UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE ALIMENTOS

Estudio de la digestibilidad in vitro del aislado proteico de pan liofilizado tipo tapado elaborado con masa madre de distintos tiempos de fermentación

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniero en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Mauricio Nicolás Chicaiza Pastuña

Tutor: Dra. Mayra Liliana Paredes Escobar

Ambato – Ecuador

Agosto - 2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Mayra Liliana Paredes Escobar

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 01 de Julio de 2024



Dra. Mayra Liliana Paredes Escobar

0501873954

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Mauricio Nicolás Chicaiza Pastuña, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título del Ingeniero en Alimentos son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



Mauricio Nicolás Chicaiza Pastuña

0503752479

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación 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 Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, 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.



Mauricio Nicolás Chicaiza Pastuña

0503752479

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
SANTIAGO CASADO ROJO

Presidente de Tribunal

Firmado electrónicamente por:
RUBEN DARIO VILCACUNDO CHAMORRO

Dr. Rubén Darío Vilcacundo Chamorro

1802738102

Firmado electrónicamente por:
YOEL HERNANDEZ NAVARRO

Mg. Yoel Hernández Navarro

1754821989

Ambato, 02 de Agosto del 2024

DEDICATORIA

A mis papas Aurora y Marcelo por su apoyo constante, por protegerme y motivarme, sin su guía y comprensión no habría sido posible este logro.

A mi hermano Alex por el apoyo moral, las risas y fuente de inspiración por demostrarme que se puede salir de momentos difíciles tu ejemplo de perseverancia y dedicación ha sido una guía invaluable en mi camino. Este logro también te pertenece.

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mis agradecimientos a mis papas y mi hermano que siempre han estado a mi lado en las buenas y en las malas, por el apoyo económico, moral y todo el cariño que me han dado.

Agradezco a mis tíos Hortencia y César y a mi primo Cristian por ser una parte fundamental en mi vida por ser un pilar de inspiración y apoyo en los momentos más difíciles de mi vida.

A mi tutora PdD Mayra Paredez por el apoyo de sus conocimientos y paciencia que me brindo durante el desarrollo de este proyecto.

A la doctora Johana Ortiz, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, por su valioso tiempo y por permitirme utilizar el equipo de HPLC de la facultad.

A mis amigos de la universidad Andrés, Gaby, Vicky, Eva y Bianchis por el apoyo constante y las largas horas de juerga

A mi abuela Trinidad que en paz descanse por ser una mujer muy luchadora y sacar adelante a sus hijos, por enseñarme el trabajo duro y el valor del dinero.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR ii
AUTORIA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN iii
DERECHOS DE AUTOR iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO v
DEDICATORIA vi
AGRADECIMIENTO vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS viii
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS x
RESUMEN EJECUTIVO xi
ABSTRACT xii
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO 1
1.1 Antecedentes investigativos 1
1.1.1 Alimentos panificados. 2
1.1.1.1 Origen 2
1.1.2 Pan tipo tapado. 3
1.1.2.1 Harina 3
1.1.3 Proteínas en alimentos panificados. 4
1.1.3.1 Gluten 4
1.1.4 Digestión de proteínas 5
1.1.4.1 Tipos de digestión 5
1.1.5 Masa madre en la panificación 7
1.1.5.1 Masa madre tipo I 7
1.1.5.2 Masa madre tipo II 7
1.1.5.3 Masa madre tipo III 8
1.1.6 Pan de masa madre 9
1.1.7 Aminoácidos 9
1.1.7.1 Aminoácidos presentes en el pan 9

1.1.8 Electroforesis de proteínas 11
1.1.8.1 Tipos de electroforesis de proteínas 11
1.1.9 Cromatografía de alta resolución (HPLC) 13
1.2 Objetivos 13
Capítulo II Metodología 14
2.1 Materiales 14
2.2 Métodos 15
2.2.1 Obtención de los aislados proteicos de las muestras liofilizadas de pan tipo tapado elaborado con masa madre de distintos tiempos de fermentación. 15
2.2.1.1 Obtención de las muestras liofilizadas 15
2.2.1.2 Concentrado proteico del pan 16
2.2.1.3 Cuantificación por el método de Dumas 16
2.2.2 Valoración de la digestibilidad in vitro del aislado proteico de pan liofilizado tipo tapado elaborado con masa madre de distintos tiempos de fermentación. 17
2.2.2.1 Simulación de la digestibilidad in vitro de la proteína 17
2.2.2.2 Electroforesis SDS – PAGE 18
2.2.2.3 Separación electroforética 19
2.2.1.1 Mezclado y dilución de la muestra hidrolizada 19
2.2.1.2 Neutralización y filtrado 19
2.2.1.3 Derivatizacion 19
Capítulo III Resultados y discusión 21
3.1 Análisis y obtención de resultados 21
3.1.1 Obtención de los concentrados proteicos de pan liofilizado 21
3.1.2 Rendimiento de la concentración de proteína 21
3.1.3 Cuantificación de proteína método Dumas. 24
3.2 Digestión de proteínas de extractos proteicos de pan liofilizado tipo tapado de distintos tiempos de fermentación 25
3.3 Determinación de aminoácidos 28
Capitulo IV Conclusiones y recomendaciones 31
Materiales de referencia 32

Anexos…… 39

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Recursos materiales. 14

Tabla 2. Composición de fluido simulado gástrico (SGF) y fluido simulado intestinal (SIF) 17

Tabla 3. Rendimiento de los extractos proteicos de pan liofilizado de masa madre de distintos tiempos de fermentación 22

Tabla 4. Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias del rendimiento de pan liofilizado de masa madre de diferentes días de fermentación. 23

Tabla 5. Porcentaje de proteína en las muestras de pan tipo tapada liofilizado elaborado con masa madre de diferentes tiempos de fermentación……24

Tabla 6. Contenido de aminoácidos de los concentrados proteicos del pan liofilizado de distintos tiempos de fermentación..... 28

Figura 1. Rendimiento vs días de fermentación a diferentes pH 23

Figura 2. Electroforesis del aislado proteico del pan liofilizado tipo tapado de distintos tiempos de fermentación (Dia 15, pH 10;5)..... 26

Figura 3. Electroforesis SDS PAGE gluten 26

Figura 4. Electroforesis SDS PAGE y B -Mercaptoetanol digestión intestinal 27

Figura 5. Contenido de aminoácidos en masa de pan sin fermentar y masa fermentada …...……29

Figura 6. Molécula de Acido Glutámico 30

Figura 7. Molécula de prolina 30

RESUMEN EJECUTIVO

El pan, un alimento ancestral y globalmente consumido, ha evolucionado con la industrialización, sustituyendo levaduras naturales por levaduras industriales y agentes químicos. Este cambio ha renovado el interés en la fermentación natural, buscada por consumidores informados sobre la calidad nutricional y su impacto en la salud. La masa madre, antigua técnica de fermentación, mejora la vida útil, valor nutricional y textura del pan de trigo, gracias a cultivos de bacterias ácido-lácticas o levaduras. Se obtuvieron aislados proteicos de pan liofilizado tipo tapado, elaborado con masa madre de distintos tiempos de fermentación. Se evaluó la digestibilidad proteica in vitro mediante digestión gástrica e intestinal simulada. Los concentrados proteicos se determinaron por precipitación isoeléctrica y se cuantificaron usando el método de Dumas. La calidad de la proteína se evaluó con electroforesis SDS-PAGE y se determinó el perfil de aminoácidos mediante cromatografía líquida de alta resolución. El estudio investiga la digestibilidad in vitro del aislado proteico de pan liofilizado tapado, evaluando el efecto de diferentes tiempos de fermentación de la masa madre. Se observa una leve influencia del pH en el rendimiento proteico, mientras que el tiempo de fermentación afecta significativamente la cantidad de extracto proteico obtenido. La electroforesis SDS – PAGE reveló diferencias en el perfil proteico y la cantidad de proteínas solubles, siendo el día quince en donde las proteínas son digeridas completamente. La cromatografía líquida de alta resolución reveló una reducción significativa de aminoácidos como el ácido glutámico, glutenina entre otros y un aumento de aminoácidos como la prolina y alanina.

Palabras claves: masa madre, digestibilidad in vitro, aminoácidos, gluten, proteína

ABSTRACT

Bread, an ancestral and globally consumed food, has evolved with industrialization, replacing natural yeasts with industrial yeasts and chemical agents. This change has renewed interest in natural fermentation, sought by consumers informed about nutritional quality and its impact on health. Sourdough, an ancient fermentation technique, improves the shelf life, nutritional value, and texture of wheat bread, thanks to cultures of lactic acid bacteria or yeasts. Protein isolates were obtained from freeze-dried tapado bread, made with sourdough of different fermentation times. Protein digestibility was evaluated in vitro through simulated gastric and intestinal digestion. Protein concentrates were determined by isoelectric precipitation and quantified using the Dumas method. Protein quality was assessed with SDS-PAGE electrophoresis and the amino acid profile was determined using high-performance liquid chromatography. The study investigates the in vitro digestibility of protein isolate from freeze-dried tapado bread, evaluating the effect of different sourdough fermentation times. A slight influence of pH on protein yield was observed, while fermentation time significantly affected the amount of protein extract obtained. SDS-PAGE electrophoresis revealed differences in protein profile and the amount of soluble proteins, with complete digestion of proteins occurring on the fifteenth day. High-performance liquid chromatography revealed a significant reduction in amino acids such as glutamic acid, glutenin, among others, and an increase in amino acids such as proline and alanine.

Keywords: sourdough, in vitro digestibility, amino acids, gluten, prote

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

El pan, siendo un alimento ancestral en la dieta humana y uno de los más consumidos a nivel global **(Arranz-Otaegui et al., 2018)**, ha experimentado una transición hacia la industrialización del proceso de producción gracias al descubrimiento de microorganismos cruciales para el desarrollo de la masa. Inicialmente, la elaboración del pan se realizaba con una levadura natural ancestral; sin embargo, en la actualidad, esta ha sido mayormente sustituida por levaduras industriales y agentes químicos. Este cambio ha renovado el interés contemporáneo de los consumidores, ahora mucho más informados y educados sobre la calidad nutricional y su impacto en la salud, por la fermentación natural **(Nionelli & Rizzello, 2016)**

La masa madre es una técnica antigua de fermentación de cereales utilizada para elaborar pan, se ha demostrado que es perfecta para mejorar la vida útil, los valores nutricionales y textura de panes de trigo y centeno. Su función principal es leudar los panes para producir un pan más aireado de mejor textura y de características organolépticas especiales. Tradicionalmente las masas madres se obtienen mediante un cultivo de bacterias ácido-lácticas o levaduras por fermentación espontanea, en donde se mezcla harina y agua, las cuales favorecen la textura, los sabores y el firmeza del pan **(Katsi et al., 2021)**. La digestión es un proceso en donde descompone los alimentos en sus formas más simples pasando por distintas etapas en el sistema digestivo, como ejemplo tenemos a la proteína en donde su fase de digestión empieza en el estómago siendo desnaturalizada por el ácido clorhídrico mientras que la enzima pepsina la descompone en péptidos más pequeños. La proteína desempeña un papel fundamental en el crecimiento, desarrollo y mantenimiento del cuerpo humano **(Ferreyra et al., 2021)**.

Conocer la cantidad de proteínas y su digestibilidad proporciona información sobre el perfil nutricional general del producto. Esto es interesante para que los consumidores tomen decisiones informadas sobre su dieta y seleccionen alimentos que se alineen con sus necesidades nutricionales y preferencias. El pan con masa madre en su composición suele albergar 7.5 g de proteína por cada 100 gramos de pan **(Hayta & Hendek Ertop, 2017)**.

En una investigación realizada por **Wu et al. (2017)** se examinaron los cambios en la digestibilidad de las proteínas durante la elaboración de pan utilizando harinas con y sin gluten. Los resultados evidenciaron que la digestibilidad aumenta durante la fermentación. Además, los mismos investigadores observaron que las tasas de digestión de las proteínas en las harinas guardaban una correlación inversa con el contenido total de polifenoles y fibra dietética.

Se sostiene la idea de que los polifenoles se vinculan a los sitios de reconocimiento de las enzimas digestivas, dificultando así la reacción de hidrólisis. Además, podría ocurrir una formación de enlace cruzado entre las proteínas y los polifenoles, limitando aún más la digestibilidad de las proteínas. Las proteínas también influyen en la calidad sensorial del pan tipo tapado. La cantidad y tipo de proteínas pueden afectar la textura, el sabor y otros atributos sensoriales que influyen en la experiencia del consumidor **(Gobbetti et al., 2020)**.

1.1.1 Alimentos panificados.

Los alimentos panificados son productos sometidos a procesos de fermentación y cocción, generalmente están elaborados con harina de cereales, siendo el trigo el cereal más usado. Los alimentos que destacan son el pan, las galletas y las pastas. Estos productos se caracterizan porque son una fuente de carbohidratos complejos, que ayudan a proporcionar energía de forma sostenida al organismo. En su composición pueden albergar una proporción variable de proteínas, minerales como el hierro y calcio y vitaminas del complejo B, esta cantidad depende de los ingredientes utilizados en la elaboración de los productos **(Cauvain & Clark, 2019)**.

1.1.1.1 Origen

Los orígenes del pan se remontan al período Neolítico, siendo de crucial importancia en la evolución cultural humana a lo largo de la historia. Con el advenimiento del conocimiento sobre las plantas, los humanos comenzaron a preparar papillas a partir de cereales y semillas para su alimentación. Egipto ha sido un pilar histórico en el desarrollo de la civilización, gracias a su ubicación estratégica a lo largo del río Nilo, cuyos caudales proporcionaban tierras fértiles propicias para el cultivo de cereales. Esta ventaja permitió a los egipcios desarrollar las primeras técnicas de panificación. Inicialmente, consumían pan sin fermentar, pero con el tiempo, desarrollaron métodos de fermentación que dieron lugar a la producción de cerveza y pan leudado **(Lahue et al., 2020)**.

El intercambio comercial con Egipto permitió a Grecia incorporar el pan a su cultura, diversificando los productos panificados al crear diversas masas y añadir ingredientes como miel, frutos y especias. Cuando el pan llegó a Roma, los romanos innovaron en la tecnología de la molienda, las máquinas de amasado y los hornos. Además, clasificaron los panes según su forma y composición, y desarrollaron un tipo de pan especial para los soldados, el cual poseía una vida útil prolongada **(Castiblanco, 2019)**.

1.1.2 Pan tipo tapado.

En Ecuador el pan tapado o también reconocido como pan de Ambato, se lleva elaborando desde hace más de 100 años, su sabor característico se debe a que la masa se deja leudar por 4 horas además la cocción se realiza en hornos de leña y como ingredientes lleva harina de trigo, centeno o cebada, huevos y manteca **(El Comercio, 2014)**.

1.1.2.1 Harina

La harina de trigo ha funcionado históricamente como el componente fundamental en la producción de pan debido a su capacidad para proporcionar estructura a los productos panificados. No obstante, ciertos tipos de pan incluyen mezclas con otras harinas como maíz, centeno y avena. La alta concentración de glutenina y gliadina en la harina de trigo permite desarrollar una red de gluten al combinarse con agua, lo que facilita la masticabilidad del producto y genera una textura firme, características esenciales de los panes tradicionales **(Verdú et al., 2016)**.

Los parámetros que generalmente se determinan en la harina de trigo dependen principalmente de sus propiedades, destacándose la fuerza, tenacidad, extensibilidad y elasticidad, que influyen en el comportamiento de las masas viscoelásticas derivadas de esta harina. Para la panificación se emplea harina de gran fuerza. La fuerza de la harina se refiere al contenido proteico del trigo, que es directamente proporcional a la cantidad de gluten, el cual retiene el aire en la masa y contribuye al incremento del volumen. Por lo general, las harinas de gran fuerza poseen un contenido de gluten que oscila entre el 10 y el 13%, siendo una materia prima ideal para la elaboración de pan, ya que proporciona una estructura adecuada a la miga tras el horneado. **(Sifre et al., 2018)**.

1.1.3 Proteínas en alimentos panificados.

En la panificación, las proteínas son esenciales debido a su papel crucial en la estructura y textura del pan. El gluten, una proteína presente en la mayoría de los cereales, es particularmente diferente y especial en el trigo, lo cual la hace importante en este proceso. Además del gluten, existen otras proteínas derivadas de ingredientes como huevos, leche y semillas, que también se encuentran en los productos panificados. Estas proteínas proporcionan aminoácidos esenciales para el organismo humano **(Barajas et al., 2011)**. Sin embargo, no ayudan a la formación de la masa viscoelástica.

Dado que el pan suele consumirse junto con otros alimentos, la combinación de diferentes fuentes proteicas mejora su perfil nutricional, incrementando el valor biológico del pan. La evaluación de la calidad de la proteína no se limita únicamente a su composición de aminoácidos; es igualmente importante considerar la digestibilidad y absorción de los productos de hidrólisis generados en el sistema gastrointestinal humano. Aunque una proteína pueda presentar un perfil de aminoácidos excelente, su utilidad puede verse restringida si su digestibilidad y capacidad de absorción son limitadas **(Castiblanco, 2019)**.

1.1.3.1 Gluten

El gluten se distingue por su textura gomosa y pertenece a los grupos de las prolaminas y glutelinas, presentando una baja hidrofobicidad. Durante el proceso de amasado del pan, al combinar agua y harina, la masa inicialmente es viscosa pero gradualmente se vuelve suave y viscoelástica. Durante el amasado, las proteínas del gluten forman una red estructural que inicialmente adquiere resistencia, pero luego se ablanda. El gluten tiene la capacidad de absorber hasta el doble de su peso seco en agua; sin embargo, cuando se seca, puede perder sus propiedades funcionales. En condiciones de laboratorio, se ha logrado minimizar esta pérdida de propiedades sometiendo el gluten a un proceso de liofilización y posterior rehidratación. **(Day et al., 2020)**.

- Glutenina

La glutenina es conocida por formar el gluten, se caracteriza porque es extremadamente elástica y proporciona extensibilidad a la harina durante el amasado, las gluteninas se agrupan entre los polímeros

con alto peso molecular formado así una red tridimensional que atrapa gases en el proceso de fermentación ayudando a que se expanda la masa, cuando interactúa con las gliadinas desarrollan una estructura porosa en el pan después del horneado **(Espinosa et al., 2013)**.

- Gliadinas

Al igual que la glutenina las gliadinas son las proteínas responsables en dar extensibilidad a la masa, también contribuyen a la maleabilidad de la masa con el fin de que pueda estirarse sin romperse, siendo uno de los parámetros esenciales durante el leudado y amasado. A diferencia de las gluteninas las gliadinas son proteínas monoméricas, permitiendo que no se formen enlaces entre moléculas, contribuyendo a la fluidez de la masa **(Hernández et al., 2015)**.

1.1.4 Digestión de proteínas

La digestibilidad de las proteínas está determinada por una combinación de factores internos y externos. Los factores internos incluyen el perfil de aminoácidos, así como el grado de encruzamiento y plegamiento de las proteínas. Por otro lado, los factores externos abarcan condiciones como el pH, la presencia de co-solutos, la temperatura y la fuerza iónica. Durante el procesamiento de alimentos, estos factores ejercen un impacto significativo en la digestibilidad de las proteínas **(Impa et al., 2019)**.

Evaluar la calidad de la proteína no se limita únicamente a la composición de aminoácidos; es igualmente crucial considerar la digestibilidad y la absorción de los productos de hidrólisis generados en el tracto gastrointestinal humano. Aunque una proteína pueda tener un perfil de aminoácidos excepcional, su capacidad para ser digerida y absorbida puede estar limitada. Para proporcionar recomendaciones fundamentadas sobre los requerimientos de proteínas, los formuladores de políticas deben considerar tanto la composición de los aminoácidos como la digestibilidad **(Ferreyra et al., 2021)**.

1.1.4.1 Tipos de digestión

Por lo general se pueden distinguir tres fases de la digestión de proteínas a lo largo del proceso del tracto intestinal.

- Fase estomacal

La actividad proteolítica se divide en dos tipos de pepsinas que se activan en un entorno ácido. Como consecuencia, los productos iniciales incluyen polipéptidos grandes, aminoácidos libres y péptidos más pequeños. Investigaciones recientes han demostrado que esta etapa de digestión no es tan indispensable para la descomposición de las proteínas, ya que hay individuos que han sido sometidos a gastrectomía evidenciando que aún pueden asimilar y digerir las proteínas en las siguientes etapas **(Gilani et al., 2005)**.

- Fase pancreática

Esta etapa es crucial en el proceso de digestión de proteínas, ya que involucra la acción de diversas enzimas proteolíticas producidas por el páncreas, como la carboxipeptidasa A y B, tripsina, quimotripsina y elastasa. La hidrólisis de las proteínas durante esta fase produce una mezcla heterogénea de aminoácidos libres y pequeños oligopéptidos. A medida que avanza esta etapa, el pH aumenta, lo que inactiva las peptidasas gástricas **(Huang et al., 2018)**.

La elastasa, quimotripsina y tripsina son endopeptidasas que tienen la capacidad de romper los enlaces peptídicos en el medio de la cadena de aminoácidos. Estas enzimas son reconocidas por su habilidad para reconocer aminoácidos a lo largo de la estructura primaria de sus sustratos. Por otro lado, las carboxipeptidasas se encargan de eliminar aminoácidos individuales. Estas enzimas pancreáticas aseguran una hidrólisis adecuada de los oligopéptidos y aminoácidos libres derivados de las proteínas **(Auld, 2013)**.

- Fase del intestino delgado

En la membrana del borde del intestino delgado se encuentra una aminopeptidasa, que hidroliza oligopéptidos cortos eliminando secuencialmente aminoácidos N-terminales. Estas enzimas pueden mostrar una alta especificidad para péptidos que contienen prolina, un tipo de aminoácido que las enzimas pancreáticas no pueden hidrolizar. El yeyuno, la porción media del intestino delgado, es el sitio óptimo para la absorción de aminoácidos. **(Picariello et al., 2015)**.

1.1.5 Masa madre en la panificación

La masa madre tradicional se origina a partir de la mezcla de harina y agua, seguida de un proceso de fermentación de esta mezcla. Posteriormente, se utiliza en pequeñas cantidades como iniciador para la elaboración de pan. Este método promueve la producción de ácidos orgánicos, enzimas, compuestos antifúngicos y exopolisacáridos, los cuales influyen en la proteólisis dentro de la masa madre **(Brandt, 2019)**.

La calidad de los compuestos generados está estrechamente vinculada a la calidad de las materias primas y a la actividad de la microbiota natural o cepas seleccionadas que inician la fermentación. La exploración actual en la diversificación de las materias primas, destacando sus propiedades nutricionales y funcionales, refleja un creciente interés en optimizar el proceso de fermentación de la masa madre **(Papadimitriou et al., 2019)**.

1.1.5.1 Masa madre tipo I

Esta masa madre se elabora típicamente con una mezcla de agua y harina, que luego se somete a fermentación mediante bacterias ácido-lácticas y levaduras presentes tanto en la harina como en el ambiente circundante **(Ripari et al., 2016)**. La masa inicial se utiliza como inoculante en una proporción del 5% al 20% del volumen total para iniciar la fermentación de una nueva mezcla de harina y agua, en un proceso conocido como refresco. El refresco generalmente se realiza a temperatura ambiente, con un período de fermentación de entre 6 y 24 horas, y se repite de 5 a 10 veces. Este proceso es crucial para seleccionar las cepas mejor adaptadas al entorno de la masa madre y para desarrollar y optimizar las actividades metabólicas de la microbiota, que son responsables de la capacidad de fermentación y acidificación de la masa madre **(De Vuyst et al., 2014)**. Una vez que se ha obtenido una masa madre estable a través del proceso de refresco, esta puede emplearse como agente leudante en la elaboración de diversos productos de panadería, como diferentes tipos de panes de masa madre tradicionales italianos, el pan de centeno alemán de tres etapas y el pan de masa madre de San Francisco **(Corsetti, 2013)**.

1.1.5.2 Masa madre tipo II

La masa madre de tipo II se elabora mediante un proceso único de fermentación, tras la inoculación de un cultivo inicial en una mezcla de harina y agua. Esta fermentación se realiza a una temperatura elevada

(menor a 30°C) para acelerar el proceso, durante un período prolongado que puede variar entre 15 y 24 horas, o incluso extenderse de 1 a 3 días. Esto resulta en un mayor rendimiento de masa en comparación con la masa madre de tipo I. Una vez completada la fermentación, la masa madre se enfría para estabilizarla, y luego se somete a pasteurización o se le agrega NaCl para desactivar los microorganismos iniciadores, detener la producción de CO2 y ácidos orgánicos. **(Huang et al., 2018)**.

Este proceso permite que el producto final mantenga sus propiedades durante varios días. La masa madre de tipo II, de consistencia semilíquida, se produce a nivel industrial en biorreactores y es muy popular en panaderías industriales debido a su facilidad de manipulación, capacidad para ser bombeada y baja producción de polvo. Esta masa madre se utiliza principalmente para acidificar la masa, en lugar de leudarla, y se emplea en la elaboración de diversos productos horneados, como pan blanco, pizzas y pasteles. **(Siepmann et al., 2018)**.

1.1.5.3 Masa madre tipo III

La deshidratación de la masa madre de tipo II estabilizada en su forma líquida resulta en la producción de masa madre de tipo III. Para ello, se emplean diversas técnicas de deshidratación, siendo el secado en tambor y el secado por pulverización las más comunes **(Chavan & Chavan, 2011)**.

La masa madre tipo III presenta varias ventajas respecto a los tipos I y II, como una calidad consistente, una vida útil prolongada, un volumen reducido que facilita su manejo, transporte y almacenamiento, y la capacidad de estandarizar la producción de productos finales. Estas características explican su presencia en los estantes de supermercados y su uso frecuente en panaderías industriales. Los productos de pan elaborados con masa madre tipo III incluyen pan tostado, gofres, pan de centeno, así como pan de San Francisco y panetón **(Decock & Cappelle, 2005)**.

Los cultivos iniciadores utilizados se seleccionan en función de su alta capacidad de acidificación, producción de compuestos aromáticos, resistencia y capacidad para sobrevivir al proceso de secado. Estos incluyen cepas heterofermentativas de Lactobacillus brevis y cepas facultativas heterofermentativas de Pediococcus pentosaceus y Lactobacillus plantarum. Aunque no se han aislado levaduras de la masa madre tipo III, al igual que en el tipo II, se añade levadura de panadero (Saccharomyces cerevisiae) para mejorar la fermentación **(Siepmann et al., 2018)**.

1.1.6 Pan de masa madre

El pan de masa madre es considerado como un estándar de excelencia en la panificación. Los cambios bioquímicos y de actividad enzimática de los microorganismos, otorgan un impacto significativo en las características de la masa madre y en la calidad del pan. La fermentación de la masa madre incrementa el valor nutricional, la vida útil y el sabor del pan o sus productos horneados derivados **(Siepmann et al., 2018)**.

En relación con la textura del pan, se sabe que el gluten tiene un impacto importante en la elasticidad de la masa, el aumento de la extensibilidad y elasticidad del pan es el resultado de la fermentación de la masa madre la cual depende de la producción de ácido láctico y acético por parte de las cepas bacterianas ácido lácticas (LAB), con las LAB se someten a un ambiente ácido que facilita la solubilidad de las proteínas del gluten. La actividad proteolítica de las levaduras y las LAB fomentan una retención superior del dióxido de carbono, el cual beneficia en el volumen y suavidad del producto final **(Nionelli & Rizzello, 2016)**.

1.1.7 Aminoácidos

Los aminoácidos son moléculas orgánicas esenciales en la síntesis proteica y de varios procesos biológicos, presenta un grupo amino ($-NH_2$) y un grupo carboxilo (-COOH) y una cadena lateral que determina sus propiedades biológicas y bioquímicas. La clasificación de los aminoácidos se basa la polaridad de sus cadenas laterales y cómo se comportan en entornos acuosos o lipídicos (Fernández & Galván, 2006).

1.1.7.1 Aminoácidos presentes en el pan.

Los principales aminoácidos del pan provienen del gluten. En donde se incluyen glicina, ácido glutámico, prolina y glutamina, la composición puede variar según el tipo de harina utilizada **(Knežević et al., 2013)**.

- Glicina

La glicina se considera uno de los aminoácidos más comunes y simples de las proteínas, es no polar y es el más pequeño de los aminoácidos, en su cadena lateral solo posee un átomo de hidrogeno, es soluble en agua y si distribuye ampliamente en las proteínas en donde forman enlaces peptídicos en la estructura primaria de las proteínas, la glicina ayuda a la síntesis de ácidos nucleicos y producción de glucosa **(Cardona, 2020)**.

- Ácido glutámico

El ácido glutámico es un aminoácido dicarboxílico que contiene dos grupos carboxilo (-COOH). Su estructura se compone de una cadena carbonada con un grupo amino ($-NH_2$) en el carbono alfa ($C\alpha$) y dos grupos carboxilo en los carbonos alfa y gamma ($C\gamma$). Es uno de los aminoácidos no esenciales más abundantes en el cuerpo humano, actuando como neurotransmisor en el sistema nervioso central. Facilita la transmisión de señales entre neuronas y participa en la eliminación del exceso de amoníaco mediante su conversión a glutamina **(Kalidas, 2023)**.

- Prolina

La prolina es un aminoácido cíclico en el cual su cadena lateral está unida al grupo amino, formando un anillo pirrolidínico. Esta estructura le confiere propiedades distintivas que afectan la estructura de las proteínas. La prolina es esencial para formar hélices y giros en las proteínas, influyendo así en su conformación tridimensional. Se encuentra abundantemente en el colágeno y también se acumula en plantas sometidas a condiciones de estrés, permitiendo proteger las células vegetales mediante osmorregulación **(Kobayashi, 2023)**.

- Glutamina

La glutamina es un aminoácido no esencial que puede ser sintetizado a partir de otros compuestos. Posee una cadena lateral que contiene un grupo amida ($-CONH_2$), a diferencia del ácido glutámico, que tiene un grupo carboxilo en lugar de la amida. La glutamina desempeña un papel crucial en el transporte

de nitrógeno, facilitando el movimiento del amoníaco desde los tejidos hacia el hígado y los riñones para su excreción **(Kobayashi, 2023)**.

1.1.8 Electroforesis de proteínas

La electroforesis de proteínas se basa en el movimiento de estas moléculas en un gel de poliacrilamida bajo la influencia de un campo eléctrico. El gel actúa como una matriz porosa que retarda el movimiento de las proteínas según su tamaño y carga eléctrica. Las proteínas más pequeñas y con mayor carga eléctrica se desplazan más rápidamente a través del gel, mientras que las proteínas más grandes y con menor carga se mueven más lentamente. La visualización de las proteínas se puede realizar utilizando tintes específicos como el azul de Coomassie o mediante métodos de detección y transferencia de proteínas **(Ritgen, 2023)**.

1.1.8.1 Tipos de electroforesis de proteínas

La electroforesis de proteínas se divide en tres grupos y depende el tipo de gel se va utilizar conforme la caracterización de las proteínas. Los métodos que destacan son glectroforesis en Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS – PAGE), electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D PAGE), Capilar y gel gradiente **(Ritgen, 2023)**.

- Electroforesis SDS – PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) es una metodología empleada para la separación de proteínas según su peso molecular. El SDS desnaturaliza y carga negativamente las proteínas, permitiendo su migración a través de un gel poroso de poliacrilamida bajo un campo eléctrico. Este procedimiento es comúnmente utilizado en el control de calidad de alimentos, diagnósticos médicos y en la caracterización de productos biofarmacéuticos **(Dżugan et al., 2023)**.

- Electroforesis 2D- PAGE

La electroforesis 2D-PAGE se usa para analizar y separar proteínas de una mezcla compleja. Este método suele combinar dos técnicas de análisis. La primera consiste en un enfoque isoeléctrico (IEF), en donde las proteínas son separadas según su punto isoeléctrico (pI) **(Hristova & Zhivkov, 2019)**. Se aplica un gel con un gradiente de pH específico sometido a un campo eléctrico para que las proteínas se muevan hasta alcanzar el pH correspondiente a su pI, donde se detienen. En la segunda fase, se utiliza la técnica SDS-PAGE para aislar las proteínas según su peso molecular. La tira del enfoque isoeléctrico se trata con SDS, el cual desnaturaliza las proteínas, dándoles una carga negativa proporcional a su longitud. Luego, se colocan en un gel de poliacrilamida con el fin de aplicar un campo eléctrico perpendicular para determinar el peso de las proteínas que migran sobre el gel. **(Walker et al., 2008)**.

- Electroforesis capilar

La electroforesis capilar se usa para separar moléculas cargadas en función de su tamaño. Este método trabaja con un campo eléctrico a lo largo de un capilar lleno de un electrolito, lo que provoca que las moléculas migren a diferentes velocidades dependiendo de sus características electroforéticas. Una de las ventajas de la electroforesis capilar es la rapidez con la que puede separar los compuestos. Además, utiliza volúmenes pequeños, siendo ideal para el análisis de muestras limitadas. A pesar de sus ventajas, este método requiere ajustes cuidadosos en el pH del electrolito, el voltaje y la **temperatura (Harstad et al., 2016)**.

- Electroforesis de gel gradiente

La electroforesis de gel gradiente emplea un gel de poliacrilamida variando su concentración de baja a alta en el gel, obteniendo así un gradiente escalonado o continuo, este gradiente separa de forma precisa las moléculas eficientemente. Las moléculas pequeñas viajan velozmente por los poros del gel y las moléculas más grandes se mueven lentamente porque presentan resistencia en los poros, las muestras con moléculas de interés se aseguran en los pocillos de gel con un marcador de masa molecular equivalente con el objetivo de determinar el tamaño de las moléculas separadas **(Ritgen, 2023)**.

1.1.9 Cromatografía de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se utiliza para identificar, separar y cuantificar los componentes de un compuesto o mezcla. El HPLC utiliza una columna de material absorbente, conocida como fase estacionaria, y un líquido llamado fase móvil que se bombea a alta presión a través de la columna. Los compuestos de la mezcla interactúan de distintas maneras con la fase estacionaria, separándose en función de sus tiempos de retención. Se utiliza un detector de UV/VIS para medir la concentración de los compuestos cuando salen de la columna. La precisión del HPLC es crucial en el análisis cualitativo y cuantitativo para detectar compuestos con concentraciones muy bajas como por ejemplo los aminoácidos **(Rajauria, 2018)**.

1.2 Objetivos.

Objetivo general.

Evaluar la digestibilidad in vitro del aislado proteico de pan tipo tapado, analizando la influencia de distintos tiempos de fermentación de la masa madre.

Objetivos específicos.

- Obtener los aislados proteicos de las muestras de pan liofilizado tipo tapado elaborado con masa madre de distintos tiempos de fermentación.
- Valorar la digestibilidad in vitro del aislado proteico de pan liofilizado tipo tapado elaborado con masa madre de distintos tiempos de fermentación.
- Establecer el perfil de aminoácidos del aislado proteico de mayor digestibilidad de pan liofilizado tipo tapado elaborado con masa madre.

Capítulo II Metodología

2.1 Materiales

Tabla 1.

Recursos materiales.

Material	Cantidad
Materia Prima	
Pan liofilizado	500 g
Reactivos	
Ácido clorhídrico	200 mL
Hidróxido de Sodio	250 g
Agua destilada	1 L
Cloruro de Potasio	1.40 mL
Fosfato mono potásico	0.17mL
Bicarbonato de sodio	5.50 mL
Cloruro de magnesio	0.15 mL
Bicarbonato de amonio	0.05 mL
Cloruro de Sodio	0.0895 mL
Equipos	
Plancha agitadora	1
Centrifuga	1
Medidor de pH	1
Liofilizador	1
Orbital	1
Baño María	1

Ultra congelador	1
Refrigerador	1
Balanza analítica	1
Detector de nitrógeno Dumas	1
Equipo de electroforesis	1
HPLC	1
Materiales	
Espátula	1
Papel filtro	1
Tubos ependorf	25
Micropipeta	1

2.2 Métodos

2.2.1 Obtención de los aislados proteicos de las muestras liofilizadas de pan tipo tapado elaborado con masa madre de distintos tiempos de fermentación.

Diseño experimental

Para analizar la digestibilidad proteica in vitro se evaluó el contenido y la calidad de la proteína del pan liofilizado, para lo cual se realizó un diseño experimental por diferencia de medias con el método de Tukey, en donde la variable de respuesta fue el rendimiento de la concentración de proteína. Los días de fermentación. La calidad de la proteína se evaluó mediante la determinación de la digestibilidad in vitro de los aislados proteicos obtenidos de las muestras de pan tipo tapado elaborado con masa madre de distintos tiempos de fermentación.

2.2.1.1 Obtención de las muestras liofilizadas

Las muestras de pan tipo tapado elaborado con masa madre de diferentes tiempos de fermentación (0, 1, 7, 15 días) fueron producidas y ultracongeladas previamente en los laboratorios de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología **(Suarez, 2024)**, posteriormente se sometieron a un

proceso de liofilización en un liofilizador BenchTop Pro, garantizando la conservación de los componentes del producto.

2.2.1.2 Concentrado proteico del pan

Se generaron concentrados de proteínas a partir de las muestras de pan tipo tapado elaborado con masa madre liofilizadas mediante el método de precipitación isoeléctrica, siguiendo la metodología propuesta por **Martínez & Añón(1996)** con ajustes mínimos. Para llevar a cabo el proceso, se tomaron 20 gramos de pan pulverizado y se dispersaron en 200 ml de agua destilada, repitiendo el proceso por triplicado. Para lograr la solubilización, se ajustaron distintos valores de pH (8, 8.5 y 10) mediante la adición de hidróxido de sodio 2 N, posteriormente se agitaron las muestras por una hora. Seguido, se centrifugaron a 4400 rpm durante 45 minutos para separar la fracción soluble. A continuación, se precipitó la proteína contenida en el sobrenadante ajustando el pH a valores de precipitación (pH 4, 4.5 y 5) utilizando ácido clorhídrico 1 M, mientras se aplicaba un constante movimiento durante 10 minutos en una plancha agitadora Isotemp. El producto obtenido se almacenó en refrigeración a 4 °C durante 24 horas para lograr la precipitación de la proteína. Se eliminó el sobrenadante mediante centrifugación y el precipitado se sometió a ultracongelación a -80 °C en envases estériles para su posterior liofilización. Finalmente, la liofilización se llevó a cabo en un Liofilizador Bench Top Pro a una temperatura de -54.8 °C y una presión de 0,2 Pa. Una vez liofilizada la muestra, se calculó el porcentaje de rendimiento de proteína en relación con la muestra inicial utilizando la siguiente fórmula:

$$\%rendimiento = \frac{P_f}{P_o} * 100$$

Donde:

Pf: Peso final de la muestra liofilizada (g).

Po: Peso inicial del pan pulverizado(g)

2.2.1.3 Cuantificación por el método de Dumas

Tomando como referencia la metodología descrita por **Jung et al. (2003)** Se pesaron 50 mg de los concentrados proteicos sobre el papel aluminio; posteriormente, se colocaron las muestras en el equipo analizador de nitrógeno (Vel Scientifica-NDA Series) para el análisis. Se escogió una curva de

calibración estándar con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para el rango de concentración de proteína y se ajustó a los siguientes factores:

Factor de proteína (% N = PROT): 5,7

Factor de oxígeno (mL O2 / mg de muestra): 1,8

Caudal de Oxígeno (mL O2 / min): 400

2.2.2 Valoración de la digestibilidad in vitro del aislado proteico de pan liofilizado tipo tapado elaborado con masa madre de distintos tiempos de fermentación.

La digestibilidad gastrointestinal in vitro se realizó en base al método expuesto **Minekus et al. (2014)**. La simulación se llevó a cabo tanto en fase gástrica como en fase duodenal, para ello se emplearon muestras de concentrados proteicos obtenidos del pan liofilizado.

2.2.2.1 Simulación de la digestibilidad in vitro de la proteína

Previo a la simulación gástrica se prepararon dos compuestos, el fluido simulado gástrico (SGF) y el fluido simulado intestinal (SIF), de la siguiente forma:

Tabla 2.

Composición de fluido simulado gástrico (SGF) y fluido simulado intestinal (SIF)

Componente	Vol Final	cantidad	SGF	SIF
KCl	10	0,466 mL	0,69 mL	0,68 mL
KH_2PO_4	2,5	0,2125 mL	0,09 mL	0,08 mL
$NaHCO_3$	20	2,1 mL	1,25 mL	4,25 mL
NaCl	10	1,463 mL	1,18 mL	0,96 mL
$MgCl2(H_2O)_6$	2,5	0,095 mL	0,04 mL	0,11 mL
$(NaH_4)_2CO_3$	1	0,06 mL	0,05 mL	-
HCl	100	0,414 mL	0,25 mL	0,125 mL

NaOH	100	0,43 mL
$CaCl_2$	2,5	0,0895 mL

- Fase gástrica

En la simulación de la fase gástrica, se siguió la metodología de **Minekus et al. (2014)**, para lo cual se preparó con 5 mL de muestra, en la cual se prepararon 520 mg de concentrado proteico de pan a pH 8.5 de solubilización y pH 4.5 de precipitación. Posteriormente, se añadió 5 mL de agua destilada en un tubo Falcon de 15 mL. En baño maría, se calentó el fluido gástrico simulado (SGF) a 37 °C. En los 5 mL de muestra, se añadieron 3.57 mL de SGF y 2.5 µL de $CaCl_2$ (H_2O_2) 0.3 M; a esta mezcla se ajustó el pH a 3 con HCl 1M. Luego, se agregaron 0.43 mL de pepsina con una concentración de 2000 U disuelta en SGF (40 mg de pepsina en 2.5 mL de SGF). Se colocaron las muestras en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se sometieron a agitación en el orbital Provocel – Esco a 37 °C por 2 horas a 5000 rpm. Posteriormente, se desactivaron las enzimas de cada muestra en baño maría a 80 °C. Se almacenaron 3 mL de digerido gástrico a -20 °C y con el resto de las muestras se procedió a la simulación intestinal.

- Fase intestinal

Con la muestra obtenidas tras la digestión gástrica, previamente se calentó en baño maría 15 mL de fluido simulado intestinal (SIF) a 37 °C, se tomó 4.70 mL de SIF y 15 µL de $CaCl_2$ (H_2O_2) 0.3 M seguido se agregaron en el tubo falcon y se ajustó el pH a7 con NaOH, luego se prepararon una solución de bilis (1g de bilis en 5 mL de SIF) y una solución de pancreatina (750 mg de pancreatina en 2.635 mL de SIF), en el tubo falcon se agregaron 1.25 mL de bilis disuelta y 1.28 mL de pancreatina disuelta. La mezcla final se llevó al orbital Provocel – Esco a 37°C por 2 horas a 5000 rpm en tubos eppendorf de 1.5 mL. Finalmente se desactivan las enzimas de las muestras en baño maría a 80°C y se congelan para su posterior análisis en electroforesis.

2.2.2.2 Electroforesis SDS – PAGE

Se aplicó el procedimiento descrito por **(Laemmli, 1970)** con modificaciones, las muestras se sometieron a un campo eléctrico de 100 V en un buffer Tris- HCl por media hora en un equipo de electroforesis Bio – Rad Mini Protean II.

2.2.2.3 Separación electroforética

El gel se preparó a una concentración de 10% de acrilamida. Se forman los pocillos colocando un peine. Se espera que se forme el gel para introducirse en la cámara de electroforesis colocando 10 µL de estándar y 10 µL de muestra, para finalizar se llenó la cámara electroforética con solución buffer de corrida. Para la formulación del gel revisar Anexos 1, 2 y 3.

2.2.1 Determinación del perfil de aminoácidos del aislado proteico de mayor digestibilidad de pan tipo tapado liofilizado elaborado con masa madre.

- Hidrólisis acida (HA): En el caso de la hidrólisis ácida, se mezclaron 0.5 g de la muestra de proteínas con 4 ml de HCl 6N en un tubo de vidrio con tapa de Teflón.

- Hidrolisis básica (HB): Para la hidrólisis básica, se añadieron 0.5 g de proteínas a 4ml de NaOH 6N.

2.2.1.1 Mezclado y dilución de la muestra hidrolizada

Ambas mezclas se agitaron vigorosamente por 1 minuto y se incubaron durante 24 horas a 105 °C. Se unieron los extractos (4 mL de HA + 4 mL de HB) y se añadieron 20 mL de agua grado HPLC.

2.2.1.2 Neutralización y filtrado

Se neutralizó la solución usando Na(OH) o HCl . Posteriormente, el hidrolizado resultante se filtró mediante un filtro de jeringa de PTFE de 0.45 µm.

2.2.1.3 Derivatizacion

La derivatización de todos los aminoácidos se realizó utilizando el inyector de un sistema Agilent 1100. Los aminoácidos primarios (0.5 µL de muestra) fueron derivatizados con 0.5 µL de Orto-ftalaldehído (OPA) 75 mM y con 0.5 µL de 9-fluorenilmetilcloroformiato (FMOC) 10 mM (estándar de

aminoácidos). La separación de los aminoácidos derivatizados se llevó a cabo en una columna Zorbax Eclipse AAA Rapid Resolution (4.6 × 150 mm, 3.5 micrones, Agilent Technologies) a una temperatura de 40 °C. Se aplicó un flujo de 2 mL/min con un gradiente de solvente A (45% metanol, 45% acetonitrilo y 10% agua) y solvente B (45 mM NaH2PO4 H2O, 0.02% NaN3, pH 7.8). La detección fluorométrica de los aminoácidos derivatizados con OPA y FMOC se realizó a longitudes de excitación/emisión de 340/450 nm y 266/305 nm, respectivamente. Para la cuantificación, se utilizaron estándares internos de norvalina y sarcosina.

Capítulo III Resultados y discusión

3.1 Análisis y obtención de resultados

3.1.1 Obtención de los concentrados proteicos de pan liofilizado

Para los aislados proteicos, se ultracongelaron y liofilizaron las muestras de pan liofilizado**. James et al. (2015)** menciona que la ultracongelación detiene de manera acelerada las reacciones bioquímicas, ayudando a mantener las reacciones biológicas de las proteínas, además reduce el crecimiento de microorganismos manteniendo la estabilidad de las muestras de proteína. s **(Harguindeguy & Fissore, 2020).**

3.1.2 Rendimiento de la concentración de proteína

El rendimiento de las proteínas determina la cantidad de concentrado proteico en comparación a la cantidad inicial de pan liofilizado. En la tabla 3, se observa el porcentaje de proteína obtenido a diferentes pH de solubilización y precipitación de las muestras elaboradas con masa madre a diferentes días de fermentación. De los 10 gramos de pan liofilizado de cada muestra se consiguen valores promedio de 7.47% y 8.4% en peso de rendimiento, concordando con los valores reportados por **Ibrahim et al. (2022)** de entre 7-11% de proteína total en el pan.

La Figura 1 representa el rendimiento que mejor se adapta a los pH de solubilización y precipitación según los días de fermentación del pan. El pH que mejor se ajusta es de 10 a 5, con una media de 7.99% en rendimiento siendo este resultado el mejor observado, la variación de pH dentro de este rango optimiza la eficiencia del proceso reflejándose en el mayor rendimiento obtenido siendo crucial para ajustar al proceso de fermentación y mejorar la recuperación de proteínas del producto final . Cabe resaltar también que la proteína solubilizada y precipitada a un pH de 8 a 4 está próxima, llegando a una media de 7.92%. Las proteínas son menos solubles en soluciones ajustadas a su punto isoeléctrico. Hay que considerar que el gluten del pan es una red proteica compleja, por lo que se trabaja con diferentes rangos de pH para obtener los concentrados proteicos **(Vázquez et al., 2022)**.

Tabla 3.

Rendimiento de los extractos proteicos de pan liofilizado de masa madre de distintos tiempos de fermentación.

		Tiempo de fermentación											
		0			1			7			15		
pH de solubilidad		8	8.5	10	8	8.5	10	8	8.5	10	8	8.5	10
pH de precipitación		4	4.5	5	4	4.5	5	4	4.5	5	4	4.5	5
	Réplica												
Rendimiento	**1**	8.3	8	8.1	8.6	8.4	8.3	7.5	7.4	7.3	7	7.1	7.6
(%)	**2**	8.5	7.9	8.6	8	8.3	8.5	7.7	7.6	7.6	7.8	7.7	7.9
	3	8.2	8	8.4	8.4	8.2	8.4	7.4	7.8	7.7	7.6	7.9	7.5
Media		8,33	7,97	8,37	8,33	8,30	8,40	7,53	7,60	7,53	7,47	7,57	7,67
Desviación estándar		±0,153	±0,058	±0,252	±0,306	±0,100	±0,100	±0,153	±0,200	±0,208	±0,416	±0,416	±0,208

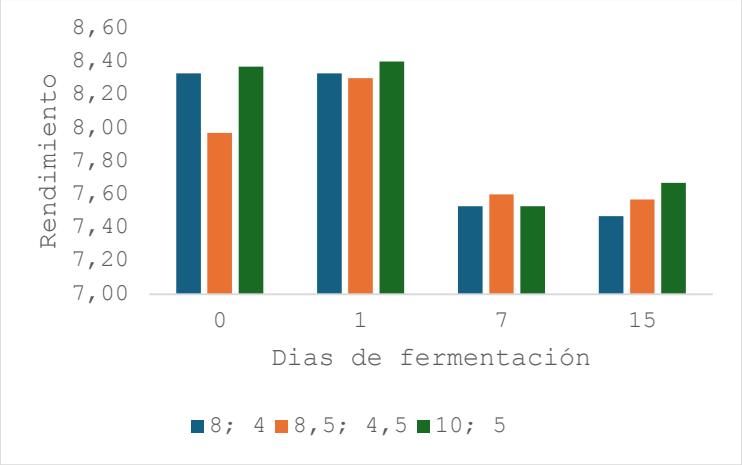


Figura 1. Rendimiento vs días de fermentación a diferentes pH

Tabla 4.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias del rendimiento de pan liofilizado de masa madre de diferentes días de fermentación.

Diferencia de Tiempo niveles	Diferencia de medias	EE de diferencia	IC simultáneo de 95%	Valor T	Valor p ajustado
1 - 0	0,122	0,111	(-0,181; 0,425)	1,10	0,693
7 - 0	-0,667	0,111	(-0,970; -0,364)	-5,99	0,000
15 - 0	-0,656	0,111	(-0,959; -0,353)	-5,89	0,000
7 - 1	-0,789	0,111	(-1,092; -0,486)	-7,09	0,000
15 - 1	-0,778	0,111	(-1,081; -0,475)	-6,99	0,000
15 - 7	0,011	0,111	(-0,292; 0,314)	0,10	1,000

En las pruebas de diferencia por niveles presentadas en la tabla 4 se puede observar que no existen varianzas significativas entre los días 0-1 y 7-15 de fermentación por que se ajustan valores p mayores que 0.05 denotando así que el rendimiento no presenta cambios importantes en estos periodos, afirmando una estabilidad en la fermentación antes y después de que ocurran variaciones en tiempo de

fermentación. Los periodos de tiempo que abarcan los entre los días 0-7, 1-7, 0-15 y 1-15 presentan una varianza significativa notable demostrando que en esos lapsos de tiempo los procesos de fermentación presentan cambios importantes en el rendimiento del concentrado proteico de las muestras. Esto ocurre por transformaciones bioquímicas y microbiológicas que afectan a la solubilidad y precipitación de las proteínas, Durante los días 0 y 7 de fermentación tanto la actividad microbiana como la enzimática es elevada conduciendo a una mayor degradación de las proteínas, a medida que avanza hacia el día 15 se alcanza nuevas fases de equilibrio y estabilidad de la matriz proteica.

3.1.3 Cuantificación de proteína método Dumas.

La cuantificación de proteína en las muestras de pan liofilizado del mejor proceso de aislamiento mostró los valores que se detallan en la tabla 5.

Tabla 5.

Porcentaje de proteína en las muestras de pan tipo tapada liofilizado elaborado con masa madre de diferentes tiempos de fermentación

Muestra	**% Proteína**	**Media**
Pan Liofilizado D15	12.876	12.885
Pan Liofilizado D 7	12.894	
Concentrado proteico D0	46.93	47.070
	47.21	
Concentrado proteico D1	49.34	48.635
	47.93	
Concentrado proteico D7	46.18	46.505
	46.83	
Concentrado proteico D15	46.43	46.290
	46.15	

Nota: El código ‘D’ hace referencia a los días de fermentación de la masa madre del pan, los valores son el promedio de dos repeticiones.

El contenido de proteína de pan puede variar según su composición, el tipo de harina utilizado y los métodos de procesamiento. Por lo general el contenido de proteína del pan de trigo suele ser de 8% al 15 % **(Tosi et al., 2011)**. En la tabla 7 se observa que el pan alcanza un porcentaje de proteína del 12% mientras que los aislados proteicos llegan a un promedio del 47%. El pan es un producto completo rico en macronutrientes por lo que minimiza la cantidad de proteínas detectables, mientras que el concentrado proteico está diseñado específicamente para maximizar el contenido de proteínas, eliminando componentes no proteicos como grasas y carbohidratos **(Andrade et al., 2019)**. El concentrado proteico del gluten crudo puede llevar a concentraciones de hasta el 80% en proteínas **(Shewry et al., 2003)**, el análisis se lleva a cabo con una muestra sometida previamente a temperaturas de horneo afectando al contenido final de proteína. Según **Ibrahim et al. (2022)** las proteína son sensibles cuando se exponen a altas temperaturas cambian su estructura tridimensional o netamente se desnaturalizan afectando la calidad del producto final, este efecto se ve evidenciado en el contenido de proteína de todas las muestras analizadas.

3.2 Digestión de proteínas de extractos proteicos de pan liofilizado tipo tapado de distintos tiempos de fermentación.

Los aislados proteicos se sometieron a dos fases de digestión: primero una fase gástrica seguida de una digestión intestinal. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a una prueba de electroforesis. La Figura 2 muestra las proteínas presentes en el pan liofilizado previo a la simulación de digestión. La electroforesis SDS-PAGE permite la separación de las proteínas del gluten según su peso molecular, revelando patrones de bandas en el extracto proteico **(Manns, 2011)** del pan liofilizado de masa madre fermentada a 15 días antes de la simulación in vitro de digestión a pH 10 de solubilización y pH 5 de precipitación.

Las proteínas identificadas en el extracto proteico previo a la digestión. En La figura 2, según su peso, fueron la glutenina y la gliadina, las cuales son componentes fundamentales del gluten. **(Abedi & Pourmohammadi, 2021)**. El peso de la glutenina (LMW-GS) entra en el rango de 30 – 100 kD **(Muñoz et al., 2023)** y el peso de las Gliadinas están entre 28 – 88 kD **(Tosi et al., 2011).** La fermentación de masa madre del día 15 influye en la estructura del gluten. Durante este proceso, los microorganismos y las enzimas juegan un papel crucial en la formación y reducción de los enlaces disulfuro estas modificaciones afectan la cohesión del gluten, y a sus proteínas.**(Arora et al., 2021)**.

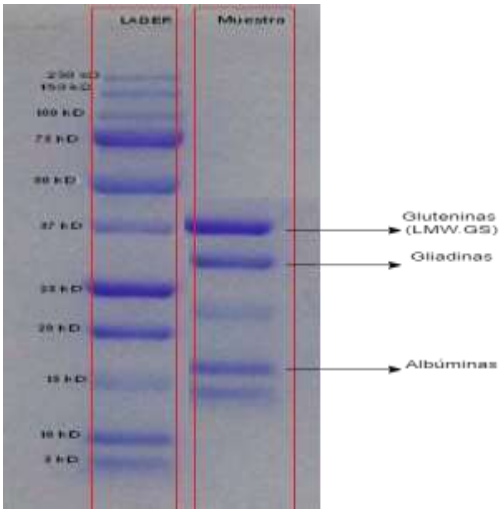


Figura 2. Electroforesis del aislado proteico del pan liofilizado tipo tapado (Dia 15, pH 10;5)

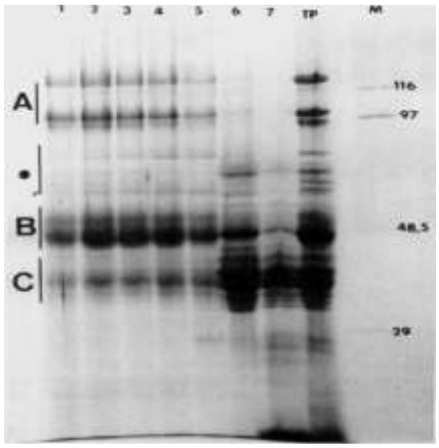


Figura 3. Electroforesis SDS PAGE gluten

Nota: (A) Glutenina HMW. (B) Glutenina LMW. (C) Gliadina (Larroque et al., 1997).

En la figura 4 el carril 2 correspondiente al aislado proteico de pan con masa madre del día 0, presenta una leve coloración en el nivel de 100 kD, el cual corresponde a la glutenina de alto peso molecular, proteína característica del gluten y difícil de digerir. El aislado proteico de pan con masa madre del día 15 presente en el carril 9 no presenta coloración alguna indicando la efectividad de la digestión de proteínas sobre fermentación de la masa madre.

Las proteínas de 33 kD pertenecientes al grupo de gluteninas o gliadinas presentes en la figura 4 son resistentes tanto a la digestión gástrica como a la digestión intestinal hasta el día 7 de fermentación de

la masa madre, siendo difíciles de descomponer por las enzimas digestivas. Cuando se someten a condiciones ácidas en el estómago, las gluteninas pueden mantener su estructura completa y compacta, mientras que la pepsina y otras enzimas empiezan a descomponer el resto de las proteínas. **(Shewry & Lafiandra, 2022)**. Las gliadinas están en el grupo de las prolaminas cuyo aminoácido importante es la prolina este aminoácido contribuye a la dificultad de digestión de las gliadinas porque son difíciles de romper por las enzimas estomacales **(Sharif et al., 2019)**.

El comportamiento de las proteínas analizadas está siendo influencias por el tiempo de fermentación de la masa madre. A medida que la fermentación avanza los microorganismos modifican las estructuras de las proteínas afectando su solubilidad y resistencia al someterse a enzimas digestivas.

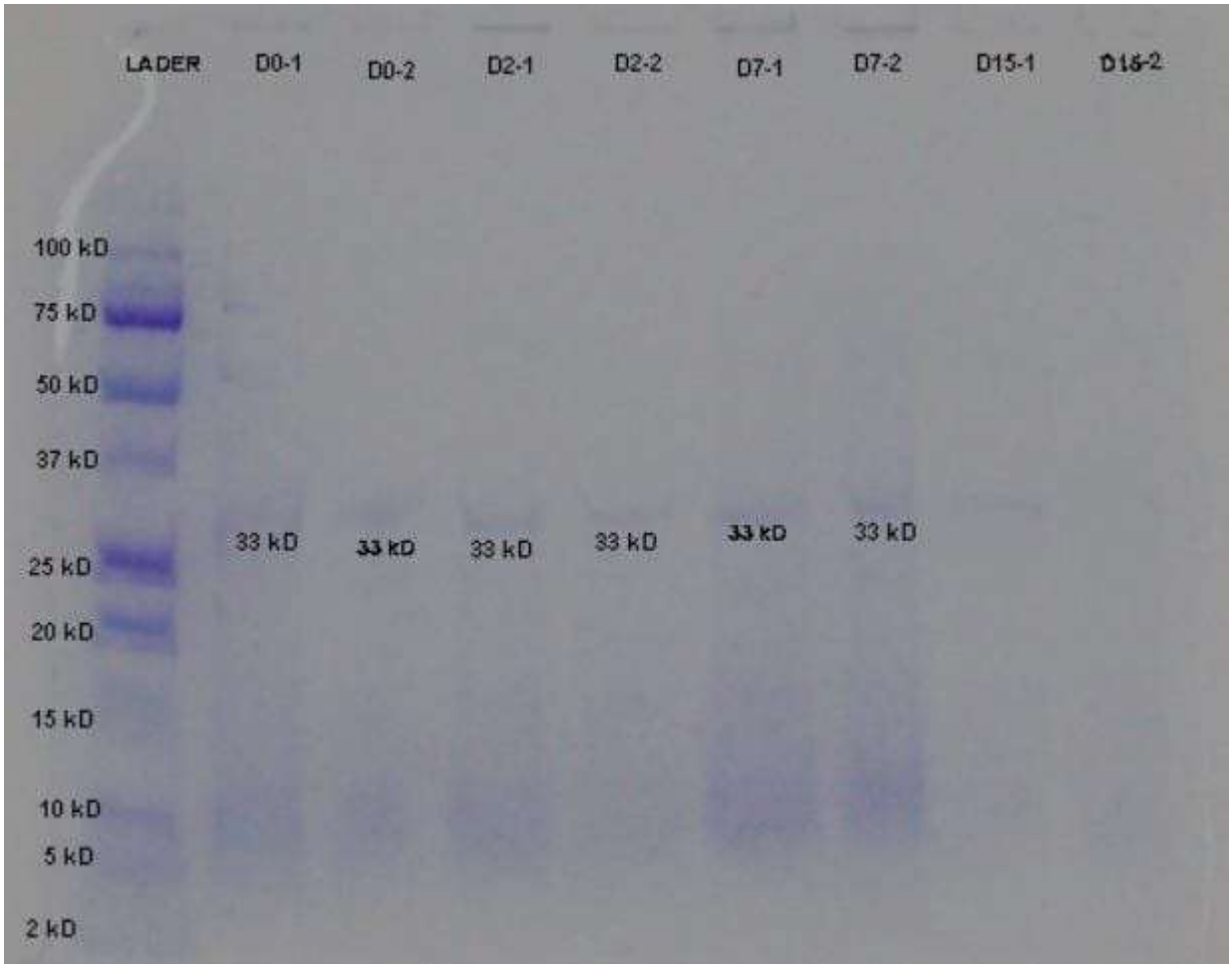


Figura 4. Electroforesis SDS PAGE y B -Mercaptoetanol digestión gástrica e intestinal.

Nota: Carril 2: Extracto proteico pan liofilizado de masa madre día 0 digestión gástrica. Carril 3: Extractos proteicos de pan liofilizado de masa madre día 0 digestión intestinal. Carril 4: Extracto

proteico de pan liofilizado de masa madre día 1 digestión gástrica. Carril 5: Extractos proteicos de pan liofilizado de masa madre día 1 digestión intestinal. Carril 6: Extractos proteicos de pan liofilizado de masa madre día 7 digestión gástrica. Carril 7: Extractos proteicos de pan liofilizado de masa madre día 7 digestión intestinal. Carril 8: Extractos proteicos de pan liofilizado de masa madre día 15 digestión gástrica. Carril 9: Extractos proteicos de pan liofilizado de masa madre día 15 digestión intestinal.

3.3 Determinación de aminoácidos

En la determinación de los aminoácidos se tomó en cuenta los concentrados proteicos de pan de masa madre de 7 días obtenidos con los pH de mejor rendimiento y el concentrado proteico que presenta mejor digestibilidad, en este caso es el pan de masa madre de 15 días con las mismas condiciones de la muestra de 7 días. La tabla 6 presenta la cantidad de aminoácidos medidos en µg/gramos de muestra. Mediante cromatografía liquida de alta resolución (HPLC) se obtuvieron los valores tanto de aminoácidos esenciales como no esenciales.

Tabla 6.

Contenido de aminoácidos de los concentrados proteicos del pan liofilizado de distintos tiempos de fermentación

Aminoácido	**Pan D7 µg aminoácido/mg de muestra**	**Pan D15 µg aminoácido/mg de muestra**
Aspartato	2.03	0.95
Acido Glutámico	19.93	4.5
Serina	0.34	0.15
Histidina	0.21	0.32
Glicina	5.32	2.31
Treonina	2.50	2.17
Arginina	0.40	0.19
Alanina	1.66	2.25
Tirosina	1.37	0.85
Valina	0.13	0.11

Metionina	0.32	0.28
Triptófano	0.30	0.09
Fenilalanina	2.51	1.05
Isoleucina	0.69	0.20
Leucina	2.89	2.64
Lisina	4.07	2.97
Prolina	4.34	10.33

Al comparar la tabla 6 perteneciente al contenido de aminoácidos de los extractos proteicos de pan liofilizado de masa madre de los días 7 y 15 con los resultados de **De Barber et al., (1989)** que se observan en la figura 5, se visualiza una variación en la concentración de casi todos los aminoácidos presentes las proteínas del gluten como el ácido glutámico, glutamina, prolina y acido aspártico, de este grupo destaca la prolina cuyo valor de concentración aumenta conforme avanza el tiempo de fermentación.

Free Amino Acid Content of Unfermented (UF) and Fermented (F) Wheat Bread Dough Samples

	Mean Content (mg/100 g of dough, db)				
Amino Acid	**UF ($n = 6$)**	**F2.5[a] ($n = 3$)**	**F6[a] ($n = 5$)**	**F12[a] ($n = 4$)**	**F24[a] ($n = 4$)**
Aspartic acid	12.15	1.50*[b]	1.39	1.31	0.73
Glutamic acid	8.98	3.61*	4.00	5.70*	6.07
Asparagine	8.21	0.64	0.50	0.67	0.58
Glutamine	4.72	3.52	0.64*	0.68	1.51
Serine	1.80	0.99*	0.60	0.58	0.53
Threonine	1.77	0.53*	tr	0.96*	0.78
Glycine	2.18	2.12	0.87*	1.14	1.25
Alanine	8.05	1.91*	2.05	8.30*	15.65*
γ-Aminobutyric acid	4.96	2.14*	0.30*	0.68	0.57
Arginine	4.26	5.71*	1.76*	2.55	2.28
Proline	2.27	2.35	3.18	5.04*	6.60*
Valine	3.35	1.02*	0.95	1.39	1.35
Methionine	0.91	0.57	0.53	0.73	0.59
Isoleucine	1.93	0.64*	0.74	0.88	0.60
Leucine	4.04	2.09*	1.89	2.38	1.69
Tryptophan	4.68	0.42*	tr	tr	0.16
Phenylalanine	3.33	1.68*	1.42	1.78	1.48
Cystine	tr	tr	tr	tr	tr
Ornithine	1.45	1.09	0.35*	0.22	0.86*
Lysine	3.73	2.83	1.29*	2.38*	3.15
Histidine	0.49	0.50	0.10*	0.21	0.35
Tyrosine	1.82	0.87*	0.53	1.00	0.88
TAA[c]	84.84	37.00*	23.37*	38.76*	47.95*

Figura 5. Contenido de aminoácidos en masa de pan sin fermentar y masa fermentada **(De Barber et al., 1989)**

El ácido glutámico pese a su pérdida de concentración en el día 15 de fermentación, es un indicador positivo de la degradación del gluten. Durante la digestión los microorganismos, al sintetizar el ácido glutámico lo convierten en otros compuestos como el ácido láctico el cual contribuye al sabor del pan de masa madre. El ácido glutámico posee una estructura abierta y lineal sus grupos carboxilos facilitan rutas metabólicas y químicas siendo más próximo a la acción de las enzimas **(Zareian et al., 2012).**

La pérdida de glutamina se explica porque su cadena lateral la pertenece al grupo amina, en condiciones de fermentación con actividades enzimáticas altas tiende a disminuir o transformase en otros compuestos aun así es uno de los aminoácidos con más influencia en el gluten porque gracias a u su grupo amina puede establecer puentes de hidrogeno que ayudan conformar la proteína glutenina y además le otorga propiedades elásticas. **(Qian et al., 2022)**.

La reducción de concentración del aspartato se origina por que participa en reacciones químicas con las enzimas durante la fermentación formando enlaces con otros compuestos, o la conversión en otros aminoácidos como la alanina gracias a los microorganismo **(Liu et al., 2022)**, explicándose así la acumulación de la concentración de la alanina en la tabla 6.

El aumento de prolina se debe a que es resistente a la degradación, la acción de bacterias acido lácticas que metabolizan los otros aminoácidos deja que se acumulen estos aminoácidos. La prolina se caracteriza por tener una estructura cíclica la misma que posee una rigidez que dificulta el acceso de enzimas a su enlace peptídico otorgándole una propiedad que inhibe la proteólisis, resiste ambientes con condiciones adversas **(Siddique et al., 2018)**.

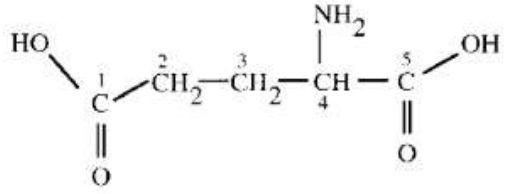


Figura 6. Molécula de Acido Glutámico **(Garattini, 2000)**

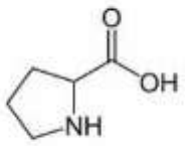


Figura 7. Molécula de prolina **(Liang et al., 2013)**

Capitulo IV Conclusiones y Recomendaciones

- La determinación de proteínas se ven influencias por su punto de solubilización y precipitación dando rendimientos variados según los ajustes de pH , las proteínas que mejor se acercaron al ajuste fueron los que se acercaron a pH de 8 a 4 y de 8.5 - 4 . En bibliografía se puede evidenciar que el rendimiento total de proteína de pan aborda desde 8% a 12%, en los fatos obtenidos se acercan en promedio de 7.6% a 8.1% de proteína estando muy cerca de lo establecido.

- La digestión de proteínas se llevó a cabo en dos fases una gástrica y una intestinal, las proteínas que resistieron a la digestión fueron las presentes en el gluten. En el análisis de electroforesis en el carril 2 perteneciente a la muestra de pan de masa madre sin fermentar se ve una leve coloración en la banda perteneciente a la glutenina de alto peso molecular demostrando su resistencia a la digestión gástrica, pero en la digestión intestinal a pesar de la descomposición del resto proteínas persiste la glutenina de bajo peso molecular. Los carriles de pan de masa madre fermentada al día 15 las proteínas están completamente digeridas por las enzimas estomacales.

- La determinación de aminoácidos del extracto proteico de mas digestibilidad presentan una variabilidad significativa, como el caso de la prolina por su estructura es resistente a las enzimas de los microorganismos siendo difícil de fragmentar en compuestos más simples. en consecuencia, presenta una acumulación de esta a lo largo de 15 días. En el caso del ácido glutámico es sintetizado por los microorganismos descomponiéndolos en otros compuestos como el ácido láctico por esta razón presenta una disminución significativa del mismo.

Materiales de referencia

Abedi, E., & Pourmohammadi, K. (2021). Chemical modifications and their effects on gluten protein: An extensive review. *Food Chemistry*, *343*, 128398. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128398

Andrade, J., Pereira, C. G., Almeida Junior, J. C. de, Viana, C. C. R., Neves, L. N. de O., Silva, P. H. F. da, Bell, M. J. V., & Anjos, V. de C. dos. (2019). FTIR-ATR determination of protein content to evaluate whey protein concentrate adulteration. *Lwt*, *99*, 166–172. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.079

Arora, K., Ameur, H., Polo, A., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., & Gobbetti, M. (2021). Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. *Trends in Food Science and Technology*, *108*, 71–83. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.008

Arranz-Otaegui, A., Carretero, L. G., Ramsey, M. N., Fuller, D. Q., & Richter, T. (2018). Archaeobotanical evidence reveals the origins of bread 14,400 years ago in northeastern Jordan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(31), 7925–7930. https://doi.org/10.1073/pnas.1801071115

Auld, D. . (2013). Carboxypeptidase A. In *Handbook of Proteolytic Enzymes* (bll 1289–1301). N.D. Rawlings y G. Salvesen (Eds.).

Barajas, E. M., Wong, B. R., Chávez, P. I. T., Machado, D. I. S., & Cervantes, J. L. (2011). Effects of protein, shortening and yeast content on doughs visco-elastic properties and quality of French type bread. *Interciencia*, *36*(4).

Brandt, M. J. (2019). Industrial production of sourdoughs for the baking branch – An overview. *International Journal of Food Microbiology*, *302*(June), 3–7. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.008

Cardona, F. (2020). Proteínas y aminoácidos en alimentos. *Universidad de Cuenca*, 8. https://riunet.upv.es/handle/10251/147154#.YKU4KCbbeZM.mendeley

Castiblanco, E. (2019). *Recopilación de técnicas en panadería*. https://elibro-net.uta.lookproxy.com/es/ereader/uta/172441

Cauvain, S. P., & Clark, R. H. (2019). *Baking technology and nutrition: towards a healthier world*. John Wiley & Sons.

Chavan, R. S., & Chavan, S. R. (2011). Sourdough Technology-A Traditional Way for Wholesome

Foods: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *10*(3), 169–182. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00148.x

Corsetti, A. (2013). Technology of sourdough fermentation and sourdough applications. In M. Gobbetti & M. Gänzle (Reds), *Handbook on Sourdough Biotechnology* (bll 90–101). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5425-0

Day, L., Augustin, M. A., Batey, I. L., & Wrigley, C. W. (2020). Wheat-gluten uses and industry needs. *Trends in Food Science and Technology*, *121*(2), 82–90. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.003

De Barber, B., Prieto, J., & Collar, C. (1989). *Reversed - Phase High Performance Liquid Chromatography Analysis of Changes in Fre Aminoacids Durin Whear Dough Fermentation*. https://www.cerealsgrains.org/publications/cc/backissues/1989/Documents/66_283.pdf

De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H. M., & Weckx, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? *Food Microbiology*, *37*, 11–29. https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.002

Decock, P., & Cappelle, S. (2005). Bread technology and sourdough technology. *Trends in Food Science and Technology*, *16*(1–3), 113–120. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.04.012

Dżugan, M., Miłek, M., Sidor, E., Buczkowicz, J., Hęclik, J., & Bocian, A. (2023). The Application of SDS-PAGE Protein and HPTLC Amino Acid Profiling for Verification of Declared Variety and Geographical Origin of Honey. *Food Analytical Methods*, *16*(7), 1157–1171. https://doi.org/10.1007/s12161-023-02489-2

El Comercio. (2014, Julie 1). *El pan de Ambato conserva su sabor tradicional desde hace más de un siglo*. https://www.elcomercio.com/actualidad/ecuador/pan-ambato-conserva-sabor-tradicional.html

Espinosa, N. H., Romano, G. P., López, F. C., González Santoyo, H. I., Varela, A. S., Riquelme, I. B., & Peña Bautista, R. J. (2013). Contribución de combinaciones de gluteninas a las características del gluten en poblaciones recombinantes de trigo. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *36*(1), 45–51.

Fernández, E., & Galván, A. (2006). Métodos para la cuantificación de proteínas. *Departamento de Bioquímica*, 1–7. http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:M?todos+para+la+cuantificaci?n+de+prote?nas#1

Ferreyra, L. S., Verdini, R. A., Soazo, M., & Piccirilli, G. N. (2021). Impact of whey protein addition on wheat bread fermented with a spontaneous sourdough. *International Journal of Food Science and Technology*, *56*(9), 4738–4745. https://doi.org/10.1111/ijfs.15052

Garattini, S. (2000). Glutamic acid, twenty years later. *Journal of Nutrition*, *130*(4 SUPPL.), 901S-909S. https://doi.org/10.1093/jn/130.4.901s

Gilani, G. S., Cockell, K. A., & Sepehr, E. (2005). Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods. *Journal of AOAC International*, *88*(3), 967–987. https://doi.org/10.1093/jaoac/88.3.967

Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Polo, A., & Rizzello, C. G. (2020). The sourdough fermentation is the powerful process to exploit the potential of legumes, pseudo-cereals and milling by-products in baking industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(13), 2158–2173. https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1631753

Harguindeguy, M., & Fissore, D. (2020). On the effects of freeze-drying processes on the nutritional properties of foodstuff: A review. *Drying Technology*, *38*(7), 846–868. https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1599905

Harstad, R. K., Johnson, A. C., Weisenberger, M. M., & Bowser, M. T. (2016). Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, *88*(1), 299–319. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04125

Hayta, M., & Hendek Ertop, M. (2017). Optimisation of sourdough bread incorporation into wheat bread by response surface methodology: Bioactive and nutritional properties. *International Journal of Food Science and Technology*, *52*(8), 1828–1835. https://doi.org/10.1111/ijfs.13457

Hernández, N., Reyes, M., González, F., Nuñez, L., & Cooper, B. (2015). Importancia de las proteínas de almacenamiento en cereales (prolaminas). *Revista Especializada en Ciencias de la Salud* , *18*(1), 3–7. https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=60701

Hristova, S. H., & Zhivkov, A. M. (2019). Isoelectric point of free and adsorbed cytochrome c determined by various methods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *174*, 87–94. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.080

Huang, R., Pan, X., Lv, J., Zhong, W., Yan, F., Duan, F., & Jia, L. (2018). Effects of explosion puffing on the nutritional composition and digestibility of grains. *International Journal of Food Properties*, *21*(1), 2193–2204. https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1514634

Ibrahim, A., Bashir, M., Idi, A., & Buhari, H. H. (2022). Proximate Analysis, Sensory Evaluation and Production of Bread from Finger Millet and Wheat Flour. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, *14*(2), 101–107. https://doi.org/10.4314/bajopas.v14i2.12

Impa, S. M., Perumal, R., Bean, S. R., John Sunoj, V. S., & Jagadish, S. V. K. (2019). Water deficit and heat stress induced alterations in grain physico-chemical characteristics and micronutrient

composition in field grown grain sorghum. *Journal of Cereal Science*, *86*(November 2018), 124–131. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.01.013

James, C., Purnell, G., & James, S. (2015). A Review of Novel and Innovative Food Freezing Technologies. *Food and Bioprocess Technology*, *8*(8), 1616–1634. https://doi.org/10.1007/s11947-015-1542-8

Jung, S., Rickert, D. A., Deak, N. A., Aldin, E. D., Recknor, J., Johnson, L. A., & Murphy, P. A. (2003). Comparison of Kjeldahl and Dumas Methods for Determining Protein Contents of Soybean Products. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *80*(12), 1169–1173. https://doi.org/10.1007/s11746-003-0837-3

Kalidas, C. (2023). *Amino Acids. In: Biophysical Chemistry*. Springer, Cham. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-031-37682-5_5

Katsi, P., Kosma, I. S., Michailidou, S., Argiriou, A., Badeka, A. V, & Kontominas, M. G. (2021). Characterization of Artisanal Spontaneous Sourdough Wheat. *Foods*, *10*, 635.

Knežević, D., Mihajlović, D., & Kondić, D. (2013). Contents of Amino Acids in Grains of Different Bread Wheat Genotypes. *Агрознање*, *14*(3), 431. https://doi.org/10.7251/agren1303431k

Kobayashi, K. (2023a). Glutamine. In *Encyclopedia of Astrobiology*. Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-662-65093-6_655

Kobayashi, K. (2023b). Proline. In *: Encyclopedia of Astrobiology*. Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-662-65093-6_1282

Laemmli, U. K. (1970). Cleave of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bateriophage T4. *Nature Publishing Group*, *227*, 680–658. https://doi.org/https://doi.org/10.1038/227680a0

Lahue, C., Madden, A. A., Dunn, R. R., & Smukowski Heil, C. (2020). History and Domestication of Saccharomyces cerevisiae in Bread Baking. *Frontiers in Genetics*, *11*(November). https://doi.org/10.3389/fgene.2020.584718

Larroque, O. R., Gianibelli, M. C., Batey, I. L., & MacRitchie, F. (1997). Electrophoretic characterisation of fractions collected from gluten protein extracts subjected to size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Electrophoresis*, *18*(7), 1064–1067. https://doi.org/10.1002/elps.1150180706

Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S. K., & Becker, D. F. (2013). Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants and Redox Signaling*, *19*(9), 998–1011. https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074

Liu, P., Xu, H., & Zhang, X. (2022). Metabolic engineering of microorganisms for L-Alanine production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *49*(2).

https://doi.org/10.1093/jimb/kuab057

Manns, J. M. (2011). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of proteins. *Current Protocols in Microbiology*, *SUPPL. 22*, 1–13. https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03ms22

Martínez, E., & Añón, C. (1996). Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study. *Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 2523–2530. https://doi.org/doi: 10.1021/jf960169p

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., MacIerzanka, A., MacKie, A., … Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, *5*(6), 1113–1124. https://doi.org/10.1039/c3fo60702j

Muñoz, J. J. C., Guzmán García, C., Pinzón Martínez, D. L., Gutiérrez Ibáñez, A. T., Rajaram, S., Solís Méndez, A. D., & Mariezcurrena Berasain, M. D. (2023). Identificación de alelos de gluteninas y gliadinas en harinas de trigo entero (Triticum aestivum L.) y su relación con la calidad panadera. *Revista de la Facultad de Agronomía*, *121*(2), 118. https://doi.org/10.24215/16699513e118

Nionelli, L., & Rizzello, C. G. (2016). Sourdough-based biotechnologies for the production of gluten-free foods. *Foods*, *5*(3), 1–14. https://doi.org/10.3390/foods5030065

Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Georgalaki, M., Alexandraki, V., Kazou, M., Anastasiou, R., & Tsakalidou, E. (2019). Sourdough Bread. In *Innovations in Traditional Foods*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814887-7.00006-X

Picariello, G., Miralles, B., Mamone, G., Sánchez-Rivera, L., Recio, I., Addeo, F., & Ferranti, P. (2015). Role of intestinal brush border peptidases in the simulated digestion of milk proteins. *Molecular Nutrition and Food Research*, *59*(5), 948–956. https://doi.org/10.1002/mnfr.201400856

Qian, X., Gu, Y., Sun, B., Ma, S., Tian, X., & Wang, X. (2022). Improvement in quality of fast-frozen steamed bread by different gluten content and glutenin/gliadin ratio and its mechanism. *Lwt*, *153*, 112562. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112562

Rajauria, G. (2018). Optimization and validation of reverse phase HPLC method for qualitative and quantitative assessment of polyphenols in seaweed. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *148*, 230–237. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.10.002

Ripari, V., Gänzle, M. G., & Berardi, E. (2016). Evolution of sourdough microbiota in spontaneous sourdoughs started with different plant materials. *International Journal of Food Microbiology*,

232, 35–42. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.025

Ritgen, U. (2023). Electrophoresis. In: Analytical Chemistry I. In *Analytical Chemistry I*. Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-662-66336-3_15

Sharif, N., Golmakani, M. T., Niakousari, M., Ghorani, B., & Lopez-Rubio, A. (2019). Food-grade gliadin microstructures obtained by electrohydrodynamic processing. *Food Research International*, *116*, 1366–1373. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.027

Shewry, P. R., Halford, N. G., & Lafiandra, D. (2003). Genetics of Wheat Gluten Proteins. *Advances in Genetics*, *49*, 111–184. https://doi.org/10.1016/S0065-2660(03)01003-4

Shewry, P. R., & Lafiandra, D. (2022). Wheat glutenin polymers 1. structure, assembly and properties. *Journal of Cereal Science*, *106*, 103486. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2022.103486

Siddique, A., Kandpal, G., & Kumar, P. (2018). Proline accumulation and its defensive role under diverse stress condition in plants: An overview. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, *12*(3), 1655–1659. https://doi.org/10.22207/JPAM.12.3.73

Siepmann, F. B., Ripari, V., Waszczynskyj, N., & Spier, M. R. (2018). Overview of Sourdough Technology: from Production to Marketing. *Food and Bioprocess Technology*, *11*(2), 242–270. https://doi.org/10.1007/s11947-017-1968-2

Sifre, M. D., Peraire, M., Simó, D., Segura, A., Simó, P., & Tosca, P. (2018). *La harina*. 25. https://bibliotecavirtualsenior.es/wp-content/uploads/2019/06/LA-HARINA.pdf

Tosi, P., Gritsch, C. S., He, J., & Shewry, P. R. (2011). Distribution of gluten proteins in bread wheat (Triticum aestivum) grain. *Annals of Botany*, *108*(1), 23–35. https://doi.org/10.1093/aob/mcr098

Vázquez, P., Mojica, L., & Morales, N. (2022). Protein Ingredients in Bread: Technological, Textural and Health Implications. *Foods*, *11*(16). https://doi.org/10.3390/foods11162399

Verdú, S., Vásquez, F., Islas, A., Barat, J., & Grau, R. (2016). Efecto de la sustitucion de harina de trigo con harina de quinoa (chenopodium quinoa) sobre las propiedades reologicas de la masa y texturales del pan. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, *12*(2), 307–317. http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81349041018

Walker, J. M., Ditor, S. E. E., Protocols, P. P., & Hill, A. F. (2008). 2D PAGE Sample Preparation and Fractionation BIOLOGY TM. In *Sample Preparation and Fractionation BIOLOGY TM* (1st ed). Humana Totowa, NJ. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-60327-064-9

Wu, T., Taylor, C., Nebl, T., Ng, K., & Bennett, L. E. (2017). Effects of chemical composition and baking on in vitro digestibility of proteins in breads made from selected gluten-containing and gluten-free flours. *Food Chemistry*, *233*, 514–524.

https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.158

Zareian, M., Ebrahimpour, A., Bakar, F. A., Mohamed, A. K. S., Forghani, B., Ab-Kadir, M. S. B., & Saari, N. (2012). A glutamic acid-producing lactic acid bacteria isolated from malaysian fermented foods. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(5), 5482–5497. https://doi.org/10.3390/ijms13055482

Anexos

Anexo 1. Preparación del tampón de corrida

	Buffer native (g)	**Buffer running (g)**
Tris-HCl	**1,5**	**5**
Glicina	**7,5**	**7,5**
SDS	**-**	**0,5**

Fuente: (Laemmli, 1970)

Anexo 2. Formulación para la preparación del gel separador o gel inferior a una concentración de 16%

Gel separador al 16%	
Agua destilada	1,2 mL
Tris-HCl a pH 8,8	1,3 mL
Acrilamida	2,7 mL
Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%	75 mL
Tetramethyletiendiamina (TEMED)	10 mL
Persulfato de amonio (PSA) al 10%	20 mL

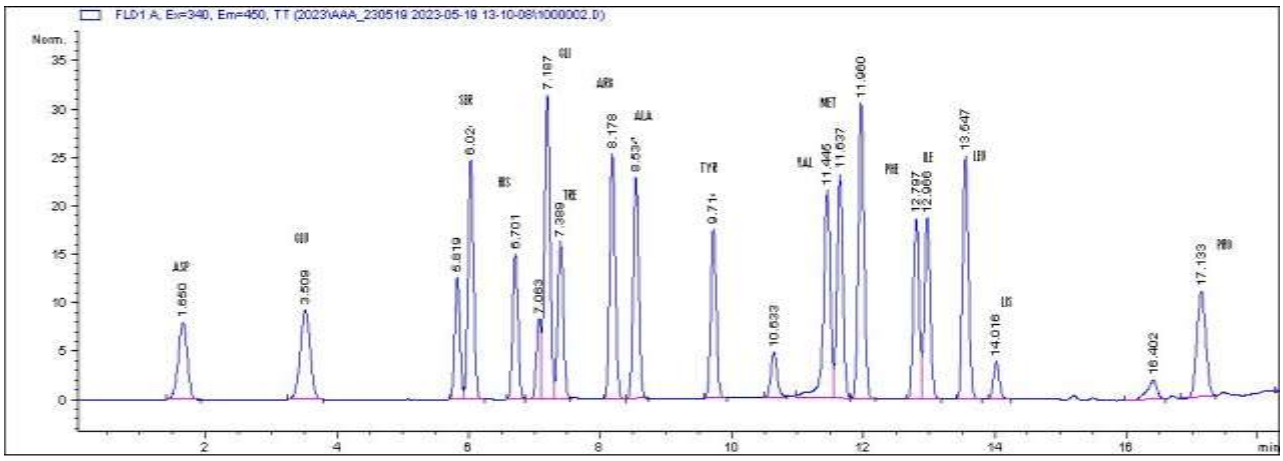
Fuente: (Laemmli, 1970)

Anexo 3. Formulación para la preparación del gel compactador o gel superior a una concentración de 4%

Gel compactador al 4%	
Agua destilada	2,2 mL
Tris-HCl a pH 6,8	0,42 mL
Acrilamida	0,7 mL
Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%	3,3 µL
Tetramethyletiendiamina (TEMED)	6 µL
Persulfato de amonio (PSA) al 10%	20 µL

Fuente: (Laemmli, 1970)

Anexo 4. Picos cromatográficos de aminoácidos



Anexo 5. Reporte de análisis de aminoácidos por cromatografía liquida de alta resolución

UCUENCA

DEPARTAMENTO DE BIOCIENCIAS
LABORATORIO DE ALIMENTOS

REPORTE DE ANÁLISIS

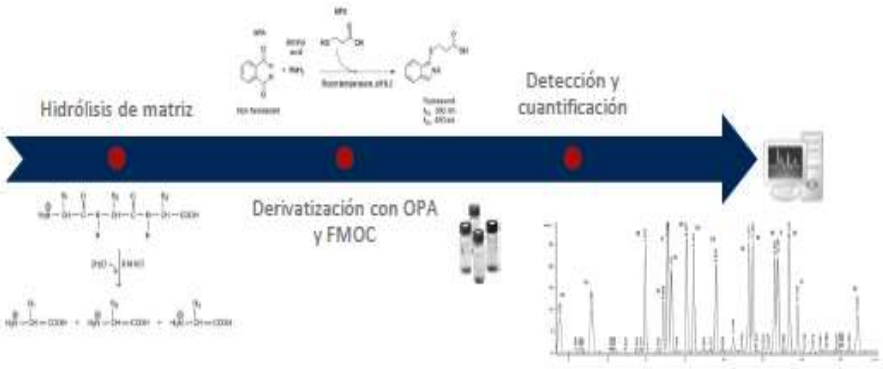
ANÁLISIS PERFIL DE AMINOÁCIDOS (AAA)

FECHA DE ANÁLISIS: MAYO-JUNIO 2024

ORDEN: 2024-LABALIM-002

METODOLOG: Cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FLD)

DESCRIPCIÓN: El análisis de perfil de aminoácidos (AAA) se refiere a la determinación de la composición de aminoácidos en una matriz proteica. Se deben tener en cuenta tres pasos generales para el AAA: 1) La hidrólisis de la muestra de proteína para liberar los aminoácidos; 2) La conversión de los aminoácidos en derivados con OPA y FMOC para ser detectados por fluorescencia; y 3) La separación de los aminoácidos derivatizados mediante procedimientos cromatográficos, seguida de su detección y cuantificación.



PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS Y DE VALIDACIÓN

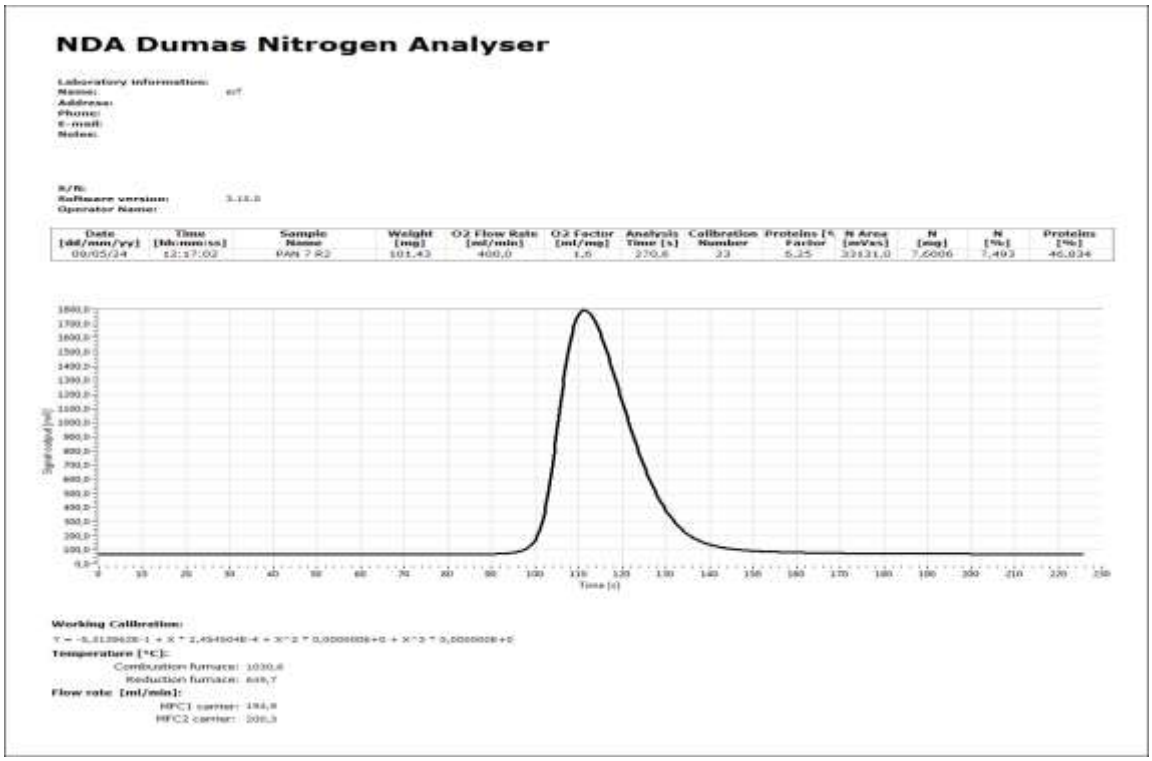
Vol. de inyección	20 µl	Flujo	2 ml/min
Columna	Zorbax C18 (4,6 x 250 mm x 5 µm) a 40°C	Gradiente	B 0% 1.9 min, B de 0 a 57% hasta 18.1 min, B 100% 18.6 min, hasta los 22.3 min y finalmente se regresó a condiciones iniciales (A 100%) hasta los 25 min.
Fase móvil A	Na2HPO4 40 mM (pH 7,8)		
Fase móvil B	MeOH/ACN/H2O 45:45:10 (v/v/v)		

Asp	y=	0,1985	x +	0,23	0,133
Glu	y=	0,2202	x +	0,20	0,147
Ser	y=	0,2875	x +	0,47	0,105
His	y=	0,2699	x +	0,11	0,155
Gly	y=	0,4236	x +	0,52	0,075
Thr	y=	0,2457	x +	0,01	0,119
Arg	y=	0,3161	x +	0,08	0,174
Ala	y=	0,2861	x +	0,27	0,089
Tyr	y=	0,2640	x +	0,05	0,181
Val	y=	0,4274	x +	-0,04	0,117
Met	y=	0,3379	x +	0,22	0,149
Trp	y=	0,4524	x +	0,29	0,204
Phe	y=	0,2912	x +	0,02	0,165
Ile	y=	0,3103	x +	0,01	0,131
Leu	y=	0,3132	x +	0,20	0,131
Lys	y=	0,0661	x +	-0,14	0,146
Pro	y=	0,3137	x +	0,22	0,115

MUESTRAS Varios: PROCESADOS DE ORIGEN ALIMENTARIO CON TRATAMIENTO PR **ORIGEN** No aplica

TRATAMIENTO PRE ANALÍTICO 1) Hidrólisis previa ácida + básica. 2) Reconstitución con agua destilada. 3) Neutralización a pH 6.5-7.2.

Anexo 6 Análisis de las muestras método Dumas

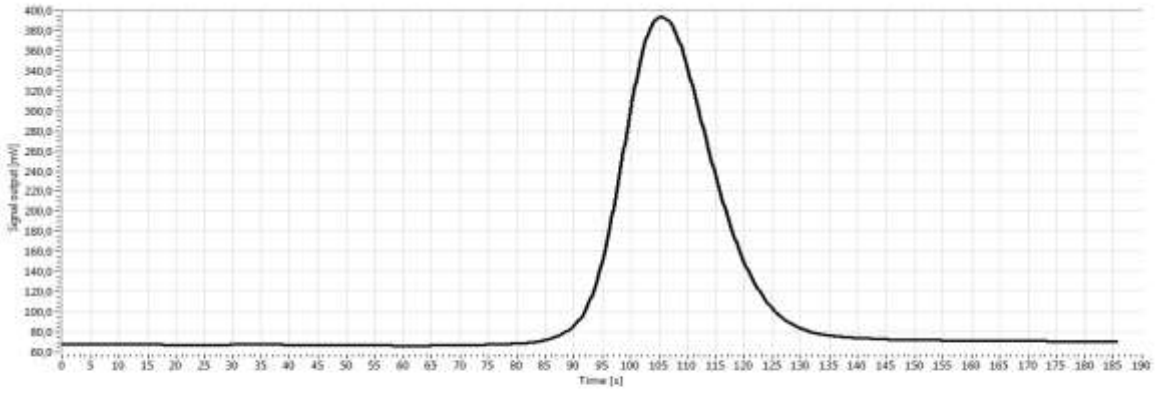


NDA Dumas Nitrogen Analyser

Laboratory information:
Name: erf
Address:
Phone:
E-mail:
Notes:

S/N:
Software version: 3.15.0
Operator Name:

Date [dd/mm/yy]	Time [hh:mm:ss]	Sample Name	Weight [mg]	O2 Flow Rate [ml/min]	O2 Factor [ml/mg]	Analysis Time [s]	Calibration Number	Proteins [% Factor	N Area [mVxs]	N [mg]	N [%]	Proteins [%]
09/05/24	12:59:27	Pan n2	51,28	400,0	1,6	230,6	23	6,25	6475,2	1,058	2,063	12,894



Working Calibration:
Y = -5,313862E-1 + X * 2,454504E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0
Temperature [°C]:
Combustion furnace: 1031,6
Reduction furnace: 650,2
Flow rate [ml/min]:
MFC1 carrier: 194,9
MFC2 carrier: 200,2

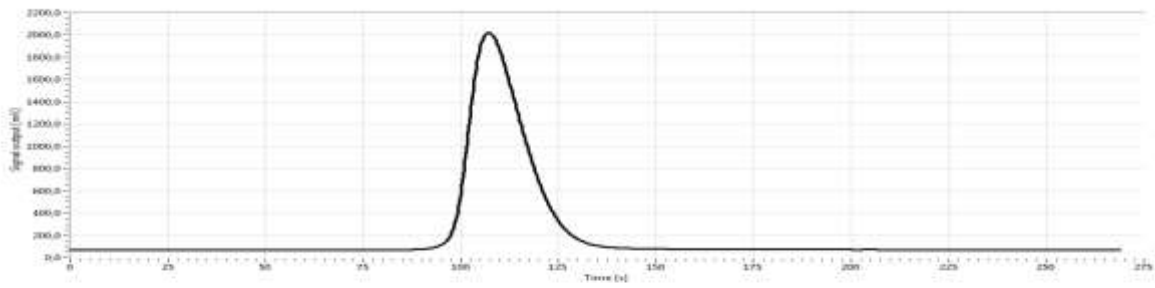
Note: Muestra perteneciente al pan de 15 días

NDA Dumas Nitrogen Analyser

Laboratory information:
Name: erf
Address:
Phone:
E-mail:
Notes:

S/N:
Software version: 3.15.0
Operator Name:

Date [dd/mm/yy]	Time [hh:mm:ss]	Sample Name	Weight [mg]	O2 Flow Rate [ml/min]	O2 Factor [ml/mg]	Analysis Time [s]	Calibration Number	Proteins [% Factor	N Area [mVxs]	N [mg]	N [%]	Proteins [%]
09/05/24	12:28:27	PAN 15 R2	100,58	400,0	1,6	313,8	23	6,25	32431,3	7,4289	7,385	46,158



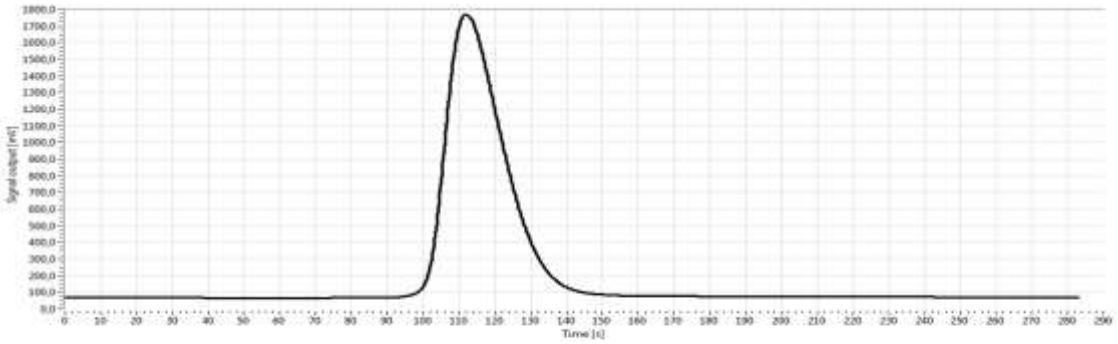
Working Calibration:
Y = -5,313862E-1 + X * 2,454504E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0
Temperature [°C]:
Combustion furnace: 1028,5
Reduction furnace: 649,9
Flow rate [ml/min]:
MFC1 carrier: 194,9
MFC2 carrier: 200,2

NDA Dumas Nitrogen Analyser

Laboratory information:
Name:
Address:
Phone:
E-mail:
Notes:

S/N:
Software version: 3.15.0
Operator Name:

Date [dd/mm/yy]	Time [hh:mm:ss]	Sample Name	Weight [mg]	O2 Flow Rate [ml/min]	O2 Factor [ml/mg]	Analysis Time [s]	Calibration Number	Proteins [% Factor	N Area [mVxs]	N [mg]	N [%]	Proteins [%]
09/05/24	12:09:37	PAN 7 R1	100,03	400,0	1,6	320,0	23	6,25	32277,3	7,3911	7,389	46,181



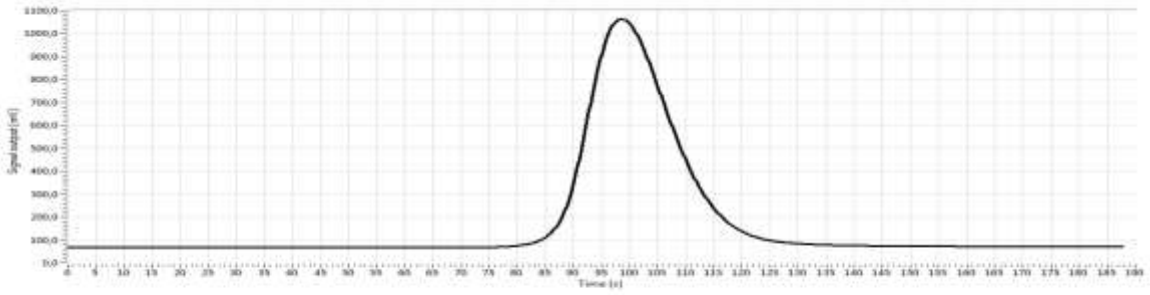
Working Calibration:
Y = -5,313862E-1 + X * 2,454504E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0
Temperature [°C]:
Combustion furnace: 1030,3
Reduction furnace: 650,4
Flow rate [ml/min]:
MFC1 carrier: 194,9
MFC2 carrier: 200,2

NDA Dumas Nitrogen Analyser

Laboratory information:
Name:
Address:
Phone:
E-mail:
Notes:

S/N:
Software version: 3.15.0
Operator Name:

Date (dd/mm/yy)	Time (hh:mm:ss)	Sample Name	Weight (mg)	O2 Flow Rate (ml/min)	O2 Factor (ml/mg)	Analysis Time (s)	Calibration Number	Proteins [% Factor	N Area (mVxs)	N (mg)	N (%)	Proteins (%)
09/05/24	12:30:53	PAN 1 R2	50,49	400,0	1,6	232,8	23	6,25	17941,6	3,8724	7,67	47,935



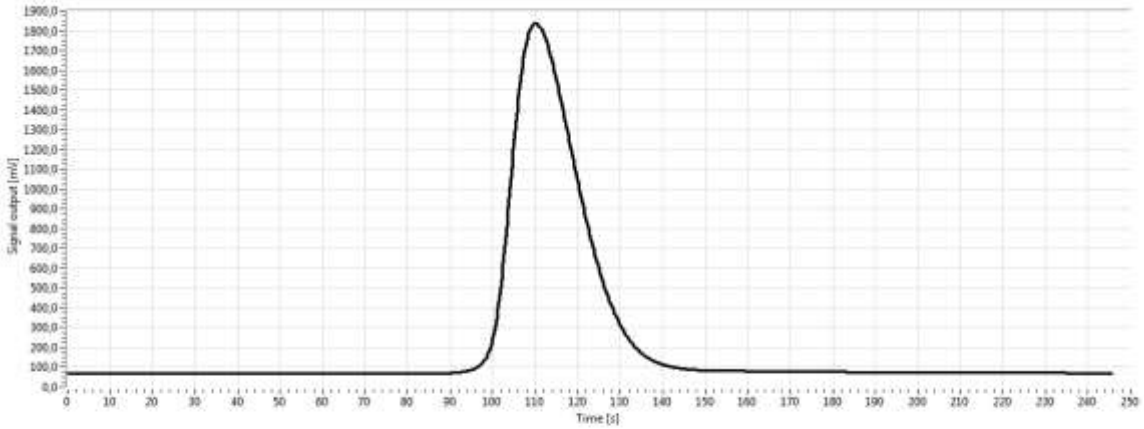
Working Calibration:
Y = -5,313862E-1 + X * 2,454504E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0
Temperature [°C]:
Combustion furnace: 1025,4
Reduction furnace: 649,9
Flow rate [ml/min]:
MFC1 carrier: 194,9
MFC2 carrier: 200,2

NDA Dumas Nitrogen Analyser

Laboratory information:
Name: arf
Address:
Phone:
E-mail:
Notes:

S/N:
Software version: 3.15.0
Operator Name:

Date [dd/mm/yy]	Time [hh:mm:ss]	Sample Name	Weight [mg]	O2 Flow Rate [ml/min]	O2 Factor [ml/mg]	Analysis Time [s]	Calibration Number	Proteins [% Factor	N Area [mVxs]	N [mg]	N [%]	Proteins [%]
09/05/24	12:41:00	PAN 0 R2	100,34	400,0	1,6	290,6	23	6,25	32860,3	7,5342	7,509	46,929



Working Calibration:

Y = -5,313862E-1 + X * 2,454504E-4 + X^2 * 0,000000E+0 + X^3 * 0,000000E+0

Temperature [°C]:

Combustion furnace: 1029,2
Reduction furnace: 649,3

Flow rate [ml/min]:

MFC1 carrier: 194,9
MFC2 carrier: 200,2

Anexo 7 Actividades.

<table>
<tr><td colspan="4">Obtencion de los aislados proteicos</td></tr>
<tr><td>  </td><td>  </td><td>  </td><td>  </td></tr>
<tr><td colspan="4">Digestión de proteinas</td></tr>
<tr><td>  </td><td>  </td><td>  </td><td>  </td></tr>
<tr><td>  </td><td>  </td><td>  </td><td></td></tr>
<tr><td colspan="4">Preparación de las muestras previo al analisis por HPLC</td></tr>
<tr><td>  </td><td>  </td><td>  </td><td>  </td></tr>
</table>

