

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Tema: “Obtención de aminoácidos libres a partir de quinua orgánica (*Chenopodium quinoa*) por hidrólisis y su aplicación en un suplemento alimenticio.”

Trabajo de Investigación, previo a la obtención del Grado Académico de
Magíster en Tecnología de Alimentos

Autora: Ingeniera Alexandra Cristina Almeida Castro

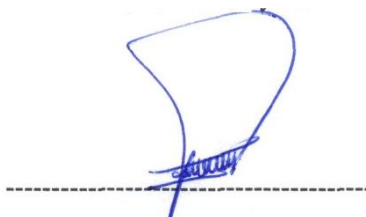
Director: Ingeniero Orestes Darío López Hernández, Doctor

Ambato- Ecuador

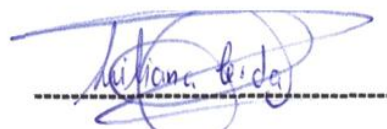
Junio 2018

A la Unidad Académica de Titulación de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

El Tribunal receptor del Trabajo de Investigación presidido por la Doctora Jacqueline de las Mercedes Ortiz Escobar, e integrado por la señorita Ingeniera Liliana Alexandra Cerda Mejía Doctora y el señor Químico William Ricardo Calero Cáceres Doctor, designados por la Unidad Académica de Titulación de Posgrado de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato, para receptor el Trabajo de Investigación con el tema: “Obtención de aminoácidos libres a partir de quinua orgánica (*Chenopodium quinoa*) por hidrólisis y su aplicación en un suplemento alimenticio.”, elaborado y presentado por la señora Ingeniera Alexandra Cristina Almeida Castro, para optar por el Grado Académico de Magíster en Tecnología de Alimentos, una vez escuchada la defensa oral del Trabajo de Investigación el Tribunal aprueba y remite el trabajo para uso y custodia en las bibliotecas de la UTA.



Dra. Jacqueline de las Mercedes Ortiz Escobar
Presidenta del Tribunal



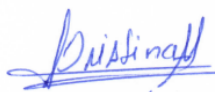
Ing. Liliana Alexandra Cerda Mejía, Dra.
Miembro del Tribunal



Quím. William Ricardo Calero Cáceres, Dr.
Miembro del Tribunal

AUTORÍA DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La responsabilidad de las opiniones, comentarios y críticas emitidas en el Trabajo de Investigación presentado con el tema: **“Obtención de aminoácidos libres a partir de quinua orgánica (*Chenopodium quinoa*) por hidrólisis y su aplicación en un suplemento alimenticio.”**, le corresponde exclusivamente a: Ingeniera Alexandra Cristina Almeida Castro, Autora bajo la dirección del Ingeniero Orestes Darío López Hernández, Doctor, Director del Trabajo de Investigación; y el patrimonio intelectual a la Universidad Técnica de Ambato.



Ingeniera Alexandra Cristina Almeida Castro

C.C. 171410944-2

AUTORA



Ingeniero Orestes Darío López Hernández, Doctor

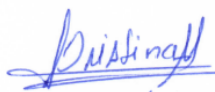
C.C. 175478486-4

DIRECTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que el Trabajo de Investigación, sirva como un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos de mi trabajo, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad.



Ingeniera Alexandra Cristina Almeida Castro

C.C. 171410944-2

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

Portada	ii
A la Unidad Académica de Titulación	ii
Autoría del Trabajo de Investigación	iii
Derechos de Autor	iv
Índice General de Contenidos	v
Índice de Tablas y Figuras.....	ix
Índice de Anexos	xi
Agradecimiento	xii
Dedicatoria.....	xiii
Resumen Ejecutivo	xiv
Executive Summary.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	2
EL PROBLEMA	2
1.1 Tema	2
1.2 Planteamiento del problema	2
1.2.1 Contextualización	3
Contextualización Macro.....	3
Contextualización Meso	3
Contextualización Micro	4
1.2.2 Análisis crítico	4
1.2.3 Prognosis	5
1.2.4 Formulación del Problema.....	5
1.2.5 Interrogantes	5
1.2.6 Delimitación del objeto de investigación	6
1.3 Justificación.....	6
1.4 Objetivos.....	8
1.4.1 General.....	8

1.4.2 Específicos.....	8
CAPÍTULO II.....	9
MARCO TEÓRICO	9
2.1 Antecedentes investigativos (estado del arte).....	9
2.2 Fundamentación filosófica	10
2.3 Fundamentación legal.....	11
2.4. Categorías fundamentales.....	11
2.4.1 Marco conceptual de las variables independientes.....	12
2.4.2 Marco conceptual de las variables dependientes.....	20
2.5. Hipótesis.....	24
2.5.1 Rendimiento de la extracción de aminoácidos libres a partir de quinua orgánica – Hidrólisis enzimática:.....	24
2.5.2 Rendimiento de la extracción de aminoácidos libres a partir de quinua orgánica – Hidrólisis ácida:.....	24
2.6 Señalamiento de las variables de la hipótesis.....	24
2.6.1 Variable independiente.....	24
2.6.2 Variable dependiente.....	24
CAPÍTULO III	25
METODOLOGÍA.....	25
3.1 Modalidad básica de la investigación.....	25
3.2 Nivel o tipo de investigación.....	25
3.3 Población y muestra	26
3.3.1 Diseño experimental.....	26
3.3.2 Respuestas experimentales.....	26
3.4 Operacionalización de variables.....	27
3.5 Plan de recolección de información.....	28
3.5.1 Metodología.....	28
3.5.1.1 Desengrasado de la harina de quinua.....	28
3.5.1.2 Aislado proteico de quinua.....	29
3.5.1.3 Hidrólisis enzimática.....	29
3.5.1.4 Hidrólisis ácida.....	30
3.5.1.5 Grado de hidrólisis.....	31
3.5.1.6 Obtención de aminoácidos.....	31

3.5.1.7 Elaboración de la cápsula dura	32
3.5.2 Materiales y equipos	32
3.5.3 Número de tratamientos.....	34
3.5.3.1 Hidrólisis enzimática	34
3.5.3.2 Hidrólisis ácida	34
3.5.4 Número de muestras	35
3.6 Plan de procesamiento de la información.....	35
CAPÍTULO IV	36
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	36
4.1 Análisis e interpretación de los resultados	36
4.1.1 Granulometría y desengrasado de la harina de quinua	36
4.1.2 Aislado proteico.....	37
4.1.3 Hidrólisis enzimática y Grado de Hidrólisis	38
4.1.4 Hidrólisis ácida	45
4.1.5 Obtención del hidrolizado de proteína de quinua.....	49
4.1.6 Elaboración de las cápsulas duras	53
4.1.6.1 Formulación de la cápsula dura	54
4.2 VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS.....	55
4.2.1 Rendimiento de la extracción de aminoácidos libres a partir de quinua orgánica – Hidrólisis enzimática:	55
4.2.2 Rendimiento de la extracción de aminoácidos libres a partir de quinua orgánica – Hidrólisis ácida:	55
CAPÍTULO V	56
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	56
5.1 CONCLUSIONES.....	56
5.2 RECOMENDACIONES	57
CAPÍTULO VI.....	58
PROPUESTA	58
6.1 DATOS INFORMATIVOS.....	58
6.1.1 TEMA.....	58
6.1.2 INSTITUCIÓN EJECUTORA	58
6.1.3 BENEFICIARIOS	58
6.1.4 UBICACIÓN	58

6.1.5 TIEMPO ESTIMADO DE EJECUCIÓN	58
6.2 ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA	58
6.3 JUSTIFICACIÓN.....	59
6.4 OBJETIVOS.....	59
6.4.1 OBJETIVO GENERAL	59
6.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
6.5 ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD.....	60
6.6 FUNDAMENTACIÓN	60
6.7 METODOLOGÍA Y MODELO OPERATIVO	62
6.8 ADMINISTRACIÓN	64
6.9 PREVISION DE LA EVALUACIÓN	65
BIBLIOGRAFÍA	66
ANEXOS	71

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Contenido de macronutrientes en la quinua y otros cereales (g 100 g ⁻¹)	7
Tabla 2. Análisis proximal de la quinua (g 100 g ⁻¹)	12
Tabla 3. Perfil de aminoácidos (g 100 g ⁻¹ proteína)	13
Tabla 4. Proteínas (% en base .seca) antes y después del proceso de pelado, en quinua y arroz.	15
Tabla 5. Características de algunas proteasas comerciales.....	17
Tabla 6. Características de las especies producidas en la hidrólisis de proteínas	18
Tabla 7. Requerimientos nutricionales estimados por FAO /WHO para preescolares extrapolables a adultos.....	20
Tabla 8. Análisis descriptivo de cada aminoácido (g 100 g ⁻¹ proteína) según el genotipo de quinua.	21
Tabla 9. Operacionalización de la variable independiente	27
Tabla 10. Operacionalización de la variable dependiente	28
Tabla 11. Número de tratamientos en la Hidrólisis enzimática.....	34
Tabla 12. Número de tratamientos en la Hidrólisis ácida.....	34
Tabla 13. Análisis proximal harina de quinua % por cada 100 g.....	36
Tabla 14. Eficiencia en el proceso de desengrasado de la harina de quinua.	37
Tabla 15. Rendimiento en la obtención del aislado proteico de la harina de quinua.	38
Tabla 16. Perfil de aminoácidos del Hidrolizado de proteína de quinua Vs. Harina de quinua de origen argentino	52
Tabla 17. Índice de compresibilidad e índice de Hausner	53
Tabla 18. Índice de Carr e Índice de Hausner	53
Figura 1. Grado de hidrólisis enzimática con papaína.....	39
Figura 2. Grado de hidrólisis enzimática con proteasa de <i>Bacillus subtilis</i>	40
Figura3. Diagrama de Pareto y de superficie de respuesta para la hidrólisis enzimática con papaína.	42
Figura 4. Diagrama de Pareto y de superficie de respuesta para la hidrólisis enzimática con proteasa de <i>Bacillus subtilis</i>	44
Figura 5. Grado de hidrólisis ácida.....	46

Figura 6. Diagrama de Pareto y de superficie de respuesta para la hidrólisis con H ₂ SO ₄	48
Figura 7. Perfil de aminoácidos del Hidrolizado de quinua	51

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Determinación de nitrógeno amínico. Método Sörensen	71
ANEXO 2. Ficha Técnica de Ptroteasa Neutra	72
ANEXO 3. Pesos del aislado proteico de quinua	74
ANEXO 4. Cálculo de nitrógeno amínico.....	75
ANEXO 5. Grado de hidrólisis	76
ANEXO 6. Análisis estadístico de los proceso de hidrólisis enzimática y ácida.....	77
ANEXO 7. Perfil de aminoácidos en el hidrolizado de quinua.....	80
ANEXO 8. Miligramos de aminoácidos/g proteína de quinua hidrolizada.....	81
ANEXO 9. Memoria fotográfica del proceso de hidrólisis enzimática y ácida en harina de quinua orgánica	82

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios su infinito amor y misericordia porque en cada paso siento su presencia y fortaleza.

A la Universidad Técnica de Ambato y a la Universidad Nacional de Chimborazo por gentilmente facilitarme los laboratorios para la realización de la fase experimental.

A cada uno de los docentes que con generosidad compartieron sus conocimientos durante la maestría y a los compañeros con los cuales se ha formado un fuerte lazo de amistad.

Al Director del Trabajo de Investigación Dr. Orestes López por su guía permanente y a los miembros del jurado Dra. Liliana Cerda y Dr. William Calero por el tiempo empleado en la revisión de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi familia Alfonso, Diana y Paula por ser mis compañeros en este hermoso viaje llamado vida.

A mis padres y hermanas por su apoyo permanente.

“Lo realmente importante es luchar para vivir la vida, para sufrirla y para disfrutarla, perder con dignidad y atreverse de nuevo. La vida es maravillosa si no se la tiene miedo”

Charlie Chaplin

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

TEMA:

“Obtención de aminoácidos libres a partir de quinua orgánica (*Chenopodium quinoa*) por hidrólisis y su aplicación en un suplemento alimenticio.”

AUTORA: Ing. Alexandra Cristina Almeida Castro

DIRECTOR: Ing. Orestes Darío López Hernández, Dr.

FECHA: 10 de mayo del 2018

RESUMEN EJECUTIVO

El presente trabajo busca dar una alternativa para equilibrar la dieta, beneficiando a la salud, a través de la obtención de aminoácidos libres a partir de quinua orgánica (*Chenopodium quinoa*) por hidrólisis y su formulación en un suplemento alimenticio.

Se inició con el aislamiento de las proteínas de harina de quinua desengrasada, en el que se realizó una hidrólisis enzimática trabajando, con dos enzimas probadas independientemente, papaína y proteasa de *Bacillus subtilis*, esta última alcanzó el mejor grado de hidrólisis 41,8 % bajo condiciones de pH 6,5, 55 °C y 3 h; se continuó con una hidrólisis ácida, experimentando con dos concentraciones de H₂SO₄ 4 y 8 %, la optimización del proceso se alcanzó con una solución al 4 %, 110 °C y 8 horas de hidrólisis, se obtuvo un 61 % en el grado de hidrólisis que equivale a una relación ente nitrógeno amínico y nitrógeno total (AN/TN) de 0,6.

El hidrolizado de proteínas de quinua secado por aspersión se caracterizó a través de un análisis de cromatografía líquida (HPLC/FLD) permitiendo identificar 7 aminoácidos no esenciales y 8 aminoácidos esenciales, cuyos valores representativos estuvieron en la histidina con el 5,5 %, leucina 3 % y 2,8 % para treonina.

Se formuló cápsulas duras de 250 mg que contienen 125,52 mg de aminoácidos no esenciales, 121,98 mg de aminoácidos esenciales y 2,5 g de aerosil como deslizante, aportando un 39,47 % del requerimiento establecido por la FAO.

Descriptores: quinua, hidrólisis, grado de hidrólisis, enzimas, aminoácidos, formulación.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

THEME:

“Obtaining free amino acids from organic quinoa (*Chenopodium quinoa*) by hydrolysis and its application in a food supplement.”

AUTHOR: Ing. Alexandra Cristina Almeida Castro

DIRECTED BY: Ing. Orestes Darío López Hernández, Dr.

DATE: 10 de mayo del 2018

EXECUTIVE SUMMARY

The present work seeks to provide an alternative to balance the diet, benefiting health, through the obtaining of free amino acids from organic quinoa (*Chenopodium quinoa*) by hydrolysis and its formulation in a food supplement.

It began with the isolation of the proteins of degreased quinoa flour, in which an enzymatic hydrolysis was carried out working, with two independently tested enzymes, papain and *Bacillus subtilis* protease, the latter reached the best degree of hydrolysis 41,8 % under conditions of pH 6,5, 55 ° C and 3 h; continued with acid hydrolysis, experimenting with two concentrations of H₂SO₄ 4 and 8%, optimization of the process was achieved with a solution at 4 %, 110 °C and 8 hours of hydrolysis, 61 % was obtained in the degree of hydrolysis which equates to a ratio between amino nitrogen and total nitrogen (AN / TN) of 0.6.

The hydrolyzed protein of quinoa dried by spray was characterized through a liquid chromatography analysis (HPLC / FLD) allowing to identify 7 non-essential amino acids and 8 essential amino acids, whose representative values were in histidine with 5,5 %, leucine 3 % and 2,8 % for threonine.

250 mg hard capsules containing 125,52 mg of non-essential amino acids, 121,98 mg of essential amino acids and 2,5 g of aerosil as a sliding were formulated, providing 39,47 % of the requirement established by the FAO.

Keywords: quinoa, hydrolysis, degree of hydrolysis, enzymes, amino acids, formulation.

INTRODUCCIÓN

La salud y la alimentación siempre han mantenido una estrecha relación, los perfiles epidemiológicos que presenta la Organización Mundial de la Salud muestra que las causas de muerte por enfermedades no transmisibles y malnutrición proteíno-energética, son altas, por lo que se requiere identificar factores que influyen en dichas patologías y aportar con alternativas nutricionales.

El desarrollo de suplementos alimentarios con aminoácidos o péptidos puede ser favorable para coadyuvar al tratamiento de problemas de salud. Por su contenido de nitrógeno las proteínas son un importante elemento de la estructura y función de las células, por lo que cumplen funciones relevantes dentro del organismo.

La quinua tiene proteínas de alta calidad cuyos valores se encuentran entre 12 y 23 % además contiene minerales, fibra, vitaminas y sustancias antioxidantes (polifenoles); al relacionar los componentes nutricionales de la quinua con cereales de consumo masivo como el, maíz ,arroz y trigo, se puede observar que el promedio de proteína, grasa y ceniza que se obtienen en la quinua son superiores Abugoch et al (2013).

La función de la hidrólisis proteica, es la rotura del enlace peptídico lo que conlleva a la formación de péptidos de menor tamaño o inclusive de amino ácidos libres, a diferencia de las proteínas los péptidos y aminoácidos tienen mejor biodisponibilidad. En la actualidad los hidrolizados de proteínas tienen múltiples usos por ser una fuente importante de nitrógeno, aplicándose como ingrediente funcional o suplementos alimenticios, aportando así a una alimentación saludable.

El grado de hidrólisis del proceso va a estar influenciado por condiciones físico-químicas como el pH y la temperatura, concentración de sustrato, naturaleza del agente hidrolizante enzimas o ácidos y la naturaleza de la enzima usada no solo va a influir en el grado de hidrólisis sino también en el tipo de péptidos producidos Vioque et al (2001)

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema

Obtención de aminoácidos libres a partir de quinua orgánica (*Chenopodium quinoa*) por hidrólisis y su aplicación en un suplemento alimenticio.

1.2 Planteamiento del problema

Mantener un equilibrio óptimo de aminoácidos en la dieta es importante para la homeostasis de todo el cuerpo, además de su intervención como componentes básicos de las proteínas y los polipéptidos, algunos aminoácidos regulan las vías metabólicas clave que son necesarias para el mantenimiento, el crecimiento, la reproducción y la inmunidad. Wu, G. (2009). La suplementación dietética con uno o una mezcla de estos aminoácidos puede ser beneficiosa para la salud.

La quinua (*Chenopodium quinoa*) es un pseudocereal, altamente nutritivo con un alto contenido de proteínas y compuestos bioactivos superando en valor biológico a los cereales más usados. Bazile et al. (2014). La quinua es una potencial fuente de aminoácidos, ya que contiene 20 tipos de aminoácidos, entre los que se encuentran los aminoácidos esenciales como lisina, metionina, treonina presentes en la quinua en una cantidad mayor al compararlo con otro tipo de cereales, por esta razón la quinua posee propiedades funcionales importantes como: actividad inmunomoduladora, antioxidante, anticarcinogénica y antiinflamatoria, dichas actividades permiten disminuir riesgo de enfermedades crónicas. Gonzalez et al. (2012)

La FAO ha establecido el requerimiento nutricional de aminoácidos esenciales para niños preescolares el mismo que puede ser extrapolable a adultos, en el cual los aminoácidos esenciales más representativos son leucina con 66 mg/g de proteína, Fenilalanina/Tirosina 63 mg/g de proteína y lisina 58 mg/g de proteína. Augustin et al. (2006)

En la actualidad se utilizan ampliamente los hidrolizados de proteínas como fuente importante de nitrógeno, en dietas especiales o suplementos que permitan ser absorbidas en el intestino sin una previa digestión en el estómago. Camacho et al. (2000)

El presente trabajo buscó proporcionar una alternativa al requerimiento de aminoácidos establecido por la FAO, considerando que el hidrolizado de proteína de quinua contiene los aminoácidos esenciales que aportan a una mejor nutrición, además de ser rico en nitrógeno puede ser empleado en formulaciones de dietas enterales, dirigidas a la alimentación infantil y/o de adultos enfermos; permitiendo que pacientes con problemas de la mucosa, desórdenes estomacales o intestinales sean tratados. Camacho et al (2000)

1.2.1 Contextualización

Contextualización Macro

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014) publica anualmente las estadísticas sanitarias mundiales, siendo la fuente autorizada de información sobre la salud de la población mundial.

Las principales causas de muerte están relacionadas a problemas cardiovasculares, enfermedades diarreicas y en vigésimo puesto pero no menos importante está la malnutrición proteíno-energética, por lo que cada vez los gobiernos, las industrias y la población busca mejorar la nutrición y disminuir las enfermedades no trasmisibles.

Mantener una alimentación correcta y balanceada es la primera etapa en este proceso. OMS (2014)

Un suplemento que esté elaborado a partir de un hidrolizado de proteína de quinua sería de gran importancia, considerando su aporte nutricional por ser fuente de aminoácidos y su beneficio a la salud al permitir tener efectos biológicos específicos sobre el sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal y el sistema inmune, previniendo así con las enfermedades relacionadas a dichos sistemas. Augustin et al. (2006)

Contextualización Meso

Al analizar el perfil epidemiológico de América Latina y el Caribe presentado por la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL), se muestra que las primeras causas de muerte para la región se encuentran las enfermedades isquémicas del

corazón (10,9 % del total de defunciones), las enfermedades cerebro vasculares (8,2 %) y las condiciones perinatales y diabetes mellitus (5 % cada una), lo cual representa una clara idea de los desafíos, límites y acciones que se deben tener en cuenta para disminuir dichos porcentajes Di Cesare (2011).

En América Latina como en Ecuador, se mantienen porcentajes altos de muerte por enfermedades no transmisibles, las mismas que están relacionadas a desórdenes alimenticios, mala nutrición y escaso ejercicio.

Contextualización Micro

Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, en su Anuario de Estadísticas Vitales, Nacimientos y Defunciones, las primeras causas de muerte no difieren de las indicadas en el contexto meso y macro. Por lo que las acciones orientadas a la prevención y cura de las enfermedades no trasmisibles se deben enfocar en promover comportamientos adecuados en la alimentación INEC (2014).

La inversión en tecnologías y desarrollo de nuevos productos como los hidrolizados de proteínas de quinua, también debe ser considerada, ya que podría poner al alcance de la mayoría de la población alimentos y suplementos seguros que a más de ser nutritivos pasan a tener una característica funcional.

En el Ecuador la quinua tiene una superficie de producción de 50000 ha, conjuntamente con Perú y Bolivia son los mayores productores, por lo que es importante realizar trabajos de investigación sobre este cultivo andino que fortalezca su consumo.

1.2.2 Análisis crítico

Hipócrates mencionó la frase célebre, “Que tu alimento sea tu medicina y que tu medicina sea tu alimento”, así la salud y la alimentación siempre han mantenido una estrecha relación, por lo que es importante que las investigaciones en el desarrollo de nuevos productos puedan aportar a mejorar la nutrición y la salud. Los perfiles epidemiológicos que se han analizado, requieren identificar los factores que influyen en dichas patologías, por lo cual hay que considerar modificar el estilo de vida de las personas, cuidando la alimentación, incorporando actividad física diaria, dejar de fumar y de consumir bebidas alcohólicas, entre otras, dichas actividades pueden aportar a dicho fin. Di Cesare (2011)

El desarrollo de suplementos alimentarios con aminoácidos puede ser favorable para coadyuvar al tratamiento de problemas de salud en diversas etapas del ciclo de vida como restricción del crecimiento fetal, morbilidad y mortalidad neonatales, disfunción intestinal asociada al destete y síndrome de desgaste, obesidad, diabetes, enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico e infertilidad; además interviene en la eficiencia de las transformaciones metabólicas para mejorar el crecimiento muscular, la producción de leche, la calidad de la carne y el huevo y el rendimiento atlético. Wu et al. (2013)

1.2.3 Prognosis

Como se evidencia en la contextualización mundial, regional y nacional, la tendencia creciente de las enfermedades no transmisibles ocupa un porcentaje significativo, por lo que, de no desarrollarse esta investigación el aporte que se podría dar hacia los suplementos alimentos que afecten de manera positiva sobre la salud del individuo, no se daría.

Sin el desarrollo de nuevos alimentos y suplementos funcionales, la calidad de vida de las personas se verá afectada en especial la de los niños, personas de la tercera edad y personas con problemas de asimilación.

El generar valor agregado a los productos andinos, como es el caso de la quinua, permitirá, no solo al sector industrial sino a los propios productores, un mayor ingreso por el desarrollo de nuevos productos.

1.2.4 Formulación del Problema

¿Cómo se puede mejorar en las personas los requerimientos nutricionales de los aminoácidos en especial los esenciales con un suplemento nutricional a base de los aminoácidos libres o péptidos obtenidos a partir de la quinua (*Chenopodium quinoa*) por medio de hidrólisis?

1.2.5 Interrogantes

- ¿Es posible obtener los aminoácidos libres o péptidos a partir de quinua orgánica (*Chenopodium quinoa*) mediante procesos de hidrólisis?
- ¿La caracterización del ingrediente funcional obtenido, permitirá identificar los aminoácidos libres?

- ¿Alcanzará resultados nutricionales favorables el desarrollar una formulación nutricional de aminoácidos libres obtenidos a partir de quinua orgánica en cápsulas duras?
-

1.2.6 Delimitación del objeto de investigación

El alcance de la investigación comprende:

- **Campo:** Agroindustrial
- **Área:** Producción
- **Aspecto:** Biotecnología
- **Delimitación Espacial:** El Estudio se desarrollará con quinua orgánica de la empresa Productos Orgánicos Chimborazo SumakLife Cia. Ltda. en la Facultad de Ingeniería, Carrera de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional de Chimborazo. y en los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato
- **Delimitación temporal:** Julio 2017 a Mayo 2018
-

1.3 Justificación

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), ha ganado popularidad como alimento en las tres últimas décadas, principalmente en Norte América, Europa así como también en países andinos; existiendo un incremento importante en las dietas vegetarianas, el aumento de personas intolerantes al gluten (enfermedad celiaca) y el notable crecimiento de la conciencia sociopolítica, sumado al patrimonio cultural indígena de la región andina sudamericana, Bazile et al. (2014).

La quinua posee proteínas de alta calidad cuyos valores se encuentran entre 12 y 23 %, un alto contenido de grasa la cual es rica en ácidos grasos poliinsaturados, adicionalmente contiene minerales, fibra, vitaminas y sustancias antioxidantes (polifenoles). Abugoch et al. (2013)

La Tabla 1 muestra una comparación de los macronutrientes y el aporte de energía de la quinua con cereales de consumo masivo como el maíz, arroz y trigo.

Tabla 1. Contenido de macronutrientes en la quinua y otros cereales (g 100 g⁻¹)

Componente	Quinua	Maíz	Arroz	Trigo
Proteína	16,5	10,2	7,6	14,3
Grasa	6,3	4,7	2,2	2,3
Carbohidratos	69,0	81,1	80,4	78,4
Energía (Kcal)	399	408	372	392

FUENTE: FAO (2011)

Según Terán et al. (2016), al analizar el perfil de aminoácidos se contrasta que los valores reportados de aminoácidos esenciales en la quinua con el arroz y el trigo, por ejemplo al comparar el contenido de lisina, la quinua posee un promedio de 6,91 gramos de aminoácido/100 gramos de proteína seca, el arroz un valor de 3,8 y el trigo valor de 2,6

La quinua presenta propiedades terapéuticas muy importantes gracias al contenido de aminoácidos, de los cuales se destaca la lisina al tener características como formar anticuerpos que favorecen al sistema inmune, participa en la restauración de las células, apoya a los procesos gástricos, favorece el transporte y absorción del calcio, interviene en el metabolismo de los ácidos grasos, y al parecer retrasa o impide metástasis cancerosas, conjuntamente con la vitamina C. FAO (2011).

Se han dado importantes pasos en la formulación de nuevos alimentos con ingredientes funcionales obtenidos a partir de aislados proteicos. En la obtención de los aislados proteicos de origen vegetal como la quinua, se debe analizar la relación estructura-funcionalidad de las fracciones proteicas integrantes frente a distintos parámetros físicos y/o químicos, como el cambio de pH. Toapanta (2016).

1.4 Objetivos

1.4.1 General

Obtener aminoácidos libres a partir de quinua orgánica (*Chenopodium quinoa*) por hidrólisis y su formulación en un suplemento alimenticio.

1.4.2 Específicos

- Obtener un hidrolizado de quinua mediante una combinación de hidrólisis enzimática y química.
- Caracterizar el hidrolizado obtenido en cuanto a grado de hidrólisis, nitrógeno y perfil de aminoácidos.
- Desarrollar una formulación nutricional de aminoácidos libres obtenidos a partir de quinua orgánica en cápsulas duras.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos (estado del arte)

Gonzalez et al. (2012) menciona que la composición de aminoácidos esenciales se vio más afectada que el rendimiento del grano y el nivel de proteína, en los diez cultivos de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) analizadas. La siembra de quinua en distintas zonas agroecológicas influye en la composición nutricional, debido a factores ambientales y climáticos.

Abugoch et al. (2013) menciona que las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas de la harina de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*), como la absorción de agua, la pérdida de solubilidad de la proteína y la composición de aminoácidos, consiguen alterarse por el tiempo y la temperatura de almacenamiento, sin embargo a temperatura ambiente (entre 20 y 30 °C) los cambios que presentó la harina de quinua no son significativos, por lo que este rango sería el ideal para procesos de almacenamiento de harina de quinua.

Toapanta (2016) señala que el pH es un factor influyente en la obtención de aislados proteicos de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*), siendo el ideal un pH 4,0 que permitió un rendimiento del 6,29 % \pm 0,03 y un contenido proteico de 64,97 % \pm 0,13, sin embargo hay que considerar otros factores importantes como la granulometría de la harina, proceso de desengrasado, tiempos y temperaturas del proceso de aislamiento, concentración y tipo de sales y ácidos ocupados.

Camacho et al. (2000).realiza una descripción sobre las distintas técnicas empleadas para la obtención de los hidrolizados comparando los diferentes métodos usados para su control tales como: determinación del grado de hidrólisis, tamaño de los péptidos, distribución de pesos moleculares y contenido en aminoácidos y péptidos. En los procesos de hidrólisis enzimática, es importante tener en cuenta la matriz proteica, el tipo de enzima y la cinética de reacción para obtener el mejor grado de hidrólisis, cuya composición es determinada con mayor precisión a través de la cromatografía líquida de exclusión.

Vioque et al. (2001) realiza una revisión de la obtención de hidrolizados proteicos de origen vegetal para su uso en alimentación humana, clasificando los distintos tipos de

hidrolizados producidos por su aplicación en: hidrolizados limitados (entre el 1 y el 0 % de grado de hidrólisis) que son usados para mejorar las propiedades funcionales del alimento en cuestión; hidrolizados con grado de hidrólisis variable para ser usados como saborizantes; por último, hidrolizados extensivos (con grado de hidrólisis superior al 10 %) que pueden ser usados como suplemento proteico en la dieta o con una composición definida para el tratamiento de enfermedades o síndromes específicos

Navarro et al. (2012) menciona que factores como el tiempo y la temperatura influyen en la hidrólisis ácida propiamente dicha así como en la degradación amino-acídica, por otra parte analiza la concentración real de los aminoácidos constituyentes a partir de una concentración aparente cuyos valores son importantes al momento de conocer las concentraciones efectivas de los aminoácidos presentes en el hidrolizado, cuando estos son usados en suplementos de dietas alimenticias pobres. En el caso de la proteína patrón (albúmina de buey) las condiciones adecuadas para determinar el contenido de aminoácidos fue 110 °C por 16 horas.

Las investigaciones anteriores, permitieron analizar las condiciones de la materia prima, del proceso de aislamiento proteico y los parámetros de pH, temperaturas, tiempo, concentraciones, en las hidrólisis planteadas en el presente trabajo, además de considerar los métodos para el control del contenido de nitrógeno, grado de hidrólisis y perfil de los aminoácidos.

2.2 Fundamentación filosófica

La filosofía y la ciencia son actividades que se correlacionarán en esta investigación, presupone buscar, examinar e indagar en las particularidades y causas que conduzcan al objetivo de extraer los aminoácidos de la quinua, además analizar posibles alternativas al momento de elegir las hipótesis de estudio.

La investigación “Obtención de aminoácidos libres a partir de quinua orgánica (*Chenopodium quinoa*) por hidrólisis y su aplicación en un suplemento alimenticio”, se basará en un proceso praxiológico Juliao (2011), explorando analíticamente la estructura de las proteínas de la quinua y su comportamiento frente a una hidrólisis enzimática e hidrólisis ácida, evaluando parámetros de pH, temperatura y tiempo, con el fin de obtener aminoácidos libres que puedan ser caracterizados y usados como un ingrediente funcional.

2.3 Fundamentación legal

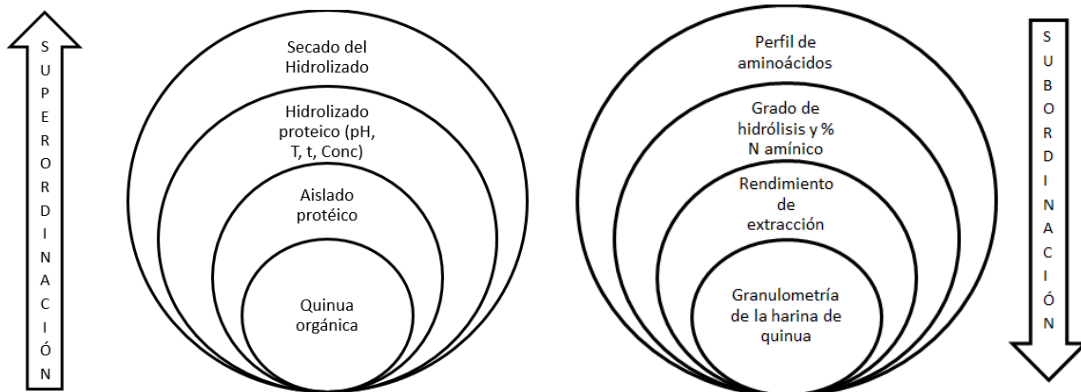
Los aminoácidos libres pueden formar parte de los productos alimenticios de dos formas: como un ingrediente funcional y como parte de un alimento funcional, en ese caso deberá estar bajo la normativa INEN 2587 (2011) “Requisitos para los alimentos funcionales”, el producto además deberá cumplir con la norma de rotulado expuestas en INEN 1334-2 (2011) “Rotulado de productos alimenticios para consumo humano. Parte 2. Rotulado nutricional. Requisitos”, INEN 1334-3 (2011) “Rotulado de productos alimenticios para consumo humano. Parte 3. Requisitos para declaraciones nutricionales y saludables”, por último la norma INEN 022 (2014) “Rotulado de productos alimenticios procesados, envasados y empaquetados”.

Los aminoácidos libres como un suplemento, deberá estar bajo la normativa INEN 2983 (2015) “Suplementos alimenticios. Requisitos”.

2.4. Categorías fundamentales

Variable Independiente

Variable Dependiente



2.4.1 Marco conceptual de las variables independientes

Quinoa

Según Bazile et al. (2014), la quinoa (*Chenopodium quinoa*) es una semilla cultivada en zonas templadas y subtropicales de América, pertenece a taxones alotetraploides que pueden ser especies domesticadas, silvestres o invasivas. El cultivo de la quinoa tiene multipropósito, existiendo un creciente interés mundial, así las semillas son usadas en la alimentación humana, en productos a base de harina y para la alimentación animal gracias a su elevado valor nutritivo y su facilidad de acoplarse a condiciones agroecológicas diversas. La genética de la quinoa es muy diversa y los cultivos tienen la facilidad de crecer en suelos marginales, tienen tolerancia a las heladas, la sequía y la salinidad, lo que permite seleccionar, adaptar y cultivar de mejor forma en varias condiciones ambientales Vega et al. (2010)

La quinoa presenta beneficios por su alto valor nutritivo, dependiendo de la variedad, el contenido proteico se encuentra entre 13,81 y 21,9 %. La FAO la ha calificado como un alimento exclusivo en el reino vegetal que proporciona todos los aminoácidos esenciales contenidos en su proteína, encontrándose muy cerca de los estándares de nutrición humana y puede compararse con la proteína de la leche. FAO (2011)

La composición bioquímica y nutricional se observa en las siguientes tablas:

Tabla 2. Análisis proximal de la quinoa (g 100 g⁻¹)

Componente	Referencias			
	Koziol ²⁷	Wright et al. ²⁸	De Bruin ²⁹	Dini et al. ³⁰
Proteína	16,5	16,7	15,6	12,5
Grasa	6,3	5,5	7,4	8,5
Ceniza	3,8	3,2	3,0	3,7
Carbohidratos	69,0	74,7	69,7	60,0
Fibra Cruda	3,8	10,5	2,9	1,92

FUENTE: Vega et al. (2010)

Tabla 3. Perfil de aminoácidos (g 100 g⁻¹ proteína)

Aminoácidos	Referencias				
	Koziol ²⁷	Dini et al. ³⁰	Repo-Carrasco et al. ³³	Wright et al. ²⁸	González et al. ³⁴
Histidina	3,2	2	2,7	3,1	ND
Isoleucina	4,4	7,4	3,4	3,3	ND
Leucina	6,6	7,5	6,1	5,8	ND
Metionina+Cisteína	4,8	4,5	4,8	2,0 ^a	2,4 ^a
Fenilalanina					
+Tirosina	7,3	7,5	6,2	6,2	ND
Treonina	3,8	3,5	3,4	2,5	ND
Valina	4,5	6	4,2	4	ND
Lisina	6,1	4,6	5,6	6,1	6,6
Triptófano	1,2	ND	1,1	ND	1,1

^a Solo reporte de metionina

FUENTE: Vega et al. (2010)

Ando et al (2002) menciona que la composición proximal del grano molido de quinua posee similitudes a la del grano integral. El contenido de proteínas y lípidos del embrión fue el 57 % de la proteína total y el 49 % del lípido total, respectivamente. El análisis mineral reveló que el grano de quinua era rico en K, Mg, Ca, P y Fe. En el perisperma se determinó grandes agregados ovales de almidón de 20-30 µm de diámetro y gránulos poligonales de alrededor de 1 µm de diámetro. Los datos de calorimetría de barrido diferencial mostraron una temperatura de gelatinización de 54 a 71 °C y una entalpía de 11 J / g de almidón. La proteína soluble en agua y las fracciones de proteína soluble en NaCl compuesto 28,7 – 36,2 % y 28,9 – 32,9 % de proteína total en cada fracción. Ácido graso insaturado representado por un valor entre el 87,2 – 87,8 % de ácido graso total. El contenido de saponina encontrado en el salvado fue del 86 % de la saponina total.

Aislado proteico

Las proteínas son macromoléculas integradas por aminoácidos, los mismos que están ligados por enlaces peptídicos entre el grupo α-amino y los grupos carboxilo, con pérdida de agua. Existen cuatro niveles de estructura proteica, primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, la estructura primaria presenta una secuencia lineal en que los aminoácidos que la componen se unen de forma covalente, por enlaces amida o

peptídicos; la estructura secundaria presenta una disposición espacial periódica de algunos aminoácidos en ciertos segmentos de la cadena polipeptídica, existiendo interacciones no covalentes de corto alcance; en la estructura terciaria diversas estructuras secundarias se pliegan sobre si misma para adquirir una forma tridimensional compacta y en una estructura cuaternaria la disposición espacial contienen más de una cadena polipeptídica. Fennema (2005)

En el caso de la estructura primaria está formada por una secuencia de aminoácidos, importantes nutricionalmente porque conserva la proteína corporal e incrementa ésta durante el crecimiento. La restricción en el aporte de proteína y energía lleva a un retraso en el crecimiento, en el adulto, el detrimento de proteína corporal se relaciona con aumento en la mortalidad y alteraciones patológicas Augustin et al. (2006).

Los valores de proteínas en la quinua que van entre el 12 y el 24 % son superiores a los de otros cereales, conteniendo todos los aminoácidos esenciales, donde el triptófano presenta una concentración menor. La quinua, a pesar de tener un proceso de pelado y/o lavado para sacar las saponinas de su epicarpo, presenta una pérdida de proteínas alrededor del 0,5 % inferior que el proceso de pelado del arroz en el cual se pierde entre 16 y 17 % de proteínas de alta calidad. Inclusive el grano consumible puede ganar alrededor de un 6 % de peso relativo de proteínas, cuando a la quinua se le ha eliminado la capa seminal externa, la cual es rica en fibra, saponinas y flavonoides como se observa en la (Tabla 4). Esta particularidad se debe a que la proteína de los cereales como el arroz está en el exterior del grano y el decortinado descarta la mayor parte de esta zona; a diferencia de las Amarantáceas y Chenopodiáceas (quinua), las proteínas se localizan en el embrión, que es levemente removido durante el pelado o lavado del grano (desaponificado). Así a pesar de que el arroz y quinua tienen procesos similares, la quinua conserva sus cualidades nutritivas Bazile et al. (2014).

Tabla 4. Proteínas (% en base .seca) antes y después del proceso de pelado, en quinua y arroz.

Momento del análisis	Arroz†	Quinua*
Antes del pelado (grano integral)	8,4	12,8
Después del Pelado (grano blanco)	6,7	13,7
Cambio proteico (%)	-16,6	+6,4

†A partir de datos en etiquetas de arroz comercial de la misma marca en comercio orgánico de Aix-en-Provence, Francia (muestreo del autor).

*Promedio de tres muestras de localidad de Cahuil, Chile central (datos del autor, Proyecto CORFO)

FUENTE: Bazile et al. (2014)

Del peso total del grano de quinua, el contenido de proteínas de alto valor biológico, se encuentra entre el 16 y el 20 %, en este porcentaje está incluido los aminoácidos esenciales que el organismo no puede producir, por lo que requieren ser consumidos en la dieta. Si se toma en cuenta el requerimiento de aminoácidos recomendados por la FAO para niños en edad preescolar, escolar y adultos, las proteínas de la quinua cubren esta necesidad. Augustin et al. (2006)

Las proteínas de la quinua son especialmente albúmina y globulina, las mismas que presentan una composición equilibrada de aminoácidos esenciales. Las hojas de quinua contienen proteínas de buena calidad, además de minerales como hierro, calcio, fósforo y vitaminas FAO (2011).

Hidrólisis enzimática

Los procesos de hidrólisis proteica, se basan en la rotura del enlace peptídico y en consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres. La rotura de estos enlaces puede producirse por métodos químicos (con ácidos o bases) o biológicos (con enzimas). La hidrólisis enzimática, tiene la ventaja de realizarse en condiciones suaves de pH y temperatura que van a reducir la formación de compuestos indeseables. Vioque et al. (2001).

Proteasas comerciales

Las proteasas pueden clasificarse según:

- El origen – animal: vegetal, bacteriano o fúngico
- Su acción catalítica: en endopeptidasas o proteinasas si rompen al azar el interior de las cadenas peptídicas, y exopeptidasas o peptidasas, si separan aminoácidos y dipéptidos de los extremos de las cadenas polipeptídicas.
- La naturaleza del sitio catalítico: así las endopeptidasas pueden ser serina, cisteína, metalo, o aspartato-proteinasas y las exopeptidasas amino-, carboxi- o dipeptidasas Camacho et al. (2000).

En la Tabla 5 se listan algunas de las proteasas comerciales de grado alimentario disponibles en el mercado. Estos preparados suelen ser mezclas de estas enzimas y normalmente se venden en estado líquido o en pellets secos.

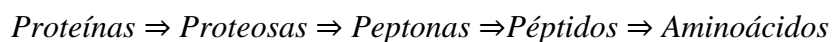
Tabla 5. Características de algunas proteasas comerciales

Enzima	Origen	Estabilidad	
		pH	T(°C)
Alcalasa 0.6 L	<i>B. licheniformis</i>	4 < pH < 11.5	50 < T < 60
Neutrasa	<i>B. subtilis</i>	6 < pH < 8	45 < T < 55
Protease 66 OL	<i>B. subtilis</i>	7 < pH < 10	50 < T < 70
Fungal-Protease	<i>A. oryzae</i>	6 < pH < 9	45 < T < 55
P .E.M . 2500 S	tripsina porcina	6 < pH < 10	30 < T < 60
	tripsina bovina	6 < pH < 10	25 < T < 45
	quimotripsina. bovina		
Corolase PP	Tripsina	7 < pH < 9	45 < T < 55
	Quimotripsina		
Corolase PS	<i>A. oryzae</i>	5 < pH < 7	50 < T < 60
Corolase 7089	<i>B. subtilis</i>	6 < pH < 8.5	55 < T < 60
Corolase 7092	<i>A. oryzae</i>	6 < pH < 9	35 < T < 45
Corolase 7093	<i>A. oryzae</i>	7 < pH < 9	40 < T < 50
Corolase 7107	<i>A. niger</i>	2 < pH < 3	30 < T < 50
Bromelina			
Takamina	vegetal (piña)	4 < pH < 9	20 < T < 65
Papaína	vegetal		
Takamina	(papaya)	6 < pH < 8	20 < T < 75

FUENTE: Camacho et al. (2000)

Mecanismo de la hidrólisis

La hidrólisis enzimática de proteínas es un proceso que mantiene un conjunto de etapas en serie:



Cada uno de estos productos intermedios, se diferencia básicamente del otro en su solubilidad, y se relacionan entre los tamaños moleculares medios (MW) y con la relación nitrógeno amino/nitrógeno total (AN/TN), que se observa en la Tabla 6.

Tabla 6. Características de las especies producidas en la hidrólisis de proteínas

	<u>MW (Da)</u>	<u>AN/TN</u>
Proteínas	> 2000	< 0,01
Proteasas	5000 - 10000	< 0,01
Peptonas	1000 - 6000	0,1 - 0,5
Péptidos	200 - 500	0,5 - 0,8
Aminoácidos	75 - 200	0,8 - 0,9

FUENTE: Camacho et al. (2000)

Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida es un proceso químico en el que se utiliza un ácido prótico que puede ser ácido sulfúrico o ácido clorhídrico para catalizar la escisión de los enlaces químicos. La hidrólisis ácida puede ser diluida o concentrada, en la primera las condiciones de presión y temperatura son altas y el tiempo en el que se da la reacción es en un rango de 1 a 4 horas lo que facilita el proceso continuo. Se usa una solución de ácido mineral que puede ser H₂SO₄ o HCl con concentraciones de 1-10 % en un reactor de flujo continuo, con relación m/v 1:10 - 1:30 y considerando temperaturas de aproximadamente 50 – 215 °C. Las hidrólisis ácidas concentradas, emplea H₂SO₄ concentrado en el rango de 10-30 % y habitualmente es usada para liberar la hemicelulosa. Los tiempos de la reacción son generalmente más largos que los de la hidrolización ácida diluida, este proceso proporciona una conversión completa y rápida de la celulosa y la hemicelulosa, los factores que hacen viable este proceso consisten en perfeccionar la recuperación de los azúcares y los ácidos empleados. Montiel et al. (2015).

La hidrólisis química presenta algunas desventajas debido a sus efectos perjudiciales sobre la calidad nutricional del hidrolizado, ya que se destruyen L-aminoácidos y se forman compuestos tóxicos como la Lisinoalanina Camacho et al. (2000).

Sin embargo hay trabajos sobre albúmina con hidrólisis ácida, en dicha investigación se trabajó con temperaturas de 110 y 145 °C y tiempos que fueron desde 8 hasta 32 horas, hacen relación entre el contenido “aparente” de un aminoácido en la proteína que corresponde a los valores obtenidos directamente del análisis realizado luego de la hidrólisis ácida y el valor “real” considerando las modificaciones y degradaciones de los

aminoácidos que pueden darse simultáneamente al proceso de ruptura de los enlaces que los unen durante el proceso hidrolítico Navarro et al. (2012).

Aminoácidos

Los aminoácidos se han clasificado por la posibilidad o no de ser sintetizados por el organismo. Así, tenemos los aminoácidos esenciales (o indispensables), cuyo esqueleto hidrocarbonado no se puede sintetizar en el organismo humano y por tanto, deben ser aportados, de forma obligatoria, por la dieta para cubrir las necesidades corporales (crecimiento y mantenimiento de estructuras). Los nueve aminoácidos indispensables son: fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano y valina. Actualmente, en los aminoácidos no esenciales (o dispensables) se ha tomado en cuenta los necesariamente dispensables que son sintetizados en el organismo a partir de otros aminoácidos o de otros metabolitos (alanina, ácido aspártico, asparragina, ácido glutámico y serina) y los que se sintetizan por vías complejas y obligatoriamente a partir de otros aminoácidos o su síntesis puede estar limitada en situaciones fisiológicas (prematuridad) o fisiopatológicas (estrés catabólico severo o disfunción metabólica intestinal). En este grupo se encuentran la arginina, cisteína/cistina, glutamina, glicina, prolina y tirosina. Sus precursores son glutamina/glutamato, aspartato, metionina, serina, ácido glutámico, amonio, colina, glutamato y fenilalanina respectivamente. Martínez et al. (2006).

La quinua contiene 16 aminoácidos y es rico en aminoácidos esenciales (como lisina, treonina y metionina), que presenta un contenido mayor que en los cereales comunes. Por ejemplo, para la lisina (esencial para crecimiento), la quinua contiene 1,4 veces más que la soja, 2,5 / 5,0 veces más que el maíz, 20,6 veces más que el trigo y 14,0 veces más que la leche pero no contiene gluten. Escuredo et al. (2014).

En la Tabla 7 se observan los requerimientos de los distintos aminoácidos.

Tabla 7. Requerimientos nutricionales estimados por FAO /WHO para preescolares extrapolables a adultos.

Aminoácido	FAO/WHO mg/g de proteína
Isoleucina	28
Lisina	58
Leucina	66
Metionina/Cisteína	25
Fenilalanina/Tirosina	63
Treonina	34
Triptófano	11
Valina	35

FUENTE: Martínez et al (2006)
FAO (Food and Agriculture Organization)/WHO (World Health Organization)

2.4.2 Marco conceptual de las variables dependientes

Perfil de aminoácidos

La determinación química o perfil de aminoácidos es un proceso largo, que implica el análisis de proteína hidrolizada con un analizador de aminoácidos que operacionalmente es complejo y costoso. Se puede realizar por espectroscopía de reflectancia del infrarrojo cercano (NIR) técnica combinada con calibración quimiométrica de algoritmos.

Considerando que la harina de quinua se utiliza como un ingrediente adicional en la preparación de alimentos altamente nutritivos, hace que sea necesario saber la composición de aminoácidos con técnicas rápidas, como puede ser NIR utilizando una sonda de fibra óptica, que reduce la medición-hora. Escuredo et al (2014).

En la Tabla 8 se puede observar los valores de los distintos aminoácidos en quinua.

Tabla 8. Análisis descriptivo de cada aminoácido (g 100 g⁻¹ proteína) según el genotipo de quinua.

Amino	Genoty	Minim	Maxim	Mean	SD
His	AG201	1,48	3,08	2,17	0,46
	B080	0,79	2,90	1,75	0,66
	Regalo	0,63	2,83	1,71	0,77
Ile	AG201	0,40	1,14	0,82	0,23
	B080	0,25	1,37	0,82	0,34
	Regalo	0,39	1,43	0,75	0,30
Leu	AG201	1,49	3,19	2,48	0,42
	B080	0,36	3,18	2,27	0,78
	Regalo	1,75	3,70	2,52	0,62
Lys	AG201	1,55	2,83	2,35	0,36
	B080	1,32	3,66	2,42	0,64
	Regalo	1,38	3,46	2,36	0,59
Met	AG201	0,05	0,61	0,31	0,16
	B080	0,16	0,66	0,38	0,14
	Regalo	0,22	4,48	0,69	1,02
Phe	AG201	0,94	1,89	1,54	0,25
	B080	0,68	2,13	1,49	0,38
	Regalo	1,03	2,20	1,53	0,38
Thr	AG201	1,22	17,50	5,71	5,89
	B080	0,90	15,28	5,53	5,79
	Regalo	0,28	26,25	8,89	7,71
Trp	AG201	0,81	1,33	1,03	0,17
	B080	0,69	1,60	0,99	0,23
	Regalo	0,69	1,71	1,07	0,30
Val	AG201	0,22	1,83	0,99	0,59
	B080	0,16	2,31	0,99	0,76
	Regalo	0,22	2,03	0,75	0,61

His: histidine; Ile: isoleucine; Leu: leucine; Lys: lysine; Met: methionine; Phe: phenylalanine; Thr: threonine; Trp: tryptophan; Val: valine.

FUENTE: Escuredo et al (2014)

Grado de Hidrólisis

La propiedad fundamental de un hidrolizado, que va a determinar en gran medida las restantes características del mismo, es su grado de hidrólisis, es decir, el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original. El grado de hidrólisis final va a estar influenciado por las condiciones usadas, tales como, concentración de sustrato, relación enzima/ sustrato, tiempo de incubación y condiciones físico- químicas como el pH y la temperatura. Otro factor que también va a determinar el grado de hidrólisis es la naturaleza de la actividad enzimática, es decir, su actividad específica y tipo de actividad. Así la naturaleza del enzima usado no solo va a influir en el grado de hidrólisis sino también en el tipo de péptidos producidos. Vioque et al. (2001).

Para el seguimiento y control de la hidrólisis de proteínas es necesario evaluar el grado de hidrólisis, DH, que se define como:

$$DH = \frac{N^{\circ} \text{ enlaces peptídicos hidrolizados}}{N^{\circ} \text{ total enlaces peptídicos}} * 100$$

Los diferentes métodos utilizados para medir el DH se basan fundamentalmente en:

- 1) La determinación de nitrógeno soluble tras precipitar la proteína con ácido tricloroacético.
- 2) La determinación de los grupos α -amino libres.
- 3) La valoración del protón liberado tras la ruptura de un enlace peptídico a determinado pH Camacho et al (2000).

Determinación de nitrógeno soluble:

En este caso las técnicas más usuales son: el método Kjeldahl A.O.A.C. (1995), la reacción de Biuret según Hung *et al.* (1984) o la determinación espectrofotométrica en la región UV de péptidos con grupos aromáticos. Camacho et al. (2000).

Determinación de los grupos α -amino libres:

Para ello puede utilizarse la valoración con formol A.O.A.C. (1995), U.S.P. (1989), aunque el gran número de interferencias que presenta este método, limita el resultado, en el caso de los hidrolizados de proteínas.

También se utilizan para esta medida productos químicos como ninhidrina, ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS), ortophenilaldehído (OPA) que reaccionan con los grupos α -amino libres.

El método del TNBS ha sido utilizado por numerosos autores para el análisis de hidrolizados de proteína como Adler et al (1979), Valles et al (1985), Humbert et al (1990), Camacho et al. (1992). Después de la incubación de las muestras durante 1 hora a 37 °C se mide la absorbancia a 420 nm. Entre los inconvenientes de este método pueden mencionarse el alto valor de los blancos, la contaminación del reactivo con ácido pícrico, la interferencia de azúcares reductores y amonio, la no reactividad de prolina e hidroxiprolina así como la alteración de los resultados por la reacción de los grupos ϵ -amino de lisina con el reactivo Camacho et al. (2000).

Rendimiento de extracción y Granulometría

El método para determinar el tamaño de las partículas en las harinas de origen vegetal se encuentra detallada en INEN 0517 (1981) “Harina de origen vegetal. Determinación del tamaño de las partículas”, la que consiste en pasar una muestra previamente pesada a través de diferentes tamices; pesar los residuos de cada uno de ellos y expresar en porcentaje.

- Pesar, con precisión de 0,1 mg, 100 g de harina de cuyas partículas debe determinarse el tamaño.
- Transferir la muestra al tamiz superior de la columna de tamices, poner la tapa, fijar la columna en el aparato de vibración y poner en funcionamiento durante cinco minutos, y después de este tiempo, suspender el movimiento de la máquina.
- Desintegrar los aglomerados pasando suavemente el pincel contra la malla, empezando la operación por el tamiz superior, luego al inmediato inferior y así sucesivamente hasta llegar al tamiz del fondo.
- Pasar cuantitativamente a una hoja de papel, previamente pesada, la fracción de la muestra retenida por cada uno de los tamices y pesar con aproximación al 0,1 g.
- Realizar los cálculos respectivos.

2.5. Hipótesis

2.5.1 Rendimiento de la extracción de aminoácidos libres a partir de quinua orgánica – Hidrólisis enzimática:

Hipótesis Nula (H_0): Los valores de tiempo, pH y tipo de enzima, ensayados no afectan significativamente en el grado de hidrólisis y nitrógeno amínico.

Hipótesis Alternativa (H_1): Los valores de tiempo, pH y tipo de enzima, ensayados afectan significativamente en el grado de hidrólisis y nitrógeno amínico.

2.5.2 Rendimiento de la extracción de aminoácidos libres a partir de quinua orgánica – Hidrólisis ácida:

Hipótesis Nula (H_0): Los valores de tiempo y concentración de H_2SO_4 , ensayados no afectan significativamente en el grado de hidrólisis y nitrógeno amínico.

Hipótesis Alternativa (H_1): Los valores de tiempo y concentración de H_2SO_4 , ensayados afectan significativamente en el grado de hidrólisis y nitrógeno amínico.

2.6 Señalamiento de las variables de la hipótesis

2.6.1 Variable independiente

- Extracción a pH, tiempo, tipo de enzima, para la hidrólisis enzimática
- Extracción óptima en la hidrólisis ácida con tiempo y concentraciones distintas de H_2SO_4

2.6.2 Variable dependiente

- Grado de hidrólisis, nitrógeno amínico y los rendimientos de los aminoácidos libres obtenidos a partir de quinua orgánica.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Modalidad básica de la investigación

La presente investigación tuvo un enfoque cuantitativo, obteniendo datos numéricos procedentes del diseño experimental, los mismos que fueron analizados estadísticamente.

Se partió del levantamiento de variables, elementos constitutivos del problema planteado, estos parámetros fueron observados y cuantificados durante la investigación, permitiendo mantener claridad entre los elementos del problema de investigación siendo posible definirlo, limitarlo y conocer la relación entre estos elementos.

La modalidad de esta investigación fue experimental, por cuanto se tiene el control de las condiciones específicas como pH, temperatura, tiempo y concentración, investigando la relación causa – efecto entre las condiciones manipuladas o controladas y los resultados obtenidos expresados en nitrógeno amínico, grado de hidrólisis y rendimiento.

3.2 Nivel o tipo de investigación

En esta investigación se utilizaron dos niveles:

Asociación de variables: Se evaluaron las variaciones del comportamiento del nitrógeno amínico y grado de hidrólisis; en función del pH, tiempo, temperatura y concentraciones del H_2SO_4 . Se analizó también la relación entre las variables y por último se determinó el mejor tratamiento en hidrólisis enzimática e hidrólisis ácida, que permitió alcanzar el mayor rendimiento en la obtención de los aminoácidos de quinua orgánica.

Descriptiva: A partir de una serie de cálculos y análisis, se logró caracterizar el objeto de estudio, los aminoácidos libres de quinua orgánica, señalando sus características a partir de un perfil de aminoácidos.

Bibliográfica: Se analizaron trabajos relacionados con esta investigación permitiendo reforzar la metodología, la importancia de la materia prima y los beneficios que se pueden obtener del producto estudiado.

3.3 Población y muestra

En la presente investigación la población considerada es la harina de quinua orgánica de la provincia de Chimborazo, se trabajó la fase experimental con una muestra de 5 kg de harina de quinua orgánica, lote 069 de la empresa Productos Orgánicos Chimborazo Sumak Life Cia. Ltda.

3.3.1 Diseño experimental

En la presente investigación, se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.I, que permitió elaborar dos tipos de Diseño Factorial en función de los niveles estudiados; un Diseño Factorial 3^2 , para la enzima papaína, con 2 factores pH (5, 6 y 7) y tiempo (1, 2 y 3 h), con 3 niveles en cada factor y 3 bloques por el número de réplicas realizadas.

Para la enzima proteasa de *Bacillus subtilis* y el H_2SO_4 ; el diseño empleado fue un Diseño Factorial 2^2 , con 2 factores pH (6,5 y 7,5) para la enzima proteasa de *Bacillus subtilis* y tiempo (2 , 3 h), con 2 niveles en cada factor; para la hidrólisis ácida los dos factores fueron 4 y 8 % de H_2SO_4 y tiempo (6 y 8 h); 3 bloque por el número de réplicas realizadas en ambos casos.

3.3.2 Respuestas experimentales

En los dos tipos de hidrólisis experimentadas, enzimática y ácida, la respuesta experimental fue nitrógeno amínico libre en base húmeda y con este valor se procedió a calcular el nitrógeno amínico libre en base seca y el grado de hidrólisis.

3.4 Operacionalización de variables

Tabla 9. Operacionalización de la variable independiente

Conceptualización	Categoría	Indicadores	Técnicas e instrumentos
El pH es una unidad de medida de alcalinidad o acidez de una solución, específicamente mide la cantidad de iones de hidrógeno que contiene una solución determinada.	pH	pH ácido = 5 - 6 - 6,5 pH neutro = 7 pH básico = 7,5	pHmetro
La concentración de una solución es la proporción o relación que hay entre la cantidad de soluto y la cantidad de disolución o de disolvente, donde el soluto es la sustancia que se disuelve, el disolvente es la sustancia que disuelve al soluto, y la disolución es el resultado de la mezcla homogénea de las dos	Concentración (%)	4 % H ₂ SO ₄ 8 % H ₂ SO ₄	

Tabla 10. Operacionalización de la variable dependiente

Conceptualización	Categoría	Indicadores	Técnicas e instrumentos																				
Para el seguimiento y control de la hidrólisis de proteínas es necesario evaluar el grado de hidrólisis (DH). Para medir el DH se basan fundamentalmente en la determinación de nitrógeno soluble	Grado de hidrólisis (%)	$DH = \left(\frac{N^\circ \text{ enlaces peptídicos hidrolizados}}{N^\circ \text{ total enlaces peptídicos}} \right) * 100$	Nitrógeno amínico Método Sorensen																				
Los aminoácidos son las estructuras básicas de las proteínas, se clasifican en aminoácidos esenciales (o indispensables), cuyo esqueleto hidrocarbonado no se puede sintetizar en el organismo humano y por tanto, deben ser aportados, de forma obligatoria por la dieta para atender a las necesidades corporales y los aminoácidos no esenciales.	Composición Aminoácidos esenciales Requerimiento FAO (1991) g/100 g proteína	<table border="0"> <tr><td>Lis</td><td>5,8</td></tr> <tr><td>Trp</td><td>1,1</td></tr> <tr><td>Phe</td><td>6,3</td></tr> <tr><td>Tyr</td><td></td></tr> <tr><td>Met</td><td>2,5</td></tr> <tr><td>Cys</td><td></td></tr> <tr><td>Thr</td><td>3,4</td></tr> <tr><td>Leu</td><td>6,6</td></tr> <tr><td>Ile</td><td>2,8</td></tr> <tr><td>Val</td><td>3,5</td></tr> </table>	Lis	5,8	Trp	1,1	Phe	6,3	Tyr		Met	2,5	Cys		Thr	3,4	Leu	6,6	Ile	2,8	Val	3,5	Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia en Fase Reversa (RP-HPLC).
Lis	5,8																						
Trp	1,1																						
Phe	6,3																						
Tyr																							
Met	2,5																						
Cys																							
Thr	3,4																						
Leu	6,6																						
Ile	2,8																						
Val	3,5																						

3.5 Plan de recolección de información

La recolección de la información, fue de carácter individual y participativo, realizado en los laboratorios de la Facultad de Ingeniería – Carrera de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de Chimborazo y la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

3.5.1 Metodología

3.5.1.1 Desengrasado de la harina de quinua.

La harina de quinua antes de iniciar su proceso de desengrasado es tamizada a través de una serie de tamices U.S.A. Standard Test Sieve Nos. 20, 40, 60, 80 y 100 para obtener la mayor cantidad de harina con un tamaño de partícula que pase por el tamiz N°60.

Posteriormente la harina de quinua fue desengrasada según el proceso descrito por Toapanta (2016) la cual consiste en una extracción de la grasa utilizando n-hexano en una proporción de 10 g de harina por cada 100 ml de n-hexano, la harina fue pesada en una balanza Mettler Toledo. El proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente con agitación continua durante 5 horas en un agitador múltiple con giro uniforme de 15 a 300 r/min, modelo AM4, transcurrido el tiempo se dejó en reposo durante 19 horas, completándose todo el proceso en 24 horas de contacto de la harina con n-hexano.

Se procedió a separar la harina del n-hexano por filtración dejando la harina en una cámara de extracción y flujo laminar, marca Marca Biobase, modelo FH1200, a temperatura ambiente durante 12 horas para eliminar los restos de n-hexano. La harina desengrasada se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

3.5.1.2 Aislado proteico de quinua

El aislado proteico de quinua se obtuvo siguiendo la metodología trabajado por Toapanta (2016). La harina desengrasada se suspendió en agua en una concentración de 10 g por cada 100 ml de agua destilada, con agitación permanente, sobre una plancha magnética marca Stuart Model CB302, se mantuvo durante 1 hora a pH 8 con NaOH 2 mol/L y controlando este valor regularmente.

Posteriormente se centrifugó durante 50 min a 4000 r/min, en una centrífuga Hettich Rotofix 32A, el sobrenadante fue llevado a pH 4,0 con una solución HCl 2 mol/L y agitación durante 10 min para precipitar las proteínas, a continuación se centrifugó por 20 min a 4000 r/min. El precipitado aislado proteico se refrigeró hasta su uso en los procesos de hidrólisis.

3.5.1.3 Hidrólisis enzimática

Para el desarrollo del proceso de hidrólisis enzimática, se realizó una modificación del método de Meinschmidt, et al. (2016). A cada aislado proteico se le determinó el porcentaje de humedad y en función del contenido de sólidos del aislado proteico de quinua, se preparó una solución 1:20; considerando que se trabajó con 1 g de enzima por cada 100 g de aislado en base seca.

Se procedió a ajustar el pH ácido o básico, usando una solución de HCL 2 mol/L o NaOH 2 mol/L respectivamente, el pH fue verificado con un pHmetro marca Hanna,

modelo HI208, para la enzima papaína se trabajó con tres niveles, pH: 5, 6 y 7 y para la enzima proteasa de *Bacillus subtilis* a dos niveles pH 6,5 y 7,5.

Una vez ajustado el pH, el proceso continuo llevando la solución a la temperatura adecuada para la actividad enzimática dependiendo de la enzima usada; así para papaína, la solución se llevó a 65 °C y para proteasa de *Bacillus subtilis*, la temperatura fue de 55 °C.

Se realizaron tres réplicas en cada tratamiento manteniéndolas en agitación permanente, en una plancha magnética modelo AG5006. Las enzimas fueron trabajadas por separado y la cantidad de la misma estuvo en función del porcentaje de sólidos del aislado. El grado de hidrólisis se controló durante el proceso, cada hora durante 3 horas, tomando una alícuota de 3 ml para ser valorada con NaOH 0,1 mol/L, de acuerdo al método de titulación de Sørensen Jodidi (1926). La descripción del método se encuentra en el Anexo 1.

Registrados los mililitros de NaOH 0,1 mol/L se procedió al cálculo del porcentaje de nitrógeno en base húmeda con la siguiente ecuación:

$$\% N_{bh} = \left(\frac{ml \text{ gastados de NaOH} * 1,4 * \text{factor de corrección NaOH}}{ml \text{ de muestra} * 1000} \right) * 100 \quad (\text{Ec.1})$$

Para el cálculo del porcentaje de nitrógeno en base seca se consideró el porcentaje de sólidos en la muestra más la enzima y se trabajó con la siguiente ecuación:

$$\% N_{bs} = \% N_{bh} \left(\frac{95}{\% \text{ de sólidos totales}} \right) \quad (\text{Ec.2})$$

3.5.1.4 Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida se realizó considerando la metodología de García, S Navarro, 2012. Con la diferencia de que se partió del mejor tratamiento de la hidrólisis enzimática previa, es decir se inició con la hidrólisis enzimática y alcanzado el tiempo ideal se inactivó la enzima subiendo la temperatura a 85 °C por 3 min, se refrigeró para continuar con el proceso de hidrólisis ácida.

Se trabajó con dos concentraciones de H₂SO₄ al 4 y al 8 %, a 110 °C por 8 horas, en una proporción de 1:2,6; en un sistema de reflujo con tubos refrigerantes Graham o refrigerante serpentín y una cocineta tipo Soxhlet, de igual forma cada dos horas se tomó la alícuota para ser valorada con NaOH 0,1 mol/L, de acuerdo al método de titulación de Sörensen Jodidi (1926).

Los porcentajes de nitrógeno en base húmeda y seca se calcularon de la misma manera que en la hidrólisis enzimática.

3.5.1.5 Grado de hidrólisis

Para determinar el grado de hidrólisis durante los procesos de hidrólisis enzimática e hidrólisis ácida, se consideró la fórmula presentada en el trabajo de (Camacho, F; González-Tello, P; Guadix, 2000) la misma que toma en cuenta los valores obtenidos de nitrógeno total del aislado proteico y el contenido de nitrógeno amínico hidrolizado, dichos valores expresados en base seca , la ecuación es la siguiente:

$$\% \text{ DH} = \left(\frac{N^{\circ} \text{ de enlaces peptídicos hidrolizados}}{N^{\circ} \text{ total de enlaces peptídicos}} \right) * 100 \quad (\text{Ec.3})$$

3.5.1.6 Obtención del hidrolizado de proteína de quinua

Una vez determinado el mejor tratamiento de hidrólisis enzimática y ácida considerando el mayor porcentaje en el grado de hidrólisis, se trabajó en un volumen mayor al trabajado en las fases iniciales de la investigación, con los mejores parámetros de tiempos, temperatura, tipo de enzima, pH y concentración de H₂SO₄.

Terminada la hidrólisis ácida, se neutralizó con Ca(OH)₂ al 20 %, con agitación permanente por 10 min, luego se centrifugó por 15 min a 4000 r/min. Con el sobrenadante del proceso de centrifugado y en función del contenido de sólidos, se procedió a concentrar en un rotoevaporador marca Büchi modelo R-21, hasta llegar a la mitad del volumen inicial.

La solución concentrada, fue sometida a un proceso de secado por aspersión, en un Spray Dryer modelo B-290 marca Büchi, cuya temperatura de entrada fue de 120 °C y una temperatura de salida de 80 °C, una vez terminado el proceso, una muestra fue

sometida a un análisis de perfil de aminoácidos por cromatografía líquida de alto rendimiento con detección de fluorescencia HPLC/FLD, modelo UVD-218 marca Knalier.

3.5.1.7 Elaboración de la cápsula dura

El hidrolizado de proteína de quinua fue sometido a una prueba de fluidez (Índice de Hausner) tomando en cuenta la densidad aparente o de vertido con la densidad compactada o de asentamiento y una prueba de compresibilidad (Índice de Carr).

Se determinó la densidad de vertido, colocando el producto con peso conocido dentro de una probeta, lo que permitió tomar su volumen exacto, luego se determinó la densidad de asentamiento, a partir de levantar la probeta a una altura de 10 ± 5 cm e impactarla 250 veces sobre una superficie plana y suave, a ritmo constante.

Calculada la densidad de vertido y asentamiento, se procedió a calcular el Índice de Carr (Ec.4) y el Índice de Hausner (Ec.5); el proceso se repitió para el producto con la adición del 1% del aerosil, utilizado como un deslizante para optimizar el flujo de producto.

$$\% ICarr = \left(\frac{\rho_{asentamiento} - \rho_{vertido}}{\rho_{asentamiento}} \right) * 100 \quad (Ec.4)$$

$$\% IHausner = \left(\frac{\rho_{asentamiento}}{\rho_{vertido}} \right) \quad (Ec.5)$$

Los valores obtenidos fueron comparados con el Anexo7 para determinar las propiedades de flujo del hidrolizado de proteína de quinua.

Se usó cápsulas blandas de gelatina para la presentación final del producto.

3.5.2 Materiales y equipos

- Harina de quinua Lote 069, proveniente de la empresa Sumak Life (Ecuador)
- Ácido clorhídrico (HCl) 2 y 0,1 mol/L, UN 1789, Ficher Scientific
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 4 y 8 %, A300C-212, Ficher Scientific
- Hexano 359000ACS, PHARMCO-AAPER
- Formaldehído neutralizado (CH₂O) 37 %, F79-500, Ficher Scientific

- Hidróxido de sodio (NaOH) 2 mol/L, S318-500, Fisher Scientific
- Hidróxido de calcio (Ca(OH)₂) 20 %, C117, Fisher Scientific
- H₂O destilada
- Enzima Papaína (Carica Papaya), EC3.4.22.2, actividad 30000 USP-U/mg, Merck
- Enzima Proteasa neutral obtenida de *Bacillus subtilis*, GRANOZYME ACC, actividad 840 UHb/g, Granotec.
- Dióxido de silicio coloidal (SiO₂), Aerosil, Evonik
- Probetas de 10 y 100 ml
- Balones de aforo de 50 - 100 y 250 ml
- Espátulas
- Micropipetas (10-1000 µl)
- Pipetas de 2 - 5 y 10 ml
- Vidrio reloj
- Vasos de precipitación 50 - 250 - 500 y 1000 ml
- Bureta de 50 ml
- Agitadores magnéticos
- Papel parafilm
- Papel absorbente
- Pesetas plásticas.

Equipos

- Tamices U.S.A. Standard Test Sieve
- Agitador múltiple de giro uniforme, AM4, IKA
- Centrífuga, 32A, Hettich Rotofix
- Balanza, ME204, Mettler Toledo
- Termobalanza, MB200, Citizen

- Plancha magnética y agitadora, CB302, Stuart
- pH-metro, HI208, Hanna
- Rotoevaporador, R-21, Büchi
- Mini Spray dryer, B-290, Büchi

3.5.3 Número de tratamientos

3.5.3.1 Hidrólisis enzimática

Tabla 11. Número de tratamientos en la Hidrólisis enzimática

Tipo de enzima	pH	Tiempo de hidrólisis
Papaína (55 °C)	5	3 horas*
	6	
	7	
Proteasa neutral de <i>Bacillus subtilis</i> (65 °C)	6,5	
	7,5	

* Se toma una muestra cada hora durante el proceso de hidrólisis para el cálculo del grado de hidrólisis.

3.5.3.2 Hidrólisis ácida

Tabla 12. Número de tratamientos en la Hidrólisis ácida

Tipo de ácido	Concentración	Tiempo de hidrólisis
H ₂ SO ₄	4 %	8 horas*
	8 %	

* Se toma una muestra a las 4 - 6 y 8 horas durante el proceso de hidrólisis para el cálculo del grado de hidrólisis.

Del mejor tratamiento en la hidrólisis enzimática y ácida se repite el proceso en mayor volumen para continuar con el proceso de extracción de los aminoácidos.

3.5.4 Número de muestras

La fase experimental partió de una muestra de harina de quinua lote 069, de la cual se obtuvo la harina de quinua desengrasada, para continuar con el proceso descrito en la metodología.

3.6 Plan de procesamiento de la información

En la investigación, los datos obtenidos fueron tabulados para realizar los cálculos respectivos de nitrógeno amínico en base húmeda, en base seca y grado de hidrólisis, haciendo uso de paquetes informáticos como Excel, los resultados fueron presentados en tablas y gráficos para su mejor interpretación.

Se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.I para realizar un Diseño Factorial 2^2 , posteriormente se analizó las figuras que el programa facilita, tales como superficie de respuesta, diagramas de Pareto, para encontrar el mejor tratamiento y la verificación de las hipótesis, se la realizó a través de una prueba Anova.

Como instrumentos se usaron, el cuaderno de notas y la cámara fotográfica para evidenciar la evolución de toda la fase experimental.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Análisis e interpretación de los resultados

4.1.1 Granulometría y desengrasado de la harina de quinua

Se partió de harina de quinua orgánica con la siguiente composición:

Tabla 13. Análisis proximal harina de quinua % por cada 100 g.

Parámetro	%
Proteína	15,49
Humedad	5,59
Grasa	7,74
Ceniza	2,76
Carbohidratos	68,42
Sodio (mg/100g)	23,27
Cloruros (Cloruro de sodio)	0,06
Acidez (ácido láctico)	0,81

Fuente: Lab.OSP. Reporte del Lote 069 a la empresa Sumak Life

Como muestra la Tabla 13, la harina de quinua empleada en la investigación, presenta un 15,49 % de proteína, cuyo valor es superior al 13 % reportado por la FAO (2011) y Toapanta (2016). Este parámetro es importante por cuanto de él se obtendrán los aminoácidos.

En el proceso de tamizado la harina de quinua pasó un 82 % por el tamiz N° 60, cuyo diámetro de abertura corresponde a 250 μm , considerándose una harina semi-gruesa tal cual el trabajo de Toapanta (2016), en el cual, la harina que pasó el tamiz N° 60 fue del 86,26 % existiendo una diferencia de 4,26 % que puede deberse al tipo de equipo utilizado en el proceso de molienda.

La harina de quinua tamizada, fue sometida a un proceso de desengrasado que permita mejorar el grado de extracción de la proteína; para lo cual se partió de un peso inicial de 40 g, si se considera que dicha harina, tiene 7,74 % de grasa como se observa en la Tabla 13, el peso final esperado sería 36,904 g. si la eficiencia fuese del 100 %.

Los valores experimentales que se reportan en la Tabla 14

Tabla 14. Eficiencia en el proceso de desengrasado de la harina de quinua.

Peso final (g)	Eficiencia (%)
37,553	93,88
38,300	95,75
37,509	93,77
37,051	92,63
37,723	94,31
38,118	95,30
38,295	95,74
38,347	95,87
38,119	95,30
37,228	93,07
Promedio	94,56

Como se observa en la Tabla 14 se obtuvo un 94,56 % de eficiencia en el proceso de desengrasado con hexano, es decir que la harina de quinua no quedó totalmente libre de grasa.

4.1.2 Aislado proteico

El aislado proteico se obtuvo a partir de 75 g de harina de quinua desengrasada, considerando los mejores parámetros trabajados en la tesis de Toapanta (2016), las proteínas fueron solubilizadas a pH 8 y llevadas a una precipitación isoelectrica (pI) a pH 4.

La humedad obtenida en el aislado proteico de quinua fue del 71,05 %, la cual fue determinada en una termobalanza, los sólidos totales fueron del 28,95 %. Los valores experimentales se observan en la Tabla15 y los datos primarios en el Anexo 3.

Tabla 15. Rendimiento en la obtención del aislado proteico de la harina de quinua.

Aislado proteico en base seca (g)	Rendimiento %
3,247	4,329
3,316	4,421
3,455	4,606
3,385	4,513
3,133	4,178
3,205	4,274
3,498	4,664
3,656	4,875
3,101	4,135
Promedio	4,444

Como muestra la Tabla 15 el rendimiento que se obtuvo para el aislado proteico de quinua fue del 4,444 % en base seca.

Para conocer el porcentaje de nitrógeno total en el aislado, se procedió a determinarlo por el método de Kjeldahl; encontrando un valor de nitrógeno de 7,43 %, este valor fue tomado en cuenta para todos los cálculos posteriores como el número total de enlaces peptídicos en la (Ec.3).

4.1.3 Hidrólisis enzimática y Grado de Hidrólisis

En la hidrólisis enzimática se trabajó con papaína y proteasa de *Bacillus subtilis* de forma independiente, en distintos tiempos se tomó una muestra para medir el nitrógeno amínico. Se realizaron los cálculos del porcentaje de nitrógeno en base seca (Ec.2), para la enzima papaína y proteasa de *Bacillus subtilis*, los resultados se presentan en el Anexo 4.

Con el nitrógeno amínico en base seca se calculó y graficó el grado de hidrólisis (DH) (Ec.3) en función del tiempo, tanto para la enzima papaína como para la enzima proteasa de *Bacillus subtilis* como se puede observar en la Figura 1 y 2

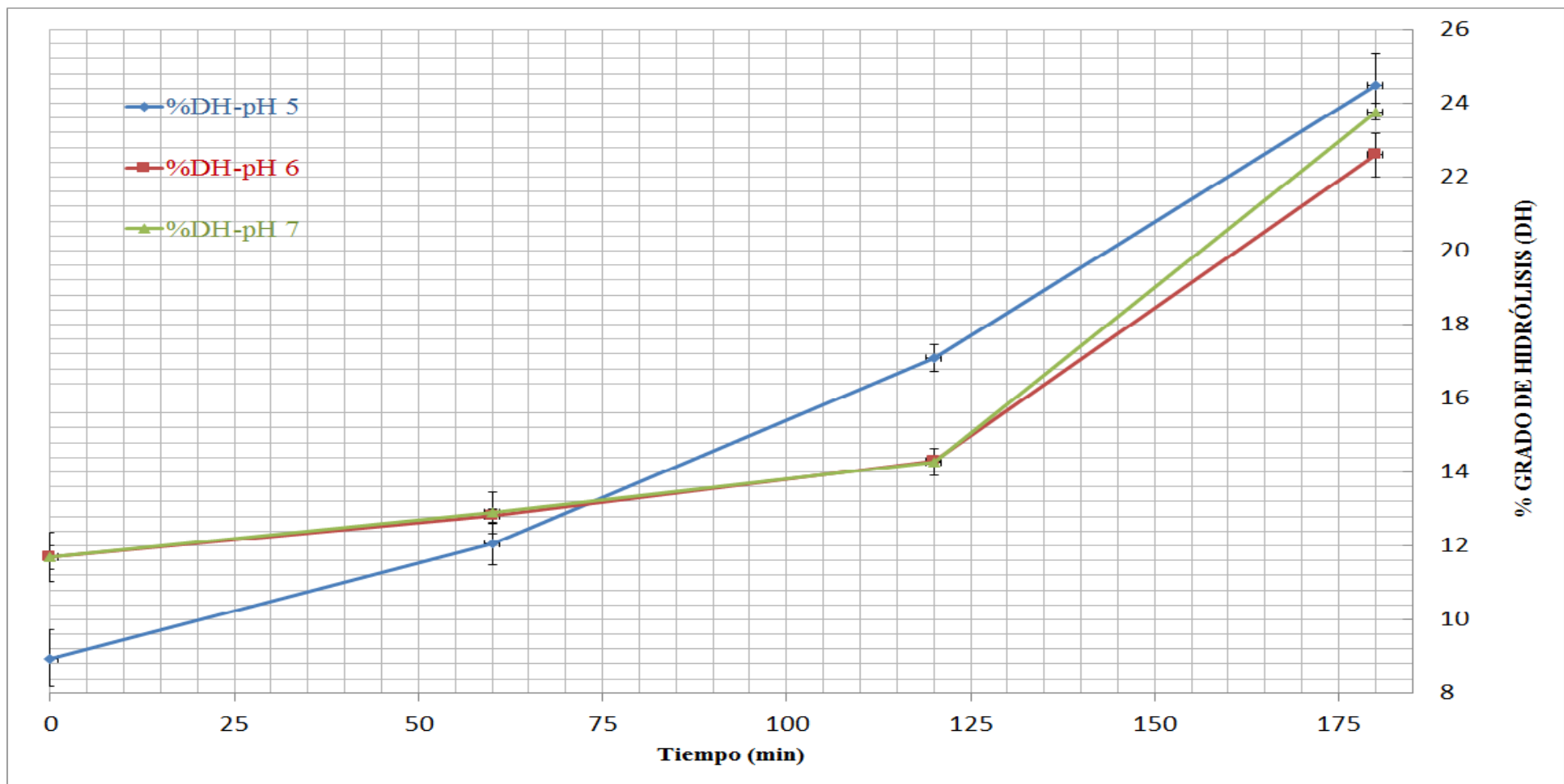


Figura 1. Grado de hidrólisis enzimática con papaína

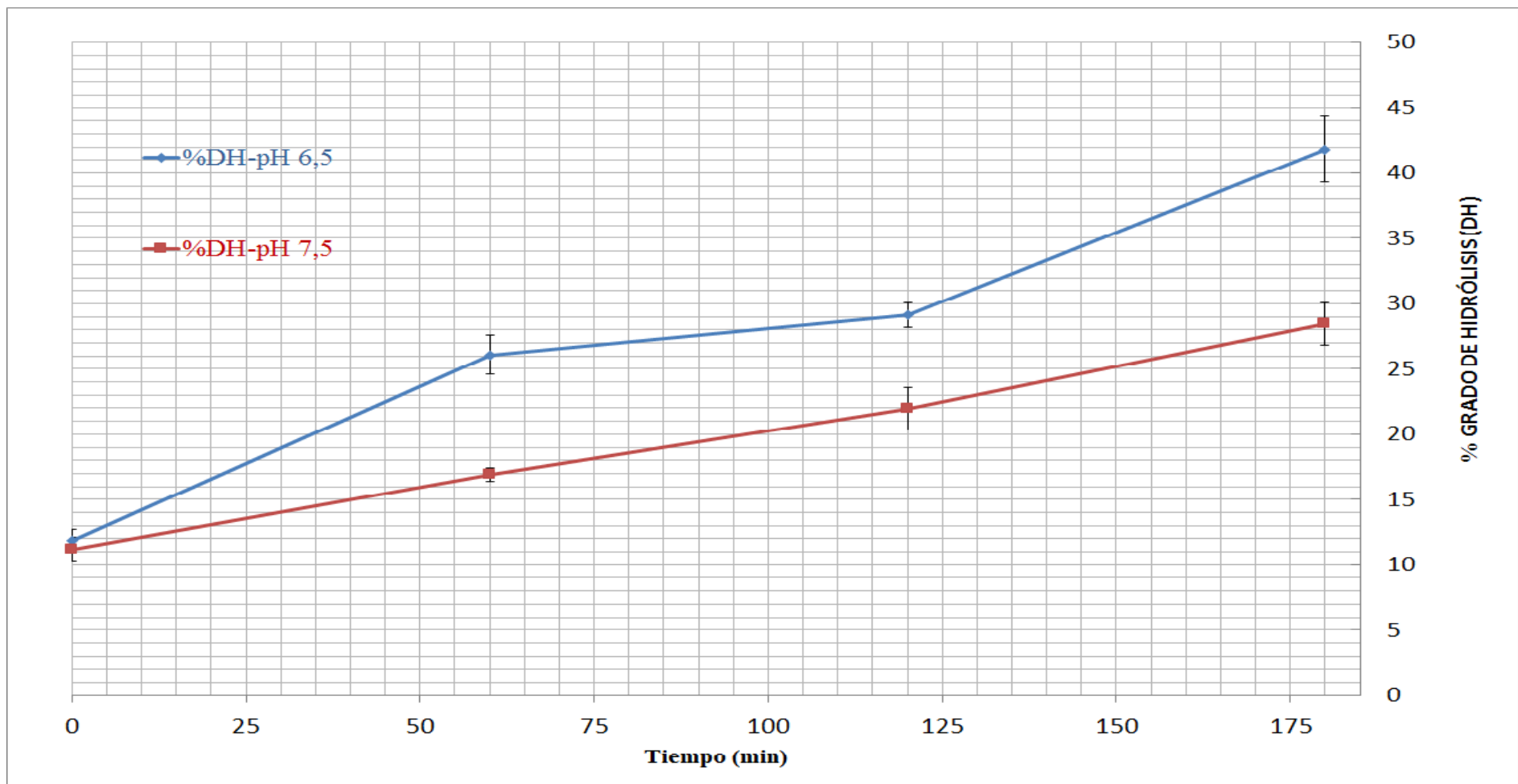


Figura 2. Grado de hidrólisis enzimática con proteasa de *Bacillus subtilis*

Las Figuras 1 y 2 muestran la misma tendencia de incremento en el grado de hidrólisis (DH) conforme el tiempo aumenta. En la Figura 1 se observa que en el proceso de hidrólisis con la enzima papaína se alcanzó un DH de 24,5 % a un pH 5 y a pH 7 el DH fue muy cercano 23,8 % en un tiempo de 180 min; sin embargo con la enzima proteasa de *Bacillus subtilis*, se alcanzó el mejor DH 41,8 % a un pH de 6,5 y 180 min de hidrólisis como lo muestra la Figura 2

A partir de los valores del grado de hidrólisis alcanzados con papaína a pH 5, 6 y 7 durante 3 horas de hidrólisis y 65 °C, se realizó el análisis estadístico, los resultados se presentan en la Figura 3. y los datos primarios en el Anexo 5.

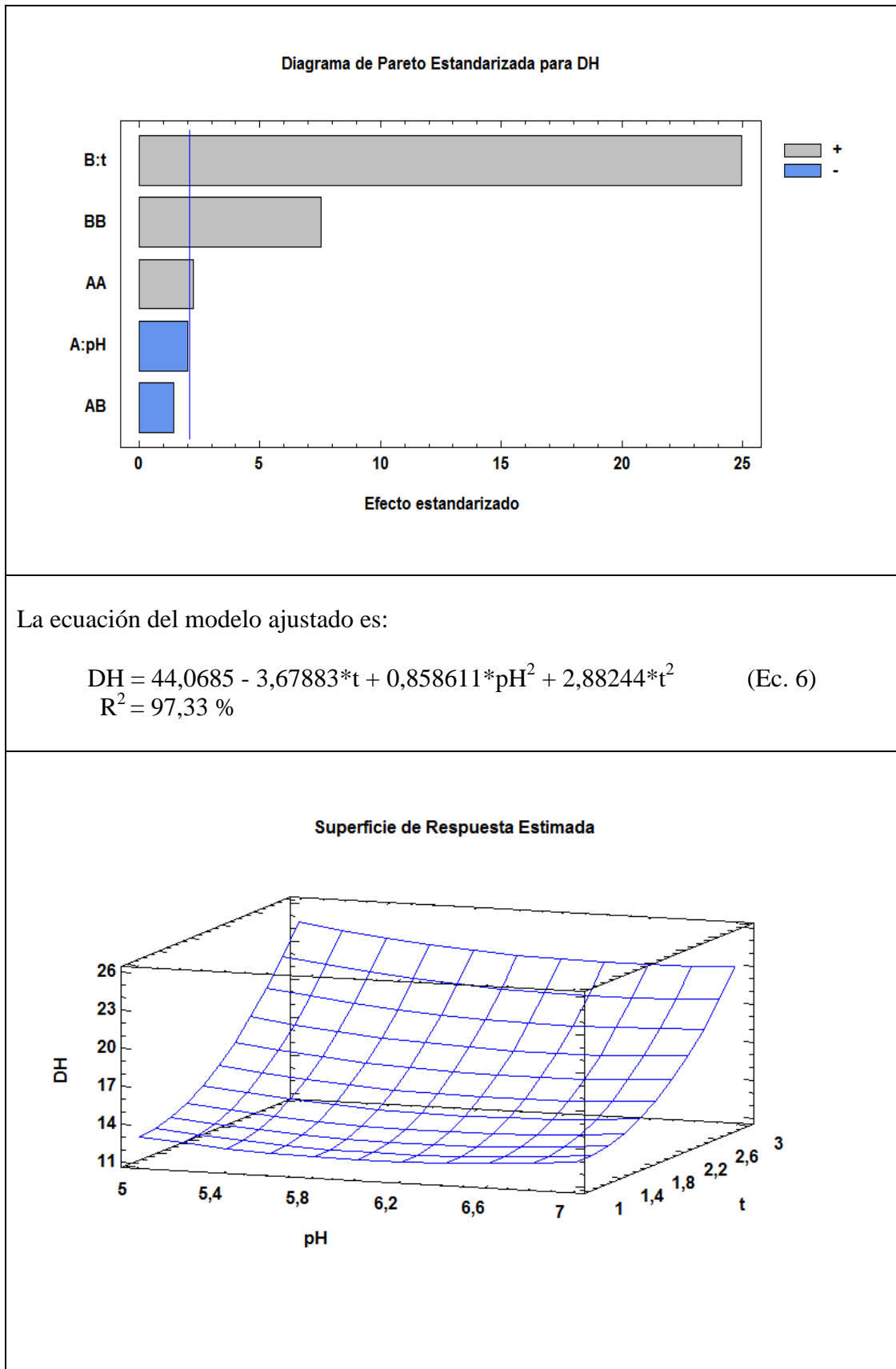


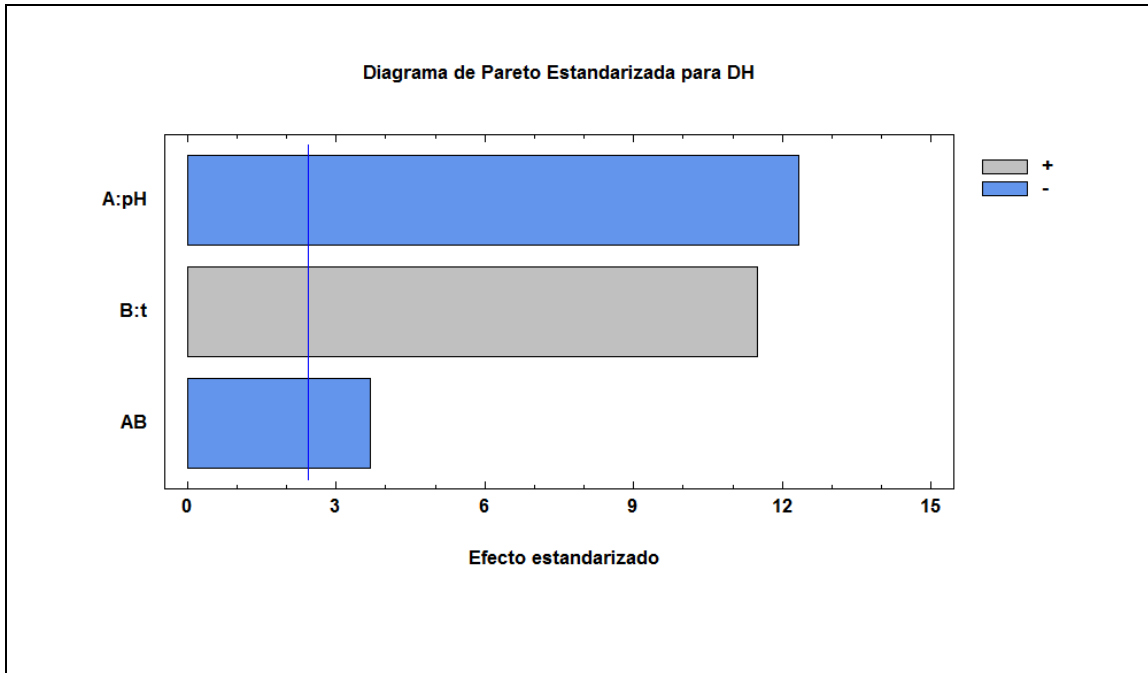
Figura3. Diagrama de Pareto y de superficie de respuesta para la hidrólisis enzimática con papaína.

En la Figura 3, el diagrama de Pareto muestra claramente y de manera estandarizada, la influencia en la variable respuesta grado de hidrólisis (DH), ante los cambios en las variables tiempo y pH; se confirma que el tiempo durante la hidrólisis enzimática con papaína es la variable que mayor predominio tiene sobre el DH.

La variable A (pH) y la interacción AB (pH-tiempo) no sobrepasan el límite estadístico, representan un aporte insignificante, por lo cual no aparecen en la ecuación de regresión (Ec.6) que representa al sistema; sin embargo el efecto cuadrático del pH (BB) y el tiempo (AA) si influyen sobre la variable respuesta.

La gráfica tridimensional obtenida del análisis de superficie de respuesta estimada, indica el comportamiento de las variables pH y tiempo en el proceso, demostrando que el tiempo posee un efecto positivo imponente sobre la hidrólisis enzimática, mientras que el pH no presentó significancia, pues no es apreciable ningún tipo de cambio de la curvatura. Sin embargo, son estas dos variables y su efecto cuadrático las necesarias para realizar el proceso de optimización el cuál fue a pH 5 y 3 horas para obtener un 24,5 % en el grado de hidrólisis.

Los resultados del análisis estadístico con los valores del grado de hidrólisis alcanzados, al realizar el proceso con la enzima proteasa de *Bacillus subtilis* a pH 6,5 y 7,5 durante 3 horas a 55 °C, se presentan en la Figura 4 y los datos primarios en el Anexo 5.



La ecuación del modelo ajustado es

$$DH = -29,4528 + 5,11567 * pH + 52,7443 * t - 6,16467 * pH * t \quad (\text{Ec. 7})$$

$$R^2 = 98,07 \%$$

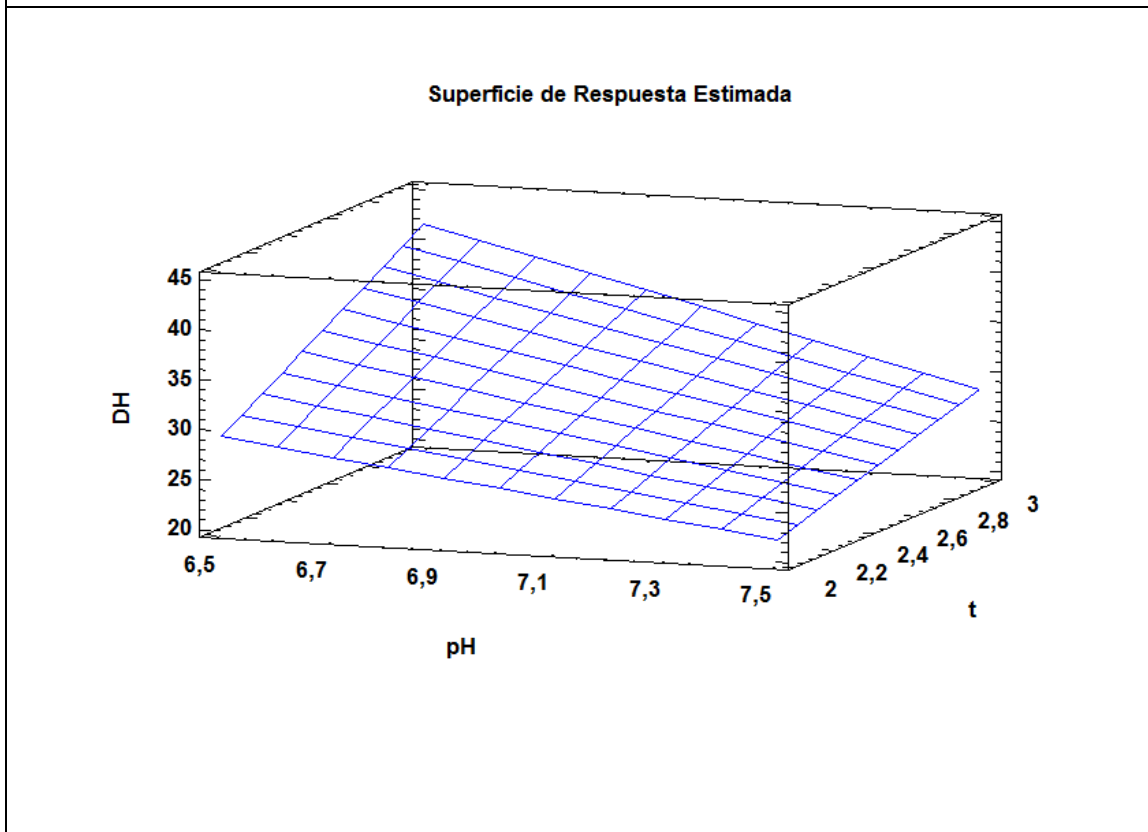


Figura 4. Diagrama de Pareto y de superficie de respuesta para la hidrólisis enzimática con proteasa de *Bacillus subtilis*

En la Figura 4, el diagrama de Pareto muestra que la variable respuesta (DH) en la hidrólisis enzimática con proteasa de *Bacillus subtilis* se ve significativamente influenciada por la variable A (pH), seguida por la variable B (tiempo), mientras que la interacción AB (pH-tiempo) tiene una influencia menor, se observa que las dos variables y la interacción sobrepasan el límite estadístico, por lo cual aparecen en la ecuación de regresión (Ec.7) que representa al sistema.

La gráfica tridimensional obtenida del análisis de superficie de respuesta estimada, indica que el mayor valor del grado de hidrólisis se alcanzó al trabajar a pH 6,5, durante 3 horas a 55 °C, con un valor de 41,8 % cumpliendo con lo especificado en la ficha técnica del producto (Anexo 2) que muestra un rango de actividad entre 6,5 y 8,5.

4.1.4 Hidrólisis ácida

En función de los grados de hidrólisis obtenidos con los dos tipos de enzimas se seleccionó como óptima aquella que permitió alcanzar el 41,8 % (proteasa de *Bacillus subtilis*) para continuar con la hidrólisis ácida, la misma que se realizó con dos concentraciones distintas 4 y 8 % de H₂SO₄, 8 horas de hidrólisis a 110 °C de temperatura.

Con el nitrógeno amínico en base seca se calculó y graficó el grado de hidrólisis (DH) en función del tiempo, para las dos concentraciones, como se puede observar en la Figura 5. Los datos primarios se presentan en el Anexo 4.

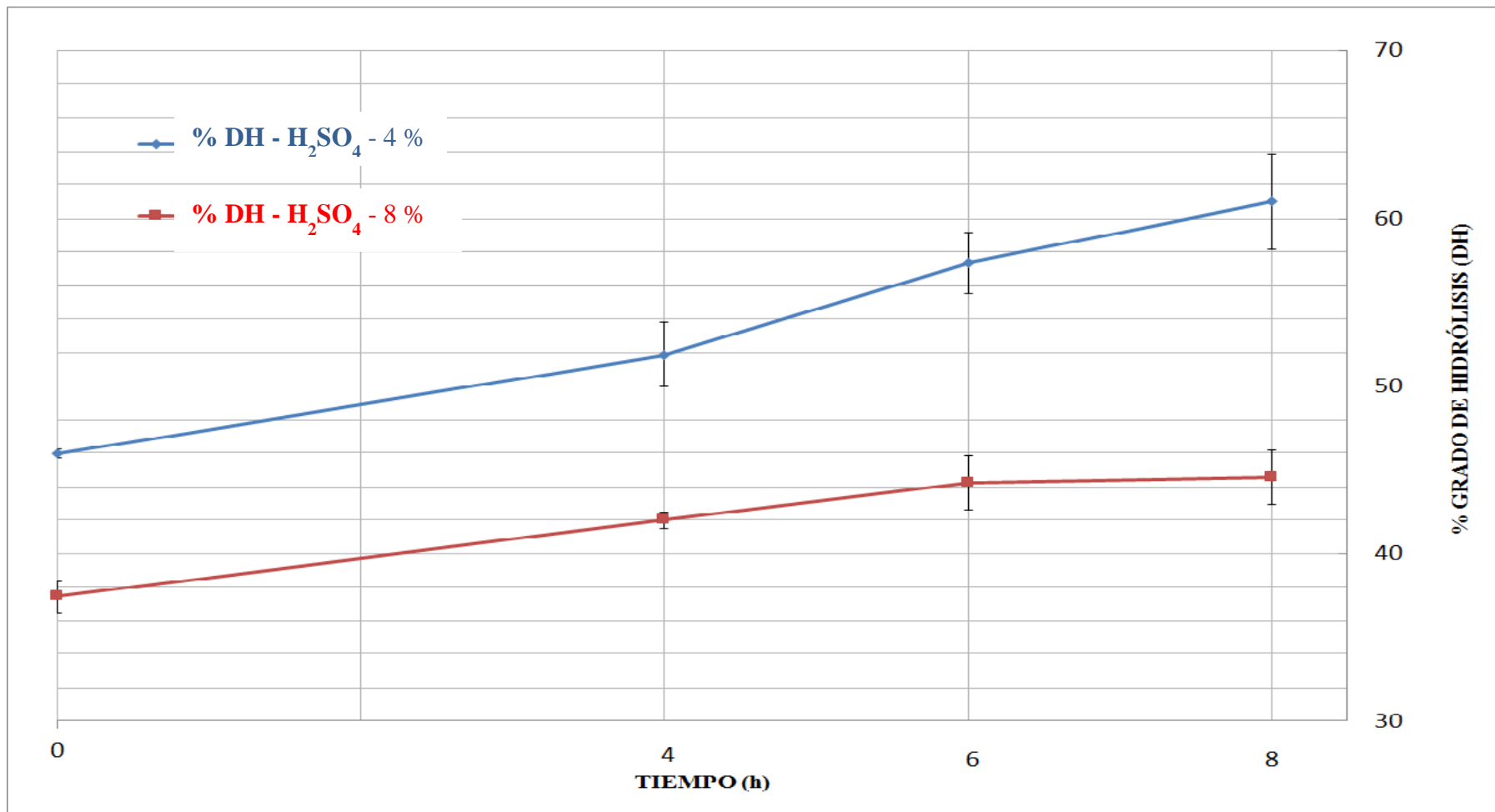
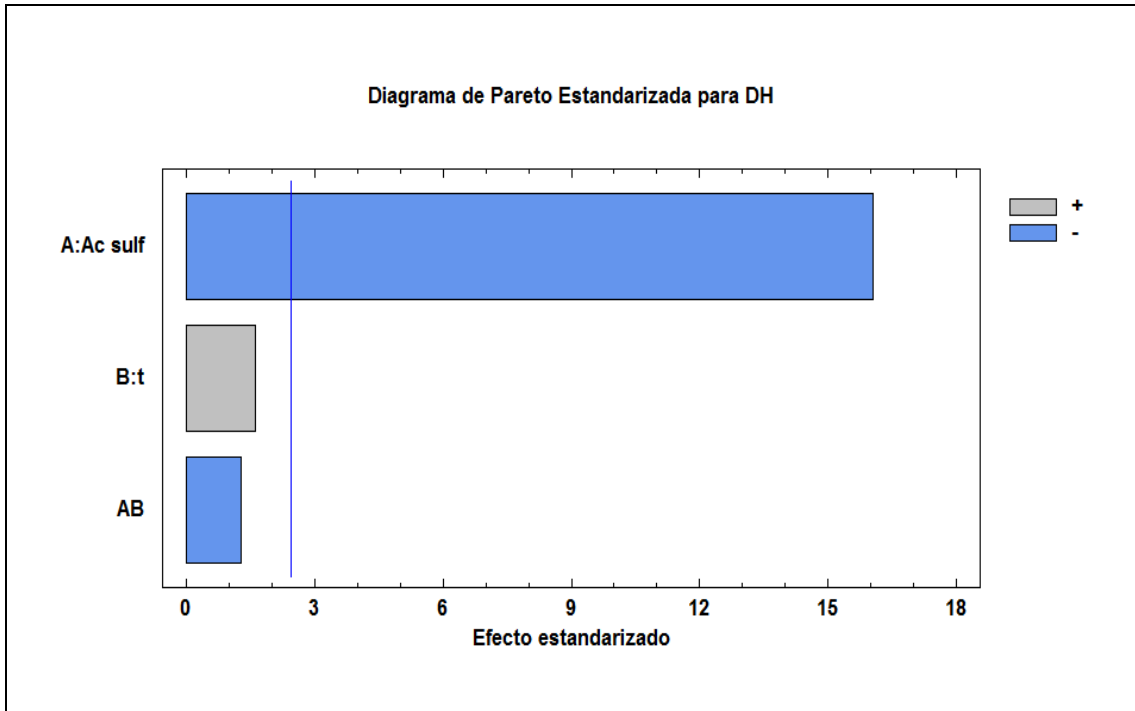


Figura 5. Grado de hidrólisis ácida

En la Figura 5, se observa que con el 4 % de H_2SO_4 se alcanzó el 61 % del DH, valor superior al obtenido con la concentración del 8 % de H_2SO_4 donde se obtuvo un 44,5 % del DH, ligeramente superior al obtenido con la enzima proteasa de *Bacillus subtilis*, cuyo valor fue 41,8 % del DH, consiguiendo así hidrolizar en su mayor grado al aislado proteico de quinua del que se partió.

El H_2SO_4 es un ácido fuerte, al experimentar en este trabajo con dos concentraciones distintas, se observó que el 8 % de H_2SO_4 alcanzó un grado de hidrólisis menor que la concentración del 4 % de H_2SO_4 ; esto se puede explicar debido a que el estado nativo de una molécula de proteína es termodinámicamente el más estable, con la menor energía libre posible en las condiciones fisiológicas adecuadas; cualquier cambio en este ambiente como modificaciones de pH, fuerza iónica, temperatura, composición del disolvente, forzarán a la molécula a asumir una nueva estructura, Fennema (2005), es decir hubo una desnaturalización de la proteína por lo que solo se alcanzó el 44,5 % del DH. Además otras investigaciones de hidrólisis ácidas indican que mientras más alta es la concentración de ácido, existe un valor de temperatura por encima del cual la proteína puede verse afectada de manera negativa, llegando a desnaturalizarse. Quintero et al (2017)

A partir de los valores del grado de hidrólisis alcanzados con las dos concentraciones de H_2SO_4 y 8 horas de hidrólisis, se realizó el análisis estadístico, los resultados se presentan en la Figura 6 y los datos primarios en el Anexo 5.



La ecuación del modelo ajustado es

$$DH = 56,7677 - 1,68633 \cdot H_2SO_4 \quad (\text{Ec. 8})$$

$$R^2 = 97,78 \%$$

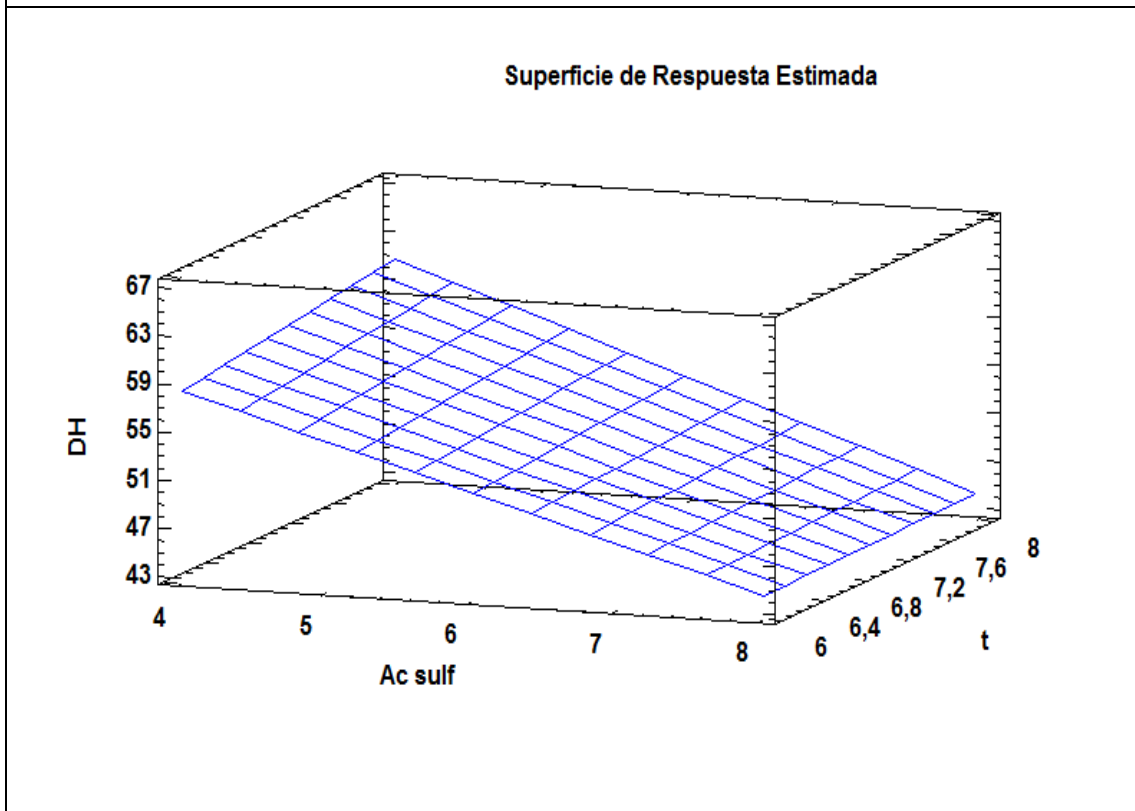


Figura 6. Diagrama de Pareto y de superficie de respuesta para la hidrólisis con H_2SO_4

En la Figura 6, el diagrama de Pareto muestra que la variable A (concentración de H_2SO_4) es la única que influye significativamente en el grado de hidrólisis, no así la variable B (tiempo) ni la interacción AB (concentración – tiempo), representando un aporte insignificante, por lo cual no aparecen en la ecuación de regresión (Ec.8) que representa al sistema.

En la gráfica tridimensional obtenida del análisis de superficie de respuesta estimada, demuestra que la concentración de H_2SO_4 posee un efecto imponente sobre la hidrólisis ácida, mientras que el tiempo no presentó significancia; sin embargo, son estas dos variables las necesarias para realizar el proceso de optimización el cuál se obtuvo al trabajar con una concentración del 4 % H_2SO_4 y 8 horas de hidrólisis, alcanzándose un valor máximo del 61 % del grado de hidrólisis.

Según lo expuesto en el trabajo de Camacho et al (2000) la relación entre el nitrógeno amínico y el nitrógeno total (AN/TN) en los aminoácidos va de 0,8 a 0,9 y un peso molecular (MW) entre 75 y 200 Da; para el caso de los péptidos la relación AN/TN va de 0,5 a 0,8 y el peso molecular entre 200 y 500 Da; obteniéndose en este trabajo una relación de AN/TN de 0,6 lo que equivale al 61 % del grado de hidrólisis; el hidrolizado de proteína de quinua, pertenece a un hidrolizado extensible, según lo expuesto en el trabajo de Munive (2010) el cual, se supone por el grado de hidrólisis que está formado por aminoácidos libres o péptidos pequeños (di y tripéptidos) con pesos moleculares bajos. Los hidrolizados extensibles tienen reducida alergenicidad, por lo que el hidrolizado de proteína de quinua podría usarse en fórmulas hipoalérgicas.

Hay que tener presente que no es conveniente que las dietas estén constituidas sólo por aminoácidos libres, ya que esta condición las hace hiperosmóticas, provocando secreción intestinal y diarrea. Los estudios actuales del mecanismo de la absorción intestinal indican que los di- o tripéptidos se absorben con mayor facilidad que los aminoácidos libres Camacho et al. (2000).

4.1.5 Obtención del hidrolizado de proteína de quinua

La segunda fase se inició con un peso de 95,45 g de aislado proteico de quinua en base húmeda, tomando en cuenta los mejores parámetros, en la hidrólisis enzimática pH 6,5, 3h de hidrólisis, 55 °C y con la enzima proteasa de *Bacillus subtilis*; y en la hidrólisis ácida, solución al 4 % de H_2SO_4 , 110 °C y 8 horas, para optimizar el grado de hidrólisis.

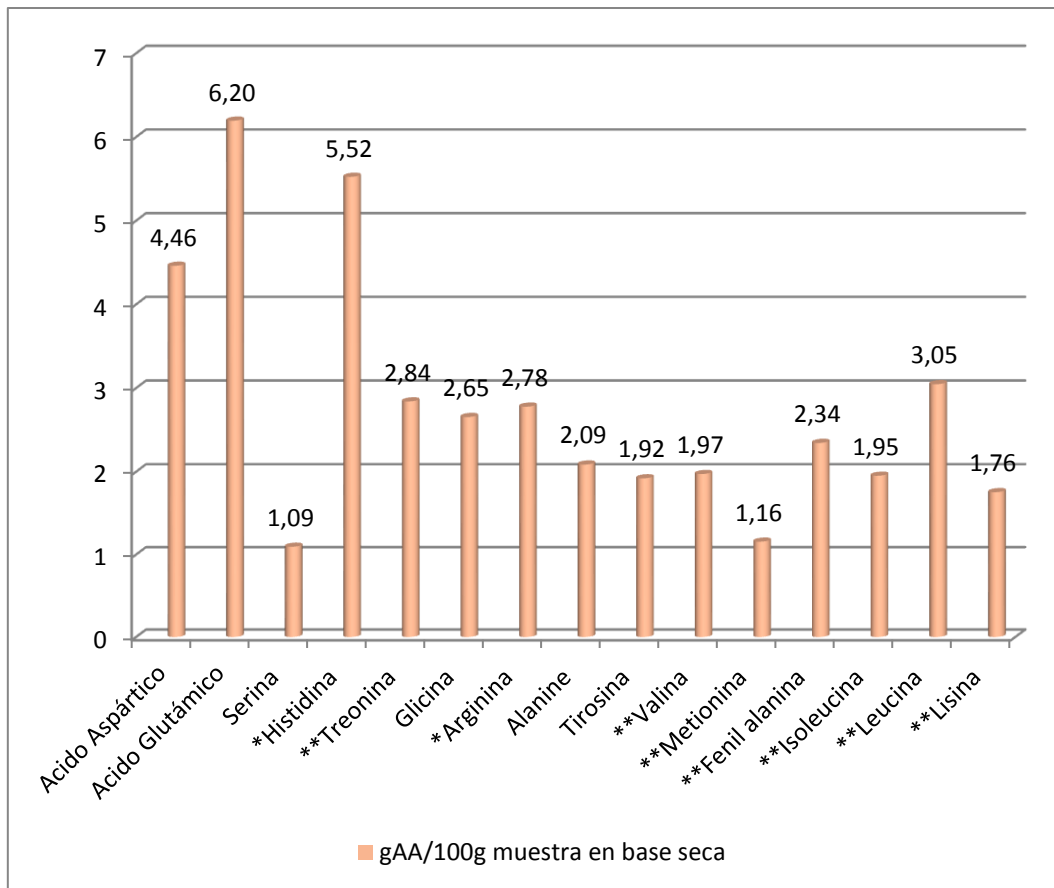
Terminada la hidrólisis ácida, se obtuvo 750 ml del hidrolizado neutralizado que se concentró hasta llegar a la mitad del volumen inicial.

La solución concentrada, se secó por aspersión, considerando una temperatura de entrada de 180 °C y una temperatura de salida de 85 °C, temperaturas que se encuentran dentro del rango de trabajo del Spray Dryer y en función de los sólidos del producto a secar Gil Garzón (2011) una vez terminado el proceso, se obtuvo 36,4 g de hidrolizado de proteína de quinua, en forma de un polvo fino de color blanco, cuyo sabor no es amargo.

El proceso detallado en una memoria fotográfica se encuentra resumido en el Anexo 9

El hidrolizado de proteína de quinua, fue caracterizado a través de un análisis de cromatografía líquida (HPLC/FLD), permitiendo determinar algunos de los aminoácidos presentes en el producto.

La composición de los aminoácidos determinados se muestra en la Figura 7 y los datos primarios en el Anexo 7



*Aminoácidos semiesenciales, **Aminoácidos esenciales

Figura 7. Perfil de aminoácidos del Hidrolizado de quinua

Los aminoácidos que se encuentran con doble asterisco en la Figura 7 corresponden a los aminoácidos esenciales, de los cuales los más representativos son la leucina y la treonina con 3,05 y 2,84 % respectivamente, el aminoácido esencial triptófano no se encuentra presente, debido a que es sensible al tratamiento de hidrólisis ácida, como lo indica Navarro et al (2012), los aminoácidos histidina 5,52 % y arginina 2,78 % se consideran semiesenciales, los demás corresponden a los aminoácidos no esenciales de los cuales la tirosina 1,92 % es importante en mujeres embarazadas y niños según Wu (2009) siendo el más representativo el ácido glutámico con 6,2 %. No se determinaron los aminoácidos no esenciales prolina, asparagina, cisteína y glutamina, al no contar con los patrones para la cuantificación de dichos aminoácidos.

A continuación en la Tabla 16 se presenta una comparación entre el perfil de aminoácidos obtenidos en el hidrolizado de proteína de quinua con los valores de harina de quinua de origen argentino reportado por Cervilla et al. (2012)

Tabla 16. Perfil de aminoácidos del Hidrolizado de proteína de quinua Vs. Harina de quinua de origen argentino

Aminoácidos	gAA/100 g proteína hidrolizada	gAA/100 g proteína Harina de quinua
Acido Aspártico	4,5	7,1
Acido Glutámico	6,2	12,0
Serina	1,1	1,0
Histidina	5,5	7,6
Treonina	2,8	2,9
Glicina	2,7	5,6
Arginina	2,8	ND
Alanine	2,1	4,1
Tirosina	1,9	2,4
Valina	2	4,7
Metionina	1,2	0,9
Fenil alanina	2,3	3,6
Isoleucina	2	3,6
Leucina	3,1	6,0
Lisina	1,8	5,0

Los valores reportados son aminoácidos totales en base seca

Al comparar los valores de la Tabla 16 se observó que el contenido de aminoácidos en 100 gramos de proteína es similar para serina, treonina, tirosina, metionina y fenil alanina, los demás aminoácidos presentan diferencia, principalmente porque el hidrolizado de proteína de quinua fue tratado con dos ácidos fuertes, H₂SO₄ en la hidrólisis ácida y HCl en la determinación de los aminoácidos, también podría atribuirse a variaciones en la expresión genómica ocasionada por las condiciones medioambientales, climáticas y del suelo que influyen de manera directa sobre la composición química de los vegetales. Cervilla et al. (2012)

Sin embargo hay que considerar que el perfil de aminoácidos de esta investigación es en proteína hidrolizada por cuanto la asimilación de dichos componentes es mayor al tener estructuras más pequeñas con pesos moleculares menores en comparación con una matriz proteica sin hidrolizar, según lo expuesto por Sun (2011)

4.1.6 Elaboración de las cápsulas duras

El hidrolizado de proteína de quinua tuvo un 3,15 % de humedad el cual se encuentra en el rango establecido (3 – 5 %) para los polvos que se usarán en cápsulas duras, según Robles (2011)

El índice de compresibilidad (ICarr) y el índice de Hausner son medidas que expresan la propensión de un polvo a la compresión, siendo medidas de la capacidad de asentamiento de un polvo y permiten evaluar la importancia relativa de las interacciones entre partículas Farmacopea Mexicana (2016) en la Tabla 17 se presentan los rangos.

Tabla 17. Índice de compresibilidad e índice de Hausner

Índice de Carr	Propiedades de flujo	Índice de Hausner
5 a 11	Excelentes	1,00 a 1,11
12 a 17	Buenas	1,12 a 1,18
18 a 22	Aceptables	1,19 a 1,34
26 a 31	Pobres	1,35 a 1,45
35 a 38	Muy pobres	1,46 a 1,59
> 38	Extremadamente malas	> 1,60

Fuente: Farmacopea Mexicana (2016)

Los resultados de las pruebas de compresibilidad y fluidez, realizados tanto al hidrolizado de proteína de quinua solo como al hidrolizado con el 1 % de aerosil como excipiente, se presentan en la Tabla 18.

Tabla 18. Índice de Carr e Índice de Hausner

Parámetro	Hidrolizado sin aerosil	Hidrolizado con aerosil
ρ_v (g/ml)	0,30	0,30
ρ_a (g/ml)	0,45	0,41
ICarr %	33	28
IHausner	1,49	1,40

ρ_v : densidad de vertido, ρ_a : densidad de asentamiento

Al comparar los Índices de Carr y de Hausner de la Tabla 18 con los reportados en la Tabla 17 se puede observar que las propiedades del flujo para el hidrolizado de

proteínas de quinua está entre pobre y muy pobre, ya que el Índice de compresibilidad fue 33 % y el Índice de Hausner 1,49; al añadir 1 % de aerosil como deslizante para mejorar el flujo del producto, el Índice de compresibilidad bajó a 28 % y el Índice de Hausner 1,40 como muestra la Tabla 17, sin embargo a pesar de ser la cantidad máxima permitida por el Handbook of Pharmaceutical Excipients Coleman, (2006) el porcentaje del excipiente no permite pasar a un rango aceptable donde el Índice de compresibilidad debe estar entre 18 – 22 y el Índice de Hausner entre 1,19 – 1,34 según lo reportado por Farmacopea Mexicana (2016). Para mejorar estos índices se podría probar con otro tipo de excipientes.

El llenado de las cápsulas se realizó manualmente por tratarse de una fase experimental en la que la cantidad obtenida está muy por debajo de la capacidad de cualquier encapsuladora.

4.1.6.1 Formulación de la cápsula dura

La cápsula como forma farmacéutica sólida que contiene el hidrolizado de proteína de quinua (principio activo), tiene una cubierta soluble de gelatina, el formato de la cápsula es 0E, con una capacidad de 250 mg

Cada cápsula de 250 mg, está formada por el 1 % de aerosil (2,5 mg) y el 99 % de hidrolizado de proteínas de quinua (121,98 mg de aminoácidos esenciales y 125,52 mg de aminoácidos no esenciales). Los datos primarios para el cálculo en miligramos de aminoácidos por cada gramo de proteína hidrolizada, se muestran en el (Anexo 8) calculados a partir del reporte del laboratorio UBA sobre el perfil de aminoácidos (Anexo 7).

Si se toma en cuenta que el requerimiento de la FAO es de 309 mg de aminoácidos esenciales Martinez et al. (2006), cada cápsula de 250 mg de hidrolizado de proteína de quinua aporta con un 39,47 % de dicho requerimiento, por lo que las cápsulas serían suministradas dependiendo de la necesidad de cada persona, teniendo presente que estos aminoácidos están biodisponibles al tratarse de una proteína hidrolizada.

4.2 VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS

4.2.1 Rendimiento de la extracción de aminoácidos libres a partir de quinua orgánica – Hidrólisis enzimática:

El análisis de varianza (nivel de confianza 95 %) realizado a la variable de respuesta (grado de hidrólisis y nitrógeno amínico), arrojó que las variables pH y tiempo en la hidrólisis enzimática con proteasa de *Bacillus subtilis*, influyeron significativamente en el grado de hidrólisis (Anexo 6)

4.2.2 Rendimiento de la extracción de aminoácidos libres a partir de quinua orgánica – Hidrólisis ácida:

El análisis de varianza (nivel de confianza 95 %) realizado a la variable de respuesta (grado de hidrólisis y nitrógeno amínico), arrojó que la variable concentración de H₂SO₄ fue la única que influyó significativamente en el grado de hidrólisis (Anexo 6)

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- Se obtuvo un hidrolizado de quinua con una relación entre el nitrógeno amínico y el nitrógeno total (AN/TN) de 0,6 equivalente a un grado de hidrólisis del 61 %, éste resultado se alcanzó mediante una combinación de hidrólisis enzimática con proteasa de *Bacillus subtilis* (1 g de enzima/100 g de aislado en base seca) a 55 °C, pH 6,5 y 3 horas de hidrólisis, consiguiendo 41,82 % de grado de hidrólisis, seguido de una hidrólisis ácida con una solución al 4 % de H₂SO₄, 110 °C y 8 horas de hidrólisis para completar un 61 % en el grado de hidrólisis. Convirtiendo al producto hidrolizado en una importante fuente de nitrógeno, aplicable como un suplemento alimenticio directo o como ingrediente funcional de otros productos.
- Se caracterizó el hidrolizado obtenido, determinando su perfil de aminoácidos mediante cromatografía líquida, permitiendo identificar los aminoácidos presentes. Por cada gramo del hidrolizado de proteína de quinua se tiene el 49,28 % de aminoácidos esenciales y el 50,72 % de aminoácidos no esenciales. Las características físicas del hidrolizado de quinua son: polvo fino, color blanco – crema, sin olor, sabor neutro, y no es amargo lo que indica que el proceso de hidrólisis enzimática y ácida fueron favorables.
- Se desarrolló una formulación nutricional de aminoácidos en una presentación de cápsula dura de 250 mg la misma que contiene 121,98 mg de aminoácidos esenciales y 125,52 mg de aminoácidos no esenciales, aportando así con un 39,47 % del requerimiento establecido por la FAO.

5.2 RECOMENDACIONES

- Estudiar la cinética de las reacciones con enzimas endopeptidasas y exopeptidasas, que permitan observar si el grado de hidrólisis se mejora al tener una acción de las enzimas sobre los enlaces peptídicos internos y externos de las proteínas, analizando otros factores importantes en los procesos de hidrólisis tales como concentraciones de enzima, concentración de sustrato, inhibidores, activadores y fuerza iónica.
- Realizar estudios de factibilidad, apuntando hacia las futuras tecnologías que permitan bajar los costes y mejorar la accesibilidad del producto, permitiendo que el suplemento esté al alcance de la mayoría de la población.
- Determinar los pesos moleculares en el hidrolizado de quinua para ratificar que se encuentran en el grupo de di y tripéptidos.
- Realizar estudios para determinar el tamaño molecular de los péptidos y su absorción.
- Desarrollar formulaciones con el ingrediente obtenido en este trabajo.

CAPÍTULO VI

PROPUESTA

6.1 DATOS INFORMATIVOS

6.1.1 TEMA

“Cinética de reacción de la hidrólisis enzimática, en el aislado proteico de quinua”

6.1.2 INSTITUCIÓN EJECUTORA

Universidades

6.1.3 BENEFICIARIOS

Los beneficiarios de esta propuesta serán: los estudiantes de maestría que estén interesados en temas de investigación relacionados a la cinética de reacción en un proceso de hidrólisis enzimático; las industrias de cereales como potenciales usuarios de estos procesos y los consumidores al tener productos hidrolizados de alta calidad proteica asimilable.

6.1.4 UBICACIÓN

El desarrollo de la investigación, dependerá de la Universidad ejecutora.

6.1.5 TIEMPO ESTIMADO DE EJECUCIÓN

8 meses

6.2 ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

La mayoría de las investigaciones relacionadas al estudio de la hidrólisis enzimática de proteínas consisten en encontrar las condiciones de operación óptimas en las que se lleva a cabo el proceso, con la finalidad de que dichos hidrolizados sean llevados a la producción industrial.

Pocos trabajos investigan la cinética de la reacción, en función de encontrar la ecuación de velocidad considerando las variables del proceso, que permita el diseño del correspondiente reactor, este tipo de investigaciones permite tener un mayor conocimiento y control de la etapa hidrolítica. Esto se debe fundamentalmente a dos razones: la complejidad de la reacción (rotura simultánea de enlaces de distinta reactividad, productos que son a su vez sustrato para el proceso, inhibición e inactivación de la enzima, etc.) y su importancia económica, que determina un mayor interés por el desarrollo y patentado de procesos comerciales. Camacho et al. (2000).

6.3 JUSTIFICACIÓN

Estudiar la cinética de reacción en el proceso de hidrólisis enzimática es de importancia por cuanto permitirá conocer con mayor certeza y eficiencia los parámetros que influyen en la hidrólisis, así se podrá optimizar el proceso.

Analizar distintos tipos de enzimas en función de los parámetros que influyen en su cinética de reacción como son concentración de la enzima y sustrato, pH, temperatura y tiempo, son condiciones que permitirán encontrar la mejor cinética de reacción y por tanto facilitar investigaciones futuras.

Encontrar condiciones adecuadas en un proceso de hidrólisis enzimática permitirá obtener mayores rendimientos en la obtención de proteínas hidrolizadas, al mismo tiempo que mantendrá las características funcionales de las mismas; esto llevará a que sea desarrollada una tecnología atractiva para el sector industrial que se beneficiará al tener productos alternativos, funcionales y accesibles.

6.4 OBJETIVOS

6.4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la cinética de reacción de la hidrólisis enzimática, en el aislado proteico de quinua.

6.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar el efecto de la concentración de la enzima, sobre la ecuación de velocidad en el proceso de hidrólisis enzimática, en un aislado proteico de quinua.
- Relacionar el efecto del tiempo y temperatura, con la ecuación de velocidad en el proceso de hidrólisis enzimática, en un aislado proteico de quinua.

6.5 ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

La propuesta presentada es factible y de carácter investigativo, que contribuirá no solo a los estudios ya realizados en este trabajo, sino a todos los estudios referentes al tema de cinética de reacción enzimática, existiendo información relevante que puede servir de apoyo para la investigación propuesta.

Factibilidad social: la investigación propuesta presenta un fondo social, debido a que se trabaja con un producto nativo del Ecuador (la quinua) cuya siembra involucra a más de 1600 familias agricultoras de los cantones de la Zona 3 del país, cantidad que se incrementaría si se toma en cuenta todas las zonas del Ecuador donde se cultiva quinua.

Factibilidad económica: la investigación propuesta no presenta un costo elevado en su realización, el tesista tendría un gasto aproximado de \$3000 en insumos y reactivos para la realización de la misma, tomando en cuenta que se podría buscar financiamiento con el Ministerio de Agricultura y Ganadería, ya que este ministerio ha impulsado la siembra de la quinua en el país. La investigación también presenta un beneficio económico a las empresas que trabajan con la quinua por cuanto una vez encontradas las condiciones óptimas para el proceso de hidrólisis podrían incursionar en la elaboración de dicho producto, diversificando así su cartera de productos.

6.6 FUNDAMENTACIÓN

Hidrólisis enzimática

Los procesos de hidrólisis proteica, se basan en la rotura de los enlaces peptídicos y en consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres. La rotura de estos enlaces puede producirse por métodos químicos (con ácidos o bases) o biológicos (con enzimas).

En la producción de hidrolizados con características nutricionales se prefiere los métodos enzimáticos, ya que la hidrólisis enzimática, se realiza en condiciones moderadas de pH y temperatura (pH 5 - 9; temperaturas entre 40 – 60 °C), garantizando una mayor pureza de los péptidos o aminoácidos; presenta otras ventajas con respecto a los métodos físico-químicos, tales como la rapidez de las reacciones, la especificidad de las enzimas, que incrementan la eficiencia del proceso dando lugar a productos con características funcionales definidas (Vioque, et al. (2001).

Enzimas y actividad enzimática.

Una enzima es una proteína de origen natural que cataliza reacciones biológicas con un alto grado de especificidad. Debido a su naturaleza proteica, a las enzimas les afectan los mismos factores que a las proteínas: temperatura, solventes, sales, pH, etc., que modifican la estructura química y provocan una pérdida de su actividad catalítica.

Las enzimas son altamente específicas para un tipo determinado de enlace y, por tanto, no es frecuente la aparición de productos de degradación Camacho et al. (2000).

La actividad catalítica de una enzima se mide en términos de “unidades” que son definidas arbitrariamente. Con el fin de uniformar esta medición, se utiliza la unidad internacional (UI) de actividad enzimática, definida como la cantidad de enzima que se requiere para transformar en producto, un micromol de sustrato, por minuto, en las condiciones de pH y temperatura óptimas para cada enzima. Munive, (2010)

Cinética de las reacciones enzimáticas

Es la rama de la enzimología que estudia los factores que afectan a la velocidad de las reacciones enzimáticas. Los factores más importantes son: la concentración de enzima, la concentración de sustratos, productos, inhibidores y activadores, el pH, la fuerza iónica y la temperatura. Calderón, (2015)

En la saturación de la enzima con el sustrato, cuando el sustrato está en exceso, la velocidad de una reacción enzimática es máxima, volviéndose independiente de la concentración de sustrato y la concentración de enzima se convierte en el factor limitante para la velocidad, presentando una proporcionalidad lineal entre dicha velocidad y la concentración de enzima. Meinlschmidt, et al. (2016)

6.7 METODOLOGÍA Y MODELO OPERATIVO

Se sugiere seguir el proceso del trabajo de investigación realizado en un hidrolizado de soya Munive, (2010).

Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática a utilizar, puede medirse como actividad caseinolítica, aplicando el método de Anson modificado por Félix (2008), que considera la hidrólisis enzimática de la caseína, para determinar la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm.

La caseína es disuelta en buffer fosfato 0,05 mol/L que se encuentra a pH 7,0 y una concentración de 10 mg/ml. El pH de las soluciones enzimáticas también entraría como parámetros de la investigación. Con la enzima, se puede preparar una solución de 5 mg/ml de buffer. El método consiste en mezclar 100 ml de solución enzimática con 1100 ml de caseína, esta mezcla se incuba a 37 °C por 20 min en un baño termostático, se adicionan 1800 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % para detener la reacción, se centrifuga por 20 min a 3500 min⁻¹ y se desecha el precipitado; del sobrenadante se realiza la lectura a 280 nm en un espectrofotómetro. Para la medición del blanco se mezcla de forma consecutiva los 100 ml de solución enzimática, 1800 ml de TCA y los 1100 ml de caseína, para después seguir con el mismo proceso.

La actividad enzimática se calcula aplicando la ecuación:

$$AE = h/(0,1)^2$$

Donde:

AE = actividad enzimática (U/ml)

h = promedio de las lecturas de absorbancia a 280 nm obtenidas para cada ensayo realizado en paralelo.

Determinación del tiempo de reacción

Se prepara una suspensión de aislado al 5 % con buffer fosfato 0,1 M pH 7,0 para cada enzima, la temperatura se lleva a 50 °C en un baño termostático con agitación. Se trabaja utilizando distintas concentración de enzima. Se toman alícuotas a diferentes tiempos de reacción y se determina el contenido de proteína soluble en TCA, de acuerdo al punto anterior. El tiempo de reacción para la determinación de la velocidad inicial, se

obtiene a partir de la sección lineal de la curva de concentración de producto (proteína soluble) vs tiempo, de acuerdo a la metodología seguida por Villacrés (2001).

Solubilidad del aislado

La solubilidad del aislado se determina espectrofotométricamente mediante el método utilizado por Rodríguez (1999), como se describe a continuación. Se solubiliza el aislado a diferentes concentraciones (10, 40, 80, 120, 150 y 200 mg/ml) en una solución buffer de fosfato 0,1 mol/L pH 7,0 se agita por 10 min. para que se homogeneicen las suspensiones, posteriormente se centrifuga a 9000 min^{-1} por un tiempo de 10 min. El ensayo se realiza a temperatura ambiente, se toma una alícuota de 81,3 ml del sobrenadante, se mezcla con 1219 ml de buffer en una celda de cuarzo y se cuantifica la cantidad de proteína soluble midiendo la absorbancia a 280 nm. El blanco utilizado será la solución buffer.

Determinación de las concentraciones óptimas de sustrato y enzima

Se determinará la concentración óptima de sustrato mediante los datos del análisis de solubilidad del aislado. Se seleccionará como óptima a aquella concentración que permita obtener una suspensión sustrato/buffer fluida, que facilite el proceso hidrolítico. Para la determinación de la concentración óptima de enzima, se mantiene constante la concentración de sustrato al 12 % (120 mg/ml) para las enzimas se varían las concentraciones. La hidrólisis se realiza a distintos pH. Durante el transcurso de la hidrólisis se extraen alícuotas en distintos tiempos de reacción y se determina el contenido de proteína soluble en TCA.

Para cada concentración de enzima, se calcula y grafica la velocidad de formación de producto (proteína soluble) en función del tiempo. A partir del gráfico de velocidad en función de la concentración de enzima, se selecciona como óptima aquella concentración de enzima que permita obtener en el segmento lineal de la curva, la mayor pendiente.

6.8 ADMINISTRACIÓN

La administración de la investigación propuesta estará a cargo del tesista y tutor.

Tabla 1. Administración de la propuesta

INDICADOR A MEJORAR	SITUACIÓN ACTUAL	RESULTADOS ESPERADOS	ACTIVIDADES	RESPONSABLES
Obtener la ecuación de velocidad en función de las variables del proceso de hidrólisis enzimática, que permita el diseño del correspondiente reactor.	La mayor parte de las investigaciones llevadas a cabo para el estudio de la hidrólisis enzimática de proteínas se limitan a encontrar las condiciones de operación óptimas en las que realizar el proceso y sólo unos pocos autores abordan el estudio cinético de la reacción,	Ecuación de la cinética de reacción en la hidrólisis enzimática de la quinua. Tener un mayor conocimiento y control de la etapa hidrolítica.	Determinación de la actividad enzimática	Tesista Tutor
			Determinación del tiempo de reacción	
			Solubilidad del aislado	
			Determinación de las concentraciones óptimas de sustrato y enzima	

6.9 PREVISION DE LA EVALUACIÓN

Tabla 2. Previsión de la evaluación

Pregunta básica	Explicación
¿Quiénes solicitan evaluar?	<ul style="list-style-type: none">• Universidades, con sus centros de investigación• Ministerios del gobierno• Industrias relacionadas con cereales• Estudiantes de pre-grado y post-grado relacionados al área
¿Por qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none">• Aportar al área investigativa en cereales• Desarrollar nuevos procesos tecnológicos• Desarrollar nuevos productos
¿Para qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none">• Desarrollar el protocolo adecuado para alcanzar el objetivo de la investigación
¿Qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none">• Protocolo desarrollado• Parámetros de concentración de sustrato, enzima, variables de pH, tiempo y temperatura de reacción enzimática.• Resultados obtenidos
¿Quién evalúa?	<ul style="list-style-type: none">• Tutor• Miembros del tribunal
¿Cuándo evaluar?	<ul style="list-style-type: none">• Durante todo el desarrollo de la fase experimental
¿Cómo evaluar?	<ul style="list-style-type: none">• Con los equipos detallados en la metodología
¿Con qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none">• Datos experimentales que son analizados estadísticamente y comparados con estudios similares.

BIBLIOGRAFÍA

- Abugoch, L; Castro, E; Tapia, C; Añón, M; Gajardo, Pi; Villarroel, A. (2013). Stability of quinoa flour proteins (*Chenopodium quinoa* Willd.) during storage. *Revista Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile*, 13–19. Retrieved from <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/120889/Quinoa>
- Ando, H; Chen, Yi-C; Tang, H; Shimizu, M; Watanabe, K; Mitsunaga, T. (2002). Food Components in Fractions of Quinoa Seed. *Food Science and Technology Research*, 8(1), 80–84. <https://doi.org/10.3136/fstr.8.80>
- Bazile, Di; Bertero, D; Nieto, C. (2014). *Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013*. (FAO (Chile) y CIRAD (Francia), Ed.). Retrieved from www.fao.org/3/a-i4042s.pdf
- Calderón, T., & Manuel, V. (2015). Hidrólisis enzimática de *Chenopodium quinoa* willd “ Quinoa ”, determinando sus parámetros cinéticos: ph , temperatura y concentración de sustrato . *Revista de Investigaciones*, 1(2), 1–10. Retrieved from revista.ulcb.edu.pe/ojs/index.php/RevistaULCB/article/download/13/15/
- Camacho, F; González-Tello, P; Guadix, E. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79–89. <https://doi.org/10.1177/108201329800400201>
- Cervilla, N; Mufari, J; Guzmán, C. (2012). Determinación del contenido de aminoácidos en harinas de quinoa de origen argentino . Evaluación de su calidad proteica . *Revista Actualización En Nutrición*, 13(2), 107–113. Retrieved from http://www.revistasan.org.ar/pdf_files/trabajos/vol_13/num_2/RSAN_13_2_107.pdf
- Coleman, P. (2006). Handbook of Pharmaceutical Excipients. *Mechanisms Of Ageing And Development*. Chicago - EEUU. Retrieved from www.gmpua.com/RD/RD/HandbookPharmaceuticalExcipients.pdf
- Di Cesare, M. (2011). El perfil epidemiológico de América Latina y el Caribe: desafíos, límites y acciones. *CEPAL Colección Documentos de Proyectos*. Santiago de Chile. Retrieved from <http://www.cepal.org/es/publicaciones/3852-el-perfil-epidemiologico-de-america-latina-y-el-caribe-desafios-limites-y>

- FAO. (2011). La quinua : Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. *Proinpa*. México D.F. - México. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/017/aq287e/aq287e.pdf>
- Farmacopea Mexicana. (2016). Densidad aparente y densidad compactada de polvos. *Usp* 30, 1–4. Retrieved from <http://www.farmacopea.org.mx/Repositorio/Documentos/258.pdf>
- Fennema, O. (2010). *Química de los alimentos.pdf*. Acribia Editorial. Zaragoza - España. Retrieved from <http://eduktodos.dyndns.org/>
- Garzón, G. (2011). Secado por aspersion: una alternativa para la conservación de los compuestos bioactivos y aromáticos del extracto de ajo (*Allium sativum* L.) TT - Spray drying: An alternative to conserve bioactive and aromatic compounds from garlic extract (*Allium sativu*. *Revista Lasallista de Investigación*, 8(2), 40–52. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492011000200005&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.co/pdf/rlsi/v8n2/v8n2a05.pdf
- Gonzalez, J; Konishi, Y; Bruno, M; Valoy, M; Prado, F. (2012). Interrelationships among seed yield, total protein and amino acid composition of ten quinoa (*Chenopodium quinoa*) cultivars from two different agroecological regions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(6), 1222–1229. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4686>
- INEC. (2014). Compendio estadístico 2014. *Compendio Estadístico*. Quito -Ecuador. Retrieved from www.ecuadorencifras.gob.ec/compendio-estadistico-2016/
- INEN 022. Rotulado de productos alimenticios procesados, envasados y empaquetados (2014). Retrieved from <https://archive.org/details/ec.nte.2587.2011%0A%0A>
- INEN 0517. Harina de origen vegetal. Determinación del tamaño de las partículas (1981). Retrieved from <https://archive.org/details/ec.nte.0517.1981>
- INEN 1334-2. Rotulado de productos alimenticios para consumo humano. Parte 2. Rotulado nutricional. Requisitos (2011). Retrieved from <http://www.bvsde.paho.org/cgi->

bin/wxis.exe/iah/?IsisScript=iah/iah.xis&base=bvsde.others&lang=e&nextAction=lnk&exprSearch=BVSDE.00013745&indexSearch=ID

INEN 1334-3. Rotulado de productos alimenticios para consumo humano. Parte 3. Requisitos para declaraciones nutricionales y saludables (2011).

INEN 2587. Alimentos funcionales. Requisitos (2011). Retrieved from <https://archive.org/details/ec.nte.2587.2011%0A%0A>

INEN 2983. Suplementos alimenticios. Requisitos (2015). Retrieved from <http://www.bvsde.paho.org/cgi-bin/wxis.exe/iah/?IsisScript=iah/iah.xis&base=bvsde.others&lang=e&nextAction=lnk&exprSearch=BVSDE.00013745&indexSearch=ID>

Jodidi, S. L. (1926). The formol titration of certain amino acids. *Journal of the American Chemical Society*, 48(3), 751–753. <https://doi.org/10.1021/ja01414a033>

Juliao, C. (2011). La praxeología: otra forma de experimentar la vida. *Praxis Pedagógica*, 14, 141–144.

Martínez, A ; Martínez, V. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. In *Nutrición Hospitalaria* (Vol. 21, pp. 01-14). Retrieved from scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112006000500002

Meinlschmidt, P; Sussmann, D., & Schweiggert-Weisz, U; Eisner, P. (2016). Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties. *Food Science and Nutrition*, 4(1), 11–23. <https://doi.org/10.1002/fsn3.253>

Montiel, K; Romero, L. (2015). Obtención de bioetanol a partir de la corona (Olote) del Maíz variedad HS-5, por el método de hidrólisis ácida diluida- Fermentación separada. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua. Retrieved from <https://www.google.com/search>

Munive, P. (2010). Elaboración de un suplemento alimenticio en polvo para consumo humano a partir de una mezcla de hidrolizado de soya y almidón de maíz. EPN. Retrieved from <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/1612>

Navarro, J; García, L; ; Sanchez, J. (2012). Aspectos del proceso hidrolítico ácido de

- proteínas. Universidad de Murcia, 122–129. Retrieved from revistas.um.es/analesumciencias/article/viewFile/102701/97671
- Escuredo, M, González, G, Wells, ... Fischer. (2014). Amino acid profile of the quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd .) using near infrared spectroscopy and chemometric techniques. *Journal of Cereal Science*, *60*(1), 67–74.
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.01.016>
- OMS. (2014). Estadísticas Sanitarias mundiales. Ginebra - Suiza. Retrieved from http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014
- Quintero, J., & Zapata, J. E. (2017). Optimización de la Extracción del Colágeno Soluble en Ácido de Subproductos de Tilapia Roja (*Oreochromis spp*) mediante un Diseño de Superficie de Respuesta. *Informacion Tecnologica*, *28*(1), 109–120.
<https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000100011>
- Robles, L. V. (2011). Los excipientes y su funcionalidad en productos farmacéuticos sólidos; *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, *42*(1), 18–36. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57918590003>
- Sun, X. (2011). Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation. *International Journal of Food Science and Technology*, *46*(12), 2447–2459.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02785.x>
- Terán, W; Vilcacundo, R., & Carpio, C. (2015). Amaranto y quinua bioactive components derived from amaranth. *Actualización En Nutrición*, *16*(May), 18–22. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/299379139>
- Toapanta, M. (2016). Caracterización de aislados proteicos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y su digestibilidad gástrica y duodenal (in vitro). Universidad Técnica de Ambato. Retrieved from repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/22858
- Vega-Gálvez, A; Miranda, M; Vergara, J; Uribe, E; Puente, L; Martínez, E. (2010). Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient Andean grain: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(15), 2541–2547. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4158>
- Vioque, J; Clemente, A; Pedroche, J; Del, M; Yust, M., & Millán, F. (2001). Obtención

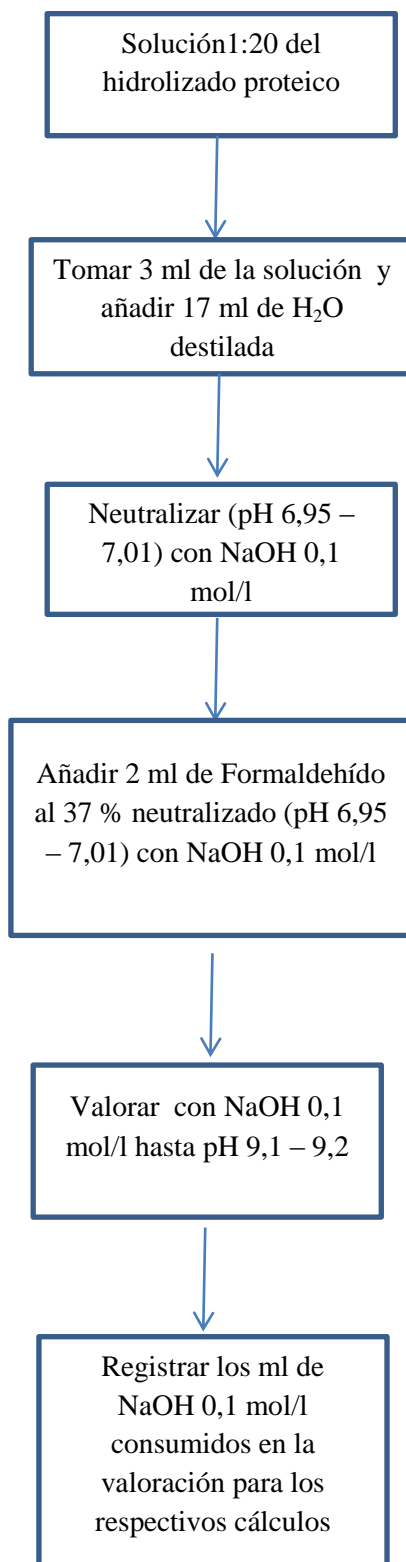
y aplicaciones de hidrolizados protéicos. *Grasas y Aceites*, 52, 132–136.

Wu, G; Wu, Z; Dai, Z; Yang, Yi; Wang, W; Liu, C; Wang, B; Wang, J; Yin, Y. (2013). Dietary requirements of “Nutritionally non-essential amino acids” by animals and humans. *Amino Acids*, 44(4), 1107–1113. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1444-2>

Wu, G. (2009). Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>

ANEXO 1

Determinación de nitrógeno amínico. Método Sörensen



ANEXO 2

Ficha Técnica de Proteasa Neutra

Nutrición y Biotecnología para la Salud

GRANOTEC

FICHA TECNICA GRANOZYME

Marzo 2013

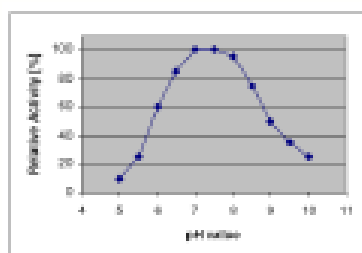
Producto	GRANOZYME ACC
Descripción	Tiene las siguientes características: producto líquido, de color marrón claro con olor característico, peso específico: 1,15 g / ml.
Composición	GRANOZYME ACC es una enzima proteasa neutra que contiene exclusivamente actividad endo-peptidasa. Se obtiene a partir de una cepa seleccionada de <i>Bacillus subtilis</i> . Hidroliza proteína de alto peso molecular en péptidos de bajo peso molecular.

COMPOSICION	
Constituyente	%
Solución de Proteasa	40
Glicerol	30
Sorbitol	30

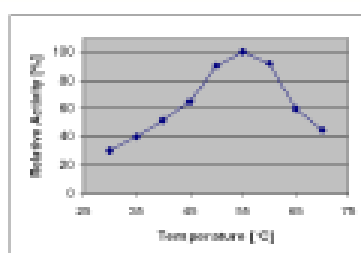
Especificaciones	GRANOZYME ACC tiene una actividad mínima de 840 UHb/g. El producto cumple con las especificaciones recomendadas de la FAO /OMS, JECFA y la Food Chemicals Codex (FCC) para enzimas de grado alimenticio. El conteo viable total esta dentro del límite superior de 5×10^6 / g.
Aplicación	HIDRÓLISIS DE PROTEINAS Se utiliza para la hidrólisis de proteína de pescado.
Dosificación	HIDRÓLISIS DE PROTEINAS 0,01 -0,5% basado en el contenido de proteínas.

Curvas del método de análisis de Actividad Enzimática según las Condiciones de trabajo

GRANOZYME ACC, Es inactivado rápidamente a valores de pH mayores a 7,5 y temperatura mayores a 55° C.



• Fig. 1: Activity in dependence on pH



• Fig. 2: Activity in dependence on temperature



Granotec Ecuador
Av. Juan Tarso Masera Km 4.5
Centro Comercial Plaza del Bala,
Losaila 19 y 20, Guayaquil - Ecuador

RSB: +593 4 2238 800 Fax: ext. 133
granotec@granotec.com.ec
www.granotec.com

Transferencia
Tecnológica
Capacitación

Innovación
Investigación
y Desarrollo

Nutrientes e
Ingredientes
Productos

Garantía
Calidad y
Compromiso



Condiciones de almacenamiento

Almacenados en un lugar fresco y seco en el embalaje original la posible pérdida de la actividad será inferior al 10% en un año. Almacenada a temperaturas <math><10^{\circ}\text{C}</math> en el embalaje original se puede utilizar hasta 24 meses desde la fecha de producción. Las enzimas se inactivan con el calor, transformándose en restos de proteínas..

Presentación

Bidones de 25 Kg. netos.

Seguridad

Evitar la inhalación del producto ya que esta puede causar sensibilidad y alergias. En caso de contacto con los ojos o mucosas lavar inmediatamente con abundante agua.

Vida Útil

12 meses



Granotec Ecuador
 Av. Juan Tenca Maranga Km 4.5
 Centro Comercial Plaza del Bala.
 Local 11 y 20. Guayaquil - Ecuador

FON: +593 4 228 800 Fax: ext. 103
 correo@granotec.com.ec
 www.granotec.com

Transferencia
 Tecnologías
 Capacitación

Innovación
 Investigación
 y Desarrollo

Nutrientes e
 Ingredientes
 Productos

Garantía
 Calidad y
 Compromiso



ANEXO 3

Pesos del aislado proteico de quinua

Aislado proteico en base húmeda (g)	Rendimiento en base húmeda %
11,214	14,95
11,454	15,27
11,933	15,91
11,692	15,59
10,823	14,43
11,072	14,76
12,082	16,11,
12,630	16,84,
10,713	14,28
Promedio	15,35

ANEXO 4

Cálculo de nitrógeno amínico.

Hidrólisis enzimática con papaína a 65 °C

pH	TIEMPO							
	0 (min)		60 (min)		120 (min)		180 (min)	
	% N bh	% N bs	% N bh	% N bs	% N bh	% N bs	% N bh	% N bs
5	0,038 ±0,003	0,664 ±0,057	0,051 ±0,003	0,895 ±0,042	0,072 ±0,003	1,270 ±0,028	0,104 ±0,005	1,818 ±0,063
6	0,048 ±0,004	0,868 ±0,023	0,053 ±0,004	0,952 ±0,013	0,059 ±0,004	1,062 ±0,010	0,093 ±0,009	1,679 ±0,044
7	0,048 ±0,003	0,869 ±0,049	0,053 ±0,003	0,958 ±0,042	0,059 ±0,001	1,060 ±0,027	0,098 ±0,001	1,766 ±0,017

Hidrólisis enzimática con proteasa a 55 °C

pH	TIEMPO							
	0 (min)		60 (min)		120 (min)		180 (min)	
	% N bh	% N bs	% N bh	% N bs	% N bh	% N bs	% N bh	% N bs
6,5	0,049 ±0,003	0,884 ±0,063	0,107 ±0,005	1,937 ±0,112	0,120 ±0,003	2,165 ±0,071	0,172 ±0,007	3,106 ±0,188
7,5	0,046 ±0,003	0,829 ±0,070	0,069 ±0,003	1,256 ±0,036	0,090 ±0,005	1,629 ±0,119	0,116 ±0,007	2,113 ±0,120

Hidrólisis ácida con H₂SO₄ a 110 °C

H ₂ SO ₄	TIEMPO							
	0 (h)		4 (h)		6 (h)		8 (h)	
	% N bh	% N bs	% N bh	% N bs	% N bh	% N bs	% N bh	% N bs
4%	0,157 ±0,003	3,413 ±0,021	0,177 ±0,005	3,854 ±0,143	0,199 ±0,003	4,327 ±0,138	0,208 ±0,005	4,531 ±0,211
8%	0,176 ±0,005	2,672 ±0,093	0,205 ±0,005	3,121 ±0,084	0,216 ±0,003	3,286 ±0,024	0,218 ±0,003	3,310 ±0,040

ANEXO 5

Grado de hidrólisis

Hidrólisis enzimática con papaína a 55 °C

t (min)	%DH					
	pH5		pH6		pH7	
	Prom	DS	Prom	DS	Prom	DS
0	8,945	±0,774	11,683	±0,307	11,699	±0,658
60	12,045	±0,572	12,811	±0,181	12,896	±0,571
120	17,095	±0,373	14,291	±0,133	14,265	±0,369
180	24,477	±0,846	22,597	±0,596	23,771	±0,232

Hidrólisis enzimática con proteasa a 65 °C

t (min)	%DH			
	pH 6,5		pH 7,5	
	Prom	DS	Prom	DS
0	11,895	±0,855	11,163	±0,945
60	26,081	±1,513	16,912	±0,488
120	29,147	±0,953	21,933	±1,606
180	41,821	±2,526	28,443	±1,622

Hidrólisis con H₂SO₄ a 110 °C

t (h)	%DH			
	4% H ₂ SO ₄		8% H ₂ SO ₄	
	Prom	DS	Prom	DS
0	45,949	±0,279	37,405	±1,253
4	51,880	±1,931	42,013	±1,127
6	57,359	±1,856	44,236	±0,322
8	60,997	±2,847	44,556	±0,545

NOTA: Prom = promedio de tres lecturas; DS = desviación estándar

ANEXO 6

Análisis estadístico de los procesos de hidrólisis enzimática y ácida

A. Hidrólisis Enzimática papaina.sfx

Resultados del programa Statgraphics

Análisis de Varianza para DH

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:pH	3,6064	1	3,6064	4,11	0,0570
B:t	547,562	1	547,562	623,68	0,0000
AA	4,42328	1	4,42328	5,04	0,0369
AB	1,81819	1	1,81819	2,07	0,1664
BB	49,8509	1	49,8509	56,78	0,0000
bloques	0,275674	2	0,137837	0,16	0,8558
Error total	16,6811	19	0,877951		
Total (corr.)	624,218	26			

R-cuadrada = 97,3277 %

Optimizar Respuesta

Meta: maximizar DH

Valor óptimo = 24,7383

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
pH	5,0	7,0	5,0
t	1,0	3,0	3,0

B. Hidrólisis Enzimática proteasa.sfx

Análisis de Varianza para DH

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:pH	318,023	1	318,023	152,32	0,0000
B:t	276,0	1	276,0	132,19	0,0000
AB	28,5023	1	28,5023	13,65	0,0102
bloques	12,466	2	6,23298	2,99	0,1259
Error total	12,5275	6	2,08792		
Total (corr.)	647,519	11			

R-cuadrada = 98,0653 por ciento

Optimizar Respuesta

Meta: maximizar DH

Valor óptimo = 41,821

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
pH	6,5	7,5	6,5
t	2,0	3,0	3,0

C. Hidrólisis ácida H₂SO₄

Análisis de Varianza para DH

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Ac sulf	695,798	1	695,798	257,66	0,0000
B:t	7,03801	1	7,03801	2,61	0,1576
AB	4,40683	1	4,40683	1,63	0,2486
bloques	7,69771	2	3,84885	1,43	0,3116
Error total	16,2028	6	2,70046		
Total (corr.)	731,143	11			

R-cuadrada = 97,7839 por ciento

Optimizar Respuesta

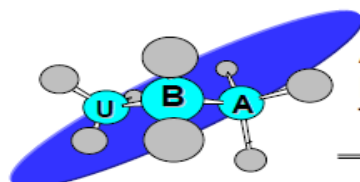
Meta: maximizar DH

Valor óptimo = 60,997

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Ac sulf	4,0	8,0	4,0
t	6,0	8,0	8,0

ANEXO 7

Perfil de aminoácidos en el hidrolizado de quinua



**Analytical
Laboratories**
Testing & Consulting

WWW.UBA-LAB.COM

INFORME DE RESULTADOS

IDR 19370-2017

Fecha: 08 de Enero del 2018

DATOS DEL CLIENTE						
Nombre	ALMEIDA CASTRO ALEXANDRA CRISTINA					
Dirección	Diego de Ibarra 2151 y Av. Daniel Leon Borja					
Teléfono	032968840					
Contacto	Srta. Cristina Almeida					
DATOS DE LA MUESTRA						
Tipo de muestra	Producto terminado	Cantidad	Aprox. 10 g			
No. de muestras	1 (n=1)	Lote	N/A			
Presentación	Frasco plástico	Fecha de recepción	28 de Diciembre del 2017			
Colecta de muestra	Realizado por el CLIENTE	Fecha de colecta de muestra	N/A			
CONDICIONES DEL ANALISIS						
Temperatura (°C)	20.9	Humedad (%)	54.0			
Fecha de Inicio de Análisis	30 de Diciembre del 2017					
Fecha de Finalización del análisis	30 de Diciembre del 2017					
RESULTADOS						
CODIGO CLIENTE	CODIGO UBA	PARAMETROS	METODO	RESULTADOS	Unidad	Límite de cuantificación
PERFIL DE AMINOACIDOS						
Hidrolizado de Proteína de Quinua	UBA-19370-1	Acido Aspártico	Burbach. Rudolph Institte	4.32	gAA/100g muestra Base Húmeda	50 ppb
		Acido Glutámico		6.00		
		Serina		1.06		
		Histidina		5.35		
		Treonina		2.75		
		Glicina		2.57		
		Arginina		2.69		
		Alanine		2.02		
		Tirosina		1.86		
		Valina		1.91		
		Metionina		1.12		
		Fenil alanina		2.27		
		Isoleucina		1.89		
		Leucina		2.95		
		Lisina		1.70		
Proteína verdadera	40.48					
Observaciones:						
1. Los resultados emitidos en este informe. corresponden únicamente a la(s) muestra(s) recibidas por el laboratorio. No siendo extensivo a cualquier lote.						
2. Este reporte no debe ser reproducido parcial o totalmente. excepto con la aprobación escrita por parte del laboratorio.						
3. Nomenclatura: N.E. = No Estimado; N.A. = No aplica; AA = Aminoácidos						

ANEXO 8

Miligramos de aminoácidos / g proteínas de quinua hidrolizada

Aminoácidos	mgAA/ g proteínas hidrolizada
Acido Aspártico	44,61
Acido Glutámico	61,95
Serina	10,94
*Histidina	55,24
*Treonina	28,39
Glicina	26,54
Arginina	27,77
Alanine	20,86
Tirosina	19,20
*Valina	19,72
*Metionina	11,56
*Fenil alanina	23,44
*Isoleucina	19,51
*Leucina	30,46
*Lisina	17,55
TOTAL *AAEsenciales	205,89
TOTAL AA no Esenciales	211,87

Nota: Cálculos en función del 96,85 % de sólidos totales

ANEXO 9

Memoria fotográfica del proceso de hidrólisis enzimática y ácida en harina de quinua orgánica

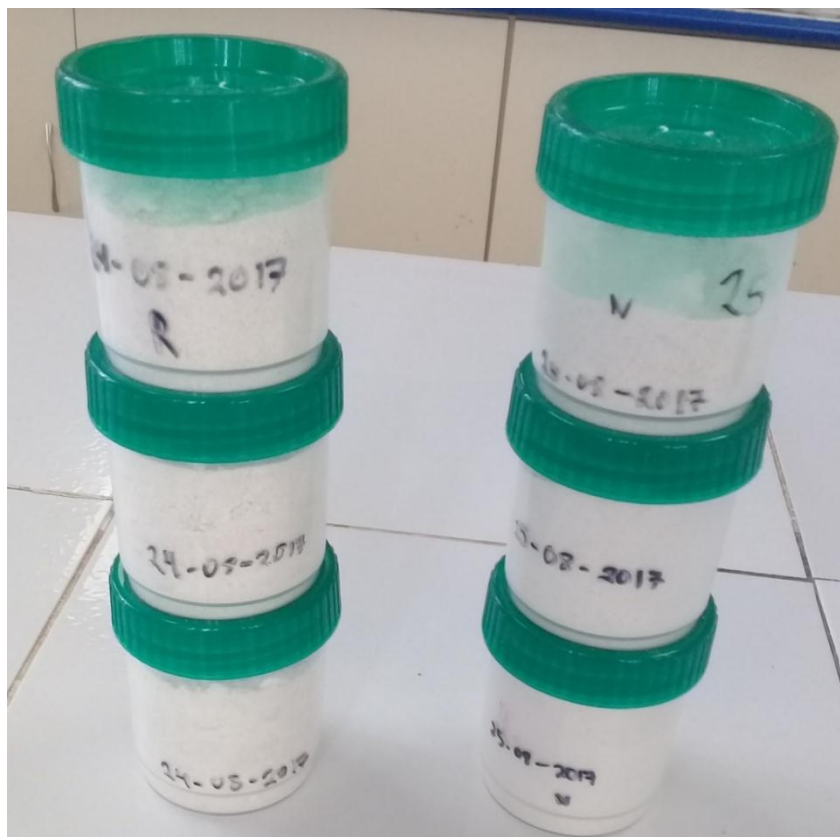


DESENGRASADO DE LA HARINA DE QUINUA ORGÁNICA





Harina desengrasada en el desecador

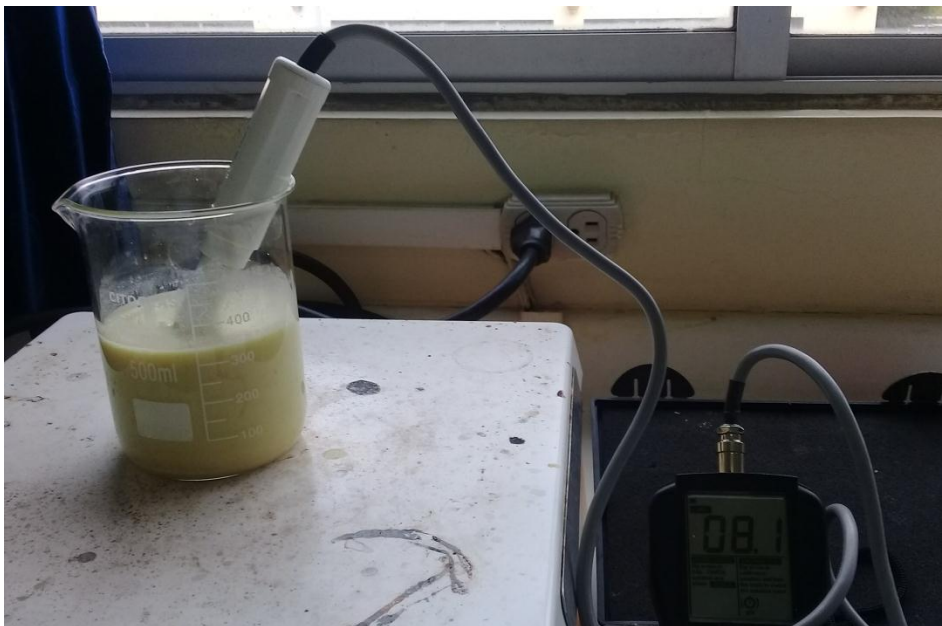


Harina desengrasada para ser refrigerada hasta su uso



Recuperación del n-Hexano

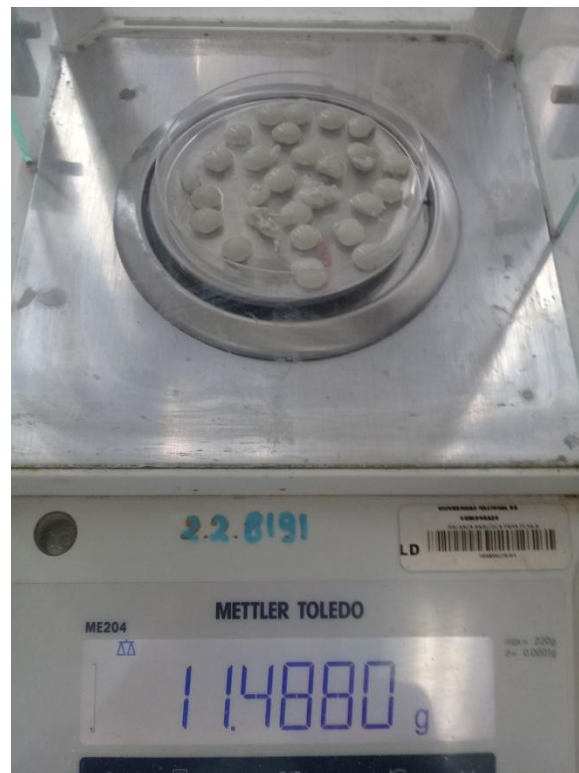
AISLADO DE QUINUA



Proceso de ajuste de pH para llegar al punto isoeléctrico



Sobrenadante y precipitado luego del proceso de centrifugación



Aislado proteico de quinua



Determinación de Nitrógeno en el aislado proteico de quinua

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA



Solución del aislado proteico de quinua 1:20 3 réplicas en cada pH



Valoración con NaOH – Determinación de N amínico Método Sörensen

HIDRÓLISIS ÁCIDA



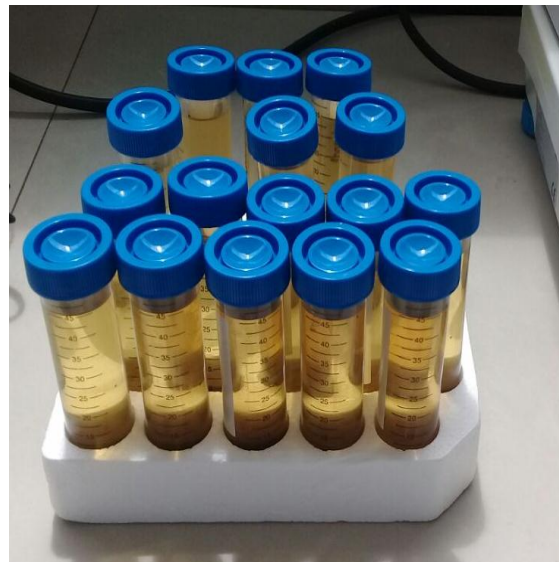
3 Réplicas – 110 °C – 8 h de reacción

NEUTRALIZACIÓN



Hidrolizado de quinua neutralizado con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 20 %

CENTRIFUGADO



CONCENTRACIÓN



Hidrolizado de quinua previo a la concentración en el rotoevaporador

SECADO POR ASPERSIÓN



Hidrolizado de quinua en polvo



Determinación de humedad del hidrolizado de quinua en polvo

PRUEBAS DE FLUIDEZ Y COMPRESIBILIDAD



Volumen de vertido



Volumen comprimido

CÁPSULAS DURAS

