



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



Tema: Caracterización de hidrolizados de quinua (*Chenopodium quinoa*), soya (*Glycine max*) y colágeno.

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previa la obtención del título de Ingeniero en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

AUTOR: Estefanía Carolina Herrera Anchatuña

TUTOR: Dr. Orestes Darío López Hernández

AMBATO – ECUADOR

Febrero - 2018


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

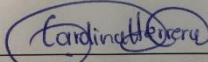
Ambato, 05 de Enero del 2018.



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

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Estefanía Carolina Herrera Anchatuña, 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.

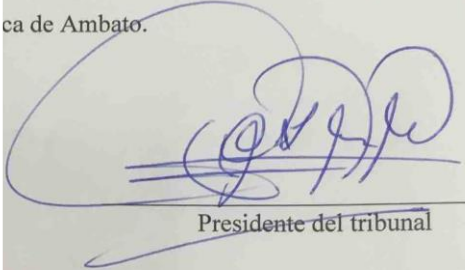


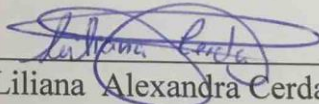
Estefanía Carolina Herrera Anchatuña
C.I. 050392656-0
AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

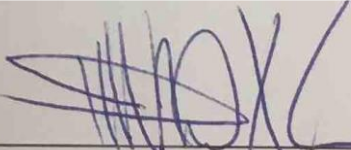
Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

ca de Ambato.

Presidente del tribunal


PhD. Liliana Alexandra Cerda Mejía

C.I 180414808-6



M. Sc. Paulo Santiago Baquero Icaza
C.I 180323354-1

Ambato, 14 de Febrero del 2018

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 de línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Estefanía Carolina Herrera Anchatuña
C.I. 050392656-0
AUTORA

DEDICATORIA

A Dios por brindarme el regalo de la vida, y acompañarme en la travesía de la vida.

A mi madre Margoth A. quien ha sido mi pilar fundamental de mi vida, el haber estado presente en todos los momentos en que más necesite con su ayuda, su amor incondicional, sus sabias palabras, su fortaleza para no dejarme caer, con cada uno de sus consejos y reflexiones para siempre salir adelante. Me ha dado todo, lo que soy como persona se lo agradezco a mi madre. Siempre recordando que el valor de las personas no está en los recursos, sino en la grandeza del corazón.

A mi padre por ayudarme con los recursos necesarios para poder terminar mi carrera, y sus palabras de alimento.

A mi hermano por ser un ejemplo, que las metas se cumplen con esfuerzo, perseverancia y constancia.

A toda mi familia, a mi tío Luis con sus palabras, con su preocupación, principios y a enseñarme a ver la vida de una manera diferente, que los sueños se cumplen al serlos perseguidos.

Gracias a todos los amo.

AGRADECIMIENTO

A mi tutor al Dr. Orestes López por su apoyo y guía en la culminación de mi trabajo de titulación. A la Mg. Cecilia Carpio y Ph.D. Dayana Morales por su paciencia y tiempo para la realización en este trabajo de graduación.

A mis amigos Vane, Jess, David, Fátima, Israel, compartimos grandes momentos, a Mayrita, Nancy, Eve, Fer que por circunstancias de la vida compartimos gratas experiencias gracias a todos por su amistad incondicional. A Ricardo por sus palabras y motivación para la culminación de este trabajo.

Gracias a todos quienes formaron parte a lo largo de mi carrera universitaria.

A los docentes por compartir sus conocimientos, experiencias de vida y sus consejos para la formación de buenos profesionales.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PAGINAS PRELIMINARES

| | |
|---|------|
| PORTADA | i |
| APROBACIÓN DEL TUTOR..... | ii |
| DECLARACION DE AUTENTICIDAD..... | iii |
| APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO..... | iv |
| DERECHOS DE AUTOR | v |
| DEDICATORIA | vi |
| AGRADECIMIENTO | vii |
| ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS..... | viii |
| RESUMEN..... | xi |
| ABSTRACT..... | xii |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPÍTULO I..... | 3 |
| EL PROBLEMA | 3 |
| 1.1 Tema..... | 3 |
| 1.2 Justificación..... | 3 |
| 1.3 Objetivos | 4 |
| 1.3.1 General..... | 4 |
| 1.3.2 Específicos | 4 |
| CAPÍTULO II | 5 |
| MARCO TEÓRICO..... | 5 |
| 2.1 Antecedentes investigativos | 5 |
| CAPÍTULO III..... | 7 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 7 |
| 3.1 Materia prima | 7 |
| 3.2 Determinación del contenido de nitrógeno amínico (grupos amínicos libres) | 7 |
| 3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)..... | 8 |

| | | |
|--------------------------------------|---|----|
| 3.4 | Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC). | 9 |
| CAPÍTULO IV | | 11 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | | 11 |
| 4.1 | Contenido de Nitrógeno Amínico | 11 |
| 4.2 | Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) | 11 |
| 4.3 | Cromatografía Líquida de Ultra Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-UHPLC) de los hidrolizados de quinua, soya y colágeno respectivamente con sus aislados proteicos. | 15 |
| CAPÍTULO V | | 18 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | | 18 |
| 5.1 | Conclusiones | 18 |
| 5.2 | Recomendaciones | 18 |
| MATERIAL DE REFERENCIA | | 19 |
| 6.1 | Referencias bibliográficas | 19 |
| ANEXOS | | 22 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE del hidrolizado y aislado de soya con y sin 2-mercaptoetanol. Pocillo 1: Aislado sin 2-mercaptoetanol; Pocillo 2: Hidrolizado sin 2-mercaptoetanol; Pocillo 3: Aislado con 2-mercaptoetanol; Pocillo 4: Hidrolizado con 2-mercaptoetanol. | 12 |
| Figura 2. Electroforesis SDS-PAGE del hidrolizado y aislado de Colágeno con 2-mercaptoetanol. Pocillo 1: Colágeno sabor a frutos rojos; Pocillo 2: Colágeno sabor a Vainilla; Pocillo 3: aislado proteico. | 13 |
| Figura 3. Electroforesis SDS-PAGE del hidrolizado y aislado de Hidrolizado de Quinoa con y sin 2-mercaptoetanol. Pocillo 1: hidrolizado de quinoa con 2-mercaptoetanol; Pocillo 2: Aislado de quina con 2-mercaptoetanol; Pocillo 3: Hidrolizado de quinoa sin 2-mercaptoetanol; Pocillo 4: Aislado de quinoa sin 2-mercaptoetanol. | 14 |
| Figura 4. Comparación de los cromotogramas de Hidrolizado de Soya y el Aislado de Soya..... | 15 |
| Figura 5. Comparación de los cromotogramas de los Hidrolizados de Colágeno sabor a mora y Vainilla con el Aislado de Colágeno..... | 16 |
| Figura 6. Comparación de los cromotogramas de Hidrolizado de Quinoa y el Aislado de Quinoa | 17 |
| Figura 7. Determinación de Nitrógeno amínico..... | 22 |
| Figura 8. Ajuste de pH nitrógeno amínico | 23 |
| Figura 9. Centrifugación de las muestras solubilizadas a pH 8 | 23 |
| Figura 10. Aislado de proteína | 24 |
| Figura 11 Secado de las muestras del aislado proteico en Spray Dryer..... | 24 |
| Figura 12. Pesado de la muestra de aislado proteico en tubos eppendorf..... | 25 |
| Figura 13. Centrifugación de las muestras de aislado proteico..... | 25 |
| Figura 14. Preparación de geles | 26 |
| Figura 15. Armado de las placas para la corrida de los geles | 26 |
| Figura 16. Equipo de electroforesis | 27 |
| Figura 17. Preparacion de muestras de los aislados proteicos e hidrolizados jeringas de 1ml..... | 28 |
| Figura 18. Preparación de las muestras para cromatografía UHPLC | 28 |
| Figura 19. Equipo de cromatografía UHPLC | 29 |

RESUMEN

La finalidad de este trabajo fue caracterizar los hidrolizados de quinua, soya y colágeno mediante la determinación del contenido de nitrógeno amínico, perfil cromatográfico y electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

El hidrolizado de soya presentó un mayor contenido de nitrógeno amínico con un $0,94 \% \pm 0,002$. Los resultados de la electroforesis SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol mostraron que las bandas de los hidrolizados son de menor coloración en comparación con los aislados proteicos, debido a que los pesos moleculares de la proteína hidrolizada son menores, debido a que se encuentran en forma de péptidos y aminoácidos.

El perfil cromatográfico en los 3 hidrolizados mostró que efectivamente la proteína se encuentra en unidades peptídicas, por ende, el proceso de hidrólisis fue idóneo. Por lo tanto, presentan una fácil absorción.

Palabras Clave: hidrolizados proteicos, quinua, soya, colágeno, Ingredientes funcionales.

ABSTRACT

The purpose of this work was to characterize the hydrolysates of quinoa, soybean and collagen by determining the amine nitrogen content, chromatographic profile and SDS PAGE electrophoresis.

The amine nitrogen content is related to the degree of hydrolysis of each of the hydrolysates, the soy hydrolyzate had a higher content of amine nitrogen with $0.94\% \pm 0.002$. The results of the SDS-PAGE electrophoresis with 2-mercaptoethanol showed that the gels of each of the hydrolysates with their respective protein isolates, the hydrolyzate bands are of lower coloration compared to the protein isolates, because the weights Molecules are inferior because of what it finds in peptides and amino acids.

The chromatographic profile in the 3 hydrolysates showed that the protein is indeed in peptide units, therefore the hydrolysis process was ideal.

When the hydrolysates are in the form of peptides, they are easily absorbed in the bloodstream, improving absorption.

Keywords: protein hydrolysates, quinoa, soya, collagen, functional ingredients

INTRODUCCIÓN

Las proteínas constituyen el componente estructural de células y tejidos, son necesarias y fundamentales para el desarrollo, crecimiento corporal y reparación de los tejidos **(Ruiz, Segura, Betancur, & Chel, 2013)**.

El proceso de hidrólisis permite fragmentar la proteína en péptidos y/o aminoácidos, el valor nutritivo de la proteína se mantiene constante, facilitando la absorción. La hidrólisis de las proteínas conduce a cambios en las propiedades moleculares como el incremento de carga de grupos hidrofóbicos, disminución del peso molecular, dichos cambios generan modificaciones en sus propiedades tanto nutricionales como tecnológicas **(Espejo, 2013)**.

Los hidrolizados son proteínas degradadas de manera química o enzimáticamente hasta su fragmentación y obtención de aminoácidos y péptidos de distintos tamaños y peso molecular **(Sánchez-Sánchez et al., 2014)**.

Dichos hidrolizados son utilizados en diversos procesos alimentarios, debido a sus propiedades funcionales, alta solubilidad y dispersión (Figueroa, Zapata, & Sánchez, 2016). También son utilizados como ingredientes dentro de formulaciones de alimentos especiales (suplementos proteicos, dietas purificadas) ya que mejoran la digestibilidad y absorción de la proteína.

La funcionalidad de los hidrolizados depende del control dentro del proceso de hidrólisis de aspectos como tamaño molecular, estructura y secuencias específicas de aminoácidos **(Guerrero, Paz, Arboleda, Vargas, & Agudelo, 2012)**.

Los hidrolizados proteicos al ser mejoradas sus propiedades, son considerados como una fuente buena dentro de la nutrición humana. El uso y aplicación de los hidrolizados va en aumento debido a los beneficios de los mismos. Su fuente de nitrógeno un factor utilizado para la formulación de dietas infantiles y/o adultos **(Aramburu, 2012)**.

En la actualidad existen un sin número de alimentos con un alto contenido proteico, de quinua, soya, chocho, etc., sin embargo, la quinua supera en consumo masivo a los demás cereales y pseudocereales, el valor nutricional de la quinua se encuentra en la calidad de la proteína, un balance adecuado de aminoácidos esenciales, su

contenido proteico es comparable con algunos de origen animal. La quinua presenta entre 14-20 % de proteína **(Peralta, 1985)**.

Motivo por el cual las proteínas de dicho pseudocereal, son consideradas como valiosas desde el punto de vista nutricional, son capaces de complementarse con otras fuentes de proteínas de cereales, leguminosas y oleaginosas mediante concentrados e hidrolizados proteicos **(Callisaya & Alvarado, 2009)**.

En los últimos años la soya presenta una mayor aceptación debido a su aporte nutricional, propiedades alimenticias y funcionales, y su bajo precio. La soya es una fuente de proteína vegetal completa, pues está constituida por todos los aminoácidos esenciales, los cuales el organismo no puede sintetizar **(López, 2013)**.

La soya presenta un 40% de proteína **(Ibarra Hernández et al., 2016)**.

El colágeno es una proteína estructural, representa un 30% de las proteínas totales del organismo, cumple con funciones de mecánica y soporte, esta proteína es responsable de los tejidos como hueso, cartílago, etc **(Bernales, Caride, Lewis, & Martín, 2004)**.

El hidrolizado de colágeno se fabrica con la finalidad de reducir el impacto ambiental que generan los desechos sólidos de empresas que se dedican a la producción de gelatinas e industrias curtidoras, motivo por el cual se realiza la hidrólisis de dichos desechos obteniéndose, un hidrolizado formado por polipéptidos de distintos pesos moleculares en función del grado de hidrólisis **(Mora, Núñez, & Yaulema, 2011)**.

Por lo cual la caracterización de hidrolizados de quinua, soya y colágeno permite conocer el grado de hidrólisis, si las proteínas se encuentran fragmentadas en péptidos y/o aminoácidos, lo cual facilita la absorción en el organismo.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema

Caracterización de hidrolizados de quinua (*Chenopodium quinoa*), soya (*Glycine max*) y colágeno

1.2 Justificación

Datos estadísticos según la FAO la quinua en el año 2014, su producción va en aumento principalmente en los países como Ecuador, Perú y Bolivia, por lo cual más del 80 % de cultivos se concentran en dichos países. La quinua contiene de 13-22 % de proteínas, por su contenido de aminoácidos esenciales, se considera como un pseudocereal de alto valor nutritivo (**Toopanta, 2016**).

Según el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), en el III Censo Nacional Agropecuario año 2000, la producción de soya es destacable dentro de Ecuador, existen 54,350 hectáreas de soya. La soya contiene un 35 % de proteína, por lo que se considera una leguminosa con propiedades nutricionales y funcionales óptimas dentro de la dieta humana (**de Luna Jiménez, 2006**).

Según (**Jordi, 2008**) El colágeno es una proteína que consta de tres cadenas polipeptídicas, formando un triple enlace, dicha proteína posee la función estructural – fibrilar.

El colágeno es el componente principal de los tejidos conectivos, estructurales y mecánicos del organismo, el colágeno representa un 25 % de la proteína total del organismo (**Limorte & Albert, 1982**).

La obtención del hidrolizado de colágeno se realiza a partir de la gelatinización de tejidos animales ricos en proteínas. La ingesta de colágeno hidrolizado dentro de la dieta posee efectos beneficiosos sobre enfermedades osteoarticulares degenerativas y envejecimiento dérmico (**Juher & Pérez, 2015**).

La hidrólisis proteica se puede llevar a cabo mediante dos vías química (álcali o ácido) y biológicamente (enzimas). La vía enzimática presenta mayores ventajas, debido a que existe un mayor control y selectividad (**Zapata & Castañeda, 2017**).

Los hidrolizados proteicos son alimentos importantes dentro de la dieta alimenticia, pues su absorción es elevada dentro del organismo, dichos alimentos son una alternativa para el desarrollo de nuevos productos que cumpla con propiedades nutricionales y funcionales dentro del organismo (**Mahmoud, 1994**).

Por lo tanto, la caracterización de los diferentes hidrolizados de distintas fuentes proteicas es de suma importancia dentro de la alimentación, ya que conocer el grado de hidrólisis es de gran importancia para su aplicación en formulaciones de suplementos nutricionales.

Este estudio permitirá caracterizar los distintos hidrolizados de quinua, soya y colágeno, proporcionando evidencias de que las proteínas se encuentran hidrolizadas, es decir, segmentadas en péptidos y aminoácidos, los cuales tienen la ventaja de ser más fácilmente absorbidos.

1.3 Objetivos

1.3.1 General

Caracterizar hidrolizados de proteínas de quinua (*chenopodium quinoa*), soya (*glycine max*) y colágeno.

1.3.2 Específicos

- Comparar los hidrolizados en cuanto a contenido de nitrógeno amínico.
- Determinar el perfil cromatográfico de cada hidrolizado y aislado proteico correspondiente mediante cromatografía líquida de alta resolución.
- Determinar el perfil electroforético de cada hidrolizado y aislado proteico correspondiente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos

La proteína es un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las estructuras corporales, la calidad de la proteína está definida por su procedencia, su perfil y proporción de aminoácidos que la componen, otros factores a tomar en cuenta es su solubilidad y grado de glicosilación (**Valenzuela, Abugoch, Tapia, & Gamboa, 2013**).

La quinua (*chenopodium quinoa willd*) es cultivada en Ecuador, representa un factor dentro de la economía del país, según la (FAO, 2014) la quinua es un pseudocereal conocido como un alimento excepcional, debido a su alta concentración proteica de 13,81 – 21,90 %, este pseudocereal está libre de gluten, contiene todos los aminoácidos esenciales que el organismo no puede sintetizar (**Romo, 2006**).

La soya (*Glycine max*) pertenece a la familia de las leguminosas, la soya es considerada como una proteína completa, pues contiene los aminoácidos esenciales como isoleucina, leucina, lisina, metionina y cisteína, fenilalanina, tirosina, treonina, triptófano, valina e histidina, los hidrolizados de soya comerciales contienen un 35% de proteína (**Martínez Augustin & Martínez de Victoria, 2006**).

Según (**Abad Expósito, 2015**) el colágeno es un proteína fibrosa, de estructura helicoidal, compuesta por una triple cadena de aminoácidos compacta, el aminoácido más relevante es la glicina. Dicha proteína se encuentra formando el tejido conjuntivo de órganos y tejidos, función de sostén.

Según (**Belagardi, 2011**) las proteínas hidrolizadas presentan la ventaja de ser fácilmente o directamente absorbidas, dichas proteínas se encuentran en forma de dipéptidos, tripéptidos o aminoácidos.

Los hidrolizados de proteína, conceden ventajas para el uso de productos alimenticios, como características funcionales, viscosidad baja, dispersión y alta solubilidad, respecto a las proteínas originales (**Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008**).

En la actualidad se realiza el control del peso a través de la dieta, por lo que se utiliza preparaciones de hidrolizados de proteína como suplementación dietética o

necesidades fisiológicas, para personas de la tercera edad, bebés prematuros y atletas **(Revelo, 2010)**.

Los hidrolizados de proteína presentan una fuente de nitrógeno de mayor biodisponibilidad, la caracterización de las proteínas permite verificar la efectividad del proceso de hidrólisis, tener la certeza que la proteína se encuentra segmentada en péptidos y aminoácidos pudiéndose utilizarlos en formulaciones **(Kurozawa, Park, & Hubinger, 2008)**.

Dentro de la dieta se incluyen los hidrolizados enzimáticos ricos en oligopéptidos, especialmente di y tripéptidos, representan una manera de mejorar la utilización de la proteína, hoy en día el aprovechamiento de materiales ricos en proteína se dirige a la utilización de concentrados, aislados e hidrolizados en la alimentación humana **(Suárez López, Kizlansky, & López, 2006)**.

CAPÍTULO III MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Materia prima

Los hidrolizados analizados de quinua, soya y colágeno sabor a vainilla y frutos rojos fueron obtenidos de la empresa Andes Kinkuna S.A. ubicada en la provincia de Cotopaxi.

3.2 Determinación del contenido de nitrógeno amínico (grupos amínicos libres)

Método Sorensen

Se realizó una dilución del hidrolizado al 2 % v/v del hidrolizado, se neutralizo con NaOH 0,1 mol/L, se agregó 2 ml de solución de formaldehído al 37 % previamente neutralizado. Se tituló con solución de NaOH 0,1 mol/L hasta alcanzar un pH entre 9,10 - 9,20. Las muestras se analizaron por triplicado.

Para el cálculo del nitrógeno amínico se utilizó la fórmula:

$$\%N. am. = \frac{ml NaOH * 1.4 * k}{ml muestra * 100} * 100 * fd$$

Dónde:

- ml NaOH = gasto de NaOH 0,1 mol/L en titulación
-
- $k = \frac{\text{concentración práctica NaOH}}{\text{concentración teórica NaOH}}$
- %S.T. = Porcentaje de sólidos totales
- Fd= factor de dilución

3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Se realizó una comparación entre los aislados proteicos e hidrolizados de quinua (*chenopodium quinoa*), soya (*glycine max*) y colágeno mediante el proceso de electroforesis que permitió caracterizar a los mismos.

Se realizó la extracción de la proteína de cada uno de los hidrolizados mediante una solubilización con agua en una concentración de 10 g de harina por cada 100 ml de agua, se llevó el pH de la suspensión a pH 8 con NaOH 2 mol/L bajo una agitación intensa en un agitador magnético se lo mantuvo durante 1 hora manteniendo el pH regularmente. Transcurrido el tiempo se centrifugo en una centrifuga marca Hettich por 30 minutos a 10000 min⁻¹. El sobrenadante, se ajustó a pH4 con una solución HCl 2 mol/L para precipitar proteínas, manteniéndolo durante 10 minutos bajo agitación y luego se centrifugo por 20 minutos a 10000 RPM. El precipitado, se llevó a una suspensión en agua llevando a pH 7 con NaOH 2 mol/L, se secó el precipitado mediante secado de aspersion.

Se pesó 10 mg de aislado de proteína y con cada uno de los hidrolizados, 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 cada uno de las muestras y se colocó en tubos eppendorf, a los cuales se adiciono 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 0,6ml 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 geles 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 μ l de TEMED

20 μ l de PSA

Se agito y con la ayuda de una pipeta de 5 ml, se tomaron 4,75 ml de la mezcla y se colocó entre los cristales, se completó con agua destilada, se dejó en reposo hasta que se forme el gel y se retiró el exceso de agua.

Se preparó el gel de la parte superior

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 μ l de SDS

6 μ l de TEMED

20 μ l de PSA

Se llenó el espacio entre los cristales con este gel y se colocó la peinilla, se dejó en reposo hasta que el líquido 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 1g/l de SDS.

Se agregaron 15 μ l de las muestras en los pocillos del gel, posteriormente se colocó la tapa del equipo, se utilizó el equipo BIO-RAD Modelo PowerPacTM Basic a 200 V, 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.

3.4 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC).

Se pesaron 10 mg de aislado de proteína con sus respectivos hidrolizados de quinua, soya y colágeno en tubos eppendorf, se añadió con la micropipeta en cada tubo 1 ml de agua desionizada, tipo 1 con 18 M Ω .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 300min⁻¹, posteriormente se centrifugó a 1300 min⁻¹ durante 5 min, se recogió el sobrenadante con una jeringa de 1 ml sin punta, se colocó un filtro en la jeringa y se filtraron las muestras por los viales.

Se utilizó el equipo 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 * 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. El perfil cromatográfico se realizará en el equipo de cromatografía líquida UHPLC, se analizaron los hidrolizados y aislados proteicos.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Contenido de Nitrógeno Amínico

A continuación, se muestra el promedio del contenido de nitrógeno amínico de los diferentes hidrolizados.

Tabla 1. Contenido de Nitrógeno Amínico en los Hidrolizados de Quinoa, Soya y Colágeno.

| Hidrolizados | Quinoa | Soya | Colágeno |
|--------------|------------|------------|------------|
| Promedio % | 0,71±0,011 | 0,94±0,002 | 0,93±0,005 |

El hidrolizado de quinoa presenta un porcentaje menor de nitrógeno amínico, mientras que el hidrolizado de soya y colágeno muestran un porcentaje similar de nitrógeno amínico, y la desviación estándar para las réplicas es inferior al 0,05. El contenido de nitrógeno amínico es bajo debido a que las enzimas proteolíticas no actúan sobre todos los enlaces peptídicos, actúan sobre ciertos enlaces entre aminoácidos (hidrólisis leve).

4.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Se compararon los hidrolizados proteicos con cada uno de los aislados proteicos, mediante SDS-PAGE, en presencia de 2-mercaptoetanol y sin 2-mercaptoetanol, se utilizó dicho reactivo para la desnaturalización de la proteína y reducción de puentes disulfuro presente en las estructuras de las proteínas.

Para dicho análisis no se utilizó ningún estándar, ya que el propósito fue demostrar que la proteína se hidrolizó.

A continuación, la figura 1 corresponde a la electroforesis SDS-PAGE del hidrolizado y aislado de soya con y sin 2-mercaptoetanol.

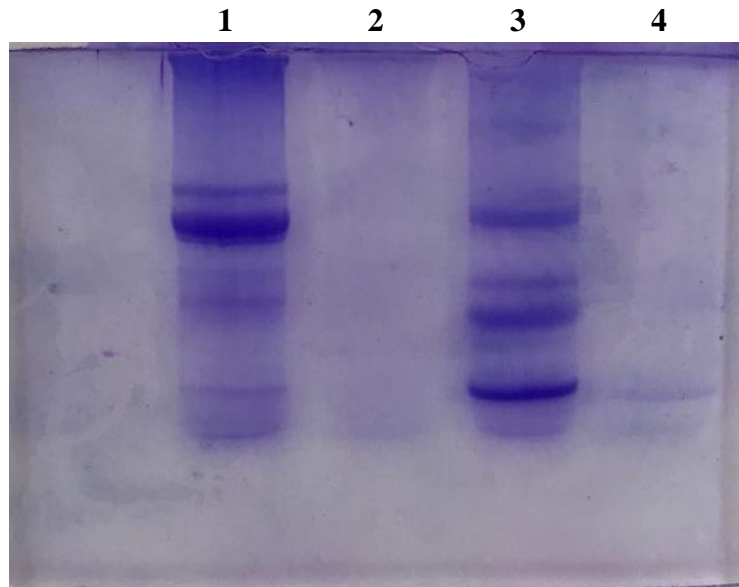


Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE del hidrolizado y aislado de soya con y sin 2-mercaptoetanol. Pocillo 1: Aislado sin 2-mercaptoetanol; Pocillo 2: Hidrolizado sin 2-mercaptoetanol; Pocillo 3: Aislado con 2-mercaptoetanol; Pocillo 4: Hidrolizado con 2-mercaptoetanol.

Como se observa los pocillos 1 y 3 correspondientes al aislado de soya, presentan bandas definidas debido a que existen proteínas de mayor tamaño molecular.

Los pocillos 2 y 4 correspondientes al hidrolizado de soya, poseen bandas de menor intensidad, debido a que estas proteínas han sido fragmentadas y se encuentran en forma de polipéptidos y péptidos de menor tamaño con respecto a las proteínas.

Las bandas de las muestras con 2-mercaptoetanol, pocillo 3 y 4, se encuentran separadas en relación a las bandas que no poseen 2-mercaptoetanol, esto debido que dicho reactivo cumple la función de la desnaturalización de las proteínas y ruptura de enlaces disulfuro.

A continuación, la figura 2 corresponde a la electroforesis SDS-PAGE del hidrolizado y aislado de colágeno.

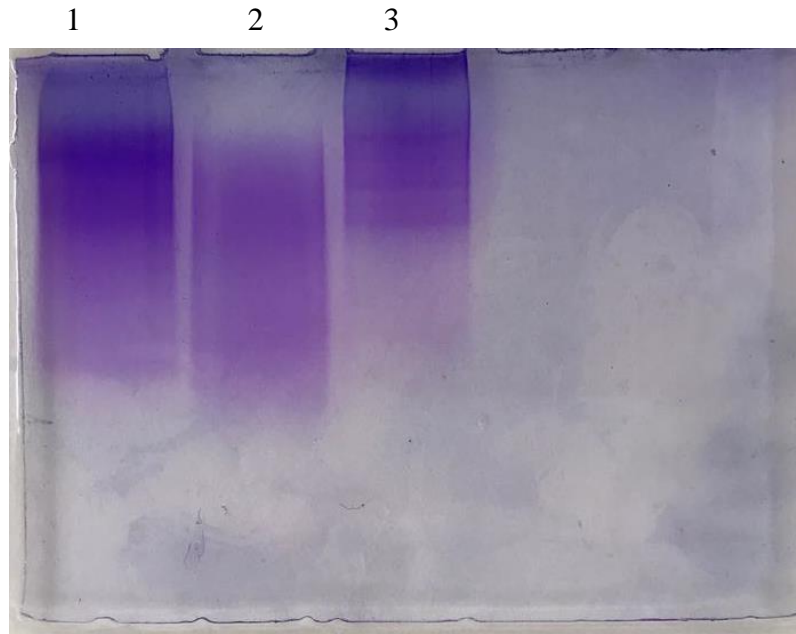


Figura 2. Electroforesis SDS-PAGE del hidrolizado y aislado de Colágeno con 2-mercaptoetanol. Pocillo 1: Colágeno sabor a frutos rojos; Pocillo 2: Colágeno sabor a Vainilla; Pocillo 3: aislado proteico.

Se observa que las bandas de los pocillos 1 y 2 se encuentran distribuidas hacia la parte inferior del gel, mientras que en el concentrado las bandas se encuentran en la parte superior del gel. Los hidrolizados sabor a vainilla y frutos rojos presentan moléculas de menor peso molecular en relación al aislado, el aislado proteico presenta proteínas de mayor peso molecular, demostrándose así que las proteínas están hidrolizadas.

A continuación, se presenta la figura 3 la electroforesis SDS-PAGE del hidrolizado y aislado de quinua.

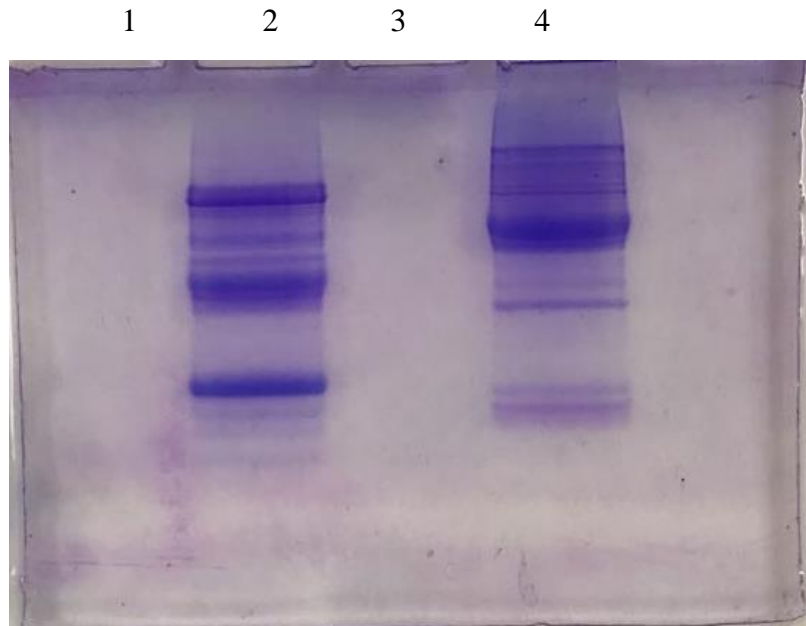


Figura 3. Electroforesis SDS-PAGE del hidrolizado y aislado de Hidrolizado de Quinua con y sin 2-mercaptoetanol. Pocillo 1: hidrolizado de quinua con 2-mercaptoetanol; Pocillo 2: Aislado de quina con 2-mercaptoetanol; Pocillo 3: Hidrolizado de quinua sin 2-mercapoetanol; Pocillo 4: Aislado de quinua sin 2-mercapoetanol.

Se observan que las bandas 2 y 4 que los aislados proteicos de quinua presentan bandas definidas, sus pesos moleculares son mayores en comparación a los hidrolizados.

Las bandas 1 y 3 correspondientes al hidrolizado de quinua, no son muy visibles debido a que las moléculas proteicas son de pesos moleculares inferiores al del aislado proteico.

Las bandas 1 y 2 con 2-mercaptoetanol las bandas se encuentran distribuidas a lo largo del gel, a diferencia de los pocillos 3 y 4 que no tienen dicho reactivo, la función del 2-mercaptoetanol es desnaturalizar la proteína y ruptura de los enlaces disulfuro por lo cual las bandas a la vista se encuentran separadas.

4.3 Cromatografía Líquida de Ultra Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-UHPLC) de los hidrolizados de quinua, soya y colágeno respectivamente con sus aislados proteicos.

Se analizó el perfil cromatográfico de los hidrolizados de quinua, soya y colágeno mediante la aplicación de la técnica de UHPLC en fase reversa.

En los 3 cromatogramas de los hidrolizados y sus aislados, se observa un pico característico en el minuto 1 debido a la presencia del ácido trifluoroacético (TFA), ya que en las corridas anteriores permanece dicho pico.

A continuación, en la figura 4 se muestra la comparación de los cromatogramas del hidrolizado y aislado de soya.

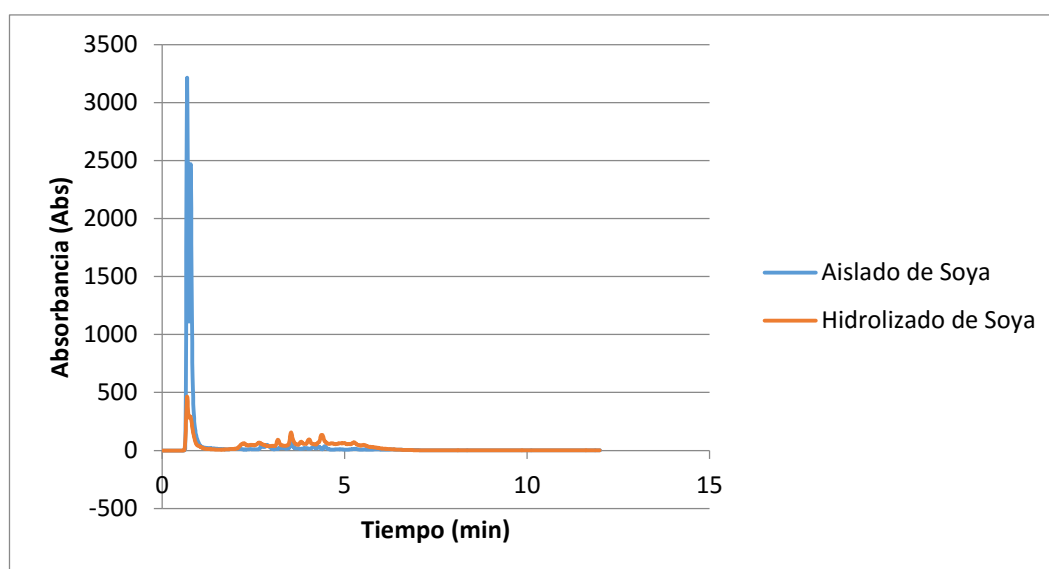


Figura 4. Comparación de los cromatogramas de Hidrolizado de Soya y el Aislado de Soya

Como se muestra, al comparar el perfil cromatográfico del hidrolizado con el aislado de soya, los picos del hidrolizado de soya son más altos con una absorbancia de 250, mientras que los picos del aislado presentan una absorbancia menor que 83,33; observándose que efectivamente los compuestos proteicos del hidrolizado se encuentran en forma de péptidos.

A continuación, en la figura 5 se muestra la comparación de los cromatogramas de los hidrolizados de colágeno sabor a frutos rojos y vainilla con el aislado de colágeno.

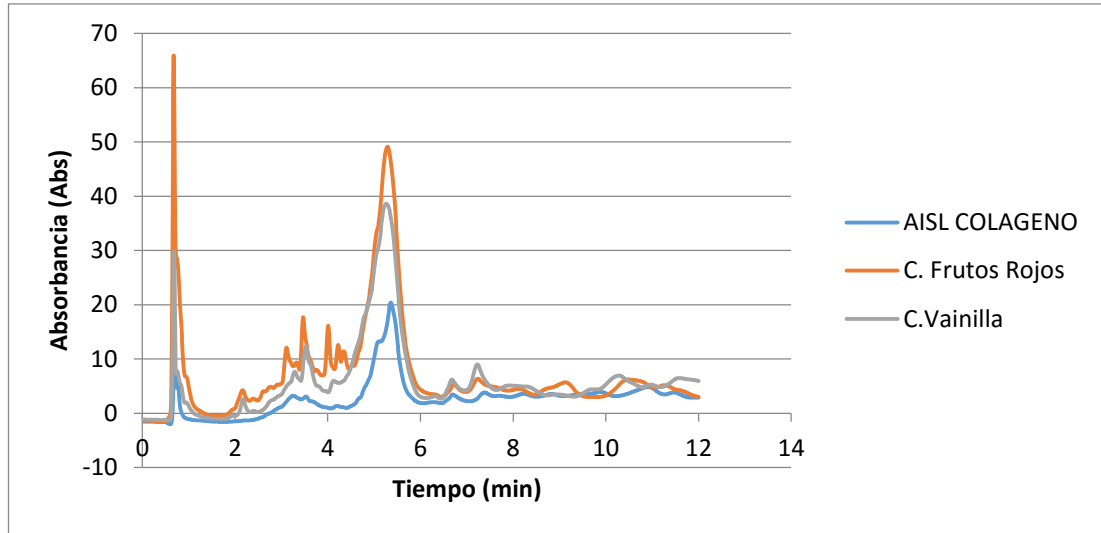


Figura 5. Comparación de los cromatogramas de los Hidrolizados de Colágeno sabor a mora y Vainilla con el Aislado de Colágeno.

Como se observa en la figura 5 la comparación de los cromatogramas de los hidrolizados de colágeno sabor a frutos rojos y vainilla con el aislado de colágeno. Muestran que ambos hidrolizados de colágeno presentan una mayor absorbancia en relación con el aislado proteico.

El hidrolizado de colágeno sabor a frutos rojos en relación al pico más alto presenta una absorbancia de 28,18, en el hidrolizado de colágeno sabor a vainilla el pico más alto presenta una absorbancia de 21,81, el aislado presenta una absorbancia de 11,82, por lo que los hidrolizados presentan una mayor absorbancia en relación al aislado debido a que los componentes proteicos se encuentran en unidades de péptidos. lo que demuestra que se encontraron en unidades de péptidos.

A continuación, se presenta en la figura 6 los cromatogramas del hidrolizado y el aislado de quinua.

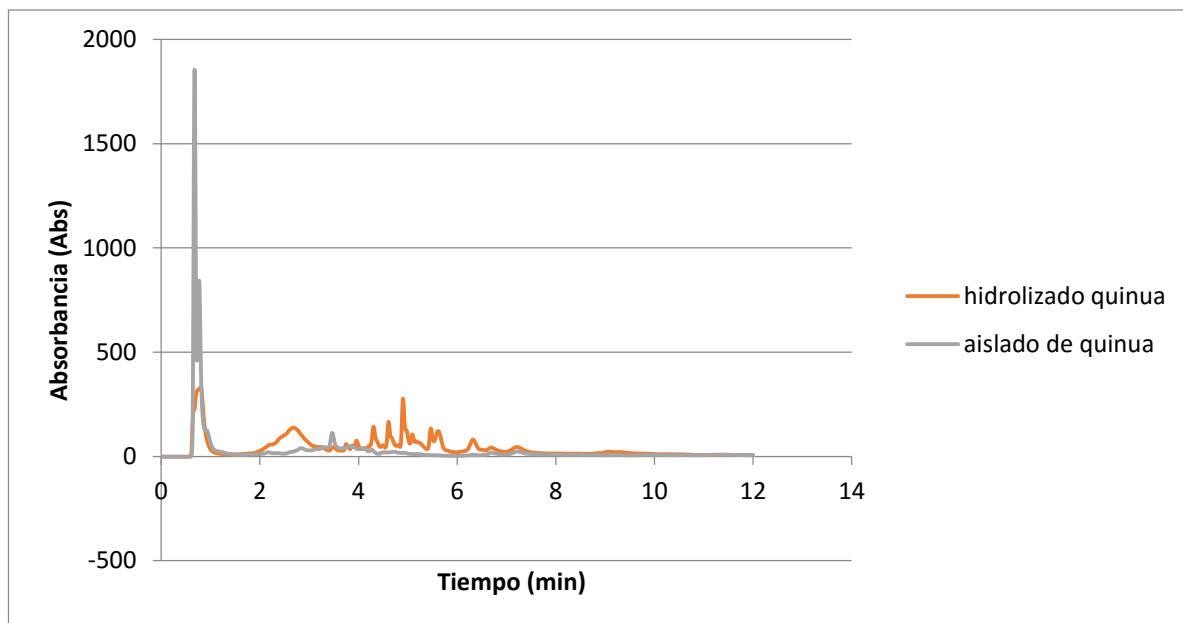


Figura 6. Comparación de los cromatogramas de Hidrolizado de Quinoa y el Aislado de Quinoa

Como se aprecia en la figura 6 la comparación cromatográfica entre el hidrolizado y el aislado de quinoa, el primero presenta mayor intensidad de los picos en relación al aislado proteico, esto se debe a que las proteínas del hidrolizado efectivamente se encuentran en unidades más pequeñas (péptidos y polipéptidos).

El hidrolizado de quinoa presenta una absorbancia de 272,72 en relación con el pico más alto, mientras que el pico más alto del aislado presenta una absorbancia de 136,66; lo que demuestra que las proteínas en el hidrolizado se encuentran fraccionadas o hidrolizadas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se realizó la comparación del contenido de nitrógeno amínico entre los tres hidrolizados de quinua, soya y colágeno, mediante la aplicación del método de Sorensen, los hidrolizados de soya y colágeno presentaron 0,93 % de nitrógeno amínico, y el hidrolizado de quinua 0,71 %.
- El perfil cromatográfico de cada hidrolizado con su respectivo aislado se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa, los hidrolizados presentan una mayor absorbancia en comparación con los respectivos aislados proteicos debido a que las proteínas se encuentran fraccionadas.
- El perfil electroforético, se comparó cada uno de los hidrolizados con sus respectivos aislados proteicos, se observó que las bandas de los hidrolizados son de menor intensidad en comparación con sus aislados, esto debido a que las proteínas se encuentran en péptidos y polipéptidos.

5.2 Recomendaciones

- Evaluar la inclusión de los hidrolizados en diferentes presentaciones de alimentos.
- Realizar un estudio de digestibilidad *in vitro*, para saber si dicha proteína es asimilada por el organismo

MATERIAL DE REFERENCIA

6.1 Referencias bibliográficas

- Abad Expósito, C. (2015). Suplementos de colágeno y efecto en el tratamiento de lesiones articulares.
- Aramburu, D. M. (2012). *HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS DE GIRASOL (HELIANTHUS ANNUS) CON PROTEASAS VEGETALES (BROMELAINA Y HEMISFERICINA) Y ANIMAL (PEPSINA) A PEPTIDOS Y AMINOACIDOS*.
- Belagardi, M. I. (2011). *Obtención de hidrolizados protéicos a partir de cebada agotada*. Universidad FASTA, Argentina Retrieved from redi.ufasta.edu.ar:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/306/2011_n_030.pdf?sequence=1
- Bernales, D. M., Caride, F., Lewis, A., & Martin, L. (2004). Membranas de colágeno polimerizado: consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tisular y ósea guiadas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 23, 65-74.
- Callisaya, C., & Alvarado, A. (2009). Aislados Proteínicos de granos altoandinos Chenopodiaceas; quinoa Chenopodium Quinoa - Cañahua Chenopodium Pallidicaule por Precipitación Isoeléctrica. *Revista Boliviana de Química*, 26, 12-20.
- de Luna Jiménez, A. (2006). Valor nutritivo de la proteína de soya. *Investigación y Ciencia*, 14(36).
- Espejo, F. (2013). *Obtención de hidrolizados de proteínas de leche de cabra con actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina*. (Doctorado), Universidad de Granada, Granada. Retrieved from <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/25136/1/21597224.pdf>
- Figueroa, O. A., Zapata, J. E., & Sánchez, C. P. (2016). Optimización de la Hidrólisis Enzimática de Proteínas de Plasma Bovino. *Información tecnológica*, 27, 39-52.
- Guerrero, A. P., Paz, J., Arboleda, L. S. M., Vargas, R. A., & Agudelo, A. C. (2012). Efecto de la desnaturalización térmica e hidrólisis química de proteínas sobre la cinética de hidrólisis enzimática. *Acta Agronómica*, 61(5), 34.

- Ibarra Hernández, B., AG, S. F., Sosa Yáñez, L., Armienta, E., Vásquez Casanova, J., Graciano Verdugo, A., . . . Carbajal, H. (2016). ELABORACIÓN DE UN PRODUCTO TIPO HELADO A BASE DE SOYA (*Glycine max*) Y AMARANTO (*Amaranthus cruentus*) CON JUGO DE FRUTA ESFERIFICADO.
- Jordi, M. d. C. L. (2008). Proteolisis enzimática del colágeno dentinario. *ConScientiae Saúde*, v. 7, n. 4, pp. 477-486.
- Juher, T. F., & Pérez, E. B. (2015). Revisión de los efectos beneficiosos de la ingesta de colágeno hidrolizado sobre la salud osteoarticular y el envejecimiento dérmico. *Nutrición Hospitalaria*, 32(1).
- Limorte, M. B., & Albert, G. L. (1982). Estudio del proceso de transformación del colágeno en gelatina. *Anales de la Universidad de Murcia (Ciencias)*, 135-146.
- López, S. (2013). *Elaboración de un producto proteico alternativo a partir de soya (Glycine max) y quinua (Chenopodium quinoa Willd)*. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Bioquímica.
- Mahmoud, M. I. (1994). Physicochemical and functional properties of protein hydrosylates in nutritional products. *Food Technology*, 48(10), 89-95.
- Martínez Augustin, O., & Martínez de Victoria, E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*, 21, 01-14.
- Mora, J. M., Núñez, M. F. J., & Yaulema, F. (2011). OBTENCIÓN DE COLÁGENO POR HIDRÓLISIS ALCALINA-ENZIMÁTICA DEL RESIDUO DE “WET BLUE” EN EL PROCESO DE CURTICIÓN. *Revista Perfiles, de la Facultad de Ciencias, ESPOCH Año XV Número 8 Julio de 2011*, 27.
- Peralta, E. (1985). La quinua, un gran alimento y su utilización. *Boletín divulgativo*(175).
- Romo, S. (2006). Potencial nutricional de harinas de Quinua (*Chenopodium Quinoa W*) variedad piartal en los Andes colombianos *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 4(1).
- Ruiz, J., Segura, R., Betancur, D., & Chel, L. (2013). *Proteínas y péptidos biológicamente activos con potencial nutracéutico*.

- Sánchez-Sánchez, A., Arías-Moscoso, J. L., Torres-Arreola, W., Marquez-Rios, E., Cárdenas-López, J. L., García-Sánchez, G., & Ezquerro-Brauer, J. M. (2014). Characterization of hydrolysates from jumbo squid by-products obtained by auto-hydrolysis and chemical-enzymatic process. *CyTA - Journal of Food*, 12(1), 85-96. doi: 10.1080/19476337.2013.801039
- Toopanta, A. M. P. (2016). *Caracterización de Aislados proteicos de quinua (Chenopodium quinoa Willd) y su Digestibilidad gástrica y duodenal (in vitro)*. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería en Alimentos.
- Valenzuela, C., Abugoch, L., Tapia, C., & Gamboa, A. (2013). Effect of alkaline extraction on the structure of the protein of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and its influence on film formation. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(4), 843-849.
- Zapata, J. I. H., & Castañeda, C. A. G. (2017). Hidrolizados de pescado–producción, beneficios y nuevos avances en la industria.-Una revisión. *Acta Agronómica*, 66(3).

ANEXOS

Tabla 2. Porcentaje de nitrógeno amínico promedio de tres réplicas de los hidrolizados de quinua, soya y colágeno

| Replicas | Quinua | Soya | Colágeno |
|----------|--------|------|----------|
| 1 | 0,7 | 0,93 | 0,93 |
| 2 | 0,72 | 0,93 | 0,93 |
| 3 | 0,7 | 0,93 | 0,93 |
| Promedio | 0,71 | 0,94 | 0,93 |

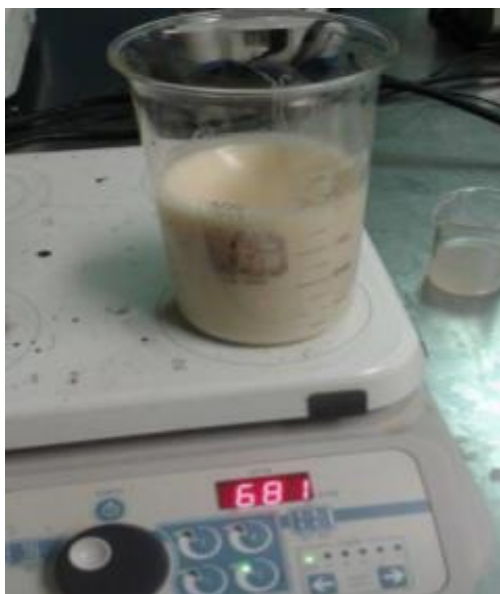


Figura 7. Determinación de Nitrógeno amínico

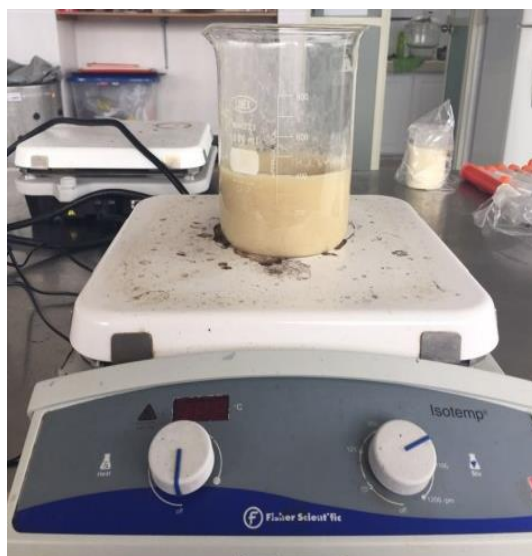


Figura 8. Ajuste de pH nitrógeno amínico



Figura 9. Centrifugación de las muestras solubilizadas a pH 8



Figura 10. Aislado de proteína



Figura 11 Secado de las muestras del aislado proteico en Spray Dryer

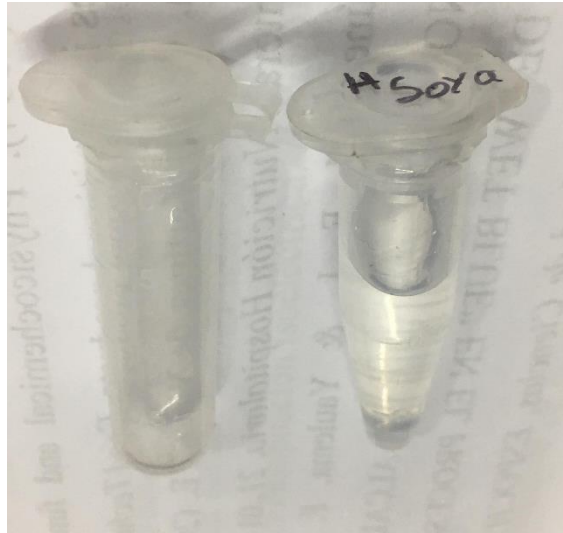


Figura 12. Pesado de la muestra de aislado proteico en tubos eppendorf.



Figura 13. Centrifugación de las muestras de aislado proteico

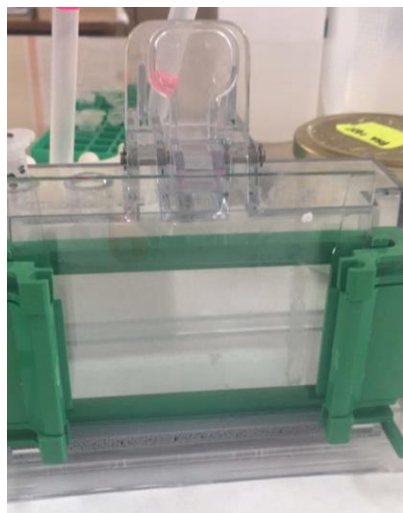


Figura 14. Preparación de geles



Figura 15. Armado de las placas para la corrida de los geles



Figura 16. Equipo de electroforesis

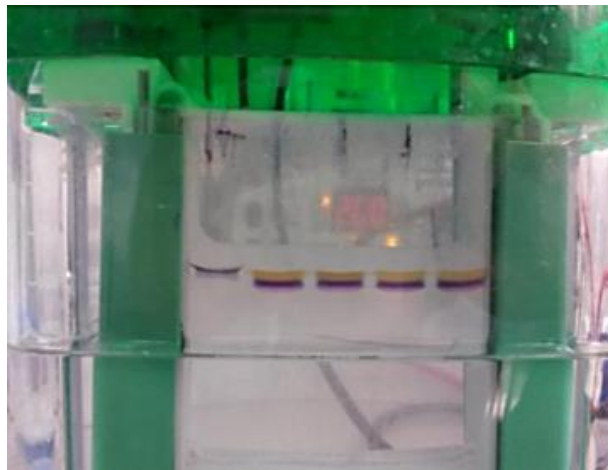


Figura 16. Corrida de geles.



Figura 17. Preparacion de muestras de los aislados proteicos e hidrolizados jeringas de 1ml



Figura 18. Preparación de las muestras para cromatografía UHPLC



Figura 19. Equipo de cromatografía UHPLC