

**METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA EN LA OPTIMIZACIÓN DE LA
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS PRESENTES EN SEMILLAS DE
GUANDUL (*Cajanus Cajan*): PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DEL
HIDROLIZADO**

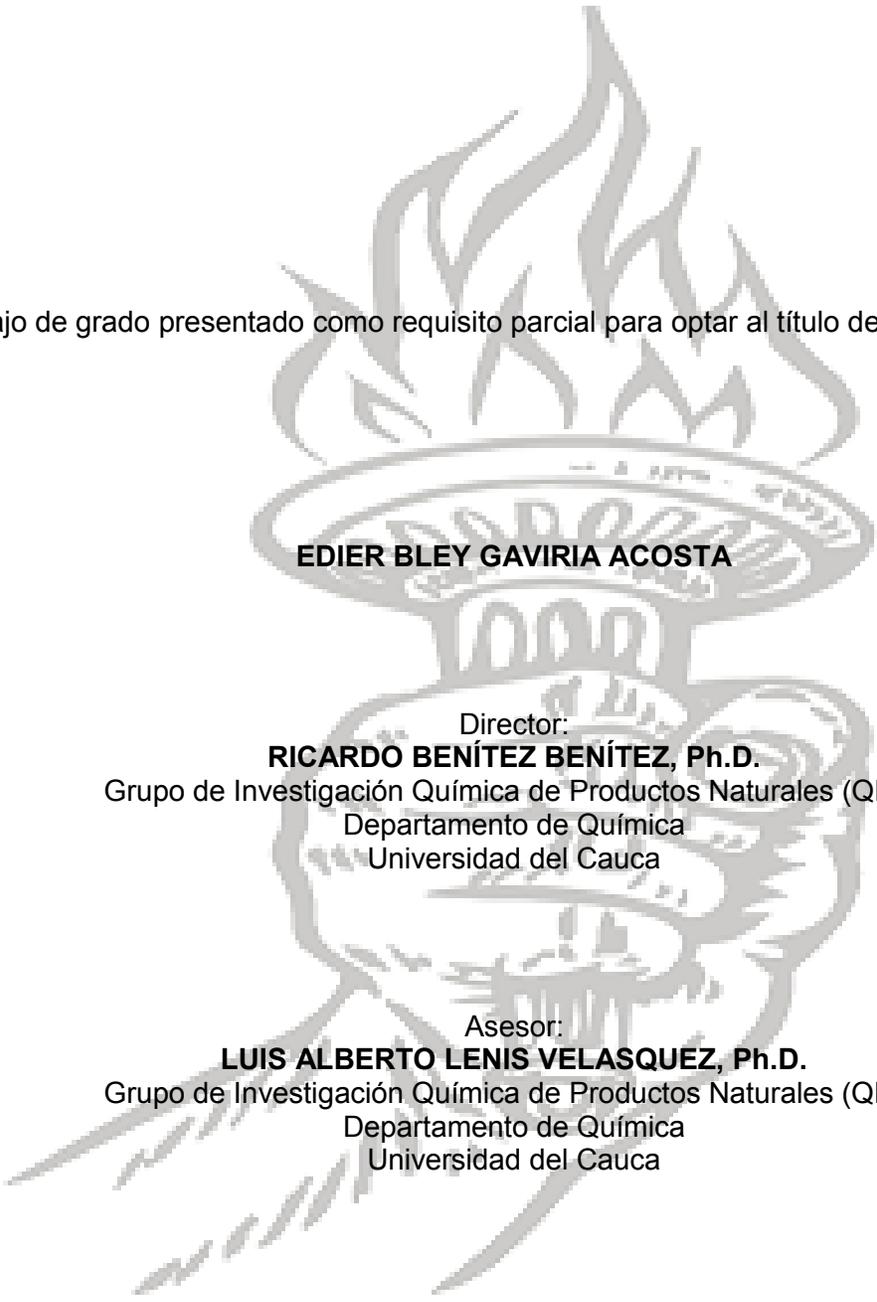
EDIER BLEY GAVIRIA ACOSTA



**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2013**

**METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA EN LA OPTIMIZACIÓN DE LA
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS PRESENTES EN SEMILLAS DE
GUANDUL (*Cajanus Cajan*): PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DEL
HIDROLIZADO**

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



EDIER BLEY GAVIRIA ACOSTA

Director:

RICARDO BENÍTEZ BENÍTEZ, Ph.D.

Grupo de Investigación Química de Productos Naturales (QPN)
Departamento de Química
Universidad del Cauca

Asesor:

LUIS ALBERTO LENIS VELASQUEZ, Ph.D.

Grupo de Investigación Química de Productos Naturales (QPN)
Departamento de Química
Universidad del Cauca

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2013**

Nota de aceptación:

Director de Trabajo de Grado _____
Ricardo Benítez, Ph.D.

Jurado _____

Jurado _____

Popayán, 19 de Abril del 2013

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la vida, llevarme por el camino correcto y regalarme la mejor familia, amigos y compañeros.

A mi madre, por su incansable lucha, por todo su amor comprensión y dedicación.

A mis hermanos, tíos y primos, que siempre estuvieron pendientes de mi vida y mi carrera.

A mi director Ricardo Benítez, por sus conocimientos, por creer en mis capacidades y por todo el tiempo dedicado, con igualmente aprecio a mi asesor Luis Alberto Lenis.

A la persona que ha dedicado gran parte de su tiempo para compartirlo a mi lado: Evelyn Alegría

A mis grandes y verdaderos amigos: Jonny Sepúlveda, Carolina Coronell, Julián Muñoz, Jeyson Cortez, David Rengifo, Helder Acosta, Lady Carvajal, Roger Burbano, Victoria Beltran, Wilmer Burbano, Leidy Alvira, Leidy Herrera.

A Todo el Grupo de química de productos naturales, profesores e integrantes, y al grupo de biotecnología y su director José L. Hoyos.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	13
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 GENERALES.....	15
2.2. ESPECÍFICOS... ..	15
3. MARCO TEÓRICO.....	16
3.1. GUANDUL.....	16
3.1.1. DESCRIPCIÓN GENERAL.....	16
3.1.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	17
3.1.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	17
3.1.4. VARIEDADES.....	17
3.1.5. COSECHA E IMPORTANCIA DEL GUANDUL.....	17
3.1.6. COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	18
3.2. METODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	18
3.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	19
3.3.1. EFECTO DEL pH.....	19
3.3.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA.....	19
3.3.3. EFECTO DEL TIEMPO.....	20
3.3.4. EFECTO DE LA RELACIÓN ENZIMA/SUSTRATO.....	20
3.4. MEDIDA DEL GRADO DE HIDRÓLISIS.....	20
3.4.1. DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO SOLUBLE.....	20
3.4.2. DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS α-AMINO LIBRES.....	20
3.4.3. MÉTODO DE pH ESTÁTICO.....	21
3.5. TIPOS DE SUSTRATOS.....	21
3.6. HIDROLIZADO DE PROTEÍNAS.....	21

3.7.	PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES DEL HIDROLIZADO.....	22
3.7.1.	SOLUBILIDAD.....	22
3.7.2.	SABOR AMARGO.....	22
3.7.3.	EMULSIÓN Y ESPUMA.....	22
3.8.	DIGESTIBILIDAD.....	22
4.	METODOLOGÍA.....	24
4.1.	OBTENCIÓN DE LA SEMILLA.....	24
4.2.	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LA SEMILLA DE GUANDUL.....	24
4.3.	MOLIENDA DE LA SEMILLA.....	24
4.4.	ANÁLISIS PROXIMAL DE LA HARINA.....	24
4.5.	EXTRACCIÓN DE PROTEINAS DE LA HARINA DE GUANDUL.....	26
4.6.	ENZIMA.....	27
4.7.	OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS.....	27
4.7.1.	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	28
4.8.	DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS.....	29
4.8.1.	MÉTODO DE OPA.....	29
4.9.	RECUPERACIÓN DE NITRÓGENO.....	30
4.10.	PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES.....	31
4.10.1.	DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE SOLUBILIDAD.....	31
4.10.2.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD EMULSIFICANTE (EC) Y ESTABILIDAD DE LA EMULSIÓN (ES)	31
4.10.3.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ESPUMANTE (FC) Y DE LA ESTABILIDAD DE LA ESPUMA (FS).....	31
4.11.	DIGESTIBILIDAD.....	31
4.11.1.	DIGESTIBILIDAD <i>in vitro</i> DE LA SEMILLA DE GUANDUL.....	31
4.11.2.	DIGESTIBILIDAD <i>in vitro</i> DEL HIDROLIZADO.....	32
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
5.1.	OBTENCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA SEMILLA DE GUANDUL	33
5.2.	ANÁLISIS DE LA SEMILLAD DE GUANDUL.....	34
5.3.	OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS.....	34
5.3.1.	DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS.....	35

5.3.2.	VALORES ÓPTIMOS PARA EL PROCESO DE HIDRÓLISIS.....	38
5.3.3.	ANÁLISIS DE PARETO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	39
5.3.4.	EFFECTOS PRINCIPALES SOBRE EL GRADO DE HIDRÓLISIS.....	40
5.3.5.	GRÁFICAS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	41
5.3.6.	EXPERIMENTOS OPTIMIZADOS.....	42
5.4.	CINÉTICA DE LA REACCIÓN.....	42
5.5.	RECUPERACIÓN DE NITRÓGENO (NR).....	43
5.6.	PROPIEDADES TECNOLÓGICAS.....	44
5.6.1.	PORCENTAJE DE SOLUBILIDAD.....	44
5.6.2.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ESPUMANTE (FC) Y DE LA ESTABILIDAD DE LA ESPUMA (FS).....	46
5.6.3.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD EMULSIFICANTE (EC) Y ESTABILIDAD DE LA EMULSIÓN (ES).....	49
5.7.	DIGESTIBILIDAD.....	50
5.7.1	DIGESTIBILIDAD <i>in vitro</i> DE LA SEMILLA DE GUANDUL E HIDROLIZADO.....	50
6.	CONCLUSIONES	52
	BIBLIOGRAFÍA	53
	ANEXOS	57

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica del Guandul.....	17
Tabla 2. Contenido nutricional del grano de Guandul verde y seco.....	18
Tabla 3. Análisis proximal de la semilla de Guandul.....	25
Tabla 4. Datos de la base del diseño experimenta.....	27
Tabla 5. Factores del diseño experimental.....	27
Tabla 6. Diseño experimental.....	28
Tabla 7. Composición proximal de la semilla de Guandul.	34
Tabla 8. Concentración y absorbancia de los patrones de leucina.....	36
Tabla 9. Cantidad de leucina en cada hidrolizado.....	36
Tabla 10. Concentración de leucina en la proteína nativa.....	37
Tabla 11. Resultados del grado de hidrólisis.....	37
Tabla 12. Valores óptimos para obtener el mayor grado de hidrólisis.....	38
Tabla 13. Experimentos óptimos.....	42
Tabla 14. Porcentaje de Nitrógeno recuperado en cada experimento.....	43
Tabla 15. Actividad emulsificante.....	50
Tabla 16. Porcentaje de digestibilidad de la proteína nativa e hidrolizada.....	51

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Vainas de Guandul	16
Figura 2. Semillas de Guandul	16
Figura 3. Extracción de proteínas de la harina de Guandul	26
Figura 4. Bioreactor	29
Figura 5. Reacción de ortoparafenilaldehído	30
Figura 6. Semilla de Guandul	33
Figura 7. Semillas en mal estado	33
Figura 8. Molienda de la semilla	33
Figura 9. Harina de Guandul	33
Figura 10. Hidrolizado líquido	35
Figura 11. Residuo sólido de la hidrólisis	35
Figura 12. Curva de Calibración, método de OPA	36
Figura 13. Gráfico de pareto	40
Figura 14. Gráfico de efectos principales	41
Figura 15. Gráfico de Superficie de Respuesta	41
Figura 16. Grado de hidrólisis respecto al tiempo	43
Figura 17. Porcentaje de solubilidad a diferente pH	45
Figura 18. Porcentaje de solubilidad a diferente pH	45
Figura 19. Capacidad espumante de los hidrolizados	46
Figura 20. Porcentaje de espuma de los hidrolizados	47
Figura 21. Porcentaje de espuma de los hidrolizados	47
Figura 22. Estabilidad de la espuma	47
Figura 23. Estabilidad de la espuma	48
Figura 24. Determinación capacidad emulsificante	49
Figura 25. Capacidad emulsificante de los hidrolizados	50

LISTA DE ANEXOS

	pág.
1. Tamizaje de la harina de Guandul	56
2. Bioreactor usado para la hidrólisis enzimática	56
3. Inactivación de la enzima por temperatura.....	56
4. Equipo de liofilización	56

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

\bar{A}	Absorbancia media
C	Carbono
D	Desviación estándar
DT	Desviación estándar total
DH	Grado de hidrólisis
ENN	Extracto no nitrogenado
EC	Capacidad emulsificante
ES	Estabilidad de la emulsión
FC	Capacidad espumante
FS	Estabilidad de la espuma
H₂O	Agua
Leu	Leucina
N	Nitrógeno
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH₂	Amino
nm	Nanómetros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
OPA	Ortoparafenilaldehído
PANES	Programa de alimentación y nutrición escolar
ppm	Partes por millón
RSM	Método de superficie de respuesta
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TNBS	Ácido Trinitrobencenosulfónico
UA	Unidades Ason
µg	Microgramo
µL	Microlitro
w/w	Porcentaje peso a peso

RESUMEN

En el presente estudio se llevó a cabo la optimización de la hidrólisis enzimática de proteínas presentes en las semillas de Guandul (*Cajanus cajan*), por el método de superficie de respuesta. Los análisis realizados mostraron que la semilla de Guandul es una rica fuente de proteína y carbohidratos con porcentajes de 22.6 y 63.0% respectivamente. El complejo enzimático utilizado es Neutrasa[®] con actividad de proteasa, los valores de las variables optimizadas son; pH: 7.2, temperatura: 53°C, tiempo: 137 minutos y relación de concentración Enzima/Sustrato de 1,5. Se determinaron las propiedades tecnofuncionales, como solubilidad, formación de emulsión y espuma, además de la digestibilidad y contenido de nitrógeno del hidrolizado obtenido y la semilla nativa, con el fin de resaltar el gran valor que tiene el producto, como fuente inmediata de aminoácidos, y sus posibles usos en la industria alimentaria.

Palabras clave: Guandul, superficie de respuesta, hidrolizado, tecnofuncionales, digestibilidad.

INTRODUCCIÓN

El Guandul (*Cajanus cajan*) se encuentra clasificado en la familia Papilionaceae, genero *Cajanus*, esta especie se caracteriza por la producción de semillas con un alto contenido de carbohidratos y proteína. La semilla de Guandul es utilizada para la alimentación humana y animal, esta se puede consumir fresca o seca, en diferentes presentaciones como guiso, sopas y al vapor. También es utilizada para la fabricación de harinas con el fin de darle diferentes aplicaciones. En los últimos años se ha incrementado el cultivo de Guandul en los departamentos del sur occidente colombiano, debido a la gran demanda que presenta la semilla, utilizada en programas de alimentación de campesinos y familias de escasos recursos, siendo el Guandul un alimento altamente nutritivo con un bajo costo de producción. La hidrólisis enzimática se presenta como una de las alternativas tecnológicas, que contribuyen a la valorización de estos productos, por medio de transformaciones que permiten el cambio de sus propiedades fisicoquímicas y se logre un mayor y mejor uso en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.

Con el fin de buscar una alternativa y darle un mayor valor a la semilla de Guandul, el presente trabajo se enfocó en la optimización de las hidrólisis de proteínas presentes en las semillas, así como mejorar su digestibilidad y determinar las propiedades funcionales que presentan los hidrolizados.

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las últimas décadas se han desarrollado en diferentes campos, innovadoras formas de generar nuevos y mejores productos a partir de materia prima de origen natural y de bajo costo, para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Una de las formas más viable, confiable y saludable es el uso de enzimas, las cuales tienen la capacidad de catalizar reacciones con alta selectividad y porcentaje de rendimiento. Entre los productos obtenidos enzimáticamente, están los hidrolizados de proteínas, utilizados en la alimentación humana y animal, fuente inmediata de aminoácidos esenciales y no esenciales, debido a que el hidrolizado es una forma proteínica mucho más biodisponible y biodegradable que la proteína nativa en la semilla. Los hidrolizados son también usados para formular alimentos enriquecidos, mejorar las propiedades tecnofuncionales, como son; solubilidad, espuma y emulsión. En la actualidad se encuentran abundantes publicaciones en las que se les reporta además propiedades medicinales, como antihipertensivos y antioxidantes, entre otras [1]. En este trabajo se plantea la optimización de la hidrólisis enzimática de proteínas de semillas de Guandul, por medio del método de superficie de respuesta, así como el estudio de las propiedades tecnofuncionales del hidrolizado obtenido, además de la digestibilidad de la semilla nativa e hidrolizado de la proteína de la semilla, y sugerencias derivadas de los posibles usos de acuerdo con los resultados obtenidos. La selección de la materia prima se debe al incremento en el uso de Guandul (*Cajanus cajan*) tanto en el departamento del Cauca como en Colombia, esta leguminosa, contiene semillas ricas en nutrientes como proteínas, carbohidratos y minerales, además de ser actualmente utilizada en la alimentación animal y humana, se encuentra entre las ocho leguminosas más cultivadas en el mundo y ocupa el tercer lugar en cuanto al contenido proteico del grano seco, con un 25%, después de la soya y la lenteja que poseen 38 y 28%, respectivamente. Presenta un mínimo gasto de pesticidas y abono para su cultivo [2]. En el departamento del Cauca se ha observado un incremento de cultivos de Guandul, destinado para alimentación humana y sobretodo infantil del departamento, diferentes programas se están desarrollando para fomentar el cultivo de esta planta, entre ellos tenemos; Programa de alimentación y nutrición escolar (PANES), plan departamental de seguridad alimentaria y nutricional y fundación tierra de paz. Los cuales han logrado tener cultivos en municipios como Totoró, Bolívar, San Sebastián, Puracé, Rosas, Balboa, entre otros. Por ende es de gran importancia estudiar las semillas de Guandul, así como la capacidad nutritiva que posee, y darle un mayor valor a través de la formación de hidrolizados, aumentando el consumo de esta leguminosa, en comparación con las más comunes y ampliamente investigadas.

2 OBJETIVOS

2.1 GENERAL

- Optimizar el método de hidrólisis enzimática de las proteínas presentes en semillas de Guandul, a través del método de superficie de respuesta.

2.2 ESPECÍFICOS

- Realizar el análisis proximal de la semilla de Guandul, cultivadas en el departamento del Cauca.
- Determinar la digestibilidad de la proteína de las semillas de Guandul y del hidrolizado generado.
- Determinar las propiedades tecnofuncionales del hidrolizado.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 GUANDUL

3.1.1 DESCRIPCIÓN GENERAL

El Guandul o Gundu (*Cajanus cajan*) es un leguminosa que llega a medir de 1 a 3 metros de altura, posee gran adaptación a la mayoría de suelos en condiciones normales, además de requerir poco fertilizante. Su tiempo de maduración es de cinco meses, sus hojas son pilosas y las flores de color amarillas [figura 1]. Las vainas de Guandul contienen entre dos y seis semillas de color variado [figura 2], estos granos tienen un gran valor nutritivo, debido a su alto porcentaje proteico, entre 20 y 24%, es buena fuente de carbohidratos, minerales y fibra. El Guandul posee un valor agregado importante, el cual consiste en fijar nitrógeno en el suelo, y ser utilizado como barrera de erosión. En los últimos años la semilla de Guandul ha sido altamente cultivada y utilizada en la alimentación humana y animal en el mundo entero.

Esta planta presenta propiedades medicinales como: antirreumática, diurética, hemostática y astringente, sus hojas se han utilizado para afecciones bronquiales y pulmonares, las semillas poseen efecto desinfectante y cicatrizante [2], además se han realizado diferentes estudios sobre la capacidad que posee para el tratamiento de cáncer, así como su actividad microbiana y prevención de daños en el hígado por el consumo de alcohol [32] [33] [34].



Figura 1: Vainas de Guandul.



Figura 2: Semillas de Guandul.

3.1.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El Origen del Guandul se encuentra en el sur de Asia, este se haya distribuido desde la India hasta el oeste de África. Es traído a Suramérica en la época de la colonización logrando una rápida adaptabilidad en países como Colombia Perú y Ecuador.

3.1.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Tabla 1. Clasificación Taxonómica.

Reino	Plantae
Clase	Angiosperma
Orden	Leguminosae
Familia	Papilionaceae
Género	<i>Cajanus</i>
Especie	<i>Cajanus cajan L.</i>
Variedad	Pinto Villalba

3.1.4 VARIEDADES

El Guandul se clasifica en dos variedades, conocidas como KaKi y Pinto Villalba. La variedad Kaki se caracteriza por tener granos claros, de un color amarillo cremoso, flores amarillas y su periodo vegetativo es de 5 a 7 meses. La variedad Pinto Villalba, posee granos pintados, de color amarillo cremosos con manchas amarillas, sus flores tienen manchas moradas y su ciclo vegetativo es de 6 meses [3].

3.1.5 COSECHA E IMPORTANCIA DEL GUANDUL

La cosecha del Guandul se puede llevar a cabo con la semilla verde o seca, dependiendo del hábito de consumo, esta se realiza de manera manual y posteriormente se realiza un secado de la semilla ya sea en la vaina o desgranada. La semilla de Guandul es una rica fuente de proteína de origen vegetal de considerable calidad, además de bajo costo, debido al poco consumo de pesticidas utilizados en su cultivo. El consumo de Guandul en combinación con otro tipo de alimentos pueden contribuir a una dieta balanceada, además sus granos contienen proteínas, carbohidratos, minerales y fibra solubles que ayudan de forma significativa en la prevención de enfermedades del corazón, obesidad y tracto digestivo, es por estas razones que en los últimos años algunas instituciones ha incentivado el comercio y consumo de este grano. El Guandul se puede preparar en

guisos, cocido, realizar la molienda para obtener la harina, y a partir de esta un sin número de formas de consumo [4].

3.1.6 COMPOSICIÓN QUÍMICA

El Guandul (*Cajanus cajan*) se encuentra dentro de las primeras ocho leguminosas con mayor número de cultivos en el mundo, su grano ocupa el tercer lugar en cuanto a contenido proteico con un 25%, después de la soya y lenteja, las cuales poseen un 38 y 28% respectivamente.

Tabla 2. Contenido nutricional del grano de Guandul verde y seco.

NUTRIENTES	GRANO VERDE	GRANO SECO
Humedad	69.4%	9.9%
Proteína	7.1%	19.5%
Grasa	0.6%	1.3%
Carbohidratos	21.2%	65.5
Fibra	0.6%	1.3
Cenizas	1.4%	3.8

Según la tabla 2, la semilla de Guandul presenta un alto contenido de carbohidratos, convirtiendo este alimento en una fuente directa de energía, además presenta un porcentaje de 19.5% de proteína, lo que potencializa un valor nutricional teniendo en cuenta que esta proteína es de buena calidad [5] [6].

3.2 MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

El método de Superficies Respuesta (RSM) es un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas para tratar problemas en los que una respuesta de interés está influida por varios factores, los cuales tienen carácter cuantitativo. Esta técnica se basa en el diseño de un experimento, para proporcionar valores razonables de la respuesta de interés, esto con el fin de determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos. El objetivo final es establecer los valores de los factores que optimizan la variable respuesta, generalmente se realiza la visualización de la superficie de respuesta, mediante una representación gráfica de los contornos de la superficie, esta grafica resulta de gran utilidad para estudiar el cambio de los factores o la variabilidad de estos [8].

3.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Las proteínas son biomoléculas formadas por polímeros de aminoácidos unidos de forma covalente, estos enlaces son denominados enlaces peptídicos. Estas se encuentran en la naturaleza en diferentes formas, tamaños y composición, cada proteína tiene una función específica y es indispensable en el desarrollo de la vida. Unas de las proteínas más importantes son las enzimas, las cuales son catalizadores biológicos y se hayan innumerables de ellas en los seres vivos, de acuerdo a su función han sido clasificadas. El uso de enzimas en la industria y en el desarrollo biotecnológico se ha incrementado significativamente debido a la demanda de nuevos y mejores productos, en campos como la medicina, cosmética e industria alimentaria. La hidrólisis enzimática consiste en el rompimiento de enlaces peptídicos, generalmente en medio acuoso, que da como resultado péptidos o aminoácidos libres, los cuales son llamados hidrolizados. Las enzimas capaces de romper enlaces peptídicos se denominan hidrolasas o proteasas, Estas provienen de diferentes fuentes como los son animal, microbiana y fúngica, cada una con actividad específica diferente [9].

3.3.1 EFECTO DEL pH

Las enzimas tienen un rango o un pH óptimo de trabajo, donde se va a dar la mayor actividad catalítica, tanto como por encima o por debajo de este valor, la actividad disminuye, esto se debe a que las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman la enzima, le dan la capacidad de actuar como ácido o base débiles, y afectar de forma directa el grado de ionización del sitio activo de la misma como del complejo enzima sustrato.

3.3.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA

En general el aumento de la temperatura acelera las reacciones química, lo mismo ocurre con casi todas las enzimas hasta cierto punto, esto debido a que son biomoléculas unidas por enlaces covalentes entre aminoácidos, la elevación de la temperatura logra distorsionar la estructura de las proteínas hasta el rompimiento de sus enlaces, lo cual se conoce como desnaturalización, por tanto es importante conocer el rango óptimo de temperatura, en la que la enzima tendrá mayor actividad catalítica. Generalmente las enzimas se desnaturalizan a una temperatura mayor a 60°C, y por tanto pierde su actividad, de igual forma ocurre si la temperatura del medio en que se encuentra la enzima desciende a temperaturas entra 0-5°C, la actividad de la enzima disminuye significativamente pero esta no se desnaturaliza.

3.3.3 EFECTO DEL TIEMPO

En una reacción química en general el tiempo es una de las variables más importantes, debido a que este determina la cantidad de reactivo(s) convertido a producto. A pesar de esto, se debe tener en cuenta factores como el tipo de reacción, la presencia o no de catalizadores, entre otros.

3.3.4 EFECTO DE LA RELACIÓN ENZIMA/SUSTRATO [E/S]

Las reacciones enzimáticas se basan en la unión de la enzima con el sustrato, denominado como complejo Enzima/Sustrato, su posterior conversión a producto, y por último la liberación del producto y la enzima libre y lista para catalizar una nueva reacción, un aumento en la concentración de sustrato lograra que todos los sitios activos de la enzima se encuentren ocupados, por tanto para evitar este equilibrio es necesario retirar producto del medio, un aumento en la concentración enzima nos llevará a una rápida conversión de sustrato a producto, lo cual no es muy conveniente en algunos casos, por esto es necesario determinar el valor óptimo de enzima que se debe utilizar en un proceso.

3.4 MEDIDA DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

Con el fin de tener un valor cuantitativo de avance de la reacción de hidrólisis, se han establecido diferentes métodos, entre ellos se tienen: determinación de Nitrógeno soluble, la determinación de los grupos α -amino libres, método de pH-estático y descenso del punto crioscópico. Todos convergen en la medida del grado de hidrolisis (DH), definido como la relación de enlaces peptídicos rotos y enlaces peptídicos totales presentes en la proteína [11].

3.4.1 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO SOLUBLE

El método usado para determinar el nitrógeno soluble en un hidrolizado de proteína es Kjeldhal, el cual consiste en digerir la muestra para llevarla a una oxidación completa, recogiendo nitrógeno presente en la muestra en forma amoniacal, para luego realizar un determinación por titulación ácido-base [16].

3.4.2 DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS α -AMINO LIBRES

Para esta determinación se pueden emplear diferentes metodologías de reacción; entre ellos colorimetría con ninhidrina, con ácido Trinitrobencenosulfónico (TNBS) o con

ortofenilaldehído. Entre ellas actualmente la más empleada es la reacción con ortofenilaldehído por ser su mayor sensibilidad. [9, 12,13].

3.4.3 MÉTODO DE pH ESTÁTICO

La reacción de hidrólisis de un proteína lleva a la liberación de protones al medio de reacción, lo que conlleva a una disminución en el pH, este método se basa en la adición de base débil, con el fin de neutralizar la acides generada en la reacción y mantener el pH constante, el volumen final de base es utilizado para conocer el grado de hidrólisis de la proteína o sustrato [11].

3.5 TIPOS DE SUSTRATOS

La materia prima usada en hidrólisis enzimática proviene de diferentes fuentes, animal, vegetal y bacteriano. Existen innumerables fuentes de sustrato para generar hidrolizados, la elección de un sustrato debe tener en cuenta el uso que se le va a dar al hidrolizado, además del valor agregado que puede tener respecto al material de partida. En muchos casos los sustratos son materia que se desecha o que no presenta utilidad inmediata, pero que al ser tratados (hidrolizados) son una fuente potencial de aminoácidos esenciales.

3.6 HIDROLIZADO DE PROTEÍNAS

El hidrolizado es el producto de una reacción de hidrólisis o rompimiento de proteínas, método que se ha utilizado para darle utilidad a compuestos y material desechados en cadenas de producción alimentaria, con los hidrolizados se logra recuperar un porcentaje alto de proteínas y por tanto aminoácidos esenciales como no esenciales, que se pueden utilizar en diferentes industrias, entre ellas la alimentaria como alimento infantil clínico, cosmética y farmacéutica, además son fuente de péptidos. Algunos de estos presentan actividad biológica y farmacéutica. Los hidrolizados se pueden generar por diferentes vías, la hidrólisis ácida, básica y enzimática. La hidrólisis ácida consiste en romper la proteína del sustrato con la adición de ácido, generalmente ácido clorhídrico 6N, la hidrólisis básica consiste en la adición de base, NaOH 6N sobre el sustrato a hidrolizar, por último la hidrólisis enzimática se basa en el rompimiento de proteínas por medio de enzima o complejos enzimáticos que posean esta capacidad. Este tipo de hidrólisis presenta algunas ventajas sobre los métodos ácidos y básicos, la hidrólisis enzimática posee mayor especificidad, así como mejores condiciones de reacción, mayor control sobre la reacción y un producto de mayor calidad nutritiva [19].

3.7 PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES DEL HIDROLIZADO

Las diferentes características que se pueden llegar adquirir o modificar en el hidrolizado al ser comparado con la proteína nativa, tales como solubilidad, viscosidad, formación de espuma, características sensoriales y propiedades emulsificantes, son importantes debido a la utilidad que se le puede dar a este en campos como el alimentario, farmacéutico, y tecnológico [20].

3.7.1 SOLUBILIDAD

Es una característica importante del hidrolizado de proteína, debido a que es un requisito indispensable al ser utilizado en la industria alimentaria, la solubilidad depende de la fuente y del grado de hidrólisis del producto, y se genera debido a la reducción de peso molecular y el aumento de grupos polares en el medio

3.7.2 SABOR AMARGO

Generalmente después de realizada la hidrólisis algunos péptidos pueden conducir a sabor amargo, o realzar este sabor respecto a la proteína nativa.

3.7.3 EMULSIÓN Y ESPUMA

Los hidrolizados de proteínas poseen propiedades funcionales muy importantes en diferentes campos, una de estas propiedades es la capacidad de formar espuma y emulsiones, esta última consiste en un sistema de dos fases dada por dos líquidos, uno disperso en el otro, la formación de emulsiones es una característica que presentan algunas proteínas debido a la composición aminoácidos, por otra parte la formación de espuma está relacionada con la dispersión de gas en una fase generalmente líquida, para que una proteína tenga una buena capacidad de espumado debe ser altamente soluble y flexible. Estas características son muchas veces valor agregado al compararlo con la materia prima, siendo de total importancia en la industria alimentaria y se han ido mejorando a través de optimización de métodos y el uso de nuevas enzimas.

3.8 DIGESTIBILIDAD

La digestibilidad es el principal factor a tener en cuenta cuando se habla de la calidad de un alimento, debido a que esta representa la biodisponibilidad de los nutrientes en los alimentos, algunos factores que afectan la digestibilidad de las proteínas son: estructura,

tratamientos con calor y anti nutricionales. Existen varios métodos para medir la digestibilidad de un alimento, métodos *in vitro* e *in vivo*. Cada uno con sus respectivas variaciones, complicaciones y ventajas, como son: el lograr simular de forma precisa reacciones bioquímicas que ocurren en los seres vivos, así como el seguimiento a la misma.

4 METODOLOGÍA

4.1 OBTENCIÓN DE LA SEMILLA

La semilla de Guandul seca y su respectiva clasificación se aportó por agricultores del corregimiento la Carbonera, ubicado en la parte sur del departamento del Cauca, en la vía que de Popayán conduce al municipio de Bolívar. Estos cultivos hacen parte de proyectos de alimentación infantil de la gobernación del Cauca que se encuentran en desarrollo. La tabla 1, contiene la información de las semillas de Guandul utilizadas en este trabajo.

4.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LA SEMILLA DE GUANDUL

Las semillas de Guandul fueron seleccionadas manualmente, descartando aquellas en mal estado.

4.3 MOLIENDA DE LA SEMILLA

La semilla de Guandul se llevó a molienda en un molino mecánico, hasta obtener harina de textura fina, la cual se pasó por un tamiz con un número de malla diez. En cada análisis se llevó a cabo el método de cuarteo con el fin tener una muestra homogénea y representativa.

4.4 ANÁLISIS PROXIMAL DE LA HARINA

El análisis próximo de la semilla de Guandul se llevó a cabo empleando los métodos descritos en la siguiente tabla:

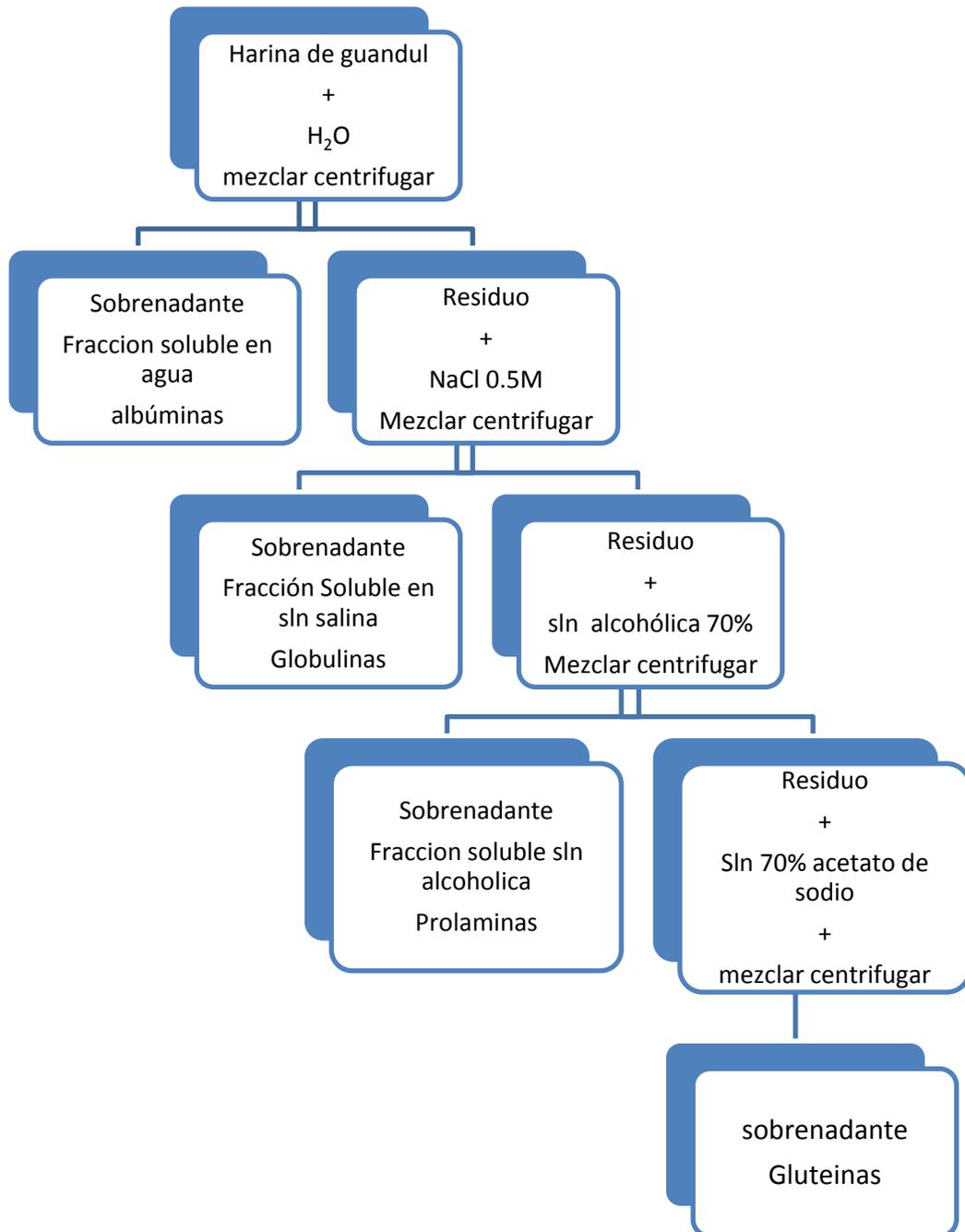
Tabla 3. Análisis proximal de la semilla de Guandul:

DETERMINACIÓN	DESCRIPCIÓN	MÉTODO
Humedad	Deshidratación a 100 – 105 °C en estufa a presión constante hasta peso constante	AOAC 950.43
Ceniza	Calcinación a 550 °C por 4 horas	AOAC 920.153
Extracto etéreo	Extracción Soxhlet por 4 horas	AOAC 991.36
Proteína bruta	Kjeldahl: Digestión ácida y destilación de nitrógeno (N x 6,25)	AOAC 968.06
Fibra bruta	Weende: Digestión ácido-base y calcinación	AOAC 962.09
Extracto no nitrogenado (ENN)	Por diferencia	

4.5 EXTRACCIÓN DE LAS FASES PROTEICAS DE LA HARINA DE GUANDUL

Con el fin de determinar el contenido de α -aminoácidos libres en la proteína nativa, se realizó la extracción de las diferentes fases proteicas presentes en la harina de Guandul, de acuerdo la siguiente figura:

Figura 3. Extracción de Proteínas de la Harina de Guandul



4.6 ENZIMA

En el presente trabajo se empleó Neutrasa® 0.8 L E.C. 3.4.24.28 de Novozymes, con una actividad de 0.8 UA/g (UA: Unidades Anson). Producidas por *Bacillus amyloliquefaciens*. Su temperatura óptima de actividad está entre 40 y 60 °C, el pH entre 6 y 8, actúa sobre el carbono terminal de fenilalanina, leucina y valina. La elección de este preparado se debió a su mayor eficiencia en reacciones de hidrólisis, que otros tipos de proteasas. Se puede emplear cuando se requiere hidrolizar las proteínas a péptidos de forma moderada o extensiva. Se utiliza para mejorar las propiedades funcionales, nutricionales y saborizantes de las proteínas.

4.7 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS

La optimización de las condiciones de hidrólisis se realizó mediante el empleo de la metodología de superficie de respuesta (RSM) con un diseño factorial completamente al azar (CRFD), mediante la generación de la factorial Diseño (4 factores, 1 bloque, tabla 4) generados usando el software Statgraphics® (STSC Inc. Rockville, Md, USA, versión plus 5.1) (tabla6). Los cuatro factores diferentes (pH, temperatura, tiempo y la relación sustrato/enzima) se emplearon a tres niveles equidistantes (-1, 0 y +1). El grado de hidrólisis (GH %) se empleó como la variable respuesta (Y).

Tabla 4: Datos de la base del diseño experimental planteado

Número de factores experimentales	4
Número de bloques	1
Número de residuos	1
Número de ejecuciones	18
Error Grados de libertad	3
Aleatorizado	Si

Tabla 5: Factores del diseño experimental.

Factor	Valor Máximo	Valor Mínimo
pH	6	8
Temperatura	40 °C	60 °C
Relación de concentración Enzima/sustrato	0.5%(w/w)	1.5%(w/w)
Tiempo	60 min	120 min

El diseño experimental generado por Statgraphisc 5.1 se muestra en el tabla 6.

Tabla 6: Diseño experimental.

Experimento No	Temperatura	pH	[E/S]	Tiempo (min)
1	50,0	7,0	1,8	90,0
2	40,0	6,0	0,5	60,0
3	50,0	7,0	1,0	90,0
4	33,2	7,0	1,0	90,0
5	50,0	8,7	1,0	90,0
6	66,8	7,0	1,0	90,0
7	50,0	5,3	1,0	90,0
8	50,0	7,0	1,0	39,5
9	60,0	8,0	1,5	60,0
10	40,0	8,0	1,5	120,0
11	50,0	7,0	0,2	90,0
12	60,0	8,0	0,5	60,0
13	40,0	8,0	0,5	120,0
14	40,0	6,0	1,5	60,0
15	60,0	6,0	1,5	120,0
16	60,0	6,0	0,5	120,0
17	50,0	7,0	1,0	90,0
18	50,0	7,0	1,0	140,5

4.7.1 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Las reacciones de hidrólisis enzimáticas de semillas de Guandul se realizaron en un reactor del programa de ingeniería Agroindustrial y ubicado en sus laboratorios (Centricol, Colombia, con capacidad para 20 litros), el cual posee control automático de temperatura y velocidad de agitación. Los experimentos se realizaron de acuerdo a la tabla 8, para ello se pesaron 100 g de muestra, 21.79 % (w/w) de proteína cruda (Nx6.25) y la cantidad de enzima correspondiente a la relación [E/S] de cada experimento, se adicionó 1000 mL de agua y el sustrato al reactor, posteriormente se dio inicio a la reacción mediante la adición de enzima, una vez la temperatura y pH alcanzaron los valores establecidos. Con el fin de obtener el valor óptimo de actividad enzimática, el pH se controló automáticamente con adición de una solución de NaOH 1N. Se determinó, el volumen final de NaOH necesario para mantener el pH constante con el fin de calcular el grado de hidrólisis por medio del método de pH estático. En todas las reacciones enzimáticas planteadas se llevó a cabo la desactivación de la enzima por medio de calentamiento a 90 °C por un tiempo de 20 minutos. El producto obtenido se centrifugación a 5000 rpm y a una temperatura de 4 °C, con el fin de separar el sobrenadante de los residuos sólidos que puedan a quedar. El

hidrolizado se precipitó con ácido tricloroacético, separando nuevamente por centrifugación en iguales condiciones. La proteína hidrolizada se resuspendió en agua desionizada y se llevó a liofilización, finalmente se almacenó a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se realizaron experimentos de control sin la adición de enzima.



Figura 4. Bioreactor usado para la Hidrólisis enzimática.

4.8 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

El grado de hidrólisis o GH se determinó en cada experimento utilizando el método de ortoparafenilaldehído o método de OPA.

4.8.1 METODO DE OPA

El método de OPA consiste en hacer reaccionar los α -aminoácidos de las cadenas peptídicas con el reactivo de ortoparafenilaldehído en presencia de mercaptoetanol y condiciones alcalinas generando derivados o compuestos con máximo de absorbancia de 340nm. Para determinar la concentración de las muestras se realizó el método de curva de calibración, para ello se prepararon patrones de leucina de diferente concentración entre 6 y 21 ppm, a los cuales se les adicionó el reactivo de OPA y se leyeron en UV-vis (Ultravioleta-visible, Génesis thermo electron corporation) a un longitud de onda de 341 nm.

Una vez obtenida la concentración de leucina en cada uno de los 18 experimentos, se realizó la extracción de la proteína sin hidrolizar de la semilla de Guandul y se determinaron los miliequivalentes de leucina en la misma (apartado 4.5). El grado de hidrólisis se determinó de acuerdo a la siguiente formula:

$$DH = \frac{h}{h_0} * 100 \quad \text{ECUACIÓN 1}$$

Donde h es el total de miliequivalentes de leucina en la muestra hidrolizada y h₀ la cantidad de miliequivalentes de leucina en la muestra sin hidrolizar.

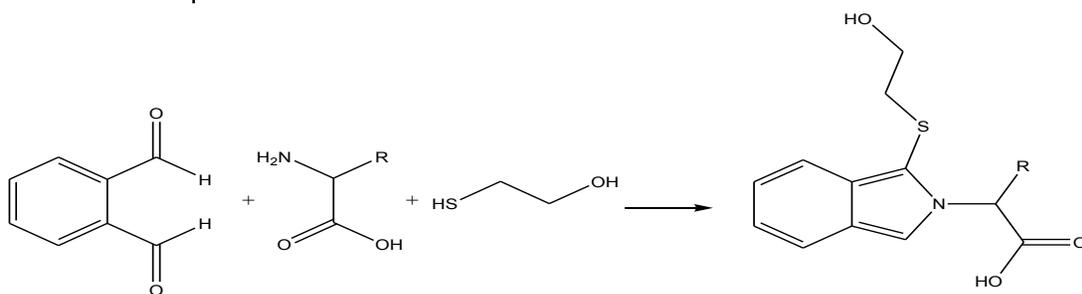


Figura 5: Reacción de ortoparafenilaldehído y aminoácidos libres en presencia de mercaptoetanol.

4.9 RECUPERACIÓN DE NITRÓGENO (RN)

La NR se usó como un índice de la solubilización del nitrógeno, con el fin de la producción de la hidrólisis. Después de la hidrólisis enzimática, se separaron la fracción soluble de la fracción insoluble centrifugando a 5000 rpm durante 15 minutos. Se determinó el nitrógeno total en las dos fracciones por el método de Kjeldhal, (AOAC, 2005). La RN se calculará según Benkajul and Morrissey [10] por medio de la ecuación 2:

$$\%RN = \left(\frac{\%NT}{\%NH} \right) * 100 \quad \text{ECUACIÓN 2}$$

Donde NT es el nitrógeno total en el sobrenadante y NH el nitrógeno en el hidrolizado.

4.10 PROPIEDADES TECNOLÓGICAS

4.10.1 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE SOLUBILIDAD DEL HIDROLIZADO DE PROTEÍNA

El índice de solubilidad de la proteína, se realizó preparando soluciones de hidrolizado en un rango de pH entre 2 y 12, posteriormente graficando el porcentaje de proteína disuelta versus el pH.

4.10.2 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD EMULSIFICANTE (EC) Y ESTABILIDAD DE LA EMULSIÓN (ES)

La actividad emulsificante del hidrolizado de proteínas se determinó empleando el método turbidimétrico (Kong) [12], con pequeñas modificaciones. Se prepararon emulsiones, en un mezclador a 5000 rpm por 90 segundos y a 20 °C. Se homogenizaron 9 mL de aceite de oliva virgen y 21 mL de solución de la proteína hidrolizada al 0.2% (pH 7.0). En tiempos de 0 y 30 minutos, se tomaron 50 µL de emulsión de la parte superior y se realizó una dilución con 5 ml de solución de dodecil sulfato de sodio (SDS al 0.1%). Se determinó la absorbancia de las emulsiones diluidas (500 nm) y el resultado se indica como una turbiedad. La actividad emulsificante se determinó de la medición de absorbancia inmediatamente después de la formación de la emulsión. La estabilidad de la emulsión (ES) se expresó como el valor de la diferencia de absorbancia entre 0 y 30 minutos.

4.10.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ESPUMANTE (FC) Y DE LA ESTABILIDAD DE LA ESPUMA (FS)

La capacidad espumante se evaluó con pequeñas modificaciones al método descrito por Kong [12]. 50 mL de solución acuosa al 5% del hidrolizado de proteína se homogenizaron a 5000 rpm durante 90 segundos en una probeta de 250 mL. FC se calculó como el porcentaje de incremento en el volumen de la dispersión proteica después de la mezcla. FS se calculó como la disminución en el volumen de la espuma como una función de tiempo en un período de 1 hora.

4.11 DIGESTIBILIDAD

4.11.1 DIGESTIBILIDAD *in vitro* DELA SEMILLA DE GUANDUL

La digestibilidad *in vitro* de las proteínas nativas presentes en semillas de Guandul se determinó modificando el método descrito por Yagoub et al. (2004), 300 mg de hidrolizado se colocaron en 30 mL de una solución de HCl (0.1 N), con 3 mg de pepsina (E.C. 3.4.23.1; 1:10.000, 1750 U mg⁻¹ proteína; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA.). Se llevó a incubación a 37 °C durante 3 horas, luego se ajustó el pH de la mezcla hasta 7.5 a 8.0 empleando NaOH 0.2 N. Se adicionó una solución de buffer fosfato (7.5 mL, pH 7.4) que contiene, 4 mg de pancreatina (Sigma, No. P1750), 1 mM CaCl₂ y 0.01% NaN₃. Para asegurar la digestión, se incubó a 37 °C durante 24 horas. La proteína sin digerir se precipitó con ácido tricloroacético al 30 % y se separó por filtración al vacío sobre papel filtro cuantitativo (Whatman no. 41). Se efectuó un blanco a las mismas condiciones, sin adicionar proteína hidrolizada. La cantidad de proteína sin digerir se determinó por el método Dumas y la digestibilidad se calculó con la ecuación 3:

$$(\%) \text{ Digestibilidad} = \frac{\text{Proteína no digerida}}{\text{Proteína total en la muestra}} \times 100 \quad \text{ECUACIÓN 3}$$

4.11.2 DIGESTIBILIDAD *in vitro* DEL HIDROLIZADO

La digestibilidad *in vitro* de las proteínas hidrolizadas de semillas de Guandul se determinó modificando el método descrito por Yagoub et al. (2004), 300 mg de hidrolizado se colocaron en 30 mL de una solución de HCl (0.1 N), con 3 mg de pepsina (E.C. 3.4.23.1; 1:10.000, 1750 U mg⁻¹ proteína; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA.). Se llevó a incubación a 37 °C durante 3 horas, luego se ajustó el pH de la mezcla hasta 7.5 a 8.0 empleando NaOH 0.2 N. Se adicionó una solución de buffer fosfato (7.5 mL, pH 7.4) que contiene, 4 mg de pancreatina (Sigma, No. P1750), 1 mM CaCl₂ y 0.01% NaN₃. Para asegurar la digestión, se incubó a 37 °C durante 24 horas. La proteína que sin digerir se precipitó con ácido tricloroacético al 30 % y se separó por filtración al vacío sobre papel filtro cuantitativo (Whatman no. 41). Se efectuó un blanco a las mismas condiciones, sin adicionar proteína hidrolizada. La cantidad de proteína sin digerir se determinó por el método Dumas y la digestibilidad se calculó con la ecuación 3.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 OBTENCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA SEMILLA DE GUANDUL

La semilla de Guandul seca, fue aportada por agricultores del corregimiento la carbonera del municipio de Bolívar Cauca, esta semilla es utilizada como base para la alimentación infantil de diferentes corregimientos del departamento. Una vez obtenida la semilla se realizó una selección de los granos que se encontraran en estado deteriorado, en descomposición o presentaran gorgojos, finalmente la semilla de Guandul seleccionada se molió en un molino metálico corona y se obtuvo la harina. En la siguientes figuras se muestran las características físicas de la semilla de Guandul, como se puede notar estas presentan un color crema, algunas de ellas tienen manchas oscura esto debido a la variedad del Guandul (variedad pinto Villalba), su forma es esférica y presentan un diámetro aproximado de 5mm.



Figura 6. Semilla de Guandul



Figura 7. Selección en mal estado.



Figura 8. Molienda de la semilla.



Figura 9. Harina de Guandul.

5.2 ANÁLISIS DE LA SEMILLA DE GUANDUL

Según los resultados obtenidos en el análisis próximo (ver tabla 7), la semilla de Guandul se encuentra compuesta principalmente por carbohidratos (63.0%), además contiene una alta cantidad de proteína (22.6%) lo cual hace del Guandul un alimento altamente nutritivo, utilizado en diferentes partes del mundo para alimentación infantil, por otra parte el contenido de fibra y otros elementos, hacen que el Guandul no solo contribuya en la nutrición, sino que también ayude en la digestión y metabolismo de los seres vivos.

Los resultados del análisis próximo muestran que el Guandul es altamente comparable con otras semillas, como lo son la lenteja y la soja, leguminosas se encuentra en los primeros puestos de semillas nutritivas, las ventajas que ofrece la semilla de Guandul sobre las demás, es la poca cantidad de fertilizantes y cuidado que necesita la planta para su desarrollo.

Tabla 7. Composición proximal de la semilla de Guandul en base seca.

DETERMINACIÓN	CONTENIDO %
CENIZA	4.0
PROTEINA	22.6
GRASA	3.9
FIBRA	6.5
CARBOHIDRATOS	63.0

5.3 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS

Para optimizar los factores de pH, temperatura, relación de concentración enzima/sustrato y tiempo se realizaron los experimentos planteados en la tabla número 7, estos experimentos se realizaron en el bioreactor del laboratorio de biotecnología de la facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca, el cual contaba con un sistema de manejo de variables a través de software.

Las reacciones de hidrólisis se efectuaron en medio acuoso, para ello se adicionó 1 litro de agua en el reactor, una vez alcanzada la temperatura se agregó 100 g de harina de Guandul y la cantidad de enzima correspondiente. Al finalizar la reacción se separó el residuo sólido del líquido y se procedió a inactivar la enzima a 90 °C en los dos medios. Los residuos líquidos presentaban una coloración amarillenta en algunos casos, y color crema en otros, esto debido al aumento de solubilidad de las proteínas por efecto de la hidrólisis, y a las diferentes condiciones de hidrolisis en cada reacción. En los residuos líquidos se encuentran los péptidos hidrolizados, además de proteína soluble en esta fase, o que por la acción de hidrólisis llegó a solubilizarse. Cada muestra líquida se guardó en frascos y se llevó a refrigeración. El sólido se llevó a sequedad y se almacenaron en bolsas plásticas, ambas fases se almacenaron para los posteriores análisis.



Figura 10. Hidrolizado líquido



Figura 11. Residuo sólido de la hidrólisis.

5.3.1 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

Para determinar el grado de hidrólisis en cada experimento se realizó el método de Nielsen, conocido como método de OPA.

Se determinó la concentración de leucina en los 18 experimentos por medio de curva de calibración, para ello se prepararon patrones de leucina a diferentes concentraciones, se hicieron reaccionar con ortoparafenilaldehído y se leyeron en Uv-vis a 341 nm como se muestra en la tabla 8. Se graficó la concentración de los patrones versus la absorbancia, obteniendo una curva con un coeficiente de regresión de 0.992, como se muestra en la figura 12. Se llevó acabo el mismo procedimiento para las 18 muestras y se calculó la concentración de leucina remplazando la absorbancia de cada muestra en la ecuación de la curva de calibración, posteriormente se calculó los miliequivalentes de leucina en cada experimento, descritos en la tabla 6. Una vez obtenida la concentración de leucina en cada uno de los 18 experimentos realizados, se hizo la extracción de la proteína sin hidrolizar de la semilla de Guandul y se determinaron los miliequivalentes de leucina en la misma, ver tabla 10. El grado de hidrólisis se determinó de acuerdo a la ecuación 4:

$$GH = \frac{h}{h_0} * 100 \text{ ECUACIÓN 4}$$

Donde h es el total de miliequivalentes de leucina en la muestra hidrolizada y h_0 la cantidad de miliequivalentes de leucina en la muestra sin hidrolizar.

Tabla 8: Concentración y absorbancia de los patrones de leucina a 341 nm.

ppm	Abs ₁	Abs ₂	\bar{A}	Desv
0	0	0	0,000	0
6	0,308	0,306	0,307	2,6 E-06
9	0,431	0,430	0,430	6,6 E-07
12	0,571	0,570	0,570	6,6 E-07
15	0,719	0,718	0,718	2.0 E-7
21	0,983	0,982	0,982	6,7 E-07

Figura 12. Curva de calibración, método de OPA.

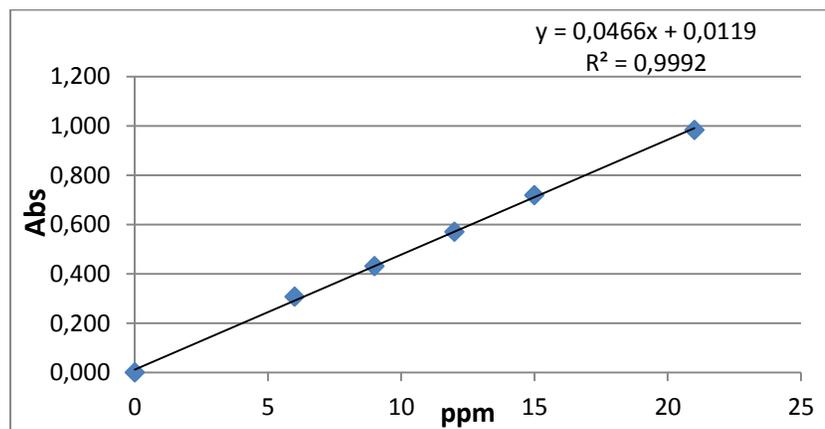


Tabla 9: cantidad de α -leucina en cada hidrolizado

Experimento No	mg Leu total	meq-leu en 100g
1	42,2	0,06
2	22,9	0,03
3	42,1	0,06
4	29,4	0,04
5	26,0	0,04
6	33,4	0,05
7	23,6	0,04
8	20,6	0,03
9	27,8	0,04
10	29,5	0,04
11	30,6	0,05
12	28,5	0,04
13	24,8	0,04
14	26,3	0,04
15	30,7	0,05
16	22,2	0,03
17	42,0	0,06
18	47,9	0,07
Blanco	17,3	0,03

Tabla 10. Concentración de α -leucina en la proteína nativa de Guandul.

Tipo de Proteína	Miliequivalentes en 100g de harina
Globulinas	0,091
Albúminas	0,113
Gluteinas	0,077
Prolamidas	0,075
α -leucinaTotales	0,356

Tabla 11. Grado de hidrólisis para los 18 experimentos son los siguientes:

Experimento No	Temperatura	pH	[E/S]	Tiempo (min)	GH
1	50,0	7,0	1,8	90,0	9,0
2	40,0	6,0	0,5	60,0	4,9
3	50,0	7,0	1,0	90,0	9,0
4	33,2	7,0	1,0	90,0	6,3
5	50,0	8,7	1,0	90,0	5,6
6	66,8	7,0	1,0	90,0	7,2
7	50,0	5,3	1,0	90,0	5,1
8	50,0	7,0	1,0	39,5	4,4
9	60,0	8,0	1,5	60,0	6,0
10	40,0	8,0	1,5	120,0	6,3
11	50,0	7,0	0,2	90,0	6,5
12	60,0	8,0	0,5	60,0	6,1
13	40,0	8,0	0,5	120,0	5,3
14	40,0	6,0	1,5	60,0	5,6
15	60,0	6,0	1,5	120,0	6,6
16	60,0	6,0	0,5	120,0	4,8
17	50,0	7,0	1,0	90,0	9,0
18	50,0	7,0	1,0	140,5	10,3

El grado de hidrolisis en los 18 experimentos se encuentra en el rango de 4.4-10.3%, donde se puede observar el mayor grado de hidrólisis en experimento número 18, el cual presenta valores medios para el pH, temperatura y relación de concentración enzima /sustrato, y un tiempo de 140.5 minutos, con lo que se deduce que el tiempo es uno de los factores más influyentes en la reacción de hidrólisis, lo cual se puede confirmar al observar la condiciones del experimento número 8, donde presenta un tiempo de aproximadamente 40 minutos y un grado de hidrólisis de 4.4% el cual es el más bajo de todos los experimentos.

5.3.2 VALORES ÓPTIMOS PARA EL PROCESO DE HIDRÓLISIS

El análisis del diseño experimental por medio del Statgraphics 5.1, con un intervalo de confianza del 95.6%, y un error máximo permisible del 4.4%, indica que los valores de los factores óptimos para lograr el mayor grado de hidrolisis se encuentran dentro del rango previamente estipulado (tabla 5), a excepción del tiempo de hidrólisis, sin embargo este valor se encuentra dentro de los datos generados por el diseño experimental, debido a que este otorga puntos por encima y por debajo de los rangos estipulados en cada factor,

estos puntos son conocidos como puntos estrella, esto con el fin de determinar el comportamiento de la respuesta por fuera de los valores establecidos, en el caso del tiempo su punto estrella es de 140.5 minutos logrando cobijar el tiempo óptimo presentado en la tabla 12 el cual es de 136.8 min.

Tabla 12. Valores óptimos para obtener el mayor grado de hidrólisis 12.6%.

Factor	Inferior	Mayor	Óptimo
Temperatura	33,2	66,8	53 °C
pH	5,3	8,7	7,2
[E/S]	0,16	1,8	1,5
Tiempo	39,5	140,4	136,8 min

5.3.3 ANÁLISIS DE PARETO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

En la siguiente imagen se muestra el diagrama de Pareto estandarizado para el diseño experimental planteado, donde se observa la influencia de los diferentes factores como lo son el pH, la relación de concentración enzima/sustrato, tiempo y temperatura, sobre nuestra respuesta, en nuestro caso el grado de hidrólisis de las proteína presentes en la semilla de Guandul. La gráfica de pareto nos da el análisis de la varianza y la influencia de cada uno de los factores en su respectivo orden de importancia (de arriba hacia abajo), además se observa que algunos factores se encuentran con color rojo y un signo negativo, esto significa que este factor influye de forma inversa con nuestra variable de respuesta, los factores que se encuentran con color rosado y poseen un signo positivo influyen de forma directamente proporcional con nuestra variable de respuesta. En la imagen se observa una línea azul, que cruza la gráfica de forma vertical, la ubicación de esta depende del intervalo de confianza del diseño (95.6%), y nos indica que todo efecto que sobrepase esta línea afectará de forma considerable el proceso de hidrólisis. El factor que más afecta el grado de hidrólisis es la doble interacción del pH, el Pareto lo presenta en color rojo y acompañado de un signo negativo lo que demuestra que cualquier cambio en el pH va a incidir de forma inversa con el grado de hidrólisis, esto se debe a que las enzimas son altamente susceptibles a los cambios de pH, afectando su estructura y por tanto su sitio activo, logrando un disminución de afinidad entre esta y el sustrato. Uno de los factores que favorecen el proceso de hidrólisis, es el tiempo este se muestra en el Pareto de color rosado y acompañado de un signo positivo, por lo cual se deduce que un cambio en el tiempo de reacción lograría un aumento en el grado de hidrólisis, por otro lado se encuentra la relación de concentración enzima sustrato, la cual tiene un efecto directo a la respuesta, esto se puede deber a que la enzima utilizada en cada experimento logra hidrolizar la proteína presente en la semilla en un mayor porcentaje a medida que la cantidad de enzima aumenta, por último, el gráfico muestra que la temperatura es un

efecto que tiene poca influencia sobre el proceso de hidrólisis, debido a que se encuentra en el la parte inferior de la gráfica muy cercana a la línea vertical, esto se debe a que se utilizó un complejo enzimático que trabaja a un amplio rango de temperatura [27].

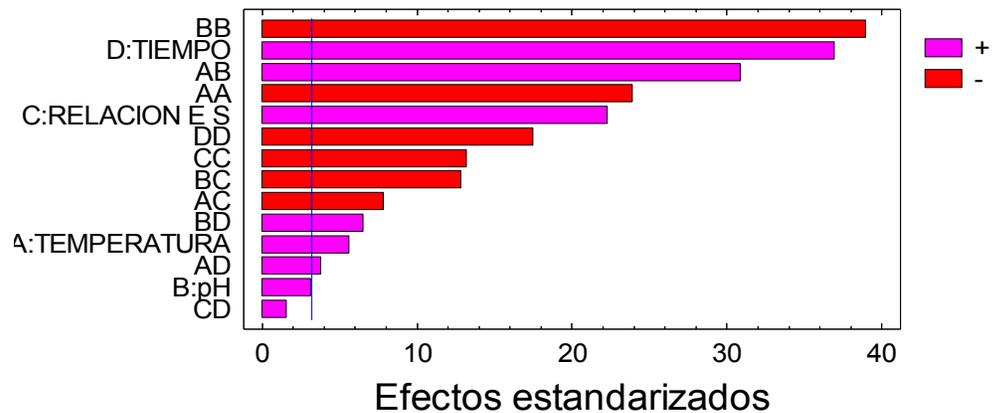


Figura 13. Gráfico de Pareto estandarizado para el GH.

5.3.4 EFECTOS PRINCIPALES SOBRE EL GRADO DE HIDRÓLISIS

El análisis de la siguiente figura muestra una idea independiente y cualitativa del efecto de los cuatro factores sobre la respuesta (grado de hidrólisis GH), determinado que a medida que aumenta la temperatura el grado de hidrólisis incrementa su valor, hasta un momento máximo donde encontramos el mayor grado de hidrólisis, posteriormente la línea comienza a descender, esto se debe a que la temperatura influye de gran forma en la actividad enzimática, logrando un incremento de la misma cuando se alcanza la temperatura óptima de la enzima, y un descenso cuando la temperatura comienza a desnaturalizarla. Otro factor que se observa en la gráfica es el pH, el cual tiene un efecto similar a la de la temperatura, teniendo un punto máximo donde se logra el mayor grado de hidrólisis, debido a que las enzimas son proteínas y su estructura contiene cargas que afectan su estructura, un cambio en el pH significa un cambio estructural de la proteína, afectando el sitio activo y obviamente la reacción de hidrólisis. La relación de concentración de la enzima respecto al sustrato también se optimizó, la gráfica nos muestra que a medida que se aumenta la cantidad de enzima aumenta el grado de hidrólisis, debido a que una mayor cantidad de enzima logrará romper de forma más rápida y en mayor grado la proteína presente en la semilla de Guandul. Por último se observa el tiempo, esta gráfica muestra que el tiempo es uno de los factores que más influyen, el grado de hidrólisis aumenta de forma significativa a medida que se incrementa el tiempo, la línea también muestra una tendencia a seguir aumentando, mostrando así que el tiempo

empleado para los experimentos no es el necesario para obtener el mayor grado de hidrólisis, por lo que se decidió realizar nuevos experimentos.

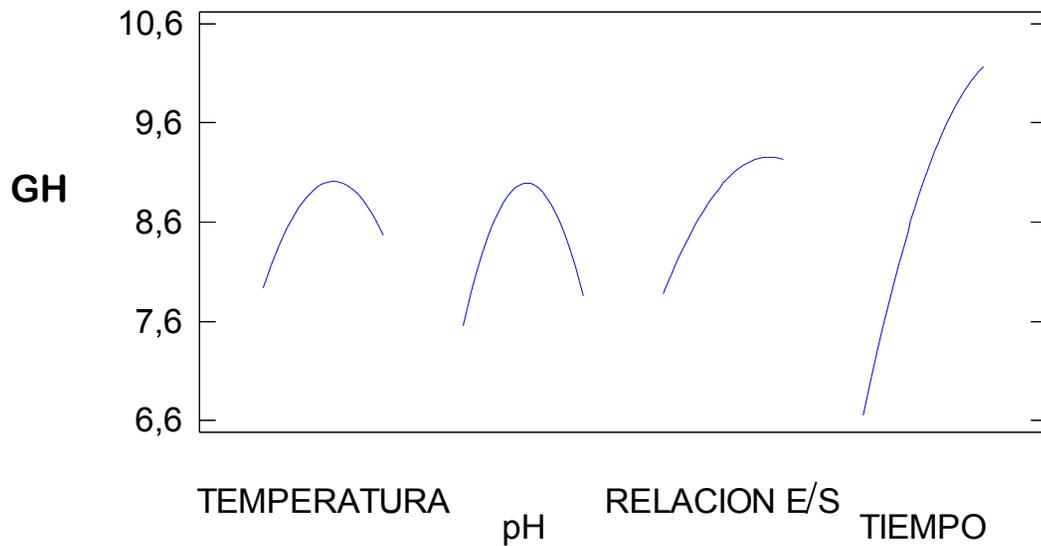


Figura 14. Gráfico de efectos principales para el GH

5.3.5 GRAFICAS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

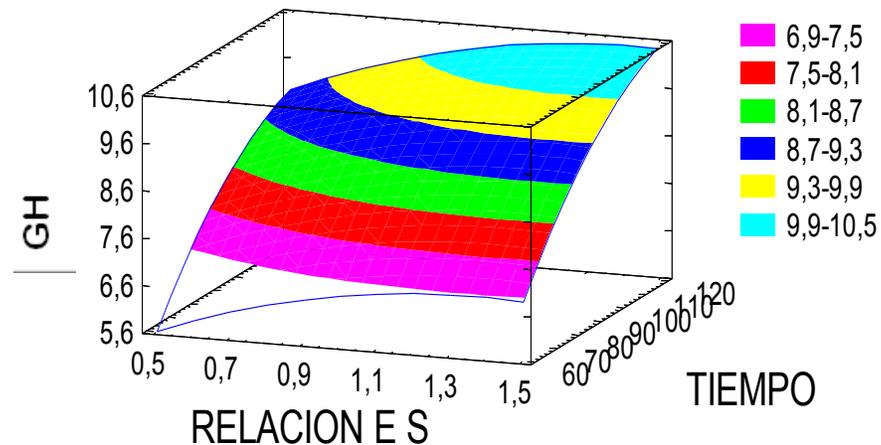


Figura 15. Gráfico de Superficie de Respuesta, Valores de pH y temperatura óptimos.

En la gráfica de superficie de respuesta se muestran los diferentes contornos, cada uno representa un valor de grado de hidrólisis, pronosticado por el modelo experimental, en la superficie de respuesta se observa como el valor de los factores afectan el grado de

hidrólisis, y como la respuesta cambia a media que variamos el rango tanto de pH, como temperatura, la superficie muestra una forma de campana sin curvas pronunciadas y con un valor máximo de GH entre 9.9-10.5.

5.3.6 EXPERIMENTOS OPTIMIZADOS

Con el fin de determinar los valores óptimos de hidrólisis arrojados por el diseño, se realizaron nuevos experimentos, uno de ellos con las condiciones óptimas para la hidrólisis y dos más con tiempos prolongados de 160 y 180 minutos. esto debido al análisis realizado sobre el grafico 14, donde se observa claramente que el tiempo asciende sin tener un tope o limite, por ende es de gran importancia obtener el mejor valor del tiempo para la reacción.

Tabla 13. Condiciones óptimas a diferentes tiempos

Experimento	Tiempo	DH
1	140	10,7
2	160	10,9
3	180	10,9

La tabla número 13 muestra los tres experimentos realizados, el numero 1 corresponde a la reacción de hidrólisis, con factores de pH, tiempo, temperatura y relación enzima/sustrato óptimos, logrando alcanzar un grado de hidrolisis de 10.7 %, valor que se encuentra por encima de los encontrados en los experimentos del diseño experimental. Los demás experimentos (2 y 3) muestran grados de hidrolisis del 10.9%, con un mayor tiempo, 160 y 180 minutos respectivamente, observando que el mayor grado de hidrólisis lo encontramos en 160 minutos, posterior a este tiempo el GH no aumenta, esto se debe a que la harina de Guandul se encuentra con un mayor tiempo de agitación y temperatura, logrando liberar proteínas ligada a carbohidratos y otras sustancia.

5.4 CINÉTICA DE LA REACCIÓN

La curva de grado de hidrólisis contra el tiempo presenta una forma característica, la hidrolisis se llevó a cabo en condiciones óptimas y la gráfica muestra una velocidad inicial baja esto debido a que la proteína no se encuentra totalmente libre y puede está ligada a otras sustancias, por otro lado se observa que a medida que transcurre el tiempo, la velocidad disminuye gradualmente, lo que se entiende como la máxima conversión de sustrato que puede lograr la enzima. La forma que presenta la gráfica 16 responde aparentemente a un mecanismo de hidrólisis de primer orden debido al ataque de la

enzima a la estructura terciaria de la proteína, correspondiendo a una curva de Michelis-Menten.

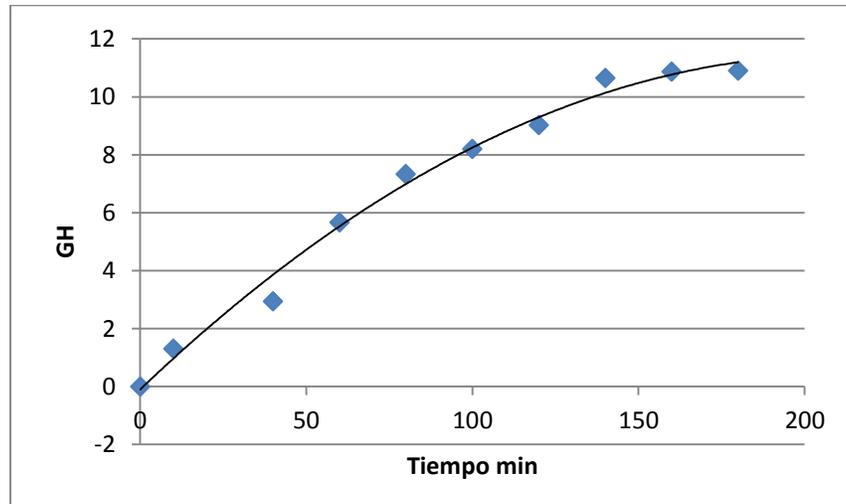


Figura 16: Grado de hidrólisis respecto al tiempo (condiciones óptimas).

5.5 RECUPERACIÓN DE NITRÓGENO (RN)

Con el fin de determinar la cantidad de nitrógeno que pasa a la fase líquida debido a la hidrólisis enzimática de la proteína de las semillas de Guandul, se determinó el porcentaje de nitrógeno, los resultados (Tabla 14) muestran que experimentos número 6, 13 y 17 presentan mayor cantidad de nitrógeno a la fase líquida, esto no se presenta como una medida de hidrólisis, debido a que efectos como la temperatura y agitación pueden lograr el paso de proteína al medio acuoso, pero si sirve para determinar las condiciones para obtener hidrolizados con una alta cantidad de nitrógeno.

Tabla 14. Porcentaje de Nitrógeno recuperado en cada experimento.

Muestra	%NR	GH
Exp 1	5,8	9,0
Exp 2	4,3	4,9
Exp 3	6.0	9,0
Exp 4	5,3	6,3
Exp 5	5,3	5,6
Exp 6	8,0	7,2
Exp 7	2,1	5,1
Exp 8	1,3	4,4
Exp 9	4,7	6,0
Exp 10	4.0	6,3
Exp 11	5,2	6,5
Exp 12	5,8	6,1
Exp 13	8,6	5,3
Exp 14	4,6	5,6
Exp 15	3,7	6,6
Exp 16	2	4,8
Exp 17	6,2	9,0
Exp 18	5,6	10,3

5.6 PROPIEDADES TECNOFUNCIONALES

Las propiedades funcionales están definidas como cualquier propiedad física o química realizada en polímeros que afectan y modifican determinadas características de un alimento, así como a la calidad del mismo, ente ellas se tienen: la capacidad de formar espuma, emulsificación, gelificación e hidratación. Las propiedades tecnofuncionales que se midieron a la mayoría de las muestras fueron determinación de la capacidad espumante y estabilidad de la espuma así como capacidad emulsificante y estabilidad de la emulsión, además de la solubilidad del hidrolizado a diferentes pH, los resultados muestran algunas diferencias importantes e interesantes.

5.6.1 PORCENTAJE DE SOLUBILIDAD

La solubilidad de las proteínas es el principal factor a tener en cuenta cuando se le va a dar utilidad a la misma, esta puede mejorar considerablemente la capacidad espumante y emulsificante de la proteína. La solubilidad de una proteína está directamente relacionada con el pH en el que se encuentre el solvente y a las características fisicoquímicas que

presenten sus aminoácidos, la mayoría de cadenas peptídicas muestran considerable solubilidad en medios altamente ácidos y básicos, poca solubilidad a pH neutro. Las muestras analizadas (Figura 17,18) presentan una alta solubilidad en medio acuoso a un pH de 2, siendo las muestras 18, 1 y 6, las que tienen una solubilidad entre 60 y 50%. La mayoría de las proteínas hidrolizadas de semilla de Guandul, presentan baja solubilidad en un rango de pH de 6-7, por lo que se presume se encuentren un su punto isoeléctrico, y este pH es el más óptimo para precipitarlas.

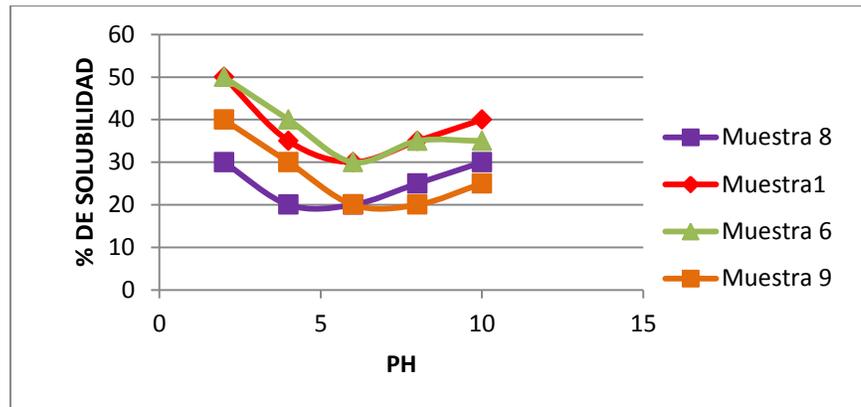


Figura 17. Porcentaje de solubilidad a diferente pH.

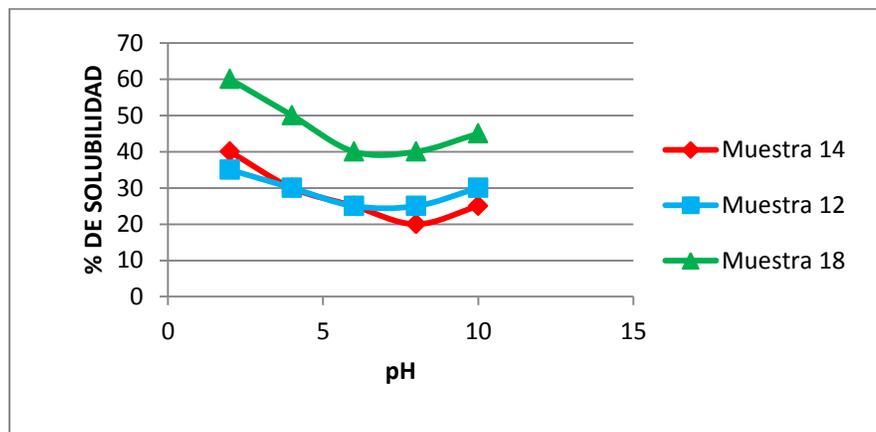


Figura 18. Porcentaje de solubilidad a diferente pH.

5.6.2 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ESPUMANTE (FC) Y DE LA ESTABILIDAD DE LA ESPUMA (FS)



Figura 19. Capacidad espumante de los hidrolizados.

Algunos alimentos procesados dentro de los que se encuentran los helados, crema batida y tortas son el resultado de sistemas espumosos, esta espuma es generada principalmente por las proteína presente en ellos o adicionadas como agentes tensoactivos, los cuales se encargan de la formación y estabilización de la fase dispersa gaseosa. En nuestro caso se determinó la capacidad espumante en algunas de las muestra hidrolizadas de semillas de Guandul, estas muestras se tomaron de acuerdo a su grado de hidrólisis y a la disponibilidad de hidrolizado para el análisis. Para ello se prepararon 50 mL de solución acuosa al 5% del hidrolizado de proteína se homogeneizarán a 5000 rpm durante 90 segundos en una probeta de 250 mL., se calculó como el porcentaje de incremento en el volumen de la dispersión proteica después de la mezcla, los resultados se muestran en las figuras 20 y 21, la estabilidad de la espuma se calculó como la disminución en el volumen de la espuma como una función de tiempo en un período de 1 hora, los resultados se muestran en las figuras 22 y 23.

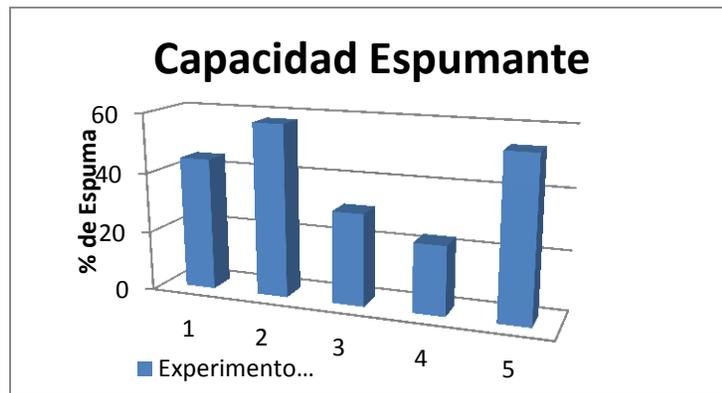


Figura 20. Porcentaje de espuma generado por cada hidrolizado

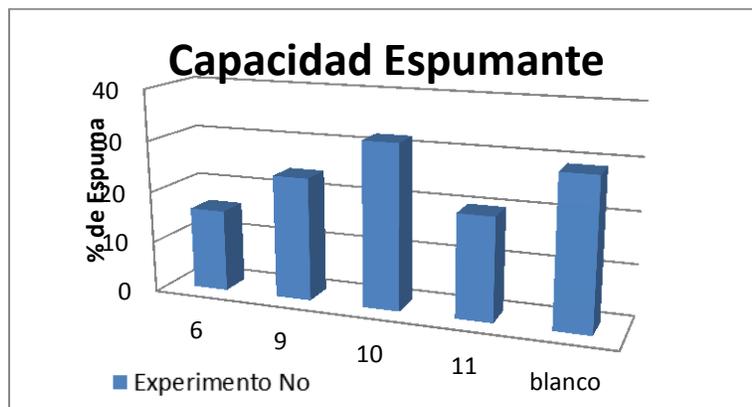


Figura 21. Porcentaje de espuma generado por cada hidrolizado

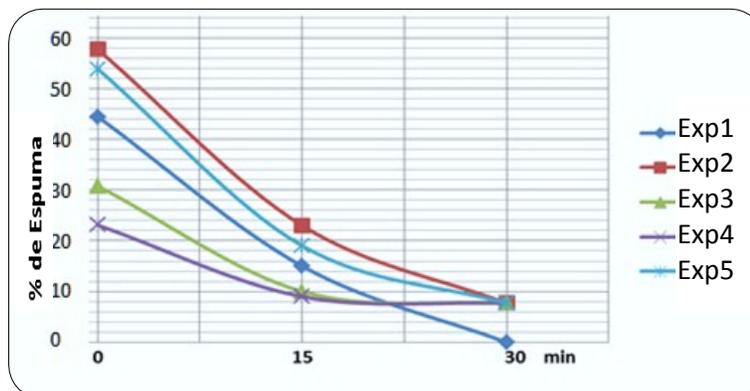


Figura 22. Estabilidad de la espuma en algunos hidrolizados

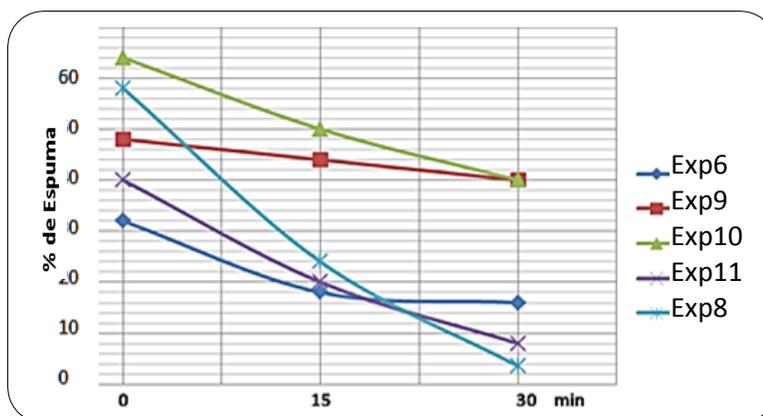


Figura 23. Estabilidad de la espuma en algunos hidrolizados

Los resultados muestran que los hidrolizados que mayor formación de espuma generaron son los de los experimentos 10, 2 y 5, este comportamiento se puede deber al tamaño molecular de estas fracciones proteicas, y a la presencia de proteína globulares, las cuales logra películas estables, con buena difusión y desdoblamiento, rebajando la tensión superficial, otro factor que afecta la formación de espuma es la solubilidad de la proteína, entre mayor sea el número de proteínas solubles, mayor capacidad tendrá el hidrolizado de formar espuma. Las otras muestras no presentan diferencia entre sí, todas tienen un bajo porcentaje en la formación espuma, esto se puede deber a la presencia de proteínas con alto peso molecular, disminuyendo la flexibilidad y capacidad de generar espuma, a pesar de esto se encuentra dificultad al intentar comparar la capacidad espumante de los hidrolizados, debido a que presentan factores de reacción diferentes, como temperatura pH, y cantidad de enzima, lo que puede afectar directamente la capacidad espumante de los mismos.

El análisis de la estabilidad de la espuma, mostro que la mayoría de las muestras analizadas presenta poca estabilidad de la espuma, esto debido a la formación de películas débiles y finas, produciendo burbujas inestables, con poca resistencia, lo que lleva a que el aire contenido en estas rompa la película líquida y se libere, un factor muy importante que se debe tener en cuenta es el tamaño de las burbujas generadas, ya que un gran tamaño aumentaría la tensión superficial hasta un punto donde la espuma comienza hacer inestable. Las muestras que presenta mayor estabilidad de la espuma son 9 y 10, las cuales logran que la espuma generada se mantenga con el tiempo en un buen porcentaje, esto se puede deber a que estos hidrolizados contienen proteínas solubles y que forman películas fuertes, logrando retener el aire dentro de las burbujas, sin embargo otros hidrolizados como los de soya presenta un porcentaje de formación y estabilidad de la espuma mucho mayor, por lo cual este no sería un propiedad a tener en cuenta al pensar en uso tecnofuncional [24, 25, 26].

5.6.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD EMULSIFICANTE (EC) Y ESTABILIDAD DE LA EMULSIÓN (ES)

La capacidad emulsificante de las proteínas es una propiedad que depende de la solubilidad de la misma, del tamaño y su composición química, estos factores afectan la tensión interfacial entre los compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos, logrando que exista una disminución o aumento de la disposición de las moléculas para actuar en la interface.

Los resultados muestran que los hidrolizados presentan en su mayoría una buena capacidad emulsificante, siendo el experimento número 6, el que tiene la mayor capacidad emulsificante, las condiciones de reacción de este experimento son: temperatura de 66.8 °C, un pH de 7.0, relación de enzima/sustrato de 1,0, en un tiempo de 90 minutos, estas condiciones lograron obtener péptidos que poseen un conformación adecuada, así como un buena disponibilidad de aminoácidos, con forma y peso molecular apropiados para generar un buena emulsión.

La actividad emulsificante corrobora la capacidad que tiene las proteínas hidrolizadas de semillas de Guandul, como era de esperarse la muestra número 6, es la que contiene la mayor actividad a la hora de formar una emulsión, al ser comparado con otro tipo de hidrolizados la muestras presenta mayor capacidad y actividad emulsificante que



proteínas hidrolizadas a partir de pescado [30,31].

Figura 24. Determinación capacidad Emulsificante.

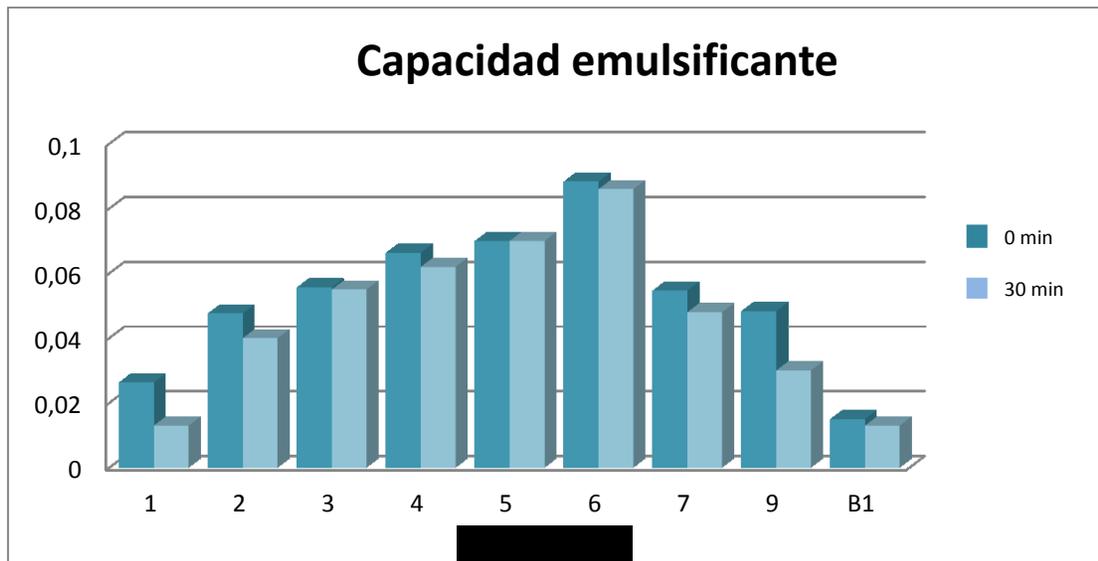


Figura 25. Capacidad emulsificante de los hidrolizados a 0 y 30 minutos.

Tabla 15. Actividad emulsificante de los hidrolizados.

Experimento No	Activad Emulsificante (m ² /ml)
1	1,1
2	2,1
3	2,4
4	2,9
5	3,1
6	3,9
7	2,4
9	2,1
Blanco	0,6

5.7 DIGESTIBILIDAD

5.7.1 DIGESTIBILIDAD *in vitro* DE LA SEMILLA DE GUANDUL E HIDROLIZADO

Una de las formas para determinar la digestibilidad de las proteínas es simular las condiciones a las que se encuentran sometidas al ser digeridas por un ser vivo, dicha simulación se conoce como digestibilidad *in vitro*. Con el fin de aumentar la digestibilidad

de la semilla de Guandul se realizó la hidrólisis enzimática de las proteínas presentes en la semilla, logrando aumentar el porcentaje de digestibilidad casi en un 38%, respecto a la semilla nativa, dándole un valor nutritivo muy alto a los hidrolizados de Guandul, los cuales se pueden convertir en una fuente directa y efectiva de aminoácidos para persona con problemas de absorción de este tipo de nutrientes, no obstante es claro que se deben realizar otro tipo de análisis y estudios para determinar si los hidrolizados de Guandul son aptos y cumplen con las especificaciones requeridas para ser un alimento o un suplemento nutritivo.

Tabla 16. Porcentaje de digestibilidad de la proteína nativa e hidrolizada.

Muestra	Repeticiones				Promedio	D	DT
Nativa	54,87	54,99	54,94	54,89	54,92	0,009	0,053
Nativa calentada 100 °C por 1 hora *	87,22	86,91	86,97	87,08	81,77	0,078	0,162
1	91,01	91,74	91,15	91,41	91,33	0,308	0,321
4	87,91	88,11	87,97	88,27	88,06	0,077	0,160
6	89,42	89,53	89,62	89,46	89,51	0,023	0,087
9	87,68	87,85	87,54	87,47	87,63	0,087	0,170
10	87,81	88,23	87,71	88,00	87,94	0,156	0,228
14	87,11	87,39	87,05	87,24	87,20	0,068	0,151
Óptimo	91,78	91,22	91,10	91,47	91,39	0,272	0,301
Óptimo	92,49	93,25	92,32	92,83	92,72	0,511	0,413

6 CONCLUSIONES

- El análisis proximal de las semillas de Guandul, mostro que la semilla tiene un buen contenido de proteína, carbohidratos, con porcentajes de 22.6 % y 63 % respectivamente. Demostrando el alto valor nutritivo que presenta esta semilla.
- Con los valores óptimos de pH: 7.2, relación de concentración enzima/sustrato: 1.5, temperatura: 53 °C y tiempo de 136.8 minutos, se logró obtener un grado de hidrólisis 10.7 %.
- El tiempo concentración enzima/sustrato son los factores más influyentes en el proceso de hidrólisis, logrando afectar de forma directa el proceso de hidrólisis.
- Las características fisicoquímicas de los hidrolizados depende de las condiciones de reacción, con las que estos hayan sido generados, estas condiciones se pueden modificar de acuerdo al uso que se le vaya a dar al hidrolizado.
- La hidrólisis enzimática logró mejorar las propiedades de espumado y emulsificantes, aportando un posible uso del hidrolizado de Guandul en diferentes campos.
- La digestibilidad de la semilla de Guandul se aumentó considerablemente por medio de la hidrólisis enzimática, postulando al hidrolizado de Guandul como una fuente directa y de fácil asimilación de aminoácidos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Medrano; A. del Castillo, Obtención de péptidos antioxidantes de glicinia de soja. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay. Revista del laboratorio tecnológico del Uruguay. No. 6 - 2011 - INNOTEC – 33. 2011
- [2] Manual técnico para el manejo de Guandul. Proyecto: asistencia técnica para el fortalecimiento de la producción agrícola y comercial de pequeños productores de quinua y guandul ubicados en trece municipios del departamento del Cauca. Gobernación del Cauca. Pag 5-19. 2010.
- [3] N. Berardo; B. Dzwelab; L. HoveC; M. Odoardi. Near infrared calibration of chemical constituents of *Cajanus cajan* (pigeon pea) used as forage. Animal Feed Science Technology 69 (1997) 201-206.
- [4] Y. Zua; X. Liua; Y. Fua; N. Wua; Y. Konga; M. Winkc. Chemical composition of the SFE-CO₂ extracts from *Cajanus cajan* (L.) Huth and their antimicrobial activity *in vitro* and *in vivo*. Phytomedicine 17 (2010) 1095–1101.
- [5] R, Martínez, Caracterización nutricional de Guandul (*Cajanus cajan*), basado en sus componentes Químicos, desaparición *in situ* y cinética digestiva.
- [6] Mwanjala A; K. Muhammad; J. Bakar; Y. Che Man. Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. I. Physicochemical properties. Food Chemistry 67 (1999) 435±443.
- [7] N, López; J, Castellón. Estudio de tres distancias de siembra, en la producción de biomasa, proteína bruta y fibra bruta de Guandul (*Cajanuscajan*), en suelo franco arenosos, de Managua. Universidad Nacional Agraria. Managua Nicaragua.2002.
- [8] F. Hao; Z. Chen; S. Xiang-Yang. Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulase from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02. Bioresource Technology 101 (2010) 4111–4119.
- [9] R, Benitez; A, Ibarz; J, Pagan. Hidrolizados de Proteína: procesos y aplicaciones. Acta Bioquímica Latinoamericana. 42 (2008): 227-36.

- [10]** L. Prado. Determinación de la especificidad de proteasas fúngicas en la hidrólisis de proteína. Tesis de especialización. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. 2003.
- [11]** D. Spellmana; E. McEvoya; G. O’Cuinnb; R.J. FitzGerald. 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* 13 (2003) 447–453.
- [12]** Katrina Go, Yousuke Horikawa, Ricardo Garcia, Francisco J. Villarreal. Fluorescent method for detection of cleaved collagens using O-phthaldialdehyde (OPA). *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2008) 878–882.
- [13]** Dirk Lochmanna, Sylvia Stadlhofer b, Jörg Weyermann a, Andreas Zimmerb. New protamine quantification method in microtiter plates using o-phthaldialdehyde/*N*-acetyl-l-cysteine reagent. *International Journal of Pharmaceutics* 283 (2004) 11–17.
- [14]** Determination of moisture content. En: *Official Methods of Analysis*. AOAC 950.43. 18th ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.
- [15]** Crude Fiber Analysis. En: *Official Methods of Analysis*. AOAC 962.09. 18th ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.
- [16]** Determination of the nitrogen content. En: *Official Methods of Analysis*. AOAC 968.06. 18th ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.
- [17]** Fat in Feeds. En: *Official Methods of Analysis*. AOAC 991.36. 18th ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.
- [18]** Mineral analysis by ICP-OES. En: *Official Methods of Analysis*. AOAC 14004. 18th ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.
- [19]** C, Prieto. Diseño y optimización de un reactor de membrana discontinuo para la hidrólisis enzimática de proteínas. Tesis Doctoral. Universidad de granada.2007.
- [20]** Kong, X., Zhou, H., & Qian, H. (2007). Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chemistry*, 101(2), 615-620.
- [21]** Adler-Nissen, J. Relationship of structure to taste of peptides and peptide mixtures. In *Protein tailoring for food and medical uses*; Feeney, R.E., Whitaker, J.R., Eds.; M Dekker: New York, 1986; pag. 97-122.

- [22] V. Morr; B.German; J. Kinsella; J.M. Regenstein; J. Van Buren; A. Kilara. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, 50, 1715–1718.1985
- [23] D. Nelson; M. Cox. Lehninger. Principios de Bioquímica. Pag 190-230. Cuarta Edición.
- [24] A., Guadix, E.; P Dueñas, P González, P. Camacho, Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada. Granada. España. *Ars Pharmaceutica*, 41:1; 79-89, 2000.
- [25] L. Now-I; J. Legrand; Y. Popineau; P. Belleville. Enzymatic hydrolysis of wheat proteins Part 2: comparison of performance of batch-stirred and torus reactors. *Chemical Engineering Journal* 65 (1997) 195-199.
- [26] J. Wasswa; J. Tang; X. Gub; X. Yuan. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry* 104 (2007) 1698–1704.
- [27] D. Pericin; Lj. Radulovic. Z. Vaštag; S. Madarev-Popovic; S. Trivic. Enzymatic hydrolysis of protein isolate from hull-less pumpkin oil cake: Application of response surface methodology. *Food Chemistry* 115 (2009) 753–757.
- [28] J. Ferreyra; E. Kuskoski; M. Bordignon Luiz; D. Barrera Arellano; R. Fett. Propiedades emulsificantes y espumantes de las proteínas de harina de cacahuate (*Arachis hypogaea* Lineau). *Grasas y aceites*, 58 (3), JULIO-SEPTIEMBRE, 264-269, 2007.
- [29] D. Suarez. obtaining of hydrolyzed fish protein from red tilapia (*oreochromis* sp.). Trabajo de grado. Universidad nacional de Colombia facultad de ciencias especialización en ciencia y tecnología de alimentos. 2010.
- [30] C. Avila. Determinación de las propiedades físico-químicas y funcionales del aislado e hidrolizado enzimático de la proteína de soja a escala piloto, para la aplicación de alimentos. Escuela politécnica nacional. Quito 2011.
- [31] M. Castel. Estudio de las propiedades funcionales, tecnológicas y fisiológicas de las proteínas de amaranto. Universidad nacional del litoral. 2011
- [32] Estudio Etnobotánico y pruebas de citotoxicidad de las plantas del sur-oeste de Nigeria para tratar el cáncer, con separación de los componentes citotóxicos de *Cajanus cajan*. JS Ashidi, PJ Houghton, PJ Hylands, T. Efferth. *Journal of Etnofarmacología Volumen 128, Número 2, 24 de marzo 2010, páginas 501-512.*

[33] Composición química de los SFE-CO₂ extractos de *Cajanus cajan* (L.) Huth y su actividad antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*. Yuan-Zu pandilla, Xiao-lei Liu Yu-jie Fu, Wu Nan, Yu Kong, Michael Wink. *Fitomedicina*, Volumen 17, Número 14 , 01 de diciembre 2010 , páginas 1095-1101.

[34] *Cajanus cajan* Linn. (Leguminosae) previene el daño inducido por el alcohol hígado de rata y aumenta la función citoprotectora. Rakesh Kundu, Dasgupta Suman, Biswas Anindita, Bhattacharya Anirban, Bikas C. Pal, Debashis Bandyopadhyay, Shelley Bhattacharya, Samir Bhattacharya. *Journal of Etnofarmacología* , Volumen 118, Número 3 , 13 de agosto 2008 , Pages 440-447.

ANEXOS



1. Tamizaje de la Harina de Guandul.



2. Bioreactor usado para la hidrólisis enzimática.



3. Inactivación de la enzima por temperatura.



4. Equipo de liofilización.