

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ALCALASA
Y TIEMPO DE DIGESTIÓN SOBRE EL GRADO DE HIDROLISIS Y
ACCIÓN INHIBITORIA FRENTE A *Staphylococcus aureus* EN EL
HIDROLIZADO PROTEICO DE FRIJOL ÑUÑA (*Phaseolus vulgaris* L.)
VARIEDAD PAVA**

**TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE
INGENIERA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

STEFANY LISSETTE BALTODANO OLIVERA

**TRUJILLO, PERÚ
2016**

La presente tesis ha sido aprobada por el siguiente Jurado:

Dr. Fernando Rodríguez Avalos
PRESIDENTE

Ing. Gabriela Barraza Jáuregui
SECRETARIO

Ing. Ana Cecilia Ferradas Horna
VOCAL

Dr. Antonio Rodríguez Zevallos
ASESOR

DEDICATORIA

A Dios por la salud y paciencia durante el desarrollo de esta investigación.

A mi padre por darme los recursos necesarios para mi formación personal y profesional, por ser ejemplo de perseverancia y constancia, por el valor mostrado para salir adelante y por todo su amor.

A mi madre por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos y por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi hermano por estar conmigo y acompañarme siempre.

A mis amigos por compartir los buenos y malos momentos.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres por su amor y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

A mi asesor el Dr. Ricardo Rodríguez Zevallos por apoyarme y dirigirme en el desarrollo de esta investigación.

A los señores miembros del jurado por sus recomendaciones.

A los docentes y amigos que colaboraron e hicieron posible culminar con éxito esta tesis.

INDICE GENERAL

	Pág
Carátula.....	i
Aprobación por el Jurado de Tesis.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimiento.....	iv
Índice general.....	v
Índice de Cuadros.....	vii
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Anexos.....	ix
Resumen.....	x
Abstract.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA.....	3
2.1. Aspectos generales del frijol ñuña (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	3
2.1.1. Descripción botánica del frijol ñuña.....	3
2.1.2. Composición nutricional del frijol ñuña.....	4
2.2. Aspectos generales de las proteínas.....	4
2.2.1. Aislamiento de proteínas.....	5
2.2.2. Hidrolisis enzimática de proteínas.....	7
2.2.2.1. Condiciones de hidrólisis enzimática.....	8
2.2.2.2. Grado de hidrólisis en proteínas.....	8
2.2.2.3. Enzimas proteolíticas.....	9
2.2.2.4. Propiedades tecnofuncionales.....	11
2.2.3. Péptidos bioactivos.....	12
2.2.3.1. Actividad antimicrobiana.....	13
2.2.3.2. Actividad inmunomoduladora.....	14
2.2.3.3. Actividad antioxidante.....	14
2.3. Tipos y aplicaciones de hidrolizados proteicos vegetales.....	15

III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Lugar de ejecución.....	17
3.2. Materiales.....	17
3.3. Equipos e instrumentos.....	18
3.4. Esquema experimental.....	18
3.5. Obtención del aislado proteico de frijol ñuña (<i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i> L.) variedad pava.....	20
3.6. Obtención del hidrolizado enzimático del aislado proteico de frijol ñuña (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad pava.....	22
3.7. Determinación de proteínas.....	24
3.8. Grado de hidrolisis de proteínas.....	24
3.9. Acción Inhibitoria frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	25
3.10. Métodos estadísticos.....	26
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1. Caracterización proximal del aislado proteico de frijol ñuña variedad pava.....	27
4.2. Grado de hidrólisis en el hidrolizado proteico de frijol ñuña variedad pava.....	29
4.3. Acción inhibitoria frente a <i>Staphylococcus aureus</i> del hidrolizado proteico de frijol ñuña variedad pava.....	35
V. CONCLUSIONES.....	41
VI. RECOMENDACIONES.....	42
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	43

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Composición nutricional del frijol ñuña (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	4
Cuadro 2. Proteasas disponibles comercialmente de grado alimentario.....	10
Cuadro 3. Composición proximal de la harina y el aislado proteico de frijol ñuña (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad pava.....	27
Cuadro 4. Prueba de homogeneidad de varianzas para el grado de hidrólisis del hidrolizado proteico de frijol ñuña (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad pava en función a la concentración de alcalasa y tiempo de digestión.....	33
Cuadro 5. Análisis de varianza para el grado de hidrólisis del hidrolizado proteico de frijol ñuña (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad pava en función a la concentración de alcalasa y tiempo de digestión.....	34
Cuadro 6. Prueba de Duncan aplicada al grado de hidrólisis de hidrolizado proteico de frijol ñuña (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad pava en función a la concentración de alcalasa y tiempo de digestión.....	35
Cuadro 7. Prueba de homogeneidad en varianzas para la acción inhibitoria frente a <i>Staphylococcus aureus</i> en el hidrolizado proteico de frijol ñuña (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad pava.....	38
Cuadro 8. Análisis de varianza para la acción inhibitoria frente a <i>Staphylococcus aureus</i> en el hidrolizado proteico frijol ñuña (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad pava.....	39

Cuadro 9. Prueba de Duncan aplicada a la acción inhibitoria frente a <i>Staphylococcus aureus</i> en el hidrolizado proteico de ñuña en función a la concentración de alcalasa y tiempo de digestión.....	40
---	----

INDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Esquema experimental para la obtención del hidrolizado proteico de frijol ñuña (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad pava.....	19
Figura 2. Diagrama de flujo para la obtención del aislado proteico de frijol ñuña (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad pava.....	20
Figura 3. Diagrama de flujo para la hidrolisis enzimática del aislado proteico de frijol ñuña (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad pava.....	22
Figura 4. Grado de hidrólisis en el hidrolizado proteico de frijol ñuña (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad pava en función a la concentración de alcalasa y tiempo de digestión.....	30
Figura 5. Acción inhibitoria frente a <i>Staphylococcus aureus</i> del hidrolizado proteico de frijol ñuña (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad pava en función a la concentración de alcalasa y tiempo de digestión.....	36

INDICE DE ANEXOS

Pág.

Anexo 1. Valores del grado de hidrólisis del hidrolizado proteico de frijol ñuña (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad pava en función de la concentración de alcalasa y tiempo de digestión.....	55
Anexo 2. Valores de la acción inhibitoria frente a <i>Staphylococcus aureus</i> en el hidrolizado proteico de frijol ñuña (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad pava.....	56
Anexo 3. Vistas fotográficas de la acción inhibitoria frente a <i>Staphylococcus aureus</i> del hidrolizado proteico de frijol ñuña (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) variedad pava.....	57
Anexo 4. Ficha técnica de la enzima Alcalasa (delvolase).....	62

RESUMEN

Se evaluó el efecto de la concentración de alcalasa y el tiempo de digestión sobre el grado de hidrólisis y la acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* en el hidrolizado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante la prueba de Levene, el análisis de varianza y la prueba de Duncan.

Se prepararon nueve tratamientos de hidrolizados proteicos, a concentraciones de alcalasa de 3, 5 y 7% y tiempos de digestión de 15, 30 y 60 min a partir del aislado proteico de ñuña. El grado de hidrólisis se determinó midiendo la cantidad de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 10% en los hidrolizados y su proporción con respecto a la cantidad de nitrógeno total en el aislado. La acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* se determinó mediante el método de Kirby-Bauer.

A mayor concentración de alcalasa y tiempo de digestión se obtuvieron mayores grados de hidrólisis y menores valores de acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* con diferencias significativas ($p < 0.05$) en las variables analizadas.

El tratamiento con alcalasa al 7% y de digestión 60 min produjo el mayor grado de hidrólisis (58.62%); el tratamiento con alcalasa al 3% y de digestión 15 min produjo la mayor acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* (8.87 mm).

El mejor tratamiento fue el de 3% de alcalasa y 15 min de digestión, siendo el grado de hidrólisis 13.86% y presentó la mayor acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* en el hidrolizado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava.

ABSTRACT

In this research, the effect of alcalase concentration and digestion time on the degree of hydrolysis and inhibitory action against *Staphylococcus aureus* on the protein hydrolyzate ñuña bean (*Phaseolus vulgaris* L.) pava variety was evaluated. The results were analyzed statistically using Levene test, analysis of variance and Duncan test.

Nine treatments of protein hydrolyzate were prepared, at concentrations of alcalase 3, 5, and 7%, and digestion times at 15, 30, and 60 min, all from ñuña protein isolate. The degree of hydrolysis was determined by measuring the amount of soluble nitrogen in trichloroacetic acid, 10% hydrolyzed, with respect to the quantity of total nitrogen in the ñuña protein isolate. The inhibitory action against *Staphylococcus aureus* was determined by the Kirby-Bauer method.

Higher digestion times, and concentrations of alcalasa obtained greater degrees of hydrolysis, and lower levels of inhibitory action against *Staphylococcus aureus* with significant differences ($p < 0.05$) in the variables analyzed.

The treatment with 7% alcalase at 60 min digestion time produced the greatest degree of hydrolysis (58.62%); 3% alcalase at 60 min digestion time produced the greatest inhibitory action against *Staphylococcus aureus* (8.87 mm).

The best treatment was with alcalasa 3% and 15 min digestion time, that produced of degree of hydrolysis of 13.86% and the greatest inhibitory action against *Staphylococcus aureus* (8.86 mm) in the protein hydrolyzate ñuña bean (*Phaseolus vulgaris* L.) pava variety.

I. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas representan en la actualidad una alternativa de origen poco convencional para el desarrollo de nuevos alimentos, por su importante contenido de proteínas que poseen, en particular, los aislados e hidrolizados proteínicos (Chel-Guerrero y otros, 2002). En el Perú, el frijol ñuña es una fuente potencial de alimentación, debido a su importante aporte de proteínas (aproximadamente 20%) y constituye uno de los legados valiosos de la agricultura andina; sin embargo, su uso directo como frijol se limita a su textura, por lo que este grano se tuesta y no se hierve (Gamarra y otros, 1996).

El consumo de proteínas vegetales en estado nativo es limitado, por su baja digestibilidad y su carácter potencialmente alergénico, por lo que es relevante buscar procesos que permitan aumentar su consumo y facilitar su incorporación en la alimentación humana (Freitas y otros, 2004). La modificación parcial del tipo hidrolítica de la estructura proteínica mediante el empleo de proteasas, en condiciones controladas de pH y temperatura, puede contribuir al desarrollo de nuevas fracciones proteínicas con características nutricionales y funcionales definidas que contribuyan a reducir la alergenicidad de la proteína, producir péptidos con actividad biológica, conseguir requerimientos para dietas específicas o mejorar propiedades funcionales (Tardioli y otros, 2003; Doucet y otros, 2003).

Las proteínas alimentarias de vegetales se investigan no solo desde el punto de vista nutricional sino también como insumos para la obtención de péptidos funcionales o bioactivos, los cuales se definen como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen diversas actividades biológicas, después de su

liberación por hidrólisis enzimática o química. La incorporación de los péptidos bioactivos en alimentos, puede ejercer un efecto beneficioso sobre el sistema cardiovascular, digestivo, inmunológico, y nervioso. Los hidrolizados de mayor estudio provienen proteínas de origen animal. Recientemente se han obtenido hidrolizados de proteínas de origen vegetal como la soya y el maíz con carácter bioactivo (Dubin y otros, 2005).

El problema de la presente investigación fue:

¿Cuál será el efecto de tres concentraciones de alcalasa (3, 5 y 7%) y de tres tiempos de digestión (15, 30 y 60 min) sobre el grado de hidrólisis y la acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* en el hidrolizado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava?

Con los siguientes objetivos:

Evaluar el efecto de la concentración de alcalasa y el tiempo de digestión sobre el grado de hidrólisis y la acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* en el hidrolizado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava.

Determinar la concentración de alcalasa y el tiempo de digestión que permitan obtener el mayor grado de hidrólisis con la mayor acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* en el hidrolizado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava.

II. REVISION DE BIBLIOGRAFÍA

2.1. Aspectos generales del frijol ñuña

La ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo originario de la región central de los Andes y es importante en la dieta nutricional del poblador rural andino. Además del importante contenido de proteínas (alrededor del 20%), contribuye al mejoramiento de los suelos, por su capacidad de fijar nitrógeno. Morfológicamente, es el mismo que el frijol común, con la diferencia de que tiene la capacidad de reventar y aumentar de volumen cuando es tostado solo o en aceite. Se distribuye desde Cajamarca (Perú) (latitud 7° 30' S) hasta Chuquisaca (Bolivia) (latitud 19° 30' S), entre 1900 a 2900 m de altitud (Toro y otros, 1990). En el Perú la ñuña se cultiva en los departamentos de Cajamarca, Cuzco, Ancash, Huánuco, Apurímac, La Libertad y Ayacucho (Tohme, 1995). La ñuña es altamente sensible a la luz diurna y tiene foto periodo de días cortos (Gamarra y otros, 1995). Se desarrolla bien entre 10 y 30 °C, siendo 20 °C la óptima; temperaturas menores que 5 °C y mayores que 25 °C pueden ser dañinas (Gamarra y otros, 1996).

2.1.1. Descripción botánica del frijol ñuña

Según Tohme (1995), la clasificación de esta especie es la siguiente:

Reino: Plantae

Subreino: Embrionionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Phaseolus*

Especie: *P. vulgaris*

2.1.2. Composición nutricional del frijol ñuña

En el Cuadro 1, se presenta la composición nutricional del frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.).

Cuadro1. Composición nutricional del frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.).

Componente	Cantidad (100 g)
Proteínas (g)	21.8
Grasas (g)	2.52
Carbohidratos (g)	55.4
Tiamina (mg)	0.63
Riboflavina (mg)	0.17
Niacina (mg)	1.8
Calcio (mg)	183
Hierro (mg)	4.7
Energía (kcal)	322

Fuente: Tohme y otros (1995)

2.2. Aspectos generales de las proteínas

Las proteínas son biomoléculas formadas básicamente por carbono, hidrogeno, oxígeno y nitrógeno. Pueden además contener azufre y en algunos tipos de proteínas fósforo, hierro, magnesio y cobre entre otros elementos. Están formadas por aminoácidos unidos mediante puentes peptídicos. A nivel elemental, las proteínas están compuestas por 50-55 % de carbono, 6-7 % de hidrogeno, 20-23 % de oxígeno, 12-19 % de nitrógeno y 0.2-3 % de azufre, la síntesis de las proteínas tiene lugar en los ribosomas (Fennema, 2000).

Las proteínas son moléculas complejas (agregaciones de los aminoácidos). Con la posibilidad de que los 20 aminoácidos diferentes puedan ser agrupados en cualquier orden para conformar polipéptidos

de cientos de aminoácidos, que tienen el extraordinario potencial de producir una gran cantidad de variantes en su conformación. Los 20 aminoácidos difieren considerablemente en sus propiedades fisicoquímicas así como en su polaridad, acidez, basicidad, aromaticidad, volumen, flexibilidad conformacional, en su habilidad para realizar entrecruzamientos para formar puentes de hidrogeno y reactividad química. Estas múltiples características, muchas de las cuales están interrelacionadas, son las responsables de la gran variedad de funciones, estructuras y demás características de las proteínas (Acuña, 2001).

Los aminoácidos son las unidades básicas que forman las proteínas. Su denominación responde a la composición química general que presentan, en las que un grupo amino ($-NH_2$) y otro carboxilo o ácido ($-COOH$) se unen a un carbono. Las otras dos valencias de ese carbono quedan saturadas con un átomo de hidrogeno ($-H$) y con un grupo químico variable al que generalmente se denomina radical ($-R$), el cual está disponible para que pueda unirse a otros elementos o grupo químico (Badui, 1990).

2.2.1. Aislamiento de proteínas

Proteínas de origen animal se han empleado desde hace muchos años para la obtención de aislados, sin embargo, en estos últimos años, se está desarrollando como alternativas, proteínas de origen vegetal, tales como girasol, colza, garbanzo, lupinus y otros. Dichos aislados son usados como insumo en la elaboración de muchos productos en la industria de alimentos y la farmacéutica (Villanueva y otros, 2001).

Se considera aislado proteico aquel producto cuyo contenido de proteínas es mayor al 70%, obtenido por medios físicos y químicos con la finalidad de reducir el contenido de otros componentes e incrementar la cantidad de proteína (Rivera, 2006).

Las proteínas son solubles en agua cuando adoptan una conformación globular. La solubilidad se debe a los radicales libres de los aminoácidos que, al ionizarse, establecen enlaces débiles (puentes de hidrógeno) con las moléculas de agua. Así, cuando una proteína se solubiliza queda recubierta de una capa de moléculas de agua (capa de solvatación) que impide que se pueda unir a otras proteínas lo cual provocaría su precipitación (insolubilización). Esta propiedad es la que hace posible la hidratación de los tejidos de los seres vivos (Silva, 2006).

Las proteínas son uno de los componentes principales de los alimentos, tanto desde el punto de vista funcional como el nutricional. Por ejemplo, determinan las propiedades físicas y organolépticas de muchos alimentos. Así, la consistencia y textura de la carne, queso o pan, dependen, en gran medida, de la naturaleza de las proteínas que los constituyen; también, en los alimentos elaborados con presencia menor de proteínas, pueden jugar un papel muy importante, al influir en las características funcionales, como la formación de emulsiones, geles, espumas y la absorción de agua o aceite. Además, las proteínas constituyen un aporte nutricional importante, como una fuente de energía, nitrógeno y aminoácidos esenciales (Vioque y otros, 2006).

Uno de los métodos de obtención de aislados proteicos de menos complejidad y con altos rendimientos es la extracción a pH alcalino y precipitación isoelectrónica. Este método consiste en el uso

de una base para solubilizar las proteínas, (comúnmente, el hidróxido de sodio) en la extracción alcalina; posteriormente, se procede a la precipitación isoeléctrica (solubilidad mínima de proteínas a pH alrededor de 4.5).

El procedimiento consiste en mezclar harina con agua destilada en relación 1:10 y ajustar el pH a 10.7 con NaOH. La extracción se realiza agitando la suspensión por 45 min a temperatura ambiente. Para separar la proteína, el extracto se centrifuga a 10000 rpm. La precipitación de la proteína aislada se realiza ajustando el pH con HCl 0.1 N. El aislado proteico precipitado se recupera por centrifugación a 10000 rpm (30 min, 4 °C), luego, se lava dos veces con agua destilada (Urrutia, 2010).

2.2.2. Hidrólisis enzimática de proteínas

En la hidrólisis enzimática, un conjunto de etapas transcurre en serie, produciendo péptidos de tamaño decreciente: Proteínas → proteosomas → peptonas → péptidos → aminoácidos. Se trata de un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio (Najafian y Babji, 2014).

Se propone un proceso de hidrólisis constituido por tres reacciones consecutivas. Primero, la formación de un complejo enzima-proteína; segundo la ruptura del enlace amídico, para liberar un péptido, y tercero, el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. El proceso puede iniciarse nuevamente sobre los dos nuevos péptidos o sobre uno de ellos (Benítez y otros, 2008).

2.2.2.1. Condiciones de la hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de proteínas depende de la selección de la enzima y la combinación del tiempo y la temperatura de incubación del tratamiento enzimático, siendo este último uno de los factores más importantes a considerar. En el caso de las reacciones enzimáticas, muchas enzimas se desnaturalizan por altas temperaturas; además, el pH influye en la velocidad de reacción de la enzima. El valor de pH óptimo es el punto donde la enzima es más efectiva. Por lo tanto, para realizar la actividad enzimática en el nivel máximo, la temperatura y el pH deben ajustarse a sus condiciones óptimas (Benítez y otros, 2008).

2.2.2.2. Grado de hidrólisis enzimática en proteínas

El grado de hidrólisis (% GH) es el parámetro clave para el seguimiento y control de las reacciones de hidrólisis de proteínas. Representa la proporción de enlaces peptídicos hidrolizados sobre el número total de enlaces y se calcula de acuerdo con la Ecuación 1, donde h es el número de enlaces peptídicos hidrolizados y h_{tot} el número total de enlaces peptídicos en la proteína nativa. El h y h_{tot} son expresados en meq/g (Adler-Nissen, 1986).

$$\% \text{ GH} = (h/h_{tot}).100 \% \quad (\text{Ec. 1})$$

Los métodos para medir el GH se basan en la determinación de los grupos α -amino libres, la determinación de nitrógeno soluble tras precipitar la proteína con ácido tricloroacético y la valoración del protón liberado tras la ruptura de un enlace peptídico a determinados valores de pH (Adler-Nissen, 1986).

2.2.2.3. Enzimas proteolíticas

Una proteasa puede ser clasificada acuerdo con:

(a) su origen: animal, vegetal, bacteriano o fúngico, (b) su modo de acción: catalítica, endo o exo-proteasas. Las endoproteasas hidrolizan enlaces amídicos dentro de la cadena de la proteína, en tanto que, las exoproteasas eliminan aminoácidos terminales de las proteínas o péptidos; (c) su residuo catalítico: serin-, metalo-, cistein-, o aspartato-proteinasas, la naturaleza del centro catalítico de las proteasas difiere de acuerdo con los aminoácidos y otros ligandos que intervienen en la formación del complejo enzima - sustrato (Rao y otros, 1998).

En el Cuadro 2, se muestra algunas proteasas disponibles comercialmente de grado alimenticio. Una de las enzimas proteolíticas más utilizadas es la alcalasa, producida por fermentación sumergida de una cepa seleccionada de *Bacillus licheniformis*. Sus condiciones son 50 °C-70 °C (dependiendo del tipo de sustrato) y pH entre 6,5 y 8,5; su principal componente enzimático es la Subtilina A (Girón-Calle y otros, 2003).

Las enzimas proteolíticas más importantes en la industria son las serinproteasas, que se dividen en dos tipos: a) las proteasas con actividad catalítica similar a la de la quimotripsina, y b) las de actividad catalítica tipo subtilisina. En ambos casos, las serinproteasas actúan mediante un ataque nucleofílico, formando un complejo acil-enzima y una posterior ruptura del complejo, liberando los productos de reacción y la enzima libre (Prieto, 2007).

Cuadro 2. Proteasas disponibles comercialmente de grado alimenticio

Tipo de proteasa		Nombre	Fuente	Temperatura (°C)	Intervalo de pH
Serinproteasas	Animal	Tripsina	Porcino, bovino	30 - 60	7 - 9
		Quimiotripsina		45 - 55	8 - 9
		Elastasa			6 - 8
	Bacteriana	Subtilisina	<i>B. licheniformis</i>	50 - 60	6 - 10
		Alcalasa			
		Subtilisina BPN	<i>B. amyloliquefaciens</i>	40- 55	6 - 10
Cistein proteasa	Plantas	Subtilisina Novo			
		Papaína	Papaya	40 - 75	5 - 8
Aspartato proteasas	Animal	Bromelina	Piña	20 - 65	5 - 8
		Pepsina	Porcino, bovino	35 - 38	1 - 4
		Quimosina	Becerro	28 - 37	4 - 6

Fuente: Benítez y otros (2008)

La especificidad de las proteasas afecta el tamaño, la cantidad, y composición de péptidos y aminoácidos libres, así como su secuencia de aminoácidos (Doucet y otros, 2003). Penta y Xiong (2002) reportaron que el uso de enzimas forma una mezcla de péptidos con diferente grado de hidrólisis y, en consecuencia, diferentes rangos de actividad biológica.

2.2.2.4. Propiedades tecnofuncionales

Los cambios de las características fisicoquímicas que se producen durante la hidrólisis de una proteína pueden ser causa del comportamiento tecno-funcional modificado del hidrolizado cuando se lo compara con la proteína intacta (Jayaprakasha y Yoon, 2005).

- Solubilidad. El efecto de la hidrólisis sobre la solubilidad depende de la proteína estudiada y el pH. Los caseinatos por ejemplo, son muy solubles en los valores de pH sobre y debajo del PI (pH 4.5). Para la proteína del suero, que es algo menos soluble que la caseína, excepto en el PI, se ha observado un aumento de solubilidad con hidrólisis en la gama entera de pH (Caessens y otros, 1999).
- Sabor amargo. Un efecto secundario negativo importante de la hidrólisis de una proteína es la liberación de los péptidos, generalmente, con sabor más amargo que la proteína nativa (Adler-Nissen y Olsen, 1979). Se ha demostrado que el sabor amargo de los péptidos puros, a pesar de depender de la fuente de proteína y de la especificidad de la enzima, está relacionado con la presencia y posición de aminoácidos hidrofóbicos en los péptidos del hidrolizado (Li y otros, 2008).
- Emulsión y espuma. Las características de la emulsión y de formación de espuma de una proteína y de los hidrolizados de la proteína dependen del pH del sistema y de la enzima empleada para la hidrólisis. La formación y estabilización de la espuma y las emulsiones deben ser medidas por separado (Govindaraju y Srinivas, 2007).

2.2.3. Péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis. Estos péptidos pueden ser generados de la proteína precursora de múltiples maneras: (a) Digestión gastrointestinal in vivo, (b) Hidrólisis in vitro por acción de enzimas digestivas, proteolíticas u otras derivadas de microorganismos o plantas y (c) Fermentación microbiana. Sin embargo, la hidrólisis enzimática es el método más efectivo, común y confiable para obtener péptidos bioactivos (Barca y otros, 2000 y Moure y otros, 2005).

Muchos de los péptidos bioactivos conocidos han sido producidos usando enzimas gastrointestinales, usualmente, pepsina y tripsina (Nalinanon y otros, 2011). Otras enzimas digestivas y diferentes combinaciones de proteasas, incluyendo quimiotripsina, pancreatina y pepsina, así como enzimas de fuentes microbianas han sido también utilizadas para generar péptidos bioactivos de varias proteínas (Ahn y otros, 2012; Ko y otros, 2012 y Liu y otros, 2010).

El uso de proteasas de grado alimenticio derivado de fuentes microbianas disponibles comercialmente (alcalasa, flavourzyme, neutrasa y otras) es ventajoso, porque son de bajo costo, seguras, y los rendimientos son considerables (Agyei y Danquah, 2011).

2.2.3.1. Actividad antimicrobiana

Los péptidos con propiedades antimicrobianas han sido identificados en muchas fuentes: microbianas, animales y vegetales. El modo de acción y efectividad de estos péptidos, biológicamente activos como agentes antimicrobianos, varían de acuerdo con sus características estructurales, tamaño, composición de aminoácidos, carga, hidrofobicidad y estructura secundaria (Cudic y otros, 2002).

Un ejemplo de péptidos antimicrobianos más estudiados son los derivados de la lactotransferrina y la ovotransferrina de la leche y el huevo. Éstos péptidos poseen actividad antibacteriana frente a una gran variedad de microorganismos entre los que se incluyen *Staphylococcus spp* y *Streptococcus pyogenes* (Dathe y Wieprecht, 1999). Esta actividad puede ser ejercida, al menos, mediante tres mecanismos distintos:

- Secuestro del hierro e impidiendo su utilización por las bacterias.
- Producción de alteraciones en la pared bacteriana.
- Estimulación de la fagocitosis por macrófagos y monocitos

Además, los péptidos bioactivos ejercen un efecto inhibitor sobre los microorganismos, mediante la interacción con los componentes intracelulares aniónicos como el ADN y el ARN, lo que inhibe la síntesis de proteínas y la división celular de los microorganismos. Por otra parte, algunos péptidos están involucrados en la

activación autolítica en los microorganismos diana (Cudic y otros, 2002).

2.2.3.2. Actividad inmunomoduladora

Los péptidos bioactivos con propiedad inmunomoduladora más estudiados son aquellos que proceden de la leche y los productos lácteos. Se ha observado, en pruebas in vitro, que los péptidos obtenidos por hidrólisis del suero lácteo estimulan la proliferación de células del sistema inmune y mejoran la capacidad fagocítica (Biziulevicius y otros, 2006).

2.2.3.3. Actividad antioxidante

Los péptidos antioxidantes son moléculas que inhiben la acción destructiva de los compuestos oxidantes, que se generan constantemente en los organismos aeróbicos como resultado de las reacciones metabólicas. Estos compuestos pueden generar daños en proteínas, lípidos y ADN. Cuando la presencia de los compuestos oxidantes es mayor a los antioxidantes se genera estrés oxidativo, que ha sido relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades y con el envejecimiento (Vioque y Millán, 2005).

La presencia de antioxidantes tiene gran importancia en los alimentos para mantener la calidad nutricional y funcional y evitar la peroxidación lipídica que produce rancidez, con aparición de sabores inaceptables para el consumidor, y disminución de la vida comercial del producto (Liu y otros, 2005).

El mecanismo exacto de la actividad de estos péptidos es desconocido, pero, se ha reportado que tienen la capacidad tanto de secuestrar radicales libres y de formar complejos con los iones metálicos y que actúan como inhibidores de la peroxidación lipídica (Hernández y otros, 2005).

2.3. Tipos y aplicaciones de hidrolizados proteicos vegetales

Las características del hidrolizado se determina, evidentemente, por el uso que se les destine. Así, el grado y tipo de hidrólisis va a determinar el resto de las propiedades del hidrolizado.

Los hidrolizados proteicos vegetales que se producen para uso en alimentación se agrupan en tres grandes grupos:

1) Hidrolizados con bajo grado de hidrólisis, entre el 1 y el 10%, para la mejora de las propiedades funcionales. La hidrólisis proteica produce un incremento de la solubilidad, necesaria para la mejora de otras propiedades funcionales (Soral-Smietana y otros, 1998). Otro factor que también influye en la funcionalidad de estos hidrolizados es la exposición de residuos hidrófobos de la proteína que estaban inmersos en el interior de la proteína intacta (Panyam y Kilara, 1996). En este sentido, se ha demostrado que una hidrólisis limitada mejora propiedades funcionales de la proteína original, además de la solubilidad, como poder emulsificante, espumante o absorción de agua o aceite (Vioque y otros, 2000). Así, hidrolizados con mejor poder espumante son usados en la producción de pasteles, pan, helados y postres (Chaplin y Andrew, 1989). Hidrolizados con buen poder emulsificante son usados en la fabricación de mayonesas, carne picada, salchichas o helados (Süle y otros, 1998). Finalmente hidrolizados con una buena absorción de aceite o agua son usados en derivados cárnicos y en productos bajos en grasas (Mannheim y Cheryan, 1992).

2) Hidrolizados con grado de hidrólisis variable para ser usados como flavorizantes. En este sentido, los hidrolizados, según el sustrato usado y las condiciones de hidrólisis, también pueden aportar sabor y olor a los alimentos. Tradicionalmente, los hidrolizados usados como flavorizantes se han obtenido mediante la hidrólisis ácida de proteínas vegetales con HCl durante 4-24 h y a 100-125 °C. Actualmente, el uso de estos hidrolizados, obtenidos mediante tratamiento con ácidos está en desuso, por los componentes antinutricionales, ya comentados, que pueden generarse. Así, se está potenciando el uso de proteasas para la obtención de un hidrolizado extensivo que pueda ser usado en alimentación como flavorizante (Pommer, 1995).

3) Hidrolizados extensivos, con grado de hidrólisis superior al 10%. Estos hidrolizados están destinados a una alimentación especializada, bien como suplemento proteico o en dietas médicas (Clemente y otros, 1999). Estos hidrolizados podrían dividirse a su vez en dos grandes grupos: 1) los usados como suplemento proteico en la dieta (Frokjaer, 1994) y 2) con una composición definida para el tratamiento de enfermedades o síndromes específicos. En este último grupo, se alcanza el máximo de especialización en lo que respecta al diseño del alimento, ya que se obtiene un producto específico para un único objetivo (Lahl y Braun, 1994).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El proceso de hidrólisis se realizó en el Laboratorio de Investigación Multidisciplinaria de la Universidad Privada Antenor Orrego; el análisis microbiológico, en el Laboratorio de Ciencia de alimentos de la Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Privada Antenor Orrego de Trujillo y los análisis de proteínas, en el Laboratorio de Patología de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Privada Antenor Orrego de Trujillo.

3.2. Materiales

- Frijol nuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava proveedor Comercial Naomi S.A.C. Cajamarca.
- Enzima comercial alcalasa (delvolase) proveedor Deltagen del Perú. Lima. Ficha técnica Anexo 4.
- Cepa de *Staphylococcus aureus*, obtenida de la Universidad Nacional de Trujillo.
- Hidróxido de sodio 1 N
- Ácido clorhídrico 1 N
- Ácido tricloroacético (TCA) al 10%
- Agar Müller Hinton
- Frascos de polipropileno con tapa
- Tubos de centrifuga de 50 mL

3.3. Equipos e instrumentos

- Refrigeradora. Marca Bosch. Modelo Frost 44. Rango 0 a 8 °C. Precisión a 2 °C
- Balanza Analítica. Marca Mettler Toledo. Capacidad 0 – 210 g sensibilidad aprox. 0,0001 g
- Termómetro digital. Marca Multidigital. Rango de 50 a 200 °C. Precisión a 0,01 °C.
- pH metro de mesa. Marca Mettler Toledo. Rango de 0 a 14, sensibilidad aprox. 0,01.
- Agitador magnético con calefacción IKA C-MAG HS 7. Rango de velocidad 0 a 1500 rpm y temperatura de 0 a 350 °C
- Baño termostático seco Thermo scientific. Rango de 30 a 100 °C. Precisión a 0,05 °C.
- Estufa Memmert 30 a 200 °C
- Agitador magnético Magnetic Stirrer MMS 3000 Boeco Germany 12 V, 250 Ma
- Centrífuga Heraeus Sepatech Labofuge 200
- Tamizador eléctrico Ruetschi. Reloj interruptor de 0 a 60 min. Movimiento de 3600 vibraciones mediante unidad electromagnética
- Mallas tamizadoras N 250, 150 y 106 μm
- Molino de laboratorio, Laboratory Mill 3100. Capacidad de 300 g en 30 - 50 s. Malla estándar de 0.8 mm.

3.4. Esquema experimental

La Figura 1 muestra el esquema experimental para la evaluación del hidrolizado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava. Son variables independientes, la concentración de alcalasa y el tiempo de digestión; y variables dependientes, el grado de hidrólisis y la acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus*.

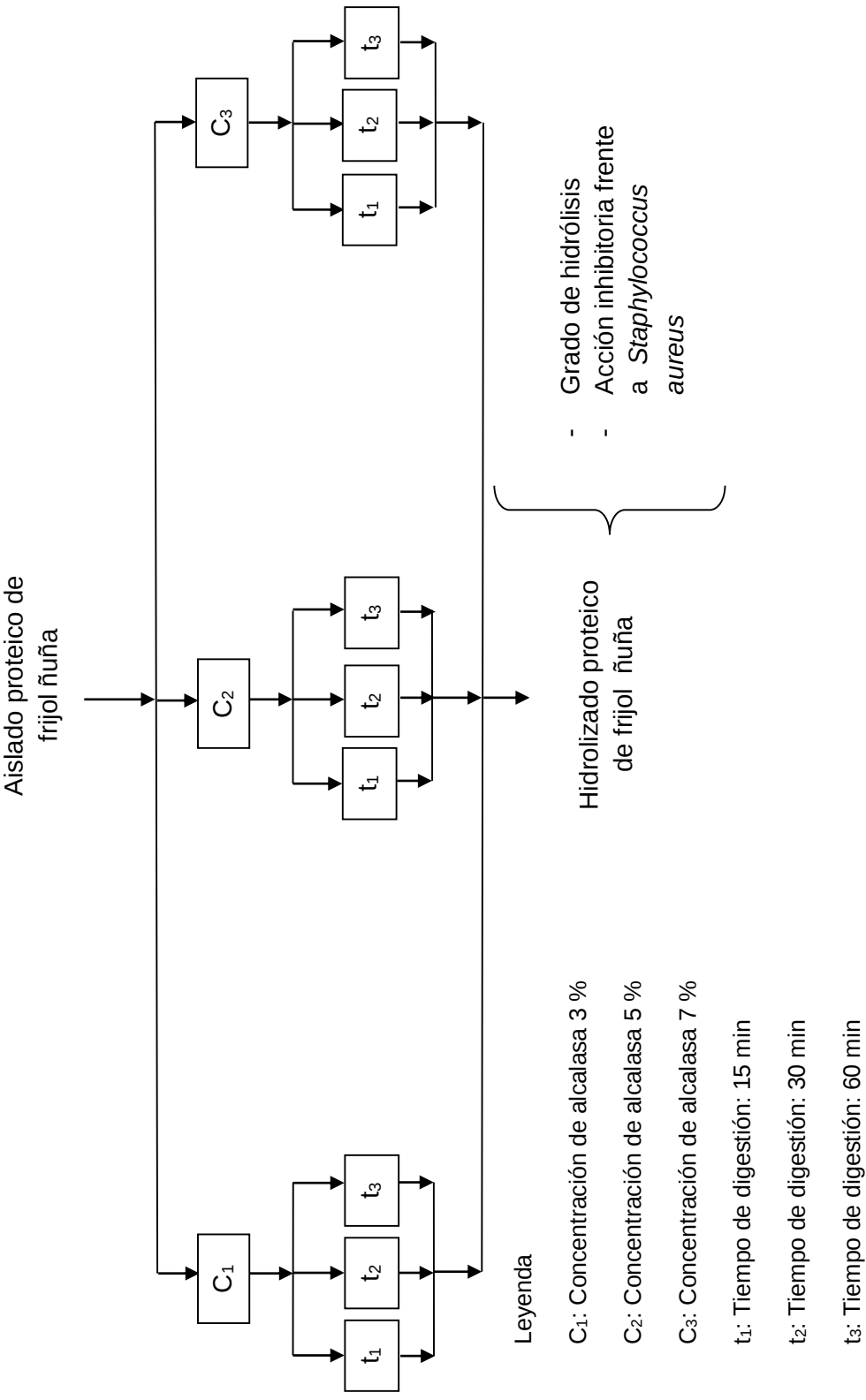


Figura 1. Esquema experimental de la obtención del hidrolizado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava

3.5. Obtención del aislado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava

En la Figura 2, se presenta el diagrama de flujo del proceso de obtención del aislado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava (Jarpa-Parra y otros, 2014).

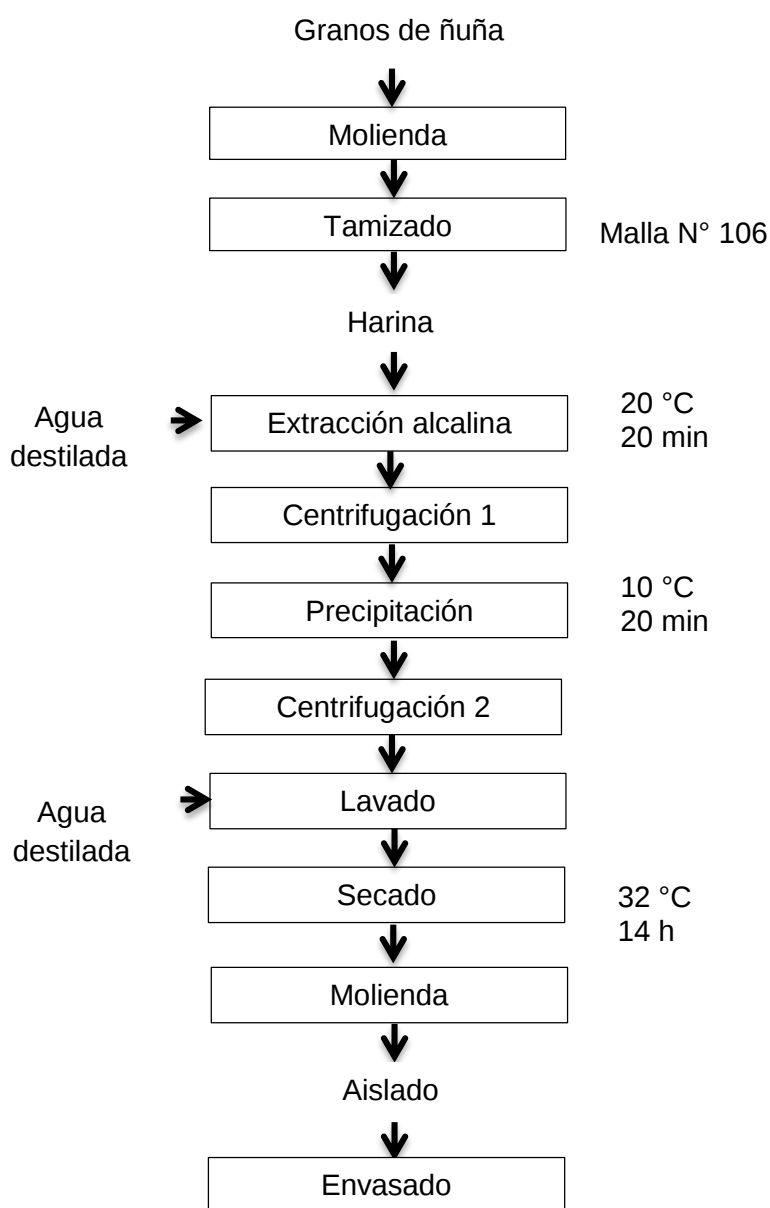


Figura 2. Diagrama de flujo de la obtención del aislado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava

A continuación se describe cada operación del diagrama de flujo de la Figura 2.

- Molienda. Los granos se trituraron en el molino de laboratorio, Laboratory Mill 3100.
- Tamizado. Los granos molidos se tamizaron a través de las mallas de 250, 150 y 106 micras.
- Harina. La harina obtenida presentó un tamaño de partícula 106 micras.
- Extracción alcalina. La harina de nuña se dispersó en agua destilada en una relación sólido/solvente de 1/15 hasta obtener una suspensión a la cual se le ajustó el pH a 10.78 con NaOH 1 N. La suspensión se agitó durante 1 h a temperatura ambiente.
- Centrifugación 1. Los residuos insolubles fueron separados del extracto líquido por centrifugación a 9000 rpm por 20 min a 20 °C. La fracción líquida se utilizó para la precipitación.
- Precipitación. A la fracción líquida se le ajustó a pH 4 con HCl 1 N y se colocó en refrigeración a 4 °C por 15 min.
- Centrifugación 2. La fracción líquida se centrifugó a 9000 rpm por 20 min a 10 °C. El precipitado obtenido corresponde al aislado.
- Lavado. Se procedió a lavar el aislado con agua destilada en relación 1/5 (p/v) y se centrifugó a 9000 rpm por 20 min a 10 °C.
- Secado. Se procedió a secar el aislado a 35 °C, en estufa durante 14 h obteniéndose el aislado proteico de ñuña seco.
- Molienda. Se procedió a triturar el aislado con un mortero.
- Envasado. El aislado se colocó en frascos de polipropileno y se conservó a temperatura ambiente.

3.6. Obtención del hidrolizado enzimático del aislado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava

En la Figura 3, se presenta el diagrama de flujo de la hidrolisis enzimática del aislado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava (Yust y otros, 2003).

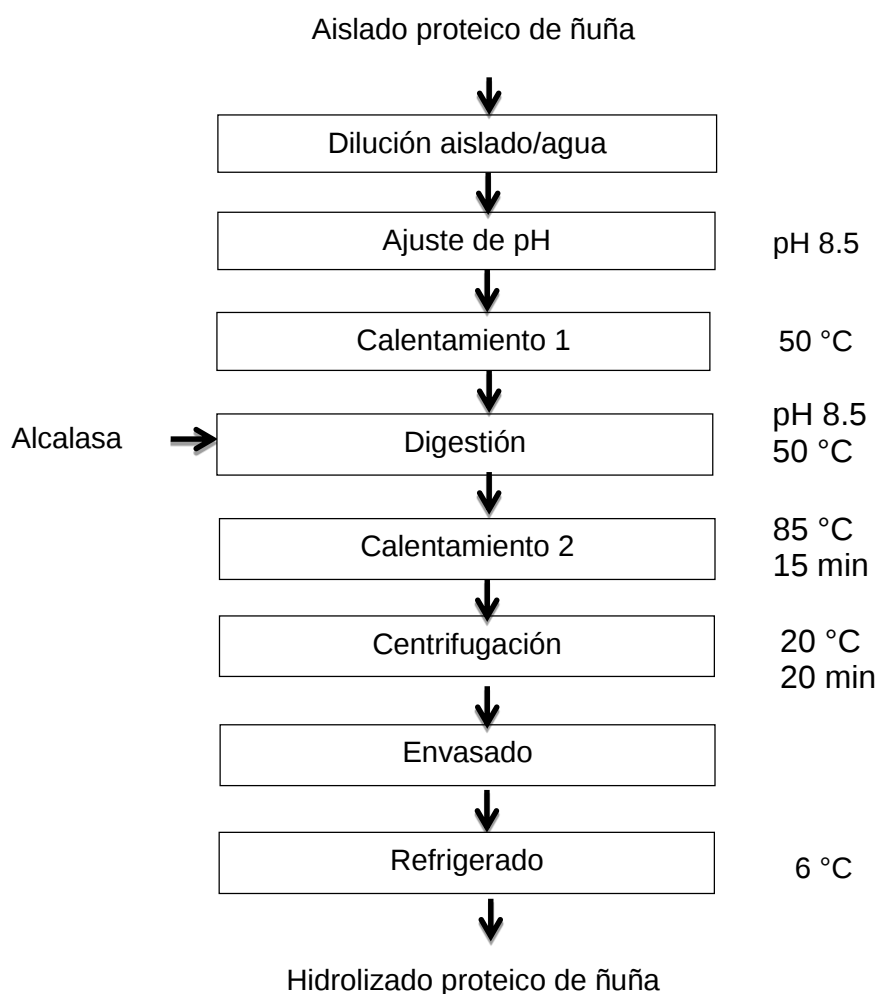


Figura 3. Diagrama de flujo de la hidrolisis enzimática del aislado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava

A continuación, se describe cada operación del diagrama de flujo de la Figura 3.

- Dilución aislado/agua. Se empleó como sustrato una solución de aislado proteico en agua, en una relación 1:10 (p/v).
- Ajuste de pH. Se ajustó el pH a 8.5 con NaOH 1 N.
- Calentamiento 1. Se calentó la solución a una temperatura de 50 °C.
- Digestión. Se efectuó en un vaso precipitado de 150 mL, empleando la enzima alcalasa a 3, 5 y 7 % en buffer fosfato a 15, 30 y 60 min, con una relación enzima:sustrato 1:10 (v/v). Se empleó un termómetro para controlar la temperatura (50 ± 3 °C) e NaOH para ajustar el pH a 8.5. Los hidrolizados se mantuvieron en agitación constante a 150 rpm.
- Calentamiento 2. El hidrolizado se colocó en un baño termostático seco a 85 °C por 15 min para detener la hidrólisis.
- Centrifugación. Se centrifugó a 9000 rpm por 30 min a 20 °C y se recogió el sobrenadante.
- Envasado. Los hidrolizados, que correspondieron a la porción líquida, se trasvasaron a tubos de polipropileno.
- Refrigerado. Los tubos con los hidrolizados se almacenaron en refrigeración a 6 °C.

3.7. Determinación de proteínas

Se usó fue el método Kjeldahl (AOAC, 1997) para determinar el porcentaje de proteínas de la harina de ñuña y el aislado proteico, considerando 5.71 como factor de conversión del nitrógeno a proteína.

El porcentaje de proteínas se calculó mediante la ecuación 2:

$$\% P = \frac{G \times N \times 14 \times f \times 100}{m} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

%P: Porcentaje de proteína

G: Gasto de HCl en la muestra analizada (mL)

f: Factor de conversión (5.71)

N: Normalidad del NaOH de titulación

m: Muestra (mg)

3.8. Grado de hidrólisis de proteínas

El grado de hidrólisis (% GH) se determinó con el método reportado por Kim y otros (1990). Se midió la cantidad de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 10% y su proporción con respecto a la cantidad de nitrógeno total en la suspensión del aislado proteínico según la ecuación 3.

$$\%GH = \frac{\text{Nitrógeno soluble en TCA al 10\%}}{\text{Nitrógeno total}} \times 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

Para determinar la cantidad de nitrógeno soluble en TCA, se midió 10 mL del hidrolizado y se mezcló con 10 mL de TCA al 10% durante 20 min. Esta mezcla se centrifugo a 9000 rpm por 15 min a 10 °C y el nitrógeno en el sobrenadante se determinó por el método Kjeldahl (AOAC, 1997). El nitrógeno total se midió tomando 10 mL de la solución

de concentrado proteico al 10% y se le determinó el contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl (AOAC, 1997).

3.9. Acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus*

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los hidrolizados proteicos de ñuña, se empleó el método Kirby-Bauer desarrollado por Rojas y otros (2005).

Preparación de la cepa. La cepa inicial de *Staphylococcus aureus* fue sembrada en tubos con agar soya tripticasa (TSA), incubada a 37 °C por 24 h.

Preparación del inóculo. Se retiró de los tubos las colonias jóvenes de *Staphylococcus aureus* y se sumergieron en 5 mL de caldo nutritivo hasta que la turbidez del medio fue equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland, cuya turbidez correspondió a la concentración 10^8 Ufc/mL.

Preparación de los discos. Los discos de papel filtro fueron sumergidos en los hidrolizados proteicos de ñuña durante 3 h.

Método Kirby-Bauer. Se midió 0.1 µL del inóculo y se colocó en la superficie de las placas de agar Müller Hinton a temperatura ambiente. Se colocó 8 discos por cada tratamiento (4 discos por placa). Las placas fueron incubadas invertidas a 37 °C por 24 h. Posteriormente se midieron los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los discos.

3.10. Métodos estadísticos

El estudio correspondió a un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 3 con 3 repeticiones.

Para el análisis de los datos del grado de hidrólisis y acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* se utilizó la prueba de Levene, para determinar la homogeneidad de varianzas de los datos experimentales; posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANVA), seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Duncan, mediante la formación de subgrupos, y determinar el mejor tratamiento.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de confianza del 95%. Para procesar los datos se utilizó el software especializado Statistical Package for the Social Science (SPSS) versión 20.0.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización proximal del aislado proteico de frijol nuña variedad pava

La caracterización proximal de la harina y aislado proteico de frijol nuña se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Composición proximal de la harina y concentrado proteico de frijol nuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava

Componente	Harina (%)	Aislado Proteico (%)
Humedad	10.50	10.21
Proteínas	17.81	73.72
Cenizas	5.36	9.34

Los porcentajes de humedad de la harina y el aislado proteico de nuña fueron mayores a los reportados por Bojórquez-Balam y otros (2012), los cuales obtuvieron 4.75% en harina y 5.28% en el aislado proteico de frijol lima (*P. lunatus*). De igual manera Chavan y otros (2001) reportaron valores de 2.83% en aislado proteico de frijol chícharo costero y Betancur-Ancona y otros (2009) de 8.6% en aislado proteico de frijol lima (*P. lunatus*).

Los valores de ceniza obtenidos para harina y aislado proteico de nuña fueron mayores a los reportados por Cruz-Cervera y otros (2010) quienes obtuvieron 3.56% en harina y 7.12% en aislado proteico de frijol terciopelo.

Corzo y otros (2000) obtuvieron un valor de 1.84% en aislado proteico de frijol terciopelo y Betancur-Ancona y otros (2009) 2.8% en

harina y 4.2% en aislado proteico de frijol pallar. Así mismo, Chel y otros (2002) obtuvieron valores de 2.79% en harina y 4.16% en aislado proteico de frijol blanco (*C. ensiformis*), los cuales son inferiores a los obtenidos en esta investigación.

De acuerdo con Ruiz-Ruiz y otros (2012), el método de extracción influye en el contenido final de cenizas de los aislados proteicos, razón que explicaría la diferencia entre los valores obtenidos en este investigación con respecto a otras.

Los valores obtenidos de proteínas fueron semejantes a los reportados por Betancur-Ancona y otros (2009), los cuales reportaron 71.13% en aislado proteico de frijol terciopelo y Chel-Guerrero y otros (2002) 73.75% en frijol blanco (*Canavalia ensiformis*). De igual manera, Torruco (2009) obtuvo valores en harina y aislado proteico de frijol lima de 26 y 71.8% respectivamente

Cruz-Cervera y otros (2010) obtuvieron un valor de 50.33% en aislado de frijol terciopelo; Tello y otros (2010) reportaron 67.3% en aislado proteico de frijol lima (*P. lunatus*) y Ruiz-Ruiz y otros (2012) 21.7% en harina y 67.7% en aislado proteico de frijol común (*P. vulgaris*), valores inferiores a los obtenidos en esta investigación.

Vioque y otros (2001) reportaron un contenido 83.4% de proteínas en aislado proteico de frijol garbanzo, valor superior al obtenido en esta investigación.

La variabilidad del contenido de proteínas hallados en la harina de leguminosa en este estudio, con respecto, a otros investigadores tal vez se deba a las condiciones de cultivo, madurez del grano y la composición original de las variedades (Chel-Guerrero y otros, 2002).

Con respecto al contenido de proteínas en los aislados y la diferencia con otras investigaciones es explicada por Devappa y Swamylingappa (2008), quienes mencionan que factores como el tamaño de partícula de la harina, el método de extracción, relación harina: disolvente, velocidad de agitación, y el número de extracciones por etapa pueden afectar la recuperación total de la proteína en el aislado. Es importante considerar que altos contenidos de proteína en los aislados favorece la obtención rendimientos óptimos en los hidrolizados.

4.2. Grado de hidrólisis en el hidrolizado proteico de frijol nuña variedad pava

En la Figura 4, se observa un incremento en el GH al aumentar la concentración de alcalasa, los valores oscilaron de 13.86 a 58.61%. Este comportamiento es explicado por Cruz-Cervera y otros (2010) quienes observaron que el aumento de la concentración de enzima, con la concentración de sustrato empleada tiene una correlación positiva, obteniendo grado de hidrólisis más altos en la solución con mayor concentración de enzima.

También se observa en la Figura 4, que los GH obtenidos en los diferentes tratamientos se incrementaron conforme aumento el tiempo de digestión, este comportamiento es similar a lo reportado por Lqari y otros (2005) quienes observaron que el grado de hidrólisis se incrementa conforme aumenta el tiempo de digestión, obteniendo grados de hidrólisis entre el 4% y 11% desde los de 20 hasta los 60 min, empleando alcalasa a una concentración de 0.01 Unidades Anson/g de enzima (AU/g) en harina de altramuz azul.

Las curvas de hidrolisis que se observan en la Figura 4 muestran un tramo de máxima pendiente en los primeros 30 min, en el cual se produce un incremento del grado de hidrolisis y a partir de ese momento el grado de hidrolisis sigue aumentando pero en menor magnitud (Aurrekoetxea y Perera, 2002).

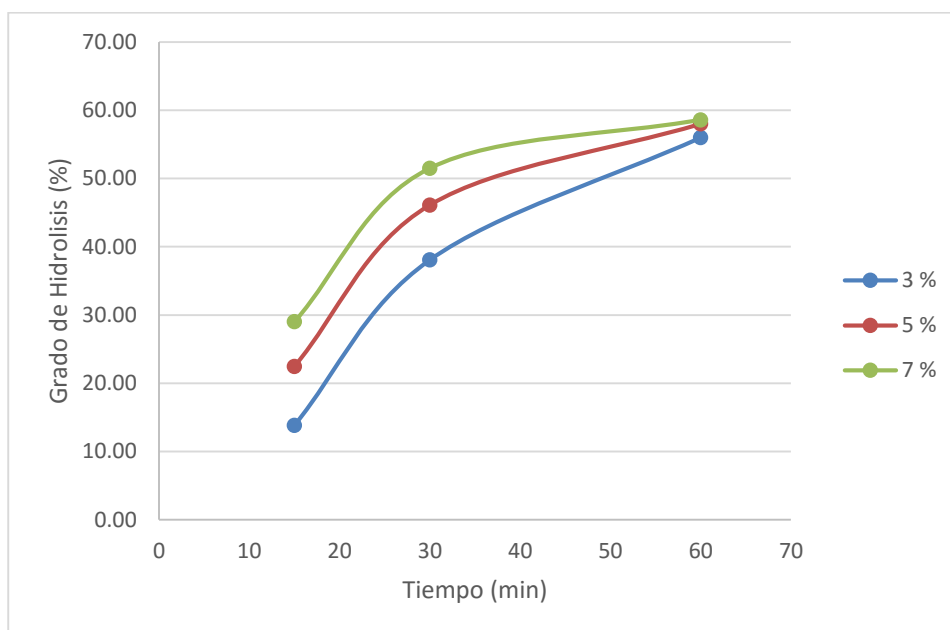


Figura 4. Grado de hidrolisis en el hidrolizado proteico de frijol nuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava en función a la concentración de alcalasa y tiempo de digestión.

Adler-Niessen (1986) y Márquez y Fernández (1993) mencionan que una característica común de los sistemas enzimas/proteínas en primer orden es la inhibición del sustrato y en segundo orden la desactivación de la enzima con respecto a su concentración y dependiendo de la concentración del sustrato, por lo que, el efecto de hidrólisis disminuye con el tiempo, lo cual explicaría la tendencia de las curvas de hidrolisis reportadas en esta investigación.

Con propósito comparativo se tiene que Aurrekoetxea y Perera (2002) emplearon concentraciones de 1, 3 y 5% de bioproteasa LA450 en 30 min de digestión en residuos cocidos de pescado, obteniendo grados de hidrólisis de 10.37, 24.33 y 34.58% respectivamente, valores semejantes se lograron en este estudio para una concentración enzimática de 3% y 30 min (38.08 %).

Cruz-Cervera y otros (2010) observaron que la hidrólisis se incrementó con el aumento en la concentración de alcalasa desde 0.03 a 0.3 AU/g y con el tiempo de digestión de 15, 30 y 90 min en frijol terciopelo, obteniendo grados de hidrólisis desde 9.36% a los 15 min y con una concentración enzimática de 0.03 AU/g hasta de 19.50 % a los 90 min y con una concentración enzimática de 0.3 AU/g. Las unidades AU/g se basan en el método de medición de la actividad enzimática (Anson) el cual es reportado en la ficha técnica de la enzima (AU/g de enzima). Estos valores de concentración son inferiores a los trabajados en esta investigación para los tiempos citados y la diferencia radicaría en la concentración enzimática.

Torruco (2009) observó grados de hidrólisis diferentes empleando las mismas condiciones de hidrólisis (concentración enzimática de 0.3 AU/g) y la misma enzima (alcalasa) para 2 leguminosas, obteniendo grados de hidrólisis en Frijol lima (*P. lunatus*) de 29.02 % a los 15 min, 31.47% a los 30 min y 32.69% a los 60 min de reacción y en Frijol jamapa (*P. vulgaris*) 41.78 % a los 15 min, de 49.48 % a los 30 min y 43.36% a los 60 min , que en comparación a los resultados obtenidos en esta investigación, los valores son superiores a los 15 min aún en la mayor concentración (7%) e inferiores a los 30 y 60 min de digestión.

Espinosa (2006) encontró un grado de hidrólisis de 13.61% a los 15 min de reacción empleando alcalasa a una concentración de 0.3 AU/g en frijol x'pelón (*Vigna unguiculata*). Valores semejantes se obtuvieron en esta investigación al mismo tiempo con una contracción enzimática de 3%.

Intiquilla (2015) alcanzó un grado de hidrólisis de 15.37, 28.49 y 39.60% a los 15, 30 y 60 min respectivamente en frijol pajuro, empleando Alcalasa a 2.4 AU/g, valores semejantes se obtuvieron en este estudio para los tratamientos 3% y 15 min, 7% y 15 min y 3% y 30 min.

Betancur-Ancona y otros (2009) reportaron grados de hidrólisis en los primeros 10 min iniciada la reacción en hidrolizados proteicos de soya y frijol lima (*P. lunatus*) de 15 y 16% respectivamente, empleando alcalasa a una concentración de 0.3 AU/g. Valores semejantes fueron encontrados en esta investigación en el tratamiento 3% y 15 min.

Segura-Campos y otros (2010) obtuvieron un grado de hidrólisis mediante la proteólisis de frijol lima de 6.68% a los 30 min con Alcalasa a una concentración de 2.4 AU/g, que en comparación a los resultados de esta y otras investigaciones, este valores es inferior; aun encontrándose la enzima sin diluir y a un tiempo considerable de digestión. La diferencia entre los grados de hidrólisis, puede ser resultado de factores como la concentración de sustrato, concentración de enzima, la relación enzima/sustrato, el tiempo de digestión, condiciones fisicoquímicas como el pH y la temperatura así como la actividad enzimática, es decir su actividad específica, tipo de actividad y método de medición (Segura-Campos y otros, 2010).

En el Cuadro 4, se presenta la prueba de Levene aplicada a los valores del grado de hidrólisis, la cual demostró que en los resultados existió homogeneidad de varianzas ($p > 0.05$), por lo que, se procedió a realizar el análisis de varianza y, posteriormente, la prueba de Duncan el mejor tratamiento.

Cuadro 4. Prueba de homogeneidad de varianzas para el grado de hidrólisis del hidrolizado proteico de frijol nuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava en función a la concentración de alcalasa y tiempo de digestión

Variable	Estadístico de Levene	p
Grado de hidrólisis	1.192	0.357

$p > 0.05$, existe homogeneidad de varianzas

El Cuadro 5 muestra el análisis de varianza para el grado de hidrólisis en el hidrolizado proteico de ñuña. Se observa que la concentración de alcalasa, el tiempo de digestión y la interacción concentración de alcalasa - tiempo de digestión presentaron efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el grado de hidrólisis en el hidrolizado proteico de ñuña.

Cuadro 5. Análisis de varianza para el grado de hidrólisis del hidrolizado proteico de frijol nuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava en función a la concentración de alcalasa y tiempo de digestión

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p
Ce	6571.929	8	821.491	821.491	0.000
t	2.069	2	0.573	0.573	0.000
Ce*t	0.923	16	0.058	0.058	0.000
Error	0.00	0			
Total	657.998	26			

p < 0.05, existe homogeneidad de varianzas

Ce: Concentración de alcalasa

t: tiempo de digestión

En el Cuadro 6, se observa la prueba de Duncan de los valores de grado de hidrólisis del hidrolizado proteico de ñuña en función a la concentración de alcalasa y tiempo de digestión. Se obtuvieron 9 subgrupos, donde el subgrupo 9 tiene el más alto grado de hidrólisis, correspondiente al tratamiento concentración de alcalasa 7% y tiempo de digestión 60 min, con valor de grado de hidrólisis de 58.62

Cuadro 6. Prueba de Duncan aplicada al grado de hidrolisis del hidrolizado proteico de frijol nuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava en función a la concentración de alcalasa y tiempo de digestión

Ce (%)	t (min)	Subgrupos								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
3	15	13.86								
5	15		22.49							
7	15			29.02						
3	30				38.08					
5	30					46.13				
7	30						51.51			
3	60							56.00		
5	60								58.02	
7	60									58.62

Ce: Concentración de alcalasa

t: tiempo de digestión

4.3. Acción inhibitoria del hidrolizado proteico de frijol nuña variedad pava frente a *Staphylococcus aureus*

En la figura 5, se observa una disminución de la acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* al aumentar la concentración de alcalasa y el tiempo de digestión. Los hidrolizados a 60 min de digestión no tuvieron efecto inhibitorio sobre dicha bacteria.

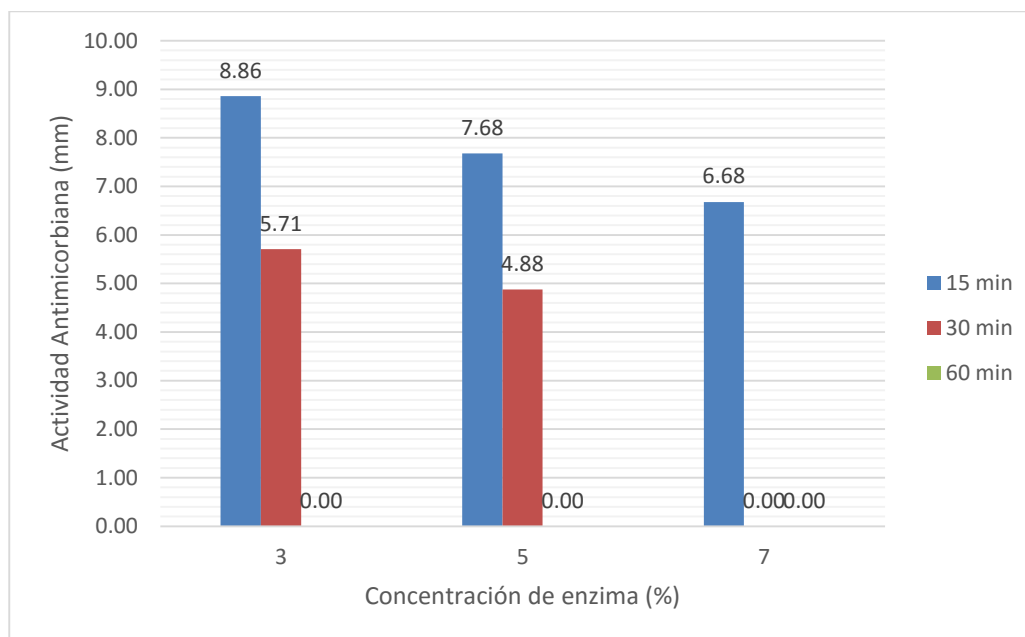


Figura 5. Acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* en el hidrolizado proteico de frijol nuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava en función a la concentración de alcalasa y tiempo de digestión

El comportamiento del hidrolizado, en cuanto a la inhibición del crecimiento bacteriano, probablemente se debió a la presencia de péptidos con actividad antimicrobiana, generados durante la hidrólisis enzimática (Rivas-Santiago y otros, 2006). Korhonen y Pihlanto (2003) afirman que la modificación enzimática puede generar compuestos con actividad antimicrobiana como los péptidos.

Rocha y otros (2012) reportaron que los hidrolizados de las caseínas bovina y ovina, empleando 120 μ L extracto crudo de *Salpichroa organifolia* durante 10 min, presentaron efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus*. Resultados semejantes fueron obtenidos por Christman (2010) para proteínas de caseína hidrolizadas con pepsina frente a *E. coli* O177:H7, donde observó que a menor grado de hidrólisis suele obtenerse

mayor actividad antimicrobiana, ya que se generan péptidos de mayor peso molecular responsables de su bioactividad. De igual manera, Ayob y otros (2009) comprobaron que fracciones peptídicas de los hidrolizados de torta de palma presentan actividad antimicrobiana contra *Bacillus cereus*.

De acuerdo con Bojorquez-Balam y otros (2012) a menor grado de hidrólisis suele obtenerse mayor actividad antimicrobiana sobre *S. aureus* en aislados proteicos de frijol lima con el sistema enzimático pepsina-pancreatina a una concentración 0.1 g de enzima/proteína a 10 min, lo cual explicaría porque los hidrolizados con grados de hidrólisis mayores al 50% correspondientes a los tratamientos concentración de alcalasa 7% y tiempo de digestión 30 min y los tratamientos a los 60 min de digestión, no presentaron efecto inhibitorio.

La presencia de péptidos que presentaron carácter bioactivo en esta investigación es explicado por Kim y Wijesekara (2010), al señalar que el efecto antimicrobiano de un hidrolizado se debe a las características de los péptidos presentes, tales como la longitud de la cadena aminoacídica, la composición de la secuencia, estructura secundaria, hidrofobicidad y carga neta. Sin embargo, Rivas-Santiago y otros (2006) argumentan que hay dos características comunes en la mayoría de los péptidos antimicrobianos sin importar su estructura o tamaño: 1) tienen carga positiva debido a la presencia de un gran número de básicos (en su mayoría lisina y arginina), y 2) aproximadamente el 50% de los aminoácidos que los constituyen son hidrofóbicos (gran presencia de prolina).

Trillos (2014) demostró que los hidrolizados de la hoja de maní forrajero con papaina a 835 µg /mL de proteína durante 5 h, mostraron efecto bacteriostático sobre *S. aureus* con un halo de inhibición perceptible de 22 mm, valor superior al encontrado en esta investigación. La diferencia radicaría en la separación de las fracciones peptídicas, puesto que,

fracciones con peso molecular específico presentan mayor actividad biológica (Rivas y Soriano, 2006).

En el Cuadro 7, se presenta la prueba de Levene aplicada a los valores de acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus*, denotándose la existencia de homogeneidad de varianzas ($p > 0.05$), por lo tanto, se procedió a realizar el análisis de varianza y posteriormente la prueba de Duncan para determinar la tendencia hacia el mejor tratamiento.

Cuadro 7. Prueba de homogeneidad en varianzas para la acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* en el hidrolizado proteico de frijol nuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava

Variable	Estadístico de Levene	p
Acción inhibitoria frente a <i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	2.423	0.067
$p > 0.05$, existe homogeneidad de varianzas		

El Cuadro 8 muestra el análisis de varianza para la acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* en el hidrolizado proteico de ñuña.

El análisis de varianza muestra que la concentración de alcalasa, el tiempo de digestión y la interacción concentración de alcalasa - tiempo de digestión, presentaron efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus*.

El Cuadro 8. Análisis de varianza para la acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* en el hidrolizado proteico de ñuña

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p
Ce	334.959	8	41.870	7.728	0.000
t	0.170	2	0.085	8.122	0.000
Ce*t	0.157	16	0.010	10.667	0.000
Error	0.00	0			
Total	335.285	26			

$p < 0.05$, existe homogeneidad de varianzas

Ce: Concentración de alcalasa

t: tiempo de digestión

Ponce (2015) empleo 0.4, 0.6, 0.8 y 1 g de wobenzima a 1, 2, 3 y 4 h de digestión para hidrolizar el aislado proteico de vísceras de abulón y observó que la concentración de enzima y el tiempo de digestión son factores que determinan la obtención de péptidos con actividad biológica, puesto que obtuvo fracciones de los hidrolizados que presentaron efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano sobre *S. aureus* y otros no. Argumentando que podría haber otros componentes sin hidrolizar y carbohidratos que actuarían como fuente de alimento para los microorganismos (Ayob y otros, 2009). Lo anterior pudo haber sido uno de los factores por los cuales no se obtuvieron resultados de inhibición bacteriana en los tratamientos con concentración de alcalasa 7% y tiempo de digestión 30 min y aquellos con 60 min de digestión.

En el Cuadro 9, se observa la prueba de Duncan aplicada a los datos de la acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus*, en función a la concentración de alcalasa y el tiempo de digestión. Se formaron 6 subgrupos, donde el subgrupo 6 tiene el más alto valor de acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* (8.87 mm), correspondiente al tratamiento con concentración de alcalasa de 3 % y tiempo de digestión de 15 min.

Valores semejantes a los obtenidos en esta investigación fueron reportados por Ariza y otros (2010), quienes evaluaron la actividad antimicrobiana de péptidos empleando alcalasa a una concentración de 0.3 AU/mL y 120 min, en frijol azufrado higuera frente a *S. aureus* y obtuvieron diámetros de los halos de inhibición de 8.10 a 9.50 mm y concluyeron que los hidrolizados poseen una mezcla de péptidos de diversos pesos moleculares responsables de su bioactividad.

Cuadro 9. Prueba de Duncan aplicada a acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* del hidrolizado proteico de frijol nuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava en función a la concentración de alcalasa y tiempo de digestión

Ce (%)	t (min)	Subgrupos					
		1	2	3	4	5	6
7	60	.00					
5	60	.00					
3	60	.00					
7	30	.00					
5	30		4.87				
3	30			5.73			
7	15				6.70		
5	15					7.67	
3	15						8.87

Ce: Concentración de alcalasa

t: tiempo de digestión

V. CONCLUSIONES

La concentración de alcalasa, el tiempo de digestión y la interacción concentración de alcalasa – tiempo de digestión tuvieron efecto significativo sobre el grado de hidrolisis y acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* en el hidrolizado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava.

La concentración de alcalasa 7% y tiempo de digestión 60 min presentó mayor grado de hidrólisis (58,62%) y no demostró acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* en el hidrolizado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava.

El mejor tratamiento fue el de concentración de alcalasa 3% y tiempo de digestión 15 min el cual presentó un grado de hidrolisis de 13.86% y la mayor acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* (8.87 mm) en el hidrolizado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava.

VI. RECONDACIONES

Investigar por electroforesis sobre el contenido y perfil de los péptidos en el hidrolizado proteico de ñuña.

Medir la acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* empleando el método concentración mínima inhibitoria o el análisis de imágenes.

Verificar la actividad enzimática de la alcalasa empleando métodos reconocidos para uniformizar unidades de concentración enzimática.

Investigar la actividad antioxidante del hidrolizado proteico de ñuña.

Optimizar el sistema de hidrólisis utilizando un bioreactor para controlar las condiciones de digestión como el pH y la temperatura.

Separar las fracciones de los hidrolizados proteicos para determinar la fracción responsable de la actividad antimicrobiana.

Investigar la aplicación del hidrolizado proteico de ñuña en la industria alimentaria.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Acuña, A. 2001. Estudio de prefactibilidad técnico económico para la obtención de hidrolizado de proteína vegetal a partir de lupino. Universidad de la Frontera, Chile.

Adler-Nissen, J. y Olsen, H. 1979. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. American Chemical Society Publications, 92:125-46.

Adler-Nissen J. 1986. Enzymatic hydrolysis of food proteins. London, Inglaterra.

Agyei, D. y Danquah, M. 2011. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. Biotechnology, 29(3):272–277.

Ahn, C.; Jeon, J.; Kim, Y. y Je, J. 2012. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by Alcalase hydrolysis. Process Biochemistry, 47(12):2240–2245.

AOAC. 1997. Method 954.01. En William Horwitz (Ed.) Official methods of analysis (17th ed). Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C., Estados Unidos.

Ariza, T., Ramírez, M., Valencia Del Toro, G., Oliver, C. y Yañez, J. 2010. Evaluación de la actividad antimicrobiana determinada por difusión en agar de péptidos de frijol azufrado higuera (*Phaseolus vulgaris* L.). Fondo Mixto del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México.

Aurreskoetxea, G. y Perera, M. 2002. Aprovechamiento de recursos pesqueros infrautilizados para la obtención de alimentos mejorados para el cultivo de peces. Boletín del Instituto Español de Oceanografía, 18(4):87-93.

Ayob, M., Nee, Y., San., K., Leong, K. y Osmar, A. 2009. Antimicrobial effects of palm kernel cake protein hidrolysates. Prosiding Seminar Kimia Bersama. Unit Kesenian Minangkabau Institut Teknologi Bandung, 35:1-13.

Badui, D. 1990. Química de alimentos. Editorial Alhambra Mexicana, Segunda edición. México D.F., México.

Barca A.; Ruiz A. y Jara M. 2000. Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. Journal of Food Science, 65(2):246–253.

Benítez, R., Ibarz, A. y Pagan, J. 2008. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires, 42(2):227–236.

Betancur-Ancona, D., Martínez-Rosado, R. Corona-Cruz, A., Castellanos-Ruelas, A., Jaramillo-Flores, M. y Chel-Guerrero, L. 2009. Functional properties of hydrolysates from *Phaseolus lunatus* seeds. International Journal of Food Science and Technology, 44(1):128-137.

Biziulevicius, G., Kislukhina, O., Kazlauskaite, J. y Zukaite, V. 2006. Food-protein enzymatic chydrolysates posses both antimicrobial and immunostimulatory activities a “cause and effect” theory of bifuntionality. FEMS Immunol Med Microbiol, 46(1):31-38.

Bojórquez-Balam, E., Ruiz- Ruiz, J., Segura-Campos, M., Betancur-Ancona, D. y Chel-Guerrero, L. 2012. Actividad antimicrobiana de fracciones peptídicas de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). Revista de la Facultad de Ingeniería Química, 52(12)11-18.

Caessens, P.; Daamen, W., Gruppen, H., Visser, S. y Voragen, A. 1999. β -Lactoglobulin hydrolysis. II. Peptide identification, SH/SS exchange,

and functional properties of hydrolysate fractions formed by the action of plasmin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2):80-90.

Chaplin, L., y Andrew, A. 1989. Functional properties of peptides derived from casein proteolysis. *Journal of Dairy Research*, 56(12):544-552.

Chavan, U., McKenzie, D. y Shahidi, F. 2001. Functional properties of protein Isolates from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *Food Chemistry*, 74(2):177-187.

Chel-Guerrero, L.; Pérez-Flores, V.; Betancur-Ancona, D. y Dávila-Ortiz, G. 2002. Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5):584-591.

Christman, J. 2010. Antimicrobial activity of casein hydrolysates against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. Master's thesis. University of Tennessee, Estados Unidos.

Cho, J., Unklesbay, N., Hsieh, F. y Clarke, D. 2004. Hydrophobicity of Bitter Peptides from Soy Protein Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:5895-5901.

Clemente, A.; Vioque, J.; Sánchez-Vioque, R.; Pedroche, J. y Millán, F. 1999. Production of extensive chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates with reduced antigenic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:3776-3781.

Corzo, L., Chel, L. y Betancur, D. 2000. Extracción de las fracciones de almidón y proteína del grano de la leguminosa *Mucuna pruriens*. *Tecnología Ciencia y Educación*, 15(1):37-41.

Cruz-Cervera, G.; Castellanos-Ruelas, A.; Rosado-Rubio, G. y Chel-Guerrero, L. 2010. Capacidad antioxidante de hidrolizados enzimáticos

de la proteína de frijol terciopelo *Mucuna pruriens*. Revista de la Facultad de Ingeniería Química, 50(12):17-25.

Cudic, M. y Otvos, L. 2002. Intracellular targets of antibacterial peptides. Current Drug Targets, 3(2):101–106.

Dathe, M. y Wieprecht, T. 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. Biochim Biophysica Acta, 1462(1-2): 71–87.

Devappa, R. y Swamylingappa, B. 2008. Biochemical and nutritional evaluation of Jatropa protein isolate prepared by steam injection heating for reduction of toxic and antinutritional factors. Journal of the Science of Food and Agriculture, 88(5): 911–919.

Doucet, D.; Otter, D.; Gauthier, S. y Foegeding, E. 2003. Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(21):6300-6308.

Dubin, A., Mak, P., Dubin, G., Rzychon, M., Stec, J., Wladyka, B., Maziarka, K. y Chmiel, D. 2005. New generation of peptide antibiotics. Acta Biochimica Polonica, 52(3):633-638.

Espinosa, G. 2006. Hidrolisis enzimática del concentrado proteico de *Vigna unguiculata* para su incorporación a un alimento para régimen especial. Tesis para optar el grado de Maestría. Universidad Autónoma de Yucatán. Yucatán, México.

Fennema, O. 2000. Química de alimentos. Editorial Acribia S.A. Segunda edición. Zaragoza, España.

Freitas, R.; Teixeira, A. y Ferreira, R. 2004. Characterization of the proteins from *Vigna unguiculata* seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(6):1682-1687.

Frokjaer, S. 1994. Use of hydrolysates for protein supplementation. Food Technology, 48:86-88.

Gamarra, F.; Puma, J. y Arana, J. 1996. Q'osco Poroto INIA- primera variedad de frijol reventón para los valles interandinos de la sierra – Cuzco. Agro Enfoque. 81^a Ed. Lima, Perú.

Girón-Calle, J.; Pedroche, J.; Rodriguez, J. y Millán, F. 2003. Proteínas alimentarias y coloides de interés industrial. Universidad de Sevilla. Sevilla, España.

Govindaraju, K. y Srinivas, H. 2007. Controlled enzymatic hydrolysis of glycinin: Susceptibility of acidic and basic subunits to proteolytic enzymes. Food Science and Technology, 40(6):1056-65.

Hernández, B., Dávalos, A. Bartolomé, B. y Lourdes, A. 2005. Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from Lactalbumin and α -Lactoglobulina. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. J. Agric. Food Chem., 53(9):588-593.

Intiquilla, A. 2015. Evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas de hidrolizados proteínicos obtenidos a partir de semillas de *Erythrina edulis*. Tesis para optar al título profesional de Licenciado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Jarpa-Parra, M., Bamdad, F., Wang, Y., Tian, Z., Temmelli, F. Han, J y Chen, L. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. Food Science and Technology, 57(2):461-469.

Jayaprakasha M. y Yoon, C. 2005. Characterization of physicochemical and functional behavior of enzymatically modified spray dried whey protein concentrate. *Milk Science International*, 60(3):30-35.

Kim, Y.; Park, W. y Rhee, C. 1990. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3):651-656.

Kim, S. y Wijesekara, I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive Peptides. *Journal of Functional Foods*, 2:1-9.

Ko, S.; Lee, J.; Byun, H.; Lee, S. y Jeon, Y. 2012. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from enzymatic hydrolysates of *Styela clava* flesh tissue. *Process Biochemistry*, 47(1):34–40.

Korhonen, H. y Pihlanto, A. 2003. Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16):1297-1308.

Lahl, W. y Braun, S. 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technology*, 48:68-71.

Li, X.; Han, L. y Chen, L. 2008. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(9):1660–1666.

Liu, J., Chen, M. y Lin, C. 2005. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *Journal Agric. Food Chem*, 52(7):2467-2474.

Liu, Q.; Kong, B.; Xiong, Y. y Xia, X. 2010. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry*, 118(2):403–410.

Lqari, H., Pedroche, J., Girón-Calle, J., Vioque, J. y Millán, F. 2005. Production of *Lupinus angustifolius* protein hydrolysates with improved functional properties. *Grasas y Aceites*. 56(2):135-140.

Mannheim, A., y Cheryan, M. 1992. Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69:1163-1169.

Márquez, M. y Fernández, C. 1993. Enzymic hydrolysis of vegetable Proteins: Mechanism and Kinetics. *Process Biochemistry*, 28:481-490.

Medrano, R. 1990. Obtención de principios nutricionales y terapéuticos de la semilla de tarwi. Universidad mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia.

Moure, A.; Domínguez, H. y Parajó J. 2005. Fractionation and enzymatic hydrolysis of soluble protein present in waste liquors from soy processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(19):7600–7608.

Najafian, L. y Babji, S. 2014. Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. Elsevier Ltd., 9(2):280–289.

Nalinanon, S.; Benjakul, S.; Kishimura, H. y Shahidi, F. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*, 124(4):1354–1362.

Panyam, D., y Kilara, A. 1996. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Science. & Technology*, 7:120-125.

Penta, A. y Xiong, Y. 2002. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. *Journal of Food Science*, 67(8):2952–2956.

Pommer, K. 1995. New proteolytic enzymes for the production of savory ingredients. *Cereal Foods World*, 40:745-748.

Ponce, X. 2015. Estudio del potencial bioactivo de las vísceras de abulón utilizando un modelo de digestión gastrointestinal in vitro. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste. La Paz, Bolivia.

Prieto, C. 2007. Diseño y optimización de un reactor de membrana discontinuo para la hidrólisis enzimática de proteínas. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Granada, España.

Rao, M., Tanksale, M., Ghatge, M. y Deshpande, V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3):597–635.

Rivas-Santiago, B., Sada, E., Hernández-Pando, R. y Tsutsumi, V. 2006. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública, México*. 84(1):62-71.

Rivera, M. 2006. Obtención, caracterización estructural y determinación de las propiedades funcionales de un aislado proteico de Quinoa orgánica (*Chenopodium quinoa*). Departamento de Ciencias y Tecnología Química. Universidad de Chile. Santiago de Chile, Chile.

Rocha, G., Francisco, K., Rosso, A. y Parisi, M. 2012. Péptidos con Actividad Antimicrobiana obtenidos de Proteínas Lácteas con Extractos de *Salpichroa organifolia*. *Información Tecnológica*, 24(2):23-30.

Rojas, J.; García, M. y López, J. 2005. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales.

Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 4(2):28-32. Universidad de Santiago de Chile. Santiago, Chile.

Ruiz-Ruiz, J., Dávila-Ortíz, G., Chel-Guerrero, G. y Betancur-Ancona, D. 2012. Wet fractionation of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds and characterization of protein, starch and fibre fractions. Food Bioprocess and Technology, 5(1):1531-1540.

Segura-Campos, M., López-Von, G., Chel-Guerrero, L. y Betancur-Ancona, D. 2010. Calidad nutrimental de un hidrolizado proteínico de *Phaseolus lunatus* y su incorporación en una crema de zanahoria. Revista de la Facultad de Ingeniería Química, 50(12):9-16.

Silva, J. 2006. Obtención, caracterización y relación estructura-funcionalidad de un aislado proteico de quinua (*Chenopodium quinoa*) orgánica proveniente de la VI región de Chile. Departamento de Ciencia de Alimentos y Tecnología Química. Universidad de Chile. Santiago de Chile, Chile.

Soral-Smietana, M.; Swigon, A.; Amarowicz, R. y Sijtsma, L. 1998. The solubility of trypsin pea protein hydrolysates. Nahrung, 42:217-218.

Süle, E.; Tömösközi, S. y Hajós, G. 1998. Functional properties of enzymatically modified plant proteins. Nahrung 42:242-244.

Tardioli, P.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. y Giordano, R. 2003. Design of new immobilized-stabilized carboxypeptidase A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. Biotechnology Progress, 19(2):565-574.

Tello, R., Ruiz, J., Chel, L. y Betancur, D. 2010. Funcionalidad biológica de jugo de naranja incorporado con hidrolizado proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). Utilización de recursos naturales tropicales para el desarrollo de alimentos. Yucatán, México.

Tohme, J.; Toro, O.; Vargas, J. y Debouck, D. 1995. La variedad de los Andes beans ñuña comunes (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). Econ. Bot., 49, 78-95.

Toro, O.; Tohme, J. y Debouck, D. 1990. Wild frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), Descripción y distribución. CIAT. Annu Rept. Bean Improvement Coop. 38, 95-96.

Torrucó, J. 2009. Efecto antihipertensivo de fracciones peptídicas bioactivas obtenidas a partir de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y frijol jamapa (*Phaseolus vulgaris*). Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias de Alimentos. Universidad autónoma de Yucatán. Yucatán, México.

Trillos, A. 2014. Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto proteico crudo y su hidrolizado obtenidos a partir de hoja de maní forrajero, *Arachis pintoii* (fabaceae). Trabajo de grado como requisito parcial para optar por el título de pregrado en Biología. Universidad del Tolima. Tolima, Colombia.

Urrutia, W. 2010. Determinación de parámetros ópticos de extracción alcalina para la obtención de aislado proteico a partir de tarwi. Trabajo de Tesis en Ingeniería Agroindustrial. Universidad Nacional Micaela Bastidas. Apurímac, Perú.

Villanueva, A., Vioque, J., Raúl, S., Clemente, A. Bautista, J. y Millán, F. 2001. Caracterización bioquímica de hidrolizados enzimáticos a partir de un aislado proteico de *Lupinus mutabilis*. Instituto de la Grasa. Sevilla, España.

Vioque, J.; Sánchez-Vioque, R.; Clemente, A.; Pedroche, J. y Millán, F. 2000. Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. Journal of the American Oil Chemists' Society, 77:156.163.

Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. y Milán, F. 2001. Obtención de aplicaciones de hidrolizados proteicos. *Grasas y Aceites*, 52(2):132-136.

Vioque, J. y Milán, F. 2005. Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud. *CTC Alimentación*, 26(2):103-107.

Vioque, J., Pedroche, J., Yust, M., Lquari, H., Megias, C., Girón, J., Alaiz, M. y Millán, F. 2006. Péptidos bioactivos en proteínas vegetales de reserva. *Journal of Food Technology*, 52(3):99-102.

Yust, M., Pedroche, J., Girón, J., Alainz, M., Millan, F. y Vioque, J. 2003. Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chemistry*, 81:363-369.

ANEXOS

Anexo 1. Valores del grado de hidrólisis del hidrolizado proteico de frijol
ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava en función de la
concentración de alcalasa y tiempo de digestión

Tratamiento	N° de Repetición	mL de HCL	N	14	100	Peso de muestra (mg)	% Nitrógeno Soluble en TCA	% Nitrógeno Solución de Aislado proteico	% Grado de Hidrólisis
Muestra 1 (3% 15 min)	1° repetición	6.2	0.109	14	100	500	1.89	13.58	13.93
	2° repetición	6.3	0.109	14	100	500	1.92	13.73	14.00
	3° repetición	6.6	0.098	14	100	500	1.81	13.28	13.64
Muestra 2 (5% 15 min)	1° repetición	10.2	0.109	14	100	500	3.11	13.58	22.92
	2° repetición	10.1	0.109	14	100	500	3.08	13.73	22.44
	3° repetición	10.7	0.098	14	100	500	2.94	13.28	22.12
Muestra 3 (7% 15 min)	1° repetición	13	0.109	14	100	500	3.97	13.58	29.21
	2° repetición	13.1	0.109	14	100	500	4.00	13.73	29.11
	3° repetición	13.9	0.098	14	100	500	3.81	13.28	28.73
Muestra 4 (3% 30 min)	1° repetición	17.1	0.109	14	100	500	5.22	13.58	38.43
	2° repetición	17	0.109	14	100	500	5.19	13.73	37.78
	3° repetición	18.4	0.098	14	100	500	5.05	13.28	38.03
Muestra 5 (5% 30 min)	1° repetición	20.7	0.109	14	100	500	6.32	13.58	46.52
	2° repetición	20.6	0.109	14	100	500	6.29	13.73	45.78
	3° repetición	22.3	0.098	14	100	500	6.12	13.28	46.09
Muestra 6 (7% 30 min)	1° repetición	23.1	0.109	14	100	500	7.05	13.58	51.91
	2° repetición	23.2	0.109	14	100	500	7.08	13.73	51.56
	3° repetición	24.7	0.098	14	100	500	6.78	13.28	51.05
Muestra 7 (3% 60 min)	1° repetición	25	0.109	14	100	500	7.63	13.58	56.18
	2° repetición	25.3	0.109	14	100	500	7.72	13.73	56.22
	3° repetición	26.9	0.098	14	100	500	7.38	13.28	55.60
Muestra 8 (5% 60 min)	1° repetición	25.8	0.109	14	100	500	7.87	13.58	57.98
	2° repetición	26.1	0.109	14	100	500	7.97	13.73	58.00
	3° repetición	28.1	0.098	14	100	500	7.71	13.28	58.08
Muestra 9 (7% 60 min)	1° repetición	26.2	0.109	14	100	500	8.00	13.58	58.88
	2° repetición	26.5	0.109	14	100	500	8.09	13.73	58.89
	3° repetición	28.1	0.098	14	100	500	7.71	13.28	58.08

Anexo 2. Valores de la acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* en el hidrolizado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.)
variedad pava

Tratamiento	N° de Repetición	Valores (mm)
Muestra 1 (3% 15 min)	1° repetición	8.81
	2° repetición	9.06
	3° repetición	8.70
Muestra 2 (5% 15 min)	1° repetición	7.63
	2° repetición	7.88
	3° repetición	7.54
Muestra 3 (7% 15 min)	1° repetición	6.66
	2° repetición	6.86
	3° repetición	6.51
Muestra 4 (3% 30 min)	1° repetición	5.71
	2° repetición	5.86
	3° repetición	5.56
Muestra 5 (5% 30 min)	1° repetición	4.84
	2° repetición	5.01
	3° repetición	4.79
Muestra 6 (7% 30 min)	1° repetición	0.00
	2° repetición	0.00
	3° repetición	0.00
Muestra 7 (3% 60 min)	1° repetición	0.00
	2° repetición	0.00
	3° repetición	0.00
Muestra 8 (5% 60 min)	1° repetición	0.00
	2° repetición	0.00
	3° repetición	0.00
Muestra 9 (7% 60 min)	1° repetición	0.00
	2° repetición	0.00
	3° repetición	0.00

Anexo 3. Vistas fotográficas de la acción inhibitoria frente a
Staphylococcus aureus en el hidrolizado proteico de frijol
ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava



Figura A. Halos obtenidos a partir de la concentración de alcalasa 3 % y tiempo de digestión 15 min

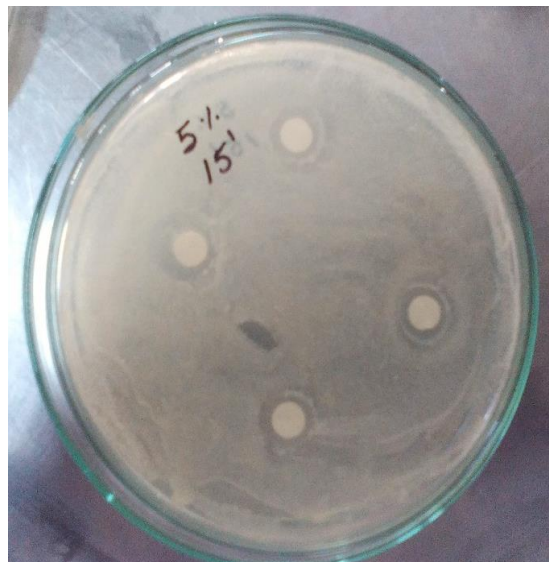


Figura B. Halos obtenidos a partir de la concentración de alcalasa 5 % y tiempo de digestión 15 min

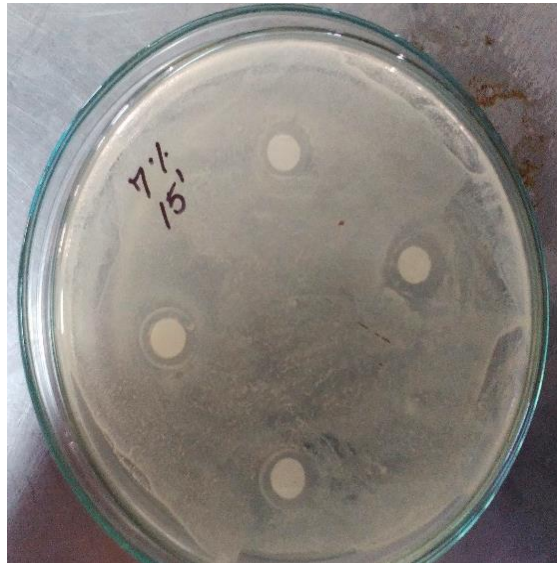


Figura C. Halos obtenidos a partir de la concentración de alcalasa 7 % y tiempo de digestión 15 min

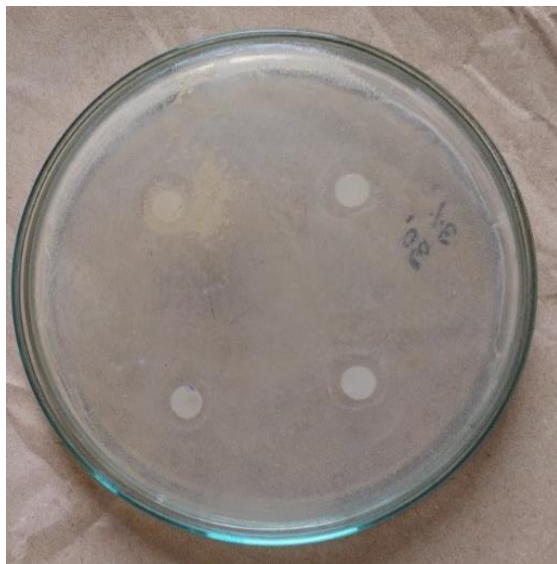


Figura D. Halos obtenidos a partir de la concentración de alcalasa 3 % y tiempo de digestión 30 min

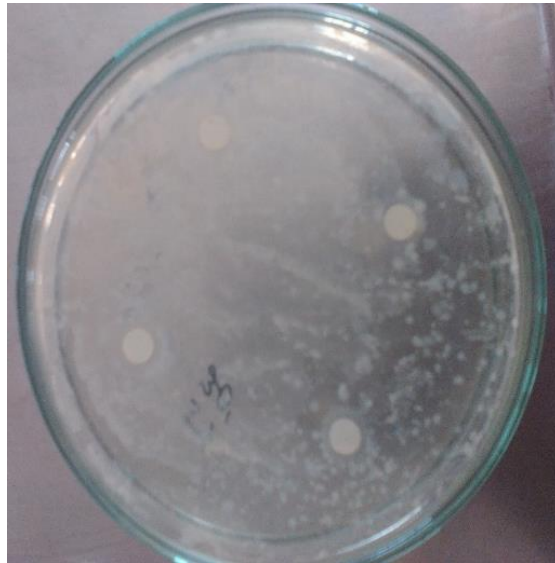


Figura E. Halos obtenidos a partir de la concentración de alcalasa 5 % y tiempo de digestión 30 min

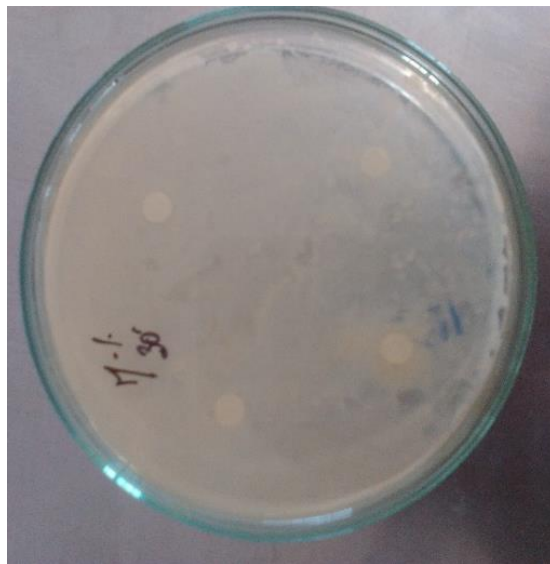


Figura F. Halos obtenidos a partir de la concentración de alcalasa 7 % y tiempo de digestión 30 min



Figura G. Halos obtenidos a partir de la concentración de alcalasa 3 % y tiempo de digestión 60 min

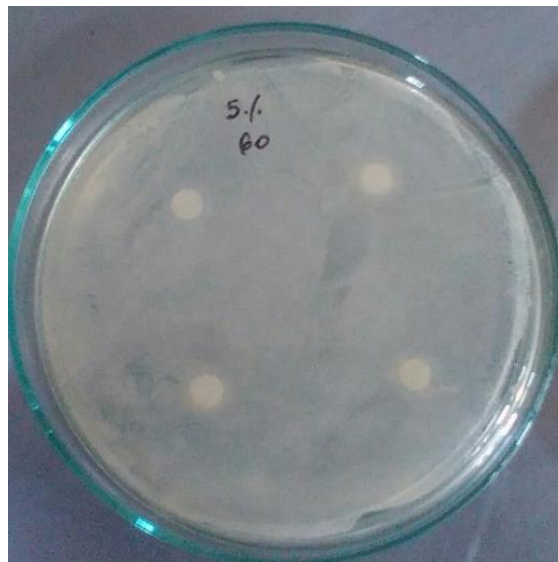


Figura H. Halos obtenidos a partir de la concentración de alcalasa 5 % y tiempo de digestión 60 min

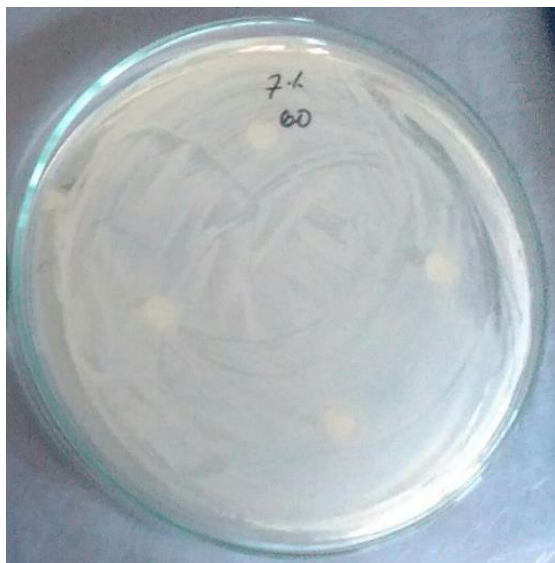


Figura I. Halos obtenidos a partir de la concentración de alcalasa 7 % y tiempo de digestión 60 min

Anexo 4. Ficha técnica de la enzima Alcalasa (delvolase)



Deltagen
del Perú S.A.

Código: AC-FT-PT-DTG010
Versión: 03
Fecha de Aprobación: Enero 2013

FICHA TÉCNICA DELVOLASE

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO: Producto enzimático elaborado para uso alimentario, contiene proteasa alcalina derivada a partir de una cepa seleccionada de *Bacillus licheniformis* GRAS. Número del producto 607.
Actividad estandarizada $\geq 560,000$ DU / g

COMPOSICIÓN:
Agente estabilizante: Benzoato de sodio y Sorbato de potasio (< 5g / l)

ESPECIFICACIONES:
SENSORIAL:

Aspecto	Líquido
Color	Marrón oscuro con posible presencia de Turbidez

FÍSICO-QUÍMICO:

pH	-	5,0 - 6,0
Metales pesados	ppm	< 30 (como Pb)
Plomo	ppm	< 5
Arsénico	ppm	< 3
Cadmio	ppm	< 0,5
Mercurio	ppm	< 0,5

MICROBIOLÓGICOS (*):

Reductores de sulfato	UFC / g	<30
Coliformes	UFC / g	<30
Salmonella	En 25 g	Ausente
Escherichia	En 25 g	Ausente
Staphylococcus Aureus	En 1 g	Ausente
Micotoxinas	UFC / g	Ausente
Recuento Total en placa	UFC / g	<5 * 10 ⁴

El producto cumple con las especificaciones generales para los preparados de enzimas alimentarias según lo Publicado por el JECFA, FCC IV y en francés "Arrêté enzima 5 de septiembre 1989" y con las normas de la FDA GMP actuales (21 CFR 110).

USO	Mercado de las aplicaciones de procesamiento de frutas: la hidrólisis de proteínas.
ALMACENAMIENTO	Conservar a una temperatura de 4°C – 8°C
TIEMPO DE VIDA ÚTIL	Cuando se almacena en las condiciones recomendadas, la pérdida de actividad será menor que 4% en un año.





