



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA DE QUÍMICA**

**“OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS Y SU HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA  
A PARTIR DE LA QUINUA AMARGA (*Chenopodium quinoa*)”**

**Trabajo de Titulación**

**Tipo:** Proyecto de Investigación

Presentado para otorgar el grado académico de:

**QUÍMICA**

**AUTORA:** ANGY LISBETH ESTRADA AROCA

**DIRECTOR:** Dr. GALO ALBERTO INSUASTI CASTELO MSc.

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2020**

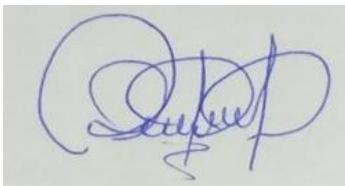
**@2020, Angy Lisbeth Estrada Aroca**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, **ANGY LISBETH ESTRADA AROCA** declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 20 de mayo del 2020.



**Angy Lisbeth Estrada Aroca**

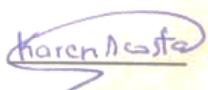
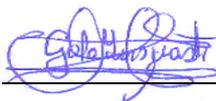
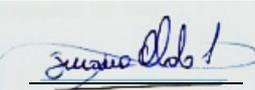
**CI: 060540711-3**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA DE QUÍMICA**

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo: Proyecto de Investigación, **OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS Y SU HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A PARTIR DE LA QUINUA (*Chenopodium quinoa*)**, realizado por la señorita: **ANGY LISBETH ESTRADA AROCA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, El mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
BQ. Karen Lisseth Acosta León M.S		
<b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>		<b>20-05-2020</b>
Dr. Galo Alberto Insuasti Castelo M.Sc.		
<b>DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN</b>		<b>20-05-2020</b>
Dra. Susana del Pilar Abdo López		
<b>MIEMBRO DE TRIBUNAL</b>		<b>20-05-2020</b>

## DEDICATORIA

El presente trabajo con fin investigativo lo dedico a toda mi familia en especial a mi hermana Gabriela Aymé, quien me supo acompañar en mi labor estudiantil, me supo guiar y ser mi fortaleza en aquellos momentos difíciles en los que sentí desmayar y Jared Matías mi fuente de inspiración y motivación. Es para mí es, una total satisfacción presentar el presente trabajo, el mismo que tiene impregnado el esfuerzo, sacrificio y ardua labor logrado con el apoyo incondicional del tutor docente.

*Angy*

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por la sabiduría, fortaleza y salud por ser mi mentor, el cual me ha acompañado en esta larga travesía llena de retos y desavenencias mismo que me ha permitido llegar a este sitio donde doy por cumplida una meta más pero el inicio de una nueva etapa en mi vida.

A mis padres mis pilares fundamentales, por su apoyo y comprensión por haber confiado en mis capacidades y habilidades, gracias por todas las palabras de aliento y ánimo que recibí en todo momento “GRACIAS A UDS SOY LO QUE SOY”, a mis hermanos por ser mis compañeros de alegrías, tristezas por el apoyo incondicional, a Chris por todo su amor y por estar en cada paso que doy, gracias por estar a mi lado.

Mi gratitud al Dr. Galo Insuasti tutor por su tiempo, conocimientos y paciencia para la ejecución del presente trabajo, a la Dra. Isabel Ortiz, Ing. Karla Haro y Dra. Susana Abdo por sus sabios consejos.

El infinito agradecimiento a los docentes que imparten las diferentes cátedras de la carrera de Química gracias por sus conocimientos y por forjar la formación profesional de muchos estudiantes que ingresan a tan distinguida institución como es la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO, con muchos sueños, anhelos y metas por cumplir.

*Angy*

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>P.Q.</b>	Proteína de quinua
<b>P.B.Q</b>	Proteína bruta de quinua
<b>E.A.P</b>	Extracto acuoso de proteínas
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>E.Br</b>	Extracto de bromelina
<b>H.E.</b>	Hidrólisis enzimática
<b>Rx</b>	Reacción
<b>T<sub>i</sub></b>	Tratamientos
<b>t<sub>i</sub></b>	Tiempos
<b>b<sub>0</sub></b>	Temperatura constante
<b>H.Q.</b>	Harina de quinua
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>h</b>	Hora
<b>min</b>	Minutos

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS .....	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XV
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	XVII
INDICE DE ANEXOS.....	XVIII
RESUMEN.....	XIX
SUMMARY.....	XX
INTRODUCCIÓN .....	1

### CAPITULO I

<b>1</b>	<b>MARCO TEÓRICO REFERENCIAL .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>La Quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i>) .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2</b>	<b>Producción de la quinoa en el Ecuador .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3</b>	<b>Clasificación taxonómica de la quinoa.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4</b>	<b>Estructura del grano de quinoa.....</b>	<b>10</b>
<b>1.5</b>	<b>Procesamiento del grano de quinoa .....</b>	<b>12</b>
<b>1.6</b>	<b>Aplicaciones de la quinoa .....</b>	<b>14</b>
<b>1.7</b>	<b>Composición y valor nutricional .....</b>	<b>15</b>

1.7.1	<i>Lípidos o grasas</i> .....	16
1.7.2	<i>Almidón</i> .....	16
1.7.3	<i>Proteínas</i> .....	17
1.7.4	<i>Aminoácidos</i> .....	18
1.7.5	<i>Saponina y sapogenina</i> .....	20
1.8	<b>Obtención de proteínas en cereales</b> .....	21
1.8.1	<i>Proteínas presentes en los cereales</i> .....	22
1.8.2	<i>Precipitación de proteínas</i> .....	23
1.8.2.1	<i>Extracción con agua tomando en cuenta el punto isoeléctrico (pi)</i> .....	23
1.8.2.2	<i>Extracción proteica con soluciones hidroalcohólicas</i> .....	23
1.8.2.3	<i>Extracción proteica con agua post Tratamiento térmico</i> .....	24
1.8.2.4	<i>Extracción de proteínas por precipitación de sales</i> .....	24
1.8.2.5	<i>Extracción de proteínas por precipitación con ácidos y otros compuestos</i> .....	24
1.8.3	<i>Métodos de determinación, cuantificación y caracterización de proteínas</i> .....	25
1.8.4	<i>Reacciones de identificación de aminoácidos</i> .....	26
1.9	<b>Piña (<i>Ananas comosus</i>)</b> .....	28
1.9.1	<i>Generalidades</i> .....	28
1.9.2	<i>Taxonomía de la piña</i> .....	29
1.10	<b>Enzimas</b> .....	29
1.10.1	<i>Enzima bromelina</i> .....	30
1.10.1.1	<i>Propiedades de la bromelina</i> .....	30

1.10.1.2	<i>Obtención de enzima bromelina</i> .....	31
1.10.2	<i>Proenzimas o zimógenos</i> .....	31
1.10.3	<i>Método de acción de las enzimas</i> .....	32
1.11	<b>Hidrólisis de proteínas</b> .....	33
1.11.1	<i>Características de la proteína hidrolizada</i> .....	34
1.11.2	<i>Aplicaciones de proteínas hidrolizadas</i> .....	36

## CAPITULO II

2	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	37
2.1	<b>Obtención de proteínas</b> .....	41
2.1.1	<i>Proceso de desamargado del grano de quinua</i> .....	41
2.1.2	<i>Proceso de obtención del extracto acuoso del grano de quinua desamargado (E.A.Q)</i> .....	42
2.1.3	<i>Precipitación ácida de proteína bruta de quinua (P.B.Q)</i> .....	43
2.1.4	<i>Aislamiento hexánico de saponinas contaminantes en la proteína bruta de quinua (P.B.Q)</i> .....	44
2.1.5	<i>Caracterización de la proteína de quinua (P.Q)</i> .....	46
2.1.6	<i>Rendimiento de la proteína de quinua</i> .....	50
2.2	<b>Hidrólisis enzimática de la proteína de quinua (monitoreo hidrólisis)</b> .....	51
2.2.1	<i>Obtención de un extracto programado de bromelina a partir de la piña (Ananas comosus)</i> .....	51

2.2.2	<i>Proceso de hidrólisis enzimática de la proteína de quinua con extracto programado de bromelina</i> .....	53
2.2.3	<i>Control de la hidrólisis enzimática de la proteína de quinua</i> .....	54
2.2.3.1	<i>Seguimiento cromatográfico de la hidrólisis enzimática de la proteína de quinua</i> ...	54
2.2.3.2	<i>Seguimiento fotométrico de la hidrólisis enzimática de la proteína de la quinua</i> .....	58
2.3	<b>Elaboración de una bebida de quinua tratada con extracto enzimático natural de bromelina</b> .....	61
2.3.1	<i>Preparación de un extracto enzimático natural de bromelina de piña (para bebida)</i> .....	61
2.3.2	<i>Elaboración experimental de una bebida de quinua tratada con extracto natural de bromelina</i> .....	63
2.3.3	<i>Pruebas de degustación de la bebida de quinua</i> .....	64
2.3.4	<i>Diseño de una propuesta para la elaboración de una bebida casera de quinua</i> .....	64

### **CAPÍTULO III**

3	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	65
3.1	<b>Resultados de la obtención de proteínas del grano de quinua</b> .....	65
3.1.1	<i>Precipitación ácida de la proteína bruta de quinua (P.B.Q.)</i> .....	65
3.1.2	<i>Resultado del aislamiento hexánico de las sapogeninas contaminantes de la P.B.Q</i> .....	66
3.1.3	<i>Pruebas de caracterización de la proteína de quinua obtenida (P.Q.)</i> .....	67
3.1.4	<i>Rendimiento de la proteína de quinua</i> .....	73

<b>3.2</b>	<b>Resultados de la hidrólisis enzimática de la proteína de quinua con extracto programado de bromelina .....</b>	<b>74</b>
<b>3.2.1</b>	<i>Resultados del proceso de la preparación del extracto programado de bromelina de la piña (Ananas comosus) .....</i>	<i>74</i>
<b>3.2.2</b>	<i>Hidrólisis Enzimática de la proteína de quinua con extracto programado de bromelina de piña (Ananas comosus) .....</i>	<i>74</i>
<b>3.2.3</b>	<i>Resultados del control del proceso de hidrólisis enzimática de la proteína de quinua .....</i>	<i>75</i>
<b>1.</b>	<i>Resultados del seguimiento cromatográfico de la hidrólisis enzimática de la P.Q ...</i>	<i>75</i>
<b>2.</b>	<i>Validación visual del cromatograma de silica-gel usando cromatografía de papel de celulosa y ninhidrina como revelador .....</i>	<i>78</i>
<b>3.</b>	<i>Resultados del seguimiento fotométrico de la hidrólisis enzimática de la P.Q .....</i>	<i>81</i>
<b>3.3</b>	<b>Elaboración de una bebida de quinua.....</b>	<b>89</b>
<b>3.3.1</b>	<i>Extracto enzimático natural de bromelina de la piña (para bebida) .....</i>	<i>89</i>
<b>3.3.2</b>	<i>Resultados de la elaboración experimental de la bebida de quinua .....</i>	<i>90</i>
<b>3.3.3</b>	<i>Propuesta de la elaboración de la bebida casera de quinua .....</i>	<i>94</i>
	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>96</b>
	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>97</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
	<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b> Clasificación taxonómica de la quinua ( <i>Chenopodium quinoa</i> ).....	9
<b>Tabla 2-1:</b> Composición nutricional de las diferentes presentaciones de la quinua .....	16
<b>Tabla 3-1:</b> Clasificación taxonómica de la piña .....	29
<b>Tabla 4-1:</b> Propiedades de la bromelina .....	30
<b>Tabla 5-1:</b> Concentración enzimática de la bromelina en diferentes partes de la piña ( <i>Ananas comosus</i> ).....	31
<b>Tabla 6-1:</b> Enzimas proteolíticas y sus aspectos principales características .....	32
<b>Tabla 7-1:</b> Valores nutricionales del grano de quinua vs Hidrolizado proteico .....	35
<b>Tabla 1-2:</b> Factores en estudio .....	53
<b>Tabla 2-2:</b> Diseño de tratamientos para seguimiento cromatográfico y fotométrico de la hidrólisis enzimática .....	54
<b>Tabla 1-3:</b> Resultado de pruebas de caracterización de la P.Q .....	67
<b>Tabla 2-3:</b> Rendimiento de la proteína de quinua.....	73
<b>Tabla 3-3:</b> Rendimiento de la proteína bruta de quinua.....	73
<b>Tabla 4-3:</b> Esquema para el seguimiento cromatográfico de Hidrólisis Enzimática .....	75
<b>Tabla 5-3:</b> Absorbancias obtenidas durante el seguimiento fotométrico de la hidrólisis enzimática.....	82
<b>Tabla 6-3:</b> Seguimiento fotométrico de la hidrólisis ( <i>bebida</i> ).....	90
<b>Tabla 7-3:</b> Término que aplica la bebida en la encuesta.....	92

**Tabla 8-3:** Resultados del análisis organoléptico de la bebida de quinua..... 93

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b> Quinoa en la región interandina.....	7
<b>Figura 2-1:</b> Estructura del grano de quinoa ( <i>Chenopodium quinoa</i> ).....	11
<b>Figura 3-1:</b> Composición física y partes externas de la semilla de la quinoa.....	12
<b>Figura 4-1:</b> Estructura de la saponina .....	20
<b>Figura 5-1:</b> Estructura de una sapogenina .....	21
<b>Figura 6-1:</b> Reacción de ninhidrina más aminoácido .....	27
<b>Figura 7-1:</b> Bromelina .....	30
<b>Figura 8-1:</b> Reacción catalizada por proteasas .....	34
<b>Figura 1-3:</b> Reacción de determinación de compuestos triterpénicos con reactivo Liebermann Burchard .....	67
<b>Figura 2-3:</b> Complejo coordinado formado entre Cu <sup>+</sup> y el grupo amina de las proteínas .....	68
<b>Figura 3-3:</b> Reacción para presencia de compuestos azufrados .....	69
<b>Figura 4-3:</b> Cromatograma en papel de celulosa de la hidrólisis total ácida de la proteína de quinoa .....	71
<b>Figura 5-3:</b> Cromatograma silica-gel de los péptidos generados (revelador: ninhidrina) .....	76
<b>Figura 6-3:</b> Cromatograma en papel de celulosa usando ninhidrina como revelador .....	79
<b>Figura 7-3:</b> Cromatograma en silica-gel usando ninhidrina como revelador .....	80
<b>Figura 8-3:</b> Rx explicativa adaptada-ninhidrina con el péptido inicial y los péptidos generados durante la hidrólisis.....	87

**Figura 9-3:** Validación fotométrica progresiva de la Hidrólisis Enzimática de la P.Q ..... 89

**Figura 10-3:** Coloración en la hidrólisis observada con ninhidrina a tiempo (0 h-24 h)..... 91

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3:</b> Seguimiento fotométrico de la hidrólisis enzimática de la P.Q .....	82
<b>Gráfico 2-3:</b> Seguimiento fotométrico de la hidrólisis en la bebida ( $t_0=0$ h y $t_1=24$ h) .....	90
<b>Gráfico 3-3:</b> Resultados de las características evaluadas en la degustación.....	92
<b>Gráfico 4-3:</b> Aceptabilidad de las características organolépticas de la bebida de quinua .....	93

## ÍNDICE DE ANEXOS

**Anexo A:** Desamargado de la proteína presente en la quinua

**Anexo B:** Obtención del E.A.Q

**Anexo C :** Obtención de la proteína de quinua

**Anexo D:** Aislamiento de sapogeninas de la P.B.Q

**Anexo E:** Caracterización del extracto hexánico de la P.B.Q con reactivo de Liebermann  
Burchard

**Anexo F:** Pruebas de caracterización de la proteína de quinua

**Anexo G:** Hidrólisis enzimática de la proteína de quinua

**Anexo H:** Cromatograma de silica-gel de la hidrolisis enzimática (0 h-24 h)

**Anexo I:** Seguimiento cromatográfico y fotométrico de la H.E.

**Anexo J:** Preparación de la bebida experimental de quinua con extracto enzimático natural de  
bromelina

**Anexo K:** Degustación de la bebida de quinua

**Anexo L:** Modelo de la encuesta organoléptica

**Anexo M:** Ejemplar 1 de encuesta organoléptica de la bebida experimental

**Anexo N:** Ejemplar 2 encuesta organoléptica de la bebida experimental

## RESUMEN

El objetivo fue la obtención de la proteína del grano de quinua amarga (*Chenopodium quinoa*) y su hidrólisis enzimática. La investigación contempló 3 fases. La primera es el aislamiento de proteína de quinua (P.Q.) del extracto acuoso de grano desamargado libre de almidón, por precipitación ácida (ácido clorhídrico-agua (1:3), (pH 5.5), centrifugación (3500 rpm)). El rendimiento de la P.Q. fue de 5,66 %. La segunda fase es, la hidrólisis enzimática de la (P.Q.) consistente en un tratamiento de 1,5 g de P.Q. con 20 ml de extracto enzimático programado de bromelina (15 g de corazón y 15 g de pulpa de piña con trituración, recolección de sobrenadantes y unificados, sin agua), el seguimiento proteolítico fue de tipo cromatográfico y fotométrico (adaptado-ninhidrina), usando 7 tratamientos con 2 y 3 réplicas respectivamente. Las condiciones de los tratamientos son: 42°C con tiempos de (0 h, 24 h, 72 h, 120 h, 144 h, 168 h). A las 120 h de hidrólisis, el control proteolítico mostró la finalización de enlaces peptídicos reconocibles por la bromelina, observándose la generación de 5 péptidos. En la tercera fase se elaboró experimentalmente una bebida con harina de quinua (H.Q.) y un extracto enzimático natural de bromelina fundamentado en metodología y resultados de la hidrólisis, organolépticamente muestra una buena aceptación definiéndola como afrutada, dulce y de consistencia aceptable. Se propuso una elaboración de bebida casera de quinua, con 15 g (H.Q.), 300 ml de extracto enzimático natural de bromelina fundamentada, manteniéndole para su hidrólisis un reposo 24 h a 20°C, posteriormente para su digestibilidad y salubridad se sometió a cocción y ebullición con especias.

**Palabras clave:** <QUÍMICA>, <QUINUA (*Chenopodium quinoa*) >, <EXTRACTO PROGRAMADO DE BROMELINA>, <HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA >, <SEGUIMIENTO FOTOMÉTRICO-NINHIDRINA>, <SEGUIMIENTO CROMATOGRÁFICÓ-NINHIDRINA>



28-05-2020

0038-DBRAI-UPT-2020

## SUMMARY

The objective was to obtain the protein from the bitter quinoa grain (*Chenopodium quinoa*) and its enzymatic hydrolysis. The investigation contemplated 3 phases. The first is the isolation of quinoa protein (P.Q.) from the starch-free aqueous extract of debittered grain, by acid precipitation (hydrochloric acid-water (1:3), (pH 5.5), centrifugation (3500 rpm)). The performance of the P.Q. it was 5,66%. The second phase is the enzymatic hydrolysis of (P.Q.) consisting of a treatment of 1,5 g of P.Q. With 20 ml of programmed enzymatic extract of bromelain (15 g of heart and 15 g of pineapple pulp with crushing, collection of supernatants and unified, without water), the proteolytic monitoring was chromatographic and photometric (adapted-ninhydrin), using 7 treatments with 2 and 3 replicates respectively. The conditions of the treatments are: 42 ° C with times of (0 h, 24 h, 72 h, 120 h, 144 h, 168 h). At 120 h of hydrolysis, the proteolytic control showed the completion of bromelain-recognizable peptide bonds, observing the generation of 5 peptides. In the third phase, a drink with quinoa flour (H.Q.) and a natural enzymatic extract of bromelain based on hydrolysis methodology and results was experimentally prepared, organoleptically showing good acceptance defining it as fruity, sweet and of acceptable consistency. A preparation of homemade quinoa drink was proposed, with 15 g (H.Q.), 300 ml of natural enzymatic extract of grounded bromelain, maintaining a 24 h at 20 ° C rest for its hydrolysis, later for its digestibility and healthiness it was subjected to cooking and boiling with species.

**Key words:** <CHEMISTRY>, <QUINOA (*Chenopodium quinoa*)>, <PROGRAMMED BROMELINE EXTRACT>, <ENZYMATIC HYDROLYSIS>, <PHOTOMETRIC-NINHYDRINE MONITORING>, <CHROMATOGRAPHIC-NINHYDRINE MONITORING>

## INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de titulación denominado “OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS Y SU HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A PARTIR DE LA QUINUA AMARGA (*Chenopodium quinoa*)”, es un trabajo investigativo de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo que forma parte del programa de vinculación “**DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DEL PROYECTO DE PRODUCCIÓN, TRANSFORMACIÓN, COMERCIALIZACIÓN Y PROMOCIÓN DE CONSUMO DE LA QUINUA Y SUS DERIVADOS**”, bajo convenio interinstitucional entre la ESPOCH con empresas y/o asociaciones productoras de quinua de la provincia de Chimborazo.

La quinua actualmente es uno de los productos más apetecidos en algunas partes del planeta (Pantone et al. 2013a), su demanda aumenta día tras día en el mercado por el valor nutricional que este pseudo-cereal posee, aproximadamente el 14,6 % de la composición total de la quinua corresponde a las proteínas semejante a la proteína de la leche entera (polvo) (Eng, Beck y White 1954).

Según (FAO 2011) la quinua (*Chenopodium quinoa*), es un alimento de origen vegetal que posee todos los aminoácidos esenciales, oligoelementos y vitaminas y no contiene gluten. Los aminoácidos esenciales están presentes en el núcleo del grano a diferencia de otros cereales que poseen estos nutrientes en la cáscara como, por ejemplo: el arroz o trigo, es cultivado en la región andina donde ha sido apreciada por su valor nutritivo y durabilidad frente a condiciones ambientales difíciles. “A partir del 2009 se comercializa aproximadamente 33 Tm de quinua anual con el convenio Comercio Justo con: Francia, Bélgica, Alemania, EEUU y Canadá mientras que en el año 2012 los ingresos por la exportación de quinua fue de 56 723 USD, por ventas locales fue de 63 962 USD” (Productores, Org y Chimborazo 2013).

Actualmente en el mercado, la quinua se lo comercializa en forma de grano pelado (sin cáscara), y en forma de harina (Dueñas Quintero 2015), es importante destacar que durante los últimos años

la producción de este grano ha sido motivo de estudios e investigaciones, a través de estos ha sido posible obtener variedad de subproductos y componentes estructurales como: aceite de quinua, extracción de almidón, saponina, leche de quinua, extracción de colorantes de las hojas y semillas (Pantone et al. 2013b).

La importancia de los subproductos obtenidos de la quinua ha trascendido en varios sectores de la convivencia humana, por un lado su comercialización está generando divisas económicas para muchos sectores agropecuarios e industriales del país y del mundo, el impacto de esta pseudo gramínea en la alimentación de las familias es indudable, “ya que la quinua puede ser considerada como cereal de gran valor nutritivo en comparación con el trigo, cebada y maíz, según estudios” (Repo-Carrasco-Valencia y Serna 2011, p. 229) este grano posee alto nivel de proteínas de buena calidad, determinándose así un alimento rico en fibra dietética y de otros componentes bioactivos (FAO 2011). “Estas características junto con las propiedades fisicoquímicas han hecho posible el posicionamiento de este grano en la industria alimentaria, la presencia de unidades estructurales y/o proteicas en un futuro próximo confluirá para que la quinua sea utilizada como materia prima para la industria química, farmacéutica y cosmética” (Pantone et al. 2013b).

“El continuo crecimiento en la demanda del cultivo de quinua en el mercado de exportación extranjera depende de Ecuador, el cual debe buscar desarrollar nuevas estrategias de mercado debido al aumento de su demanda”(Horton 2014, p. 25) mismo que, trae consigo nuevos retos para los productores de este grano, ya que deben precautelar su calidad, desarrollo de plagas y el mercado competitivo (Chucho 2015) “para abastecer los mercados internacionales de suministros saludables, reducir sus costos de producción y aumentar los ingresos con la venta de este producto y de sus derivados” (Horton 2014).

“Alrededor del 70% de la demanda de proteína se centra en el consumo de semillas, de forma directa o indirecta en la ingesta de animales necesarios para la producción de carne” (Cordero y Orozco 2011, p. 10).” La Asamblea General de la ONU declaró 2013 Año Internacional de la Quinua, Ecuador fue uno de los países que a partir del 2008 creó e implementó una política de seguridad alimentaria, la cual da mucha importancia a los alimentos tradicionales y autóctonos

del país “(Villarroel 2020).

Los agricultores locales que cultivan este grano enfrentan retos cada día por lo que ellos ven la necesidad de promover la manufactura de nuevos productos con ayuda de procesos tecnológicos, elemento considerado necesario además, la intervención de una entidad con certificación (Chucho 2015, p. 2) que procure la inocuidad de los productos con valor agregado, para fomentar el desarrollo productivo del país, potencializando así su riqueza natural, andina mega diversidad en el mercado extranjero (aei 2013, p. 5).

¿Se podrá obtener hidrolizados enzimáticos a partir de la proteína aislada de la quinua?

Para entender este problema se hace importante considerar que:

1. “Según varias investigaciones el grano de quinua posee gran cantidad de proteínas a diferencia de otros granos integrales, que aportan una gran variedad de aminoácidos esenciales necesarios para el organismo además, de otros componentes como: la fibra, magnesio, fósforo y hierro, así como en vitamina E y potasio (Villarroel 2019), convirtiéndole en un alimento de gran valor nutricional”.
2. “La bromelina es una enzima proteolítica, pertenece a la familia de las Bromeliáceas rico en azufre, se extrae principalmente del tallo y fruto de la piña (*Ananas comosus*),” dentro de sus generalidades se destaca su actividad proteolítica la cual consiste en la rápida digestión de las proteínas para transformarlas en aminoácidos” (Piñeiro 2009, p. 1), es usado en la industria alimenticia, farmacéutica y en la medicina (Gaspar y Torres 2018, p.6).

3. Para la extracción de proteínas en la industria cosmética se obtienen de productos gramíneas como avena, trigo, maíz, centeno (Ponce 2015, p. 9) y de leguminosas como la soja ya las proteínas actúan como hidratantes, tiene propiedades nutritivas y mejoran la elasticidad cutánea. En productos capilares, tienen un efecto hidratante, protegen al cabello y reparan la cutícula, aportan elasticidad y mejoran la dermocompatibilidad de los tenso activos (Alcalde 2007; Cosmedi-admin 2013).
4. “Según estudios, los péptidos obtenidos mediante hidrólisis enzimática son de dos tipos: los péptidos de cadena corta son más activos que los péptidos de cadena larga ya que los péptidos de bajo peso molecular poseen mayor potencial que los péptidos de alto peso molecular como antihipertensivos, además pueden ser usados como compuestos que reducen la cantidad de radicales libres” (Abugoch 2009, p. 9; Monu, R. & Aluko 2003). “En casos específicos se ha obtenido aislados de proteína de soja para productos cosméticos con una característica en particular alta dispersabilidad en agua o en otros sistemas líquidos con un 90% de proteína en promedio” (PISA S.A 2019).

Por lo expuesto y para dar respuesta al problema planteado, el presente trabajo investigativo se orienta en primer lugar, al aislamiento de la proteína de la quinua (P.Q.) mediante el presente proceso simplificado denotado a continuación: desamargado del grano de quinua y posterior trituración del grano obtención de un extracto acuoso del grano de quinua desamargado (E.A.P.), precipitación acida de proteína bruta de quinua usando una solución de HCl-H<sub>2</sub>O diluido en proporción (1:3), separación de proteína de quinua bruta (P.B.Q) por centrifugación, aislamiento hexánico de saponinas contaminantes de la proteína bruta. La obtención de este componente nutricional (proteínas), está sustentada en la caracterización química del mismo por diferentes pruebas de identificación estructural.

En segundo lugar, la proteína de quinua aislada es hidrolizada enzimáticamente mediante la adición del extracto de la bromelina obtenido a partir de la piña fresca (*Ananas comosus*). En el que se busca la determinación de las condiciones óptimas para el proceso de hidrólisis a una temperatura de 42°C, a diferentes tiempos, controlando la hidrólisis progresiva mediante seguimiento cromatográfico del proceso de hidrólisis enzimática en cromatofolios de silica-gel y el seguimiento fotométrico de la hidrólisis usando ninhidrina de cada uno de los tratamientos,

los cuales permitirán demostrar el fraccionamiento proteico.

Se planteó desarrollar la elaboración de una bebida casera de quinua con extracto enzimático de bromelina en base a los conocimientos y resultados generados del proceso de hidrólisis enzimática, el mismo que, promete a los consumidores una mejor y fácil digestibilidad de los péptidos (obtenidos tras su de proceso), la bebida se la puede producir de manera casera para su autoconsumo y posible comercialización. Adicionalmente tras una encuesta organoléptica realizada a estudiantes de la Carrera de Química se pudo determinar características propias de la bebida dada a conocer durante la presente experimentación.

El presente estudio, contribuye para que todas las pequeñas y grandes empresas productoras de quinua, opten por obtener otros subproductos, que pueden ser generados a partir de este grano tomando en consideración el potencial uso de su concentración proteica para la obtención de péptidos usando una enzima proteolítica de origen vegetal (bromelina), beneficiando a los consumidores, permitiendo una rápida y fácil digestibilidad y aumentando el porcentaje de absorción de nutrientes (amínicos) al organismo al momento de ingerir la proteína hidrolizada. Convirtiendo así, a los péptidos generados tras hidrólisis enzimática de la proteína del grano de quinua, en un alimento funcional, además es una alternativa nutricional que puede contribuir a la disminución de los índices de desnutrición de los pobladores de la provincia de Chimborazo.

## **OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Obtener proteínas y su hidrólisis enzimática del grano de la quinua (*Chenopodium quinoa*).

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aislar proteína presente en los granos de quinua.
- Diseñar un proceso de optimización de la hidrólisis enzimática (bromelina) del aislado del grano de quinua.
- Elaborar una bebida de quinua con extracto enzimático de bromelina a partir de la piña (*Ananas comosus*).

## CAPITULO I

### 1 MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

#### 1.1 La Quinoa (*Chenopodium quinoa*)



**Figura 1-1: Quinoa en la región interandina**  
Fuente: (Demarta 2017)

La quinoa (*Chenopodium quinoa*), es considerada como un pseudo-cereal por razones botánicas, por su inusual composición y su proporción equilibrada de aceite, proteínas y grasas (Vega-Gálvez et al. 2010). La quinoa no es considerada como cereal por ser parte de la familia de la Quenopodiáceas, como el: arroz, trigo cebada que pertenecen a la familia de la gramíneas (Arroyave y Esguerra 2006).

## 1.2 Producción de la quinua en el Ecuador

Actualmente los institutos de investigación agrícola en los países andinos se preocupan por los intereses de los agricultores indígenas de Ecuador por lo que se quiere fomentar el cultivo de granos como la quinua para consumo local, ya que durante los últimos años su demanda disminuyó considerablemente (Horton 2014), debido a la baja remuneración producido por la venta de quintales de este grano además que las nuevas generaciones no valoran el aporte nutricional de este grano ancestral (Aroni et al. 2013, p. 1689).

Una de las posibles soluciones para poner fin a la baja producción y mejorar la productividad del grano están en manejar estrategias que permitan capacitar a agricultores sobre el manejo del cultivo, la semilla de buena calidad, precio justo por la venta del grano, tratamiento del grano para consumo además del incentivo a créditos productivos a productores de este pseudo-cereal, ya que se calcula existe aproximadamente 80 000 ha de terreno aptas para su cultivo parte de ellas son aprovechadas para cultivo de otros productos y/o pastoreo (Peralta 2013).

Este cereal posee una gran variabilidad genética en el que es fácil la manipulación de sus genes mejorando aspectos como: color, rendimiento y tamaño de grano, resistencia y/o tolerancia a factores como: cantidad de agua, poca humedad del suelo, obteniéndose cultivos a los 4 000 metros de altura (Pantone et al. 2013b).

Pero debido a investigaciones sobre sus propiedades funcionales y valor nutricional ha aumentado el interés de este grano en Europa y EE. UU, por lo que el estado ecuatoriano a integrado a este grano dentro del proyecto de seguridad alimentaria incentivando a los agricultores el cultivo de granos andinos especialmente la quinua y ser considerado como nuevo producto de exportación ya que la quinua es considerado como alimento muy saludable y es demandado en el mercado extranjero (Horton 2014).

Los granos de quinua antes de salir de su centro de acopio son revisado por técnicos especializados que corroboran su calidad para su comercialización, la quinua al ser transformada en otros subproductos tiene mayor precio en el mercado por lo que aumenta los ingresos y ganancias en los productores de la provincia de Chimborazo (Maggi 2016), iniciativa que permite el cambio de la matriz productiva y aumento de comercio exterior (Peralta 2013).

### 1.3 Clasificación taxonómica de la quinua

A continuación, se muestra en la siguiente tabla la clasificación taxonómica de la quinua:

**Tabla 1-1: Clasificación taxonómica de la quinua**  
(*Chenopodium quinoa*)

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
<b>Subreino vegetal:</b>	<i>Tracheobionta</i>
<b>Superdivisión:</b>	<i>Spermatophyta</i>
<b>División:</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase:</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclase:</b>	<i>Caryophyllaceae</i>
<b>Orden:</b>	<i>Caryophyllales</i>
<b>Familia:</b>	<i>Chenopodiaceae</i>
<b>Género:</b>	<i>Chenopodium</i>
<b>Especie:</b>	<i>Chenopodium quinoa Willd.</i>

Fuente: (Cogliatti y Heter 2016, p. 2; USDA 2019)

La quinua es cultivada hace épocas precolombinas por su alto valor nutricional, quienes aprovecharon su valor nutritivo, según estudios su consumo suplanta la cantidad de las proteínas animales (Chacchi 2009) considerada como una de las principales fuentes proteicas para la

alimentación humana contribuyendo al desarrollo a la seguridad alimentaria regional (FAO 2016).

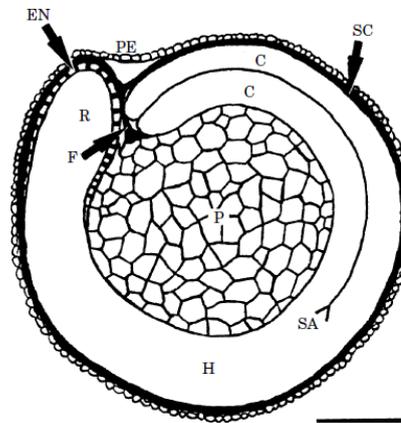
Este grano presenta características extrínsecas entre ellas se destacan:

- Alta variabilidad genética: la manipulación genética puede mejorar aspectos como: precocidad, color, tamaño de grano, resistencia a diversos factores, calidad de sus proteínas, de sabores, colores, etc. importantes para la gastronomía moderna (FAO 2011).
- Adaptabilidad a difíciles condiciones climáticas: se cultiva hasta los 4 000 metros de altitud (FAO 2011), y a una temperatura rango entre los 15 a 25°C (FAO 2016).
- Calidad nutritiva, considerado como un alimento funcional e ideal para el organismo (FAO 2011) gracias la calidad nutricional de tipo proteica, rico en los aminoácidos lisina y azufrados necesario para síntesis de proteína tisular en el organismo (Muñoz 2013).
- Bajo costo de producción, el cultivo es poco exigente en insumos y mano de obra (FAO 2011).

#### **1.4 Estructura del grano de quinua**

El grano de la quinua se encontrar en diferentes colores como: rojo, crema y blanco opaco de tamaño mediano, principalmente se cosechan en las provincias de Chimborazo y Bolívar (Peralta 2009, p. 471) de la sierra ecuatoriana. La semilla de la quinua constituye el fruto maduro de forma lenticular, elipsoidal, cónica en el cual se distinguen tres partes (Almeida 2015, p. 7):

- Episperma
- Embrión
- Perisperma

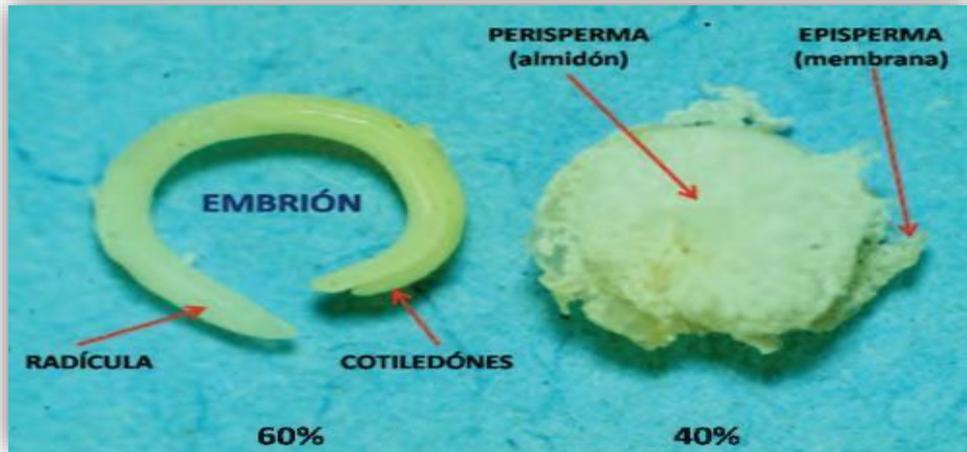


**Figura 2-1: Estructura del grano de quinua**  
(*Chenopodium quinoa*)

**Fuente:** (Prego et al. 1998, p. 482)

Pericarpio (PE) cubre la semilla. El embrión consiste en un hipocotilerio eje (H) con dos cotiledones (C) y Endosperma (EN). Episperma, pericarpio o conocido comúnmente como cascarilla o mojuelo rico en saponina presente es de origen triterpénico derivada de la hederagenina y de los ácidos oleanólico, fitolacagénico y serjanico (Ahumada et al. 2016, p. 438), en la planta para el consumo de este grano implica su remoción para eliminar su sabor amargo característico (FAO 2011).

El embrión de color blanquecino y de textura almidonosa está formado por dos cotiledones y una radícula envuelve al perisperma tomando la apariencia de un anillo se calcula que el 60% de la materia seca del grano es el embrión, mientras que, constituyen 40% entre el perisperma denominado almidón y episperma o conocido como membrana (Peralta 2013).



**Figura 3-1: Composición física y partes externas de la semilla de la quinua**

Fuente: (Peralta 2010, p. 14)

Además el grano de quinua presenta gránulos de almidón mucho más pequeños que el almidón de cereales, posee en menor cantidad la amilosa y de mayor viscosidad cualidad que puede ser aprovechada para usos industriales como por ejemplo en cremas bajas en calorías a partir de carbohidratos (Galwey 1993, p. 101).

## 1.5 Procesamiento del grano de quinua

- **Escarificación**

El proceso de escarificado disminuye efectivamente la cantidad de saponinas presente en el grano (Calliope et al. 2015, p. 239).

- **Lavado o desaponificación**

La saponina se elimina con ayuda de agua potable, aquí se separan las impurezas del grano debido a su menor densidad estas se suspenden en la superficie del tanque (Almeida 2015) se excluyen.

- **Secado del grano**

El grano para ser almacenado debe mantener una humedad entre el 10 % a 12 % para evitar el daño del grano y prevenir la germinación de la semilla y/ o la proliferación de hongos y bacterias (Sánchez y Chapoñán 2015, p. 41).

- **Almacenamiento**

El grano se debe almacenar en bodegas o lugares que tengan buenas condiciones higiénicas y ambientales a para evitar la descomposición o contaminación posterior (Almeida 2015).

- **Presentaciones de la quinua**

- a) **Quinua perlada o en grano**

Es el grano entero de quinua sin presencia de saponina del grano (Meyhuay 2013, p. 11).

## **b) Harina de quinua cruda**

Es considerada el producto de la molienda del grano de la quinua, se puede emplear en panificación, galletería, repostería y en la elaboración de pastas (Peralta 2009), este subproducto harina de quinua crudo presenta una digestibilidad 76,91% (Mira y Sucoshañay 2016) por lo que permite que exista una mejor acción de la enzima sobre el sustrato.

## **1.6 Aplicaciones de la quinua**

### **Aplicación en la industria alimentaria**

Esta propuesta pretenden disminuir la mal desnutrición y hambre en el mundo incluyen en la dieta de niños alimentos y/o productos con micronutrientes, proteínas, energía tomando como materia prima cereales diferentes del trigo como la quinua que aporta al organismo de lisina y fibra soluble (Forero et al. 2016, p. 72) importantes para el crecimiento y desarrollo.

A partir de la quinua se puede elaborar varios subproductos de tipo alimenticio dentro de los que se destaca:

### **a) Hojuelas de quinua**

Se elaboran hojuelas a partir de los granos cocidos de quinua, materia prima para la elaboración de barras energéticas, granolas y sopas instantáneas. Aportan 8,5 % de proteína, 3,8 % de fibra y de minerales como el calcio 114 mg, fósforo 60 mg y hierro 4,7 mg (Forero et al. 2016).

## **b) Panificación**

Lo que se pretende es crear una mezcla homogénea de la harina de quinua y trigo en la cual aporta una cantidad significativa de proteínas a partir de la quinua obteniendo una mejora en las características del pan como: color de su corteza nutricional, color de las migas, textura, sabor, olor característico a la quinua (Arroyave y Esguerra 2006)

### **1.7 Composición y valor nutricional**

Dentro de la composición de este pseudo-cereal esta su alto porcentaje de fibra dietética total (FDT), el cual le concede propiedades como depurador del cuerpo que ayuda a disminuir residuos presentes en un organismo (FAO 2011). Este grano es una de las fuentes de energía gracias a su alto contenido de almidón, la quinua contiene proteína de buena calidad, fibra dietética y ácidos grasos (Valcárcel y Caetano 2012, p. 265).

Además contienen niveles importantes de minerales, vitaminas y otros componentes como: saponinas, fitoesteroles, escualeno, fagopiritoles (Valcárcel y Caetano 2012) y antioxidantes aportan a mejorar la calidad nutricional del individuo prueba de ellos es el mejoramiento de las funciones neuronales, sus minerales con ayuda de las proteínas actúan como cofactores en enzimas antioxidantes que ayudan a proteger las membranas celulares (Vega-Gálvez et al. 2010).

**Tabla 2-1: Composición nutricional de las diferentes presentaciones de la quinua**

<b>COMPOSICIÓN DEL GRANO DE QUINUA</b>				
<b>COMPONENTE (por cada 100g)</b>	<b>Humedad</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Grasas</b>	<b>Carbohidratos</b>
<b>QUINUA NATURAL</b>	9,96	13,46	6,17	66,91
<b>QUINUA ESCARIFICADA</b>	8,30	13,34	5,61	69,65
<b>QUINUA LAVADA Y SECADA</b>	8,63	12,76	4,09	71,8

Fuente: (Calliope et al. 2015)

Realizado por: Angy Estrada, 2020

### **1.7.1 *Lípidos o grasas***

Son sustancias orgánicas constituidas químicamente por: carbono, hidrógeno y oxígeno insoluble en agua y soluble en solventes orgánicos (Estrella 2005, p. 46). Según recientes investigaciones el contenido de grasa en el grano de quinua se estima entre el 2,05 a 10,88 % del total de ácidos grasos cinco de estos están entre el 86,60 a 91,84 %, entre los que se destacan el ácido oleico linoleico y linolénico de origen insaturados mientras que el ácido palmítico y esteárico ácidos grasos saturados (Rojas et al. 2016, p. 114).

### **1.7.2 *Almidón***

El almidón se halla entre 39,2 a 61,5 %, amilosa de 10,5 a 21,5 % y amilopectina de 78,5 a 89,5% (Rojas et al. 2016). Posee una temperatura de gelatinización de 73,33°C además, presenta una estabilidad al congelamiento y descongelamiento de 38,54 % por lo que se puede decir que el almidón de la quinua es apto para la elaboración de productos gelificados (Corzo 2018, p.38).

### 1.7.3 *Proteínas*

Es el conjunto de dos o más cadenas poli peptídicas enlazadas entre sí, todas unidas hasta con miles de aminoácidos por medio de un enlace covalente (Cecie Starr; Ralph Taggart 2008). Las proteínas están formadas por aminoácidos los cuales están unidos por enlaces amida (-NH<sub>2</sub>) llamados enlaces peptídicos (Yurkanis 2007, p. 433). En la formación de las proteínas que se encuentran presentes en los seres vivos intervienen 20 aminoácidos (Yurkanis 2007).

Son conocidos como polímeros de aminoácidos que se diferencian uno de otro por su peso molecular o con el número de residuos de su cadena, su peso molecular puede ir desde cientos de miles o varios millones de daltones (D) que se los conoce como polipéptidos y si está formado hasta 50 aminoácidos se los denomina péptidos (McKee 2014, p. 124).

Las proteínas deben ser consideradas como un esencial dentro de la dieta alimentaria ya que al momento de ser ingeridas son hidrolizadas en el organismo teniendo como resultado de este proceso aminoácidos individuales vitales para la síntesis de nuevas proteínas, o para el aporte de energía o para la síntesis de compuestos de tipo no proteico como la melanina (Yurkanis 2007) que nuestro cuerpo necesita.

Cada proteína presente en nuestro cuerpo posee una estructura única y ordenada que permite el cumplimiento de varias funciones, muchas proteínas pueden integrar con tan sólo una cadena poli peptídica, la mayoría incluye más de una cadena, o subunidad (Karp 2008, p. 50).

En el grano de quinua se considera que entre el 16 y 20 % del peso de la semilla de este grano es proteínas de alto valor al igual que sus hojas además contienen vitaminas y minerales como: calcio, fósforo y hierro. En los cotiledones de la semilla se encuentra entre 35-40 % de proteína, mientras que en el perisperma contiene entre 6,3 al 8,3 % de la proteína total del grano (Sánchez y Chapoñán 2015).

Las proteínas presentes en la quinua son de tipo albúmina, globulina y prolaminas los cuales poseen una composición balanceada de aminoácidos esenciales parecida a la proteína de la leche, durante las últimas investigaciones se ha encontrado que las hojas de quinua tienen alto contenido de proteínas con altos contenidos en vitaminas y minerales como: calcio, fósforo y hierro (Tapia et al. 2016, p. 79; FAO 2011).

Debido a la cantidad de proteína presente en este pseudo- cereal es un alimento ideal para personas vegetarianas, ya que en combinación con otros alimentos pueden reemplazar a la carne (Vega-Gálvez et al. 2010).

#### **1.7.4 Aminoácidos**

Los aminoácidos esenciales presentes en la quinua se hallan en el núcleo del grano a diferencia de otros cereales como: arroz y trigo que contienen estos componentes en el cáscara o denominado exosperma (FAO 2011).

La deficiencia de aminoácidos esenciales de una proteína se denomina “aminoácido limitante”, es decir que se encuentra en menor proporción que la establecida para una proteína patrón el mismo que determina la eficiencia de utilización de la proteína presente en un alimento o si un aminoácido esencial es insuficiente en la dieta para un individuo (Arroyave y Esguerra 2006).

Según la (FAO 2011) la quinua presenta los siguientes:

#### a) Aminoácidos esenciales:

“La **lisina** es un aminoácido muy abundante mejora la función inmunitaria al colaborar en la formación de anticuerpos, favorece la función gástrica, colabora en la reparación celular. **La isoleucina, la leucina y la valina** ayudan en la producción de energía muscular mejorando los trastornos neuromusculares y previenen el daño hepático. **La metionina** actúa como agente detoxificador disminuye los niveles de metales pesados en el organismo frente a formación de radicales libres. La quinua contiene **fenilalanina** considerado como un estimulante cerebral. **Treonina** participa en la formación de colágeno y elastina, y facilita la absorción de otros nutrientes” (FAO 2011, p. 9).

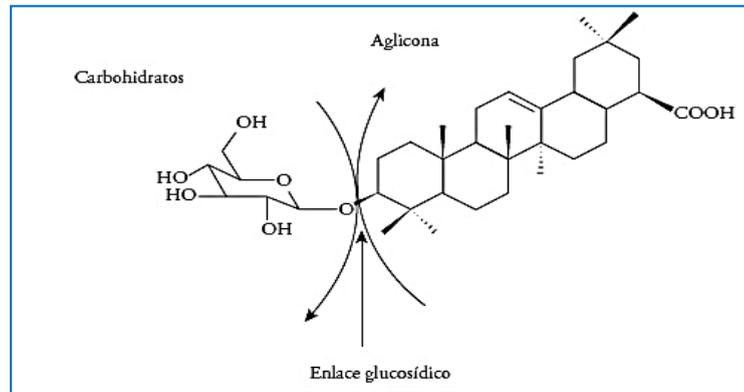
#### b) Aminoácidos “no esenciales”

La quinua contiene más del triple de **histidina**, recomendable en la alimentación de infantes, posee acción antiinflamatoria. **La arginina**, es un aminoácido casi esencial en la infancia, estimula la producción y liberación de la hormona de crecimiento, reparación muscular. **La alanina** es fuente de energía para músculos, cerebro y sistema nervioso y **la glicina** actúa como un neurotransmisor tranquilizante en el cerebro y regula de la función motora“(FAO 2011).

“Además, **la prolina** ayuda en la reparación de las articulaciones, cicatrización de lesiones y úlceras, parece ser eficaz para tratar los casos de impotencia y frigidez, es protector cardiovascular y se utiliza junto a la lisina y la vitamina C para impedir o limitar las metástasis cancerosas “(FAO 2011). “Es común encontrar en granos de origen pseudo-cereal **el ácido aspártico**, que mejora la función hepática y el sistema cardiovascular, **el ácido glutámico** participa en los procesos de producción de energía para el cerebro y la memorización, **la cisteína** es un protector hepático y destruye los radicales libres, **la serina** potente agente hidratante natural y **la tirosina** tiene efecto anti estrés reduciendo la depresión y la ansiedad “(FAO 2011). El contenido aproximado de los principales aminoácidos presentes en la quinua esenciales están la leucina entre 46,0 a 58,5 y lisina de 42,0 a 53,3 mg de proteína (Rojas et al.2016).

### 1.7.5 Saponina y sapogenina

#### Saponinas



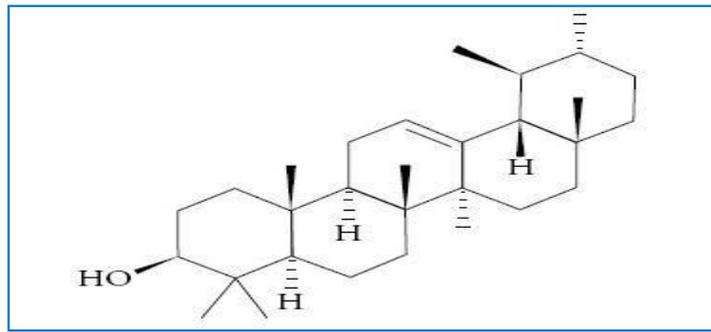
**Figura 4-1: Estructura de la saponina**

Fuente: (Ahumada et al. 2016, p. 441)

“Las saponinas son metabolitos secundarios que constituyen una gran familia de compuestos estructuralmente constituidos por un anillo terpenoide o esteroidal, que se encuentran, en la cáscara de las semillas derivadas de la hederagenina y de los ácidos oleanólico, fitolacagénico y serjánico en la planta que provee de sabor amargo” (Ahumada et al. 2016, p. 438-441).

“Es un compuesto triterpénico derivado de la saponina el cual en su estructura a parte de una aglicona posee grupos sustituidos por oligosacáridos unidos a través de enlaces glucosídicos que les confieren un carácter anfifílico. (Quiñones et al. 2007, p. 88; Ahumada et al. 2016, p. 441).

## Sapogeninas



**Figura 5-1: Estructura de una sapogenina**

Fuente: (Ahumada et al. 2016, p. 441)

Las sapogeninas son las agliconas que quedan después de pasar por un proceso de hidrólisis, es decir la ruptura del azúcar que posee la saponina. Familia de productos naturales denominado saponinas (Torres 2011, p. 67).

### 1.8 Obtención de proteínas en cereales

#### Maíz (*Zea mays* L.)

“Es un cereal el cual puede ser aprovechado obteniendo subproductos como: harina, fibra aceite y proteínas que pueden ser usadas para consumo humano dentro de las investigaciones que se han realizado, se han encontrado que la cantidad de extracto proteico de este grano es de 10,83mg/l conteniendo en su composición diversos tipos proteínas así tenemos: albuminas, globulinas, prolaminas y gluteninas” (Correa et al. 2017, p. 60).

El método de extracción usada es agitación asistida con ultrasonido y usando como solvente el ácido Tris-Base y para su respectiva cuantificación se la realizo con espectroscopia ultravioleta visible empleando los reactivos de: Lowry, Bio-Rad y Bradford como componentes cromogénicos para la identificación de proteínas (Correa et al. 2017) .

## Arroz

El arroz contiene gran cantidad de proteínas cuyo contenido aproximadamente es de 17,66 % - 24,35 % (Gandebe et al. 2017, p. 823), su extracción se la realizó por precipitación alcalina en la que se añadió a la harina de arroz 0.005 N de NaOH se separó el sobrenadante y posteriormente se eliminó impurezas como almidón y líquidos, para su cuantificación se empleó el equipo kjeldahl y como solventes el CuSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en el cual se identificó la presencia y cantidad de nitrógeno (Gandebe et al. 2017).

### 1.8.1 Proteínas presentes en los cereales

2. **Albúminas:** Son proteínas de reserva solubles en agua pura;(Pinciroli 2010, p. 7; Cordero y Orozco 2011), este tipo de proteínas podemos encontrar en semillas como las de la almendra de capulín (*Pronus serotoninina*) son más solubles en un pH de: 6,7 y 12 (Raya et al. 2012, p. 203).
3. **Globulinas:** solubles en soluciones salinas diluidas y neutras y son más abundantes en la naturaleza (Cordero y Orozco 2011; Pinciroli 2010) se coagulan por acción del calor, y precipitan en presencia de sulfato de amonio (Teijón y Blanco 2020, p. 67).
4. **Prolaminas:** Son proteínas de almacenamiento que se encuentran formado parte del endospermo de los cereales ricos en prolina y glutamina (Hernández et al. 2015b, p. 1), son solubles en alcohol o en mezclas de alcohol /agua (Cordero y Orozco 2011; Pinciroli 2010). Proveen a los cereales de propiedades funcionales como: extensibilidad y la elasticidad (Hernández et al. 2015).” Tienen un dominio globular  $\alpha$ -hélice con 6-8 residuos de cisteína y 3- 4 puentes disulfuro, gracias a esto estas proteínas son muy solubles en etanol (40-70 %). **Se clasifican en:** prolaminas ricas en azufre ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  gliadinas), prolaminas pobres en azufre ( $\omega$  gliadina) y prolaminas de alto peso molecular” (Hernández et al. 2015).

**5. Glutelinas**, solubles en soluciones alcalinas o ácidas. (Cordero y Orozco 2011).

### **1.8.2 Precipitación de proteínas**

El objetivo fundamental de la precipitación de proteínas es obtener extractos ricos en proteína, considerando el incremento en la temperatura de precipitación permite la obtención de precipitados con mayor contenido proteico (Álvarez et al. 2014, p. 36).

Las proteínas se obtienen por precipitación a un pH específico determinado para cada semilla llamándose precipitación isoeléctrica para que se de este fenómeno es necesario solubilizar a las proteínas en un medio específico para lograr la separación de restos de los componentes por el ajuste de pH (Simon 2004, p. 4).

#### **1.8.2.1 Extracción con agua tomando en cuenta el punto isoeléctrico ( $p_i$ )**

Con este método se extraer de forma continua fracciones de compuestos insolubles mediante centrifugaciones sucesivas a un pH controlado sin desnaturalizar la proteína (Sair 1959, p. 1; Vioque et al. 2001, p. 128), tomando en consideración el punto isoeléctrico dependiendo de la naturaleza de una proteína (Álvarez et al. 2014).

#### **1.8.2.2 Extracción proteica con soluciones hidroalcohólicas**

Este método se extrae a contracorriente el alimento con mezclas de etanol 50-70 % v/v, al adicionar alcohol el secado del concentrado se hace más complicado (Vioque et al. 2001)

### *1.8.2.3 Extracción proteica con agua post Tratamiento térmico*

Para realizar este método se debe tener la harina desengrasada para luego ser tratada con vapor a presión atmosférica el cual permite insolubilizar la proteína considerando que el vapor hace se eliminan los componentes volátiles, disminuyendo las propiedades entre las fases acuoso-oleoso y así mejorando la solubilidad. La continua exposición al calor puede provocar sabores amargos y cambios oscuros en el concentrado dando lugar a reacciones de Maillard (Diaz 2016, p. 14; Vioque et al. 2001).

### *1.8.2.4 Extracción de proteínas por precipitación de sales*

Las proteínas precipitan en presencia de altas concentración de sales (sulfato de amonio y sulfato magnésico), para su aislamiento se usa la centrifugación con el fin de separar las fracciones por diferenciación de solubilidad, este método es usado para obtener proteínas de grado comercial a gran escala (Primo 1995, p. 291-292).

### *1.8.2.5 Extracción de proteínas por precipitación con ácidos y otros compuestos*

Para la extracción de proteínas también se pueden usar ácidos (Ácido tricloroacético, ácido clorhídrico) y metales pesados (acetato de plomo, cloruro de bario), por lo general se usan para eliminación de proteínas contaminantes en la industria de alimentos. A nivel de laboratorio se puede usar acetona y etanol para fines analíticos (Primo 1995, p. 291).

### **1.8.3 Métodos de determinación, cuantificación y caracterización de proteínas**

- **Cromatografía CF**

Se basa en separar a partir de una mezcla de sustancias disueltas en una solución (fase móvil) micropipetas, el cual es colocada en una cuba de vidrio gruesa, que resista la mezcla de solvente (agresivos) específica para los componentes a separar (fase estacionaria). Para la visualización de los diferentes componentes de la solución separada se usan agentes conocidos como reveladores que actúan y provocan colocaciones en el soporte (UNAM 2005).

- **Prueba de Biuret**

Es una prueba de identificación para polipéptidos y proteínas, la positividad de esta prueba se da al tornarse violeta al añadir el reactivo de biuret a la muestra, se debe a que se forma un complejo de coordinación en los cationes cúpricos en medio alcalino con las uniones peptídicas de las proteínas (Vázquez et al. 2014).

- **Prueba de coagulación**

“Esta prueba es específica para identificación de: albúminas, globulinas y prolaminas cuando es positiva esta prueba se visualiza la formación de un coágulo lo que se produce por la deshidratación de la molécula proteica ”(Vázquez et al. 2014).

- **Prueba de Sulfato de amonio**

“Las proteínas son precipitadas por soluciones concentradas como por ejemplo las sales de amonio [NaCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{NaSO}_4$ ]. Esto se produce por la neutralización y deshidratación de la molécula, seguida de agregación y precipitación” (Vázquez et al. 2014).

- **Cuantificación de proteínas por electroforesis**

La electroforesis en gel es una técnica para cuantificación de proteínas, se basa en la elución y recuperación de proteínas con ayuda del gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS PAGE), este proceso permite localizar la proteína de estudio en el gel, eliminar la proteína del gel, eliminar la SDS de la muestra eluida y renaturalizar la proteína (Kurien et al. 2020, p.479).

#### ***1.8.4 Reacciones de identificación de aminoácidos***

- **Prueba Xantoproteica**

Esta reacción que reconoce los aminoácidos que contienen el grupo bencénico (tirosina, fenilalanina, triptófano).

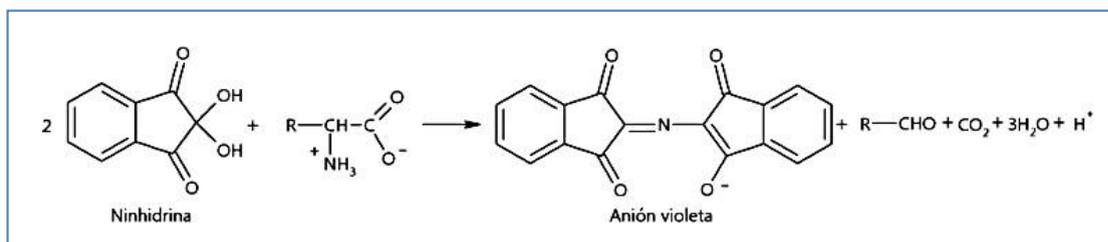
- **Prueba de la Ninhidrina**

La ninhidrina conocida también como: hidrato de tricetohidrindeno, por lo general los aminoácidos están constituidas por un grupo amino y un grupo carboxilo libre que reacciona

con la ninhidrina, produciendo un color violáceo esto se produce porque las soluciones amino y aminos se oxidan y/o reducen con el reactivo en presencia del amoníaco. Los aminoácidos porina e hidroxiprolina, que no poseen grupo amino sino imino (-NH-), dan un color rojo que pasa rápidamente a amarillo (Vázquez et al. 2014, p. 69).

### Mecanismo de reacción

La ninhidrina al ser un oxidante energético por desaminación oxidativa de los aminoácidos conduce a la formación de un aldehído, con liberación de amoníaco y gas carbónico además produce un intermediario llamado “hidridantina”, que en presencia de otra de ninhidrina, se condensa produciendo una coloración violeta o llamada púrpura de Ruhemann (Túnez 2018, p. 5). La coloración violeta propia de la reacción con ninhidrina es sensible todos los aminoácidos su espectro de absorción a los 570 nm (Teijón et al. 2009, p. 72).



**Figura 6-1: Reacción de ninhidrina más aminoácido**

Realizado por: Angy Estrada, 2020

- **Prueba de los grupos azufrados SH**

Es una prueba para identificar proteínas y/o aminoácidos azufrados, se reconocen por la formación de una coloración negra o gris (Vázquez et al. 2014).

- **Prueba de Sakaguchi**

La mayoría de las proteínas poseen arginina este reactivo nos permite identificarlo la reacción es positiva cuando la muestra se torna de color debido a la presencia del grupo guanidina (Vázquez et al. 2014).

- **Prueba de Hopkins-Cole**

Sirve para identificar las proteínas que contienen triptófano es positiva esta prueba cuando aparece un anillo color violeta rojizo (Vázquez et al. 2014).

## **1.9 Piña (*Ananas comosus*)**

### **1.9.1 Generalidades**

Es originaria de América del Sur, es una monocotiledónea que pertenece a la familia de las Bromeliáceas es de tipo herbáceo que se caracteriza porque sus raíces sobresalen de la parte de su inferior tallo, este es de longitud corta en él están insertadas hojas de forma espiral y su fruto es de forma cilíndrica de color blanquecino cuando esta verde y se torna de color amarillo a medida que avanza su estado de maduración (Gallardo et al. 2008; Sánchez 2012, p. 5).

### 1.9.2 Taxonomía de la piña

**Tabla 3-1: Clasificación taxonómica de la piña**

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Liliopsida
<b>Orden:</b>	Bromeliales
<b>Familia:</b>	Bromeliaceae
<b>Género:</b>	<i>Ananas</i>
<b>Especie:</b>	<i>Comosus</i>

Fuente:(Sánchez 2012)

### 1.10 Enzimas

Se define como fermentos orgánicos de origen proteico elaboradas por células vivas provenientes de animales y vegetales que actúan como catalizadores a gran velocidad descomponiendo el sustrato sobre el que actúan (Estrella 2005).

### 1.10.1 Enzima bromelina



**Figura 7-1: Bromelina**

Fuente: (Laproteina.es 2012)

La enzima bromelina se obtiene a partir de la piña con un alto valor nutricional (Dalgo 2012, p. 47), bromelina es una glicoproteína que pertenece al grupo de las cisteíno-proteasas, actúa directamente sobre los aminoácidos de tipo básico y aromático de las proteínas (Clavijo et al. 2012, p. 41).

#### 1.10.1.1 Propiedades de la bromelina

**Tabla 4-1: Propiedades de la bromelina**

<b>Numero CAS</b>	<b>(EC 3.4.22.32 - Stem bromelain),</b>
<b>Enzima de tipo</b>	Endoproteasa
<b>Especificidad</b>	Amplia
<b>Ph Óptimo</b>	4.5-8
<b>Temperatura de trabajo</b>	35-55°C
<b>Tolera</b>	Ph alcalinos
<b>Temperatura máx de trabajo</b>	60°C

Fuente: (Biocon.es 2016, p. 1)

Realizado por: Angy Estrada, 2020

### 1.10.1.2 Obtención de enzima bromelina

La bromelina por lo general se extrae de la cáscara de la piña con ayuda de etanol a una temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$  al cabo de 7 días logró establecer (Gallardo et al. 2008, p. 1).

**Tabla 5-1: Concentración enzimática de la bromelina en diferentes partes de la piña (*Ananas comosus*)**

Parte del fruto	Cantidad de enzimas proteolíticas (mg/ml)	Actividad específica (nmol/min/mg)
Pulpa	625,09	18,73
Corazón	591,04	19,88
Cáscara	857,35	9,05

Realizado por: Angy Estrada, 2020

Fuente: (Gallardo et al. 2008, p. 1)

### 1.10.2 Proenzimas o zimógenos

Estas enzimas son sintetizadas catalíticamente de forma inactiva que se activan de manera irreversible por ruptura proteolítica que libera péptidos de su cadena, al perder parte de su estructura la proteína adopta una configuración espacial convirtiéndose en enzima activa, para su inactivación después de ejecutada su acción se debe contrarrestar su función con proteínas inhibitoras que se unen a las enzimas proteolíticas bloqueando su acción o degradándolas (Blanco y Teijón 2006).

**Tabla 6-1: Enzimas proteolíticas y sus aspectos principales características**

Tipode proteasa	Origen	Nombre	Fuente	Temperatura (°C)	pH óptimo	Sitio de acción
Serinproteasa	Animal	Tripsina	Porcino, bovino	30-60	7-9	Lis, (o Arg)
		Quimiotripsina		45-55	8-9	Trp, (o Tyr, Fe, Leu)
	Bacteriana	Substilisín Carlsberg.	Bacillus Licheniformis	50-60	6-10	AAhf
		Subst. BPN	Bacillus amyloliquefasciens	40-55	6-10	
Cisteinproteasas	Plantas	Papaína	Papaya	40-75	5-8	Fe, (o Val, Leu)
		Bromelina	Pina		20-65	
		Ficina	Látex de ficus		5-8	
Aspartato proteasa	Animal	Pepsina	Porcino, bovino		1-4	-Fe (o Tyr, Leu) –
		Quimosina	Becerro		4-6	Trp (o Fe, Tyr)

Fuente:(Wei y He 2003, p. 309; Benítez et al. 2008)

### 1.10.3 Método de acción de las enzimas

Las enzimas permiten que los organismos lleven a cabo sus reacciones químicas ya que disminuyen su energía de activación de los reactivos obteniendo mayor velocidad de reacción, sin necesidad de aumentar su temperatura ya que si esto ocurre se produce la desnaturalización de la proteína (Valdivia et al. 2008). Para que una enzima actúe eficazmente sobre un sustrato, es

necesario que en la reacción enzimática participen varios grupos funcionales presentes en la enzima para que se dé el proceso catalítico (Carbonero 1975, p. 110).

- **Especificidad de las enzimas**

Una enzima muestra afinidad sobre un sustrato específico el cual actúa sobre un centro activo el producto formando un **complejo enzima-sustrato** (Peña et al. 2004, p. 185-188).

El grado de especificidad de una enzima se determina por el número de grupos químicos que existe sobre la superficie proteica constituye el 5 % de su superficie total y se lo denomina “centro activo”, el cual permite la unión sustrato enzima y la catálisis el mismo que dependerá los aminoácidos próximos de la cadena peptídica, la unión enzima sustrato depende en gran medida de los enlaces iónicos, puentes de hidrógeno y Van der Waals los cuales contribuyen a la marcada especificidad de las enzimas sobre los sustratos específicos (Teijón et al. 2009, p. 266).

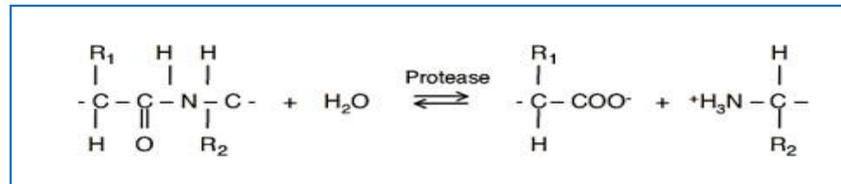
### **1.11 Hidrólisis de proteínas**

La hidrólisis es la ruptura de una estructura primaria de una proteína, dependiendo del tiempo de exposición de la proteína al agente hidrolizador (ácido, enzima, álcali), se genera péptidos de diferente peso molecular (hidrólisis parcial) y si se obtiene, aminoácidos libres si la exposición al agente hidrolizador es mayor y el avance de reacción es completo (hidrólisis total) (Saavedra 2016, p. 20).

**Hidrólisis enzimática** es la ruptura de largas cadenas de proteínas hasta convertirlos en péptidos o aminoácidos, por acción de enzimas proteolíticas de tipo proteasa (Benítez et al. 2008, p.227).

**Hidrólisis ácida:** Las proteínas al ser sometidas a una solución de ácido clorhídrico al 20%, y en presencia de calor por medio de reflujo durante varias horas los enlaces amina se rompen degradándose la proteína obteniéndose aminoácidos libres (Ege 2018, p. 1207).

En la siguiente figura, la enzima de tipo proteasa actúa sobre el enlace peptídico, rompiéndolo, y dejando libre el grupo amino y el grupo carboxilo. El grupo amino y carboxilo obtenidos al finalizar la hidrólisis están parcialmente ionizados este estado dependerá del pH al que se realizó la hidrólisis (León y Sifuentes 2017).



**Figura 8-1: Reacción catalizada por proteasas**

**Fuente:** (León y Sifuentes 2017, p. 20).

### 1.11.1 Características de la proteína hidrolizada

- Por lo general este tipo de proteína tiene un sabor amargo debido al proceso de hidrólisis, dándole una característica muy peculiar ya que mientras más amarga sea, mayor será el número de cadenas proteicas descompuestas por lo tanto tendrá el producto será de mejor calidad (Toro 2018).
- Disminución de peso molecular de la proteína ya sea por fraccionamiento total o parcial, acompañado del aumento de carga y la exposición de los grupos hidrofóbicos (Benítez et al. 2008, p. 231).
- Existe cambios funcionales que adopta la proteína así tenemos: alergenicidad disminuida a las proteínas tipo parentales. Alteraciones en propiedades fisiológicas en las que da lugar a la formación de péptidos bioactivos y de propiedades funcionales como el aumento de la solubilidad además de poder emulsificante y espumante (Benítez et al. 2008, p. 231). Su costo en el mercado es elevado debido al gran aporte nutricional que proveen (Toro 2018).

**Tabla 7-1: Valores nutricionales del grano de quinua vs Hidrolizado proteico**

<b>Aminoácidos esenciales</b>	<b>Semillasdequinua</b>	<b>Hidrolizado proteico de quinua(g/100)</b>
Histidina	2.98	4.28
Isoleucina	3.57	3.41
Leucina	5.95	6.25
Lisina	5.42	4.25
Metionina	2.18	1.82
Fenilalanina	4.20	3.85
Treonina	2.98	3.86
Triptófano	1.18	N/D
Valina	4.21	3.93
Digestibilidad de proteínas	78.00 %	87.73 %
<b>Aminoácidos no esenciales</b>	<b>Semillasdequinua</b>	<b>Hidrolizado proteico de quinua</b>
Acido aspártico	8.30	6.27
Acido glutámico	13.10	12.75
Serina	4.20	5.45
Tirosina	1.85	1.89
Arginina	7.73	7.25
Alanina	4.16	4.23
Glicina	4.92	4.69
Prolina	4.21	3.93

Fuente: (Nazate et al. 2019, p. 85; Ruales y Nair 1994, p. 453)

### ***1.11.2 Aplicaciones de proteínas hidrolizadas***

- Los hidrolizados se usan en la tecnología alimentaria gracias a su: solubilidad, poder emulsificante y capacidad espumante (Benítez et al. 2008), al aumentar su solubilidad se usa en bebidas alimentarias ácidas para obtener mejorar calidad (Monu, R. & Aluko 2003).
- Se han formulado productos hidrolizados infantiles que tiene una propiedad importante que es la hipo alergénico, son más estables enzimáticamente ya que se reduce notablemente el poder emulsionante de la fórmula infantil por ende existe menor riesgo que su consumo produzca algún trastorno gástrico (Mahmoud, Malone y Codle 1992).
- Los péptidos antioxidantes obtenidos por proteínas mediante enzimas de origen vegetal, animal o microbiana, tienen gran potencial uso en la industria alimenticia y farmacéutica, para tener acción antioxidante (Gallegos et al. 2013, p. 119).
- Los péptidos de peso molecular bajo, tienen más potencialidades que los péptidos de peso molecular alto ya pueden actuar como agentes antihipertensivos y reducir los radicales libres en el cuerpo (Monu, R. & Aluko 2003)
- En la cosmética, las proteínas hidrolizadas retrasan el envejecimiento dérmico proveniente de tejidos animales, los cuales estimulan la síntesis de colágeno y de otros componentes del tejido colaginoso mediante el aporte de los AA y péptidos (Juher y Pérez 2015, p. 62,65).

## CAPITULO II

### 2 MARCO METODOLÓGICO

El presente trabajo investigativo consta de las siguientes fases:

- Obtención de la proteína de quinua
- Hidrólisis enzimática de la proteína de quinua (monitorio de hidrólisis)
- Propuesta para la elaboración de una bebida de quinua tratada con extracto natural enzimático de bromelina

#### ✓ **Lugar de la Investigación**

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

#### ✓ **Tipo de investigación**

La presente investigación es de tipo explicativa ya por medio de un seguimiento cromatográfico y fotométrico se busca determinar cómo actúa la bromelina sobre la proteína de la quinua durante la hidrólisis enzimática, resultados que potencialmente podrían aportar en los campos de la Industria química, cosmética y alimentaria.

✓ **Materiales, equipos y reactivos usados en la investigación**

**Para el aislamiento proteína de quinua**

<b>MATERIALES</b>	<b>REACTIVOS</b>	<b>EQUIPOS</b>
Tamiz	HCl concentrado	Licadora
Vasos de precipitación de 250 ml	Reactivo de Biuret	Centrifuga
Varilla de agitación	Etanol de 96°	pH metro
Bureta de 25 ml	Agua destilada	
Vaso de precipitación de 1000 ml	Agua destilada	
Pipeta graduada		
Pinzas universales		
Soporte		
Tubos de centrifuga		
Reverbero		

Realizado por: Angy Estrada, 2020

**Para la hidrólisis enzimática**

<b>MATERIALES</b>	<b>INGREDIENTES</b>	<b>EQUIPOS</b>
Olla	Canela en polvo	Reverbero
Cernidora	Anís estrellado	Centrifuga
Varilla de agitación	Harina de quinua	
Tubos de centrifuga	Piña	
Cuchara		
Frasco de vidrio		

Realizado por: Angy Estrada, 2020

**Para la elaboración de la bebida experimental de quinua**

<b>MATERIALES</b>	<b>REACTIVOS</b>	<b>EQUIPOS</b>
Vaso de precipitación de 500 ml	NaOH al 1 %	Agitador magnético
Vaso de precipitación de 250 ml	Ninhidrina al 2 %	Centrifuga
Varilla de agitación	Etanol de 96°	pH metro
Pipeta graduada de 10 ml	Agua destilada	Balanza analítica
Tubos de centrifuga	Agua destilada	Estufa
Vidrio reloj		Incubadora
Mortero y pistilo		
Vasos de precipitación de 100 ml		
Tubos de ensayo de centrifuga		
Pipeta Pasteur		

Realizado por: Angy Estrada, 2020

## ✓ Preparación de reactivos

### **Reactivo de biuret**

Se pesa 0,38 g de sulfato de cobre penta hidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) y 1,2 g de tartrato de sodio y potasio. Se disuelve en 50 ml de agua destilada, agregar 100 ml de solución de NaOH al 10 % se agita y se aforar a 250 ml. La presente solución se conserva en un frasco ámbar para evitar su descomposición por acción de la luz.

### **Reactivo de ninhidrina al 0.2%**

Se pesa 0,2 gramos de ninhidrina en 100 ml de alcohol potable al 96 % agitar y conservar en un frasco color ámbar.

### **Reactivo de millón**

Se pesa 5 g de mercurio, colocar cuidadosamente en una probeta y añadir 15 ml de ácido nítrico concentrado ( $\text{HNO}_3$ ), dejar reaccionar hasta observar que no exista la emanación de gases tóxicos propios de la reacción, añadir 45 ml de agua de destilada agitar y conservar en un frasco limpio y seco de color ámbar.

### **Reactivo xantoproteico (Ácido nítrico concentrado)**

### **Reactivo Liebermann Burchard**

Se añade 10 ml de anhídrido acético y 2 ml de ácido sulfúrico concentrado agitar y conservar en un frasco ámbar.

### **Reactivo de Hopkins –Cole**

A 0,010 g de magnesio agregar 25 ml de ácido oxálico y 25 ml de agua destilada agitar y finalmente colocar en un frasco la solución.

## 2.1 Obtención de proteínas

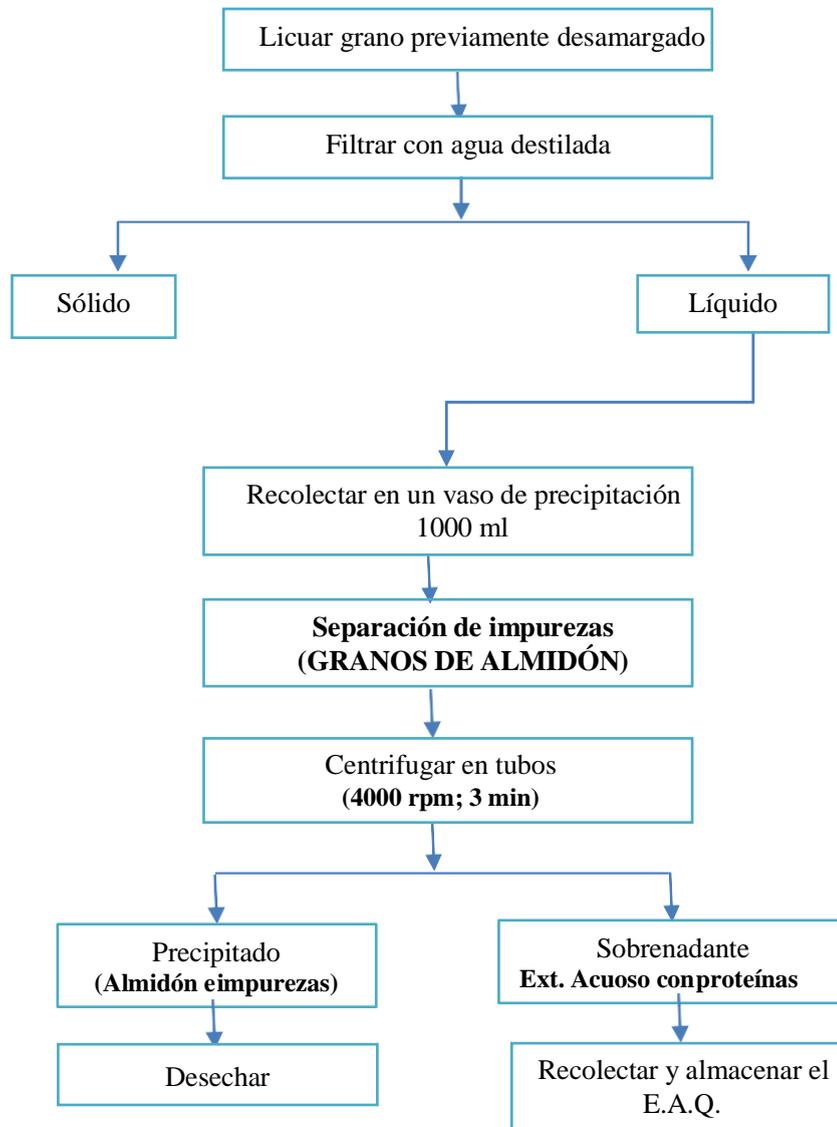
Para la obtención y aislamiento de proteínas a partir del grano de quinua se siguen los siguientes pasos:

- *Proceso de desamargado del grano de quinua*
- *Proceso de obtención del extracto acuoso del grano de quinua (E.A.Q.)*
- *Precipitación ácida de la proteína bruta de quinua (P.B.Q.)*
- *Aislamiento hexánico de saponinas contaminantes de la proteína bruta de quinua (P.B.Q.)*
- *Caracterización de la proteína de quinua (P.Q.)*
- *Rendimiento de la proteína de quinua (P.Q.)*

### 2.1.1 *Proceso de desamargado del grano de quinua*

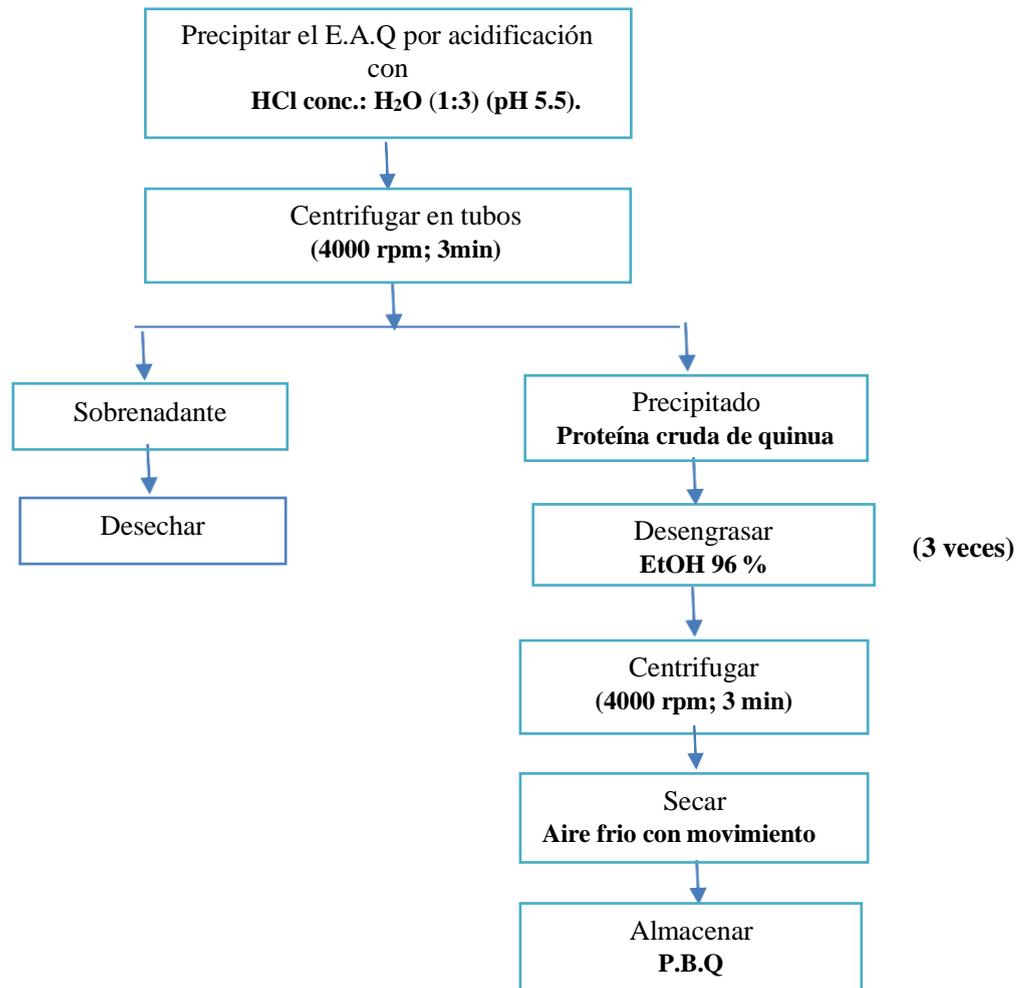
- ✓ Pesar 254 g de granos de quinua blanca
- ✓ Dejar en remojo con 750 ml de agua por aprox. 8h con el fin de desamargar el grano
- ✓ Eliminar el agua de remojo

### 2.1.2 *Proceso de obtención del extracto acuoso del grano de quinua desamargado (E.A.Q)*



Realizado por: Angy Estrada, 2020

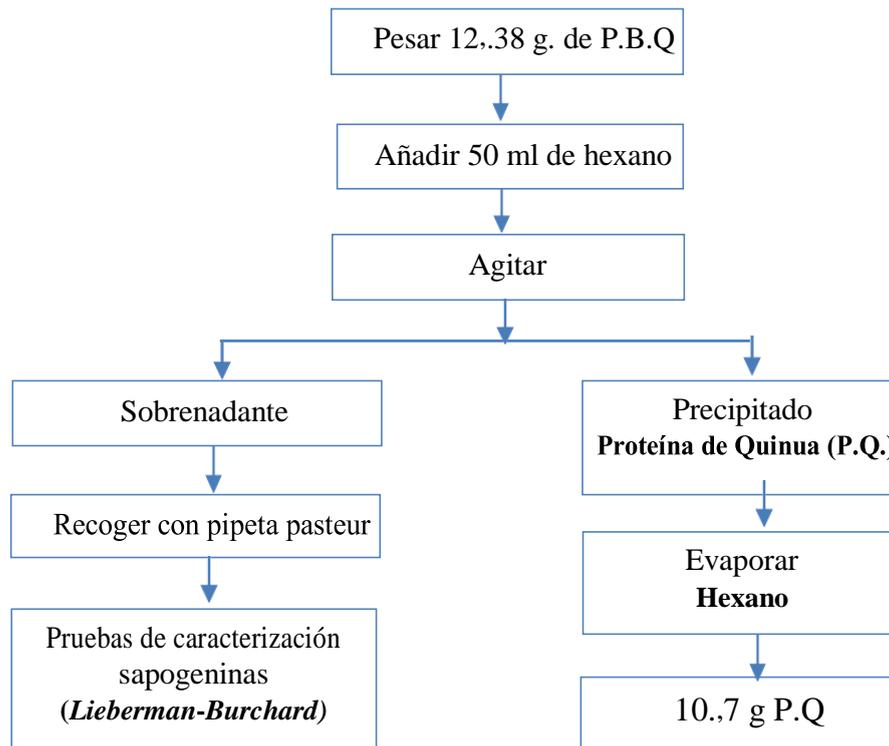
### 2.1.3 *Precipitación ácida de proteína bruta de quinua (P.B.Q)*



Realizado por: Angy Estrada, 2020

2.1.4 *Aislamiento hexánico de sapogeninas contaminantes en la proteína bruta de quinua (P.B.Q)*

a) *Procedimiento para eliminar sapogeninas de la proteína bruta de quinua*

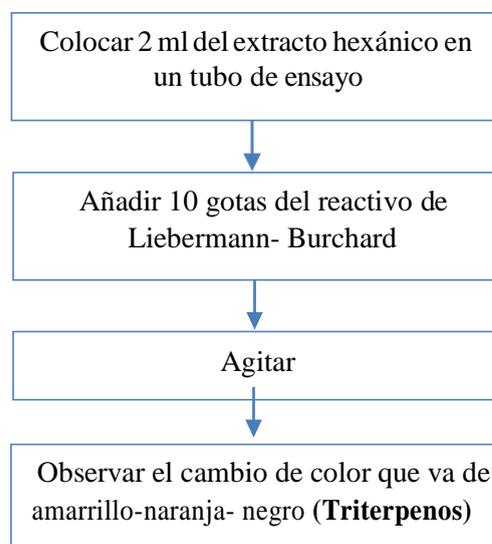


Realizado por: Angy Estrada, 2020

## b) Caracterización de sapogeninas esteroidales (Liebermann-Burchard)

### Fundamento

Esta reacción se basa en la oxidación del colesterol libre y estratificado presente en la muestra, que en presencia del ácido sulfúrico y anhídrido acético forman un compuesto coloreado el mismo que puede ser detectado a una absorbancia de 540 nm indicadores de la presencia de compuestos triterpénicos (Roca et al. 2003, p. 243).



Fuente: (Véjar 2005, p. 60)

Realizado por: Angy Estrada, 2020

### 2.1.5 *Caracterización de la proteína de quinua (P.Q.)*

“Por la naturaleza de los compuestos o la presencia de ciertos grupos funcionales las proteínas reaccionan con agentes que producen agregados coloreados” (Bohinski 1998, p. 86; Characterization y Oyster 2014). Para la caracterización de las proteínas aisladas del grano desamargado se usaron diferentes pruebas cualitativas de análisis:

a) **Prueba de biuret** (FAO 1997, p. 169).

#### **Fundamento**

“Al adicionar la solución de proteína el reactivo de Biuret produce una reacción de coloración púrpura esto se produce cuando los iones cuprosos ( $\text{Cu}^{2+}$ ) se acomplejan a los enlaces peptídicos (NH) en presencia de pH alcalino. La intensidad del color dependerá del tipo de proteína y el contenido de proteína presente en la muestra”.

#### **Procedimiento**

- ✓ Pesar 0,25 g de proteína aislada y añadir en tu de precipitación
- ✓ Añadir 3 ml de agua destilada al tubo
- ✓ Colocar 1ml de Reactivo de biuret y agitar
- ✓ **Prueba positiva** si la muestra se torna de color violeta

b) **Prueba de Millón** (Vázquez et al. 2014)

**Fundamento**

“Esta reacción es positiva en proteínas que presentan compuestos fenólicos no sustituido en la posición 3, 5 así tenemos la tirosina, fenol y timol al producirse esta reacción probablemente se dé la formación del complejo de óxido de mercurio y fenol”.

**Procedimiento**

- ✓ Añadir a 0,25gr. de proteína de quinua 10 gotas de reactivo de millón
- ✓ Agitar hasta la obtención de un precipitado blanco
- ✓ Calentar la muestra a baño maría
- ✓ Prueba positiva si la muestra se torna de color rojo

c) **Prueba Xantoproteica** (Vázquez et al. 2014)

**Fundamento**

“Esta reacción que reconoce los aminoácidos que contienen el grupo bencénico (tirosina, fenilalanina, triptófano). Es positiva esta reacción cuando se añade ácido nítrico e NaOH a la muestra se torna amarillo o verde debido a la formación de nitrocompuestos aromáticos”.

## **Procedimiento**

- ✓ En un tubo de ensayo añadir pesar 0,25 g de proteína de quinua
- ✓ Añadir 2 ml de agua
- ✓ Añadir 1 ml de HNO<sub>3</sub>, concentrado
- ✓ Agitar
- ✓ Someter a baño maría la muestra y verifique si la solución se torna de color amarillento
- ✓ Dejar enfriar el tubo
- ✓ Adicionar gota a gota una disolución de NaOH al 10%
- ✓ Reacción es positiva si la coloración se torna anaranjada

d) **Prueba de Hopkins –Cole** (Vázquez et al. 2014).

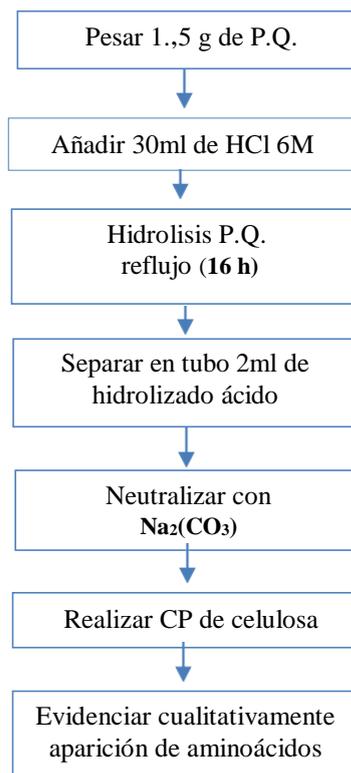
## **Fundamento**

“Sirve para identificar las proteínas que contienen triptófano el cual reacciona con el ácido glioxílico en presencia del ácido sulfúrico concentrado es positiva esta prueba cuando aparece un anillo color violeta”.

**Procedimiento** (Giraldo et al. 2010, p. 100)

- ✓ Añadir 2 ml de solución problema
- ✓ 2 ml de reactivo de Hopkins-Cole
- ✓ Agitar
- ✓ Adicionar por las paredes del tubo 1 ml de ácido sulfúrico concentrado

**e) Hidrólisis ácida total de P.Q. como prueba indirecta de caracterización proteica**



**Realizado por:** Angy Estrada, 2020

### 2.1.6 Rendimiento de la proteína de quinua

Se calcula el rendimiento de la obtención de la proteína de quinua, obtenida a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento de la P.Q. obtenida (\%)} = \frac{\square * 100}{\square}$$

**Donde:**

Peso práctico de los granos de quinua (**P**) = 254g

Masa de proteína de quinua obtenida (**m**) = 14,38 g

Se calcula el rendimiento de la obtención de la proteína bruta de quinua, obtenida a través de la siguiente fórmula:

$$\frac{\square * 100}{\square}$$

**Donde:**

Peso práctico de los granos crudos de quinua (**P**) = 254g

Masa de proteína de quinua bruta obtenida (**m**) = 21,50 g

## 2.2 Hidrólisis enzimática de la proteína de quinua (monitoreo hidrólisis)

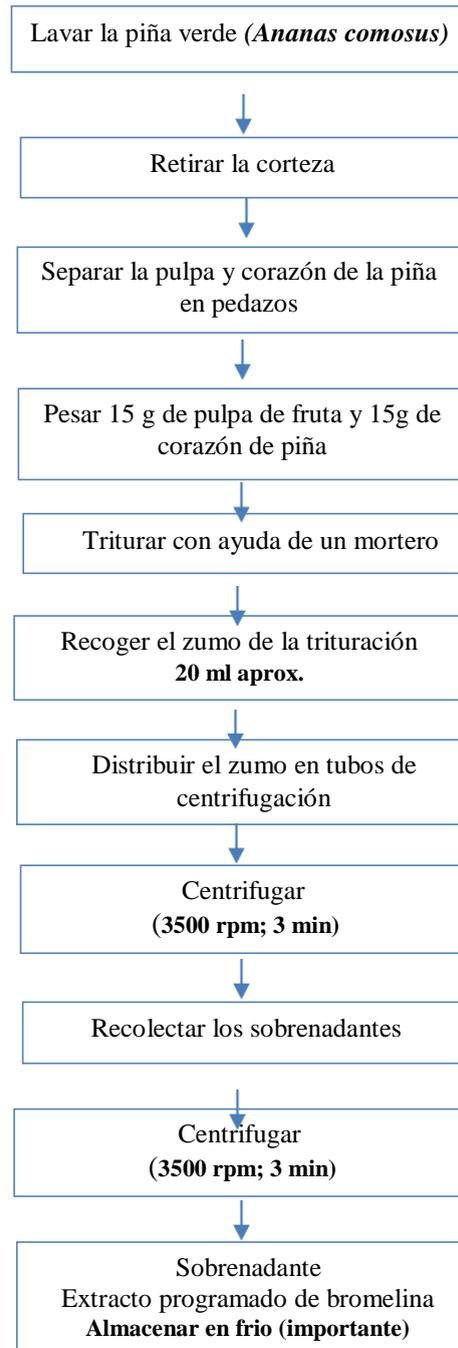
El presente trabajo experimental de hidrólisis enzimática consta de las siguientes partes:

- *Obtención de un extracto programado de bromelina a partir de la piña (**Ananas comosus**).*
- *Proceso de hidrólisis enzimática de la proteína de quinua con extracto programado de bromelina.*
- *Control del proceso de hidrólisis:*
  1. Seguimiento cromatográfico de la hidrólisis enzimática de la proteína de quinua.
  2. Seguimiento fotométrico de la hidrólisis enzimática de la proteína de la quinua

### 2.2.1 *Obtención de un extracto programado de bromelina a partir de la piña (**Ananas comosus**)*

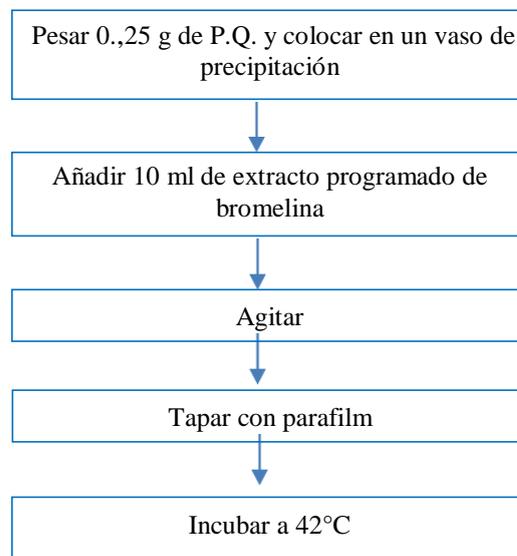
El extracto enzimático de bromelina se realiza con piña (**Ananas comosus**), de estado de maduración (inmadura), perteneciente a la familia Bromeliácea, género: **Ananas**, especie **comosus** (Miller, 1917), adquirida en el mercado mayorista de la ciudad de Riobamba. Según los reportes (Gallardo et al. 2008, p. 1),” afirma que la pulpa y el corazón de la piña fresca, contiene mayor actividad y concentración enzimática de la bromelina, por lo que para la presente experimentación se ha decidido usar estas partes del fruto”.

El extracto programado de bromelina se prepara siguiendo el presente procedimiento:



Realizado por: Angy Estrada, 2020

**2.2.2** *Proceso de hidrólisis enzimática de la proteína de quinua con extracto programado de bromelina*



**Realizado por:** Angy Estrada, 2020

Los factores a considerar en la hidrólisis enzimática de proteínas en el trabajo son:

**Tabla 1-2: Factores en estudio**

<b>FACTOR</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>NIVEL</b>	
<b>Factor A</b>	<b>Tiempo</b>	0 h	T <sub>0</sub>
		24h	T <sub>1</sub>
		48 h	T <sub>2</sub>
		72 h	T <sub>3</sub>
		120 h	T <sub>4</sub>
		144 h	T <sub>5</sub>
		168 h	T <sub>6</sub>
<b>Factor B</b>	<b>Temperatura</b>	42°C	b <sub>0</sub>

**Realizado por:** Angy Estrada, 2020

Estos tiempos y temperaturas se escogieron luego de varias pruebas previas. Los indicadores para el seguimiento del fraccionamiento proteolítico son: el control cromatográfico de la hidrólisis enzimática de la proteína de quinua en cromatofolios de silica-gel y la medición fotométrica en el proceso de proteólisis de la proteína de quinua, según los tratamientos descritos en la (Tabla 1-2) cada uno con 2 y 3 réplicas respectivamente:

**Tabla 2-2: Diseño de tratamientos para seguimiento cromatográfico y fotométrico de la hidrólisis enzimática**

Tratamiento	Combinación	INDICADORES DE CONTROL				
		Cromatografía (CF) silica-gel		Medición de absorbancia		
		Cromatograma 1	Cromatograma 2	R1	R2	R3
1	b <sub>0</sub> T <sub>0</sub> (0 h)					
2	b <sub>0</sub> T <sub>1</sub> (24 h)					
3	b <sub>0</sub> T <sub>2</sub> (48 h)					
4	b <sub>0</sub> T <sub>3</sub> (72 h)					
5	b <sub>0</sub> T <sub>4</sub> (120 h)					
6	b <sub>0</sub> T <sub>5</sub> (144 h)					
7	b <sub>0</sub> T <sub>6</sub> (168 h)					

**Donde R: réplica**

Realizado por: Angy Estrada, 2020

### 2.2.3 Control de la hidrólisis enzimática de la proteína de quinua

#### 2.2.3.1 Seguimiento cromatográfico de la hidrólisis enzimática de la proteína de quinua

El hidrolizado enzimático con bromelina a una temperatura de 42°C y tiempos indicados anteriormente en la (Tabla 2-2), fueron sometidos a una cromatografía en capa fina en cromatofolios de silica-gel para visualizar los péptidos generados en el rango de tiempos establecidos. Las muestras aplicadas fueron: extracto programado de bromelina y cada uno de los tratamientos identificados como (T<sub>i</sub>) que abarca un tiempo de 0 h a 168 h (0 h, 24 h, 72 h, 120 h, 144 h, 168 h).

Se utilizó ninhidrina como revelador para visualizar los péptidos sustentados en que, la ninhidrina es específica para el grupo amino presente en los aminoácidos, por tanto, reaccionaría con los grupos aminos que se generaría progresivamente a partir de la hidrólisis de la proteína de quinua, que en pruebas de ensayo realizadas en cromatofolio de silica-gel, se observa manchas rosáceas que corresponderían a la generación de péptidos, metodología que se redacta en el numeral (*Procedimiento para la cromatografía en papel de celulosa (revelador: ninhidrina) del hidrolizado de quinua (7días) para contrastar visualmente con la cromatografía en silica.*, pág. 57).

**a) Procedimiento para la realización de una cromatografía en silica gel para visualizar los péptidos generados (revelador: ninhidrina)**

- ✓ Usar guantes y recortar el *cromatofolio de silica-gel* de dimensión 14,5cm x 20cm, adecuado para el número de muestras a eluir.
- ✓ Marcar las posiciones para los tratamientos en el *cromatofolio de silica-gel* con ayuda de una hoja cuadriculada.
- ✓ Aplicar sobre las marcas 20 aplicaciones de cada uno de los tratamientos con ayuda de micro capilares.
- ✓ Secar el papel a temperatura ambiente.
- ✓ Asegurar la placa para su colocación en la cuba de modo que la línea antes señalada quede por encima del eluyente.
- ✓ Cerrar la cuba y esperar que el solvente ascienda por la placa 16,5 cm (Fs).
- ✓ Retirar, evaporar y secar la placa a temperatura ambiente.
- ✓ Revelar la placa pulverizando una solución de ninhidrina al 0,2 %
- ✓ Exponer la placa preferentemente al sol hasta la aparición de manchas (rosáceas) y posteriormente en la estufa a 110°C para terminar el revelado de la placa.

**Eluyente:**

Para CF ascendente Butanol -Ácido Acético -Agua (27,5: 13: 10)

**Revelador:**

Solución de ninhidrina al 0,2 % etanol

Para verificar que las manchas rosáceas corresponden a péptidos se realizó una cromatografía en papel de celulosa, utilizando como revelador ninhidrina, con las mismas condiciones de la cromatografía realizada en silica-gel. Las muestras aplicadas fueron: muestra del hidrolizado enzimático (7 días), acompañado con aplicaciones de: albúmina de huevo, proteína de quinua y el extracto programado de bromelina.

Esta cromatografía busca determinar que las manchas rosáceas generadas en el *cromatofolio de silica-gel* coincidan, con las manchas violetas que se generarían en la cromatografía en *papel de celulosa* revelada con ninhidrina. La finalidad de aplicar albúmina de huevo y proteína de quinua en la cromatografía en papel es definir si una proteína reacciona con ninhidrina y simultáneamente detectar si un péptido reacciona con este reactivo, además se busca comparar, las manchas generadas en la cromatografía de silica-gel con las manchas presentes en el papel de celulosa para aceptar la ninhidrina como revelador de péptidos en cromatografía de silica-gel.

La cromatografía en papel de celulosa fue replicada en cromatofolios de silica- gel.

**b) Procedimiento para la cromatografía en papel de celulosa (revelador: ninhidrina) del hidrolizado de quinua (7días) para contrastar visualmente con la cromatografía en silica.**

- ✓ Usar guantes y recortar el *papel de celulosa* de dimensión 14,5 cm x 20 cm.
- ✓ Marcar las posiciones para cada una de las muestras con ayuda de una hoja cuadriculada considerando la misma distancia de separación entre muestra y muestra.
- ✓ Aplicar sobre las marcas 20 aplicaciones de cada una de las muestras (albúmina de huevo, proteína de quinua, extracto programado de bromelina, hidrolizado enzimático (7días)) con ayuda de micro capilares.
- ✓ Secar el papel a temperatura ambiente (evitar contaminación).
- ✓ Asegurar el papel y colocar en la cuba de modo que la línea antes señalada quede por encima del eluyente.
- ✓ Cerrar la cuba y esperar que el solvente ascienda por la placa [16,5 cm (Fs)].
- ✓ Retirar, evaporar y secar el papel al ambiente.
- ✓ Revelar el papel pulverizando una solución de ninhidrina al 0,2 %.
- ✓ Exponer el papel preferentemente al sol hasta la aparición de manchas (Violeta) y posteriormente en la estufa a 110°C para terminar el revelado de la placa.
- ✓ **NOTA:** Comparar cromatograma de papel de celulosa con el cromatograma de silica-gel

**Eluyente:**

Para CF ascendente Butanol -Ácido Acético -Agua (60: 15: 20)

**Revelador:**

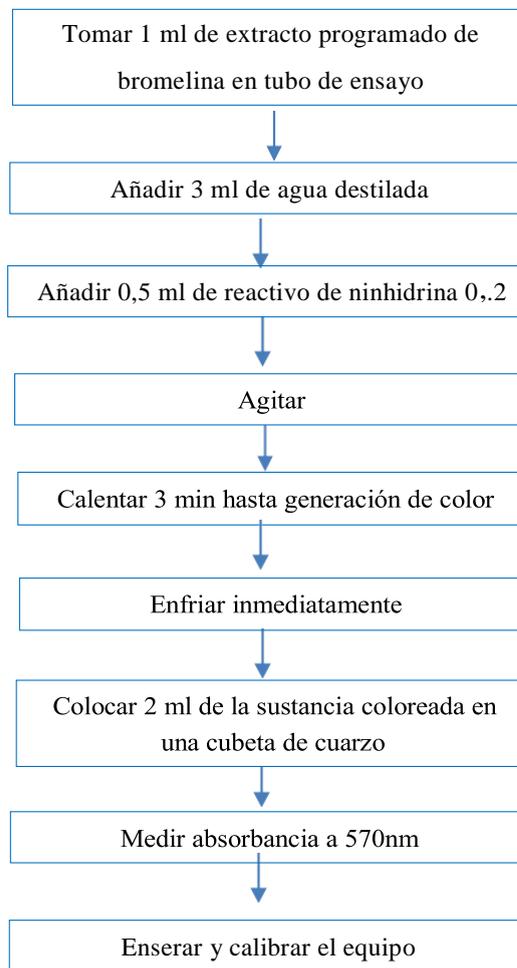
Solución de ninhidrina al 0,2 % etanol

### 2.2.3.2 Seguimiento fotométrico de la hidrólisis enzimática de la proteína de la quinua

El procedimiento para el seguimiento de la generación de péptidos de la hidrólisis enzimática a partir de la proteína de la quinua se realiza fotométricamente con ninhidrina. Dado que la ninhidrina es específica para la determinación de aminoácidos al reaccionar con el grupo amino produce un color púrpura, se probó la utilización de un método fotométrico adaptado, sustentado en pruebas previas donde, el grupo amino de los péptidos generados reaccionan con ninhidrina, esperándose la generación de un color cercano al azul de Ruhemann o púrpura típico en aminoácidos, debido al acortamiento de la cadena peptídica inicial y al aumento de grupos amino por la formación de péptidos.

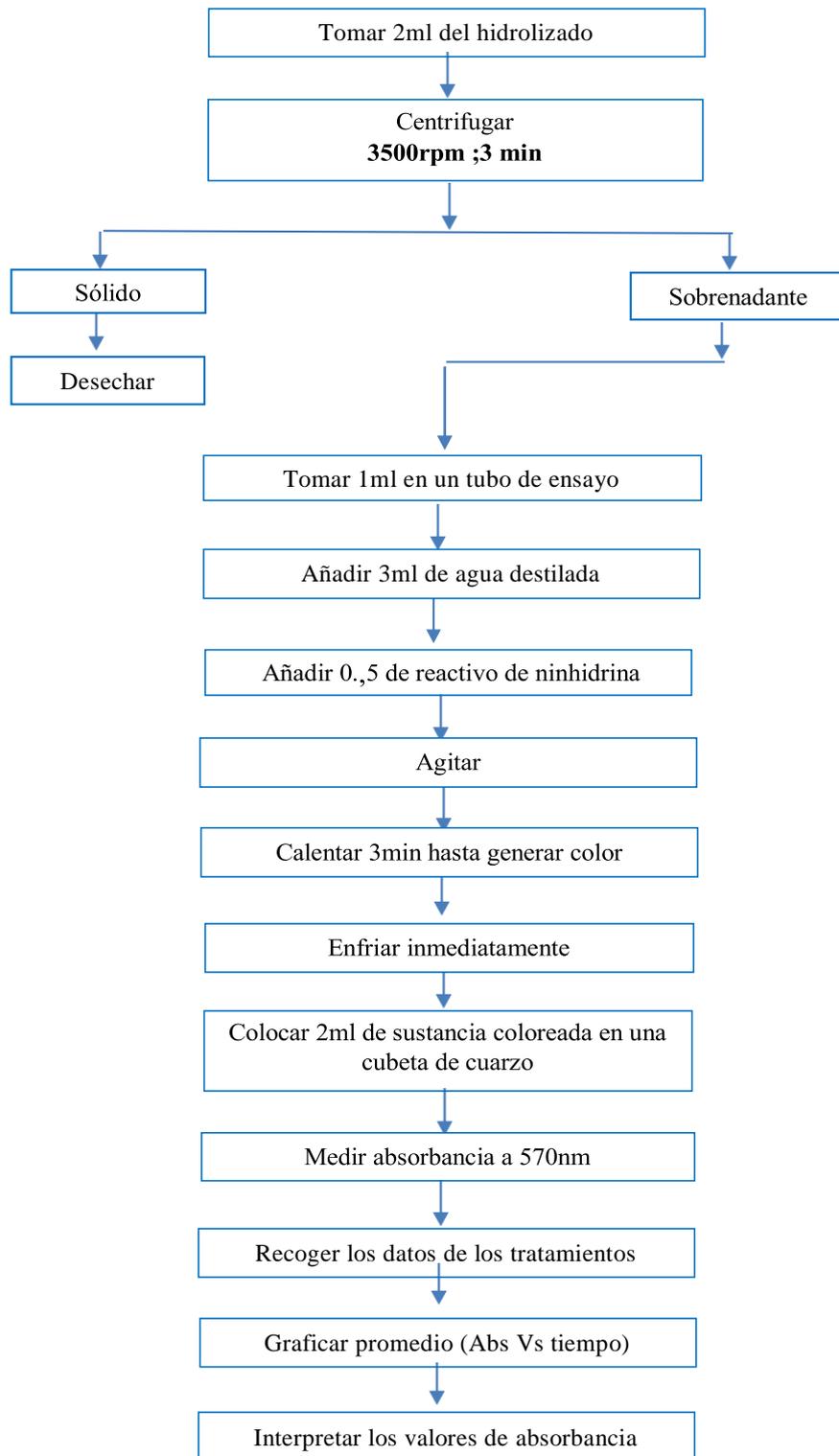
A continuación, presentamos el procedimiento aplicada a cada tratamiento con tiempos y temperaturas detallada en la *(Tabla 2-2)* y del blanco normalizado correspondiente para cada uno de ellos:

## Procedimiento de elaboración del blanco normalizado para calibración del equipo fotométrico



**Realizado por:** Angy Estrada, 2020

## Procedimiento de hidrólisis y seguimiento fotométrico para cada tratamiento



Realizado por: Angy Estrada, 2020

## **2.3 Elaboración de una bebida de quinua tratada con extracto enzimático natural de bromelina**

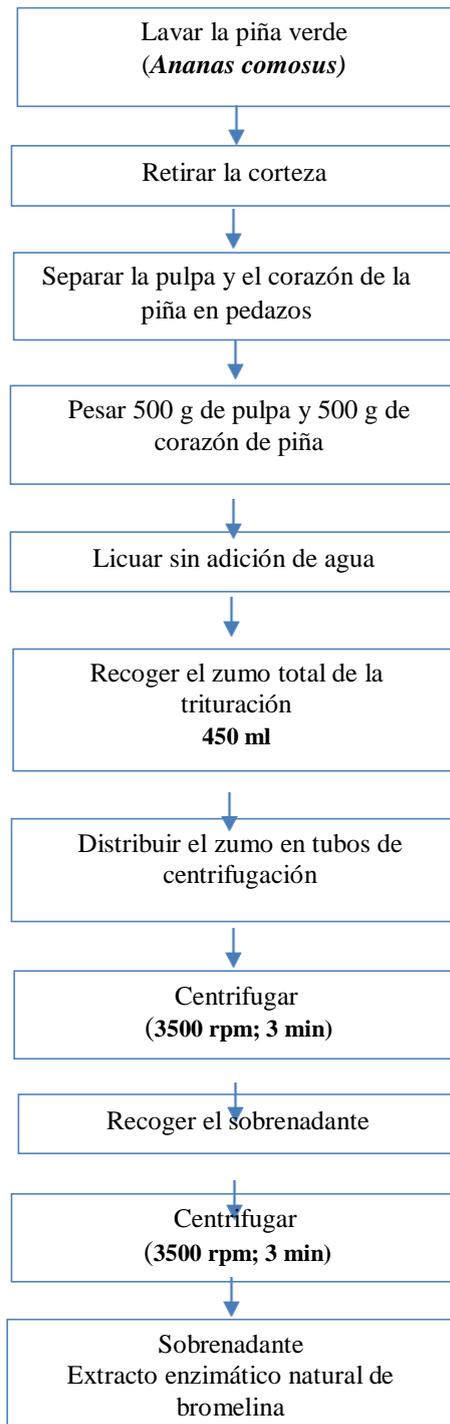
El valor agregado del presente trabajo investigativo es la preparación de una bebida de quinua basada, en la metodología experimental usada para la realización del proceso de hidrólisis enzimática con el extracto programado de bromelina, con la finalidad de obtener una bebida de quinua con proteína parcialmente hidrolizada que proporcionará péptidos al consumidor.

Para la propuesta de la elaboración de la bebida casera de quinua se sigue de los siguientes pasos:

- Preparación de un extracto enzimático natural de bromelina de piña (para bebida)
- Elaboración experimental de una bebida de quinua tratada con extracto natural de bromelina
- Pruebas de degustación de la bebida de quinua
- Propuesta para la elaboración de una bebida casera de quinua con extracto enzimático natural de bromelina

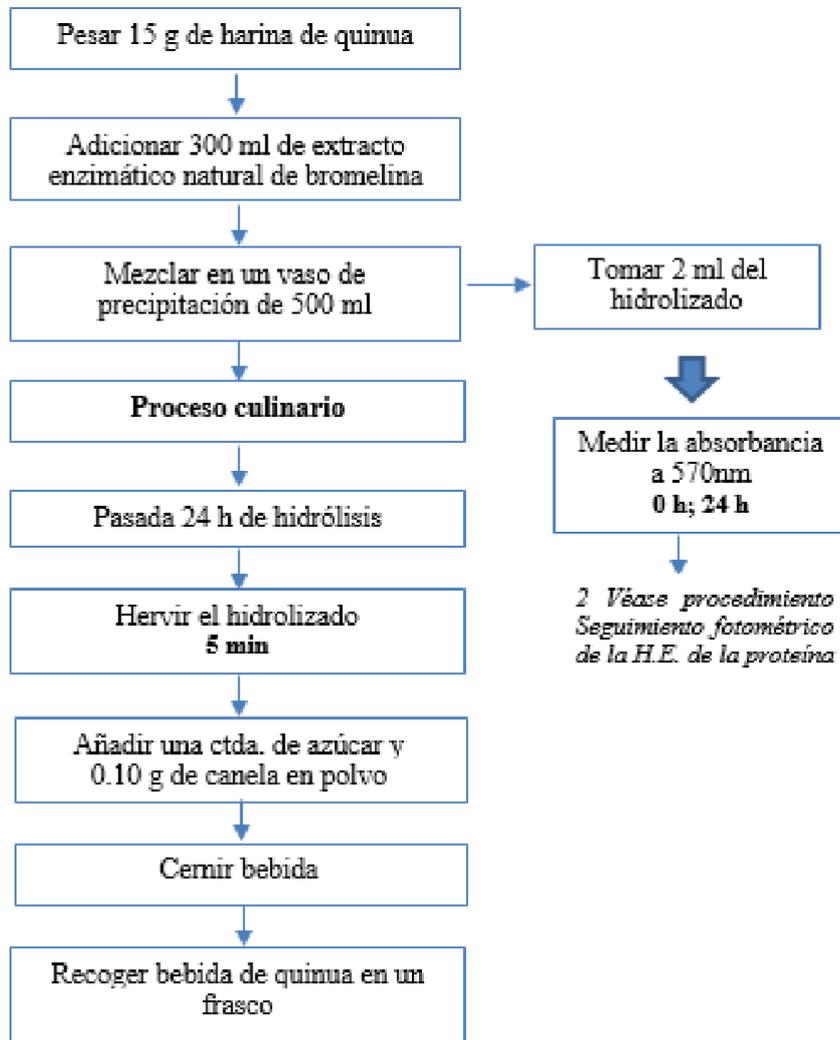
### ***2.3.1 Preparación de un extracto enzimático natural de bromelina de piña (para bebida)***

El extracto enzimático es un líquido preparado a partir de una piña inmadura, que contiene la enzima bromelina sin adición de agua, el cual garantiza la mayor concentración enzimática extraída de la pulpa y corazón del fruto. El proceso de preparación está basado en el siguiente proceso experimental:



**Realizado por:** Angy Estrada, 2020

2.3.2 *Elaboración experimental de una bebida de quinua tratada con extracto natural de bromelina*



Realizado por: Angy Estrada, 2020

### **2.3.3 Pruebas de degustación de la bebida de quinua**

Para la presente prueba se tomó en consideración a 20 estudiantes de la carrera de Química de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, pertenecientes al periodo septiembre 2019 - febrero del 2020 para la realización de una encuesta en el que se busca, determinar las características organolépticas de la bebida de quinua tratada con extracto enzimático natural de bromelina sustentado en el desarrollo del trabajo de titulación. **“Obtención de proteínas y su hidrólisis enzimática de la quinua amarga (*Chenopodium quinoa*)”**.

Para la prueba de degustación se usa una encuesta (Anexo L) para evaluar las características organolépticas como: textura- consistencia, aroma, color y sabor; para su valoración se usó los criterios de la escala hedónica donde 1 significa me disgusta muchísimo y 9 me gusta muchísimo.

### **2.3.4 Diseño de una propuesta para la elaboración de una bebida casera de quinua**

Los resultados que se generen en la elaboración experimental de la bebida peptídica de la harina de quinua se utilizarán para diseñar una propuesta de elaboración de una bebida casera obtenida a partir de harina de quinua tratada con extracto enzimático natural de bromelina.

## CAPÍTULO III

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 3.1 Resultados de la obtención de proteínas del grano de quinua

##### 3.1.1 *Precipitación ácida de la proteína bruta de quinua (P.B.Q.)*

La proteína bruta de quinua se obtuvo desde un extracto acuoso libre de saponinas y almidón del grano de quinua licuado (frío), al realizar un tratamiento de acidificación utilizando 8 gotas de una solución de HCl concentrado en proporción (1:3) hasta llegar a un pH de 5.5, luego de mantener en estas condiciones toda la solución a un tiempo de 30min de reposo para lograr la precipitación mayoritaria de la proteína. La proteína sedimentada pudo ser recolectada por centrifugación, desengrasándola con lavados de etanol al 96 % y finalmente secándola con aspersión de aire frío, la proteína bruta de quinua obtenida se la obtuvo de aspecto aglutinado con poca movilidad.

En el proceso de precipitación ácida de proteína fue importante eliminar el almidón en frío para separarlo en forma de granos por centrifugación y evitar su gelificación, de igual manera se buscó separar las saponinas para evitar posibles interferencias en el proceso, sin embargo el aspecto aglutinado y de poca movilidad de la proteína nos llevó a suponer la presencia de saponinas debido a la acidez utilizada en el proceso, pues puede haberse dado una hidrólisis parcial de las saponinas durante el tiempo de 30 min, por esta razón a la proteína obtenida hasta este momento se la llamó “**Proteína bruta**” y se realizó un procesamiento de aislamiento y caracterización de saponinas.



Precipitación de E.A.Q a pH 5,5



Sedimentación luego de los 30 min

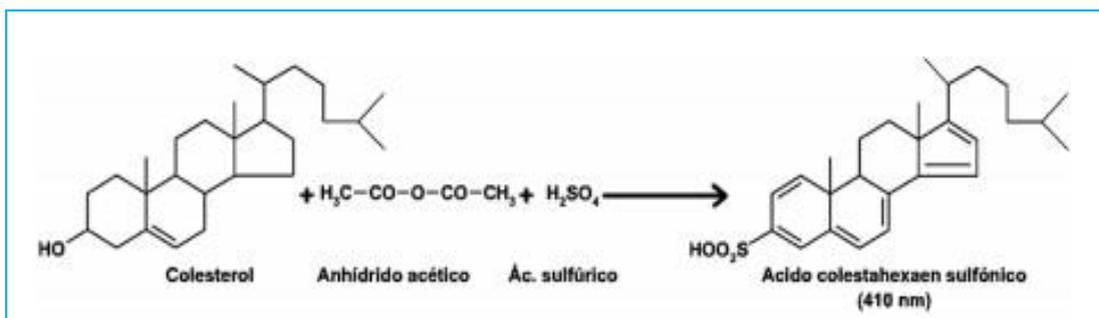


Proteína bruta de quinua (P.B.Q)

### 3.1.2 *Resultado del aislamiento hexánico de las saponinas contaminantes de la P.B.Q*

A partir de la P.B.Q de aspecto aglutinado, pegajoso y con poca movilidad se procedió a liberar de saponinas con un lavado utilizando solvente orgánico (hexano), en el cual se ejecutó la prueba de Liebermann Burchard para determinar la presencia de compuestos esteroideos-triterpénicos, dando positiva para saponinas. Luego del lavado con hexano y evaporado con aire frío se obtuvo la proteína de quinua (P.Q.), con un aspecto pulverulento de color crema. Con relación a la solubilidad de la P.Q. esta aparenta ser soluble en solución ligeramente alcalina de pH 9.

Con el aislamiento detallado pudo demostrarse que la P.B.Q se encuentra acompañada de saponinas, por tanto, el tratamiento para precipitar proteína con ácido llega a hidrolizar en algún grado a las saponinas durante el tiempo de reposo que se utiliza para precipitación y sedimentación, a su vez esta es la causa de que la proteína bruta de quinua tenga, el aspecto aglutinado pegajoso y de poca movilidad.



**Figura 1-3: Reacción de determinación de compuestos triterpénicos con reactivo Liebermann Burchard**

Fuente:(Roca et al. 2003)

### 3.1.3 Pruebas de caracterización de la proteína de quinua obtenida (P.Q.)

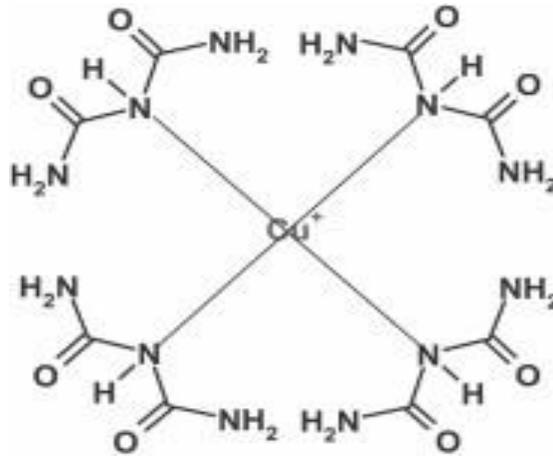
**Tabla 1-3: Resultado de pruebas de caracterización de la P.Q.**

PRUEBAS	BLANCO	P.Q.
Biuret	(+)	(+)
Millon	(+)	(+)
Xantoproteica	(+)	(-)
Hopkins-cole	(+)	(+)
Cromatografía en papel como prueba indirecta de Hidrólisis ácida total de la P.Q.	Ver Figura 4-3	

Realizado por: Angy Estrada, 2020

### a) Prueba de biuret

La prueba de biuret fue positiva (+) para la caracterización de la P.Q, permitió demostrar que el polvo aislado a partir del grano de quinua es una cadena peptídica, tanto una proteína pues la prueba de biuret indica la presencia de 1 o más de enlaces peptídicos, de acuerdo complejo coordinado que genera esta reacción entre el cobre y la cadena peptídica (color violeta).



**Figura 2-3: Complejo coordinado formado entre  $\text{Cu}^+$  y el grupo amina de las proteínas**

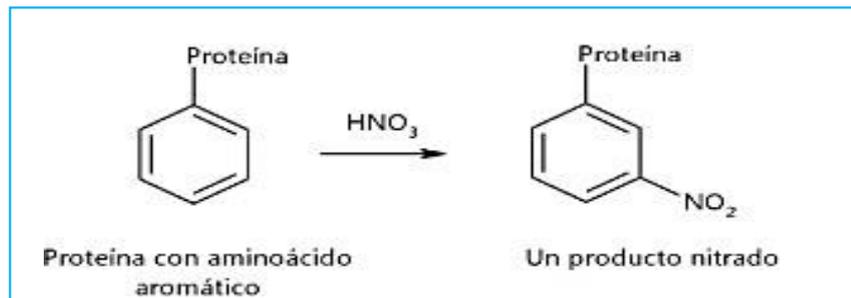
Fuente: (Roca et al. 2003)

### b) Reacción de millón

La reacción con millón sirva para determinar la presencia de aminoácidos de tipo aromático (Tyr, Thyp) en la proteína. Al realizar esta prueba de caracterización a la proteína de quinua se pudo determinar la positividad de esta prueba, ya que el ( $\text{NO}_2$ ) del ácido nítrico presente reacciona con el mercurio propio del reactivo, formado el  $\text{Hg}_2 (\text{NO}_3)_2$  el cual, en pH ácido reacciona con el grupo hidroxilo ( $-\text{OH}$ ) de la tirosina produciendo así un color ladrillo característico de este aminoácido.

### c) Reacción xantoproteica

La reacción con el reactivo xantoproteica es característica para la determinación de compuestos azufrados, por lo medio de esta reacción de identificación se comprobó que la proteína de quinua P.Q., aislada mediante el proceso por acidificación no presenta aminoácidos de tipo azufrados ya que no denota la presencia de un precipitado negro, o podría tener cantidades muy bajas de aminoácidos azufrados para la sensibilidad de la prueba.



**Figura 3-3: Reacción para presencia de compuestos azufrados**

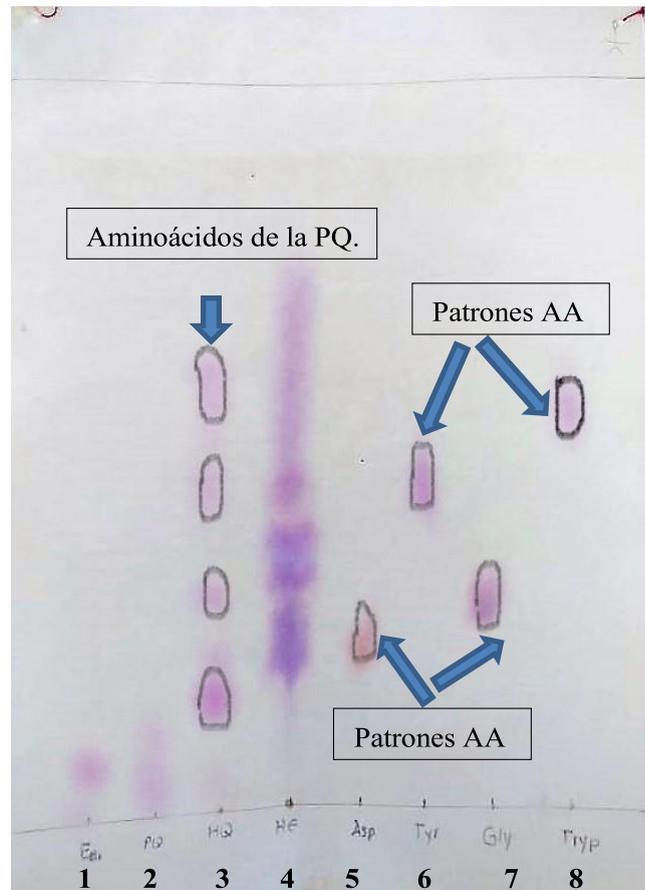
Fuente:(Guarnizo y Martinez 2009, p. 183)

### d) Reacción de Hopkins Cole

La prueba de caracterización de Hopkins-cole sirve para determinar triptófano presente en proteínas por lo que decidió usar esta prueba, dando positiva (+) la presencia de triptófano en la muestra de P.Q. ya que, se visualiza la aparición de un anillo violeta propia de la presencia este aminoácido (*ver Anexo F*).

**e) Hidrólisis ácida total de P.Q. como prueba indirecta para caracterización proteica**

La hidrólisis total ácida (16 h) de la proteína de quinua P.Q. obtenida genera aminoácidos verificados por cromatografía en papel de celulosa, usando como revelador ninhidrina. El cromatograma correspondiente corrido junto a otras muestras identificadas en la parte inferior del cromatograma se observa a continuación:



**Fase móvil:** ButOH, Ac. Acético, agua (60: 15:20)

**Soporte:** Papel de celulosa

**Revelador:** Ninhidrina al 0.2% etanol

#### Aplicación

1. **(E<sub>Br</sub>)** Extracto programado de bromelina
2. **(PQ)** Proteína de quinua
3. **(HQ)** Hidrolizado ácido total de la P.Q. **(16h)**
4. **(HE)** Hidrolizado enzimático de la P.Q. **(7días)**
5. **(Asp)** Estándar del ácido aspártico
6. **(Tyr)** Estándar de la tirosina
7. **(Gly)** Estándar de la glicina
8. **(Tyr)** Estándar del triptófano

**Figura 4-3: Cromatograma en papel de celulosa de la hidrólisis total ácida de la proteína de quinua**

Realizado por: Angy Estrada, 2020

La proteína de quinua en la cromatografía en papel realizada muestra 4 aminoácidos, 3 de los cuales pueden ser identificados como: glicina, ácido aspártico, tirosina y uno no ha sido identificado con los estándares disponibles y utilizados.

Esta cromatografía realizada, demuestra que si se han obtenido péptidos., visto que se aplicó proteína de quinua en la posición 2, donde no se observan manchas definidas, no así, como se observa en el hidrolizado que corresponde a la aplicación 3.

En esta cromatografía se buscó aprovechar aplicando en la posición 4 hidrolizado enzimático de la P.Q. (7 días), observándose aproximadamente 5 manchas que corresponderían a péptidos generados, pues en la aplicación 2 que corresponde a P.Q. sola solubilizada en medio alcalino, no se observan manchas, particularidad que demostraría la validez de usar ninhidrina como revelador para péptidos en papel de celulosa.

En la cromatografía se aplicó el extracto de bromelina posición 1, como blanco para minimizar interferencias relacionadas con aminoácidos y péptidos pues, en el carril 1 solo se observa una mancha difusa y casi en el origen.

Se descarta la presencia de triptófano a pesar de que, la prueba del Hopkins Cole fue positiva, ya que la hidrólisis ácida le destruye por reacciones diversas que ocurren durante la exposición al ambiente fuertemente ácido. También se destruye la serina y treonina (Lehinger y Cox 2005, p. 87).

### 3.1.4 Rendimiento de la proteína de quinua

**Tabla 2-3: Rendimiento de la proteína de quinua**

<b>Peso del grano crudo de quinua (g)</b>	<b>Peso práctico de la P.Q. obtenida (g)</b>	<b>Porcentaje de rendimiento P.Q.</b>
254	14,38	5,66

Realizado por: Angy Estrada, 2020

El porcentaje de P.Q. obtenido no es comparable con porcentajes de proteínas de quinua reportados, pues el rendimiento obtenido en el presente trabajo se relaciona con el objetivo puntual de obtener proteína desde el grano de quinua, los datos reportados en grano son valores que hacen referencia a 100 g de grano de quinua.

También se reporta el rendimiento de la proteína de quinua bruta, valor que no lo consideramos muy trascendente, al tener un grado de contaminación con sapogeninas.

**Tabla 3-3: Rendimiento de la proteína bruta de quinua**

<b>Peso del grano crudo de quinua (g)</b>	<b>Peso práctico de la P.B.Q. obtenida (g)</b>	<b>Porcentaje de rendimiento P.B.Q.</b>
254	21,50	8,46

Realizado por: Angy Estrada, 2020

### **3.2 Resultados de la hidrólisis enzimática de la proteína de quinua con extracto programado de bromelina**

#### **3.2.1 *Resultados del proceso de la preparación del extracto programado de bromelina de la piña (Ananas comosus)***

El extracto programado de bromelina se preparó obteniendo el zumo total (sin adicionar agua) de una mezcla de 15 g de pulpa y 15 g de corazón de piña, utilizando centrifugación repetida para obtenerla recolectando los sobrenadantes limpios y unificados. El volumen obtenido fue de aproximadamente 20 ml.

Según los reportes de (Gallardo et al. 2008, p. 1) la mayor actividad y concentración enzimática se encuentra en la pulpa y corazón de la piña, para esta experimentación se decidió usar pulpa y corazón de una piña fresca inmadura verde (*Ananas comosus*), se utilizó trituración y centrifugación repetida, para la obtención de un líquido casi traslúcido considerando que no se adiciona agua para concentrar mayor cantidad de la enzima bromelina y mantener la eficacia sobre el sustrato. El extracto de bromelina fue conservado en refrigeración.

#### **3.2.2 *Hidrólisis Enzimática de la proteína de quinua con extracto programado de bromelina de piña (Ananas comosus)***

El proceso de hidrólisis enzimática de la proteína de quinua se realizó haciendo una mezcla de 1,5 g de P.Q. aislada y 10ml de extracto programado de bromelina natural con agitación manual, hasta la obtención de una solución homogénea, que se incubó a una temperatura de 42°C, mezcla que se empleó para tomar muestras a distintos tiempos programados por el lapso de aproximadamente 168 h, según el método descrito (*procedimiento 2.2*). Hay reportes que indican que la enzima bromelina actuaría sobre los enlaces Fe-Val y Fe-Leu, provocando la generación de péptidos (Wei y He 2003, p. 309; Benítez et al. 2008).

### 3.2.3 Resultados del control del proceso de hidrólisis enzimática de la proteína de quinua

El control de proceso de hidrólisis enzimática se realizó de 2 maneras, haciendo un seguimiento cromatográfico y un seguimiento fotométrico.

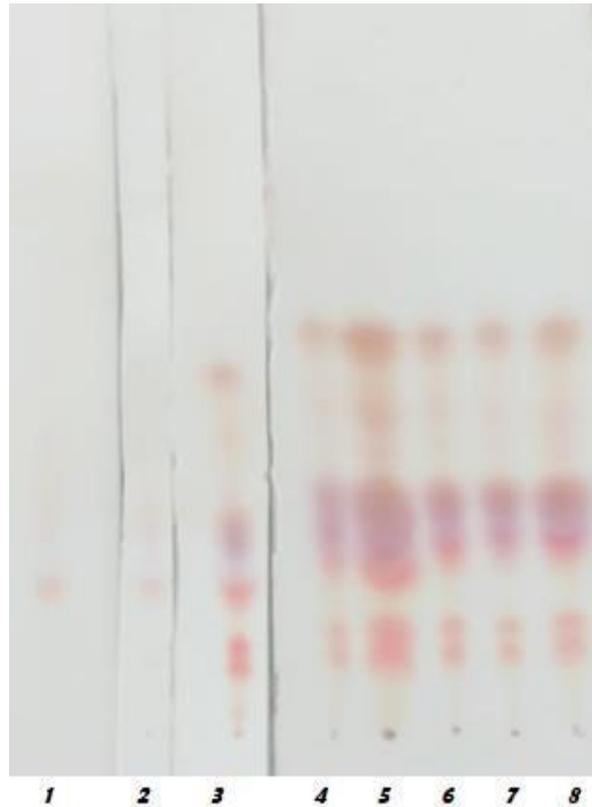
#### 1. Resultados del seguimiento cromatográfico de la hidrólisis enzimática de la P.Q.

El seguimiento cromatográfico en (CF) de sílica-gel, se realizó en 7 tratamientos: (T<sub>i</sub>) que combinan tiempos (t<sub>i</sub>) y temperatura constante 42°C (b<sub>0</sub>), tratamientos que han sido aplicados para la cromatografía por duplicado, el esquema del seguimiento y el cromatograma de péptidos generados se presentan a continuación:

**Tabla 4-3: Esquema para el seguimiento cromatográfico de Hidrólisis Enzimática**

Tratamiento	Combinación	INDICADORES DE CONTROL	
		Cromatografía (CF) sílica-gel	
		Cromatograma 1	Cromatograma 2
1	b <sub>0</sub> t <sub>0</sub> (0 h)	Aplicación 2	Aplicación 2
2	b <sub>0</sub> t <sub>1</sub> (24 h)	Aplicación 3	Aplicación 3
3	b <sub>0</sub> t <sub>2</sub> (48 h)	Aplicación 4	Aplicación 4
4	b <sub>0</sub> t <sub>3</sub> (72 h)	Aplicación 5	Aplicación 5
5	b <sub>0</sub> t <sub>4</sub> (120 h)	Aplicación 6	Aplicación 6
6	b <sub>0</sub> t <sub>5</sub> (144 h)	Aplicación 7	Aplicación 7
7	b <sub>0</sub> t <sub>6</sub> (168 h)	Aplicación 8	Aplicación 8
X	Extracto de bromelina	Aplicación 1	Aplicación 1

Realizado por: Angy Estrada, 2020



**Fase móvil:** ButOH, Ac. Acético, agua (27.5: 13:10)

**Soporte:** cromatofolio de silica-gel

**Revelador:** Ninhidrina a 0.2% etanol

#### Aplicación

1. Extracto programado de bromelina (E. Br)
2. T<sub>0</sub> Hidrólisis enzimática (**0 h**): P.Q.+(E. Br)
3. T<sub>1</sub> Hidrólisis enzimática (**24 h**): P.Q.+(E. Br)
4. T<sub>2</sub> Hidrólisis enzimática (**48 h**): P.Q.+(E. Br)
5. T<sub>3</sub> Hidrólisis enzimática (**72 h**): P.Q.+(E. Br)
6. T<sub>4</sub> Hidrólisis enzimática (**120 h**): P.Q.+(E. Br)
7. T<sub>5</sub> Hidrólisis enzimática (**144 h**): P.Q.+(E. Br)
8. T<sub>6</sub> Hidrólisis enzimática (**168 h**): P.Q.+(E. Br)

**Figura 5-3: Cromatograma silica-gel de los péptidos generados (revelador: ninhidrina)**

Realizado por: Angy Estrada, 2020

El cromatograma permite observar que la P.Q. se ha hidrolizado completamente en péptidos al observarse, las aplicaciones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.

Las aplicaciones 4, 5, 6, 7, 8 muestran una similitud en número de manchas de 6 mientras que la aplicación 2 y 3 muestran 0 y 4 manchas respectivamente, esto permitió determinar que, la proteína de la quinua se hidrolizó completamente y aproximadamente en 5 péptidos. Sobre las aplicaciones 2 y 3 se puede decir que hay hidrólisis parcial hasta el tiempo correspondiente 24 horas.

La cromatografía se corrió frente a una aplicación de extracto de bromelina, con la finalidad de definir si las manchas generadas corresponderían a la hidrólisis o a la propia bromelina.

A pesar de varios intentos no fue posible realizar un seguimiento en tiempos más cortos, pues la hidrólisis ocurre muy rápidamente esto se observó en parte en la transición de la aplicación 3 y 4 correspondientes a los tiempos (24 h - 48 h). Lo importante es haber observado la aparición de péptidos resultantes de la hidrólisis enzimática, la igualdad en número de péptidos (manchas) desde la aplicación 4 hasta la aplicación 8, se explica en el hecho de que se ha cumplido la especificidad hidrolítica que tiene la bromelina en relación a los enlaces peptídicos (Fe-Leu) y (Fe-Val).

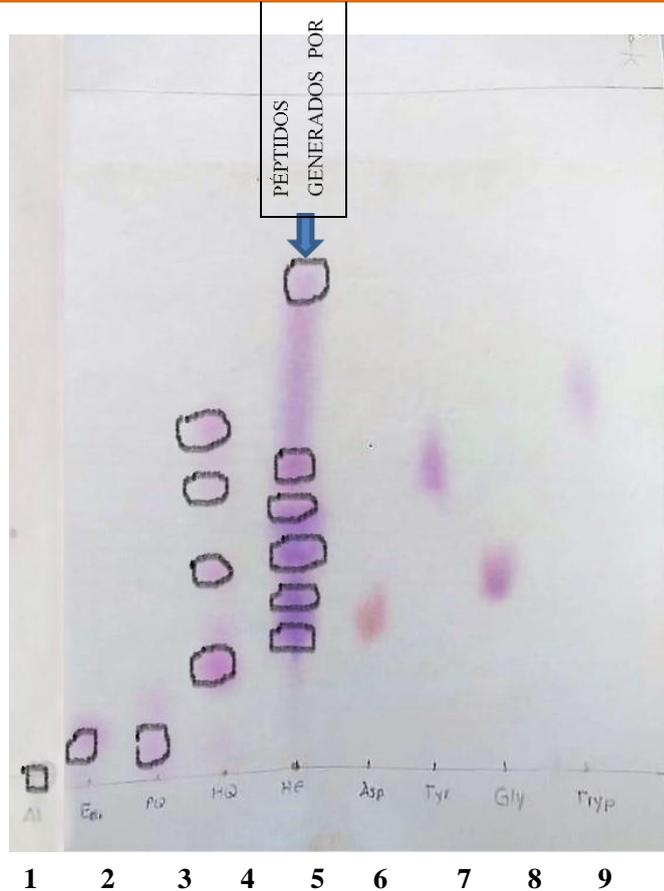
Como posibilidad al requerir precisión la tercera mancha desde la línea inicial de aplicación de las muestras podría ser bromelina en medio de los péptidos, visto que la mancha de la aplicación de la bromelina 1 parece estar en las manchas de las aplicaciones que van desde la 3 hasta la 8.

La cromatografía en (CF) de sílica-gel ha sido revelada utilizando ninhidrina que es específica para aminoácidos, generando manchas de color rosáceas característica de los péptidos, esto obligó a validar su uso realizando una cromatografía en papel de celulosa.

## ***2. Validación visual del cromatograma de sílica-gel usando cromatografía de papel de celulosa y ninhidrina como revelador***

El número y ubicación de manchas en el cromatograma revelado con ninhidrina en papel de celulosa es completamente similar al cromatograma en sílica-gel generado con el mismo revelador, esto indica la validez del uso de ninhidrina como revelador en placas de sílica-gel, debiendo precisar que el color en papel es violeta y en sílica son rosáceas a pesar de que, en sílica se observa manchas de tendencia violeta que corresponderían a péptidos más cortos que simularían un poco imaginariamente llegar a hacer aminoácidos. Lo manifestado se observa a continuación en el cromatograma de papel de celulosa contrastado con el cromatograma en sílica-gel:

## PAPEL



**Fase móvil:** ButOH, Ac. Acético, agua (60: 15:20)

**Soporte:** Papel de celulosa

**Revelador:** ninhidrina al 0.2% etanol

### Aplicación

1. (Al) Albúmina de huevo
2. (Ebr) Extracto programado de bromelina
3. (PQ) Proteína de quinua
4. (HQ) Hidrolizado ácido de la P.Q. (16h)
5. (HE) Hidrolizado enzimático de la P.Q. (7 días)
6. (Asp) Estándar del ácido aspártico
7. (Tyr) Estándar de la tirosina.
8. (Gly) Estándar de la glicina.
9. (Tryp) Estándar del triptófano.

**Figura 6-3: Cromatograma en papel de celulosa usando ninhidrina como revelador**

Realizado por: Angy Estrada, 2020

## SILICA



**Fase móvil:** ButOH, Ac. Acético, agua (27.5: 13:10)

**Soporte:** Silica

**Revelador:** ninhidrina al 0.2% etanol

### Aplicación

1. (Al) Albúmina de huevo
2. (Ebr) Extracto programado de bromelina
3. (P.Q.) Proteína de quinua
4. (H.Q.) Hidrolizo ácida de proteína de quinua (16 h)
5. (H.E.) Hidrolizado enzimático de proteína de quinua (7 días)
6. (Asp) Estándar del ácido aspártico
7. (Tyr) Estándar de la tirosina.
8. (Gly) Estándar de la glicina.
9. (Tryp) Estándar del triptófano.

**Figura 7-3: Cromatograma en silica-gel usando ninhidrina como revelador**

En las cromatografías para validación de la ninhidrina en sílica y papel de celulosa se aplicaron estratégicamente muestras de: 1 proteína pura (Alb de huevo), 2 proteína de quinua (solución alcalina), 3 extracto de bromelina, 4 hidrolizado ácido de la proteína de quinua (16 h), 5 hidrolizado enzimático de la proteína de quinua (7 días), 6, 7, 8 y 9 estándares de aminoácidos. Los cromatogramas obtenidos en sílica-gel y en papel de celulosa tienen una similitud notoria en todas las aplicaciones, lo que se busca, es demostrar la utilidad de la ninhidrina para poder visualizar las proteínas puras, péptidos y aminoácidos.

### **3. Resultados del seguimiento fotométrico de la hidrólisis enzimática de la P.Q.**

Se diseñó una metodología fotométrica fundamentada ver ( *Seguimiento fotométrico de la hidrólisis enzimática de la proteína de la quinua*, pág. 58), para el seguimiento de la hidrólisis de la proteína de quinua según los tratamientos (*Tabla 2-2*), que consistieron en elaborar una mezcla de proteína de quinua y extracto programado de bromelina (*Proceso de hidrólisis enzimática de la proteína de quinua con extracto programado de bromelina* pág. ,53 ), donde se midió la absorbancia del complejo coloreado generado por la mezcla y el reactivo de ninhidrina a una longitud de onda de 570 nm.

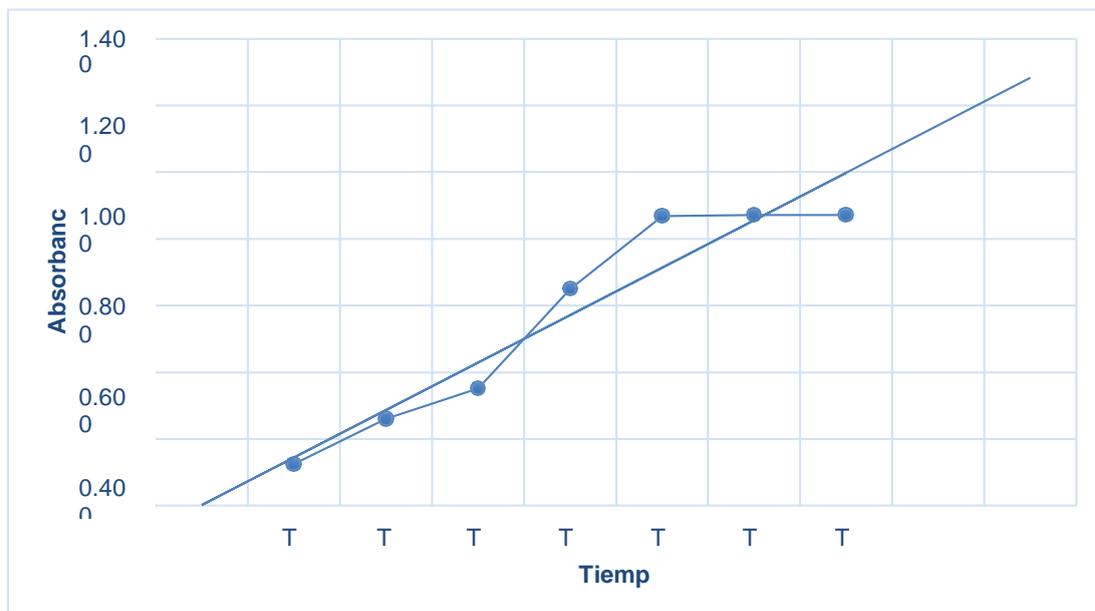
Se realizaron 7 tratamientos ( $T_i$ ) con 3 repeticiones, con combinaciones de tiempo ( $t_i$ ) y temperatura constante ( $b_0$ ), las absorbancias generadas se observan en la siguiente tabla:

**Tabla 5-3: Absorbancias obtenidas durante el seguimiento fotométrico de la hidrólisis enzimática**

	Tratamiento	Medición de absorbancia (570 nm)				
		R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar (±)
1	b <sub>0</sub> T <sub>0</sub> (0 h)	0,121	0,125	0,127	0,124	0,0025
2	b <sub>0</sub> T <sub>1</sub> (24 h)	0,263	0,258	0,258	0,26	0,0024
3	b <sub>0</sub> T <sub>2</sub> (48 h)	0,351	0,348	0,354	0,351	0,0024
4	b <sub>0</sub> T <sub>3</sub> (72 h)	0,653	0,651	0,651	0,652	0,0009
5	b <sub>0</sub> T <sub>4</sub> (120 h)	0,871	0,867	0,867	0,868	0,0019
6	b <sub>0</sub> T <sub>5</sub> (144 h)	0,872	0,871	0,873	0,872	0,0008
7	b <sub>0</sub> T <sub>6</sub> (168 h)	0,873	0,874	0,869	0,872	0,0022

Realizado por: Angy Estrada,2020

A continuación, se presenta la gráfica de los promedios del seguimiento fotométrico:



**Gráfico 1-3: : Seguimiento fotométrico de la hidrólisis enzimática de la P.Q.**

Realizado por: Angy Estrada, 2020

En el (*Gráfico 1-3*), se observa que la intensidad de absorbancia tiende a aumentar, a medida que se expone la proteína de quinua a la acción de la bromelina en tiempos prolongados, hasta el tiempo 4, a partir del cual es estable porque ya no se produce más hidrólisis.

El uso de ninhidrina está destinado para aminoácidos, no para péptidos o proteínas, pues con aminoácidos se sabe da un color púrpura (Azul de Ruhemann), (*Figura 6-1*). Se decidió probar utilizar ninhidrina para péptidos basado en que, ella inicia la reacción sobre el grupo amino, posibilidad que se sustentó en pruebas cualitativas in vitro, pruebas que mostraron, que muestras hidrolizadas dan un color más cercano al púrpura a diferencia de una muestra no hidrolizada que da azul-violáceo.



(a)



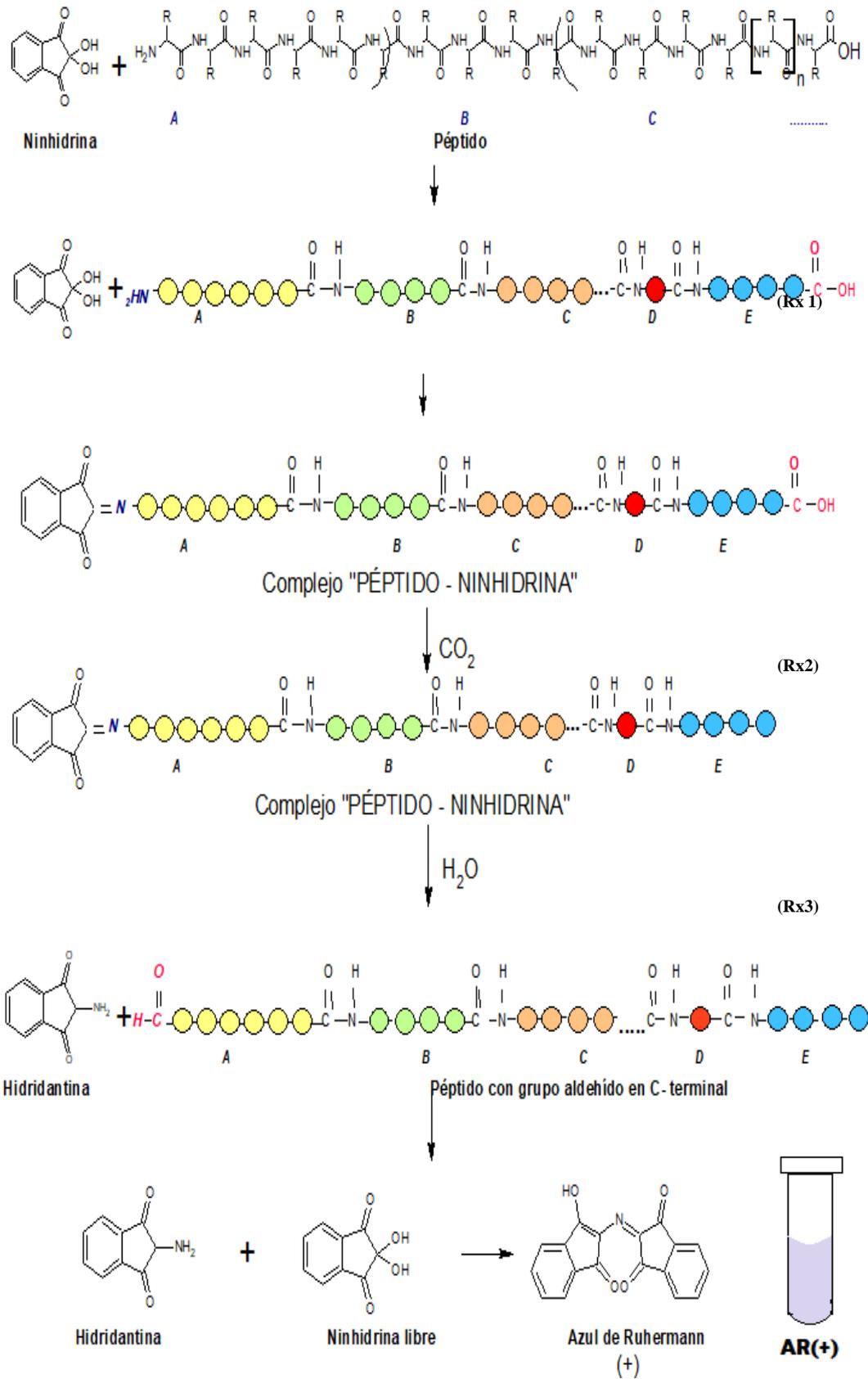
(b)

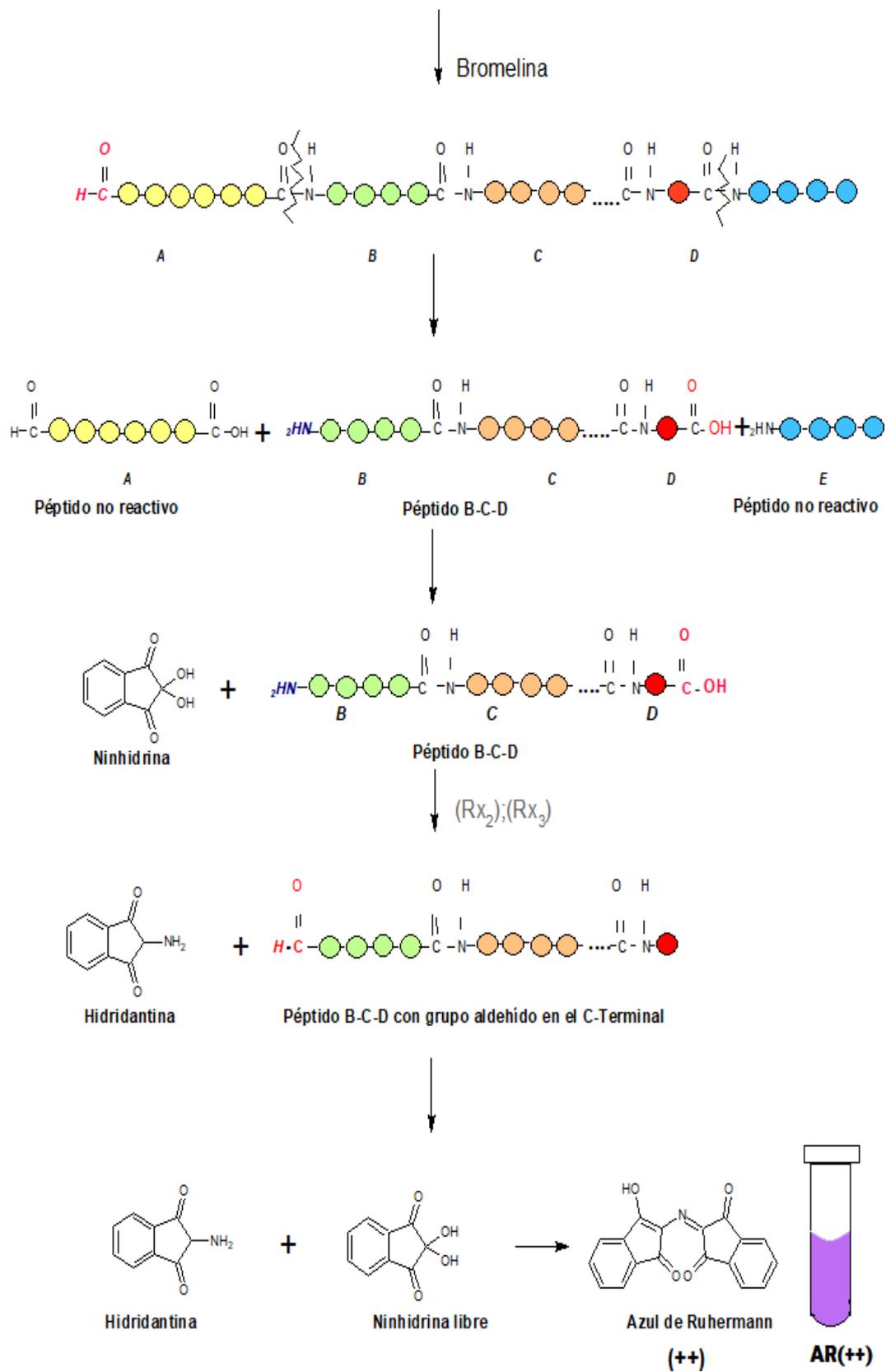


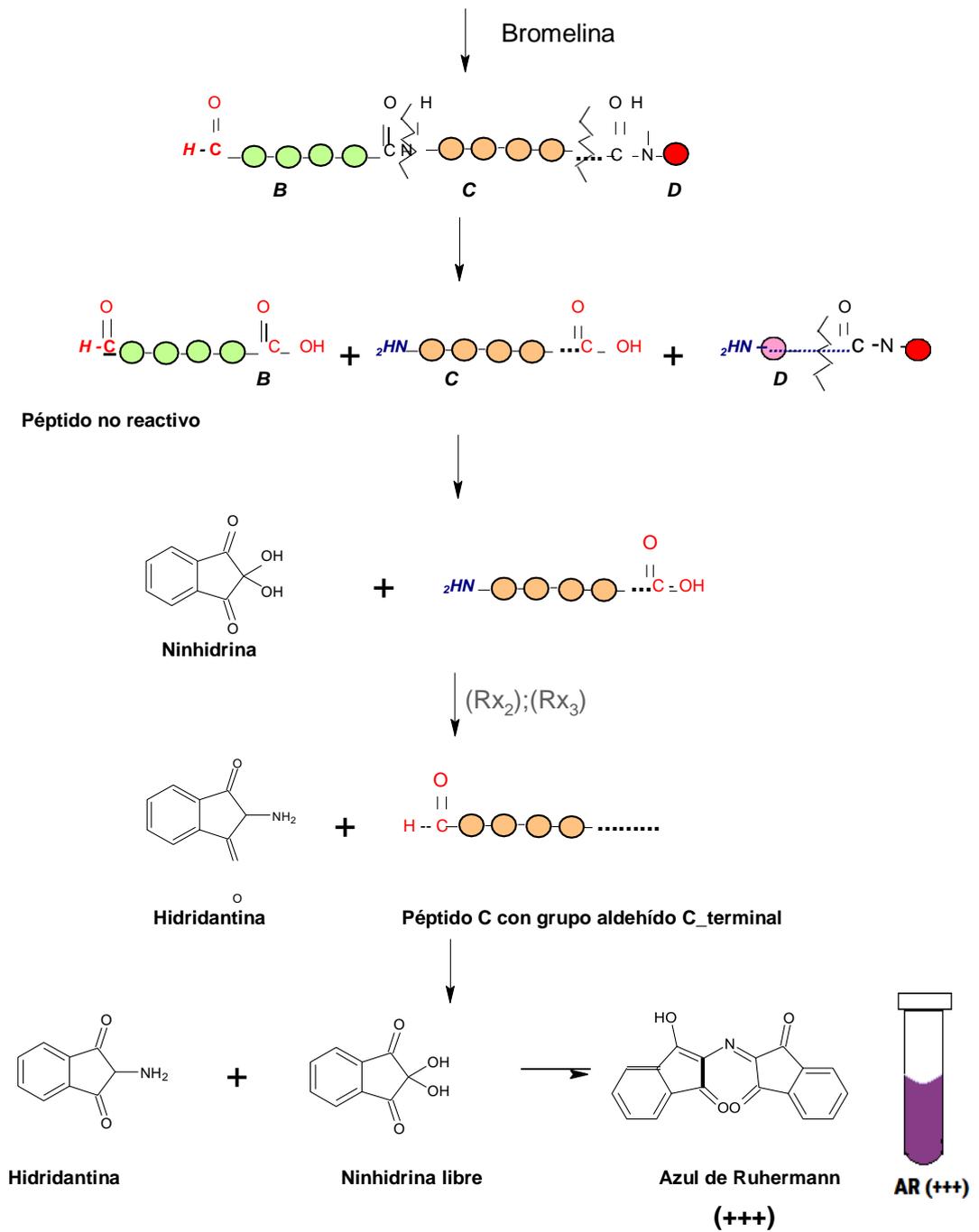
(c)

Donde (a), representa el patrón de albúmina más ninhidrina, (b) la proteína de quinua más ninhidrina, (c) Hidrolizado enzimático de la P.Q.

En base a esta evidencia se ejecutó los tratamientos de la (Tabla 5-3), que permitieron determinar que, mientras más hidrolizada se encuentre la proteína hay mayor formación del complejo azul de Ruhemann, en vista de que, a medida que pasa el tiempo de hidrólisis van aumentando los grupos amino de los péptidos que se van generando (*observar la reacción explicativa adaptada de la ninhidrina con el péptido inicial y los péptidos generados durante la hidrólisis, Figura 8-3*) esta sería la causa para el aumento de la absorbancia observada a 570 nm. Un hecho adicional que se debe mencionar es que, la absorbancia a tiempos avanzados (> 120h T<sub>4</sub>), tiende a mostrar cierto comportamiento de constancia que se puede considerar lógico porque se debe llegar a un momento donde no hay enlaces peptídicos que puedan ser reconocidos e hidrolizados por acción de la bromelina.







**Figura 8-3: Rx explicativa adaptada-ninhidrina con el péptido inicial y los péptidos generados durante la hidrólisis**

Fuente: Elaboración propia basado en la Rx de un aminoácido más ninhidrina (Figura 6-1)

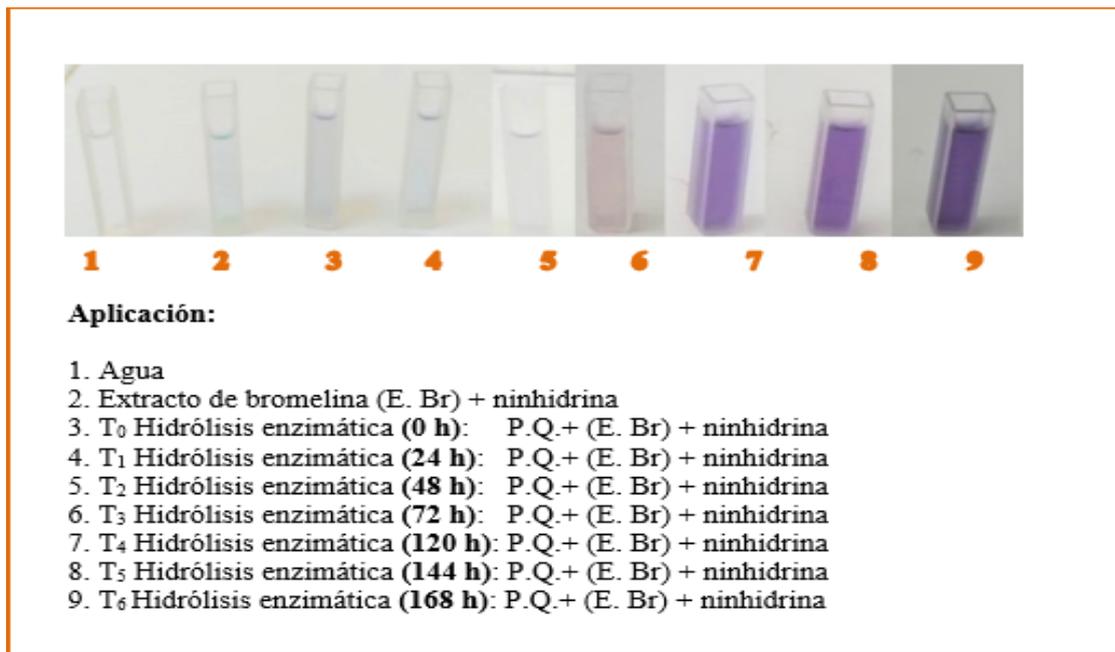
Realizado por: Angy Estrada, 2020

Los péptidos poseen grupos aminos libres que reaccionan con la ninhidrina, para formar un complejo “PÉPTIDO NINHIDRINA” con posterior desprendiendo CO<sub>2</sub>.

El complejo “PÉPTIDO-NINHIDRINA” se hidroliza formando, un compuesto denominado hidridantina, acompañado de un péptido con un grupo aldehído en el C\_ terminal y un carboxilo en el otro C\_ terminal, residuo peptídico que como tal, no es reactivo con ninhidrina hasta que haya una nueva hidrólisis intermedia en la cadena peptídica, esta nueva hidrólisis es llevada a cabo por la bromelina, generando un residuo peptídico (NH- terminal), que reacciona con la ninhidrina y además de, otros segmentos que no son reactivos hasta nueva acción de la bromelina.

Las hidridantinas que reaccionan con cada enlace peptídico afectado por la bromelina, reaccionarán en cada momento con otra molécula de ninhidrina libre, escenario que provocaría un mayor número de moléculas de azul de Ruhemann, que visualmente haría esperar un incremento en la tonalidad del color típico azul de Ruhemann formando un complejo cromóforo denominado “Azul de Ruhemann” (Estrada, 2020).

Por tanto, la intensidad del color del complejo sería dependiente de los posibles grupos aminos libres que se van generando en el transcurso de la hidrólisis (péptidos), mientras más cortas sean las cadenas de péptidos, más cercano será al color característico de un aminoácido más ninhidrina. Se debe asumir que la actividad de la bromelina tiene un tope relacionado con su especificidad de hidrólisis que visualmente se observaría con una tonalidad constante del color, (*Figura 9-3*).



**Figura 9-3: Validación fotométrica progresiva de la Hidrólisis Enzimática de la P.Q.**

Realizado por: Angy Estrada, 2020

### 3.3 Elaboración de una bebida de quinua

#### 3.3.1 *Extracto enzimático natural de bromelina de la piña (para bebida)*

El extracto enzimático de bromelina obtenido según el procedimiento (*Preparación de un extracto enzimático natural de bromelina de piña (para bebida)*), fue de un volumen de 300ml generados sin adicionar agua de una mezcla de 500 g de pulpa y 500 g de corazón de piña, habiendo utilizado trituración y centrifugación repetida en tubos para obtener los sobrenadantes traslúcidos, recolectados y unificados. El extracto enzimático de bromelina mostró pH neutro, color amarillento, olor y sabor agradable característico a la piña.

El extracto enzimático obtenido, asegura mantener actividad enzimática de la bromelina al no

utilizar calor y disminuir cualquier posibilidad de dilución.

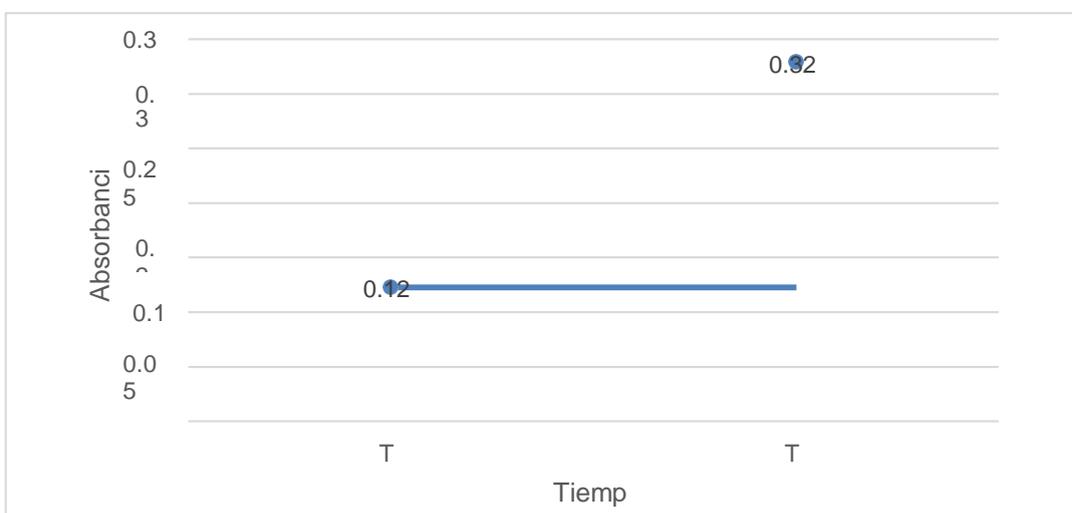
### 3.3.2 Resultados de la elaboración experimental de la bebida de quinua

Se realizó un seguimiento fotométrico de una hidrólisis enzimática promovida con 15 g de harina de quinua y 300 ml de extracto enzimático de bromelina, durante 24 h a temperatura ambiente 20°C, la medición fotométrica se realizó a una longitud de onda de 570 nm a tiempo inicial ( $t_0=0$  h) y tiempo final ( $t_1=24$  h). Los resultados del seguimiento fotométrico se observan a continuación.

**Tabla 6-3: Seguimiento fotométrico de la hidrólisis (bebida)**

Tratamiento	Combinación	Medición de absorbancia (570 nm)				
		R1	R2	R3	Promedio	Desviación estándar ( $\pm$ )
1	20°C $t_0$ (0 h)	0,122	0,124	0,122	0,124	0,0009
2	20°C $t_1$ (24 h)	0,328	0,331	0,329	0,260	0,0012

Realizado por: Angy Estrada, 2020



**Gráfico 2-3: Seguimiento fotométrico de la hidrólisis en la bebida ( $t_0=0$  h y  $t_1=24$  h)**

Realizado por: Angy Estrada, 2020



**Aplicación:**

1. Agua
2. Extracto de bromelina + ninhidrina
3. T<sub>0</sub> Hidrólisis enzimática (0 h): P.Q.+ (E. Br) + ninhidrina
4. T<sub>1</sub> Hidrólisis enzimática (24 h): P.Q.+ (E. Br) + ninhidrina

**Figura 10-3: Coloración en la hidrólisis observada con ninhidrina a tiempo (0 h-24 h)**

Realizado por: Angy Estrada, 2020

Según el procedimiento descrito (*Elaboración experimental de una bebida de quinua tratada con extracto natural de bromelina*), se pudo determinar que, existe un rango significativo de diferencia entre las mediciones de absorbancia a las 0 h a 24 h de hidrólisis por lo que se podría decir que, en ese lapso de tiempo existen sitios donde la bromelina actúa sobre la proteína de la harina de quinua destruyendo los enlaces peptídicos existentes entre (Fe-Val) y (Fe-Leu), pues la coloración púrpura a las 24 h es muy intensa debido al incremento de grupos amino durante la hidrólisis y la generación de péptidos.

A la porción restante de bebida sometida a la hidrólisis enzimática durante las 24 h se le sometió a un proceso culinario para obtener una bebida alimenticia de consumo. A la que, se la sometió a una cocción por ebullición 5-10 min condimentando con canela, anís estrellado y azúcar para conseguir un sabor aceptable. La operación de ebullición es importante para conseguir salubridad.

La bebida obtenida fue sometida a una prueba de degustación donde se evaluó aspectos como color, olor, sabor y consistencia, con la colaboración de 20 estudiantes de la Carrera de Química de la Facultad de Ciencias del periodo 2019-2020. Para las pruebas de degustación se usó

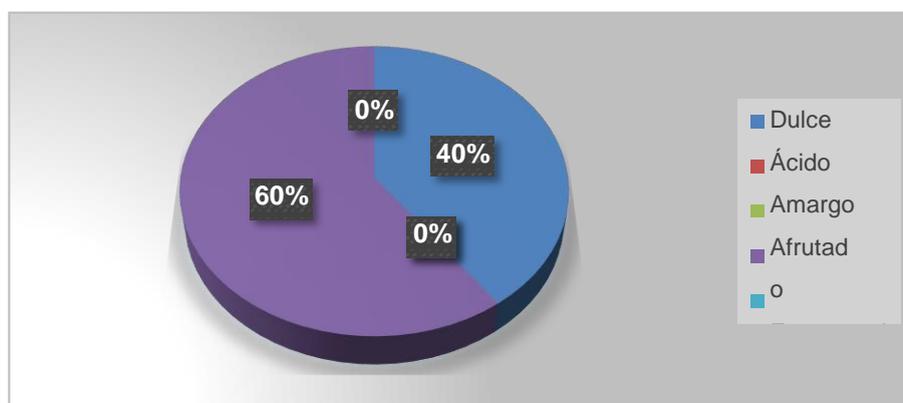
encuestas bajo la escala hedónica de 9 puntos. Donde 1 representa me disgusta muchísimo y 9 a me gusta muchísimo. Los resultados obtenidos sobre las características consideradas en la encuesta presente en la metodología son los siguientes:

**Tabla 7-3: Término que aplica la bebida en la encuesta**

CARACTERÍSTICA	N° DE ENCUESTADOS
Dulce	8
Ácido	0
Amargo	0
Afrutado	12
Fermentado	0
<b>TOTAL</b>	<b>20</b>

Realizado por: Angy Estrada, 2020

A continuación, se muestra la gráfica que corresponde a la (Tabla 7-3)



**Gráfico 3-3: Resultados de las características evaluadas en la degustación**

Realizado por: Angy Estrada, 2020

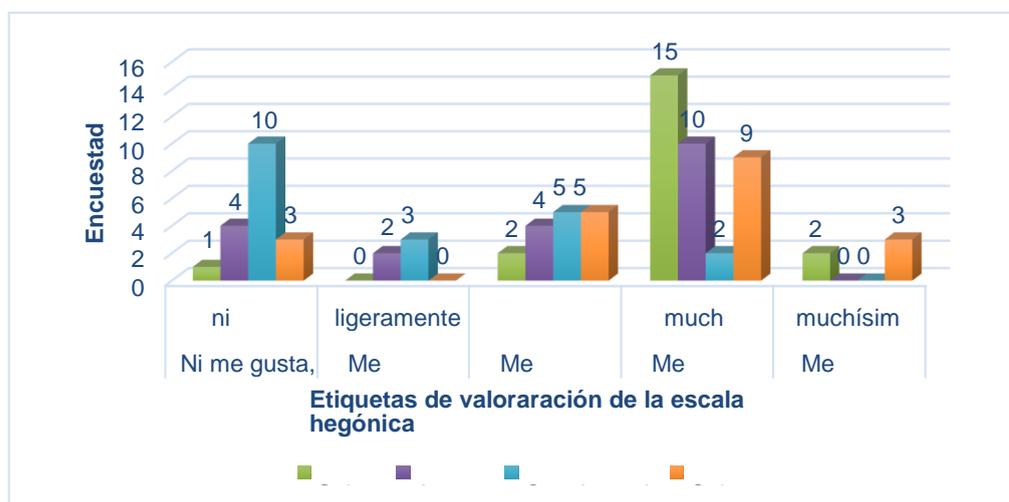
Con relación a las características evaluadas los degustadores consideran a la bebida dulce y afrutada.

En relación a la aceptabilidad de la bebida, el 75 % de los encuestados consideran que la bebida de quinua tiene un sabor agradable, el 50 % opinan que la consistencia es moderada por tanto ni les gusta, ni les disgusta, relación al aroma de la bebida, presenta un 50 % aceptabilidad posiblemente debido a la adición de canela en polvo mientras que, el color exhibe un 45 % aceptabilidad entre los degustadores.

**Tabla 8-3: Resultados del análisis organoléptico de la bebida de quinua**

Característica	VALORACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS																	
	Me disgusta muchísimo	Me disgusta mucho	Me disgusta bastante	Me disgusta ligeramente	Ni me gusta, ni me disgusta	Me gusta ligeramente	Me gusta bastante	Me gusta mucho	Me gusta muchísimo									
Número de encuestados /Porcentaje																		
Sabor	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	1	5%	0	0%	2	10%	15	75%	2	10%
Aroma	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	4	20%	2	10%	4	20%	10	50%	0	0%
Consistencia	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	10	50%	3	15%	5	25%	2	10%	0	0%
Color	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	3	15%	0	0%	5	25%	9	45%	3	15%

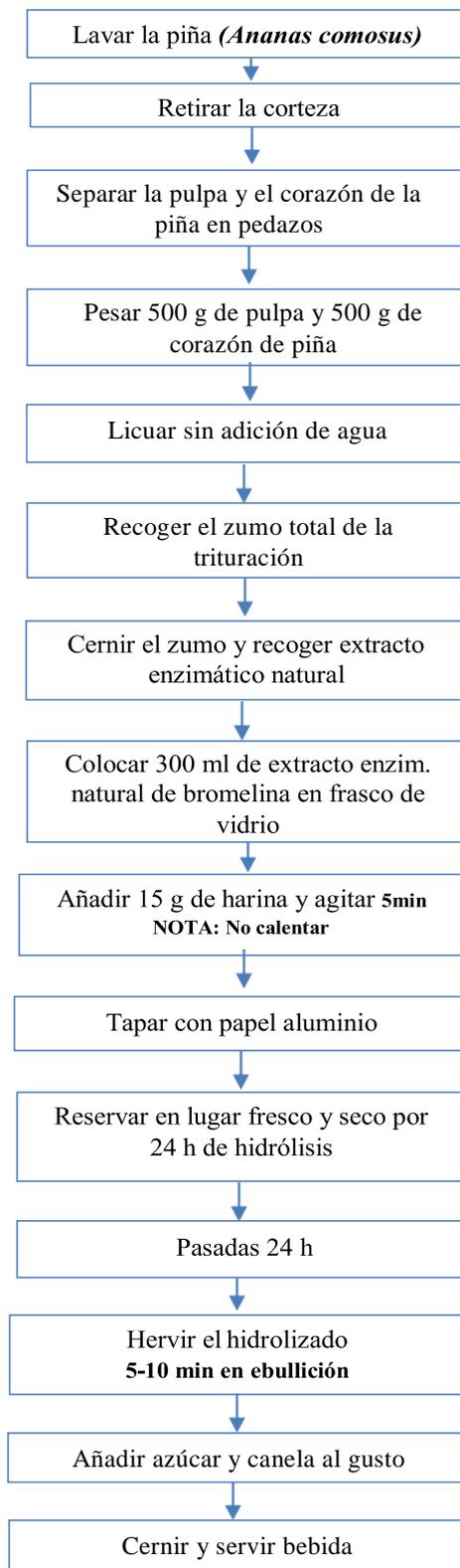
Realizado por: Angy Estrada, 2020



**Gráfico 4-3: Aceptabilidad de las características organolépticas de la bebida de quinua**

Realizado por: Angy Estrada, 2020

### 3.3.3 Propuesta para la elaboración de una bebida casera de quinua



Realizado por: Angy Estrada, 2020

La propuesta recoge datos generados en el proceso de elaboración experimental de la bebida obtenida por tratamiento con bromelina: pulpa y corazón relación (1:1), extracto de bromelina sin adición de agua, tiempo de reposo para hidrólisis 24 h, temperatura ambiente 20°C.

Cumplido el tiempo de hidrólisis y el proceso completo descrito en el diagrama, la bebida debe ser considerada para consumo del momento.

## CONCLUSIONES

- La proteína bruta de quinua precipita a temperatura ambiente con una solución de ácido clorhídrico concentrado-agua en proporción (1:3), (pH 5.5) desde un extracto acuoso de grano de quinua desamargado.
- Las condiciones de precipitación de proteína bruta afectan hidrolíticamente a las saponinas extraídas conjuntamente con la proteína por afinidad de solubilidad generando las sapogeninas correspondientes, particularidad que exige realizar un lavado hexánico de la proteína bruta precipitada para separarlas y obtener proteína de quinua (rendimiento de proteína de quinua según la metodología de aislamiento utilizada es de 5,66 %).
- Las condiciones para el proceso de hidrólisis enzimática de 1,5 g de la proteína de quinua son: 20 ml de extracto programado de bromelina a 42°C, a las 24 h existe una hidrólisis considerable con la aparición de 5 péptidos, los mismos que a tiempos superiores a las 120 h de hidrólisis se mantienen constantes, indicativo de ausencia de enlaces peptídicos reconocibles por la bromelina.
- La bebida de quinua se obtiene a partir de 15 g de harina de quinua con 300 ml de extracto enzimático natural de bromelina obtenido según metodología detallada experimentalmente, mostrando una buena aceptación organoléptica, que la definió como afrutada, dulce y de consistencia aceptable, bebida que también sirvió para el control proteolítico y propuesta casera de elaboración.

## RECOMENDACIONES

- En el caso de reproducción de este trabajo se recomienda el cumplimiento con cada una de las especificaciones denotadas en la metodología para lograr con éxito lo que se proponga replicar.
- El aislamiento de la proteína del grano de quinua se recomienda que sea continuo para evitar la descomposición y/o contaminación.
- Sería necesario considerar utilizar bromelina comercial para establecer condiciones de hidrólisis proteica, en vista de que en el presente trabajo se utilizó un extracto programado de bromelina a partir de la piña (*Ananas comosus*).
- La bebida con extracto enzimático natural de bromelina puede ser combinada con otras frutas para conseguir mejores características organolépticas y pueda ser conservada por un tiempo prudencial para su comercialización
- Se debería fortalecer el estudio sobre la validación en el uso de ninhidrina para caracterización de péptidos en procesos proteolíticos.

## GLOSARIO

**Proteína:** Es una macromolécula originada por la unión de pequeñas monómeros denominados aminoácidos unidos por un enlace peptídico.

**Hidrólisis enzimática:** Por acción específica de enzimas se produce ruptura de enlaces peptídicos generando péptidos.

**Enzima:** Moléculas orgánicas de origen proteico provenientes de plantas o animales, el cual actúa sobre un sustrato específico.

## BIBLIOGRAFÍA

**ABUGOCH, L.** Chapter 1 - Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): Composition, Chemistry, Nutritional, and Functional Properties. *Advances in Food and Nutrition Research* [en línea]. 2009. 1. Santiago: Elsevier Inc. pp. 1-3 [Consulta: 9 junio 2019]. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)58001-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1043-4526(09)58001-1).

**AEI.** Ecuador un país emprendedor e innovador en el 2020. Quito, 2013 .Disponible en: [https://unctad.org/en/PublicationsLibrary/epf\\_npd02\\_Ecuador\\_es.pdf](https://unctad.org/en/PublicationsLibrary/epf_npd02_Ecuador_es.pdf).

**AHUMADA, A., et.al.** Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd .): un subproducto con alto potencial biológico R. , vol. 45, no. 3, [en línea], 2013, pp. 438-469, [Consulta: 6 julio 2019] Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13123456>.

**ALCALDE, M.T.** Alimentos usados en formulación cosmética. *Almax* [en línea], 2007. vol. 26, pp. 100-108. [Consulta: 11 junio 2019]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13101021>.

**ALMEIDA, J.A.** *Mejoramiento Del Proceso Productivo De Quinua (Chenopodium Quinua, W), En El Centro Poscosecha De Granos Andinos "Imbandino", MAGAP-IMBABURA* [en línea], 2015. S.l.: s.n. [Consulta: 22 septiembre 2019]. Disponible en: [http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/1379/1/02\\_ICA\\_286\\_TESIS.pdf](http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/1379/1/02_ICA_286_TESIS.pdf).

**ÁLVAREZ, C. , et.al.** Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas presentes en cuatro fuentes foliares: yuca (*Manihot esculenta* Crantz) variedades verónica y tai, jatropha (*Jatropha curcas* L.) y gmelina (*Gmelina arborea* ), 2014. *Prospectiva*, vol. 12, no. 1). pp. 30. ISSN 16928261. [Consulta: 2 septiembre 2019] DOI 10.15665/rp.v12i1.148.

**ARNEJO, et.al.** Hacia una cosmética vegetal: nuevos productos. 2016, *ResearchGate*, no. November, pp. 2-11 [Consulta: 15 de octubre 2019] DOI 10.15665/rp.v12i1.148.

**ARONI, G. , et.al...** Tecnología de procesamiento de quinua a pequeña en el antiplano Sur de Bolivia. *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 53, no. 9,[en línea] ,2013. pp. 1689-1699. ISSN 1098-6596. [Consulta: 26 octubre 2019] DOI 10.1017/CBO9781107415324.004.



43,47. ISBN 0-495-10678-X.

**CHACCHI, K.** *Demanda de la quinua (Chenopodium quinoa Willdenow) a nivel industrial*". Lima-Peru:, [en línea], 1995. Universidad Agraria La Molina, . [Consulta: 26 agosto 2019]. Disponible en: Rivera, Ricardo Cultivos Andinos en el Perú. Investigaciones y Perspectivas de su%0ADesarrollo. Editorial Minerva. Lima, Perú. 417 p.

**CHARACTERIZATION, P. y OYSTER, M.** Caracterización físicoquímica y contenido de proteínas de extractos fluidos del ostión de mangle (*Crassostrea rizophorae*). *Revista Cubana de Química*, 2014 vol. XXVI, no. 1. [Consulta: 26 agosto 2019] pp. 66-74. ISSN 0258-5995.

**CHUCHO, M.** *Sistema de comercialización de la corporación de productores y comercializadores orgánicos bio taita chimborazo - coprobich, comunidad mishquilli, parroquia cajabamba, Cantón Colta, Provincia de Chimborazo y su incidencia en el posicionamiento de mercado*. Riobamba: Universidad Nacional de Chimborazo. , 2015 [en línea]. [Consulta: 26 mayo 2019]. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/4094>.

**CLAVIJO, D , et.al.** Cinética de la bromelina obtenida a partir de la piña perolera (*Ananas Comosus*) de Lebrija-Santander. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas* vol. 10, no. 2, [en línea], 2012. pp. 41-49. [Consulta: 12 septiembre 2019]. ISSN 0120-4211. DOI 10.24054/01204211.v2.n2.2012.84. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/903/90326388008.pdf>.

**COGLIATTI, M. y HETER, D.** *Perspectivas de producción de quinua en la región agrícola del centro de la provincia de buenos aires*. 1. Buenos Aires: s.n. [en línea], 2016 pp. 6-19. [Consulta: 12 septiembre 2019]. ISBN 9789874212092.

**CORDERO, C.C. y OROZCO, A.J.** Productos de la asimilación del nitrato se depositan en plantas como proteínas de almacenamiento , 2011, vol. 16, no. 1 .[Consulta: 12 septiembre 2019] . pp. 9-22.

**CORREA, M., et.al.** Optimización del protocolo para la extracción y la cuantificación de proteínas totales en semillas an efficient extraction and quantification method to total protein analysis from corn (zea mays l.) germinated seeds. *Universidad Militar Nueva Granada* | [en línea] , 2017. vol. 13, no. 1, pp. 60-64. [Consulta: 9 octubre 2019]. DOI 10.18359/rfcb.2756. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.2756>.

**CORZO, D.** *Evaluación de las Características del Almidón de Quinoa (Chenopodium Quinoa Willd) de Dos Variedades de Cundinamarca como una Posible Alternativa Tecnológica en la Industria de Alimentos* Colombia, , 2018: UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA UNAD [en línea]. [Consulta: 22 septiembre 2019]. Disponible en: <https://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php?url=/bitstream/10596/21312/1/53060873.pdf>.

**COSMEDI-ADMIN.** *Cosmetica a la medida. 3 de enero* [en línea], 2018. [Consulta: 30 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.cosmeticamedida.com/2013/01/03/alimentos-usados-en-formulacion-cosmetica/>.

**DALGO, V.** *Obtención de un concentrado con bromelina a partir de la piña (Ananas comosus) y determinación de su actividad enzimática en sustratos proteínicos.* S.l.: Universidad Tecnica de Ambato.Ambato , [en línea] , 2012 .[Consulta: 12 septiembre 2019]. Disponible en: <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3061/1/SBQ.27.pdf>.

**DEMARTA, C.** *¿Cómo crece la Quinoa? Julie Thomson, HuffPost US* [en línea] , 2017. [Consulta: 10 septiembre 2019]. Disponible en: [https://www.huffingtonpost.es/2017/06/08/como-crece-la-quinoa-asi-son-sus-plantas-y-cultivos\\_a\\_22122580/](https://www.huffingtonpost.es/2017/06/08/como-crece-la-quinoa-asi-son-sus-plantas-y-cultivos_a_22122580/).

**DIAZ, N.** *Desarrollo de un proceso para la obtencion de un aislado proteico a partir de la harina de quinoa (Chenopodium quinoa willdenow) para su evaluacion potencial en la industria.* Quito: escuela politécnica nacional. , 2016. [ en línea] [Consulta: 4 octubre 2019]. Disponible en: <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3061/1/SBQ.27.pdf>.

**DUEÑAS QUINTERO, D.M.** *Vigilancia competitiva de la quinoa: potencialidad para el departamento de Boyacá,* , 2015. *Suma de Negocios* vol. 5, no. 12, [en línea] .pp. 85-95. ISSN 2215910X. DOI 10.1016/s2215-910x(14)70030-8. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S2215-910X\(14\)70030-8](http://dx.doi.org/10.1016/S2215-910X(14)70030-8).

**EGE, S.** *Quimica organica Estructura y reactividad.* 2. Madrid:, 2018 s.n.. pp. 1198-1247.

**ENG, I , et.al** *Nutrient Content and Protein Quality of Quinoa and Canihua, Edible Seed Products of the Andes Mountains.,* vol. 3, no. 6, 1954). pp. 531-534. [Consulta: 10 de diciembre 2019]. DOI 10.1111/j.1365-2621.1964.tb00464.x.

**ESTRELLA, R.** *Biología & Ecología.* . segunda. Quito: Radmandi Proyectos Editoriales. [en línea], 2005. [ Consulta: 21 de julio 2019] p.p. 41-48. ISBN 9978-18-104-0.

**FAO.** Métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos. En: C. MORÓN, I. ZACARÍAS y S. de PABLO (eds.), *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición*. Santiago Chile, 1997: s.n., [en línea]. [Consulta: 8 octubre 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/Ah833s17.htm#17.1>.

**FAO.** *La quinua: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial* [en línea], 2011. S.l.: s.n. [Consulta: 24 junio 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/aq287s/aq287s.pdf>.

**FAO.** *Guía del cultivo de Quinua*. Segunda. Lima, Perú: s.n., [en línea], 2016 [Consulta: 26 agosto 2019]. N° 2016-03359. ISBN 9789253090693. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i5374s.pdf>.

**FORERO, N, et.al.** Usos potenciales de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) en la industria alimentaria. [en línea], , 2016 no. December. pp. 68-88. [Consulta: 22 septiembre 2019]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/324672750\\_Usos\\_potenciales\\_de\\_la\\_quinua\\_Chenopodium\\_quinoa\\_Willd\\_en\\_la\\_industria\\_alimentaria/link/5ada92bb0f7e9b28593e622c/download](https://www.researchgate.net/publication/324672750_Usos_potenciales_de_la_quinua_Chenopodium_quinoa_Willd_en_la_industria_alimentaria/link/5ada92bb0f7e9b28593e622c/download).

**GALLARDO, L., et.al,** Extracción de bromelina a partir de residuos de piña. *Ciencia y tecnología de Alimentos*, 2008 vol. 18, pp. 1-4 [en línea]. [Consulta: 12 septiembre 2019]. ISSN 0864-4497. Disponible en: <https://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/5225/1-PDF-Alejandro.pdf?sequence=1>.

**GALLEGOS, S. , et.al.** Péptidos con actividad antioxidante de proteínas vegetales. *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* [en línea], 2013. no. January 2015, pp. 111-122. [Consulta: 11 junio 2019]. DOI 10.3926/oms.94. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Luis\\_CorzoRios/publication/262261604\\_Peptidos\\_con\\_actividad\\_antioxidante\\_de\\_proteinas\\_vegetales/links/54c2b5a20cf256ed5a8f62ad.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Luis_CorzoRios/publication/262261604_Peptidos_con_actividad_antioxidante_de_proteinas_vegetales/links/54c2b5a20cf256ed5a8f62ad.pdf).

**GALWEY, N.W.** The potential of quinoa as a multi-purpose crop for agricultural diversification: a review. *Elsevier* [en línea], 1993 vol. 1., pp. 101-106. [Consulta: 3 septiembre 2019]. DOI [https://doi.org/10.1016/0926-6690\(92\)90006-H](https://doi.org/10.1016/0926-6690(92)90006-H). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/092666909290006H>.

**GANDEBE, M. , et.al.,** . Changes in Some Nutritional and Mineral Components of Nerica Rice Varieties as Affected by Field Application with Mycorrhiza and Chemical Fertilizer in Northern

Cameroon. *Food and Nutrition Sciences*, 1993 vol. 08, no. 08,). pp. 823-839. ISSN 2157-944X. [Consulta: 27 septiembre 2019].DOI 10.4236/fns.2017.88059.

**GASPAR, S.L. y TORRES, A.M.** *Para optar el Título Profesional de* [en línea]. S.l.: universidad nacional de huancavelica, 2018. [Consulta: 24 junio 2019]. Disponible en: [http://tesis.unsm.edu.pe/jspui/bitstream/11458/1025/1/Richard\\_Hidalgo\\_Mozombite\\_Rafael\\_Pacheco\\_Gonzaga.pdf](http://tesis.unsm.edu.pe/jspui/bitstream/11458/1025/1/Richard_Hidalgo_Mozombite_Rafael_Pacheco_Gonzaga.pdf).

**GIRALDO, G. , et.al** *Laboratorio debioquímica una vision practica*. 1ERA. S.l.: s.n. [en línea], , 2010. [Consulta: 31 diciembre 2019]. ISBN 9789589932568. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=dAbMDrXcTHsC&pg=PA96&dq=reacciones+de+identificacion+de+proteinas&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwiJkq6hsN3mAhXStVkKHXPiASEQ6AEIMDAB#v=onepage&q=reacciones+de+identificacion+de+proteinas&f=false>.

**GUARNIZO, A. y MARTINEZ, P.** *Experimentos de química orgánica con enfoque en ciencias de la vida*. 1era. Colombia , 2009: s.n. ISBN 9789589774465. [Consulta: 14 diciembre 2019].Disponibleen:<https://books.google.com.ec/books?id=dAbMDrXcTHsC&pg=PA96&dq> =.

**HERNÁNDEZ, N. , et.al...** Importancia de las proteínas de almacenamiento en cereales (gluteninas). *VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud* [en línea], 2015. vol. 8, no. 2 pp. 4-7. [Consulta: 1 de agosto 2019]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2015/vre151a.pdf>.

**HORTON, D.** Investigación Colaborativa de Granos Andinos en Ecuador. En: C.C.P. RESEARCH (ed.), *Granos andinos* [en línea], 2014. 1era. Quito, Ecuador:INIAP, pp. 22,23. [Consulta: 14 abril 2019]. Disponible en: [http://quinua.pe/wp-content/uploads/2016/03/granos\\_andinos\\_ecuador.pdf](http://quinua.pe/wp-content/uploads/2016/03/granos_andinos_ecuador.pdf).

**JUHER, T.F. y PÉREZ, E.B.** Revisión de los efectos beneficiosos de la ingesta de colágeno hidrolizado sobre la salud osteoarticular y el envejecimiento dérmico. *Nutricion Hospitalaria* vol. 32, [en línea], 2015. pp. 62-66. [Consulta: 30 junio 2019]. ISSN 16995198. DOI 10.3305/nh.2015.32.sup1.9482. Disponible en: <http://www.aulamedica.es/nh/pdf/9482.pdf>.

**KARP, G.** *Biología celular y molecular*. quinta. Mexixo, 2008: s.n. 1234567890.. ISBN 9789701069257.

**KURIEN, B.T., et.al.** Protein Extraction from Gels: A Brief Review. *Methods and Protocols*,

*Methods in Molecular Biology* [en línea], 2019 S.l.: Springer Science,. pp. 479-482. [Consulta: 14 octubre 2019]. ISBN 9781493987931. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1\\_40](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_40), ©.

**LAPROTEINA.ES** Bromelina caps. [en línea], 2012. [Consulta: 24 noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.laproteina.es/tienda/6107-bromelina-30-caps.html>.

**LEHINGER, N. y COX, M.** *Bioquímica*. segunda. S.l. [en línea], 2005. [Consulta: 4 noviembre 2019].: s.n. ISBN 978-84-282-1667-8.

**LEÓN, S. y SIFUENTES, G.** “ESTUDIO DE LA HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS EN ANCHOVETA ENTERA (*Engraulis ringens*) POR ACCIÓN ENZIMÁTICA”. PRESENTADO. Peru: UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA. [en línea] , 2017. [Consulta: 13 noviembre 2019].:

**MAGGI, E.** Un millar de productores de quinua recibe crédito para mejorar el cereal y exportarlo Esta noticia ha sido publicada originalmente por Diario EL TELÉGRAFO bajo la siguiente dirección: <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/regional/1/un-millar-de-product>. *Telegrafo* [en línea]. Quito, abril 2016. pp. 1. Disponible en: <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/regional/1/un-millar-de-productores-de-quinua-recibe-credito-para-mejorar-el-cereal-y-exportarlo>.

**MAHMOUD, M.I. , et.al.** Enzymatic Hydrolysis of Casein: Effect of Degree of Hydrolysis on Antigenicity and Physical Properties. *Journal of Food Science*, , 1992. vol. 57, no. 5, pp. 1223-1229. ISSN 17503841. DOI 10.1111/j.1365-2621.1992.tb11304.x.

**MCKEE, T. y J.M.** Aminoácidos , péptidos y proteínas. En: M. GRAMHILL (ed.), *Bioquímicas molecularresica*. 4ta. Mexico: s.n., [en línea] , 2014. S.l.: s.n. [Consulta: 18 junio 2019] pp. 124-182. ISBN 9789701070215.

**MEYHUAY, M.** *Quinoa: Operaciones de Poscosecha* [en línea], 2013 S.l.: s.n.. [Consulta: 2 junio 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-ar364s.pdf>.

**MIRA, M. y SUCOSHAÑAY, D.** Caracterización de la harina de quinua (chenopo-dium quinua willd.) Producida en la provincia de Chimborazo, Ecuador, 2016. *Perfiles*.vol. 1, pp. 27-31. Consulta: 13 de febrero 2020]. Disponible en: <http://ceaa.esPOCH.edu.ec:8080/revista.perfiles/faces/Articulos/Perfiles16Art4.pdf>

**MONU, R. & ALUKO, E.** Functional and Bioactive Properties of. *Food Science* [en línea], ,

2003. vol. 68, no. 4, pp. 1254-1258. [Consulta: 9 junio 2019]. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb09635.x>. Disponible en: <http://quinua.pe/wp-content/uploads/2013/02/Aluko-Protein.pdf>.

**MUÑOZ, A** " Año Internacional de la Quinoa ". *Rev. Soc. Quim* [en línea], 2013. vol. 79, no. 1, pp. 20-25. [Consulta: 23 agosto 2019]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371937630001>.

**NAZATE, K. , et.al.**. Obtención y caracterización de un hidrolizado proteico de quinua ( *Chenopodium quinoa* Willd ). *Enfoque UTE*, 2019 vol. 10, pp. 79-89. ISSN 1390-9363.

**PANTONE, A.A., et.al.** *Descriptors for Quinoa and cereals* [en línea]. Paz, Bolivia: Bioersivity International, 2013a. [Consulta: 12 mayo 2019]. ISBN 9789290439271. Disponible en: <http://www.fao.org/3/aq658s/aq658s.pdf>.

**PANTONE, A.A., et.al** *Descriptors for Quinoa and wild relatives* [en línea]. Bioersivity. La Paz, Bolivia, , 2013b: Fundación PROINPA. [Consulta: 15 mayo 2019]. ISBN 6885290438171. Disponible en: <http://www.fao.org/3/aq658s/aq658s.pdf>.

**PEÑA, A.,et.al** *Bioquímica* [en línea]. segunda. Mexico , 2004: s.n., [Consulta: 1 febrero 2020]. ISBN 968-18-2660-4. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=EFUP472dyEMC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>.

**PERALTA, E.** La Quinoa en Ecuador “Estado del Arte”. *INIAP-Estacion Experimental Santa Catalina* [en línea], 2009 no. 1965, pp. 462-475. [Consulta: 21 mayo 2019]. Disponible en: <http://repositorio.iniap.gob.ec/jspui/bitstream/41000/805/1/iniapsclgaq1.pdf>.

**PERALTA, E.** Granos andinos Chocho, Quinoa, Amaranto. Quito, 2010 pp. 169.

**PERALTA, E.** Cap. 5.3 La Quinoa en Ecuador. *Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013*, 2013. pp. 462-476 [Consulta: 18 octubre 2019].

**PINCIROLI, M.** *Proteínas de arroz. Propiedades estructurales y funcionales* [en línea], 2010. 1ERA. S.I.: s.n [Consulta: 9 octubre 2019]. Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/1828/Documento\\_completo\\_\\_\\_\\_.pdf?sequence=3&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/1828/Documento_completo____.pdf?sequence=3&isAllowed=y).

**PIÑEIRO, E.** La bromelina de la piña, nuevo complemento dietético. *Fundación Erosky* [en

línea], 2009 pp. 2. [Consulta: 24 junio 2019]. Disponible en: <http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/tendencias/2009/07/16/186554.php>.

**PISA S.A** Productos de Procesadora de Ingredientes. [en línea], 2019 [Consulta: 11 junio 2019]. Disponible en: <https://www.quiminet.com/shr/es/procesadora-de-ingredientes-1361352584.htm>.

**PONCE, N.** Apuntes de tecnología de cereales y oleaginosas. Toluca:, [en línea], 2015. [Consulta: 30 agosto 2019]. Disponible en: <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/32457/secme-8641.pdf?sequence=1>.

**PREGO, Ii., et.al.** Seed Structure and Localization of Reserves in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany* [en línea], 1998 vol. 82, pp. 481-488. [Consulta: 29 agosto 2019]. DOI <https://dx.doi.org/10.1006/anbo.1998.0704>. Disponible en: [https://watermark.silverchair.com/820481.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW\\_Ercy7Dm3ZL\\_9Cf3qfKAc485ysgAAAj4wggI6BgkqhkiG9w0BBwaggIrMIICJwIBADCCAiAGCSqGSIB3DQEHATAeBgIghkgBZQMEAS4wEQQMyJAInfpASnV6SuZyAgEQgIIB8RFgLU CgQh0Ilg0Lr0NrMhUOxLiH\\_ARXYuevpEaw3k5U6-XT](https://watermark.silverchair.com/820481.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAj4wggI6BgkqhkiG9w0BBwaggIrMIICJwIBADCCAiAGCSqGSIB3DQEHATAeBgIghkgBZQMEAS4wEQQMyJAInfpASnV6SuZyAgEQgIIB8RFgLU CgQh0Ilg0Lr0NrMhUOxLiH_ARXYuevpEaw3k5U6-XT).

**PRIMO, E.** *Química orgánica básica y aplicado de la molécula a la industria* [en línea], , 1995. Barcelona: s.n. [Consulta: 20 diciembre 2019]. ISBN 978-84-291-7954-5. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=aU\\_aBXvAB3MC&pg=PA990&dq=metodos+de+extraccion+de+proteinas&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEWjZkfPz9L3nAhU11VkkKHfOzBtEQ6AEIKDAA#v=onepage&q=metodos de extraccion de proteinas&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=aU_aBXvAB3MC&pg=PA990&dq=metodos+de+extraccion+de+proteinas&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEWjZkfPz9L3nAhU11VkkKHfOzBtEQ6AEIKDAA#v=onepage&q=metodos de extraccion de proteinas&f=false).

**PRODUCTORES, et.al.** Seminario de la quinua 2013. En: C.D.P.Y.C.O. "BIOT. CHIMBORAZO" (ed.), *COPROBICH*. Chimborazo, Riobamba: Avelino Morocho, , 2013. pp. 11.

**QUIÑONES, W., et.al.** Estructura y actividad de sapogeninas triterpénicas. *Scientia et Technica*, 2007. vol. 1, no. 33, pp. 87-90. ISSN 0122-1701. DOI 10.22517/23447214.5779.

**RAYA, J.C. , et.al** Caracterización de las proteínas de reserva y composición mineral de la semilla de capulín (*Prunus serotina*). , 2012. *Poli Botánica*. no. 34, pp. 203-315.[Consulta: 20 diciembre 2019].

**REPO-CARRASCO-VALENCIA , et.al.** Quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd.) as a source of dietary fiber and other functional components. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, , 2011.

vol. 31, no. 1, pp. 225-230. [Consulta: 4 diciembre 2019]. ISSN 0101-2061. DOI 10.1590/s0101-20612011000100035.

**ROCA, P., et.al** *Bioquímica, Técnicas y Metodos*. España, España: , , 2003 s.n.. [Consulta: 2 de agosto 2019].ISBN 84-921124-8-4.

**ROJAS, W., et.al** La diversidad genética de la quinua: potenciales usos en el mejoramiento y agroindustria Genetic diversity of quinoa: Potential uses for breeding and agroindustry. [en línea], , 2016 vol. 3, no. 2, pp. 114-124. [Consulta: 10 septiembre 2019]. Disponible en: [http://www.scielo.org.bo/pdf/riarn/v3n2/v3n2\\_a01.pdf](http://www.scielo.org.bo/pdf/riarn/v3n2/v3n2_a01.pdf).

**RUALES, J. y NAIR, B.** Effect of processing on in vitro digestibility of protein and starch in quinoa seeds, , 1994 *International Journal of Food Science & Technology*,.vol. 29, no. 4, pp. 449-456. ISSN 13652621. Consulta: 1 septiembre 2019]DOI 10.1111/j.1365-2621.1994.tb02086.x.

**SAAVEDRA, M.** *Hidrólisis enzimática de proteína de residuo de merluza a alta concentración de sólidos sin control de pH*. S.l.: UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA[en línea], 2016 vol. 2, no. 2,. [Consulta: 21 septiembre 2019]..

**SAIR, L.** Protenaceousoy composition and method of prepraring [en línea], 1959,. 2 881 076. Chicago Evergreen Park. [Consulta: 26 octubre 2019]. 2 881 076. Disponible en: <https://patentimages.storage.googleapis.com/80/f4/47/b8d4d5a9976083/US2881076.pdf>.

**SANCHÉZ, J.** *Manual para la producción de una piña de calidad*, , 2012 S.l.: s.n.. [Consulta: 2 octubre 2019]. Disponible en: [http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/tematicas/ftaxonomia\\_plantas/f01-cultivo/2018/manual\\_produccion\\_pia.pdf](http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/tematicas/ftaxonomia_plantas/f01-cultivo/2018/manual_produccion_pia.pdf).

**SÁNCHEZ, J. y CHAPOÑÁN, J.** “Evaluación del rendimiento en grano de cuatro variedades de quinua (*chenopodium quinoa willd*) con tres distanciamientos entre surcos en el distrito de cutervo” [en línea]. Peru: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, 2015. [Consulta: 23 octubre 2019]. Disponible en: <http://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/UNPRG/1032/BC-TES-5803.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

**SIMON, R.** Proceso para la extracción aislado y purificación de la proteína de ajonjolí. *Proceso para la extracción aislado y purificación de la proteína de ajonjolí* [en línea], 2004 vol. 1, no. ENERO 2003, pp. 4. [Consulta: 2 junio 2019]. Disponible en:

<https://patents.google.com/patent/WO2004019694A1/es>.

**TAPIA, I., et.al.** Aislamiento de proteínas de quinua ecuatoriana ( *Chenopodium quinoa* Willd ) variedad INIAP Tunkahuan con remoción de compuestos fenólicos , para uso potencial en la nutrición y salud humanas. *Rev. Fac Cien Med.*, [en línea], 2004 vol. 41, no. 1, pp. 71-80. [Consulta: 2 junio 2019]. Disponible en: [http://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/CIENCIAS\\_MEDICAS/article/view/1173](http://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/CIENCIAS_MEDICAS/article/view/1173).

**TEIJÓN, J.M. y BLANCO, M.D.** Proteínas: clasificación y propiedades. En: TÉBAR FLORES (ed.), *Fundamentos de Bioquímica Estructural.* , 2019 tercera. S.l.: s.n., pp. 65-81. ISBN 978-84-7360-618-9.

**TEIJÓN, J.M., , et.al.** Proteínas funcionales. En: T. FLORES (ed.), *Bioquímica estructural Conceptos y tests.* 2ed. S.l.: s.n., [en línea], 2009 pp. 57-122. [Consulta: 25 julio 2019]. ISBN 9788473603232.

**TORO, R. del.** Proteína Hidrolizada | Qué es, beneficios y cómo tomarla. *The Hut.com*, 2012 [en línea] [Consulta: 25 julio 2019]. Disponible en: <https://www.myprotein.es/thezone/suplementos/proteina-hidrolizada-beneficios/>.

**TÚNEZ, I.** 26. Aminoácidos. [en línea], 2018. vol. 1, pp. 1-9. [Consulta: 21 enero 2020]. Disponible en: <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/26aminoacidos.pdf>.

**UNAM.** *Prácticas de Bioquímica* [en línea]. 4ta. Mexico, Mexico:, 2005 s.n. [Consulta: 4 septiembre 2020]. ISBN 970320025-7. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=FbIissDEAuQC&pg=PA21&dq=ninhidrina+que+es&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwjZ0fqwo8fnAhXNxlkKHb53BBoQ6AEIOTAC#v=onepage&q=ninhidrina+que+es&f=false>.

**USDA.** Clasificación para Kingdom Plantae Down to Species *Chenopodium quinoa* Willd. [en línea], 2019 [Consulta: 4 septiembre 2019]. Disponible en: <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=CHQU>.

**VALCÁRCEL, B. y CAETANO, S.** Applications of Quinoa ( *Chenopodium Quinoa* Willd .) and Amaranth ( *Amaranthus* Spp .) and Their Influence in the Nutritional Value of Cereal Based Foods. *Scientific & Academic publishing* [en línea], 2012 vol. 2, no. 6, pp. 265-275. [Consulta: 3 septiembre 2019]. DOI 10.5923/j.fph.20120206.12. Disponible en: <http://article.sapub.org/10.5923.j.fph.20120206.12.html>.

**VALDIVIA, , et.al.** *Biología La vida y sus procesos*. novena. Mexico, Mexico, 2008: Editorial Patria. pp. 6-14. [Consulta: 9 septiembre 2019]. ISBN 970-24-0528-9.

**VÁZQUEZ, J., et.al.** Redalyc. Caracterización físicoquímica y contenido de proteínas de extractos fluidos del ostión de mangle (*Crassostrea rizophorae*). *Revista Cubana de de Química*, 2014 vol. XXVI, no. 1, pp. 66-74 [Consulta: 9 septiembre 2019]. disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S222454212014000100009&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S222454212014000100009&lng=es&nrm=iso).

**VEGA-GÁLVEZ, et.al.** Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa willd.*), an ancient Andean grain: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [en línea], 2010. vol. 90, no. 15, pp. 2541-2547. [Consulta: 14 julio 2019]. ISSN 00225142. DOI 10.1002/jsfa.4158. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.4158>.

**VÉJAR, E.** *Prácticas de Bioquímica descriptiva* [en línea]. Mexico: , 2005 s.n. ISBN 970698263X. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=xv8LNjwigGQC&pg=PA56&dq=prueba+de+liebermann-burchard&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiAgrCY5uPmAhXxxlkKHZ-ACBkQ6AEINzAC#v=onepage&q=prueba+de+liebermann-burchard&f=false>.

**VILLARROEL, J.** *Optimización del proceso de desaponificado de la quinua por el método de lavado, mediante la implementación de una lavadora industrial en la empresa asoalienu” villarroel* [en línea]. Riobamba: ESPOCH, 2019. [Consulta: 28 agosto 2019]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/11387/1/85T00540.pdf>.

**VIOQUE, J., et.al.** Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados protéicos Por, 2001 , vol. 52, no. 2, pp. 127-131. [Consulta: 4 agosto 2019]. Disponible en: <https://digital.csic.es/handle/10261/22046>.

**WEI, Q. y HE, Z.** Hidrólisis enzimática de proteínas: mecanismo y modelo cinético. *Springer link* [en línea], 2003. vol. 1, no. 3, pp. 308–314. [Consulta: 2 noviembre 2019]. DOI <https://doi.org/10.1007/s11458-006-0026-9>. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11458-006-0026-9>.

**YURKANIS, P.** *Fundamentos de la Química Organica*. 1era. Mexico, Mexico: Timothy Murphy, 2007. pp. 23-26. ISBN 10: 970-26-1022-2.

## ANEXOS

### Anexo A: Desamargado de la proteína presente en la quinua



Peso del grano de quinua



Desamargado de la quinua 8 h

### Anexo B: Obtención del E.A.Q



Licuar el grano de quinua



Filtrar el bagazo



Leche de quinua



Extracto acuoso de quinua

## Anexo C : Obtención de la proteína de quinua



Acidificación del E.A.Q



Colocación de la solución en tubos



Centrifugación de tubos



Pulverización de la P.B.Q.

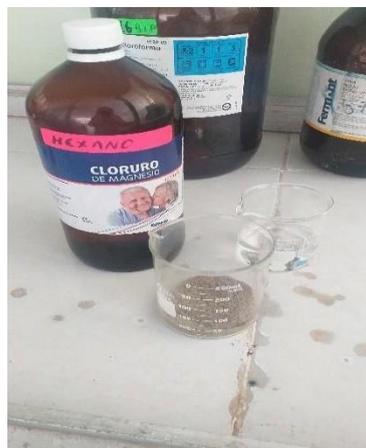


Secado de la P.B.Q

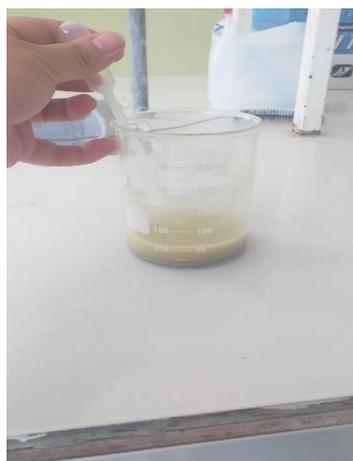
## Anexo D: Aislamiento de saponinas de la P.B.Q



Pesado de la P.B.Q



Adición de hexano a P.B.Q



Agitar la solución hexánica



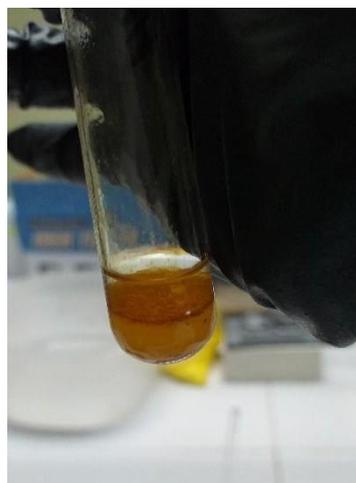
Evaporación de hexano

**Anexo E: Caracterización del extracto hexánico de la P.B.Q con reactivo de Liebermann Burchard**

Visualización del viraje de color en la prueba de Lieberman-Burchard



Amarillo

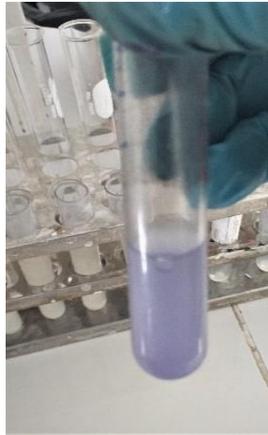


Rojo – anaranjado



Negro

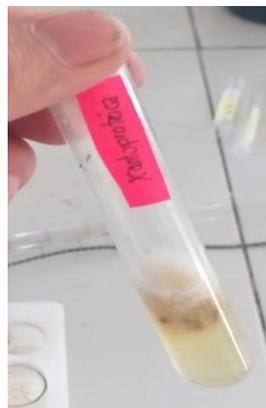
**Anexo F: Pruebas de caracterización de la proteína de quinua**



Reacción con biuret (+)



Reacción de millón (+)

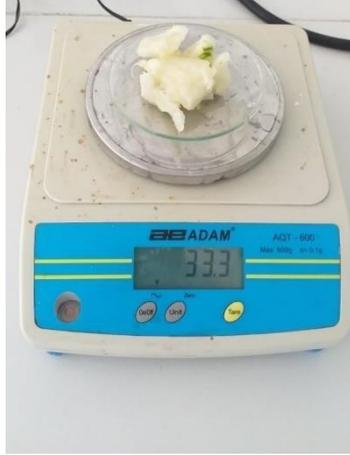


Reacción xantoproteica (-)

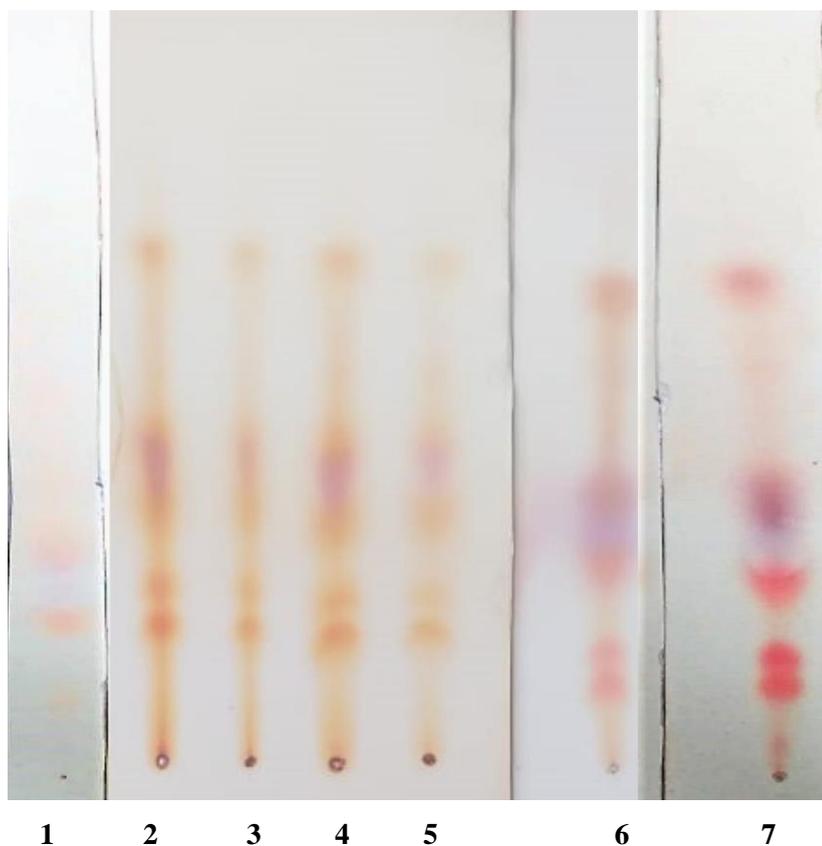


Reacción con Hopkins-cole  
(+)

## Anexo G: Hidrólisis enzimática de la proteína de quinua



## Anexo H: Cromatograma de silica-gel de la hidrolisis enzimática (0 h-24 h)



**Fase móvil:** ButOH, Ac. Acético, agua (27.5: 13 10)

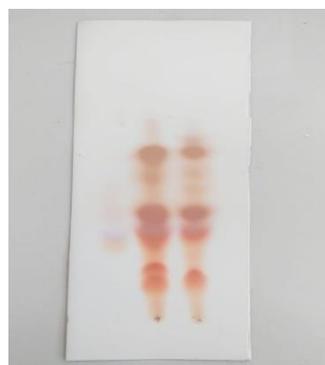
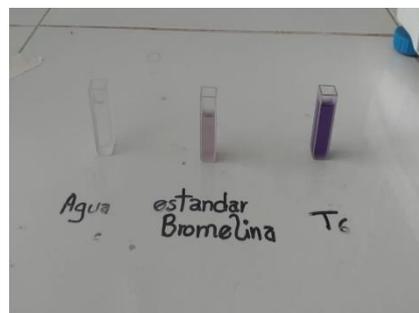
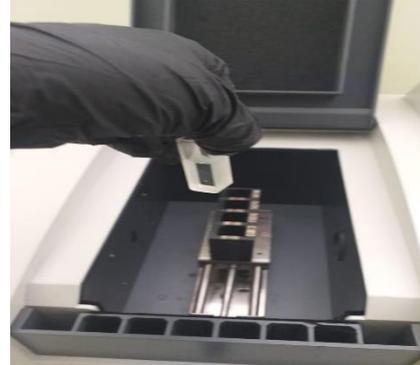
**Soporte:** Silica

**Revelador:** Ninhidrina al 0.2% etanol

### Aplicación

- 1.- T<sub>0</sub> Hidrolizado enzimático: P.Q. + E.Br (0 h)
- 2.- T<sub>1</sub> Hidrolizado enzimático: P.Q. + E.Br (1 h)
- 3.- T<sub>2</sub> Hidrolizado enzimático: P.Q. + E.Br (2 h)
- 4.- T<sub>3</sub> Hidrolizado enzimático: P.Q. + E.Br (3 h)
- 5.- T<sub>4</sub> Hidrolizado enzimático: P.Q. + E.Br (6 h)
- 6.- T<sub>5</sub> Hidrolizado enzimático: P.Q. + E.Br (9 h)
- 7.- T<sub>6</sub> Hidrolizado enzimático: P.Q. + E.Br (24 h)

**Anexo I: Seguimiento cromatográfico y fotométrico de la H.E.**



## Anexo J: Preparación de la bebida experimental de quinua con extracto enzimático



**Anexo K: Degustación de la bebida de quinua**



## Anexo L: Modelo de la encuesta organoléptica



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE  
CHIMBORAZO FACULTAD DE  
CIENCIAS



### ENCUESTA ORGANOLÉPTICA DE UNA BEBIDA CASERA DE QUINUA TRATADA CON EXTRACTO ENZIMÁTICO DE BROMELINA

La presente encuesta está dirigida a los estudiantes de la carrera de Química de la facultad de ciencias de .... semestre del periodo septiembre 2019-febrero del 2020 en el que se busca determinar las características organolépticas de una bebida casera de quinua tratada con extracto enzimático de bromelina sustentada en el trabajo de titulación “OBTENCIÓN DE PROTEINAS Y SU HIDROLISIS ENZIMATICA DE LA QUINUA AMARGA (*Chenopodium quinoa*)”

Sexo: M  F

1. ¿Qué palabra describe el producto que acaba de degustar?

Dulce  Acid  Amarg  Fermentad  Afrutado   
0 0 0 0

2. Califique a la bebida de acuerdo a la escala hedónica escoja los puntajes y colóquelos en el recuadro

CARACTERÍSTIC A	PUNTAJE
Aroma	
Color	
Sabor	
Consistencia-textura	

Puntaje	Calificación
9	Me gusta muchísimo
8	Me gusta mucho
7	Me gusta bastante
6	Me gusta ligeramente
5	Ni me gusta, ni me disgusta
4	Me disgusta ligeramente
3	Me disgusta bastante
2	Me disgusta mucho
1	Me disgusta muchísimo

.....

Firm

a

C.I.

Anexo M: Ejemplar 1 de encuesta organoléptica de la bebida experimental

 ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS 

**ENCUESTA ORGANOLÉPTICA DE UNA BEBIDA CASERA DE QUINUA TRATADA CON EXTRACTO ENZIMÁTICO DE BROMELINA**

La presente encuesta está dirigida a los estudiantes de la carrera de Química de la facultad de Ciencias de séptimo semestre del periodo septiembre 2019-febrero del 2020 en el que se busca determinar las características organolépticas de una bebida casera de quinua tratada con extracto enzimático de bromelina sustentada en el trabajo de titulación "OBTENCIÓN DE PROTEINAS Y SU HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LA QUINUA AMARGA (*Chenopodium quinoa*)"

Sexo: M  F

1. ¿Qué termino aplica al producto que acaba de degustar?

Dulce  Acido  Amargo  Fermentado  Afrutado

2. Califique a la bebida de acuerdo a la escala hedónica, escoja los puntajes y colóquelos en el recuadro

CARACTERÍSTICA	PUNTAJE
Aroma	5
Color	6
Sabor	7
Consistencia-textura	7

Puntaje	Calificación
9	Me gusta muchísimo
8	Me gusta mucho
7	Me gusta bastante
6	Me gusta ligeramente
5	Ni me gusta, ni me disgusta
4	Me disgusta ligeramente
3	Me disgusta bastante
2	Me disgusta mucho
1	Me disgusta muchísimo

  
Firma C.I. 1723191755

Anexo N: Ejemplar 2 encuesta organoléptica de la bebida experimental

 ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS 

**ENCUESTA ORGANOLÉPTICA DE UNA BEBIDA CASERA DE QUINUA TRATADA CON EXTRACTO ENZIMÁTICO DE BROMELINA**

La presente encuesta está dirigida a los estudiantes de la carrera de Química de la facultad de Ciencias de séptimo semestre del periodo septiembre 2019-febrero del 2020 en el que se busca determinar las características organolépticas de una bebida casera de quinua tratada con extracto enzimático de bromelina sustentada en el trabajo de titulación "OBTENCIÓN DE PROTEINAS Y SU HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LA QUINUA AMARGA (*Chenopodium quinoa*)"

Sexo: M  F

1. ¿Qué termino aplica al producto que acaba de degustar?

Dulce  Acido  Amargo  Fermentado  Afrutado

2. Califique a la bebida de acuerdo a la escala hedónica, escoja los puntajes y colóquelos en el recuadro

CARACTERÍSTICA	PUNTAJE
Aroma	8
Color	9
Sabor	7
Consistencia-textura	8

Puntaje	Calificación
9	Me gusta muchísimo
8	Me gusta mucho
7	Me gusta bastante
6	Me gusta ligeramente
5	Ni me gusta, ni me disgusta
4	Me disgusta ligeramente
3	Me disgusta bastante
2	Me disgusta mucho
1	Me disgusta muchísimo

  
Firma C.I. 1720332906



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE  
CHIMBORAZO



DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS  
PARA EL APRENDIZAJE Y LA INVESTIGACIÓN

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS  
REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 14 / 07 /2020

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> Angy Lisbeth Estrada Aroca
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<b>Facultad:</b> Ciencias
<b>Carrera:</b> Química
<b>Título a optar:</b> Química
<b>f. Analista de Biblioteca responsable:</b> Lic. Luis Caminos Vargas Mgs.



14-07-2020

0038-DBRAI-UPT-2020