

**OPTIMIZACIÓN EN LA DIGESTIBILIDAD *in vitro* DE UNA PAPILLA
PREPARADA A BASE DE QUINUA (*Chenopodium quinoa willd*)
MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS.**

DIANA MARCELA AGREDO



**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2016**

**OPTIMIZACIÓN EN LA DIGESTIBILIDAD *in vitro* DE UNA PAPILLA
PREPARADA A BASE DE QUINUA (*Chenopodium quinoa willd*)
MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS.**

Trabajo de grado presentado como requisito
parcial para optar al título de Químico

DIANA MARCELA AGREDO

Director:

RICARDO BENÍTEZ BENÍTEZ, Ph.D.

Grupo de Investigación Química de Productos Naturales (QPN)

Departamento de Química

Universidad del Cauca

Co-Director:

QCO. EDIER GAVIRIA ACOSTA

Grupo de Aprovechamiento de Subproductos Agroindustriales

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad del Cauca

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2016**

Nota de aceptación

Director _____
Ricardo Benítez Benítez, Ph.D.

Jurado _____

Jurado _____

Popayán, 10 de Junio del 2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios por haberme permitido culminar esta etapa en mi vida, por la fortaleza, paciencia y entendimiento en el transcurso de mi carrera.

A mi madre Clara Elisa Agredo por ser ejemplo de lucha y perseverancia por las cosas que se quieren. Por estar siempre a mi lado, dándome la fuerza para superar las adversidades que se presentan. Por creer en mí y apoyarme en todo. A mi tía Luz Marina Agredo por ser una segunda madre, porque siempre me ha brindado su apoyo incondicionalmente.

A mi Hermano Charly Jonny Salamanca Agredo, mi primo Jonathan Andrés Toro Agredo, tíos y familia por estar a mi lado brindándome su apoyo.

A mis amigos Yeniffer, Carolay, Marcela, Kelly, Francy, Daniela, Leydi, Linda, Lina, por su amistad, fortaleza y ejemplo; quienes me han acompañado incondicionalmente y con los que he compartido momentos gratos y difíciles, y demás personas con las que se han ido forjando amistades a través del tiempo.

A mi familia de Residencias Universitarias que se convirtió en mi hogar, conocí personas que dejaron grandes enseñanzas. Gracias a este espacio pude culminar mi carrera.

A Luis Alfonso Guerrero Cerón por el acompañamiento en todo el proceso de mi carrera, por ser mi apoyo moral en los momentos de tristeza, muchas gracias.

A mi director Ricardo Benítez Benítez, por sus conocimientos, paciencia y apoyo en el desarrollo de este trabajo. Muchas gracias

A mi codirector Edier Gaviria Acosta por haber brindado la mejor actitud para solucionar los problemas que se presentaron.

Al coordinador de la Unidad de Análisis Industrial, profesor German Cuervo Ochoa por facilitarnos el préstamo de equipos.

Al profesor José Luis Hoyos y su grupo de trabajo ASUBAGROIN porque se convirtieron en otra familia, por haberme brindado el mejor acogimiento a pesar de que no hacía parte de su proyecto de investigación, siempre me sentí parte del grupo, muchas gracias.

A todos los profesores que hicieron parte de mi formación académica y como persona, porque aquí aprendí muchas lecciones de vida. Muchas gracias.

A SEGALCO S.A.S y AGROINNOVA por el apoyo para el desarrollo de esta investigación, facilitándonos la materia prima y los recursos para los análisis.

Contenido

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE ANEXOS	XI
LISTA DE ECUACIONES	XI
LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	XII
RESUMEN.....	XIII
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
2. OBJETIVOS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. ANTECEDENTES Y MARCOS CONCEPTUALES	17
3.1. QUINUA	17
3.1.1. DESCRIPCIÓN GENERAL.....	17
3.1.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	18
3.1.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y TAXONÓMICA	19
3.1.4. VARIEDADES	20
3.1.5 COSECHA	20
3.1.6. IMPORTANCIA DE LA QUINUA.....	21
3.1.6. COMPOSICIÓN QUÍMICA	22
3.2. HIDRÓLIZADOS PROTEICOS.....	23
3.2.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS	23
3.2.2. Sustrato.....	24
3.2.3. Enzimas	24
3.2.4. Tiempo	27
3.2.5. Parámetros fisicoquímicos (Temperatura y pH).....	27
3.2.6. Relación enzima sustrato E/S.....	27
3.2.7. Etapas de la hidrólisis enzimática de proteínas	28
3.3. CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO.....	28
3.3.2. Solubilidad del hidrolizado	30
3.3.3. Análisis proximal del hidrolizado.....	30
3.3. Digestibilidad de proteínas	32
3.3.1 Digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas	33
3.3.2. Evaluación nutricional de proteínas	33
3.5. MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA	34

3.6. APLICACIONES.....	35
3.6.1. Propiedades funcionales	36
3.6.2. Nutrición infantil y clínica	37
4. METODOLOGÍA.....	38
4.1. REACTIVOS, SOLVENTES, EQUIPOS Y MATERIALES.....	38
4.1.1. Reactivos y solventes.....	38
4.1.2. Equipos	39
4.2. CONSECUENCIA DE LA MATERIA PRIMA	40
4.3. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	40
4.3.1. Determinación del contenido de humedad.....	40
4.3.2. Determinación de cenizas o materia mineral	41
4.3.3. Determinación del extracto etéreo o grasa bruta.	41
4.3.4. Determinación del contenido de nitrógeno total (Proteína)	41
4.3.5. Determinación de fibra y extracto no nitrogenado.....	41
4.4. ENZIMAS	42
4.5. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE HARINAS POR VÍA SECA	42
4.6. PRUEBAS AL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO	43
4.6.1. Pruebas de solubilidad	43
4.6.2. Determinación de la actividad y cinética enzimática	44
4.7. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS.....	46
4.8. DISEÑO EXPERIMENTAL OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR LA METODOLOGÍA SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	46
4.9. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO NUTRICIONAL DE LAS MUESTRAS.	47
4.9.1. Caracterización proximal de las muestras	47
4.9.2. Determinación del contenido de aminoácidos.....	48
4.9.3. Digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas.	49
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS	51
5.1. OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA	51
5.2 CARACTERIZACIÓN PROXIMAL DE LA MATERIA PRIMA	51
5.3. PRUEBAS AL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO	52
5.3.1. Prueba de solubilidad	52
5.3.2. Determinación de la actividad y cinética enzimática	56
5.4. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS.....	64
5.5. DISEÑO EXPERIMENTAL OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR LA METODOLOGÍA SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	65
5.5.1. Valores óptimos para el proceso de hidrólisis.....	67

5.5.2. Evaluación del valor óptimo de hidrólisis	67
5.5.3. Diagrama de Pareto	68
5.5.4. Efectos principales para la digestibilidad	69
5.5.5. Ecuación del modelo ajustado	69
5.5.6. Superficie de respuesta y diagrama de contorno	70
5.6. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO NUTRICIONAL	70
5.6.1. Análisis composicional del punto óptimo de hidrólisis	71
5.6.2. Contenido de aminoácidos	71
5.6.3. Digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas	76
CONCLUSIONES	78
RECOMENDACIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	80
ANEXOS	91

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Cultivo de quinua Blanca de Jericó, municipio de Bolívar Cauca. Fotografía: Fierro V., 2015.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 2. Grano de quinua blanca. Fotografía: Fierro V., 2015</i>	<i>18</i>
<i>Figura 3. Panoja de la planta de quinua florecida. Fotografía: Fierro V., 2015</i>	<i>18</i>
<i>Figura 4. Partes de una planta de género Chenopodiu (Jansen, P. 2004)</i>	<i>19</i>
<i>Figura 5. Reacción de hidrólisis enzimática de proteínas. Donde R_1 y R_2 es la continuación de la cadena proteica.</i>	<i>23</i>
<i>Figura 6. Mecanismo de acción catalítico de una proteasa.</i>	<i>28</i>
<i>Figura 7. Representación gráfica de la interacción de los factores y la respuesta.</i>	<i>35</i>
<i>Figura 8. Gráfica de contorno.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 9. Montaje para hidrólisis enzimática en base seca.</i>	<i>42</i>
<i>Figura 10. Determinación del % Humedad. Balanza de humedad Kern.</i>	<i>43</i>
<i>Figura 11. Desnaturalización de la enzima a 100 °C.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 12. Residuo insoluble del hidrolizado enzimático</i>	<i>43</i>
<i>Figura 13. Reacción del TNBS con los aminoácidos primarios libres.</i>	<i>45</i>
<i>Figura 14. Reacción entre la proteína y los reactivos, método de Lowry.</i>	<i>46</i>
<i>Figura 15. Shaker, equipo con agitación constante y control de temperatura.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 16. Precipitación de proteínas con TCA</i>	<i>49</i>
<i>Figura 17. Equipo Kjeldahl, determinación del contenido de nitrógeno total (Proteína).....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 18. Materia prima. a) Granos de quinua, b) Harina de quinua, c) Harina de trigo, d) Mezcla de harina trigo/quinua.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 19. Solubilidad del hidrolizado enzimático a 50°C.y 60°C durante 12 y 24 horas, proteína asilada de soya.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 20. Seguimiento del hidrolizado enzimático de la mezcla trigo/quinua a 50 °C durante 6 horas mediante la solubilidad.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 21. Reacción de Maillar. (UNAD; Usuriaga 2015</i>	<i>56</i>
<i>Figura 22. Curva de calibración de Trp para la determinación de actividad enzimática, método TCA.</i>	<i>57</i>
<i>Figura 23. Seguimiento de hidrólisis enzimática mediante liberación de Trp en harina de quinua..</i>	<i>58</i>
<i>Figura 24. Curva de calibración de albúmina para la determinación de actividad enzimática, método Lowry.</i>	<i>59</i>
<i>Figura 25. Seguimiento de hidrólisis enzimática en hidrolizados a base proteína de soya, quinua, mezclas de harinas trigo/quinua e hidrólisis con el doble de concentración de la enzima.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 26. Curva de calibración de Leucina mediante el método TNBS</i>	<i>61</i>
<i>Figura 27. Seguimiento de la actividad enzimática mediante el método TNBS, usando como sustrato quinua.....</i>	<i>62</i>

<i>Figura 28. Comparación actividad enzimática en el tiempo</i>	<i>63</i>
<i>Figura 29. Posible mecanismo de reacción de una enzima metaloproteasa (Neutrasa®). Paso 1. Centro activo de la enzima y el sustrato. Paso 2. Formación del complejo. Paso 3. Estado estacionario de la reacción. Paso 4. Formación de productos.</i>	<i>64</i>
<i>Figura 30. Determinación del grado de hidrólisis en la mezcla de harina trigo/quinua.</i>	<i>65</i>
<i>Figura 31. Diagrama de Pareto del diseño experimental.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 32. Gráfica de efectos principales sobre digestibilidad.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 33. Superficie de respuesta para digestibilidad.</i>	<i>70</i>
<i>Figura 34. Diagrama de contorno para digestibilidad.</i>	<i>70</i>
<i>Figura 35 . Cromatograma del contenido de aminoácidos en la mezcla sin hidrolizar.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 36. Cromatograma del contenido de aminoácidos en el hidrolizado enzimático del punto óptimo.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 37. Cromatogramas de los patrones de aminoácidos</i>	<i>94</i>

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la quinua	19
Tabla 2. Variedad de quinua cultivada en Colombia.	20
Tabla 3. Contenido de macro-nutrientes en la quinua y otros alimentos, en base seca % w/w.	21
Tabla 4. Composición proximal promedio de quinua	22
Tabla 5. Clasificación de enzimas	25
Tabla 6. Proteasas disponibles comercialmente de grado alimenticio	26
Tabla 7. Factores del diseño experimental.	47
Tabla 8. Diseño experimental: optimización por superficie de respuesta.	47
Tabla 9. Composición proximal de la materia prima en base seca	51
Tabla 10. Contenido de macronutrientes en la quinua y en alimentos seleccionados, por cada 100g de peso en seco.	52
Tabla 11. Concentración y absorbancia de los patrones de Triptófano (Trp) a 278 nm.	57
Tabla 12. Concentración y absorbancia de los patrones de albúmina a 660nm	59
Tabla 13. Datos curva de calibración de Leucina con TNBS.	61
Tabla 14. Digestibilidad y Grado de Hidrólisis para los 17 experimentos de optimización.	66
Tabla 15. Digestibilidad in vitro de proteínas de muestras sin hidrolizar.	67
Tabla 16. Valores óptimos de hidrólisis enzimática	67
Tabla 17. Evaluación experimental de las condiciones óptimas de hidrólisis. Con un (n=3) y una desviación estándar de 0,0877.	67
Tabla 18. Coeficiente de regresión para digestibilidad	69
Tabla 19. Análisis proximal del hidrolizado enzimático del punto óptimo.	71
Tabla 20. Composición de aminoácidos en la materia prima trigo-quinua comparada con otros cereales (g AA/ 100 g muestra).	72
Tabla 21. Composición de aminoácidos presentes en la muestra hidrolizada a las condiciones óptimas y la mezcla sin tratamiento (g AA/100 g muestra).	73
Tabla 22. Comparativo de los aminoácidos del hidrolizado enzimático con las necesidades de los mismos para diferentes grupos de edad (mg AA/g proteína)	74
Tabla 23. Resultados cómputo químico del hidrolizado enzimático en relación a la proteína del huevo (mg AA/ g proteína)	75
Tabla 24. Digestibilidad in vitro de la proteína en el hidrolizado enzimático y otras muestras.	77
Tabla 25. Puntaje químico de aminoácidos corregido por digestibilidad (PDCAAS).	77
Tabla 26. Datos curvas de calibración de patrones de aminoácidos.	94

LISTA DE ANEXOS

<i>Anexo 1. Tabla de normalidad para prueba de solubilidad.....</i>	<i>91</i>
<i>Anexo 2. Prueba t para la prueba de solubilidad.</i>	<i>91</i>
<i>Anexo 3. Tabla de normalidad para prueba de hidrólisis con diferentes sustratos y condiciones de reacción.</i>	<i>91</i>
<i>Anexo 4. Prueba t para la prueba de hidrólisis con diferentes sustratos.....</i>	<i>92</i>
<i>Anexo 5. Prueba de normalidad para la curva de comparación de actividad a través del tiempo ...</i>	<i>92</i>
<i>Anexo 6. Prueba t para la curva de comparación de actividad a través del tiempo</i>	<i>93</i>
<i>Anexo 7. Prueba t para la digestibilidad in vitro y grado de hidrólisis del diseño</i>	<i>93</i>
<i>Anexo 8. Curvas de calibración de aminoácidos.</i>	<i>94</i>
<i>Anexo 9. Tiempo de retención de cada aminoácido.....</i>	<i>95</i>

LISTA DE ECUACIONES

<i>Ecuación 1. Ecuación de Michaelis-Menten</i>	<i>28</i>
<i>Ecuación 2. Calculo del grado de hidrólisis</i>	<i>29</i>
<i>Ecuación 3. Calidad proteica.....</i>	<i>34</i>
<i>Ecuación 4. Score de aminoácidos en la proteína de estudio</i>	<i>34</i>
<i>Ecuación 5. Polinomio de segundo orden MSR.....</i>	<i>35</i>
<i>Ecuación 6. Polinomio de segundo orden modelo ajustado</i>	<i>35</i>
<i>Ecuación 7. Calculo del porcentaje de digestibilidad in vitro de una proteína</i>	<i>49</i>
<i>Ecuación 8. Ecuación del Modelo matemático que describe la superficie de respuesta</i>	<i>70</i>
<i>Ecuación 9. Calculo del escore químico de una proteína</i>	<i>75</i>
<i>Ecuación 10. Digestibilidad verdadera de una proteína</i>	<i>77</i>

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

\bar{x}	Promedio
σ	Desviación estándar
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
TNBS	Ácido trinitrobencenosulfónico
TCA	Ácido tricloroacético
min	Minutos
h	Hora
seg	Segundos
g	Gramos
UV	Ultra violeta
Leu	Leucina
mg	Miligramos
L	Litros
r.p.m	Revoluciones por minuto
E/S	Relación enzima sustrato
UA	Unidades Anson
Trp	Triptófano
w/w	Peso/peso
FAO	Food and Agriculture Organization
PANES	Programa de Alimentación y Nutrición Escolar
μL	Micro litros
Abs	Absorbancia
nm	Nanómetros
λ	Longitud de onda
GH	Grado de hidrólisis
NTC	Norma técnica colombiana
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
msnm	Metros sobre el nivel del mar
pKa	Constante de disociación ácida
et al.	Y otros

RESUMEN

Los hidrolizados enzimáticos son utilizados ampliamente en la industria alimentaria por sus propiedades funcionales, nutricionales e inmunológicas para la obtención de péptidos con actividad biológica. Los hidrolizados con bajo grado de hidrólisis son usados como modificadores de las propiedades funcionales de los alimentos, los de alto grado de hidrólisis son utilizados en la formulación de dietas especiales y alimentos infantiles, mejorando las características de digestión y absorción intestinal de la proteína de partida. La elección de la fuente proteica a utilizar en el proceso de hidrólisis se realiza en función del uso final que va a tener el hidrolizado y del valor agregado con respecto al sustrato de partida, es por esto que se plantea usar como sustrato una mezcla de cereales a base de trigo y quinua. La quinua es un grano altamente nutritivo debido a su excelente calidad de proteínas y a una amplia gama de minerales y vitaminas, clasificándola como el único alimento vegetal que proporciona todos los aminoácidos esenciales, con alta proximidad a los estándares de nutrición humana establecidos por la FAO.

Es por esto que el objetivo de este trabajo fue optimizar el proceso de hidrólisis enzimática de proteínas a base de quinua y trigo con Neutrasa®, usando un sistema de reacción en seco, metodología que hasta el momento no es reportada en la literatura. La optimización se realiza mediante el método estadístico de superficie de respuesta, teniendo como parámetros de respuesta grado de hidrólisis y digestibilidad *in vitro* con el fin de obtener la formulación de una papilla a base de quinua que suplemente la deficiencia de aminoácidos esenciales que no están presentes en los cereales usados comercialmente. Esto se consiguió realizando pruebas preliminares de hidrólisis enzimática en un montaje para materiales secos, con agitación constante y control de temperatura. Los rangos sobre los cuales se plantea el diseño experimental para la optimización del proceso de hidrólisis se encontró realizando pruebas de actividad enzimática en proteína de soya y en la mezcla trigo/quinua. Luego se procedió a ejecutar los procesos arrojados por el diseño de superficie de respuesta para la hidrólisis con la mezclas de cereales trigo/quinua encontrando que las condiciones óptimas de hidrólisis fueron: 42,447°C, 1,638% w/w, 32,8 min obteniéndose valores de grado de hidrólisis y digestibilidad *in vitro* de 3% y 79,864% respectivamente, los cuales están en rangos superiores en comparación con las muestras que no han recibido ningún proceso.

Palabras clave: Neutrasa[®], grado de hidrólisis, superficie de respuesta, reacción en seco, condiciones óptimas.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los cereales son una fuente importante de proteínas en la dieta de los seres humanos, su valor nutricional está relacionado principalmente con el contenido de proteínas, que son un importante grupo de macromoléculas biológicas que participan en las funciones fisiológicas (Gorinstein *et al.* 2002). La calidad nutricional de la proteína se determina por la cantidad de aminoácidos esenciales que están presentes en estas, como lisina. Estos no pueden ser sintetizados por el cuerpo, limitando la síntesis de nueva proteína para remplazar a la perdida debido al recambio normal, lo que produce un balance negativo de nitrógeno. Generalmente, la mayoría de las proteínas animales contienen todos los aminoácidos esenciales en las cantidades aproximadamente necesarias para el cuerpo humano; las proteínas vegetales, por otro lado, carecen frecuentemente de uno o más aminoácidos esenciales (OMS. 2007), pero el mayor inconveniente es el alcance que tiene la población de las proteínas animales, por lo que se debe buscar alternativas para evitar la desnutrición. La quinua es un grano altamente nutritivo debido a su excelente calidad de proteínas y a una amplia gama de minerales y vitaminas. El contenido de proteína en la quinua oscila entre 13,81 y 21,9% dependiendo de la variedad (Miranda *et al.* 2013; Llorenten *et al.* 2008). Debido al alto contenido de aminoácidos esenciales, la quinua es considerada el único alimento vegetal que proporciona todos los aminoácidos esenciales que están cerca de los estándares de nutrición humana establecidos por la FAO, la proteína del grano es rica en aminoácidos como histidina, lisina y metionina que son deficientes en cereales (Bertazzo *et al.* 2007).

En 1996, la quinua fue clasificada por la FAO como uno de los cultivos más prometedores de la humanidad, por sus beneficios nutricionales y su versatilidad agrícola para contribuir a la seguridad alimentaria en diversas regiones del planeta, sobre todo en los países que están limitados en la producción de alimentos o donde la población no tiene fácil acceso a fuentes de proteína, además es libre de gluten, disminuyendo el riesgo de alergenicidad para las personas que son intolerantes a este tipo de compuestos en las harinas de los cereales (Nascimento *et al.* 2014).

A pesar de los beneficios que ofrece el consumo de quinua por su alto contenido de proteínas, los niños en periodo de lactancia no asimilan fácilmente las proteínas con alto peso molecular, generando intolerancia y molestias estomacales. Una de las soluciones que se han implementado con el avance y desarrollo tecnológico es el uso de hidrolizados enzimáticos, los cuales mejoran la digestibilidad y aumentan el valor nutritivo; además, el consumo no genera desequilibrios osmóticos ni alergias, y tiene un sabor aceptable (Benítez *et al.* 2008). Los hidrolizados enzimáticos son

usados en la industria alimentaria porque se tiene un control en la hidrólisis y no es destructiva, en comparación con la hidrólisis ácida y alcalina.

Con base a esto y que en los últimos años la quinua se ha reconocido en el Cauca como una importante fuente de nutrientes (Corredor 2006), este cultivo que se había abandonado, hace una década se convirtió en el principal alimento de la estrategia para combatir la desnutrición infantil en el departamento, a través del Programa de Alimentación y Nutrición Escolar PANES, de la gobernación del Cauca, en convenio con la Universidad del Cauca, para lo cual estableció el Plan Departamental de Seguridad Alimentaria y Nutricional “Cauca sin Hambre” 2009-2018, en el que la quinua es el eje central de esta política pública. Consecuente con esta estrategia para combatir la desnutrición en el Cauca, ha potencializado que cultivadores, transformadores y comercializadores trabajen de manera integrada, con el apoyo del equipo técnico de Agroinnova (Corporación Incubadora de Empresas Agroindustriales del Cauca)¹. Surgiendo como iniciativa la formulación de una papilla a base de quinua por parte de la empresa transformadora de esta materia prima SEGALCO S.A.S, implementando el uso de metodologías que implican menores costos y que no están reportados en la literatura, mediante la optimización de un proceso de hidrólisis enzimática en base seca de proteínas a partir de un alimento con alto potencial nutricional.

¹ URL:// <http://www.periodicolacampana.com/la-quinua-es-nutricion-y-desarrollo-economico-para-el-cauca/>. Consultado 14-09-2015

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Optimizar la digestibilidad *in vitro* de un hidrolizado enzimático de proteínas, utilizando como proteasa Neutrasa® en la formulación de una papilla de harina de cereales a base de quinua (*Chenopodium quinoa willd*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Evaluar la eficiencia de la enzima teniendo como variables temperatura, tiempo, tipo de sustrato, concentración enzima-sustrato.

2.2.2. Garantizar la máxima digestibilidad, determinando las condiciones óptimas de hidrólisis enzimática.

2.2.3. Determinar las características nutricionales del producto final.

3. ANTECEDENTES Y MARCO CONCEPTUALE

3.1. QUINUA

3.1.1. DESCRIPCIÓN GENERAL

La quinua (*Chenopodium quinoa willd*) es un pseudocereal con un alto valor nutricional que durante miles de años fue el principal alimento de las antiguas culturas de los Andes y se distribuye en diferentes zonas agroecológicas de la región, el contenido de proteína de la quinua varía entre 13,81 y 21,9% dependiendo de la variedad; debido al elevado contenido de aminoácidos esenciales de su proteína, la quinua es considerada como el único alimento del reino vegetal que provee todos los aminoácidos esenciales, que se encuentran cerca de los estándares de nutrición humana establecidos por la FAO (Mujica *et al.* 2006; Koziol *et al.* 1992). Actualmente, la quinua está en un proceso de expansión porque tiene un gran potencial para mejorar las condiciones de vida de las personas en los países andinos y el mundo moderno (FAO. 2011). Es una planta de hoja ancha, 1-2 m de altura como se observa en la Figura 1, con raíces profundas y se puede cultivar desde el nivel del mar hasta una altitud de 4000 m.s.n.m, el fruto es seco y mide aproximadamente 2 mm de diámetro (de 250 a 500 semillas/g) como se observa en la Figura 2, rodeado por el cáliz, que es del mismo color que la planta (Figura 3). La quinua es muy adaptable a diferentes zonas agroecológicas, se adapta a los climas cálidos y secos, puede crecer con humedades relativas del 40% al80 %, soportando temperaturas de -4°C a 38°C. El grano se utiliza para hacer sopa, cereales y alcohol, mientras que la harina se utiliza en la fabricación de galletas, pan y alimentos procesados (Stikic *et al.* 2012; Escuredo *et al.* 2014)



Figura 1. Cultivo de quinua Blanca de Jericó, municipio de Bolívar Cauca. Fotografía: Fierro V., 2015.



Figura 2. Grano de quinua blanca. Fotografía: Fierro V., 2015



Figura 3. Panoja de la planta de quinua florecida. Fotografía: Fierro V., 2015

3.1.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La quinua fue ampliamente cultivada en la región Andina por culturas precolombinas y sus granos han sido utilizados en la dieta de los pobladores del altiplano y de los valles interandinos, en zonas altas superiores a 3500 m.s.n.m, zonas frías con un promedio de temperaturas de 12°C y zonas áridas con una precipitación promedio de 350 mm (Mujica *et al.* 1999; Jacobsen *et al.* 1993). El cultivo de quinua se ha expandido en los últimos años, destacándose como principales productores Bolivia, Perú, Estados Unidos, Ecuador y Canadá. La quinua se cultiva también en Inglaterra, Suecia, Dinamarca, los Países Bajos, Italia, Francia y en zonas tropicales como las sabanas de Brasil donde se reporta la obtención de rendimientos más altos que los de la zona Andina (FAO. 2011). En Colombia, la quinua fue utilizada por los Chibchas y otras tribus de la meseta Cundinaboyacense y se empezó a desplazar hacia la región de las antiguas ruinas de San Agustín en el Huila, quienes tenían comunicación con los pobladores de la Sabana de Bogotá, y a la vez ayudaron a la dispersión de la quinua hacia el departamento de Nariño y posteriormente a Ecuador (Corredor *et al.* 2006). Actualmente se estima que el área cultivada de quinua en Colombia es cercana a las 600 ha; localizadas en Nariño, 200 ha; Cauca, 100 ha; Boyacá, 200 ha y Cundinamarca, 100 ha, cuyo promedio de producción oscila entre 1.5 ton/ha sin tecnificación y tecnificada hasta 3.5 ton /ha. En el Cauca la quinua es cultivada por los productores pertenecientes a los municipios de Silvia, Caldono, Jambaló, Bolívar, Sotaró, Puracé, Santa Rosa, Totoró, La vega, Toribio, Almaguer y Rosas²

² URL: <http://elnuevoliberal.com/el-cauca-se-la-juega-con-la-quinua/>. Consultado 17-09-2015

3.1.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y TAXONÓMICA

3.1.3.1. Clasificación botánica.

La quinua es una planta anual, dicotiledónea, usualmente herbácea, que alcanza una altura de 0,2 a 3,0 m. Las plantas presentan diversos colores dentro de los que se encuentran verde, morado, rojo y algunos colores intermedios. El tallo principal puede ser ramificado o no, depende del ecotipo, raza, densidad de siembra y de las condiciones del medio en que se cultiven, es de sección circular en la zona cercana a la raíz, transformándose en angular a la altura de las ramas y hojas. Estas son de carácter polimórfico en una sola planta; las basales son grandes y pueden ser romboidales o triangulares, mientras que las hojas superiores generalmente alrededor de la panoja son lanceoladas como se observa en la Figura 4. Su color va desde el verde hasta el rojo, pasando por el amarillo y el violeta, según la naturaleza y la importancia de los pigmentos. (Tapia *et al.* 2000; Bonifacio *et al.* 1992; Rojas *et al.* 2010). La inflorescencia es racimosa y se denomina panoja por tener un eje principal más desarrollado, del cual se originan los ejes secundarios y en algunos casos terciarios. En la Figura 3 se observa la panoja, en esta se encuentran pequeñas y densas flores que contienen el grano, este es un aquenio indehiscente que contiene un grano que puede alcanzar hasta 2,66 mm de diámetro de acuerdo a la variedad (Rojas *et al.* 2003), el cual está cubierto por el perigonio y se desprende con facilidad al frotarlo (Tapia *et al.* 2000).

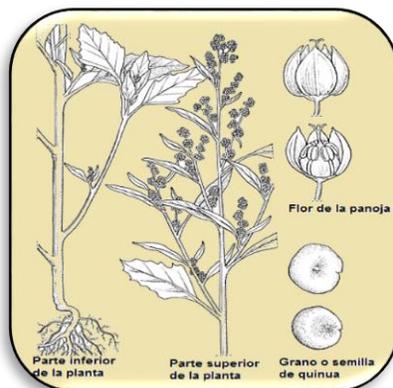


Figura 4. Partes de una planta de género *Chenopodium* (Jansen, P. 2004)

3.1.3.2. Clasificación taxonómica.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la quinua

Orden	Clasificación
Reino	Vegetal
División	<i>Magonoliophyta</i>

Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Caryophyllidae</i>
orden	<i>Caryophyllales</i>
Familia	<i>Chenopodiaceae</i>
Genero	<i>Chenopodium</i>
Sección	<i>Chenopodia</i>
Subsección	<i>Cellulata</i>
Especie	<i>Chenopodium quinoa willdenow</i>

Fuente: Chamorro et al. 2003. Continuación Tabla 1

El género *Chenopodium* es el principal dentro de la familia *Chenopodiaceae* y tiene amplia distribución mundial, con cerca de 250 especies. Los nombres usados en la región Andina son quinua, Kiuna, parca (Ecuador, Perú, Bolivia), supha, jopa, jupha, jiura, aara, callapi, vocali (Bolivia); quinhua (Chile); y suba, pasca (Colombia). (Giusti et al. 1970; Chamorro et al. 2003).

3.1.4. VARIEDADES

Las variedades de quinua se han catalogado teniendo en cuenta la adaptación a diferentes condiciones agroecológicas (suelos, precipitación, temperatura, altitud, resistencia a heladas, sequía, salinidad o acidez); mostrando variabilidad en la coloración de la planta, inflorescencia y semilla. Las variedades de quinua que se cultivan en Colombia son las variedades dulces (Bonifacio et al. 2004)

Tabla 2. Variedad de quinua cultivada en Colombia.

Departamento	Variedad
Nariño	Blanca dulce, Tunkahuan, Piartal, Los Pastos
Cauca	Blanca Dulce (Blanca de Jerico), Tunkahuan
Cundinamarca	Blanca Dulce, Amarilla de Maranganí
Boyacá	Blanca Dulce, Tunkahuan, Dorada

Fuente: Corredor et al. 2006

3.1.5 COSECHA

La cosecha y poscosecha comprende las labores de corte, secado, trilla, venteo y almacenamiento del grano. Con la aplicación de buenas prácticas en estas labores se logra obtener un grano que cumplan los parámetros de calidad. La época óptima para el corte de las plantas depende de la variedad, tipo de suelo, humedad y temperatura predominante. Por lo general, las hojas de la planta de quinua se tornan de una coloración amarillenta o rojiza dependiendo de la variedad y en la panoja es posible ver los granos por la apertura que realiza el perigonio, característico en esta

fase de madurez fisiológica. Otra manera es golpeando suavemente la panoja con la mano, si existe caída de los granos ya se puede empezar con el corte (Aroni J., 2005).

3.1.6. IMPORTANCIA DE LA QUINUA

La quinua, el llamado grano de oro, protegido durante miles de años por los habitantes de las zonas andinas de América Latina y descubierto por el resto del mundo recientemente, fue homenajeada por la Organización de las Naciones Unidas al declarar el 2013 como el Año Internacional de la Quinua. Además, la Asamblea General de las Naciones Unidas destaca las cualidades nutritivas de la quinua y su adaptabilidad a diferentes condiciones agroecológicas, propiedades que, junto a su bajo costo de producción, la convierten en una gran aliada en la lucha contra el hambre y la inseguridad alimentaria. La amplia variabilidad agroecológica a la cual puede adaptarse la quinua se refleja en el hecho de que los cultivo se concentra en los valles altiplánicos de Bolivia y Perú, se la encuentra en algunas regiones costeras del Sur de Chile, hasta los valles andinos del Sur de Colombia, y en pisos altitudinales que van desde el nivel del mar hasta los 4.000 m.s.n.m (FAO. 2014). Estudios recientes realizados por Vidueiros *et al.* 2014, Gonzáles *et al.* 2011, Miranda *et al.* 2013 muestran la riqueza nutricional de la quinua en comparación con otros alimentos básicos (Tabla 3), destacando el hecho de que las proteínas de la quinua reúnen todos los aminoácidos esenciales en un buen balance, al mismo tiempo los ácidos grasos, son libres de colesterol; presentan un alto contenido de fibra y fácil digestibilidad, (Koziol *et al.* 1992; Vidueiros *et al.* 2014). La NASA también la incluyó dentro del sistema CELLS (en español: Sistema Ecológico de Apoyo de Vida Controlado) para equipar sus cohetes en los viajes espaciales de larga duración, por ser un alimento de composición nutritiva excelente como alternativa para solucionar los problemas de insuficiente ingesta de proteínas (Bertazzo *et al.* 2007).

Tabla 3. Contenido de macro-nutrientes en la quinua y otros alimentos, en base seca % w/w.

Contenido	Quinua	Frijol	Maíz	Arroz	Trigo
Energía (Kcal/100g)	399	367	408	372	392
Proteína (g/100g)	16,5	28	10,2	7,6	14,3
Grasa (g/100g)	6,3	1,1	4,7	2,2	2,3
Total carbohidratos (g/100g)	69,0	61,2	81,1	80,4	78,4

Fuente: Koziol *et al.* 1992

3.1.6. COMPOSICIÓN QUÍMICA

La composición química proximal de los granos de quinua dependiendo de la variedad está constituida por la composición que se observa en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición proximal promedio de quinua

Composición (%)	\bar{X}	(min-max)
Humedad	12,9	5,4-20,7
Proteína	14,3	9,6-22,1
Grasa	4,6	1,8-8,2
Ceniza	3,5	2,4-9,7
Carbohidratos	61,4	46,0-77,4
Fibra	3,0	1,1-5,8
Celulosa	5,3	2,9-12,2

Fuente: Corredor *et al* 2006. Donde \bar{X} indica el promedio entre el porcentaje del valor mínimo y el máximo.

Entre el 16 % y el 20 % del peso de una semilla de quinua lo constituyen proteínas con todos los aminoácidos, incluidos los esenciales, considerándose una proteína de alto valor biológico, ya que estos cubren los requerimientos de aminoácidos recomendados para niños en edad preescolar, escolar y adultos (FAO/OMS/UNU, 1985). La importancia de las proteínas de la quinua radica en la calidad, son principalmente del tipo albúmina y globulina, estas tienen una composición balanceada de aminoácidos esenciales parecida a la composición de aminoácidos en la caseína, la proteína de la leche. El contenido de ácidos grasos presente en la quinua ayuda a reducir el colesterol LDL (colesterol malo) del organismo y elevar el colesterol HDL (colesterol bueno) gracias a su contenido en ácidos grasos omega 3 (ácido linolénico), omega 6 (ácido linoleico), omega 9 (ácido oleico) (Tang *et al.* 2015; Peiretti *et al.* 2013); según estos autores, el 11,5% de los ácidos grasos totales de la quinua son saturados. Los carbohidratos de las semillas de quinua contienen entre un 58 % y 68 % de almidón y un 5 % de azúcares, que la convierten en una fuente óptima de energía que se libera en el organismo de forma lenta por su importante cantidad de fibra (Llorente *et al.* 2008). Es un alimento rico en minerales como calcio, potasio, magnesio, hierro, fósforo, zinc, manganeso y pequeñas cantidades de cobre y litio. Cabe destacar que la quinua contiene fibra dietaria, es libre de gluten y además contiene dos fitoestrógenos, daidzeína y genisteína, que ayudan a prevenir la osteoporosis y muchas de las alteraciones orgánicas y funcionales ocasionadas por la falta de estrógenos durante la menopausia, además de favorecer la adecuada actividad metabólica del organismo y la correcta circulación de la sangre (Llorente *et al.* 2008).

3.2. HIDROLIZADOS PROTEICOS

Los hidrolizados proteicos se pueden obtener mediante tres métodos, hidrólisis ácida, alcalina y enzimática; esta última presenta ventajas en comparación con las otras metodologías, puesto que no es destructiva y permite un control de los productos a obtener, es por esto que en los últimos años las investigaciones para la obtención de hidrolizados proteicos y sus aplicaciones se realizan usando enzimas (Guadix *et al.* 2000). La composición final y, por tanto el uso, dependen principalmente de la fuente y proteína nativa presente, del tipo de proteasa usada, de las condiciones y del grado de hidrólisis alcanzado en la reacción. Los hidrolizados proteicos son de gran interés para la industria alimentaria, siendo ampliamente utilizados en la fabricación de alimentos preparados, productos dietéticos, nutrición infantil y péptidos con actividad biológica. La modificación de las proteínas permite mejorar las propiedades funcionales, nutricionales e inmunológicas del alimento original sin perder el valor nutritivo. La hidrólisis mejora la solubilidad, el poder espumante y la capacidad emulsificante de las proteínas, aumenta su digestibilidad y reduce el carácter alergénico. Además, mediante hidrólisis enzimática se obtienen determinados péptidos de actividad biológica demostrada, que se emplean en la formación de nuevos productos proteicos de alto valor añadido conocidos como alimentos funcionales (Prieto *et al.* 2007).

3.2.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS

La reacción de hidrólisis consiste en la ruptura del enlace existente entre los aminoácidos que componen una cadena peptídica, consumiéndose una molécula de agua por cada enlace roto como se observa en la Figura 5. Las proteasas son las encargadas del rompimiento del enlace peptídico, generando diferentes especies: proteínas, proteosomas, peptonas, péptidos y aminoácidos; cada especie se diferencia fundamentalmente por su solubilidad y el tamaño de la cadena obtenida.

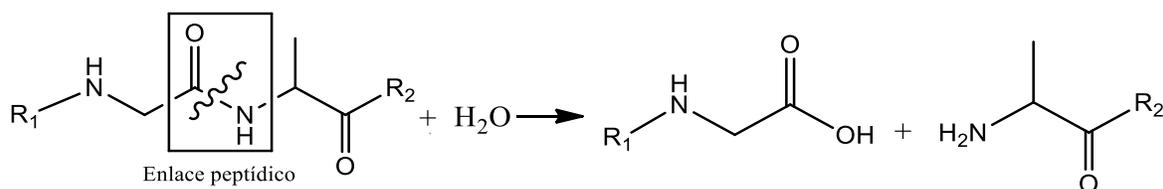


Figura 5. Reacción de hidrólisis enzimática de proteínas. Donde R_1 y R_2 es la continuación de la cadena proteica.

El grado de hidrólisis es la propiedad fundamental de un hidrolizado y va a determinar en gran medida las restantes características del mismo y por tanto su

posible uso. Se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación al número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína. El grado de hidrólisis final está determinado por las condiciones utilizadas, siendo éstas, la concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato, el tiempo de reacción y las condiciones fisicoquímicas tales como pH y temperatura. Otro factor que también va a determinar el grado de hidrólisis es la naturaleza de la enzima, caracterizada por su actividad específica y tipo de actividad. Así, la naturaleza de la enzima usada no sólo va a influir en el grado de hidrólisis, sino también en el tipo de péptidos producidos (Benítez *et al.* 2008).

3.2.2. Sustrato

La fuente proteica para la hidrólisis enzimática puede ser de origen animal, vegetal, bacteriano o fúngico. Para la elección de una fuente proteínica adecuada debe tenerse en cuenta el uso que vaya a tener el hidrolizado, así como el valor agregado del producto final con respecto al sustrato inicial. (Benítez *et al.* 2008); dependiendo del tipo de proteína, la secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional se va a dar el ataque proteolítico y así mismo la formación de las cadenas peptídicas. En los últimos años se han desarrollado numerosas aplicaciones, destacándose la formulación de alimentos a base de proteína de origen vegetal, como alternativa al uso de proteína de origen animal en la formulación de alimentos especiales para niños y/o adultos enfermos; las proteínas son el principal componente estructural y funcional de las células y tienen numerosas e importantes funciones dentro del organismo que van desde su papel catalítico (enzimas) hasta su función en la motilidad corporal (actina, miosina), pasando por su papel mecánico (elastina, colágeno), de transporte y almacén (hemoglobina, mioglobina, citocromos), protección (anticuerpos), reguladora (hormonas). (Martínez *et al.* 2006; Clemente *et al.* 2010; Velasco *et al.* 2007).

3.2.3. Enzimas

Las enzimas son proteínas que actúan como potentes y eficaces catalizadores, son específicas respecto al tipo de sustrato; se clasifican de acuerdo a su actividad y al tipo de sustrato sobre el cual actúan, como se observa en la Tabla 5. La actividad catalítica de una enzima se caracteriza por actuar en condiciones específicas de temperatura y pH, trabajar con enzimas proporciona altos rendimientos y aumento en las velocidades de reacción, además permite el control de la hidrólisis y las propiedades de los productos obtenidos (Velasco *et al.* 2007; Mathews *et al.* 2002).

Tabla 5. Clasificación de enzimas

Clase	Ejemplo de enzimas
Oxidorreductasas	Peroxidasas, Catalasas, Glucosa-oxidasas, Lacasas
Transferasas	Fructosil-transferasas, Glucosil-transferasas
Hidrolasas	Amilasas, Celulasas, Lipasas, Pectinasas, Proteasas
Liasas	Pectato-liasas. Alfa-acetolactato decarboxilasa
Isomerasas	Glucosa-isomerasas
Ligasas	Sintetasa

Fuente: Mathews 2002.

Las proteasas, enzimas utilizadas en la industria alimentaria para la obtención de los hidrolizados proteicos, se clasifican de acuerdo a su origen (animal, vegetal, bacteriano o fúngico), su acción catalítica y la naturaleza del centro activo. Pueden ser endopeptidasa si rompe el interior de las cadenas peptídicas, y exopeptidasas, si rompe aminoácidos y dipéptidos de los extremos de las cadenas polipeptídicas. La naturaleza del centro catalítico en las endopeptidasas puede ser serinproteasas, cisteínproteasas, metaloproteasas y aspartatoproteasas; las exopeptidasas pueden ser, aminopeptidasas, carboxipeptidasas o dipeptidasas (Velasco *et al.* 2007). Las proteasas de grado alimenticio usadas en la industria se muestran en la Tabla 6, destacando el uso de complejos enzimáticos como Neutrasa[®], Papaína, Protamex, Flavozymes para los procesos tecnológicos en alimentos.

Tabla 6. Proteasas disponibles comercialmente de grado alimenticio

Tipo de proteasa	Origen	Nombre	Fuente	Temp (°C)	Intervalo de pH	Sitio de acción catalítica
Serinproteasa	Animal	Tripsina	Porcino, bovino	30-60	7-9	-*Lis (o Arg)--
		Quimiotripsina		45-55	8-9	-*Trp (o Tir, Fen, Leu)-
		Elastasa			6-8	-*Ala--
	Bacteriana	Substilisín. Carlsberg,	<i>Bacillus licheniformis</i>	50-60	6-10	-*AA _{hf} --
		Alcalasa				
		Subst.BPN, Substilisín Novo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	40-55	6-10	
Cisteinproteasas	Plantas	Papaina	Papaya	40-75	5-8	-*Fen (o Val, Leu)--
		Bromelaina	Piña	20-65	5-8	AA _{hf} --
		Ficina	Latex de Ficus		5-8	
Aspartato proteasas	Animal	Pepsina	Porcino, bovino		1-4	-Fen (o Tir, Leu)*-Trp
		Quimosina	Becerro		4-6	(o Fen, Tir)
	Fúngica	Aspergilopeptidasa A	<i>Aspergillus Saitoi</i>		2-5	Glu, Asp, Leu*---
		Newlasa	Rhizopus sp		3-6	Similar a la pepsina
Metalo proteasas	Animal	Carboxipeptidasa A	Pancreas		7-8	* Carbonilo del AA terminal del péptido, excepto Pro, Arg, Lis
	Bacteriana	Neutrasa	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	40-55	6-7,5	-Fen, Leu, Val*...
		Termolisina	<i>B. thermoproteolyticus</i>		7-9	-Ile, Leu, Val, Fen*...
<i>Preparaciones enzimáticas. Mezcla de papaina, quimopapaina y lisozima</i>						
	Papaina cruda		Fruto de la papaya	5-9		Amplia especificidad
	Páncreatina		Páncreas (bovino y porcino)	30-80	7-9	Muy amplia especificidad
	Veron P. Sumicina LP. Biocina A		<i>Aspergillus oryzae</i>	40-55	4-8	Muy amplia especificidad
	Pronasa		<i>Streptomyces griseus</i>	7-9		Muy amplia especificidad

Fuente: Benítez et al. 2008. Donde *Indica sitio de acción de la proteasa sobre el sustrato; AA_{hf} Indica AAs hidrofóbicos.

3.2.4. Tiempo

El tiempo de reacción es una de las variables que determinan la hidrólisis enzimática y está relacionado directamente con el final de la reacción, implica la transformación de una o varias sustancias iniciales llamadas reactivos en otras sustancias diferentes que se denominan productos de la reacción, y se mide de acuerdo a la cantidad de moles de producto generada por unidad de tiempo, relacionada con la actividad enzimática.

3.2.5. Parámetros fisicoquímicos (Temperatura y pH)

Las variables temperatura y pH determinan el resultado de la reacción e influyen en la especificidad de la enzima y por tal motivo en la composición del hidrolizado. En la reacción de hidrólisis enzimática de la Figura 5, por cada molécula de agua que se consume en la reacción, se forman grupos carboxilo y amino nuevos capaces de liberar o aceptar protones dependiendo del pH. A pH bajo todos los grupos amino están protonados y solamente parte de los grupos carboxilo están desprotonados, resultando en una captación neta de protones por cada enlace peptídico roto, generando un aumento del pH. A pH neutro y alcalino la hidrólisis conlleva a una disminución de pH, debido a que los grupos carboxilo están desprotonados y solamente parte de los grupos amino están protonados. La conformación de las proteínas depende, en parte, de las cargas eléctricas, aportadas por los grupos químicos ionizables carboxilo, amino, tiol, etc, cada enzima tiene su conformación más adecuada, y por ende su mayor actividad catalítica en un determinado pH, valor óptimo; el cambio drástico de pH puede generar una desnaturalización de la enzima, evidenciándose en una disminución o pérdida de la actividad, por esto es recomendado realizar reacciones enzimáticas en buffer o en un sistema que permita controlar el pH (Benítez *et al.* 2008; Grahame *et al.* 2015).

La velocidad de una reacción aumenta al aumentar la temperatura, en el caso de las reacciones catalizadas por enzimas, tienen temperaturas óptimas sobre la cual tienen su mejor actividad catalítica. A esta temperatura, la barrera de la energía de activación es menor, al sobrepasar la temperatura óptima puede ocurrir una desnaturalización de la enzima y perder su actividad debido a que se rompen los enlaces que dan la conformación de la enzima.

3.2.6. Relación enzima sustrato E/S

Las reacciones catalizadas por enzimas tienen la función principal de disminuir la energía de activación e inducir la formación del complejo enzima-sustrato, que da

paso a la formación del producto y posterior liberación de la enzima que continua con el proceso catalítico. La velocidad de transformación aumenta con la concentración de sustrato hasta un determinado valor (V_{max} , velocidad máxima) donde la enzima se encuentra saturada de sustrato, es decir todos sus centros activos se encuentran ocupados y la concentración de enzima libre es cero, es por esto que se debe encontrar el valor óptimo de la cantidad de enzima y sustrato para que la reacción continúe hasta que se da la transformación del sustrato a producto (Grahame *et al.* 2015; Arderiu *et al.* 1998)

3.2.7. Etapas de la hidrólisis enzimática de proteínas

Todas las enzimas tienen un centro activo en el cual interaccionan las moléculas del sustrato, la hidrólisis enzimática se da en tres etapas, la primera etapa es la formación del complejo enzima-sustrato que se ve favorecida por la formación de una serie de interacciones débiles entre grupos funcionales complementarios de la enzima y el sustrato, la formación de estas interacciones genera una liberación de energía que ayuda a estabilizar el complejo y es la energía que las enzimas utilizan para disminuir la barrera de la energía de activación y aumentar la velocidad de reacción; la segunda etapa es el fraccionamiento del enlace amídico dando como resultado la liberación de un péptido y como etapa final el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. El mecanismo de acción catalítico se muestra en la Figura 6 y sigue la Ecuación 1 de Michaelis-Menten (Benítez *et al.* 2008; Grahame *et al.* 2015).

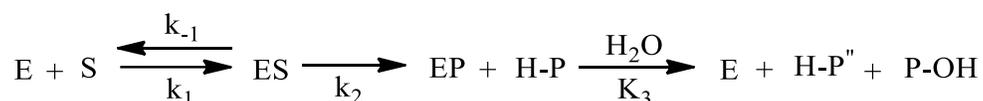


Figura 6. Mecanismo de acción catalítico de una proteasa.

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \rightarrow \frac{1}{V} = \frac{K_M + [S]}{V_{m\acute{a}x}[S]} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x} [S]} + \frac{[S]}{V_{m\acute{a}x}[S]}$$

Ecuación 1. Ecuación de Michaelis-Menten

3.3. CARACTERIZACIÓN DEL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO

Los péptidos obtenidos de la hidrólisis enzimática tienen mejores propiedades funcionales, nutricionales y actividad biológica comparados con la proteína nativa, ya que genera un cambio en las propiedades funcionales, obteniendo péptidos de menor peso molecular, un aumento en la carga y la liberación de grupos

hidrofóbicos entre otros. Todos estos cambios moleculares pueden ser detectados por diferentes métodos analíticos y hacer seguimiento de los mismos. El parámetro más usado para la caracterización molecular del hidrolizado es el grado de hidrólisis, y el análisis de las propiedades funcionales mediante solubilidad y digestibilidad (Benítez *et al.* 2008; Kose *et al.* 2015; Kong *et al.* 2007).

3.3.1.1 Determinación del grado de hidrólisis

El avance de la reacción proteolítica se mide como grado de hidrólisis, se define como la relación entre el número de enlaces peptídicos rotos y el número total de enlaces peptídicos en la proteína, y se calcula de acuerdo a la Ecuación 2, donde h es el número de enlaces peptídicos hidrolizados y h_{tot} el número de enlaces peptídicos presentes en la proteína nativa.

$$GH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

Ecuación 2. *Calculo del grado de hidrólisis*

Existen diferentes métodos para medir el grado de hidrólisis, estos se basan fundamentalmente en la determinación del nitrógeno soluble tras precipitar la proteína, la determinación de los grupos α -amino libre, la valoración del protón liberado tras la ruptura del enlace peptídico a determinados valores de pH y la medida del descenso del punto crioscópico (Velasco C., 2007, Benítez *et al.* 2008).

3.3.1.2. Determinación de los grupos α -amino libres

La determinación del contenido de los grupos α -amino libres es uno de los métodos usados para la determinación del grado de hidrólisis en el que los grupos α -amino reaccionan con reactivos que absorben a una determinada longitud de onda y se hace el seguimiento espectrofotométricamente. Los métodos más usados para el control de estos grupos emplean la reacción con ninhidrina que tiene interferencia con amonio y tiempos de reacción altos; otro reactivo utilizado es el ortofenilaldehído (OPA) que tiene el inconveniente de no reaccionar con prolina y solo parcialmente con cisteína; también se usa el ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) que presenta alto color de los blancos, contaminación del TNBS con el ácido pícrico, interferencia de azúcares reductores y amonio. Spellman *et al.* 2003 y Panasiuk *et al.* 1998 realizaron una comparación entre los dos métodos OPA y TNBS, demostrando que el método OPA es estable solo durante los primeros 20 minutos en comparación con el TNBS, encontrando resultados reproducibles con TNBS (Velasco *et al.* 2007; Benítez *et al.* 2008; Nissen *et al.* 1979).

3.3.1.3. Determinación del contenido de aminoácidos por el método Waters Pico-Tag.

El Método Waters Pico Tag ha sido ampliamente utilizado para el análisis de aminoácidos por más de dos décadas. Este método es aplicable a muestras de hidrolizados proteicos, fluidos fisiológicos, piensos, alimentos y preparaciones farmacéuticas. La determinación del contenido de aminoácidos se hace mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC. El método consiste en una prederivatización con fenilisotiocianato (PITC), que da paso a la formación del complejo feniltiocarbamil (PTC)-aminoácido y después se da la separación de los derivados por cromatografía en fase reversa, el complejo es detectado con alta sensibilidad a 254nm, (Restrepo *et al.* 2011; Or-Rashid *et al.* 2000; Fekkes *et al.* 2000; Schwarz *et al.* 2005; Christo *et al.* 2007; Deyl *et al.* 1986; Sarwar *et al.* 1993).

3.3.2. Solubilidad del hidrolizado

La solubilidad del hidrolizado se debe a la reducción de la estructura secundaria de la proteína y a que la enzima produce liberación de péptidos de menor tamaño molecular aumentando la solubilidad (Kong *et al.* 2007; Quaglia *et al.* 1987), ocasionando la liberación o exposición de los grupos amino y carboxilos ionizables de los aminoácidos que los conforman con mayor capacidad hidrofílica y solvatante. La capacidad de absorber agua es de gran utilidad en la definición del uso potencial de las proteínas modificadas, principalmente si van a ser empleadas en sistemas donde se requiera una buena interacción con el agua, como es el caso de sopas, salsas, masas, productos horneados (Granito *et al.* 2004) y productos cárnicos (Douglas *et al.* 2007).

3.3.3. Análisis proximal del hidrolizado

El análisis proximal es un conjunto de metodologías con las cuales se realiza una caracterización cuantitativa de la composición de un alimento.

3.3.3.1. Humedad o sustancias volátiles

El agua esta presenta en todos los alimentos, la cantidad, el estado físico y la dispersión afecta su aspecto, olor, sabor y textura. Los alimentos en general se consideran que están integrados por dos fracciones, su materia seca y cierta

cantidad de agua, esta agua está en dos formas dentro del alimento como agua libre o agua ligada. El conocimiento del contenido de agua en un alimento ayuda prevenir el crecimiento de microorganismos cuando está por encima de 60% y otras propiedades. La determinar del contenido de agua se realiza de acuerdo a lo establecido por la AOAC 950.43 a través de una deshidratación completa por evaporación del agua en una estufa.

3.3.3.2. Cenizas o materia mineral

Los alimentos contienen elementos minerales formando parte de compuestos orgánicos e inorgánicos; la incineración puede generar una variación en el contenido de los mismos debido a las reacciones que se presentan en el momento de la calcinación. El contenido de cenizas o contenido inorgánico es el que queda después de calcinar la materia orgánica, determina la calidad del alimento de acuerdo a los estándares establecidos. La determinación del contenido inorgánico en un alimento se hace de acuerdo a lo establecido por la AOAC 920.153, para ello se calcina a 500°C la muestra durante 4 horas o hasta obtener un residuo gris.

3.3.3.3. Extracto etéreo o grasa bruta

El extracto etéreo se refiere a las sustancias extraídas con éter etílico que incluyen el grupo de nutrientes llamados grasa bruta o lípidos. La grasa es un componente necesario de los tejidos y esencial en la nutrición, debido a que puede almacenarse y es la principal fuente de energía, la determinación del contenido graso se realiza de acuerdo a lo establecido por la AOAC 991.36, mediante un calentamiento continuo del disolvente se realiza una extracción de la grasa y se cuantifica por pérdida de peso de la muestra en un sistema soxhlet.

3.3.3.4. Nitrógeno total (Proteína)

La determinación del contenido de nitrógeno es una determinación indirecta del contenido proteico en un alimento, se determina mediante una oxidación de la materia orgánica con ácido sulfúrico en presencia de un catalizador para obtener sulfato de amonio, este se neutraliza y libera el amoniaco que es destilado y recogido en una solución de ácido bórico que es titulada con una solución de ácido estandarizado, obteniendo el porcentaje de nitrógeno presente en la muestra. Al multiplicar por un factor de conversión se obtienen el contenido de proteína bruta. Este método fue ideado por Johan Kjeldahl, el cual ha sufrido algunas

modificaciones, las cuales se contemplan en la metodología establecida por la AOAC 968.06.

3.3.3.5. Fibra bruta y extracto no nitrogenado

La fibra bruta presente en un alimento no posee un valor nutritivo, pero tiene como función de estimular el peristaltismo intestinal; está constituido fundamentalmente por celulosa, lignina y pentosanas, suberina, cutina, algínatos y pectinas, constituyentes de las estructuras celulares de los vegetales. La determinación del contenido de fibra se realiza de acuerdo a lo establecido por la AOAC 962.09 mediante una digestión ácido-base, y posterior calcinación del residuo. El contenido de fibra se calcula por medio de la diferencia del residuo y el contenido de cenizas. El extracto no nitrogenado o carbohidratos totales, es una medida indirecta del contenido de carbohidratos mediante una diferencia de 100 menos el contenido de los componentes mencionados en el análisis proximal.

3.3. Digestibilidad de proteínas

La digestibilidad de un alimento proteico se define como la cantidad de nitrógeno que es absorbido tras su ingestión, por esto la digestibilidad está relacionada con la calidad de la proteína; esta puede modificarse por los tratamientos tecnológicos y culinarios a los que son sometidos los alimentos que la contiene y también por la presencia en ellos de factores antinutricionales que afectan la biodisponibilidad de los aminoácidos. La complementación proteica permite, mediante la formulación de mezclas de proteínas de baja calidad, mejorar la biodisponibilidad, y por tanto la calidad de esa mezcla proteica. En los últimos años la nutrición y la tecnología de los alimentos están experimentando una profunda transformación debido al desarrollo del concepto de alimentos funcionales y nutraceuticos. Existen diferentes métodos para evaluar la calidad de una fuente proteica alimentaria, estos pueden ser *in vivo* o *in vitro*, que se han clasificado en químicos, biológicos y microbiológicos. Entre los químicos se incluyen el cómputo químico, aminograma, índice de aminoácidos esenciales (IAAE) y lisina disponible. Dentro de los biológicos se han utilizado y se siguen utilizando el PER (Protein Efficiency Ratio), coeficiente de eficacia en crecimiento (CEC), valor sustitutivo de la proteína, Valor Biológico (VB), Utilización Neta de la Proteína (NPU) y Valor Productivo de la Proteína (PPV) (Martínez *et al.* 2008).

3.3.1 Digestibilidad *in vitro* de proteínas

La digestibilidad proteica se puede determinar mediante metodologías *in vivo* o *in vitro*, en la actualidad se ha investigado alternativas para la determinación de la digestibilidad real de proteínas y otros nutrientes buscando alternativa a las metodologías *in vivo*, debido a que implican mayores costos y tiempo (Tang 2007). De acuerdo a reportes dados por Saunders *et al.* 1998 obtienen resultados reproducibles con la metodología *in vitro*. La digestibilidad *in vitro* consiste en una simulación de las condiciones a las que es sometida la proteína desde el momento de su consumo. La digestión de las proteínas comienza en el estómago con la intervención del ácido clorhídrico que tiene como función estimular la conversión del pepsinógeno en pepsina, esta enzima desdobla proteínas y péptidos, en sitios específicos de la unión peptídica, como el grupo carboxilo de algunos aminoácidos, fenilalanina, triptófano, tirosina, leucina y otros aminoácidos. Después de que la proteína está parcialmente fraccionada, pasa al intestino delgado, en donde las enzimas pancreáticas tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasas A y B son las responsables de continuar su digestión. La hidrólisis final de los péptidos producidos por las enzimas pancreáticas tiene lugar en la superficie de las membranas de los microvilli de las células de la mucosa intestinal, el resultado final de la digestión luminal de las proteínas en el intestino delgado es la obtención de fragmentos de oligopéptidos, dipéptidos y aminoácidos que son absorbidos en la parte ileal del intestino delgado. Se realiza por un mecanismo que utiliza transportadores dependientes de energía, los cuales se encuentran en la membrana de los microvilli (Nakornpanom *et al.* 2010; Wang *et al.* 2008; Wendy *et al.* 2005).

3.3.2. Evaluación nutricional de proteínas

En la actualidad el método sugerido para evaluar la calidad proteica es la calificación del cómputo químico o score de aminoácidos corregido por digestibilidad proteica (protein digestibility corrected amino acid score) o PDCAAS. Este método fue propuesto en 1991 por la FAO y ha reemplazado al PER como la norma para calcular el porcentaje del valor diario de proteína en el rotulado de los alimentos para adultos y niños mayores de un año de edad. Para cumplir con los requerimientos proteicos más rigurosos, el PDCAAS compara el perfil de aminoácidos de una proteína en estudio con las necesidades del niño mayor a un año que representan los requerimientos más exigentes de los diferentes grupos etarios a excepción de los lactantes que se comparan con la leche humana. El PDCAAS más alto que puede recibir una proteína es 1.0. Las calificaciones por encima de 1.0 se nivelan pues todos los aminoácidos en exceso no son utilizados para la síntesis de tejidos, sino que son desaminados y oxidados para ser utilizados en el metabolismo energético o almacenados como tejido adiposo. El PDCAAS se

calcula multiplicando el valor correspondiente al escore por el valor correspondiente a la digestibilidad con la Ecuación 3 y 4.

$$PDCASS = \text{Escore} \times \% \text{ Digestibilidad}$$

Ecuación 3. *Calidad proteica*

$$\text{Escore} = \frac{\text{mg aminoácido proteína en estudio}}{\text{mg de aminoácidos en proteína patrón}}$$

Ecuación 4. *Score de aminoácidos en la proteína de estudio*

3.5. MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

La Metodología de Superficie de Respuesta es una estrategia de experimentación secuencial y modelación que permite estimar las condiciones óptimas de operación de un proceso y mejorar significativamente su resultado en cuanto a costos, tiempos, eficiencia y productividad (Montgomery *et al.* 2001). Cuando decimos que el valor real esperado, η , que toma la variable de interés considerada está influido por los niveles de k factores cuantitativos, X_1, X_2, \dots, X_k (que se supone continua en $X_i, \forall i = 1, \dots, k$) que proporciona el correspondiente valor de η para alguna combinación dada de niveles:

$$\eta = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$$

de tal forma que la variable respuesta puede expresarse como:

$$Y = \eta + \varepsilon = f(X_1, X_2, \dots, X_k) + \varepsilon$$

Donde ε es el error observado en la respuesta.

La relación $\eta = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$ existente entre η y los niveles de los k factores puede representarse a través de una hipersuperficie (subconjunto de un espacio euclídeo $(k + 1)$ dimensional) a la que llamaremos superficie de respuesta.

Para el estudio de este método se deben tener en cuenta los términos usados; factores: son las condiciones del proceso que influyen la variable de respuesta, estos pueden ser cuantitativos o cualitativos; respuesta: es una cantidad medible cuyo valor se ve afectado al cambiar los niveles de los factores, el interés principal es optimizar dicho valor; función de respuesta predicha: la función de respuesta se puede representar con una ecuación polinomial, el éxito de un proceso de optimización depende de cómo se pueda ajustar a un polinomio de primer o segundo orden (Ecuación 5 y 6), donde la función de respuesta Y depende de los

niveles x_1, x_2, \dots, x_k de k factores, en este los β_i son los coeficientes de regresión para los términos de primer orden, los β_{ii} son los coeficientes para los términos cuadráticos puros, los β_{ij} son los coeficientes para los términos de producto cruz y ϵ es el término del error aleatorio; superficie de respuesta: es la relación entre la función de respuesta y los niveles de los factores, se representa por una superficie como se observa en la Figura 7; grafica de contorno: consiste en representar la gráfica de contorno de la superficie, en la que se trazan las denominadas líneas de contorno, que son curvas correspondientes a valores constantes de la respuesta sobre el plano. La gráfica de contornos resulta útil para estudiar los niveles de los factores en los que se da un cambio en la forma o altura de la superficie de respuesta como se observa en la Figura 8.

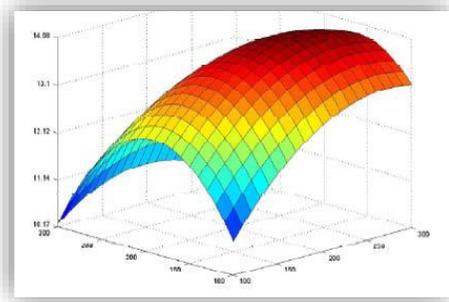


Figura 7. Representación gráfica de la interacción de los factores y la respuesta.

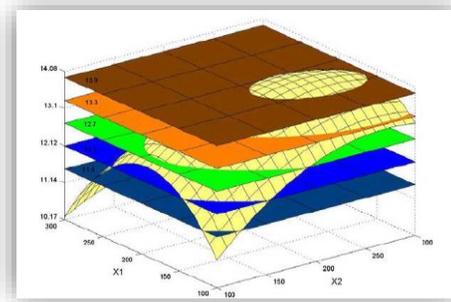


Figura 8. Gráfica de contorno.

El modelo que sigue el ajuste es un polinomio de segundo orden (Ecuación 5):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^K \beta_i x_i + \sum_{i=1}^K \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j}^K \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon$$

Ecuación 5. Polinomio de segundo orden MSR

Los parámetros del modelo se estiman mediante el método de mínimos cuadrados, una vez se tienen los estimados se sustituye en la ecuación y se obtiene un modelo ajustado (Ecuación 6):

$$Y^{\wedge} = b_0 + \sum_{i=1}^K b_i x_i + \sum_{i=1}^K b_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j}^K b_{ij} x_i x_j + \epsilon$$

Ecuación 6. Polinomio de segundo orden modelo ajustado

3.6. APLICACIONES

Los hidrolizados proteicos se utilizan ampliamente en la industria alimentaria por sus propiedades funcionales, nutrición infantil, clínica y como fuente de péptidos bioactivos. Dependiendo del grado de hidrólisis pueden clasificarse en tres grupos: i) hidrolizados con un grado de hidrólisis menor al 10%, se usan como modificadores

de las propiedades funcionales de los alimentos (especialmente en panadería, heladería, elaboración de salsas y mayonesas). ii) un grado de hidrólisis mayor al 10% se usan en la formulación de alimentos infantiles como fuente nitrógeno y dietas especiales. Estos hidrolizados mejoran las características nutricionales de la proteína nativa (Pedroche *et al.* 2003). También es frecuente su uso como potenciadores del sabor (principalmente en sopas, salchichas, alimentos precocinados y productos cárnicos). iii) fuente de péptidos bioactivos de interés creciente para la industria alimentaria y farmacéutica (Korhonen *et al.* 2003; Velasco *et al.* 2007; Lamsal *et al.* 2007).

3.6.1. Propiedades funcionales

La incorporación de hidrolizados enzimáticos de proteínas a alimentos genera un cambio en las propiedades fisicoquímicas, como la solubilidad, el poder emulsificante, la capacidad espumante, la adsorción de agua, muy importantes desde el punto de vista tecnológicos, además estos hidrolizados son potenciadores del sabor debido a la liberación de ácido glutámico en la hidrólisis (Nielsen *et al.* 2002; Nilsang *et al.* 2004). La solubilidad depende de la fuente y del grado de hidrólisis del producto, y se genera debido a la reducción de peso molecular y al aumento de grupos polares en el medio.

Por otra parte Nissen 1979 comprobaron que la longitud de la cadena peptídica que compone la proteína influye de manera notable en las propiedades funcionales especialmente en el poder emulsificante y la capacidad espumante. Los hidrolizados de caseína o soja al 1-2% presentan una mayor capacidad emulsificante que la proteína nativa, disminuyendo significativamente a grados de hidrólisis mayores. También ocurre así para las proteínas séricas: un hidrolizado de proteínas del suero lácteo con Corolase PN-L al 1% empleado como agente emulsificante en salsas, mostró mejores propiedades emulsificantes y dio lugar a un emulsión más estable que en el caso de usar un concentrado de proteínas del lactosuero (WPC) o β -lactoglobulina nativa (Christiansen *et al.* 2004). Tuncturk *et al.* 2006 comprobaron que la hidrólisis limitada de caseína con Neutrasa[®] mejora la capacidad emulsificante, la estabilidad de la emulsión formada y la densidad de la emulsión frente a la proteína nativa. Por el contrario, un mayor grado de hidrólisis conlleva a un empeoramiento de las propiedades anteriores.

En cuanto a la capacidad espumante Halling *et al.* 1981 demostraron que la proteólisis aumenta el poder espumante de las proteínas pero disminuye la estabilidad de la espuma formada. La rotura de enlaces y el desdoblamiento de la proteína por el proceso de hidrólisis favorecen el reagrupamiento de péptidos y la formación de una película en la interface agua-aire. Sin embargo, la película formada no es lo suficientemente gruesa ni visco-elástica para dar estabilidad a la

espuma. Por tanto, el tamaño molecular medio de los péptidos liberados durante la hidrólisis es decisivo en la formación de espumas. Larre *et al.* 2002 compararon la capacidad espumante de hidrolizados de proteínas de gluten. La hidrólisis la realizaron con quimotripsina y el hidrolizado resultante se fraccionó mediante ultrafiltración (corte de 50 kDa y 150 kDa). Para los dos tamaños de corte ensayados, los hidrolizados completos presentaron una gran capacidad espumante, aunque la espuma formada era poco estable. Los filtrados (de bajo peso molecular) apenas poseían poder espumante mientras que los retenidos (péptidos de cadena larga) formaban fácilmente espumas y además, éstas poseían mayor estabilidad que las formadas por el hidrolizado completo.

Al igual que el poder espumante, la capacidad de adsorción de agua está íntimamente relacionada con los fenómenos interfaciales. De hecho, una adsorción rápida conlleva una mejor capacidad espumante y emulsificante. Kumagai *et al.* 2002 estudiaron la interacción agua-proteínas y los fenómenos superficiales asociados. Los autores hidrolizaron con tripsina muestras de ovoalbúmina, un aislado de proteínas de soja y caseína. Y determinaron el grado de hidrólisis, la actividad acuosa y la capacidad espumante. Los valores de actividad acuosa disminuían a medida que el grado de hidrólisis aumentaba, mostrando la ovoalbúmina el menor valor de adsorción de agua, en el estudio se concluyó la disminución de la adsorción de agua, que puede relacionarse con un aumento de la capacidad espumante del hidrolizado para todas las proteínas ensayadas.

3.6.2. Nutrición infantil y clínica

La hidrólisis aumenta la digestibilidad de las proteínas y favorece su absorción en el intestino, además reduce el carácter alergénico de las proteínas. Estos hidrolizados deben cumplir con determinadas características para que pueden ser usados en la formulación de dietas enterales; requieren ser osmóticamente equilibrados, hipoalergénicos, altamente nutritivo y tener sabor agradable. La alergenicidad y amargor desaparecen para hidrolizados con un tamaño molecular medio menor de 1000 Da (Velasco *et al.* 2007; Benítez *et al.* 2008; Wroblewska *et al.* 2004).

La hidrólisis parcial de caseína bovina mediante enzimas pancreáticas ha demostrado ser un método válido para la reducción del poder alergénico de esta proteína (Mahmoud *et al.* 1992). Nakamura *et al.* 1993 patentaron un proceso para reducir la alergenicidad de las proteínas séricas. Los autores ensayaron la hidrólisis extensiva y selectiva de β -lactoglobulina con proteínas vegetales (papaína y bromelaína) en medio alcalino, reduciendo considerablemente la alergenicidad del preparado proteico.

Boza *et al.* (1995) caracterizaron un hidrolizado comercial de proteínas del lactosuero. Los autores determinaron la composición química, la distribución de pesos moleculares, la calidad nutricional (mediante ensayos con ratas) y el potencial antigénico (mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*). La mayor parte del hidrolizado se componía de péptidos de bajo peso molecular, con sólo una fracción del 7.5 % entre 1000 y 3000 Da. La calidad nutricional de la proteína (medida mediante el índice NPU) fue alta si se compara a una proteína de referencia (caseína más 5% de DL-metionina), aunque el índice PER fue ligeramente inferior para el hidrolizado. La antigenicidad del hidrolizado resultó ser cinco veces menor que para la β -lactoglobulina y mostró propiedades profilácticas y terapéuticas en ensayos con animales. Por todo ello, se concluyó que los hidrolizados de proteínas del lactosuero eran aptos para la formulación de dietas especiales para nutrición enteral.

4. METODOLOGÍA

4.1. REACTIVOS, SOLVENTES, EQUIPOS Y MATERIALES.

4.1.1. Reactivos y solventes

- Isooctano (99,9%)(Honeywell)
- Hidróxido de sodio (99%) (Merck Millipore)
- Ácido sulfúrico (95-97%) (Merck Millipore)
- Pastillas catalizador Kjeldahl (Merck)
- Azul de metileno (Merck Millipore)
- Rojo de metilo (Merck Millipore)
- Alcohol etílico (99,8%) (Fischer Scientific)
- Ácido bórico (98%) (Merck Millipore)
- Neutrasa® 1,5 MG E.C. 9080-56-2 de Novozymes, actividad de 1,5 UA/g
- BAN 460 Alfa amilasa (Novozymes)
- Ácido tricloroacético (Merck)
- Triptófano (Sigma Aldrich)
- Ácido trinitrobenceno sulfónico (Sigma Aldrich)
- Fosfato dibásico de potasio hidratado (99%) (Merck)
- Fosfato monobásico de potasio monohidratado (99%) (Merck)
- Sulfito de sodio (Merck)
- Leucina (Sigma Aldrich)
- Ácido fosfomolibdotúngstico (Merck)
- Albumina bovina (Sigma Aldrich)
- Bicarbonato de sodio (98%) (Merck Millipore)

- Sulfato de cobre (Carlo Erba)
- Tartrato de sodio-potasio (Sigma Aldrich)
- Pepsina (Sigma Aldrich)
- Antibiótico amikacina 500mg/2mL (Genfar)
- Pancreatina (Sigma Aldrich)
- Acetona (Fischer Scientific)
- Caseína (Sigma Aldrich)
- Acetonitrilo grado analítico (99,93%) (Sigma Aldrich)
- Metanol grado HPLC (Fischer Scientific)
- Etanol grado HPLC (Sigma Aldrich)
- Ácido acético glacial (Fischer Scientific)
- Ácido fosfórico (Sigma Aldrich)
- Acetato de sodio (Sigma Aldrich)
- Trietilamina (Merck Millipore)
- Estándar de aminoácidos (Cys, Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Tyr, Thr, Val, Ala, Asp, Glu, Gly, Pro, Ser, Trp) (Sigma Aldrich)
- Fenilisotiocianato (Merck Millipore)

4.1.2. Equipos

- Estufa, Jeio Tech, (Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad del Cauca)
- Balanza analítica, Kern AES 220-4 (220g/0,0001g) (Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agrarias) (Universidad del Cauca)
- Planchas de calentamiento con agitación magnética, CORNING (Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agrarias) (Universidad del Cauca)
- Equipo Kjeldahl (Buchi) (Unidad de Análisis Industrial, Laboratorio de Aguas, Departamento de Química, Universidad del Cauca)
- Mufla, Laboratorio Química de Productos Naturales, Departamento de Química, Universidad del Cauca)
- Centrifuga Refrigerada Hermle Labortechnik GmbH, Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad del Cauca)
- Espectrofotómetro UV-Vis, SHIMADZU CORPORATION (Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad del Cauca)
- Rotaevaporador Heidolph (Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad del Cauca)
- Baño termostático Polystat 2W7 (Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad del Cauca)

- Rotor Mecánico IKA WERKE RW16 basic (Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad del Cauca)
- Vortex Mixer (Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad del Cauca)
- Bomba de vacío (Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad del Cauca)
- pH metro Metrohm 827 (Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad del Cauca)
- Shaker Thermo Scientific MAXQ 445 (Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad del Cauca)
- Cromatógrafo líquido de alta resolución SHIMADZU, modelo LC-2010AHT con 2 bombas modelo 510, automuestreador con loop de inyección de 1-250µL, módulo de control de temperatura, detector UV Waters 486. Software Millennium 2010 de Waters (QUANTAR S.A.S Cali-Colombia).
- Columna C18 Waters Pico Tag (300x3,9mm,3µm) Fase reversa (QUANTAR S.A.S Cali-Colombia)
- Balanza de humedad Kern (60g/0,001g) (Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad del Cauca).

4.2. CONSECUCCIÓN DE LA MATERIA PRIMA

El desarrollo de esta investigación se realizó con harina de trigo *Triticum* refinada y harina de quinua, variedad blanca de Jericó del municipio de Bolívar Cauca. Para obtener la harina de quinua, esta se sometió a un proceso de desaponificación a 70 °C por 5 seg, posteriormente los granos se llevaron a molienda en la empresa SEGALCO S.A.S de la ciudad de Popayán, proveedores de la materia prima, quienes tienen interés en los resultados de esta investigación para la formulación de un producto a base de quinua.

4.3. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

4.3.1. Determinación del contenido de humedad

La determinación del contenido de humedad en la materia prima se realizó de acuerdo a lo establecido en la AOAC 950.43. Se tomaron $5,0007 \pm 0,0002$ g de muestra finamente particularizada, se esparció homogéneamente en una caja de Petri que se llevó a una estufa a 105°C por 4 horas, después se enfrió a temperatura ambiente por media hora, se pesó y continuó con el proceso hasta obtener un peso constante.

4.3.2. Determinación de cenizas o materia mineral

El contenido de cenizas se determinó de acuerdo a lo establecido en la AOAC 920.153, 1,0004 ± 0,0006 g de muestra se calcino a 500°C durante 2 horas, el calentamiento se hizo gradualmente para evitar pérdidas de cenizas por el cambio brusco.

4.3.3. Determinación del extracto etéreo o grasa bruta.

El contenido de grasa en la muestra se determinó de acuerdo a lo establecido por la AOAC 991.36, el material se lavó con una solución de NaOH garantizando eliminación de interferencias, posteriormente se pesaron 3,0003 ± 0,0005 g de muestra en un cartucho de celulosa que se llevó a la cámara soxhlet con un sistema de reflujo constante con calentamiento hasta el punto de ebullición del Isooctano, el reflujo se mantuvo durante 4 horas, el contenido de grasa se determina por diferencia de peso.

4.3.4. Determinación del contenido de nitrógeno total (Proteína)

La cantidad de proteína se determinó de acuerdo a lo establecido por la AOAC 968.06, 5,0007 ± 0,0002 g de muestra se sometieron a una oxidación con 10 mL de ácido sulfúrico concentrado por 3 horas hasta que la solución tomó una coloración traslúcida, en este proceso se obtuvo el nitrógeno como sulfato de amonio, este se neutralizó con 50 mL de una solución alcalina, dándose la liberación del amoniaco que fue destilado y recogido en una solución de ácido bórico, quedando como borato de amonio, este fue titulado con una solución estandarizada de ácido clorhídrico 0,1 N. El proceso de digestión y destilación del amoniaco se realizó en el equipo Kjeldahl. El contenido proteico se obtuvo multiplicando el contenido de nitrógeno por el factor de corrección 6,25 que es el usado para cereales (Jones *et al.* 2000).

4.3.5. Determinación de fibra y extracto no nitrogenado

El contenido de fibra en la muestra se determinó siguiendo la metodología establecida por la AOAC 962.02, 2,0006 ± 0,0005 g de muestra desengrasada se llevaron a una digestión con una solución caliente de ácido sulfúrico durante 30 minutos, después se lavó con agua caliente y se sometió a una digestión con una solución caliente de hidróxido de sodio durante 30 minutos, posteriormente se lavó con agua caliente y se llevó a calcinación el residuo que quedó después del lavado. El contenido de fibra es la diferencia entre el residuo y las cenizas obtenidas.

4.4. ENZIMAS

Para el desarrollo de este trabajo se hicieron ensayos preliminares con Neutrasa® 1,5 MG E.C. 9080-56-2 de Novozymes, con una actividad de 1,5 UA-N/g (UA: Unidades Anson), 9 g de cada 100 g es proteína, solida granulada color marrón, es producida por *Bacillus amyloliquefaciens* mediante fermentación sumergida de un microorganismo, su rango óptimo de temperatura es de 45-55°C y un pH entre 5,5-7,5. Esta metaloendoproteasa actúa sobre el carbono terminal de fenilalanina, leucina y valina.

4.5. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE HARINAS POR VÍA SECA

Para llevar a cabo la hidrólisis enzimática en seco se realizó un montaje especializado para reacción en base seca, controlando agitación, temperatura y tiempo de reacción. El montaje para la hidrólisis enzimática se realizó de acuerdo a las condiciones necesarias para la reacción; para el control de temperatura se usó el baño termostático del rotaevaporador de marca Buchi, un motor eléctrico con un aspa que garantiza una homogenización y contacto constante entre la enzima y el sustrato como se observa en la Figura 9.



Figura 9. Montaje para hidrólisis enzimática en base seca.

Posteriormente se calentó 500 g de harina o mezcla de harinas a la temperatura establecida en el diseño experimental. Una vez alcanzada dicha temperatura, la mezcla se llevó a una humedad del 23% con la enzima activada previamente a 50°C, esta solución fue agregada mediante aspersion con agitación constante. La determinación del contenido de humedad en la mezcla se realizó cuando la harina

había alcanzado la temperatura establecida, esta medición se hizo en la balanza de humedad que se muestra en la Figura 10 y se calcula la cantidad de agua necesaria para llevar a la humedad requerida. Una vez rociada la solución enzimática, se tomó el tiempo cero de reacción y se inactivo la enzima para parar la reacción a 100°C durante 20 min como se observa en la Figura 11, se continuó tomando muestra de acuerdo al tiempo establecido.



Figura 10. Determinación del % Humedad. Balanza de humedad Kern.



Figura 11. Desnaturalización de la enzima a 100 °C

4.6. PRUEBAS AL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO

4.6.1. Pruebas de solubilidad

La evaluación de los cambios en las propiedades funcionales de las muestras generados por el proceso de hidrólisis enzimática y la elección de las condiciones de reacción de la enzima, se realizaron con pruebas de hidrólisis enzimática a 50°C y 60°C durante 12 h y 24 h. 5,0006 ± 0,0002 g de muestra se solubilizaron en 60 mL de agua con ayuda del vortex, posteriormente se centrifugo a 10000 r.p.m y se filtró al vacío, el residuo que se observa en la Figura 12 se llevó a calentamiento en una estufa a 105°C para ser secado y luego pesado hasta peso constante, el porcentaje de solubilidad se determinó calculando la diferencia de pesos.



Figura 12. Residuo insoluble del hidrolizado enzimático

4.6.2. Determinación de la actividad y cinética enzimática

La determinación de la actividad de la enzima Neutrasa® se realizó de acuerdo a las condiciones de reacción del proceso de hidrólisis enzimática para materiales secos, usando como sustrato quinua para ver el comportamiento de la enzima y proteína aislada de soya con un 90% de proteína. El seguimiento se realizó mediante tres métodos espectrofotométricos descritos a continuación. Se determinó la actividad de la enzima después del tiempo de reacción de hidrólisis y 30 días después, para corroborar que el proceso de inactivación de la enzima está siendo eficiente y así mismo garantizar que la enzima no siga reaccionando y genere péptidos de bajo peso molecular que no son aceptables al consumir por su sabor amargo.

4.6.2.1. Determinación actividad enzimática método TCA

La evaluación de la actividad de la enzima se realizó pesando 50 g de muestra cada 30 minutos hasta completar un tiempo de reacción de 60 a 90 minutos, la cuantificación se realizó espectrofotométricamente precipitando proteínas con ácido tricloroacético; 0,1003 ± 0,0005 g de muestra se solubilizaron en 10 mL de agua destilada con ayuda del vortex, posteriormente se agregó 1 mL de ácido tri-cloro acético para precipitar las proteínas que quedaron parcialmente solubles, luego se centrifugo a 4500 r.p.m por 10 minutos, y se realizó la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de $\lambda = 278$ nm. La cuantificación se desarrolló mediante una curva de calibración de triptófano que incluyo concentraciones de 0 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm y 20ppm.

4.6.2.2. Determinación actividad enzimática método TNBS

La evaluación de la actividad de la enzima mediante el método TNBS se realizó siguiendo el procedimiento mencionado. La cuantificación se realizó espectrofotométricamente por detección del complejo formado entre el grupo amino y el ácido trinitrobencenosulfónico como se observa en la Figura 13. A 0,5 g de muestra (hidrolizado enzimático de proteína de soya o quinua) se le adicionaron 6 mL de solución buffer fosfato pH=7, posteriormente se llevó a agitación en el vórtex por 10 segundos, luego se centrifugo a 12000 r.p.m a 4°C por 15 minutos. Posteriormente se filtró al vacío y 1 mL se aforo a 5 mL. Para la reacción se tomaron 128 μ L de la solución anterior y se le adiciono 2mL de solución buffer pH=8.2 y 1 mL de TNBS 0,01%, luego se llevó a un baño maría a temperatura constante de 50°C por 30 minutos y se adiciono 2 mL de solución de bisulfito de sodio 0,1 M y se dejó en reposo 15 minutos. La lectura se realizó en el espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de onda de 410 nm. La cuantificación se realizó mediante curva de

calibración con leucina a concentraciones de 0,6 ppm, 1,2 ppm, 1,8 ppm, 3 ppm, 4,2 ppm y 6 ppm; se tomaron 128 μL de la solución estándar y se continuó con el proceso mencionado para la muestra.

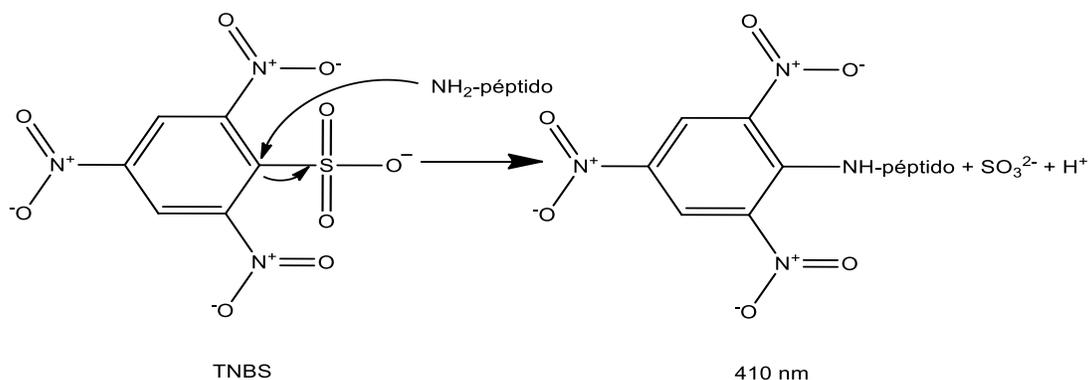


Figura 13. Reacción del TNBS con los aminoácidos primarios libres.

4.6.2.3. Determinación actividad enzimática método Lowry.

La determinación de la actividad enzimática mediante este método se realizó con las muestras obtenidas del proceso de hidrólisis enzimática en seco, se pesaron 50 g de muestra cada 30 minutos hasta completar un tiempo de reacción de 60 a 90 minutos, la cuantificación se realizó espectrofotométricamente al formarse un complejo de coordinación entre el cobre y el nitrógeno peptídico como se observa en la Figura 14. El reactivo de Lowry está compuesto por tres soluciones que se mezclaron en una relación 1:0,005:0,005 en el momento de su uso: Carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1 M, sulfato de cobre al 1%, tartrato sodio-potasio al 2%, esta solución tomó una coloración azul clara, posteriormente se agregó el reactivo de Folin-Ciocalteu que tiene una coloración amarilla, al reducirse toma una coloración azul oscura (Figura 14), este reactivo de fenoles viene preparado comercialmente, se debe mantener en refrigeración y preparar la solución antes de su uso, se diluye en la relación de 1 parte de reactivo por 2 de agua destilada.

Para la cuantificación se pesaron $0,1003 \pm 0,0008$ g de muestra y se solubilizaron en 10 mL, se llevó a centrifugación a 4500 r.p.m y posterior filtración; a 1 mL de la solución se le agregó 5 mL de la solución preparada inicialmente, se esperó 10 minutos y se agregó 0,5 mL del reactivo de Folin, posteriormente se realizó la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de $\lambda=660\text{nm}$ después de 30 minutos. La cuantificación se hizo mediante una curva de calibración de albumina bovina con concentraciones de 0 ppm, 30 ppm, 60 ppm, 120 ppm, 150 ppm, 180 ppm y 200 ppm.

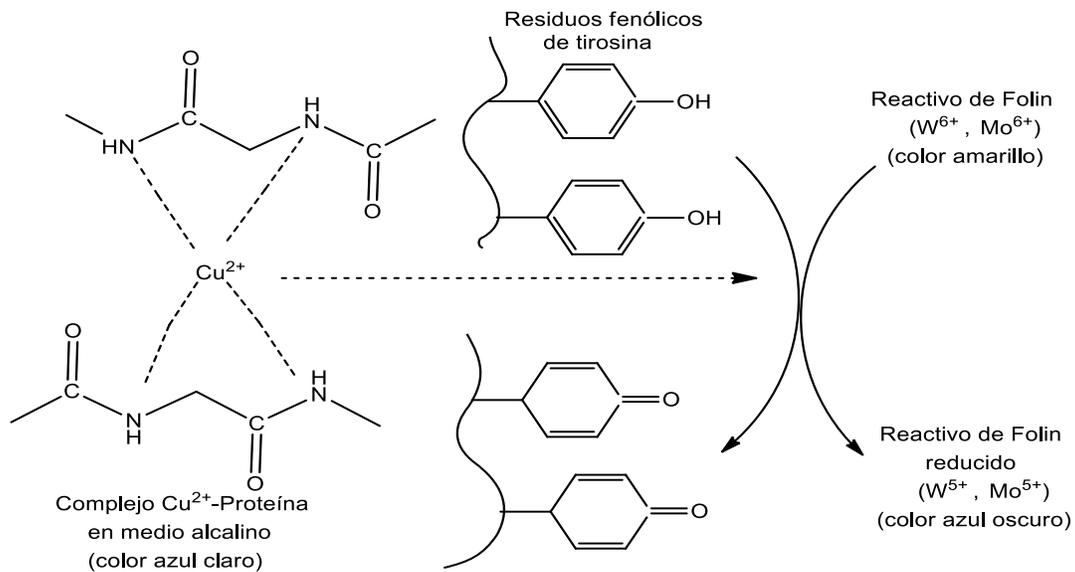


Figura 14. Reacción entre la proteína y los reactivos, método de Lowry.

4.7. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

El control de la hidrólisis enzimática se realizó mediante pruebas espectrofotométricas: TNBS y Lowry. La cuantificación se realizó mediante curvas de calibración con leucina y albumina respectivamente, siguiendo la metodología planteada en los ítems 4.6.2.2 y 4.6.2.3. El avance de la reacción proteolítica se determinó como grado de hidrólisis, que se define como la relación entre el número de enlaces peptídicos rotos y el número total de enlaces peptídicos en la proteína, se calcula de acuerdo a la Ecuación 1.

4.8. DISEÑO EXPERIMENTAL OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR LA METODOLOGÍA SUPERFICIE DE RESPUESTA

El planteamiento del diseño se realizó basándose en los resultados encontrados en ensayos preliminares de hidrólisis, lo reportado por Wang *et al.* 2009 y las condiciones de reacción de la enzima, evaluándose el efecto que tiene la temperatura, el tiempo y la relación enzima-sustrato sobre las variables de respuesta digestibilidad *in vitro* y grado de hidrólisis, ver Tabla 6. Se evaluaron 3 factores a tres niveles, temperatura entre 35°C y 65°C, tiempo entre 30 min y 90 min, y la concentración de enzima sustrato entre 0,75% y 2,25%.

Tabla 7. Factores del diseño experimental.

Factor	- 1	0	1
Temperatura	35	50	65
Tiempo	30	60	90
E/S	0,75	1,5	2,25

La optimización de las condiciones de hidrólisis se realizó mediante el empleo de la metodología de superficie de respuesta (RSM), con un diseño central compuesto con puntos estrella, completamente al azar y rotable. La ejecución del diseño experimental de la Tabla 7 se realizó usando el software Statgraphics® Centurion XVI desarrollado por Statpoint Technologies, Inc.

Tabla 8. Diseño experimental: optimización por superficie de respuesta.

Número de corrida	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	E/S (w/w)
1	50	60	1,500
2	50	9,6	1,500
3	50	60	1,500
4	50	60	1,500
5	65	90	2,250
6	50	60	2,761
7	65	30	2,250
8	35	30	2,250
9	25	60	1,500
10	35	90	0,750
11	75	60	1,500
12	50	60	0,239
13	35	30	0,750
14	35	90	2,250
15	65	90	0,750
16	65	30	0,750
17	50	110	1,500

4.9. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO NUTRICIONAL DE LAS MUESTRAS.

4.9.1. Caracterización proximal de las muestras

La caracterización del hidrolizado encontrado en el punto óptimo y las muestras que no han recibido ningún tratamiento, se realizaron de acuerdo a la metodología establecida en el ítem 4.3.

4.9.2. Determinación del contenido de aminoácidos

La determinación del contenido de aminoácidos se realizó de acuerdo al método PICO-TAG de Waters Corporation (1995), trabajada por Restrepo *et al.* 2011 y lo establecido por la AOAC 994.1210. La cuantificación de aminoácidos se realizó por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con columna en fase reversa, columna C18 Waters Pico Tag (300 x 3,9 mm, 3 µm) en QUANTAR S.A.S Cali-Colombia.

Tratamiento de muestra: la muestra se oxido con ácido clorhídrico 6 N, durante 24 horas a 110°C, posteriormente el ácido se evaporo a sequedad. La solución de estándares de aminoácidos se preparó en HCl 0,1 N con concentraciones de 4,2 ppm, 8,3 ppm, 12,5 ppm, 16,7 ppm y 20,8 ppm. Cada corrida se realizó por triplicado.

Etapas de secado y derivatización: Etapa 1. Proceso de resecado: la solución de resecado está compuesta de etanol, agua y trietilamina en una relación 2:2:1 respectivamente. A 50 µL de la muestra y a las soluciones estándar de aminoácidos se adiciono 10 µL de la solución de resecado, posteriormente se liofilizó a sequedad a -40°C durante 30 min hasta eliminación completa del solvente. **Etapa 2.** Preparación del reactivo derivatizante: Se preparó mezclando etanol, agua, trietilamina y fenilisotiocianato (PITC; reactivo de Edman) en la relación 7:1:1:1, respectivamente. **Etapa 3.** Reacción de derivatización: se adiciono 20 µL de reactivo derivatizante a la muestra obtenida en la etapa 1, posteriormente se liofilizó durante 30 min con el propósito de secar completamente el fenilisotiocianato que no reacciona.

Preparación de soluciones: Fases móviles y diluentes: Fase móvil A: Mezcla de acetato de sodio 0,150M (pH=6,4, se titula con ácido acético glacial para llevar a este pH) y acetonitrilo (16:1, v/v), posteriormente se agregó 5,2 µL de trietilamina. Fase móvil B: Agua-acetonitrilo (0,6:1, v/v), previamente desgasificada en ultrasonido durante 20 seg. Solución diluyente de la muestra: Solución de fosfato disódico (solución de fosfato disódico 0,005 N que se lleva a pH=7,4 con ácido fosfórico) y acetonitrilo (19:1, v/v).

Inyección de muestra: A la muestra obtenida en la etapa 3 se le adiciono 600 µL de la solución diluyente Pico -Tag, se agitó en vortex y se inyectó 5 µL de la muestra derivatizada. Los aminoácidos derivatizados son separados en una columna C18 Waters Pico Tag (300x3, 9mm, 3µm) fase reversa, a una velocidad de flujo de 1,0 mL/min, se usó un gradiente multietapas simple de dos solventes, temperatura constante de 38°C, la identificación se realizó utilizando un detector ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm.

4.9.3. Digestibilidad *in vitro* de proteínas.

La determinación de la digestibilidad *in vitro* se realizó siguiendo lo establecido en la norma técnica colombiana NTC 719 y haciendo algunas modificaciones de lo reportado por Miller *et al.* 1997. La simulación de la digestibilidad *in vitro* de proteínas se da en 2 etapas:

Etapa 1: Simulación de la digestión gástrica: A 0,5 g de la muestra se le adicionaron 25 mL de buffer fosfato 0,1 M a pH=6, posteriormente se agitó y agrego 10mL de HCl 0,2 N, luego se ajustó el pH=2 con solución de HCl 1N y NaOH 1N. Posteriormente se agregó 25 mg de pepsina y 1mL de antibiótico para evitar el crecimiento bacteriano, seguido de una incubación por 2h a 39°C con agitación constante en el equipo shaker que se observa en la Figura 15.



Figura 15. Shaker, equipo con agitación constante y control de temperatura.



Figura 16. Precipitación de proteínas con TCA

Etapa 2: Simulación de la digestión post-gástrica: Después de terminar el primer periodo de incubación, se agregó 10mL de buffer fosfato 0,2 M a pH 6,8 y 5 mL de NaOH 0,6M y se ajustó el pH a 6,8, con soluciones de HCl 1N y NaOH 1N. Posteriormente se agregó 100 mg de pancreatina y se dejó en incubación por 4 h. Terminado el tiempo de incubación se dejó las muestras a temperatura ambiente y se agregó 5mL de ácido tricloroacético para precipitar las proteínas ligeramente solubles que quedaron sin ser digeridas como se observa en la Figura 16, por un tiempo de 30 min. Posteriormente se centrifugo y separo la proteína residual que no fue digerida con un solvente orgánico, y se llevó a secar a 40°C por 12 h. Finalmente se determinó el contenido proteico del residuo por el método Kjeldahl, usando el equipo de la Figura 17. El cálculo de digestibilidad se realiza mediante la Ecuación 7.

$$\%D = \frac{P_1 - P_2}{P_1} \times 100$$

Ecuación 7. Calculo del porcentaje de digestibilidad *in vitro* de una proteína

Donde P_1 es la concentración de proteína que hay en la muestra cruda y P_2 es la concentración de proteína que hay en el residuo que no fue digerido.



Figura 17. *Equipo Kjeldahl, determinación del contenido de nitrógeno total (Proteína).*

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1. OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA

El grano de quinua es de la variedad blanca de Jericó, cultivada por agricultores del municipio de Bolívar Cauca, los granos son esféricos, tienen un tamaño aproximadamente 3 mm, coloración crema como se observa en la Figura 18, a, b; la harina de trigo *Triticum spp* es refinada, de coloración blanca (Figura 18, c). El desarrollo de este trabajo se realizó con una mezcla de trigo y quinua, que tiene como objetivo complementar la deficiencia de aminoácidos esenciales de los cereales de mayor consumo, esta mezcla presenta una coloración crema debido al porcentaje de harina de quinua (Figura 18, d)



Figura 18. Materia prima. a) Granos de quinua, b) Harina de quinua, c) Harina de trigo, d) Mezcla de harina trigo/quinua.

5.2 CARACTERIZACIÓN PROXIMAL DE LA MATERIA PRIMA

A continuación se muestra la composición proximal de la materia prima, usada para la investigación.

Tabla 9. Composición proximal de la materia prima en base seca

Cereal	Trigo	Quinua	Método
% Humedad	12,834 ± 0,083	8,128 ± 0,247	AOAC 950.43
% Ceniza	1,049 ± 0,043	1,117 ± 0,010	AOAC 920.153

% Grasa	1,284 ± 0,193	8,827 ± 0,057	AOAC 991.36
% Proteína bruta	12,983 ± 0,112	16,644 ± 0,155	AOAC 968.06
% Fibra bruta	4,174 ± 0,213	3,981 ± 0,366	AOAC 962.09
% Carbohidratos*	81,510 ± 0,140	69,431 ± 0,209	

*Calculado por diferencia. Continuación tabla 9.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la composición proximal de la materia prima Tabla 9, se observa que el contenido de proteína, ácidos grasos y cenizas en quinua es mayor que en trigo, arroz y maíz (cocidos tradicionalmente como granos de oro Rojas *et al.* 2010) al comparar con lo reportado por Koziol *et al.* 1992. Se observa en la Tabla 10 que el contenido proteico aportado por la quinua está cerca de lo reportado en los ensayos, de igual forma el contenido de grasa, carbohidratos y la energía aportada por esta. El valor nutricional referente al contenido de ácidos grasos es mayor en quinua que en otros cereales (Tabla 10), se caracteriza por tener en su composición ácidos grasos como el omega 3 y omega 6 los cuales ayudan a reducir el colesterol LDL (o colesterol malo) del organismo y elevar el colesterol HDL (o colesterol bueno) (Peiretti *et al.* 2013).

Tabla 10. Contenido de macronutrientes en la quinua y en alimentos seleccionados, por cada 100g de peso en seco.

	Quinua ¹	Quinua ²	Maíz ¹	Arroz ¹	Trigo ¹
Energía (Kcal/100g)	399,000	402,482	408,000	372,000	392,000
Proteína (g/100g)	16,500	16,644	10,800	7,600	14,300
Grasa (g/100g)	6,300	8,827	4,700	2,200	2,300
Total carbohidratos	69,000	69,431	81,100	80,400	78,400

Fuente: ¹Koziol (1992) y ²presente investigación.

El contenido de carbohidratos en los granos de quinua y trigo está dentro de los valores establecidos en cereales, es el valor más importante de la composición en cuanto a fuente de energía, la cual se libera en el organismo de forma lenta por su importante cantidad de fibra.

5.3. PRUEBAS AL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO

5.3.1. Prueba de solubilidad

Para determinar el rango de temperatura en el que trabaja la enzima, se realizaron pruebas de solubilidad al hidrolizado enzimático obtenido con la metodología del ítem 4.5, usando las condiciones trabajadas por Liu *et al.* 2013 y Ortega *et al.* 2009. Para el proceso de hidrólisis se calienta el sustrato, proteína aislada de soya a 50°C y 60°C durante 12 y 24 horas con una relación enzima-sustrato del 1%,

observándose que la actividad de la enzima en las dos condiciones genera un hidrolizado con alta solubilidad (Figura 19), a 50°C: $82,816 \pm 0,104$ % en 12 h y $83,432 \pm 0,365$ % en 24h; a 60°C: $80,447 \pm 1,959$ % en 12h y $82,014 \pm 0,165$ % en 24h, mientras que la muestra sin hidrolizar tiene un % solubilidad de $76,145 \pm 0,124$ %, demostrando que la hidrólisis genera una alteración en las propiedades funcionales de las proteínas. Al hacer pruebas de normalidad se observa que no hay diferencia significativa entre las condiciones trabajadas ver Anexo 1 y Anexo 2, los datos son normales con un $p > 0,05$; lo que llevó a elegir como temperatura de trabajo máxima 50 °C y tiempos de reacción menores de 12 horas porque hay una disminución en el gasto energético, además se garantiza la actividad de la enzima evitando ser desnaturizada por altas temperaturas.

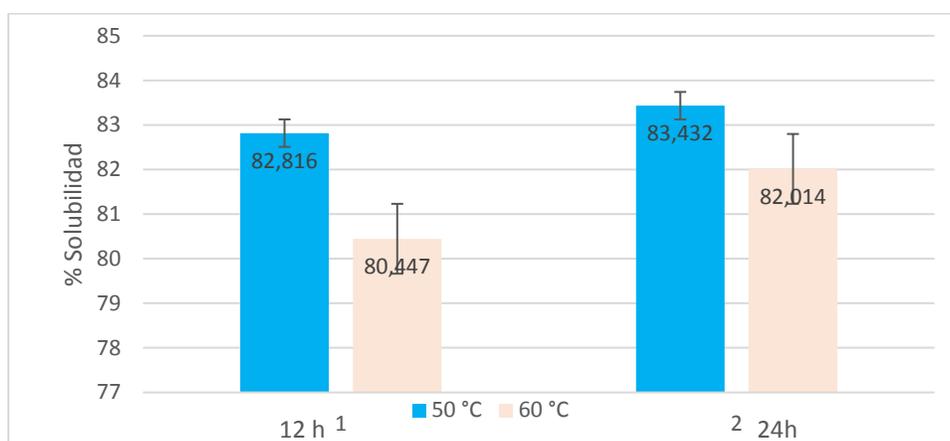


Figura 19. Solubilidad del hidrolizado enzimático a 50°C.y 60°C durante 12 y 24 horas, proteína asilada de soya

Una vez evaluadas las condiciones de reacción sobre proteína de soya, se hidroliza la mezcla trigo/quinua a 50°C y 6h de reacción, tomando una muestra cada 30 min, observándose un aumento del porcentaje de solubilidad hasta los 120 min de reacción como se observa en la Figura 20. Después de los 120 min de reacción se observa una disminución, esto se debe a la generación de enlaces hidrofóbicos que se exponen sobre la superficie de la proteína e impiden que moléculas de agua formen puentes de hidrogeno y se solubilice.

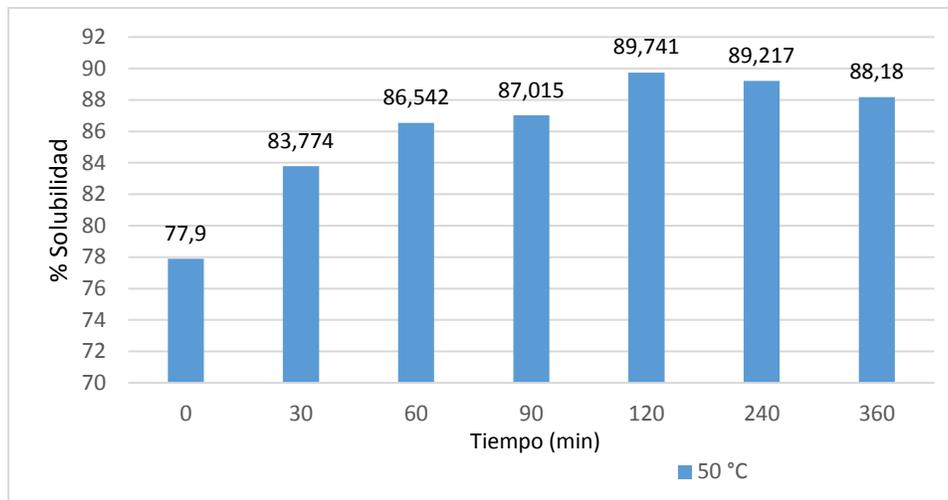


Figura 20. Seguimiento del hidrolizado enzimático de la mezcla trigo/quinua a 50 °C durante 6 horas mediante la solubilidad.

Las proteínas también pueden estar presentando efectos de desnaturalización por una exposición prolongada a esta temperatura, generando un rompimiento de las interacciones débiles desorganizando la estructura de la proteína, de forma que el interior hidrofóbico interactúa con el medio acuoso y se produce la agregación y precipitación de la proteína desnaturalizada y la solubilidad de la proteína desnaturalizada llega a ser menor que la proteína nativa (Mathew *et al.* 2002). La disminución de la solubilidad puede deberse a las reacciones generadas por los productos generados de la hidrólisis, como las de pardeamiento o reacción de Maillard que se da entre el grupo amino de los aminoácidos de las proteínas hidrolizadas y un azúcar reductor (glucosa, maltosa o lactosa) (Sanz *et al.* 2003; De Block *et al.* 2003) presentes en la muestra, sigue la reacción planteada en la Figura 21.

La reacción de Maillard se lleva a cabo en varias etapas, donde el primer paso es la condensación, reacción generada entre un azúcar reductor y un aminoácido primario. La pérdida de agua, produce una imina que es capaz de ciclar, formando una glicosilamina (aldosaminas o cetosaminas, dependiendo del azúcar) (Figura 21, a). El N-glucósido formado se encuentra en equilibrio mediante mutarrotación entre los anómeros a y b (Figura 21, b). Posteriormente se lleva a cabo el reordenamiento de Amadori, donde una glicosilamina (aldosamina) genera una fructosilamina (cetosilamina). La isomerización de las cetosilaminas a aldosaminas es una reacción llamada reordenamiento de Heyns (Figura 21, c). La deshidratación comienza por la enolización en la posición 1-2; luego se forman compuestos dicarbonílicos insaturados que son potentes precursores del pardeamiento y altamente reactivos. Las glicosilaminas pueden degradarse a furfural de forma lenta, por lo que se estima la unión de un azúcar dando dicetoaminas, las cuales son inestables y al romperse por calor generan una monocetoamina y compuestos

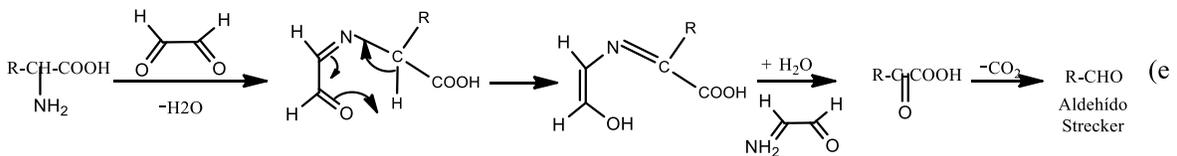
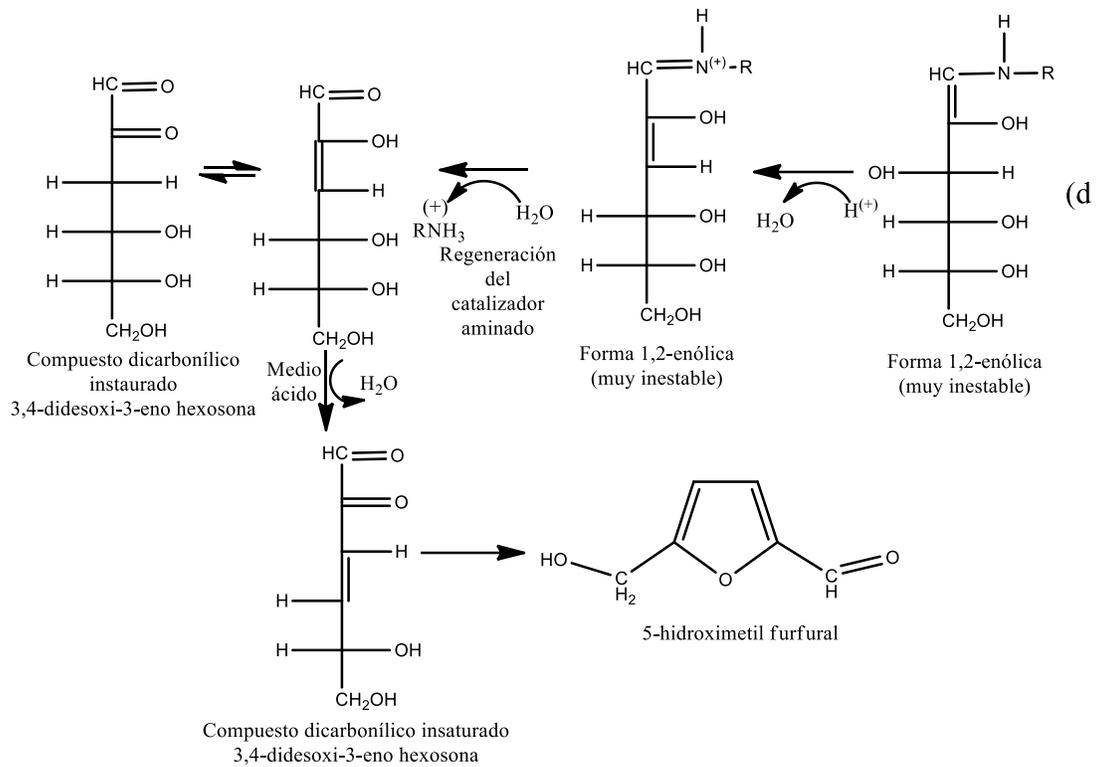


Figura 21. Reacción de Maillard. (UNAD; Usuriaga 2015)

5.3.2. Determinación de la actividad y cinética enzimática

La determinación de la actividad y el seguimiento cinético de la enzima se evalúa mediante tres métodos espectrofotométricos, las pruebas de hidrólisis se realizan de acuerdo a la metodología establecida para materiales secos y las condiciones encontradas en las pruebas de solubilidad, temperatura y tiempo menores de 50 °C y 2 horas.

5.3.2.1. Determinación de la actividad método TCA

La prueba de actividad enzimática mediante el método TCA se realizó haciendo seguimiento por curva de calibración de la cantidad de triptófano generado, para

ello se prepararon patrones de triptófano a diferentes concentraciones y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de $\lambda = 278$ nm, obteniéndose los valores mostrados en la Tabla 10, con desviaciones estándar bajas. Se graficó la concentración de los patrones versus la absorbancia, obteniendo una curva con un coeficiente de regresión de 0,9998, como se muestra en la Figura 22

Tabla 11. Concentración y absorbancia de los patrones de Triptófano (Trp) a 278 nm.

Trp mg / L sln	\bar{X} Abs	σ
0	0	0,000
1	0,037	0,000
5	0,156	0,001
10	0,309	0,004
15	0,456	0,000
20	0,598	0,000

Donde \bar{X} Abs es el promedio de las tres mediciones y σ es la desviación estándar.

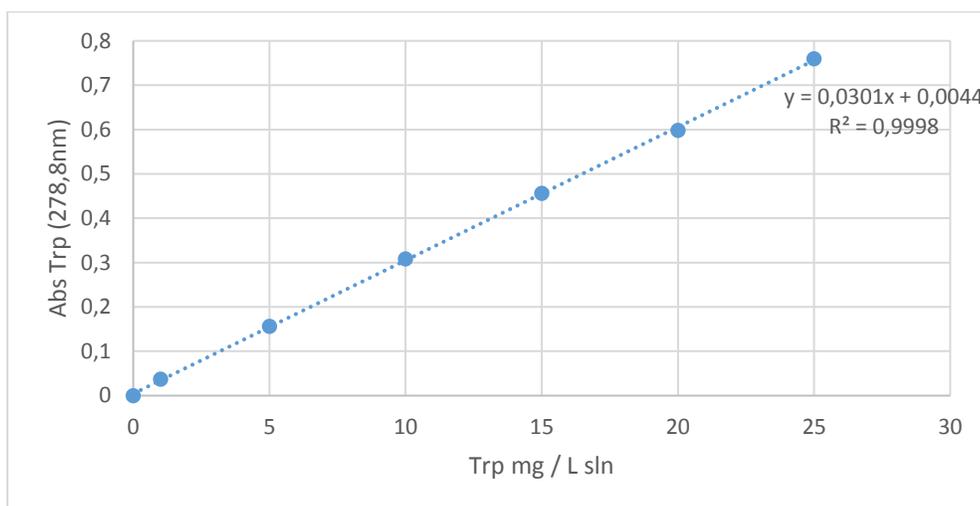


Figura 22. Curva de calibración de Trp para la determinación de actividad enzimática, método TCA.

Para observar el comportamiento de la enzima sobre el sustrato de interés, se realizó un control de hidrólisis enzimática sobre harina de quinua, haciendo seguimiento de la cantidad de triptófano liberado en cada muestra. Para el cálculo se reemplazó la absorbancia de cada muestra en la ecuación de la curva de calibración; se observa el avance graficando la cantidad de triptófano generado a través del tiempo, el seguimiento se realiza durante 2 horas con un muestreo cada 30 min, presentando una curvatura como se observa en la Figura 23.

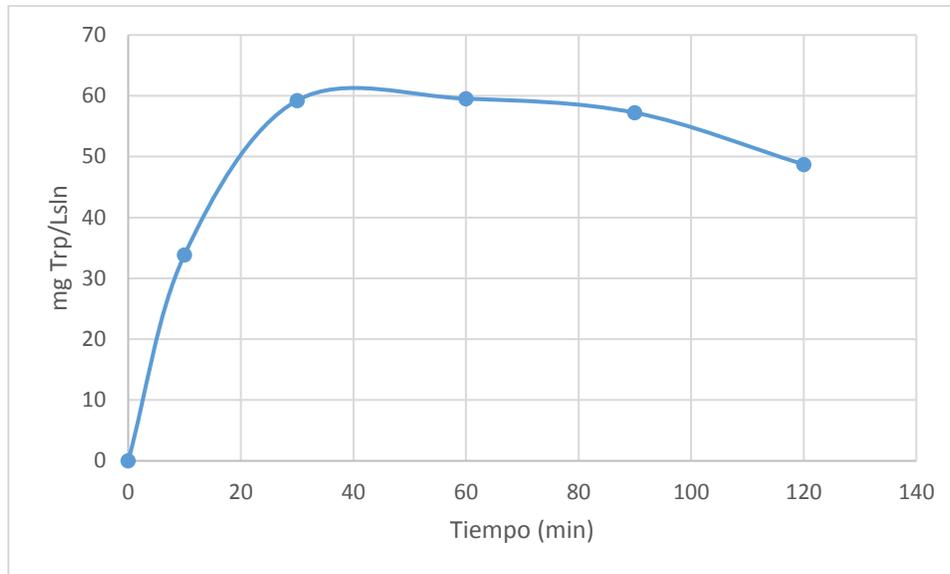


Figura 23. Seguimiento de hidrólisis enzimática mediante liberación de Trp en harina de quinua

Este tipo de curva se conoce como curva de progreso, tiene un comportamiento constante, la transformación del sustrato con respecto al tiempo es lineal al inicio equivalente a la formación de producto a través del tiempo, pero después empieza a disminuir. Inicialmente no hay productos presentes, pero a medida que progresa la reacción, se observa la formación de productos, por ende la concentración de sustrato también disminuye con el tiempo de manera que la actividad es menor porque la enzima está menos saturada de sustrato. La velocidad calculada en la parte lineal de la curva de la Figura 23 es de 0,0027 menor que la concentración de sustrato, indicando que es una reacción de orden cero, en la gráfica se puede observar que hay un progreso en la formación de producto a bajas concentraciones de sustrato, la enzima permanece en un equilibrio constante entre la forma libre E y el complejo enzima-sustrato ES en el lapso de tiempo de 10 a 30 min, donde se da el equilibrio y la etapa que define la velocidad de reacción. Este procedimiento nos ayuda a determinar la actividad de la enzima encontrando que tiene una actividad de 0,98 U/mg sobre harina de quinua. (Mathews *et al.* 2003, Plummer 1980).

5.3.2.2. Determinación de la actividad método Lowry

La determinación de la actividad enzimática por el método de Lowry se realizó evaluando la formación del complejo entre los residuos de albúmina que se generan con el reactivo colorimétrico, este seguimiento se hace mediante una curva de calibración de albúmina, preparada a partir de una solución madre de 200ppm de albúmina, los patrones reaccionan con el reactivo de Lowry y se leen a 660nm en el espectrofotómetro como se muestra en la Tabla 11. Se grafica la concentración de

los patrones versus la absorbancia, obteniendo una curva con un coeficiente de regresión de 0,9977, como se muestra en la Figura 24.

Tabla 12. Concentración y absorbancia de los patrones de albúmina a 660nm

Albúmina mg / L sln	\bar{X} Abs	σ
0	0	0,000
10	0,018	0,050
20	0,040	0,011
40	0,077	0,022
60	0,112	0,053
80	0,153	0,040
100	0,189	0,021
150	0,266	0,091

Donde \bar{X} Abs es el promedio de las tres mediciones y σ es la desviación estándar.

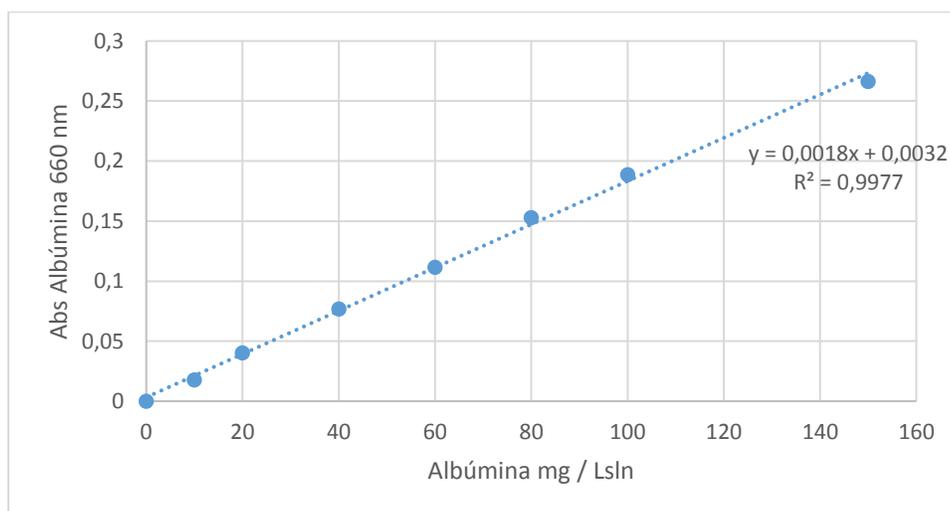


Figura 24. Curva de calibración de albúmina para la determinación de actividad enzimática, método Lowry.

La reacción de hidrólisis se realiza con muestras de harina de quinua, proteína de soya y mezcla de harina trigo-quinua, con el objetivo de evaluar la actividad de la enzima en estos tres tipos de sustratos y ver la reproducibilidad del método, el contenido de albumina en la muestra se calcula con la curva de calibración de la Figura 24. En la Figura 25 se observa que la velocidad de reacción al usar proteína aislada de soya es mayor en comparación con las demás muestras, esto se debe a que la interacción de la enzima con el sustrato es más efectiva, la proteína está libre de interferencias que impiden la interacción con el sustrato, lo que genera un aumento en la actividad enzimática.

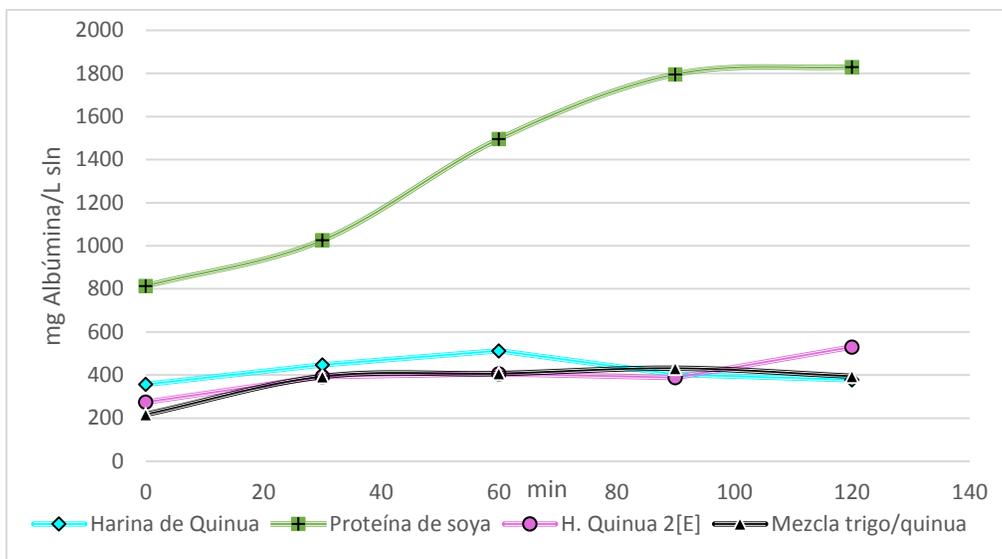


Figura 25. Seguimiento de hidrólisis enzimática en hidrolizados a base proteína de soya, quinua, mezclas de harinas trigo/quinua e hidrólisis con el doble de concentración de la enzima.

El comportamiento de la enzima es similar cuando se usa como sustrato quinua, mezcla trigo-quinua y al duplicar la concentración de enzima, de acuerdo al análisis estadístico, las tres muestras no presentan diferencia significativa en las velocidades de reacción ver Anexo 3 y 4, lo cual da indicio sobre el rango de concentración en el que se puede ejecutar el diseño experimental para la optimización del proceso, las variaciones que se observan se debe a la concentración de aminoácidos presentes en las muestras. Las curvas de seguimiento y el cálculo de la constante de Michaelis-Menten indican que el orden de la reacción es cero, indicando que hay una mayor afinidad por el sustrato. Los resultados arrojados de la evaluación de la actividad de la enzima con el doble de concentración indican que el rendimiento de la reacción es mayor, pero no se diferencian significativamente para aumentar la concentración de la enzima, disminuyendo costos.

5.3.2.3. Determinación actividad enzimática método TNBS

La determinación del comportamiento enzimático a través del tiempo en los hidrolizados proteicos se realiza mediante la reacción del ácido trinitrobenzenosulfónico con los aminoácidos que quedan libres después del fraccionamiento de las proteínas por el proceso de hidrólisis, el seguimiento del proceso se realizó mediante curva de calibración, para ello se prepararon patrones de leucina que es el aminoácido que se encuentra en mayor concentración en las proteínas, este aminoácido reacciona con el TNBS y se lee a 410 nm como se muestra en la Tabla 12. Se grafica la concentración de los patrones versus la

absorbancia, obteniendo una curva con un coeficiente de regresión de 0,9933 como se muestra en la Figura 26.

Tabla 13. Datos curva de calibración de Leucina con TNBS

Leu mg / L sln	\bar{X}	σ
0,6	0,056	0,000
1,2	0,094	0,050
1,8	0,145	0,011
3,0	0,241	0,022
4,2	0,329	0,053
6,0	0,423	0,040

Donde \bar{X} Abs es el promedio de las tres mediciones y σ es la desviación estándar.

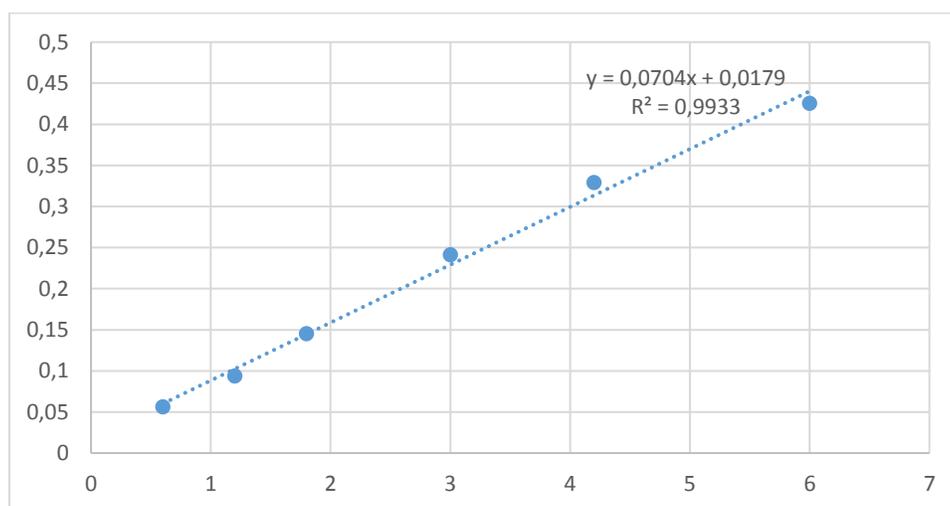


Figura 26. Curva de calibración de Leucina mediante el método TNBS

La actividad de la enzima sobre el sustrato de quinua que se observa en la Figura 27 tiene un comportamiento similar al planteado con las metodologías mencionadas en el ítem 5.3.2.1 y 5.3.2.2, siguiendo un orden cero de reacción, mostrando la máxima actividad enzimática en los primeros 60 min del proceso.

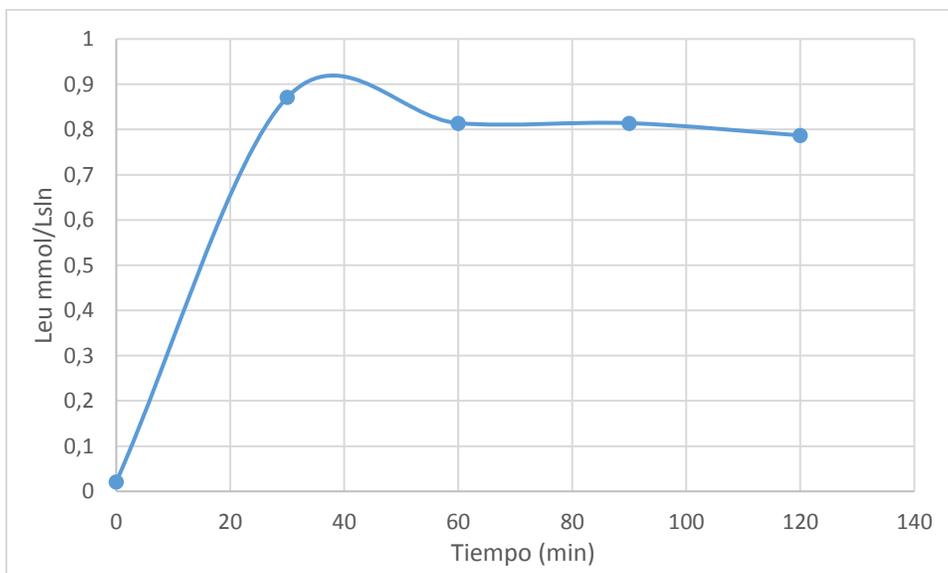


Figura 27. Seguimiento de la actividad enzimática mediante el método TNBS, usando como sustrato quinua.

5.3.2.3.1. Evaluación del proceso de inactivación enzimática por calentamiento.

La evaluación de la actividad de la enzima Neutrasa® se realizó de acuerdo a la metodología del ítem 4.5, usando como sustrato proteína aislada de soya, que tiene un 90% de proteína, se evaluó en el día 0 y en el día 30; las muestras se almacenaron en bolsas herméticas para evitar el ingreso de oxígeno y humedad que favorecen el crecimiento de microorganismos que alteran los resultados. La determinación de la actividad de la enzima se realiza con el fin de corroborar la eficiencia del proceso de inactivación y garantizar que la enzima no sigue reaccionando y generando péptidos de bajo peso molecular que se introducen en los productos en los que se emplean, presentando un sabor amargo que no son aceptables por el consumidor. Según el comportamiento mostrado en la Figura 28, se observa que la actividad de la enzima sobre el sustrato de la reacción a los 30 días es similar a la actividad del día 0, hay un aumento a los 40 min, 50 min y 60 min después de los 30 días de inactivación, sin embargo el análisis estadístico (Anexo 5 y 6) de los dos seguimientos, se observa que no hay diferencia significativa, indicando que el proceso de calentamiento es efectivo para la inactivación por desnaturalización de la enzima, demostrando que la metodología detiene la reacción. Una vez evaluado el comportamiento de la enzima en los diferentes sustratos se plantea un posible mecanismo de reacción.

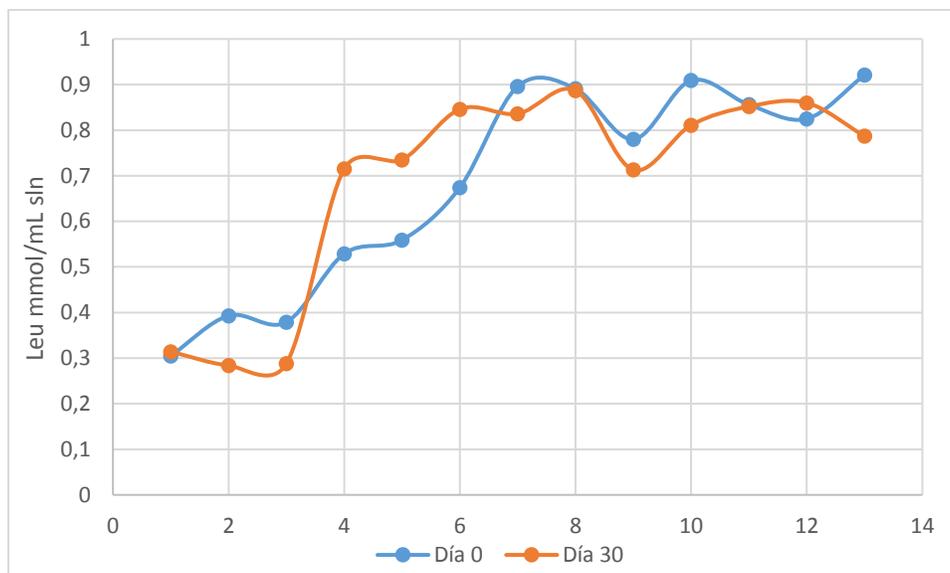


Figura 28. Comparación actividad enzimática en el tiempo

5.3.2.4. Planteamiento del mecanismo de acción catalítico de una metaloproteasa (Neutrasa®).

Las metaloproteasas son hidrolasas (Tabla 4). Este grupo de enzimas permite romper moléculas de alto peso molecular, un ejemplo de ello es el ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico mediante una molécula de agua. Las metaloproteasas tienen en su centro activo un catión metálico divalente, este ion está enlazado a cuatro aminoácidos ligandos, generalmente son histidina, glutamina, ácido aspártico o lisina. La Neutrasa® tiene en su centro activo un átomo de zinc, este forma un complejo de coordinación con tres aminoácidos ligandos proporcionados por la proteína (His, His y Asp) (Figura 29, paso 1); posteriormente se da la formación de un enlace de coordinación entre el átomo de oxígeno del carbonilo del enlace peptídico y el oxígeno de la molécula de agua (Figura 29, paso 2), la enzima Neutrasa® tiene afinidad por enlaces peptídicos formados por aminoácidos como lisina, fenilalanina y valina. El zinc (II) tiene como funciones polarizar el grupo carbonilo del sustrato y facilitar la desprotonación del agua como nucleófilo, el enlace de coordinación entre el átomo de zinc y el oxígeno carbonílico genera una polarización del enlace y estabilización de la carga negativa generada sobre el oxígeno en el estado de transición (Figura 29, paso 3); la estabilización de estas cargas, da lugar a una disminución en la energía de activación y como consecuencia a un aumento en la velocidad de reacción, favoreciendo así la reactividad de los compuestos. Por otra parte, las moléculas de agua coordinadas con metales se ionizan a un pK_a de 7, generando iones hidroxilo altamente reactivos (Figura 29, paso 3), este hidroxilo activado es el que realiza el ataque nucleofílico

sobre el carbono y genera la hidrólisis de la proteína (Figura 29, paso 4) (Kontogiorgis *et al.* 2005; Juers *et al.* 2005; Mathews *et al.*, 2002)

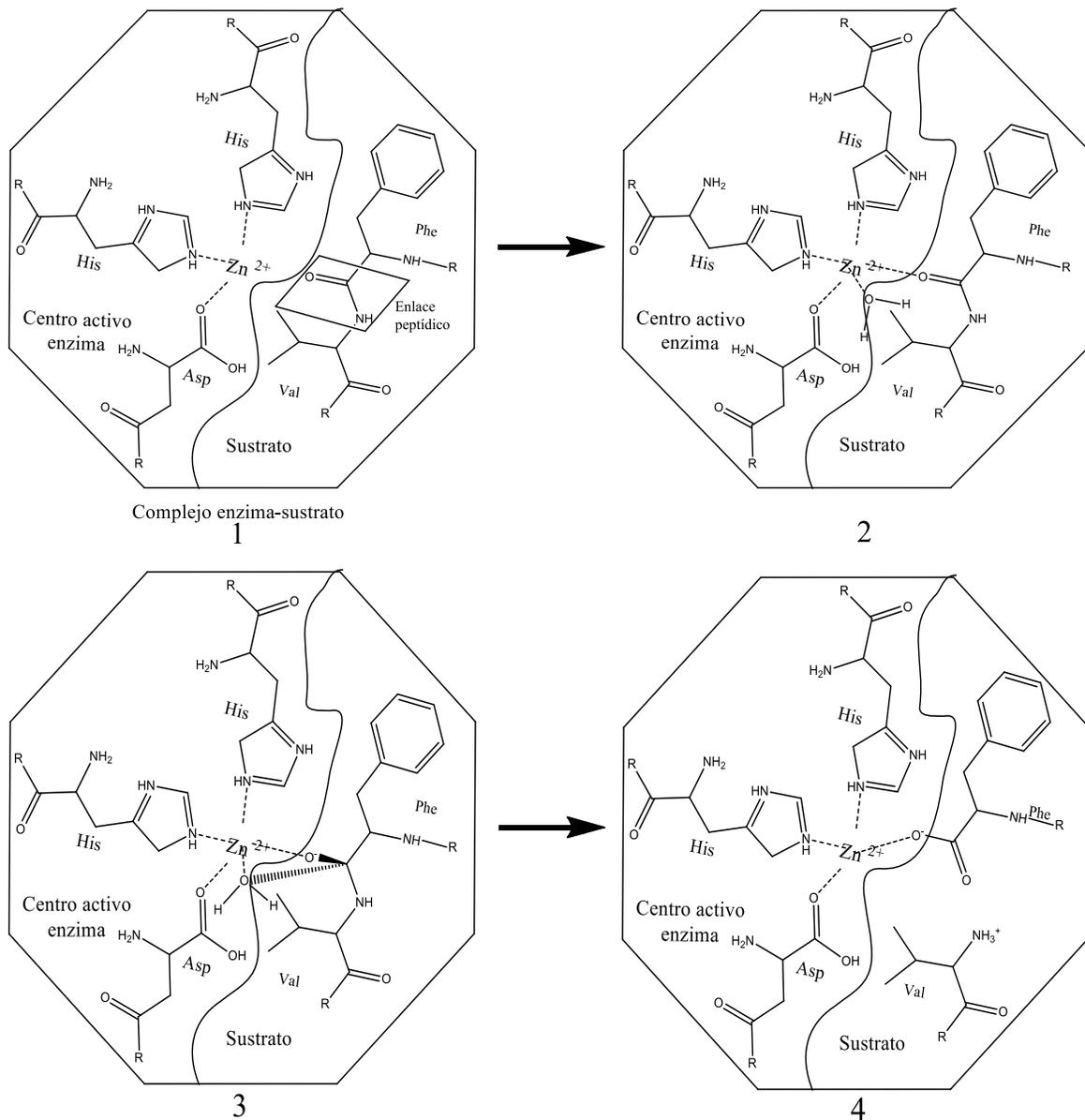


Figura 29. Posible mecanismo de reacción de una enzima metaloproteasa (Neutrasa®). Paso 1. Centro activo de la enzima y el sustrato. Paso 2. Formación del complejo. Paso 3. Estado estacionario de la reacción. Paso 4. Formación de productos.

5.4. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

El avance del proceso de hidrólisis se determinó mediante el grado de hidrólisis, calculado mediante la ecuación 1, donde h es el número de enlaces peptídicos hidrolizados y h_{tot} el número de enlaces peptídicos presentes en la proteína nativa

De acuerdo a las condiciones encontradas, se determinó el grado de hidrólisis de la mezcla de harinas trigo/quinua en diferentes tiempos de reacción, encontrando que la enzima tiene una actividad constante después de los 60 min de reacción como se observa en la Figura 30, este comportamiento se debe a que el calentamiento prolongado ayuda a que los productos formados generen reacciones secundarias como las de pardeamiento que ayudan en la inhibición de la enzima.

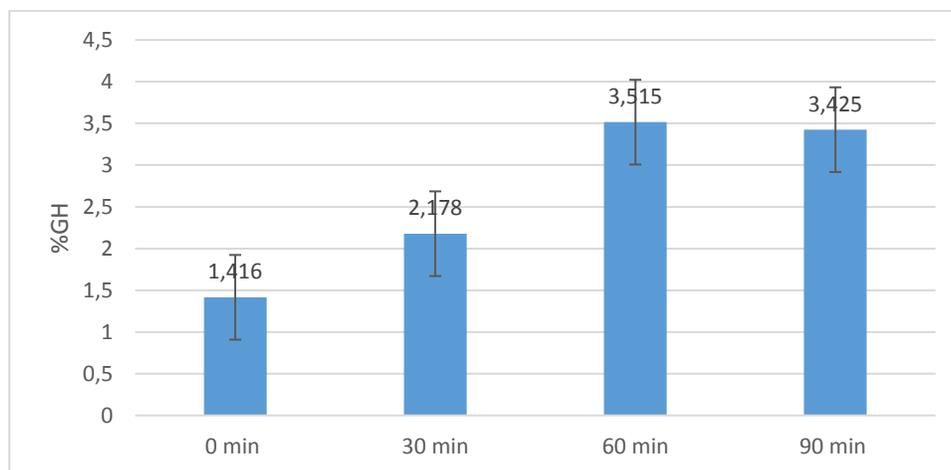


Figura 30. Determinación del grado de hidrólisis en la mezcla de harina trigo/quinua.

5.5. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR LA METODOLOGÍA SUPERFICIE DE RESPUESTA

La optimización de los factores, temperatura, tiempo y relación enzima sustrato se realizó mediante la ejecución del diseño experimental planteado en la Tabla 7, la variable de respuesta principal fue digestibilidad de proteínas, esta valoración se hizo mediante la metodología planteada en el ítem 4.9.3 y el grado de hidrólisis mediante la metodología planteada en el ítem 4.7. La hidrólisis se hizo de acuerdo a lo planteado en el ítem 4.5. El % de digestibilidad se calculó hallando la diferencia entre la proteína inicial y proteína que no ha sido digerida; este porcentaje proteico se determinó por el método Kjeldahl. De acuerdo a esto se obtienen los resultados mostrados en la Tabla 13.

Tabla 14. Digestibilidad y Grado de Hidrólisis para los 17 experimentos de optimización

Experimento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	E/S (w/w)	Digestibilidad (%)	GH (%)
1	50	60	1,500	79,712	1,1301
2	50	9,6	1,500	85,199	0,8224
3	50	60	1,500	83,730	1,2112
4	50	60	1,500	89,241	0,8970
5	65	90	2,250	65,898	2,7045
6	50	60	2,761	74,192	2,3040
7	65	30	2,250	65,653	2,4052
8	35	30	2,250	86,053	0,4928
9	25	60	1,500	66,347	0,4404
10	35	90	0,750	63,185	0,5810
11	75	60	1,500	78,621	1,4356
12	50	60	0,239	70,205	1,1305
13	35	30	0,750	91,001	0,3696
14	35	90	2,250	73,421	1,3329
15	65	90	0,750	78,821	1,6843
16	65	30	0,750	80,578	1,7504
17	50	110	1,500	78,712	1,6379

Los resultados obtenidos en la Tabla 13, muestran porcentajes de digestibilidad altos que van desde 63,185 a 91,001, se generan porcentajes de digestibilidad altos cuando se trabaja con valores medios de las condiciones de reacción, resultados que están relacionados con los obtenidos en las pruebas de hidrólisis y solubilidad. El grado de hidrólisis influye significativamente en la digestibilidad de las proteínas debido a que el rompimiento de la proteína en dos partes aumenta la digestibilidad por la facilidad de absorción (Herrera *et al.* 2006; Wang *et al.* 2008) evidenciándose en los resultados de la Tabla 13 y lo mostrado por el análisis estadístico del Anexo 7. Al comparar estos valores de digestibilidad con los obtenidos en la Tabla 15 de muestras que no han sufrido ningún proceso, se observa un incremento de la digestibilidad del 20 % en comparación con las muestras de la harina de quinua, trigo y la mezcla trigo-quinua, esto da un valor agregado a este tipo de productos, destacando que la hidrólisis de proteínas mejora sus propiedades funcionales; de igual forma se observa que el porcentaje de digestibilidad del producto comercial de cereales consumido por infantes (Nestum) presenta un porcentaje de digestibilidad del 73,298 % menor que el encontrado en el hidrolizado del punto óptimo, tema que se trata en los siguientes ítems. La estandarización de la metodología de digestibilidad *in vitro* se realiza con un patrón de caseína.

Tabla 15. *Digestibilidad in vitro de proteínas de muestras sin hidrolizar.*

Muestra	Digestibilidad (%)
Quinua	59,843
Trigo	60,387
Mezcla Trigo-Quinua (77/23)	58,709
Nestum	73,298
Caseína Patrón.	93,322

5.5.1. Valores óptimos para el proceso de hidrólisis

Los resultados encontrados en la Tabla 13 fueron analizados por medio del programa Stargraphics XV, con un intervalo de confianza del 95,0%, y un error máximo permisible del 5%, indicando que el valor óptimo está dentro de los parámetros estipulados del diseño, el objetivo es maximizar la digestibilidad y encontrar los valores óptimos de reacción para que el proceso sea eficiente, encontrándose una temperatura óptima de trabajo de 42,447 °C, un tiempo de reacción 32,800 min y una relación enzima-sustrato de 1,638% (Tabla 16), con un porcentaje de digestibilidad de 87,911%.

Tabla 16. *Valores óptimos de hidrólisis enzimática*

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura	24,773	75,227	42,447
Tiempo	9,546	110,45	32,800
E/S	0,239	2,761	1,638
% Digestibilidad			87,911

5.5.2. Evaluación del valor óptimo de hidrólisis

Para determinar el ajuste de las condiciones arrojadas por el diseño en la reacción de hidrólisis enzimática, se realizó un experimento por triplicado del valor óptimo, encontrándose un porcentaje de digestibilidad del 79,864% (Tabla 16) cercano al valor estimado por el modelo matemático de la ecuación del polinomio de segundo orden de la superficie de respuesta, con una diferencia de 8,047%.

Tabla 17. *Evaluación experimental de las condiciones óptimas de hidrólisis. Con un (n=3) y una desviación estándar de 0,0877.*

Tiempo (min)	Temperatura (°C)	E/S (%)	Digestibilidad (%)
32,800	42,447	1,638	79,864

No se obtiene exactamente el porcentaje estimado de 87,911% debido a que son sistemas biológicos y estos no siguen un comportamiento lineal como se observa en el ítem 5.3.2. De acuerdo a los resultados obtenidos se evidencia que el porcentaje de digestibilidad del punto óptimo es mayor que el porcentaje de las muestras sin hidrolizar y del producto comercial de cereales destinado a infantes.

5.5.3. Diagrama de Pareto

El diagrama de Pareto es un indicativo de la influencia que tienen los factores sobre la variable de respuesta en un orden descendiente como se observa en la Figura 31. Las barras en color azul con un signo negativo son indicativos de cómo afectan inversamente estos factores la digestibilidad, mientras que las barras grises con un signo positivo son indicativos de cómo aumenta el % digestibilidad. La línea azul que cruza la gráfica de forma vertical nos indica que todo efecto que sobrepase esta línea afectará de forma considerable la digestibilidad; la ubicación de esta depende del intervalo de confianza del diseño, en este caso el diseño tiene un intervalo de confianza del 95%, en el eje horizontal se observa la relación de los factores que afectan la digestibilidad, descritos como: AC es la relación entre temperatura y la concentración enzima-sustrato, T es el tiempo de reacción, CC es el efecto de la concentración enzima-sustrato, AA es la relación de la temperatura, BB es el efecto del tiempo, BC es el efecto del tiempo y la concentración enzima-sustrato. La interacción tiempo presentada en color azul y acompañado de un signo negativo demuestra que cualquier cambio en el tiempo va a incidir de forma inversa en la digestibilidad, y esto se ve reflejado en las propiedades funcionales del mismo hidrolizado, después de un tiempo de reacción de 2 horas hay un descenso en la solubilidad debido a que la enzima se inactiva por la posible formación de compuestos de pardeamiento que inhiben la enzima; de la misma forma la relación entre temperatura y concentración enzima sustrato.

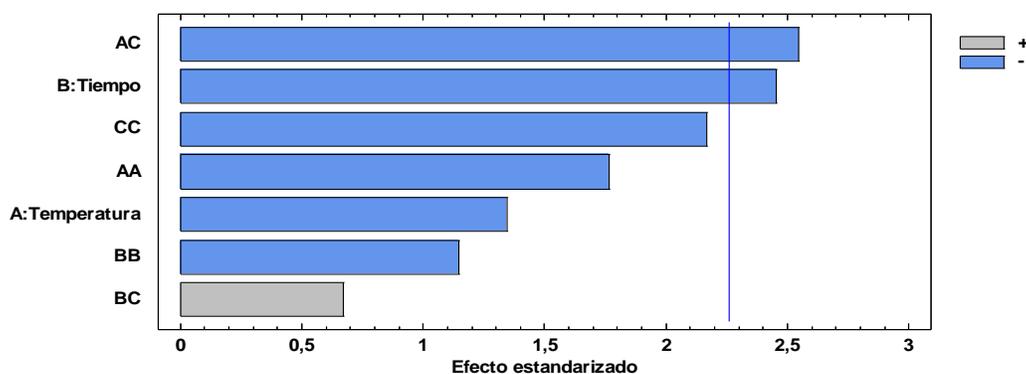


Figura 31. Diagrama de Pareto del diseño experimental

Las reacciones biológicas dependen de los diferentes factores que están en el medio de reacción, la velocidad puede verse afectada por cambios en el pH, temperatura, tiempo y la concentración enzima/sustrato, como se observa en el gráfico cualquier variable puede afectar la hidrólisis y por ende la digestibilidad

5.5.4. Efectos principales para la digestibilidad

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Figura 33 se observa que un aumento en la temperatura, la digestibilidad aumenta hasta un punto máximo donde se encuentra el mayor porcentaje de digestibilidad o punto óptimo, después hay un descenso, esto se debe a que la enzima sufre una desnaturalización, disminuyendo la actividad enzimática y por ende la digestibilidad, generando una agregación de proteínas debido a que se pierde su conformación tridimensional por el rompimiento de los enlaces débiles. Otro de los factores que afectan la digestibilidad es el tiempo de reacción, si el tiempo de reacción se prolonga, la enzima puede sufrir un proceso de desnaturalización, saturación e inhibición por la formación de productos de la reacción de Maillard.

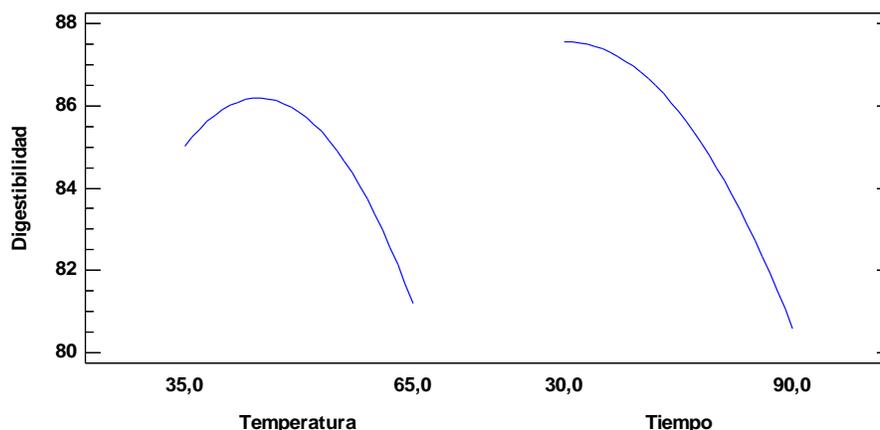


Figura 32. Gráfica de efectos principales sobre digestibilidad

5.5.5. Ecuación del modelo ajustado

El método de optimización por superficie de respuesta sigue un modelo matemático de segundo orden descrito en la Ecuación 8, este busca maximizar la variable de respuesta mediante la interacción de todos los factores y los valores estimados de la Tabla 18, maximizando el valor óptimo de digestibilidad a 87,911 %

Tabla 18. Coeficiente de regresión para digestibilidad

Coefficiente	Estimado
Constante	21,499
A:Temperatura	1,723
B:Tiempo	0,039
C:E/S	35,645
AA	-0,012
AC	-0,419
BB	-0,002
BC	0,055
CC	-6,008

$$\% \text{ Digestibilidad} = 21,499 + 1,723 \times \text{Temperatura} + 0,039 \times \text{Tiempo} + 35,645 \times \text{E/S} - 0,012 \times \text{Temperatura}^2 - 0,419 \times \text{Temperatura} \times \text{E/S} - 0,002 \times \text{Tiempo}^2 + 0,055 \times \text{Tiempo} \times \text{E/S} - 6,008 \times \text{E/S}^2$$

Ecuación 8. Ecuación del Modelo matemático que describe la superficie de respuesta

5.5.6. Superficie de respuesta y diagrama de contorno

La superficie de respuesta y el diagrama de contorno que se observan en las Figuras 34 y 35, los factores influyen en la variable de respuesta y sobre que rangos se encuentran los valores óptimos de digestibilidad. La muestra tiene una digestibilidad máxima en los rangos estipulados entre 40°C y un tiempo de reacción de 32 minutos, estos factores aparecen en la gráfica porque son los que más influyen en el proceso.

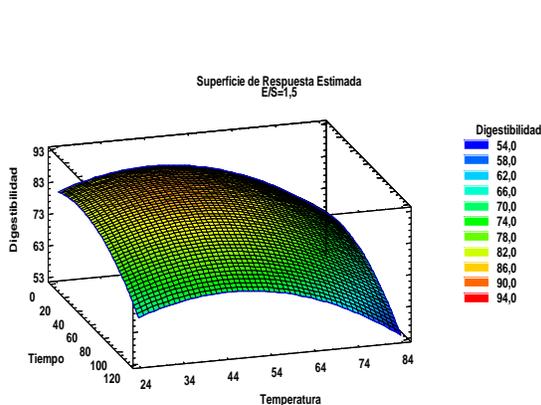


Figura 33. Superficie de respuesta para digestibilidad.

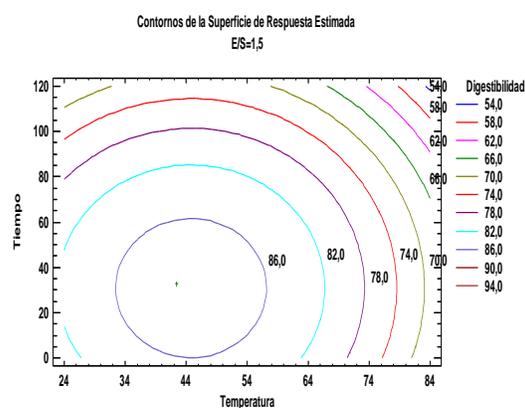


Figura 344. Diagrama de contorno para digestibilidad.

5.6. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO NUTRICIONAL

La evaluación del efecto de hidrólisis sobre las propiedades funcionales y nutricionales, se realiza mediante cuantificación de aminoácidos, digestibilidad proteica y composición proximal, por las metodologías descritas en los ítems 4.3, 4.9.1 y 4.9.2 obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 19.

5.6.1. Análisis composicional del punto óptimo de hidrólisis

La determinación de la composición del hidrolizado enzimático del punto óptimo de hidrólisis y la mezcla trigo-quinua que no ha sufrido ningún tratamiento se realiza siguiendo la metodología establecida en el ítem 4.3

Tabla 19. Análisis proximal del hidrolizado enzimático del punto óptimo.

Cereal	Hidrolizado enzimático	Mezcla sin hidrolizar	Método
% Humedad	9,416 ± 0,245	11,734 ± 0,343	AOAC 950.43
% Ceniza	1,020 ± 0,053	1,058 ± 0,432	AOAC 920.153
% Grasa	5,758 ± 0,105	5,585 ± 0,056	AOAC 991.36
% Proteína bruta	11,756 ± 0,012	11,141 ± 0,008	AOAC 968.06
% Fibra bruta	6,223 ± 0,725	6,821 ± 0,832	AOAC 962.09
% Carbohidratos*	75,243 ± 0,285	75,395 ± 0,332	

* *Calculo por diferencia.*

El análisis proximal de la mezcla sin hidrolizar en comparación con el hidrolizado enzimático es similar porque tienen la misma composición, se diferencian en el contenido de agua debido a que el hidrolizado ha sufrido una deshidratación por el calentamiento constante que requiere el proceso. El contenido proteico en el hidrolizado es más alto debido al porcentaje de proteína aportado por la enzima de hidrólisis.

5.6.2. Contenido de aminoácidos

Para una adecuada formulación del componente proteico (aminoácidos) en dietas destinadas a seres humanos, es necesario conocer la calidad nutricional de las fuentes de proteína. Con este propósito, es necesario estimar la disponibilidad de los aminoácidos de dichas fuentes de proteína y valorar su digestibilidad (Hodgkinson, 2006). Para ello se debe tener conocimiento del contenido de aminoácidos presentes en las muestras. Se inicia realizando un análisis composicional de aminoácidos presentes en la materia prima, encontrándose lo mostrado en la Tabla 20.

Tabla 20. Composición de aminoácidos en la materia prima trigo-quinua comparada con otros cereales (g AA/ 100 g muestra)

Aminoácido	Quinoa¹	Trigo¹	Maíz²	Avena²
Aspártico	0,640	0,700	0,410	0,650
Glicina	0,390	0,380	0,250	0,310
Histidina	2,180	5,070	1,380	2,930
Arginina	0,540	0,190	0,300	0,380
Treonina	0,860	0,650	0,440	0,640
Alanina	0,620	0,470	0,600	0,580
Prolina	0,710	1,990	0,810	0,810
Tirosina	0,470	0,390	0,270	0,460
Valina	1,050	0,690	0,450	0,780
Metionina	0,130	0,080	0,620	0,120
Lisina	1,550	0,560	0,280	0,890
Isoleucina	0,700	0,520	0,270	0,560
Leucina	1,330	1,230	1,360	1,320
Fenilalanina	0,980	1,130	0,610	1,110
Triptófano	0,140	0,160	0,200	0,130

¹Presente investigación; ²Mota *et al.* 2016; Song *et al.* 2008.

La formulación de alimentos a base de cereales son suplementos alimenticios con un alto valor nutricional, la deficiencia de aminoácidos en cada uno de ellos es suplementado por otro cereal, como se observa en la Tabla 20 hay cereales que tienen un mayor porcentaje de ciertos aminoácidos con respecto a los demás. Las proteínas de quinua son ricas en aminoácidos como lisina con un valor de 1,550% en comparación con otros cereales como el maíz con 0,280%, 0,890% avena y 0,560% en el trigo ver Tabla 19 según lo reportado por Mota *et al.* 2016, Song *et al.* 2008 y los resultados encontrados. La concentración de aminoácidos como glicina, arginina, treonina, alanina, tirosina, valina e isoleucina están en mayor concentración en quinua que en los otros cereales. El contenido de histidina y prolina es mayor en trigo que en quinua, maíz y avena. Una formulación de la mezcla trigo quinua suplementa la deficiencia de histidina, prolina, lisina y leucina, aminoácidos importantes para la absorción de calcio, construcción de proteínas musculares, crecimiento y desarrollo en los niños (Brown *et al.* 2014). En las Figuras 35 y 36 se observa el perfil cromatográfico de los aminoácidos presentes en la mezcla de trigo y quinua que no recibió ningún tratamiento y el hidrolizado enzimático del punto óptimo del diseño experimental, en el cual se observa picos de absorción (con tiempos de retención que se observan en el Anexo 9 que han sido estimados con los patrones de cada aminoácido como se observa en el Anexo 8).

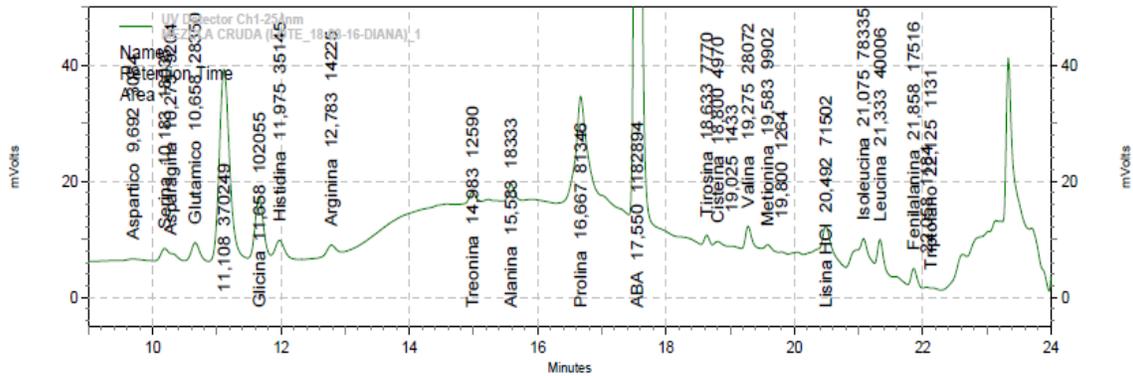


Figura 35 . Cromatograma del contenido de aminoácidos en la mezcla sin hidrolizar

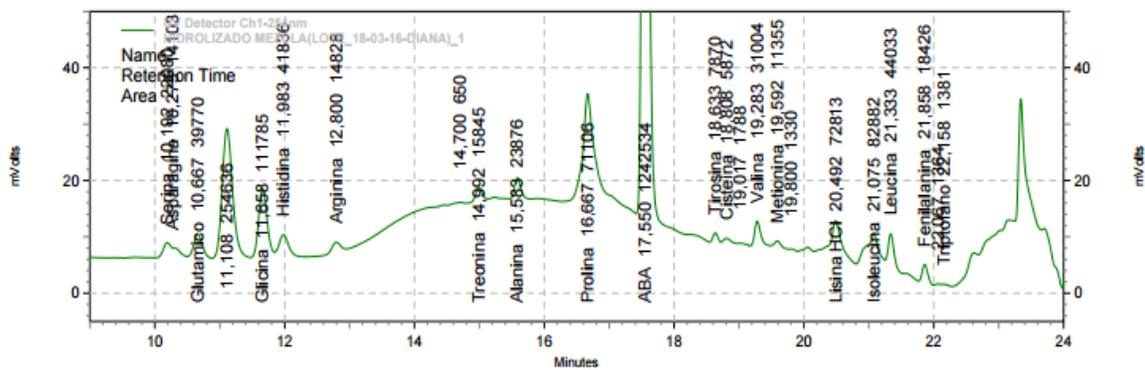


Figura 36. Cromatograma del contenido de aminoácidos en el hidrolizado enzimático del punto óptimo

Debido a que los aminoácidos tienen una amplia gama de polaridades, para hacer la separación en un solo cromatograma, se va variando la composición de la fase móvil a lo largo de la separación, aumentando el poder de elución mediante el empleo de un gradiente de polaridad. Encontrando que el proceso genera un aumento del contenido de aminoácidos libres como se observa en la Tabla 21.

Tabla 21. Composición de aminoácidos presentes en la muestra hidrolizada a las condiciones óptimas y la mezcla sin tratamiento (g AA/100 g muestra)

Aminoácido	(% p/p) Hidrolizado enzimático	(% p/p) Mezcla sin hidrolizar
Aspártico	ND	1,364
Serina	0,892	0,783
Asparagina	1,189	0,835
Glutámico	1,178	0,903
Glicina	5,563	5,460
Histidina	0,839	0,757

Arginina	0,250	0,257
Treonina	1,470	1,256
Alanina	0,607	0,501
Prolina	1,290	1,587
Cisteina	0,252	0,229
Tirosina	0,884	0,939
Valina	0,870	0,847
Metionina	0,390	0,366
Lisina	1,957	2,067
Isoleucina	2,028	2,061
Leucina	1,356	1,325
Fenilalanina	0,657	0,672
Triptófano	0,066	0,058

Continuación de la Tabla 21

El contenido de aminoácidos presentes en el hidrolizado enzimático está en mayor porcentaje que en la harina sin hidrolizar, a excepción de Arginina que está en 0,250 %, Prolina con 1,290 %, Tirosina 0,884 %, Lisina 1,957 %, Isoleucina 2,028 % y Triptófano 0,066 %, esta disminución puede deberse a que se están generando reacciones de pardeamiento formando enlaces entre el grupo amino de los aminoácidos libres y un azúcar reductor presente en la muestra, generando una disminución. El contenido de ácido aspártico en el hidrolizado no es detectado debido a que el complejo enzimático fracciona por este aminoácido liberando una gran cantidad del mismo, el cual reacciona con los azúcares reductores presentes en la muestra, limitando su detección. El aumento en el porcentaje de aminoácidos en el hidrolizado se debe a que el fraccionamiento de la proteína por la enzima, libera un mayor número de aminoácidos (Liu *et al.* 2010). En general, el contenido de aminoácidos esenciales es un buen indicador de la calidad de una proteína, por lo tanto, si se conoce el contenido de aminoácidos esenciales de un alimento, tales como metionina, cisteína, lisina, treonina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina y triptófano, y se comparan con lo reportado por la FAO, se puede calcular su calidad respecto a cada aminoácido, conociendo la digestibilidad proteica (ver Tabla 22).

Tabla 22. Comparativo de los aminoácidos del hidrolizado enzimático con las necesidades de los mismos para diferentes grupos de edad (mg AA/g proteína)

AA esenciales	Preescolares (2 a 5 años)¹	Escolares (10 a 12 años)¹	Adultos¹	Hidrolizado Enzimático²	Mezcla sin hidrolizar²
Isoleucina	28	28	13	172,508	175,315
Leucina	66	44	19	115,345	112,708
Lisina	58	44	16	166,468	175,825

Metionina + Cisteína	25	22	17	54,611	50,611
Fenilalanina + Tirosina	63	22	19	131,082	137,036
Treonina	34	28	9	125,043	106,839
Triptófano	11	9	5	5,614	4,934
Valina	35	25	13	74,005	72,048
Histidina	19	19	16	71,386	64,393
Total	339	241	127	916,062	899,709

¹ (FAO/WHO Food standards, 2009) y ² Presente investigación

Los aminoácidos esenciales presentes en las muestras están en mayor concentración que el balance estimado por la FAO para los diferentes grupos de edad, cumpliendo con el valor estimado para formulación de alimentos destinados al consumo de infantes. El contenido de triptófano cumple con las necesidades requeridas para adultos, pero no alcanza a cumplir con los valores estimados para los grupos de edad de infantes. Una vez conocida la composición de aminoácidos es necesario evaluar la calidad de la proteína; en la actualidad el método sugerido para evaluar la calidad proteica es la calificación del cómputo químico o score de aminoácidos corregido por digestibilidad proteica (protein digestibility corrected amino acid score) o PDCAAS. En la determinación del cómputo de aminoácidos de la mayoría de los alimentos y de las dietas se recomienda emplear los valores de referencia de los aminoácidos lisina, triptófano, treonina, metionina y cisteína, porque estos son los aminoácidos indispensables, que con mayor frecuencia se hallan limitados en los alimentos comunes (FAO 2009). Así, el cómputo químico de la proteína contenida en el hidrolizado enzimático, se basa en la comparación del contenido de aminoácidos en el hidrolizado con el de una proteína denominada patrón, en este caso la proteína de huevo, que presenta una eficiencia de retención de nitrógeno de 100%. El cómputo químico se calcula usando la siguiente ecuación:

$$\text{Computo Químico} = \frac{\text{mg AA en hidrolizado enzimático}}{\text{mg AA en el huevo}} \times 100$$

Ecuación 9. *Calculo del score químico de una proteína*

Tabla 23. *Resultados cómputo químico del hidrolizado enzimático en relación a la proteína del huevo (mg AA/ g proteína)*

AA esenciales	Huevo¹	Hidrolizado Enzimático²	Computo Químico (%)²
Isoleucina	59,340	172,508	290,711
Leucina	91,570	115,345	125,964
Lisina	66,860	166,468	248,980

Metionina + Cisteína	58,680	54,611	93,066
Fenilalanina + Tirosina	101,570	131,082	129,056
Treonina	47,770	125,043	261,761
Triptófano	15,290	5,614	36,717
Valina	73,310	74,005	100,948
Histidina	28,100	71,386	254,043

¹FAO/WHO Food standards, 2009; ²Presente investigación

De acuerdo a los cálculos se observa en la Tabla 23 que el contenido de aminoácidos presentes en el hidrolizado enzimático en comparación con el patrón están por encima del valor estipulado para cada aminoácido; indicando que el contenido nutricional presente en el hidrolizado enzimático es de alta calidad y puede ser consumido por infantes, aportando al valor nutricional y ayudando a mitigar el problema de desnutrición que afecta a la población mundial. De acuerdo a los reportes dados por Wilmot *et al.* 2001, el aminoácido limitante en el contenido nutricional de los alimentos es el triptófano, aminoácido que se encuentra en menor concentración en el hidrolizado, pero que está dentro de los valores estimados para este aminoácido en el huevo. Además se puede potencializar su contenido, con un proceso tecnológico, como la extrusión, donde las condiciones del proceso generan un cambio en las proteínas y por ende un aumento en la disponibilidad de aminoácidos (Mota *et al.* 2016). El cómputo químico de una proteína no tiene en cuenta factores como la digestibilidad de esta, o el hecho de que algunos aminoácidos pueden estar en formas químicas no utilizables, sin embargo, es un parámetro fácilmente medible y sus resultados pueden ser comparables.

5.6.3. Digestibilidad *in vitro* de proteínas

La digestibilidad *in vitro* de una proteína es una estimación de la digestibilidad real de los alimentos, ya que no hay interferencia por la presencia de aminoácidos de origen endógeno en la digestión, como ocurre cuando se utilizan métodos *in vivo*. Los reportes dados por Wilmot *et al.* 2001 muestran que los valores de digestibilidad *in vitro* e *in vivo* están significativamente correlacionados. En la Tabla 24 se registra los porcentajes de digestibilidad de las muestras analizadas y de un patrón de caseína para estandarizar el método. Se observa que la digestibilidad en el hidrolizado es mayor en comparación con la mezcla cruda, trigo y quinua, también tiene una digestibilidad alta en comparación con el producto comercial Nestum, indicando que el proceso de hidrólisis genera un cambio en las proteínas presentes en la mezcla, mostrando que se puede utilizar como un alimento destinado al consumo humano. Sin embargo se deben seguir evaluando condiciones que puedan aumentar el porcentaje de digestibilidad y la disponibilidad de aminoácidos esenciales.

Tabla 24. *Digestibilidad in vitro de la proteína en el hidrolizado enzimático y otras muestras.*

Muestra	% Digestibilidad proteína
Hidrolizado enzimático	79,864
Mezcla sin hidrolizar	58,709
Quinua	59,843
Trigo	60,387
Nestum	73,298
Caseína Patrón	93,322

El uso de aminoácidos en el organismo obtenidos de los alimentos, se calcula haciendo la corrección del puntaje de acuerdo a la digestibilidad proteica (PDCAAS). El valor del puntaje corregido por digestibilidad se obtiene al comparar el perfil de aminoácidos esenciales de la proteína, con los requerimientos de aminoácidos esenciales establecidos por la FAO/OMS, para edades fluctuantes entre 2-5 años (La selección de este patrón de requerimientos para hacer la corrección se justifica por presentar las mayores exigencias, con excepción de menores de dos años), seleccionando la relación de aminoácidos más baja y multiplicando por la digestibilidad de la proteína (Velásquez 2006) .

$$PDCAAS = \text{Computo químico (Score)} \times \% \text{ digestibilidad}$$

Ecuación 10. *Digestibilidad verdadera de una proteína*

El puntaje químico de aminoácido corregido por digestibilidad da como resultado la digestibilidad proteica que se presenta a continuación.

Tabla 25. *Puntaje químico de aminoácidos corregido por digestibilidad (PDCAAS)*

Muestra	% Digestibilidad verdadera
Hidrolizado enzimático	74,326
Mezcla sin hidrolizar	68,882

Los resultados muestran que el hidrolizado enzimático tiene una alta digestibilidad en comparación con la mezcla cruda, lo cual indica que el hidrolizado no solo es una buena fuente de aminoácidos sino que son altamente asimilables, resultado que nos lleva a deducir que esta mezcla se puede usar como alimento de consumo humano, mejorando las propiedades mediante procesos tecnológicos para alimentos, como el proceso de extrusión.

CONCLUSIONES

Se obtuvo un hidrolizado con alta calidad proteica mediante un proceso de optimización de hidrólisis enzimática con un sistema para materiales secos, metodología que no se encuentra reportada en la literatura. Las condiciones óptimas para la hidrólisis enzimática están dentro de los rangos medios estimados en las pruebas de actividad y solubilidad, obteniendo un porcentaje de digestibilidad del 79,864% con una concentración enzima/sustrato de 1.683%, una temperatura de 42,447°C y un tiempo de 32,800 minutos, valores estimados con intervalo de confianza del 95 % por la ecuación de segundo orden. El contenido de aminoácidos presentes en el hidrolizado está por encima de los valores estimados para el huevo, estándar establecido por la FAO, mostrando una digestibilidad verdadera de la proteína de 74,326%.

La digestibilidad de la mezcla trigo-quinua aumentan un 20% por medio de la hidrólisis enzimática a diferencia de las muestras que no han recibido ningún tratamiento. Este porcentaje de digestibilidad supera al estimado para el producto de cereales comercial consumido por infantes, postulando al hidrolizado como una fuente directa y de fácil asimilación de aminoácidos.

El análisis proximal de quinua y trigo mostró un alto contenido proteico (16 % y 12 %) en comparación con otros cereales, un importante contenido de aminoácidos esenciales con altos porcentajes de histidina, leucina, lisina y prolina aminoácidos importantes para el desarrollo y crecimiento. Demostrando el alto valor nutritivo para la formulación de alimentos destinados al consumo humano

La modificación de las proteínas mediante hidrólisis enzimática permite mejorar las propiedades funcionales de la harina, con porcentajes de solubilidad del 90 % en comparación con la muestra sin hidrolizar con un porcentaje de solubilidad del 76 %, aportando un posible uso del hidrolizado en diferentes campos.

El mecanismo de reacción que sigue la hidrólisis enzimática es de orden cero, con una actividad enzimática de 0,98 U/mg para Neutrasa® sobre harina de quinua.

El diagrama de Pareto, la superficie de respuesta y la gráfica de efectos principales para digestibilidad de proteínas muestran que el tiempo y la temperatura son los factores más influyentes, afectando el proceso de hidrólisis y la digestibilidad de proteínas.

Las características fisicoquímicas de los hidrolizados dependen de las condiciones de reacción, con las que estos hayan sido generados, estas condiciones se pueden modificar de acuerdo al uso que se defina para el hidrolizado.

RECOMENDACIONES

Las condiciones óptimas de hidrólisis enzimática arrojaron un porcentaje de digestibilidad alto en comparación con las muestras que no han recibido ningún tratamiento y la mezcla comercial de cereales destinados al consumo de infantes, sin embargo se debe evaluar un diseño central compuesto en este rango para ajustar los parámetros del proceso.

A pesar de que el diseño de hidrólisis en seco garantiza un hidrolizado con altos porcentajes de digestibilidad, es necesario mejorar su digestibilidad y capacidad de absorción de nutrientes mediante procesos tecnológicos que permitirán mejorar estas propiedades, uno de los más usados es la extrusión. Además se debe evaluar los cambios en el contenido de vitaminas, minerales etc.

Incentivar investigaciones con productos que tengan un alto potencial por su contenido nutricional y facilidad de cultivo que ayuden a mitigar la desnutrición infantil, uno de los problemas más grandes a nivel mundial. Además de la implementación de metodologías económicas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. ARDERIU F.X., LACAMBRA C. J., COMPAÑÓ Q. M. Bioquímica clínica y Patología molecular. Editorial Reverté (1998). Vol 2. p 448-450
- [2]. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official methods of analysis, 13th edition, Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C. (2000). Vol 1. p 1106-1108.
- [3]. ARONI J.C. Serie de Módulos Publicados en Sistemas de Producción Sostenible en el Cultivo de la Quinoa: Módulo 2. Manejo agronómico de la Quinoa Orgánica. Fundación PROINPA, Fundación AUTAPO. Embajada Real de los Países Bajos. La Paz, Bolivia. (2005). Vol 5. p 87-102.
- [4]. FAO 2014, Recetario Internacional de la quinoa, tradición y vanguardia
- [5]. BENITEZ B.R., IBARZ A., PAGAN J. Hidrolizados de Proteína: procesos y aplicaciones. Acta Bioquímica Latinoamericana. (2008). Vol 42. p 227-36.
- [6]. BERTAZZO A., COMAI S., BAILONI L., ZANCATO M., COSTA C.V., ALLEGRI G. The content of proteic and nonproteic (free and Protein-bound) tryptophan in quinoa and cereal flours. Food Chemistry. (2007). Vol 100. p 1350-1355.
- [7]. BROWN L.D., HENDRICKSON K., MASOR M.L., HAY W.W. High-Protein Formulas Evidence for Use in Preterm Infants. Clinics in Perinatology. (2014). Vol 41, p 383-403.
- [8]. BONIFACIO A., MUJICA A.A., ALVAREZ y ROCA W. Mejoramiento genético, germoplasma y producción de semilla. Quinoa Ancestral cultivo andino, alimento del presente y futuro. FAO. UNA. CIP. (2004). Vol 3. p 125-187.
- [9]. BOZA J.J., MARTINEZ-A. O., GIL A. Nutritional and Antigenic Characterization of an Enzymic Whey Protein Hydrolyzate. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (1995). Vol 43. p 872-875.
- [10]. CONESA P.D., PERIAGO M.J., ROS G., LÓPEZ G. Non Protein nitrogen in infants cereals affected by industrial processing. Food Chemistry (2005). Vol 90, p 513-521

- [11]. CONESA P.D., PERIAGO M.J., ROS G., LÓPEZ G. Protein Nutritional Quality of Infant Cereals during Processing. *Journal of Cereal Science* (2009). Vol 36. p 125-133
- [12]. CORREDOR G., ROMERO A., SARAVIA R., BONIFACIO A., ORTIZ R., MUJICA A. PROYECTO QUINUA: CULTIVO MIJLTIPROPOSITO PARA LOS PAISES ANDINOS. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, Facultad de Agronomía, Instituto de Ciencia y Tecnología de alimentos-ICTA, informe final. Elaborado por: Guillermo Corredor Sbchez Ph. D. Coordinador Proyecto en Colombia. (2006). Vol 4. p 10-12
- [13]. CHRISTO D. S., MARTIMBIANCO D.F.C., OLIVEIRA D.A.S., BATISTA P. D. Plasma amino acids in preterm infants fed different human milk diets from a human milk bank. *The European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*. (2007). Vol 2. p 51-56
- [14]. CHRISTIANSEN K. F., VEGARUD G., LANGSRUD T., ELLEKJAER M. R. y EGELANDSDAL B. Hydrolyzed whey proteins as emulsifiers and stabilizers in high-pressure processed dressings. *Food Hydrocolloids*. (2004). Vol 18. p 757-767.
- [15]. DOUGLAS R., CAMACHO B., ÁLVAREZ M.M.J., GARCÍA D., MEDINA C., SIDOROVAS A. Caracterización de un hidrolizado proteico enzimático obtenido del pez caribe colorado (*pygocentrus cariba* Humboldt. 1821). *Interciencia*. (2007). Vol 32. p 188-194.
- [16]. DIZES J., BONIFACIO A.. Estudio en microscopia electrónica de la morfología de los órganos de la quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) y de la cañahua (*Chenopodium pallidicaule* A.) en relación con la resistencia a la sequía. In: D. Morales y J. Vacher (eds.). *Actas del VII Congreso Internacional sobre Cultivos Andinos*. La Paz, Bolivia. (1999). Vol 56. p 69-74.
- [17]. DEYL Z., HYANEK J y HORAKOVA M. (1986). Profiling of amino acids in body fluids and tissues by means of liquid chromatography. *J. Chromatography*. (1986). Vol 379: p 177-250.
- [18]. FEKKES D., VOSKUILEN K.A., JANKIE R., HUIJMANS C. Precise analysis of primary amino acids in urine by an automated high-performance liquid chromatography method: comparison with ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography B*.(2000). Vol 744. p 183-188.

- [19]. ESCUREDO A., MARTÍN B., MONCADA G., FISCHER S. C., HERNÁNDEZ J.M. Hierro Amino acid profile of the quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) using near infrared spectroscopy and chemometric techniques. *Journal of Cereal Science*. (2014). Vol 60. p 67-74
- [20]. FIERRO, V. (Fotografía). 2015 *Cultivo de quinua Blanca de Jericó, municipio de Bolívar Cauca* (Fotografía).
- [21]. FIERRO, V. (Fotografía). Grano de quinua blanca. (Fotografía). 2015
- [22]. FIERRO, V. (Fotografía). Planta de quinua florecida (Fotografía). 2015
- [23]. FIERRO, V. (Fotografía). Panoja de la planta de quinua florecida (Fotografía). 2015
- [24]. FAO, FOOD and Agriculture Organization, Ecocrop Database (2011)
- [25]. GUADIX A., GUADIX E. M., PAEZ D.M., GONZALEZ T.P., CAMACHO F. Procesos tecnológicos y métodos de control de la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*. (2000). Vol 41. p 79-89.
- [26]. GRANITO M., GUERRA M., TORRES A., GUINAND J. Efecto del procesamiento sobre las propiedades funcionales de *Vigna sinensis*. *Interciencia*. (2004). Vol 29: p 521-526.
- [27]. GONZÁLEZ J.A., KONISHI Y., BRUNO M., VALOY M., PRADO F.E.,. Interrelationships among seed yield, total protein and amino acid composition of ten quinoa (*Chenopodium quinoa*) cultivars from two different agroecological regions. *J. Sci. Food Agric*. (2011). Vol 92. p 1222-1229.
- [28]. Gobernación del Cauca. Tomado: <http://www.cauca.gov.co/noticias/programa-panes-se-destaca-como-una-estrategia-para-disminuir-la-desnutricion-infantil>. 14 de Diciembre del 2015.
- [29]. GRAHAME D.A.S., BRYKSA B.C., YADA R.Y. Factors affecting enzyme activity. *Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality*. (2015). Vol 4. p 11-55.
- [30]. HALLING P J. Protein-stabilized foams and emulsions. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. (1981). Vol 1. p 155-170.

- [31]. HERRERA C. A. Tesis. Determinación de la digestibilidad in vitro de la proteína, contenido de fitatos y lisina disponible en variedades criollas de maíz del estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del estado de Hidalgo. (2011). Vol 2. p 141-151.
- [32]. JONES D.B. Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins. US Dept. Agriculture. (2000). Vol 183. p 15-17.
- [33]. KORHONEN H., PIHLANTO L. A., RANTAMAKI P., TUPASELA T. The functional and biological properties of whey proteins: prospects for the development of functional foods. Agriculture and Food Science in Finland. (1998). Vol 7. p 283-296.
- [34]. KUMAGAI H., SETO H., NORIMATSU Y., ISHII K. Changes in activity coefficient gw of water and the foaming capacity of protein during hydrolysis. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. (2002). Vol 2. p 1455-1461.
- [35]. PERICIN D.; RADULOVIC L., VAŠTAG Z.; MADAREV S.; TRIVIC S. Enzymatic hydrolysis of protein isolate from hull-less pumpkin oil cake: Application of response surface methodology. Food Chemistry. (2009). Vol 15. p 753–757.
- [36]. HODGKINSON S.M.; *Evaluation of the quality of protein sources for inclusion in diets for monogastric animals*. RevistaLatinoamericana en Ciencias de la Agricultura y Ambientales. (2006). Vol 33. p 65-72
- [37]. JACOBSEN S., STOLEN O. Quinoa - Morphology, phenology and prospects for its production as a new crop in Europe. Eur. J. Agron. (1993). Vol 2. p 19-29.
- [38]. JANSEN, P.C.M. Chenopodium album L. Grubben, G.J.H. & Denton, O.A. (Editors). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales del 'Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands. (2004). Vol 3. p 112-116
- [39]. JUERS D. H., KIM J., MATTHEWS B.W., SIEBURTH S.M. *Structural Analysis of Silanediols as TransitionState-Analogue Inhibitors of the Benchmark Metalloprotease Thermolysin*. Biochem (2005). Vol 44. p 16524- 16528.
- [40]. KONTOGIORGIS C.A., PAPAIOANNOU P., HADJIPAVLOU D.J. "MATRIZ Metalloproteínase Inhibitors: A review on pharmacophore mapping and (Q)Sars results". Currents medical Chemistry (2005).Vol 12. p 339-355.

- [41]. KONG X., ZHOU H., QIAN H. Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chemistry*. (2007). Vol 1001. p 615-620.
- [42]. KOSE A., ONCEL S.S. Properties of microalgal enzymatic protein hydrolysates: Biochemical composition, protein distribution and FTIR characteristics. *Biotechnology Reports*. (2015). Vol 9. p 77. 1-7.
- [43]. KOZIOL M. Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Composition and Analysis*. (1992). Vol 5. p. 35-68.
- [44]. CLEMENTE A. Enzymatic Protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food & Technology* (2010). Vol 11. p 254-262
- [45]. LAMSAL B.P., JUNG S., JOHNSON L.A. Rheological properties of soy protein hydrolysate obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT*. (2007). Vol 40. p 1215-1223
- [46]. LARRE C., HUCHET B., BEROT S., POPINEAU Y. Functional properties of peptides derived from wheat storage proteins by limited enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *Special Publication - Royal Society of Chemistry*. (2001). Vol 9. p 262-271.
- [47]. LESCANO J.L. Genética y mejoramiento de cultivos altoandinos: quinua, kañihua, tarwi, kiwicha, papa amarga, olluco, mashua y oca. Programa Interinstitucional de Waru Waru. Convenio INADE/PELT - COTESU. (1994). Vol 2. p 459-463
- [48]. LIU F., WANG L., WANG R., CHEN Z. Calcium-Binding Capacity of Wheat Germ Protein Hydrolysate and Characterization of Peptide- Calcium Complex. *Journal Agricultural and Chemistry*. (2009). Vol 57. p 109-115.
- [49]. LIU L., OU K., ZHANG L., YANG X., HUANG Z., NOUT R., LIANG J. Effect of Neutrase, Alcalase, and Papain Hydrolysis of Whey Protein Concentrates on Iron Uptake by CaCO₂ Cells. *Journal Agricultural and Chemistry*. (2010). Vol 58. p 4894-4900.
- [50]. MARTÍNEZ A., MARTÍNEZ V. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*. (2006). Vol 21. p 1-15.

- [51]. MATHEWS C.K., HOLDE K.E., AHERN K.G., Bioquímica Madrid. Pearson educación. (2002). p 437-438
- [52]. MIRANDA M., VEGA G.A., MARTÍNEZ, E.A., LOPEZ, J., MARIN, R., ARANDA, M., Fuentes, F., Influence of contrasting environments on seed composition of two quinoa genotypes: nutritional and functional properties. Chil. J. Agric. Res. (2013). Vol 73, p 108- 116.
- [53]. LLORENTE R. Quinoa: Un auténtico superalimento. Discovery D Salud. (2008). Vol 50. p 101-106.
- [54]. MUJICA A.S., JACOBSEN. Resistencia de la quinua a la sequía y otros factores abióticos adversos y su mejoramiento. I Curso Internacional sobre Fisiología de la Resistencia a Sequía en Quinoa: (1999). Vol 25-38.
- [55]. MAHMOUD M.I., MALONE W.T., CORDLE C.T. Enzymic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. Journal of Food Science.(1992). 57. 1223-1229.
- [56]. MUJICA A.S., JACOBSEN K. La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) y sus parientes silvestres. Botánica Económica de los Andes Centrales. (2006). Vol 449-457. P 1856-1871
- [57]. MONTGOMERY D.C. Design and Analysis of experiment. 5 ED. John Wiley & Sons, Inc. 2001. 88-97
- [58]. NASCIMENTO A.C., MOTA C., COELHO., GUEIFAO S., SANTOS M., MATOS A.S., GIMENEZ A., LOBO M., SAMMAN N., CASTANHEIRA I. Characterisation of nutrient profile of quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus caudatus*), and purple corn (*Zea mays* L.) consumed in the North of Argentina: Proximates, minerals and trace elements. Food Chemistry (2014). Vol 148. p 420-426.
40.
- [59]. NAKORNPANOM N., HONGSPRABHAS P., HONGSPRABHAS. Effect of soy residue (okara) on *in vitro* protein digestibility and oil release in high-calorie emulsion stabilized by heated mixed proteins. Food Research International. (2010). Vol 43.p 26-32.

- [60]. NIELSEN P.M. y OLSEN H. S. Enzymes in food technology. Chapter 6: Enzymic Modification of food protein. Sheffield Academic Press. (2002). Vol 5. P 112-117
- [61]. NILSANG S., LERTSIRI S., SUPHANTHARIKA M., ASSAVANIG A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. Journal of Food Engineering. (2005). Vol 1. 70. p 571-578
- [62]. NISSEN J. A. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (1979). Vol 27. p 1256-1262.
- [63]. ORTEGA N., PEREZ M., PILAR M., BUSTO M. Neutrase immobilization on Alginate-Glutaraldehyde Beads by Covalent Attachment. Journal Agricultural and Food Chemistry. (2009). Vol 57. p 109-115.
- [64]. OR- RASHID M.M., ONODERA R., WADUD S., MOHAMMED N. Convenient method of threonine, methionine and their related amino compounds by high-performance liquid chromatography and its application to rumen fluid. Journal of Chromatography B. (2000). Vol 74; p 279-287
- [65]. Official Methods of Analysis. AOAC. 18th ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.
- [66]. PEDROCHE J., YUST M. M., GIRON-CALLE J., VIOQUE J., ALAIZ M., MILLAN F. Plant protein hydrolysates and tailor-made foods. EJEAFChe, Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. 2003. 2. 32-36
- [67]. PEIRETTI P.G., F. GAI S. TASSONE B. Fatty acid profile and nutritive value of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds and plants at different growth stages. Animal Feed Science and Technology 183 (2013) 56–61
- [68]. PRIETO C.A. Diseño y optimización de un reactor de membrana discontinuo para la hidrólisis enzimática de proteínas. Tesis doctoral. Universidad de Granada Departamento de Ingeniería química Editorial de la universidad Nueva Granada. 2007

- [69]. PANASIUK R, AMAROWICZ R, KOSTYRA H, SIJTSMA L. Determination of alphaamino nitrogen in pea protein hydrolysates: a comparison of three analytical methods. *Food Chem* 1998; 62: 3637.
- [70]. QUAGLIA G.B., ORBAN E. Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from sardine (*sardina pilchardus*), *Science Food Agriculture*. (1987). Vol 38. p 271-276
- [71]. RADMILA S.A., DJORDJE G.A., MIRJANA D.A., BILJANA V.A., SVEN E., JACOBSEN C, MIRJANA M. Agronomical and nutritional evaluation of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) as an ingredient in bread formulations. *Journal of Cereal Science*. (2012). Vol 55. p 132-138
- [72]. RESTREPO J., COLMENARES A.J., HERRERA S. Estudio sistemático para la determinación de aminoácidos plasmáticos. *Revista de ciencias*. (2011). Vol 2. p 141-151.
- [73]. RISI, J. La quinua: actualidad y perspectivas. In: Taller sobre desarrollo sostenible de la quinua. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura-IICA, Cámara de Exportadores. La Paz, Bolivia. (1997). Vol 6. p 1123-1132
- [74]. ROJAS W., PINTO M., SOTO J.L., JAGGER M., PADULOSI S. Granos Andinos: Avances, logros y experiencias desarrolladas en quinua, cañahua y amaranto en Bolivia. *Biodiversity International*, Roma, Italia. (1998). Vol 3. p 11- 23.
- [75]. NAKAMURA T., SADO H., SYUKUNOBE Y. and HIROTA T. Antigenicity of whey protein hydrolyzates prepared by combination of two proteases. *Milchwissenschaft*. (1993). Vol 48. p 667-670.
- [76]. SANZ M. L., OLANO, AGUSTÍN., CASTILLO, Z. MANUEL. *Nuevos indicadores químicos para el control de la calidad de alimentos*. 4, Alimentacion, Nutricion y Salud. (2003). Vol 10. p 91-99.
- [77]. DE BLOCK, J *Monitoring nutritional quality of milk powders: capillary electrophoresis of the whey protein fraction compared with other methods*. 2-3, *International Dairy Journal*. (2003). Vol. 13. p. 87-94.

- [78]. SARWAR G.; BOTTING H.G. Evaluation of liquid chromatographic analysis of nutritionally important amino acids in food and physiological samples. *J. Chromatografia*. (1993). Vol 615. p. 1-22
- [79]. SAUNDERS R. M., CONNOR M.A. BOOTH A.N. Measurement of digestibility of alfalfa protein concentrates by *in vivo* and *in vitro* methods. *The Journal of nutrition*. (1998). Vol 2. 530-535.
- [80]. VIDUEIROS S.M., CURTI R., DYNER L.M., BINAGHI M., PETERSON G., BERTERO H., PALLARO A.N. Diversity and interrelationships in nutritional traits in cultivated quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) from Northwest Argentina. *Journal of Cereal Science*. (2015). Vol 62. p 87-93
- [81]. SCHWARZ E. L., ROBERTS W.L., PASQUALI M. Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection. *Clinica Chimica*. (2005). Vol 4. p 354 83-90
- [82]. SPELLMAN D., MCEVOY E., CUINN O. G. FITZGERALD R.J. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*. (2003). Vol 13. 447-453.
- [83]. TAPIA, M. E. cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentacion. Second edition. Oficina Regional de la FAO para America Latina y el Caribe. (2000). Vol 2. p (97-101).
- [84]. TANG C.H. Functional properties and *in vitro* digestibility of buckwheat protein products: Influence of processing. *Journal of Food Engineering*. (2007). Vol 82. p 568-576.
- [85]. TAVANO O.L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of molecular Catalysis B Enzymatic*. (2013). Vol 90. p 1-11.
- [86]. TUNCTURK Y., ZORBA O. The effects of enzymatic hydrolysis of casein on apparent yield stress and some emulsion properties: Part Special issue: WCFS Food Summit. *Food Hydrocolloids*. (2006). Vol 20. p 475-482.
- [87]. VEGA G.A., MIRANDA M., VERGARA J., URIBE E., PUENTE L., MARTÍNEZ E.A. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.),

an ancient Andean grain: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2010). Vol 15. p 2541-2547.

[88]. WANG S.X., TANG C.H., YANG X. Q., GAO W.R. Characterization, amino acid composition and *in vitro* digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins. *Food Chemistry*. (2008). Vol 107. p 11-18.

[89]. WENDY M.Y., EUNICE C.Y., CHAN L. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from *In vitro* Pepsin-Pancreatin Digestion of Soy Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (2005). Vol 53. p 3369-3376.

[90]. WROBLEWSKA B., KARAMAC M., AMAROWICS R., SZYMKIEWICZ A., TROSZYNSKA A. KUBICKA E. Immunoreactive properties of peptide fractions of cow whey milk proteins after enzymatic hydrolysis. *International Journal of Food Science and Technology*. (2004). Vol 39. p 839-850.

[91]. YAO TANG., XIHONG L., PETER X. C., Bing Z., HERNANDEZ M, Hua Zhang b , Massimo F. Marcone d , Ronghua Liu b , Rong Tsao b Characterisation of fatty acid, carotenoid, tocopherol/tocotrienol compositions and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd. Genotypes. *Food Chemistry*. (2015). Vol 174. p 502–508

[92]. KOZIOL, M.J. Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Journal of Food Composition and Analysis*. (1992). Vol 5, p 35-68.

[93]. CHAMORRO V. S. Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador. Copyright Elsevier Science Ltd. All Rights Reserved. (2003). Vol 3. p 112-116

[94]. SONG Y. S., FRIAS J., MARTINEZ V. C., VIDAL C., GONZALEZ E., Immunoreactivity reduction of soybean meal by fermentation, effect on amino acid composition and antigenicity of commercial soy products. *Food Chemistry*. (2008). Vol 108. p 571-581.

[95]. MOTA C., SANTOS M., MAURO R., SAMMAN N., MATOS A. S., TORRES D., Castanheira I. Protein content and amino acids profile of pseudocereals. *Food Chemistry*. (2016). Vol 193. p 55-61.

[96]. UNAD (s.f.). Apuntes lección 36, pardeamiento no enzimático. Recuperado el 20 de marzo de 2016, del Sitio web de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia
UNAD:

http://datateca.unad.edu.co/contenidos/202015/202015/leccin_36_pardeamiento_n_o_enz.

[97]. USURIAGA M. Y. Inmovilización de la enzima lactozym en soporte mesoporoso (MCM-41) y su aplicación en la obtención de leches bajas en lactosa [Tesis de Pregrado]. Popayán (Colombia): Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la educación. (2015). p 25-27.

[98]. VÉLAZQUEZ G. Fundamentos de alimentación saludable. Salud, Nutrición y Dietética. Editorial Universidad de Antioquia. (2006). Vol 2. 91-97

[99]. WILMOT M.Y., PHILLIPS R.D., HARGROVE J.L. Protein quality evaluation of cowpea-based extrusion cooked cereal/legume weaning mixtures. Nutrition Research. (2001). Vol 21. p 849-857.

[100]. WANG X.S., TANG C.H., CHEN L., YANG X.Q. Characterization and Antioxidant Properties of hemp protein Hydrolysates Obtained with Neutrase®. Food Technology Biotechnology. (2009). Vol 47. p 428-434.

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de normalidad para prueba de solubilidad

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

		VAR00002	VAR00004
N		3	3
Parámetros normales ^{a,b}	Media	71,8640	74,1537
	Desviación típica	18,94546	12,28245
Diferencias más extremas	Absoluta	,373	,362
	Positiva	,271	,261
	Negativa	-,373	-,362
Z de Kolmogorov-Smirnov		,647	,628
Sig. asintót. (bilateral)		,797	,825

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

Anexo 2. Prueba t para la prueba de solubilidad.

Prueba de muestras relacionadas

	Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 60 - 1 50	-	,672459	,475500	-7,935300	4,148300	-3,982	1	,157

Anexo 3. Tabla de normalidad para prueba de hidrólisis con diferentes sustratos y condiciones de reacción.

Pruebas de normalidad

	muestras	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
concentración	duplican	,267	5	,200*	,921	5	,539
	mezcla	,413	5	,006	,717	5	,014
	quinua	,202	5	,200*	,943	5	,686

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Anexo 4. Prueba t para la prueba de hidrólisis con diferentes sustratos

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas	Prueba T para la igualdad de medias								
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
CONCENTRACIÓN	Se han asumido varianzas iguales	,204	,664	1,072	8	,315	50,78860	47,39489	-58,50420	160,08140
	No se han asumido varianzas iguales			1,072	7,271	,318	50,78860	47,39489	-60,44045	162,01765

Anexo 5. Prueba de normalidad para la curva de comparación de actividad a través del tiempo

Pruebas de normalidad

	valor	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
concentración	1,00	,200	13	,163	,868	13	,049
	2,00	,315	13	,001	,735	13	,001

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Anexo 6. Prueba t para la curva de comparación de actividad a través del tiempo

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
concentración	Se han asumido varianzas iguales	,119	,733	-,009	24	,993	-,00085	,08947	-,18551	,18382
	No se han asumido varianzas iguales			-,009	23,994	,993	-,00085	,08947	-,18551	,18382

Anexo 7. Prueba t para la digestibilidad in vitro y grado de hidrólisis del diseño

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
concentración	Se han asumido varianzas iguales	36,121	,000	36,073	32	,000	75,77878	2,10073	71,49972	80,05783

No se han asumido varianzas iguales			36,073	16,212	,000	75,77878	2,10073	71,33016	80,22740
-------------------------------------	--	--	--------	--------	------	----------	---------	----------	----------

Anexo 8. Curvas de calibración de aminoácidos.

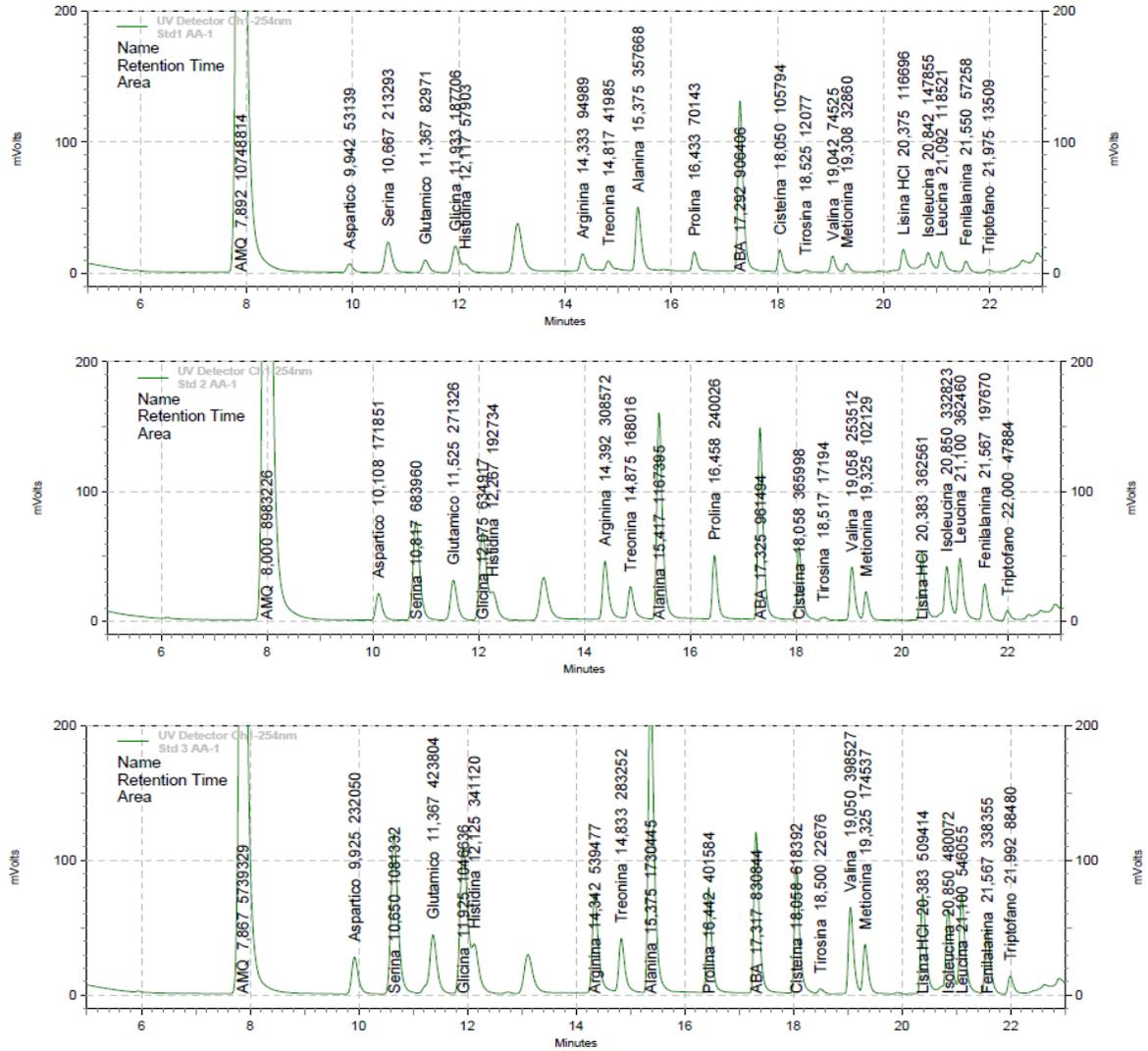


Figura 37. Cromatogramas de los patrones de aminoácidos

Tabla 26. Datos curvas de calibración de patrones de aminoácidos

Aminoácido	Tiempo de retención		Pendiente	Intercepto	R ²
Aspártico	9,942	10,108	9,925	5,012	0,973
Serina	10,667	10,817	10,650	39,462	0,998

Glutámico	11,367	11,525	11,367	11,080	0,018	0,996
Glicina	11,933	12,075	11,925	19,927	0,004	0,999
Histidina	12,117	12,267	12,125	14,215	-0,006	1,000
Arginina	14,333	14,392	14,342	9,125	-0,005	1,000
Treonina	14,817	14,875	14,833	13,514	0,008	0,998
Alanina	15,375	15,417	15,375	15,644	-0,117	0,990
Prolina	16,433	16,458	16,442	11,663	0,001	0,999
Tirosina	18,525	18,517	18,500	7,052	0,010	0,993
Valina	19,042	19,058	19,050	13,236	0,012	0,996
Metionina	19,308	19,325	19,325	8,395	-0,002	1,000
Lisina	20,375	20,383	20,383	13,628	0,025	0,985
Isoleucina	20,842	20,850	20,850	15,138	0,040	0,980
Leucina	21,092	21,100	21,100	13,914	0,040	0,994
Fenilalanina	21,550	21,567	21,567	12,051	-0,004	1,000
Triptófano	21,975	22,000	21,992	9,761	0,004	1,000

Anexo 9. Tiempo de retención de cada aminoácido

Muestra	Hidrolizado enzimático	Mezcla sin hidrolizar
AA	Tiempo retención	Tiempo retención
Aspártico	ND	9,692
Serina	10,192	10,183
Asparagina	10,275	10,275
Glutámico	10,667	10,658
Histidina	11,983	11,975
Glicina	11,658	11,658
Arginina	12,800	12,783
Treonina	14,992	14,983
Alanina	15,583	15,583
Prolina	16,667	16,667
Tirosina	18,633	18,633
Cisteína	18,808	18,800
Valina	19,283	19,275
Metionina	19,592	19,583
Lisina	20,492	20,492
Isoleucina	21,075	21,075
Leucina	21,333	21,333
Fenilalanina	21,858	21,858
Triptófano	22,158	22,125