado (ver figura 7) se pueden observar bandas muy finas en comparación con las bandas gruesas de la proteína aislada de chocho, la diferencia se debe a que hay mayor peso molecular de las proteínas presentes en el chocho, mientras que al haberse sometido al proceso de hidrólisis la ruptura de las moléculas hizo que los fragmentos tengan menor peso molecular, por lo tanto se puede decir que el proceso fue efectivo, sin embargo hay que tomar en cuenta que la cantidad de proteína en el hidrolizado es menor que en el aislado debido a que se utilizó todo el contenido de la harina para su obtención.

El chocho tiene metionina y cisteína en cantidad de 23 miligramos por cada gramo de proteína (**Poveda, 2015**), éstos son aminoácidos sulfurados, es decir contienen azufre en su composición tendiendo a formar puentes disulfuro mediante la oxidación; por lo que se utilizó 2-mercaptoetanol para reducirlos. Según (**Mommaerts, Sanchez, Betsou, & Mathieson, 2015**) la solución de 2-mercaptoetanol es la más utilizada y aceptada como agente reductor de estructuras terciarias de las proteínas unidas con

puentes disulfuro. Como se puede observar en la figura 7, el carril de la proteína sin 2-mercaptoetanol (PS) tiene una banda gruesa en la parte superior, mientras que en el carril de la proteína con 2-mercaptoetanol a la misma distancia existen tres bandas con mayor definición, las cuales al ser comparadas con un estándar de pesos moleculares se podría saber a qué proteínas pertenecen. Esto se debe a que al ser reducidos los puentes disulfuro, la estructura de la molécula es menos compleja por lo que hay mayor facilidad de migración de las moléculas según su peso, pudiéndose observar de mejor manera las proteínas y péptidos formados.

Cromatografía UHPLC

A continuación se presenta el gráfico que corresponde al cromatograma de la proteína aislada del chocho.

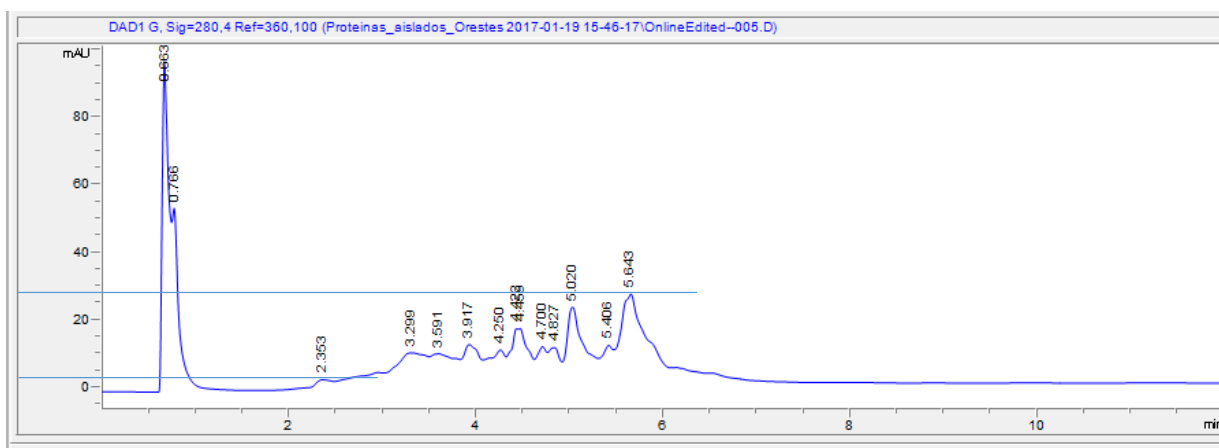


Figura 8. Cromatograma de la proteína de chocho

Para obtener el perfil de la proteína de chocho se realizó el análisis cromatográfico. En la figura 8, se muestra la elución de la proteína durante 12 min, el primer pico se puede asociar a la adición de TFA ya que en corridas anteriores permanece el pico con muestras distintas; al tiempo de retención de 2,353 min se empiezan a formar los picos de la muestra y a partir del minuto 4,459 los picos son más altos y un poco más definidos, el máximo y último pico se formó a los 5,643 min de la corrida. Esto indica que existe mayor afinidad con el metanol y poca solubilidad en agua. Los picos presentan una intensidad baja ya que el rango de absorbancia de este perfil va de 2,351 a 26,976.

La figura 9 corresponde al perfil cromatográfico del hidrolizado de chocho

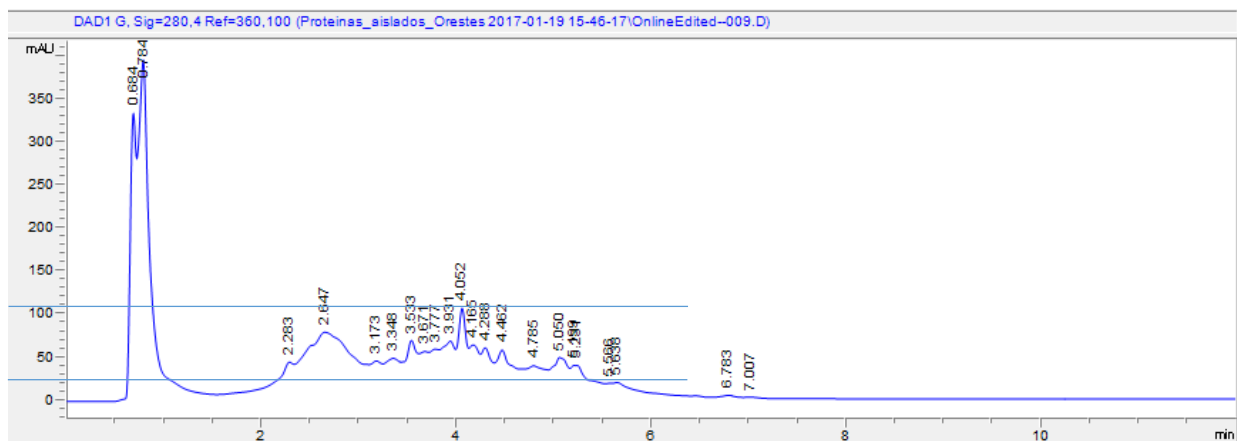


Figura 9. Cromatograma del hidrolizado de chocho

El perfil cromatográfico del hidrolizado de chocho se muestra durante los 12 min de corrida, el primer pico y más alto se atribuye a la adición del TFA. El primer pico de la muestra se observa a los 2,283 min mientras que el último a los 7,007 min. La mayor concentración de picos estuvo entre los 2,283 y los 5,638 min por lo que se puede deducir que el hidrolizado tiene mayor afinidad a agua y al metanol en comparación con el perfil de la proteína de chocho. Los picos presentaron una mayor intensidad que los del aislado de proteína ya que el rango de absorbancia obtenida fue de 19,902 a 104,275 lo que representa una concentración tres veces mayor de péptidos medidos a una longitud de onda de 280 nm.

Para comparar el aislado de proteína y el hidrolizado de chocho se superpusieron los cromatogramas, los cuales se muestran en la figura 10.

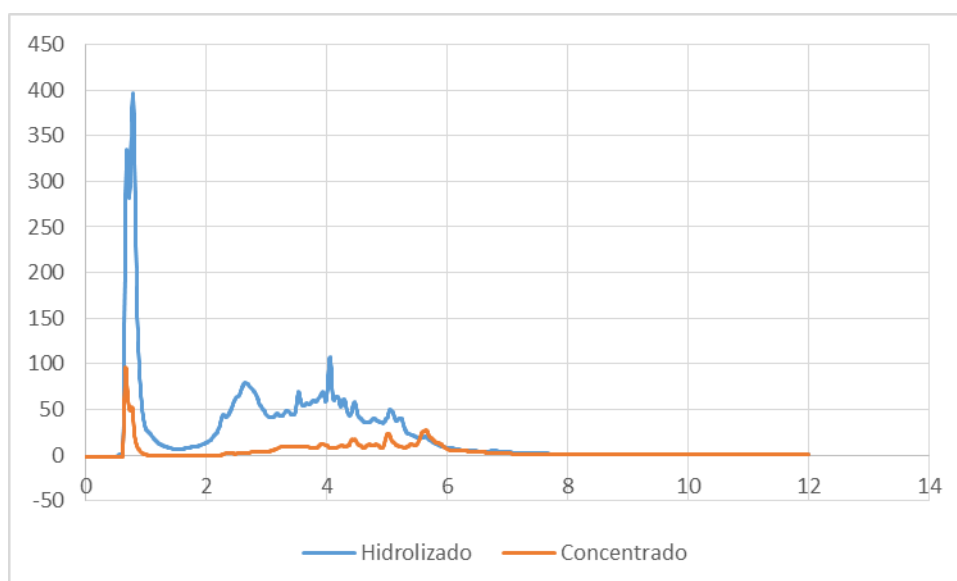


Figura 10. Comparación de cromatogramas del hidrolizado y de la proteína de chocho

Los picos del hidrolizado de chocho son de mayor tamaño que los de la proteína de chocho, lo que se puede asociar a que en la cromatografía se utilizó la parte soluble y las moléculas pequeñas de las muestras y el proceso de hidrólisis permitió que los péptidos tengan mayor solubilidad que la proteína nativa.

Para que las propiedades tecno-funcionales de las proteínas cambien se aplican procesos de hidrólisis y generalmente esto permite, entre otros cambios, que la solubilidad de las proteínas aumente, como sucedió en el hidrolizado de chocho, y se debe a que las moléculas cambian su estructura por lo que las fuerzas intermoleculares e intramoleculares se ven afectadas (**Castel, 2010**). Esta propiedad es estudiada debido a su utilidad, pudiéndose aplicar en productos en distintas presentaciones incluyendo bebidas.

Al realizar los primeros ensayos con 5 miligramos de proteína aislada se obtuvo picos máximos de 20, mientras que al doblar la cantidad, los picos más altos alcanzaron 6 puntos más. En el caso del hidrolizado, el tamaño de los picos se duplicó por lo que se puede asumir que la proteína de chocho tiene una solubilidad en agua mínima y al incrementar la concentración no va a cambiar el perfil cromatográfico significativamente. Lo que se buscó en este análisis fue comparar los picos entre el hidrolizado y el concentrado, más no el perfil aminoacídico debido a que para ello hubiese sido necesario someter a la proteína a procesos que pueden cambiar su estructura impidiendo la diferenciación entre ambas muestras.

Análisis proximal

En la tabla 4 se presenta el análisis proximal del grano de chocho y del hidrolizado de chocho.

Tabla 4. Análisis proximal del grano de chocho desamargado y pasteurizado, y del hidrolizado de chocho en base seca

Parámetros	Cantidad en 100 g de grano de chocho	Cantidad en 100 g de hidrolizado de chocho
Grasa	19,05	11,11 %
Ceniza	4,03	5,03 %
Proteína (F: 5,46)	44,39	25,63 %
Carbohidratos	29,22	58,23%
Calorías	465,89	394,50 Kcal

Fuente: Laboratorio de Análisis y Aseguramiento de Calidad Multianalítica Cía. Ltda.

La cantidad de proteína en base seca del chocho es alta, sin embargo, el chocho desamargado como materia prima tiene un 75 % de humedad es decir, contiene un alto porcentaje de agua, por esta razón se intentó realizar el hidrolizado triturando al chocho desamargado y húmedo para realizar la hidrólisis, pero las partículas obtenidas obstruían los conductos del Spray Dryer, por lo que se decidió secar el chocho y transformarlo en harina cuyas partículas fueron mucho más finas.

El hidrolizado de chocho tiene un porcentaje de proteína menor al del chocho en base seca debido a que se añadió jugo de piña que tiene baja cantidad de proteína y es alto en carbohidratos. Según **Bueno López & Rincón Buriticá (2016)** la composición nutricional de la piña es proteína 0,53 %, grasa 0,11 % y carbohidratos 13,5 %. La cantidad de jugo añadido fue de 770 mililitros por cada 100 gramos de harina por lo que la cantidad de carbohidratos en el hidrolizado es 58,23 % mientras que la cantidad de grasa 11,11 % y de proteína 25,63 %.

Actividad enzimática

Los resultados de la actividad enzimática de la bromelina se muestran en la tabla 6

Tabla 5. Actividad enzimática de la bromelina medidas en unidades de digestión de la gelatina por ml de jugo de piña GDU/ml

Muestra	GDU/ml
1	0,043
2	0,044

La actividad de la bromelina fue medida como unidades de digestión de gelatina por ml de jugo de piña. Una unidad hidroliza 1 mg de nitrógeno amino de la gelatina en 20 minutos, a pH 4,5 y 45 °C. Los valores de actividad de la bromelina fueron 0,043 y 0,044 GDU/ml, medidas que se realizaron a dos piñas maduras con pH de 3,64 y 3,60 y grados Brix de 15 y 14, respectivamente. Esto se debe a que la piña madura tiene bromelina con menor actividad enzimática en comparación con la que se encuentra en estado verde. Lo que se evidencia en los estudios de **Coello Montoya & Hidalgo Torres (2013)** en los cuales se evaluó la actividad enzimática de la bromelina en la pulpa de piña a 12 y 18 meses de madurez teniendo como resultado una mayor actividad en la pulpa de la piña no madura en comparación con la que se encontraba en su estado de madurez organoléptica obteniendo valores de 184,62 y 65 unidades de tirosina por miligramo, respectivamente. La utilización de piñas inmaduras supone una mayor actividad enzimática, sin embargo, también mayores costos al requerir mayor cantidad de fruta debido a que en estado verde contiene menor concentración de la enzima en la pulpa 0,08 % y mayor en la corona 0,14%; a diferencia de la que se encuentra en estado de madurez donde la bromelina se encuentra en mayor cantidad en la pulpa con un 0,13 % mientras que en la corona con 0,04 % (**Lago, Varela & Cáceres, 2009**). Por otro lado, un beneficio que tiene la piña madura es que aporta un sabor dulce y ácido al hidrolizado, mejorando su calidad organoléptica.

Verificación de hipótesis

El porcentaje de nitrógeno amínico varió conforme fueron modificados: la relación sustrato- agua y el pH, por lo que se rechaza la hipótesis nula ya que ambas variables presentaron diferencia significativa en relación al grado de hidrólisis. El máximo porcentaje de nitrógeno amínico fue 1,371 y se obtuvo a pH 5 y con la relación sustrato-agua 1/20.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Se obtuvo un hidrolizado enzimático a partir de harina de chocho, tanto a nivel de laboratorio como a escala industrial utilizando jugo de piña como fuente de bromelina, y mediante un análisis y optimización de los factores pH y relación sustrato-agua para el proceso de hidrólisis teniendo como resultado un alto nivel de deseabilidad que equilibra el grado de hidrólisis y el rendimiento del proceso.

Se determinaron las condiciones óptimas para la hidrólisis enzimática de las proteínas que fueron a pH 5 y relación de sustrato- agua de 1 en 10,3, logrando una deseabilidad de 87,3 %.

Se realizó un escalado del hidrolizado de chocho a nivel industrial obteniendo un grado de hidrólisis de 0,83 % mediante las condiciones seleccionadas de la máxima deseabilidad debido a que en una industria es importante optimizar rendimientos y garantizar un producto de calidad.

Se caracterizó cualitativamente el hidrolizado obtenido mediante electroforesis SDS-PAGE, que mostró una gran diferencia de los tamaños moleculares de la proteína y del hidrolizado, siendo mucho menores en el hidrolizado debido a la ruptura de enlaces entre los aminoácidos dando lugar a moléculas más pequeñas como péptidos; y por cromatografía líquida de alta resolución un perfil cromatográfico de mayor tamaño y más definido para el hidrolizado en comparación con el de la proteína aislada de chocho, debido al incremento de solubilidad en las proteínas como una característica tecnofuncional del hidrolizado.

Recomendaciones

Realizar pruebas de digestibilidad del hidrolizado in vivo para verificar la biodisponibilidad que tienen los péptidos.

Desarrollar un producto alimenticio o farmacéutico innovador a partir del hidrolizado de chocho utilizándolo como un ingrediente funcional.

MATERIAL DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Acuña, O. & Caiza, J. (2010). Obtención de hidrolizado enzimático de proteína de chocho (*lupinus mutabilis*) a partir de harina integral. *Revista Politécnica, Quito: EPN(29)*, 70-77.
- Benítez, R., Ibarz Ribas, A. & Pagan Gilabert, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 42(2), 227-237.
- Borja Lozano, J. E. (2014). *Obtención de péptidos bioactivos de Lupinus mutabilis ("tarwi") mediante proteasas de Bacillus sp.*, UNMSM, Universidad Nacional Mayor de San Marcos Programa Cybertesis PERÚ.
- Bueno López, L. & Rincón Buriticá, N. (2016). *Aprovechamiento de piñas de segunda, para la obtención de un zumo de piña comercial*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
- Caicedo, C., Peralta, E., Villacrés, E. & Rivera, M. (2001). Poscosecha y mercado de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) en Ecuador. *No. 105*.
- Carrillo, W. (2014). Digestibilidad de las proteínas alergénicas. *Química Viva*, 13(2), 109 - 122.
- Castel, M. V. (2010). *Estudio de las propiedades funcionales, tecnológicas y fisiológicas de las proteínas de amaranto*. Universidad Nacional del Litoral, Instituto de Tecnología de Alimentos-FIQ-UNL.
- Coello Montoya, D. S., & Hidalgo Torres, J. J. (2013). *Comparación de la concentración y actividad enzimática de la bromelina obtenida a partir de la pulpa de la piña (ananas comosus) variedad perolera de dos grados de*

madurez. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción.

De la Barca, A. M. C., Medrano, A. W., Hernández, M. F. R. & Miranda, J. R. V. (2004). Ventajas nutricias de la soya hidrolizada, enriquecida con aminoácidos unidos covalentemente: modelos geriátrico y cirrótico. *Nutrición Clínica*, 7(2), 100-106.

Drago, S. R., Luggren, P. J., Vioque Peña, J., Betancur Ancona, D., Chel Guerrero, L., & González, R. J. (2013). *Propiedades bioactivas de hidrolizados de gluten de trigo* (Vol. 1). *OmniaScience Monographs*, Barcelona 83-109.

Evangelho, J. A. D., Berrios, J. D. J., Pinto, V. Z., Antunes, M. D., Vanier, N. L. & Zavareze, E. d. R. (2016). Antioxidant activity of black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates. *Food Science and Technology (Campinas)*, 36, 23-27.

Gammopathies, M. V. P. (2005). Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *American family physician*, 71, 105-112.

Gil, A. (2010). *Tratado de nutrición* (E. M. Panamericana Ed. 2 ed. Vol. 4). Madrid.

Guadix, A., Guadix, E., Páez-Dueñas, M., González-Tello, P. & Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79-89.

Hernández Ledesma, B. (2002). Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas mediante hidrólisis enzimática y procesos fermentativos. Universidad Complutense de Madrid, CSIC - Instituto de Fermentaciones Industriales.

- Hernández, M., Carvajal, C., Márquez, M., Báez, R., Morris, H., Santos, R. & Chávez M de los Ángeles. (2005). *Obtención de preparados enzimáticos a partir de tallos de piña (Ananas comosus) con potencialidades de uso en la biotecnología y la medicina*: Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba.
- Lago, I. L., Varela, J. D. & de Cáceres, F. M. (2009). La bromelina: una proteasa de interés comercial. *CYTA-Journal of Food*, 1(2), 17-22.
- Lluguín Sánchez, V. & Quinde Fuentes, C. (2015). *Extracción, purificación parcial y secado de la enzima bromelina obtenida a partir del corazón de la piña (ananas comosus)*. Espol, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción.
- Maldaner, L. & Jardim, I. (2012). UHPLC–Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. *Scientia Chromatographica*, 4(3), 197-207.
- Manninen, A. H. (2004). Protein hydrolysates in sports and exercise: a brief review. *J Sports Sci Med*, 3(2), 60-63.
- Mommaerts, K., Sanchez, I., Betsou, F. & Mathieson, W. (2015). Replacing β -mercaptoethanol in RNA extractions. *Analytical Biochemistry*, 479, 51-53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.03.027>
- Peña Castro, J. M., Gregorio-Ramírez, O. & Barrera-Figueroa, B. E. (2013). Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación química*, 24(2), 237-246.
- Pérez, S. (2012). Concentrados de *Cajanus cajanus* y *Phaseolus vulgaris* fermentados e hidrolizados: ingredientes funcionales para el desarrollo de alimentos. *Interciencia*, 37(6), 431-437.

Poveda, D., V., J. (2015). *Desarrollo de un complemento alimenticio proteico vegetal de alto valor biológico, a partir de la combinación de quinua (Chenopodium quinoa Willd) y chocho (Lupinus Mutabilis Sweet), y su aceptabilidad en niños pre-escolares, del Jardín Juan Montalvo de la comunidad de Oyambarillo. Durante los meses de Septiembre-Octubre, 2014.* PUCE, Facultad de Enfermería.

Prieto, C. A. (2007). *Diseño y optimización de un reactor de membrana discontinuo para la hidrólisis enzimática de proteínas* (Cuarto), Universidad de Granada, Departamento de Ingeniería Química, Granada.

Velazquez, C. J. A. & Hevia, J. T. (2007). *Manual de manejo postcosecha de frutas tropicales (Papaya, piña, plátano, cítricos).* Perú: FAO.

Viquez Rodríguez, F. & González Leiva, E. (2002). *Elaboración de una confitura utilizando los excedentes y rechazos de frutas tropicales.*

Anexos

Tabla 6. Actividad enzimática valores de NaOH gastados

Muestra 1	NaOH gastados (ml)
Réplica 1	24,0
Réplica 2	24,0
Blanco 1	19,2
Blanco 2	19,2
Muestra 2	NaOH gastados (ml)
Réplica 1	24,1
Réplica 2	24,1
Blanco 1	19,2
Blanco 2	19,2

$$\frac{GDU}{ml} = \frac{(T - B) * 14 * N}{ml \text{ jugo de piña}}$$

$$\frac{GDU}{ml} = \frac{(24,0 \text{ ml} - 19,2 \text{ ml}) * 14 \frac{mg}{mEq} * 0,05 \frac{mEq}{ml}}{77 \text{ ml}}$$

$$\frac{GDU}{ml} = 0,0436$$

Tabla 7. Valores promedio de porcentaje de humedad, solidos totales y nitrógeno amínico a diferentes concentraciones y pH

pH	Concentración	% H	%ST	% N amínico
5	1/10	81,564	18,436	0,721
	1/20	94,189	5,811	1,37
6	1/10	88,773	11,227	0,77
	1/20	91,835	8,165	0,733

$$\%ST = 100 - \%H$$

Tabla 8. Porcentaje de nitrógeno amínico promedio de dos réplicas en diferentes tiempos de hidrólisis

Tiempo	30	60	90	120	150	180
% N amínico	0,76	0,88	0,95	1,03	1,10	1,14



Figura 11. Tamizado de harina de chocho



Figura 12. Hidrólisis a diferentes pH y relación sustrato-agua



Figura 13. Hidrólisis a condiciones de deseabilidad en laboratorio



Figura 14. Secado del hidrolizado en Spray Dryer



Figura 15. Hidrolizado de chocho a nivel de laboratorio



Figura 16. Obtención de harina de chocho en la industria



Figura 17. Proceso de hidrólisis en condiciones de asepsia



Figura 18. Recolector del Spray Dryer



Figura 19. Hidrolizado en polvo



Figura 20. Mezcla de harina de chocho y agua

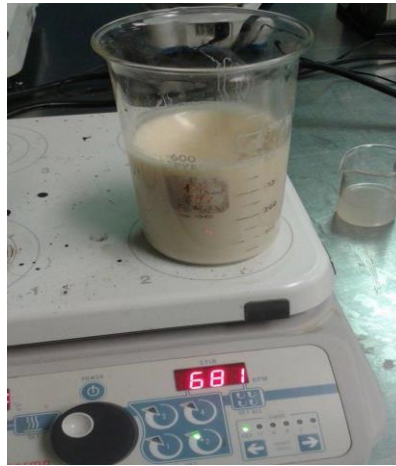


Figura 21. Solubilización de la proteína de chocho a pH 10,5



Figura 22. Precipitación ácida de la proteína a pH 4,5



Figura 23. Centrifugado del precipitado de proteína de chocho



Figura 24. Tubos de ensayo con proteína precipitada

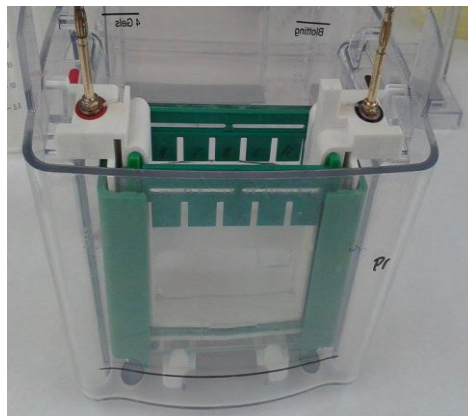


Figura 25. Preparación del gel de acrilamida



Figura 26. Electroforesis SDS-PAGE

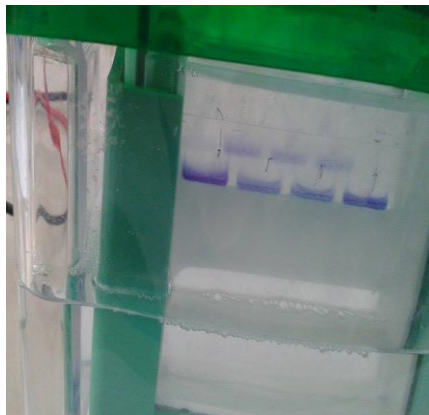


Figura 27. Muestras de proteína e hidrolizado de chocho migrando por acción de la carga



Figura 28. Gel de acrilamida con muestras sometidas a electroforesis



Figura 29. Preparación de las muestras para la cromatografía

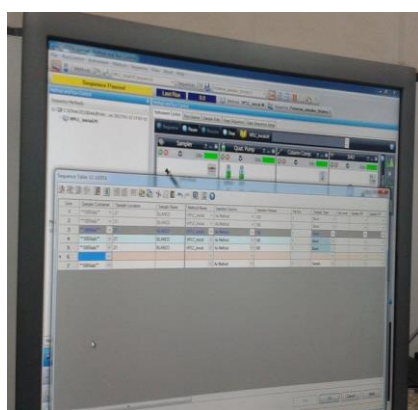


Figura 30. Equipo UHPLC