

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**“HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN UNA Y DOS ETAPAS DE LA
PROTEÍNA DE LA CAÑIHUA (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) PARA
OBTENER PÉPTIDOS BIOACTIVOS”**

Presentada por:

KARINA GUADALUPE OCHOA PACHAS

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGISTER SCIENTIAE EN
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Lima – Perú

2017

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**“HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN UNA Y DOS ETAPAS DE LA
PROTEÍNA DE LA CAÑIHUA *Chenopodium pallidicaule* Aellen., PARA
OBTENER PÉPTIDOS BIOACTIVOS”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

KARINA GUADALUPE OCHOA PACHAS

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dra. Ana Aguilar Galvez

PRESIDENTA

Dra. Rosana Chirinos Gallardo

PATROCINADORA

Dr. David Campos Gutiérrez

CO-PATROCINADOR

Dra. Bettit Salvá Ruíz

MIEMBRO

Dra. Ritva Repo-Carrasco

MIEMBRO

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada a mis padres y hermanos, mi modelo a seguir, por su esfuerzo y paciencia durante mi desarrollo académico, pero sobretodo por su apoyo constante.

AGRADECIMIENTOS

A mi jurado de tesis y en especial a mi asesora, Dra. Rosana Chirinos Gallardo y a la Dra. Ana Aguilar, por su constante apoyo y paciencia durante la realización de la investigación. También al personal del Instituto de Biotecnología (IBT) y a mis compañeros de laboratorio, que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme.

Les agradezco especialmente a Wendy y Miluska, mis grandes amigas, quienes estuvieron presentes durante todo el proceso de la realización de la tesis, hasta la sustentación y me apoyaron y motivaron en todo momento.

La presente tesis ha sido financiada por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú), de acuerdo al convenio 354-PNICP-PIAP-2014 en el marco del proyecto: "Estudio de la Biotransformación Enzimática de la Proteína de Cañihua (*Chenopodium pallidicaule*) para la Obtención de Péptidos Bioactivos, con Actividades Antihipertensiva, Antioxidante y Antihipercolesterolémica"

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN.....	4
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1	GENERALIDADES SOBRE LA CAÑIHUA	4
2.1.1	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y REQUERIMIENTOS CLIMÁTICOS	4
2.1.2	DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y VARIEDADES	4
2.1.3	VALOR NUTRITIVO DE LA CAÑIHUA.....	5
2.1.4	CONCENTRADO PROTEICO DE CAÑIHUA.....	10
2.2	PÉPTIDOS BIOACTIVOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS ALIMENTARIAS	10
2.2.1	PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS	13
2.2.2	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS	13
2.2.3	DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS	26
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1	LUGAR DE EJECUCIÓN	28
3.2	MATERIA PRIMA E INSUMOS	28
3.2.1	CAÑIHUA	28
3.2.2	ENZIMAS.....	28
3.3	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	29
3.3.1	MATERIALES	29
3.3.2	EQUIPOS	30
3.3.3	REACTIVOS.....	31
3.4	MÉTODOS DE ANÁLISIS	32
3.4.1	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD Y PROTEÍNA TOTAL	32
3.4.2	PROTEÍNA SOLUBLE.....	32
3.4.3	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	33
3.4.4	DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS	33
3.4.5	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA ECA - I E IC ₅₀	34
3.4.6	EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ESTABILIDAD DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS FRENTE A CONDICIONES DE DIGESTIÓN.....	35
3.5	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	36
3.5.1	OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO PROTEICO DE CAÑIHUA	36
3.5.2	OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS A PARTIR DEL CONCENTRADO PROTEICO CAÑIHUA	39
3.5.3	EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS PÉPTIDOS DURANTE DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i>	40

3.5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DESGRASADA Y CONCENTRADO PROTEICO DE LA CAÑIHUA	42
4.2 GRADO DE HIDRÓLISIS.....	43
4.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	48
4.4 INHIBICIÓN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA I (ECA - I).....	54
4.5 EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ESTABILIDAD DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS FRENTE A CONDICIONES DE DIGESTIÓN.....	62
V. CONCLUSIONES.....	65
VI. RECOMENDACIONES	67
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
VIII. ANEXOS	85

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Composición de los granos andinos en comparación con el trigo (g/100g).....	8
Cuadro 2: Composición química de la cañihua.....	9
Cuadro 3: Fracciones proteicas de quinua y cañihua (porcentaje de proteína total).....	9
Cuadro 4: Contenido de aminoácidos (aa) en granos de cereales.....	10
Cuadro 5: Procedimiento para la determinación de la actividad inhibitoria ECA - I.....	36
Cuadro 6: Formas de reacción de las enzimas, concentración y parámetros.....	39
Cuadro 7: Contenido de proteína de la harina desgrasada y del concentrado proteico de cañihua.....	42
Cuadro 8: Grado de hidrólisis (%) para cada tiempo de hidrólisis enzimática de la proteína de la cañihua en una etapa.....	43
Cuadro 9: Grado de hidrólisis (%) para cada tiempo de hidrólisis enzimática de la proteína de la cañihua en dos etapas.....	47
Cuadro 10: Capacidad antioxidante ABTS ⁺ durante la hidrólisis enzimática de la proteína de la cañihua en una etapa.....	49
Cuadro 11: Capacidad antioxidante ABTS ⁺ durante la hidrólisis enzimática de la proteína de la cañihua en dos etapas.....	52
Cuadro 12: Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina ECA - I (%) para distintos tiempos de hidrólisis enzimática llevada a cabo en una y dos etapas.....	58
Cuadro 13: Valores de IC50 obtenidos con diferentes tratamientos enzimáticos y a diferentes tiempos de hidrólisis.....	62
Cuadro 14: Valores de inhibición de la actividad ECA - I (%) e IC50 obtenidos durante el proceso de digestión <i>in vitro</i>	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cañihua. Sus componentes botánicos: A. Planta, B. Formas de hoja, C. Grano	5
Figura 2: Efectos biológicos beneficiosos producidos por péptidos de origen alimentario	10
Figura 3: Esquema de la proteína antes (paso 1: las enzimas están en estado activo) y después (paso 2: desactivación de las enzimas luego de la hidrólisis completa) de la hidrólisis enzimática.....	13
Figura 4: Representación del SRA y del sistema quinina-caliceína donde se observa su interconexión por la acción de la ECA.....	20
Figura 5: Sistema renina-angiotensina-aldosterona. La activación de este sistema resulta en una disminución de la excreción de Na ⁺ y agua por los riñones.....	17
Figura 6: Obtención de concentrado proteico de cañihua	38
Figura 7: Correlación entre el grado de hidrólisis y la capacidad antioxidante ABTS ⁺ de la proteína de cañihua obtenida mediante diferentes tratamientos enzimáticos.....	55

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Curvas estándar empleadas en la investigación	85
ANEXO 2: Análisis estadístico de grado de hidrólisis por tiempo de reacción enzimática	87
ANEXO 3: Análisis estadístico de capacidad antioxidante por tiempo de reacción enzimática.....	95
ANEXO 4: Análisis estadístico de grado de hidrólisis por tratamiento enzimático	104
ANEXO 5: Análisis estadístico de capacidad antioxidante por tratamiento enzimático	111
ANEXO 6: Análisis estadístico de inhibición de la ECA – I	118

RESUMEN

En el presente estudio, se obtuvieron hidrolizados proteicos con potencial bioactivo, capacidad antioxidante y antihipertensiva a partir de un concentrado proteico de cañihua (79.38 %, p/p) mediante hidrólisis enzimática utilizando las enzimas comerciales Alcalasa® (endoproteasa), Neutrasa® (endoproteasa) y Flavourzyme® (complejo proteasa/peptidasa) en una y dos etapas. Los mayores grados de hidrólisis (GH) se obtuvieron a los 240 minutos para las reacciones en una etapa con Alcalasa y Neutrasa con valores de 42.82 y 35.96 por ciento, respectivamente. Un incremento importante en el GH se obtuvo cuando se combinaron las enzimas (reacciones de dos etapas) Alcalasa/Flavourzyme y Alcalasa/Neutrasa con valores de 46.76 y 60.28 por ciento, respectivamente. La capacidad antioxidante (CAOX) ABTS⁺ *in vitro* aumentó con el GH de la proteína, obteniéndose los valores mayores con reacciones de dos etapas, donde las combinaciones Alcalasa/Neutrasa y Alcalasa/Flavourzyme dieron valores ABTS⁺ en el rango de 3 y 3.50 μmol de equivalente trolox (TE)/mg de proteína, respectivamente. Los valores IC₅₀ dependieron principalmente del tipo de enzima o la mezcla de enzimas utilizadas, mientras que el GH tuvo una relación directa con la CAOX. Los mejores resultados fueron obtenidos con la combinación de enzimas Neutrasa/Alcalasa (180 min de reacción) alcanzando un IC₅₀ de 0.12 mg de proteína/ml, a esta condición un GH de 42.19 por ciento y un valor ABTS⁺ de 2.12 μmol TE/mg de proteína, fue obtenido. Al evaluar la estabilidad del hidrolizado frente a las condiciones gastrointestinales utilizando un modelo *in vitro* (hidrólisis secuencial con pepsina y pancreatina), se obtuvo un IC₅₀ de 0.07 mg/ml de proteína al final de la reacción, lo que indicaría que los péptidos muestran estabilidad a las condiciones de ensayo.

PALABRAS CLAVE: hidrólisis enzimática, péptidos, proteína, cañihua

ABSTRACT

In this study, protein hydrolysates with bioactive potential antihypertensive and antioxidant capacity were extracted from cañihua flour (79.38 %, p/p) by enzymatic hydrolysis using commercial enzymes Alcalase® (endoprotease), Neutrasa® (endoprotease) and Flavourzyme® (protease/peptidase complex) in one and two stages. The highest degrees of hydrolysis (DH) were obtained 240 minutes for reactions in one step with Alcalase and Neutrase with 42.82 and 35.96 values percent, respectively; whereas Flavourzyme's values were low (9.63 percent). A significant increase in DH was obtained combining enzymes (two stage reactors) Alcalase/Flavourzyme and Alcalase/Neutrase with 46.76 and 60.28 values percent respectively combined. The antioxidant capacity (CAOX) ABTS⁺ *in vitro* increased with GH protein, yielding the highest values with two stage reactor method, where combinations Alcalase/Neutrase and Alcalase/Flavourzyme gave values ABTS⁺ in the range of 3 and 3.50 mol equivalent trolox (TE)/mg protein, respectively. IC₅₀ values depended mainly on the type of enzyme or the mixture of enzymes used, with the DH directly related to the CAOX. The best results were obtained with the combination of Neutrase/Alcalase enzymes (180 min) reaching an IC₅₀ of 0.12 mg of protein/ml, to this condition a DH of 42.19 percent and an ABTS⁺ value of 2.46 μmol TE/mg protein was obtained. When assessing the stability of the hydrolyzate against gastrointestinal conditions using an *in vitro* model (sequential hydrolysis with pepsin and pancreatin), an IC₅₀ of 0.07 mg / ml protein was obtained, indicating that the peptides show stability in the assay conditions.

KEYWORDS: enzymatic hydrolysis, peptide, protein, cañihua

I. INTRODUCCIÓN

Los péptidos bioactivos o péptidos con actividad biológica producidos durante la digestión gastrointestinal o la elaboración de alimentos pueden ejercer un importante papel en la regulación y la modulación metabólica, que sugiere su uso potencial como nutracéuticos e ingredientes de alimentos funcionales para promoción de la salud y la reducción del riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles como la hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes, entre otros (Saadi *et al.*, 2015). En los últimos años se han destinado muchos esfuerzos al estudio de las diferentes actividades beneficiosas que estos péptidos bioactivos pueden tener sobre el organismo, incluyendo su actividad antihipertensiva, hipocolesterolemia, antioxidante, antimicrobiana e inmunomoduladora, así como su efecto opiáceo (Mulero *et al.*, 2011).

Recientemente, las propiedades bioactivas de las proteínas y los péptidos derivados de cereales andinos han ganado un mayor reconocimiento en las áreas de ciencias de la alimentación y nutrición, por sus posibles beneficios en el tratamiento y/o prevención de la aparición de enfermedades (Udenigwe y Aluko, 2012). La cañihua es uno de los granos andinos menos estudiados y más nutritivos, su contenido y calidad proteica es excepcional (15-19 por ciento), como también es rico en micronutrientes tales como hierro y calcio (Repo-Carrasco, 2011). En un estudio previo, Espinoza (2015) evaluó el empleo de la Alcalasa® para la obtención de hidrolizados proteicos con actividades antihipertensiva y antioxidante a partir de la proteína de la cañihua obteniendo resultados interesantes. Sin embargo, mayores estudios empleando otras enzimas proteolíticas así como la combinación de enzimas son necesarios desarrollar para optimizar la obtención de péptidos con actividades antihipertensiva y antioxidante, estudio que ha sido abordado en la presente tesis, la misma que tuvo como objetivos:

- Evaluar el proceso de hidrólisis de la proteína de cañihua empleando enzimas de uso alimentario Alcalasa®, Flavourzyme®, Neutrasa® y la combinación de estas.
- Determinar las actividades antihipertensiva (actividad inhibitoria de enzima convertidora de la angiotensina ECA - I) y antioxidante (ABTS⁺) *in vitro* de la proteína de cañihua hidrolizada.
- Evaluar la estabilidad de los hidrolizados de la proteína de cañihua frente a las condiciones de digestión gástrica *in vitro*, a través de la determinación de la actividad ECA - I, IC₅₀ y antioxidantes después del tratamiento con pepsina y pancreatina.

Es así como la proteína de cereales andinos, como la cañihua, podría ser utilizada como materia prima para la obtención de péptidos bioactivos de gran valor biológico mediante un proceso de hidrólisis enzimática aportando beneficios a la salud de los consumidores mediante sus propiedades antioxidantes y antihipertensivas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES SOBRE LA CAÑIHUA

2.1.1 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y REQUERIMIENTOS CLIMÁTICOS

La cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) está estrechamente relacionada con la quinua, de hecho, se consideró una variedad de quinua hasta 1929 cuando fue clasificada como especie distinta. La cañihua crece en condiciones ambientales muy duras, sobre todo en el altiplano peruano y boliviano. Es uno de los cultivos más resistentes a las bajas temperaturas y presencia de heladas, pero es sensible a la falta de humedad sobre todo al inicio de su crecimiento (Tapia y Fries, 2007). Repo-Carrasco *et al.* (2009) mencionan que la cañihua es una planta resistente, florece en tierras pobres y rocosas, soportando climas fríos y secos, como los que existen en el altiplano. La cañihua puede germinar a 5°C, florecer a 10°C y desarrollar semillas a 15 °C, pudiendo encontrarse en altitudes de 1500 a 4400 m, pero raramente cultivada por debajo de los 3800 m. El rendimiento promedio de la semilla es de 400 a 900 kg/ha, pero se pueden obtener hasta 2 a 3 t/ha. En el Perú su cultivo se centraliza en el altiplano de Puno en las zonas agroecológicas de Suni y Puna (mayor producción), aunque también se le puede encontrar en parcelas muy aisladas en Cusco, Huancavelica y Huancayo (Tapia y Fries, 2007).

2.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y VARIEDADES

Según Mujica *et al.* (2002), citados por Huamán (2011), la cañihua presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Vegetal, Eukarionta
División: Angiospermophyla
Clase: Dicotyledoneae
Sub clase: Archichlamydeae
Orden: Centrospermales
Familia: Chenopodaceae
Género: Chenopodium
Especie: *Chenopodium pallidicaule* Aellen

La cañihua una planta herbácea, erecta que alcanza 25 a 70 cm de altura; su crecimiento es anual alcanzando la madurez en 95 a 150 días, debiendo cosecharse antes de la completa madurez porque de otro modo las semillas caerían al suelo. Las inflorescencias son pequeñas, axilares o terminales, cubiertas totalmente por el follaje que las protege del efecto de las bajas temperaturas. Las hojas alternas presentan pecíolos cortos y finos, las láminas son engrosadas, de forma de rombo, las hojas presentan tres nervaduras bien marcadas en la cara inferior que se unen después en la inserción del pecíolo (Tapia y Fries, 2007). Al igual que la quinua, la cañihua produce una semilla similar a un cereal, pero no es considerada como tal. La semilla es en realidad un fruto de paredes duras (aquenio), que contiene a la semilla, de aproximadamente 1-1.2 mm de diámetro, la mitad del tamaño de los granos de quinua. El fruto está cubierto por un perigonio (cáliz persistente), generalmente de color gris, el cual se desprende con facilidad a la madurez y en algunos casos puede permanecer adherido al grano incluso después de la trilla dificultando la selección (Repo-Carrasco, 2011). En la Figura 1 se muestra la planta de cañihua.

Algunos de los cultivares conocidos en Perú son: Cupis, Ramis, Akallapi, Huanaco, Rosada, Chillihua, Condorsaya, K'ellu y Puca. En Bolivia, los cultivares incluyen Kanallapi, Chusllunca e Issualla. Existen colecciones de germoplasma en las estaciones experimentales INIA de Camacani e Illpa (Puno), la Universidad San Antonio Abad en K'ayra (Cuzco) en Perú; y en Bolivia en la Universidad de Patacamaya en el Instituto Boliviano de Tecnología Agropecuaria (IBTA) donde se almacenan en frío más de 380 accesiones (FAO, 1994). En la estación experimental Illpa/INI AA en Puno, se han

seleccionado las variedades Ramis, Cupi y Lampa. En Bolivia, se distribuye en el Altiplano y las serranías de Cochabamba. No ha tenido mayor difusión fuera de estas regiones.

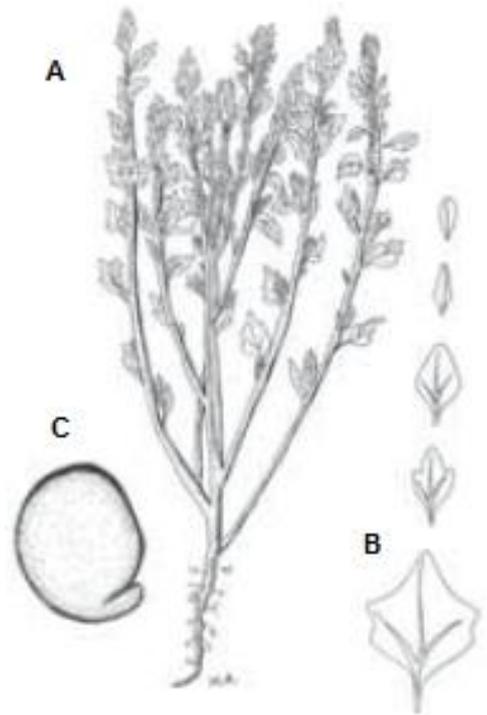


Figura 1: Cañihua. Sus componentes botánicos: A. Planta, B. Formas de hoja, C. Grano

FUENTE: Tapia y Fries (2007)

2.1.3 VALOR NUTRITIVO DE LA CAÑIHUA

La cañihua (*Chenopodium pallidicaule*), la quinua (*Chenopodium quinoa*), y el amaranto o kiwicha (*Amaranthus caudatus*) son granos andinos que se caracterizan por contener proteínas de alto valor biológico y nutricional (Seminario, 2004). La calidad nutricional de una proteína depende en gran parte de la composición de sus aminoácidos y su digestibilidad. Si una proteína es deficiente en uno o más aminoácidos esenciales, su calidad es más baja. Cuando se administra una proteína al organismo humano y una gran parte del nitrógeno de esta proteína es retenida por los tejidos, se habla de una proteína de alto valor biológico (porcentaje de proteína que el cuerpo retiene para utilizarlo en la

síntesis de nuevos tejidos), el cual a su vez depende de los aminoácidos esenciales contenidos por la proteína y de la relación que guarden entre ellos; es así que las proteínas de alto valor biológico contienen todos los aminoácidos esenciales y en proporciones adecuadas (Patiño, 2006). Si una proteína es deficiente en uno o más aminoácidos esenciales, su calidad es baja. El más deficiente de los aminoácidos esenciales de una proteína se denomina «aminoácido limitante», el cual determina la eficiencia de utilización de la proteína presente en un alimento o en combinación de alimentos. Los seres humanos por lo general comen alimentos que contienen muchas proteínas. Por lo tanto, los nutricionistas se interesan en la calidad de la proteína de la dieta de una persona o de sus comidas, más que de un solo alimento. Si un aminoácido esencial es insuficiente en la dieta, éste limita la utilización de otros aminoácidos para formar proteína. La utilización neta de la proteína, por su parte, corresponde al porcentaje de proteína ingerida que es retenido en el cuerpo, el cual depende de la digestibilidad de la proteína (Latham, 2002). En el Cuadro 1 se aprecia el contenido de macronutrientes de los granos andinos, comparados con el trigo, donde se observan las diferencias en cantidad.

La cañihua es un grano que tiene un alto valor nutricional por su elevado contenido de proteínas que varía entre 14 y 19 por ciento; además tiene una proporción importante de aminoácidos azufrados, metionina y cisteína (Repo-Carrasco *et al.*, 2009). La ventaja preponderante con respecto a la quinua es la ausencia de saponina, facilitando su utilización en la dieta alimentaria (Huamán, 2011). La composición química de dos variedades de cañihua se muestra en el Cuadro 2.

La importancia de las proteínas de granos andinos está basada en su calidad. Las proteínas de quinua y cañihua pertenecen principalmente a las albúminas y globulinas (Cuadro 3), que tienen una composición balanceada de aminoácidos esenciales similar a la composición de la caseína, proteína de la leche (Repo- Carrasco *et al.*, 2003).

Existen 22 aminoácidos que conforman las proteínas y que son fisiológicamente importantes. El organismo sintetiza 14 a partir del adecuado suministro de nitrógeno, y los

que no pueden ser sintetizados (aminoácidos esenciales) a la velocidad y cantidad requerida, son suministrados a través de ciertos alimentos en la dieta. Ellos son: leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, valina, triptófano, y para los lactantes hay que considerar a la histidina (Tapia y Fries, 2007). Mujica et al., (2002) citados por Huamán (2011) señalan que el contenido de aminoácidos es variable en comparación con cereales comunes como el arroz que es deficiente en lisina (3.2 g de lisina en 16 g de nitrógeno), mientras que la cañihua contiene el doble de este aminoácido. La composición de aminoácidos esenciales de cañihua, quinua y kiwicha en comparación al trigo se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 1: Composición en base seca de los granos andinos en comparación con el trigo (g/100g)

Componente	Cañihua (a)	Quinua (a)	Kiwicha	Trigo
Proteína	15.9	15.5	14.1	11.6
Grasa	5.4	6.9	7.3	2.1
Carbohidratos	72.3	75.9	75.9	83.9
Fibra	10.9	6.1	2.7	3.4
Ceniza	5.7	2.8	2.5	1.7
Humedad (%)	12.3	11.5	9.2	11.6

(a) Valores promedio de las variaciones de la tabla de composición de los alimentos peruanos.

FUENTE: Instituto Nacional de Salud (2009)

Cuadro 2: Composición química de la cañihua

Componente (%)	Grano crudo	
	Cupi	Ramis
Humedad	10.37 ± 0.19	11.79 ± 0.10
Proteína	14.41 ± 0.26	14.88 ± 0.46
Grasa	5.68 ± 0.02	6.96 ± 0.24
Fibra cruda	11.24 ± 1.15	8.18 ± 0.02
Carbohidratos	63.64	65.65
Fibra dietaria total	25.24	25.95
Fibra dietaria soluble	2.98 ± 0.42	2.79 ± 0.57
Fibra dietaria insoluble	22.27 ± 2.30	23.16 ± 0.89
Almidón resistente	0.24 ± 0.03	0.26 ± 0.04
Lignina	6.88 ± 0.34	7.98 ± 1.04
Betaglucanos	0.07 ± 0.02	0.04 ± 0.04

FUENTE: Repo-Carrasco *et al.* (2009)

Cuadro 3: Fracciones proteicas de quinua y cañihua (porcentaje de proteína total)

	Albúminas + Globulinas	Prolaminas	Glutelinas + proteínas insolubles
Cañihua	41	28	31
Quinua	45	23	32

FUENTE: Scarpati y Briceño (1980), reportados por Repo-Carrasco *et al.* (2003)

Cuadro 4: Contenido de aminoácidos (aa) en granos de cereales

Aminoácidos	g/100 g de proteína					
	Cañihua	Quinoa	Kiwicha	Trigo	FAO/OMS ¹	FAO/OMS ²
Triptófano	0.9	1.5	1.1	1.1	0.7	0.6
Metionina +cisteína	4.6	3.4	6.1	4.0	2.5	2.2
Treonina	3.3	3.8	3.3	2.9	2.7	2.3
Isoleucina	3.4	3.2	3.2	3.3	3.1	3.0
Valina	4.2	3.9	3.8	4.4	4.1	3.9
Lisina	5.3	5.1	6.0	2.9	5.2	4.5
Fenilalanina +Tirosina	6.0	6.3	6.4	7.5	4.6	3.8
Leucina	6.1	7.9	5.4	6.7	6.3	5.9
Histidina	2.7	2.4	2.4	2.3	1.8	1.5

¹: Patrón de aminoácidos de referencia para niños de 1 a 2 años (FAO/OMS 2007)

²: Patrón de aminoácidos de referencia para adultos (FAO/OMS 2007)

FUENTE: Walters (2013)

El score de una proteína refleja su contenido en aminoácidos (AA) en comparación con la proteína ideal. Sin embargo, cuando se necesita conocer la utilización de los AA en el organismo es necesario realizar la corrección del valor de score según la digestibilidad proteica. En la actualidad el método sugerido para evaluar la calidad proteica es la calificación del cómputo químico o score de aminoácidos corregido por digestibilidad proteica o PDCAAS que compara el perfil de aminoácidos de una proteína en estudio con las necesidades del niño mayor a un año que representan los requerimientos más exigentes de los diferentes grupos etarios a excepción de los lactantes que se comparan con la leche humana. El PDCAAS se calcula multiplicando el valor correspondiente al score por el valor correspondiente a la digestibilidad (Suárez *et al.*, 2006). En el caso de la quinua, el PDCAAS para preescolares es de 87 por ciento, mayor al de la harina de trigo y arroz (43 y 50 por ciento, respectivamente) pero menor al del aislado proteico de soya (96 por ciento) y caseína (100 por ciento); sin embargo en el caso de la cañihua se desconoce la digestibilidad proteica por lo cual no se puede calcular exactamente

el PDCAAs pero se puede estimar basado en la digestibilidad de la quinua, resultando en 89 por ciento tomando como aminoácido limitante a la lisina (Walters, 2013).

2.1.4 CONCENTRADO PROTEICO DE CAÑIHUA

La cañihua y quinua tienen un contenido relativamente alto en proteínas, hecho que convierte a las proteínas de ambos cereales andinos en matrices alimentarias muy atractivas, las cuales podrían ser incluidas en la alimentación humana bajo la forma de harinas, concentrados y/o aislados proteicos (Callisaya y Alvarado, 2009). Los concentrados proteicos son aquellos que contienen un mínimo de 70 por ciento de proteína en base seca, se extraen a partir de la harina desgrasada del grano previamente descascarillado y pulverizado, con la posterior eliminación de compuestos solubles no proteicos, obteniendo un producto rico en azúcares insolubles y proteínas; mientras que los aislados proteicos son los que contienen entre el 80 y 90 por ciento de proteína, obtenidos mediante una extracción a pH alcalino seguida del ajuste a pH ácido (punto isoelectrico) para generar la precipitación de las proteínas y separarlas de resto de compuesto no solubles (Aguilar y Vélez, 2013).

2.2 PÉPTIDOS BIOACTIVOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS ALIMENTARIAS

Las proteínas son uno de los componentes principales de la dieta y, al ser digeridas en el tracto gastrointestinal, se hidrolizan en aminoácidos libres y una gran cantidad de péptidos, algunos de los cuales son absorbidos y transportados por el torrente circulatorio (Fernández, 2015). Una serie de proteínas de transporte de membrana se localizan en la célula epitelial intestinal dando por resultado la absorción de sustratos específicos en el enterocito. Estos transportadores son proteínas de membrana especializadas que pueden reconocer, unir y translocar un sustrato específico o múltiples sustratos diferentes a través de la membrana del borde en cepillo de la célula epitelial. Además, otras proteínas de transporte implicadas en este proceso han sido detectadas y caracterizadas en una extensión

limitada en la membrana basolateral. La mayoría de los aminoácidos libres que se presentan en la superficie luminal o apical de la célula epitelial son transportados tanto por el borde de cepillo como por membranas basolaterales en la sangre venosa portal. Se han definido varios portadores de aminoácidos de membrana de borde de cepillo, unidos a diferentes iones, que dan como resultado el transporte de aminoácidos básicos, neutros y aniónicos. Sin embargo, para oligopéptidos se evidencian diferentes rutas de transporte celular (Freeman, 2015). Tanto para los dipéptidos como para los tripéptidos, está presente una proteína de membrana, PepT1, que parece tener una capacidad de sustrato muy amplia y, teóricamente, se cree que podría transportar todos los dipéptidos y tripéptidos posibles dentro de la célula epitelial (Gilbert *et al.*, 2008, citados por Freeman, 2015). Para 20 aminoácidos diferentes, se han enumerado un total de 400 dipéptidos y 8000 tripéptidos. Para aquellos péptidos que consisten en 4 o más aminoácidos, las enzimas de borde de cepillo primero deben hidrolizar cada uno de ellos a aminoácidos libres, dipéptidos y tripéptidos. A continuación, sigue la captación de sustrato en la célula epitelial. Una vez dentro de la célula epitelial, las enzimas citoplasmáticas hidrolizan estos dipéptidos y tripéptidos en aminoácidos libres para su transporte a la sangre venosa portal. La mayoría de las oligopeptidasas son aminopeptidasas, actuando para eliminar un residuo de aminoácido del extremo amino del péptido. La longitud de la cadena peptídica determina la ubicación de la hidrólisis con péptidos más largos hidrolizados en el borde del cepillo y dipéptidos y tripéptidos principalmente en el citoplasma. En particular, los oligopéptidos que contienen prolina son pobremente hidrolizados por la mayoría de las peptidasas, aunque son muy importantes para la asimilación de muchas proteínas dietarias normales con un alto contenido de prolina (por ejemplo, gliadina), por lo cual existen dipeptidasas específicas de prolina. Los aminoácidos infundidos en el intestino humano en forma de péptidos son más fácilmente absorbidos que si se infunden en el lumen intestinal como aminoácidos libres (Freeman, 2015).

Se ha descrito que algunos de esos péptidos derivados de los alimentos comparten estructuras moleculares con los péptidos endógenos, lo cual podría permitir a los péptidos alimentarios interactuar con los receptores del organismo, tal y como ocurre con los péptidos opiáceos, o inhibir ciertos enzimas reguladores. A estos péptidos, se les conoce como péptidos bioactivos y son foco de gran interés científico debido a su variedad y

multifuncionalidad (Figura 2). Por lo general contienen 3-20 residuos de aminoácidos, y sus actividades se basan en su composición de aminoácidos y la secuencia (Qian *et al.*, 2008). Estas cadenas cortas de aminoácidos son inactivas dentro de la secuencia de la proteína de origen, pero pueden ser liberadas durante la digestión gastrointestinal, procesamiento de alimentos, o fermentación (Kim y Wijesekara, 2010).

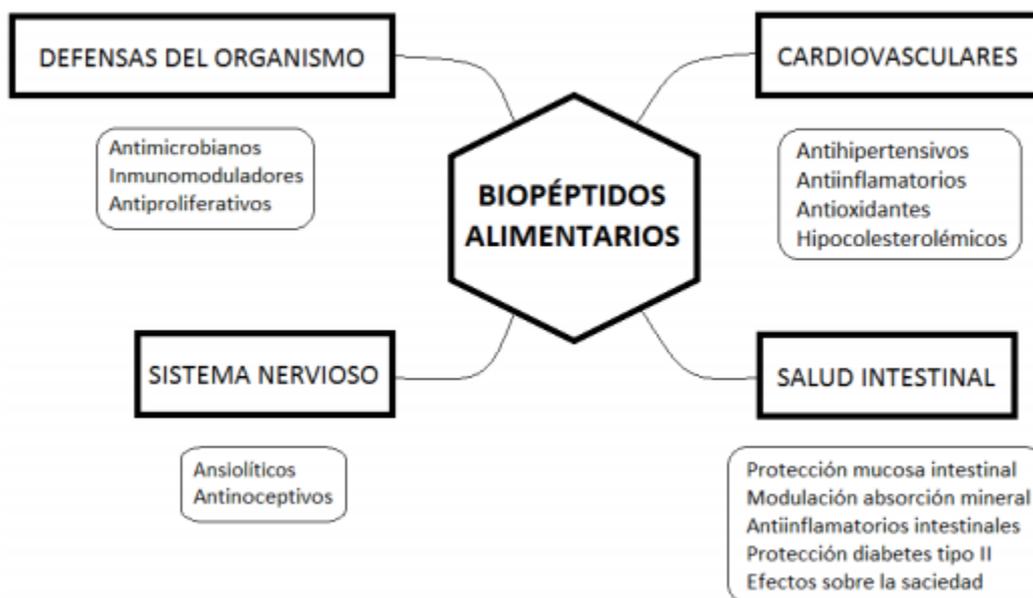


Figura 2: Efectos biológicos beneficiosos producidos por péptidos de origen alimentario

FUENTE: Fernández (2015)

En la actualidad, las proteínas alimentarias se investigan no sólo desde el punto de vista nutricional o funcional, sino como materia prima para la obtención de péptidos, debido a que toda fuente de proteínas alimentarias es susceptible de aportar péptidos funcionales (Korhonen, 2002; citado por Saadi *et al.*, 2015). Debido a su relevancia, se han desarrollado técnicas para la obtención de nuevos péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias mediante digestión enzimática *in vitro*, empleando enzimas proteolíticas de origen microbiano (Meisel, 2004); además, en estudios recientes se han obtenido péptidos modificados, diseñados a partir de péptidos naturales, con el fin de incrementar la actividad de estos últimos (Martínez y Martínez, 2006). De esta manera, proteínas de distinta

procedencia (animal y vegetal) han sido utilizadas para el aislamiento de péptidos a partir de hidrolizados enzimáticos, siendo interesante destacar que dependiendo de la fuente proteica, del tipo de enzima usado y de las condiciones de procesamiento, la actividad biológica y los péptidos obtenidos son distintos (Wang y González, 2005). La incorporación de hidrolizados proteicos en alimentos ha incrementado su aplicación en la industria alimentaria. La formulación de nuevos alimentos con la incorporación de biopéptidos es de gran interés para el organismo humano ya que mejora la dieta mediante la suplementación de sistemas biológicos capaces de regular las funciones corporales (Saadi *et al.*, 2015).

2.2.1 PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Para el estudio de los péptidos bioactivos, en la actualidad se siguen una serie de etapas generales que son: 1) la obtención del péptido mediante algún método, como extracción con solventes, hidrólisis enzimática o fermentación microbiana de proteínas alimentarias; 2) búsqueda de la actividad biológica mediante ensayos de simulación *in vitro*; 3) separación y caracterización de el o los péptidos responsables de la actividad; y 4) ensayos de actividad *in vivo* en un modelo animal (Shahidi y Zhong, 2008; Kim y Wijesekara, 2010). Los enfoques más comunes utilizados en la producción de biopéptidos se presentan en las siguientes secciones:

a. Producción de péptidos endógenos

Este tipo de biopéptidos usualmente tienen un origen interno. Son secretados ya sea por rutas particulares por neuronas o a partir de células endocrinas (Sasaki y Minamino, 2013). Se ha elaborado mucha información en la generación de péptidos endógenos que puede ocurrir bajo procesos proteolíticos intrínsecos. Los biopéptidos son considerados como biomarcadores promisorios en los sistemas vivos (células, tejidos y fluidos corporales) particularmente en el reconocimiento de ciertas enfermedades tales como enfermedades

renales, cánceres, enfermedades orales y otros tipos. La identificación y caracterización de los péptidos endógenos ha propuesto muchos desafíos y limitaciones, particularmente en sus comportamientos dinámicos y de eficacia (Saadi *et al.*, 2015).

b. Producción de biopéptidos con fermentación microbiana

La fermentación microbiana de biopéptidos ha generado gran atención de la industria láctea, debido a las actividades proteolíticas de los cultivos iniciadores. Los roles benéficos de los biopéptidos obtenidos a partir de productos lácteos son considerados como prometedores candidatos para la promoción de varias funciones saludables tales como cardíacas, de control del estrés, sistema digestivo, mejora del sistema inmune y reducción del riesgo de obesidad y desarrollo de diabetes tipo II (Zimecki y Kruzel, 2007; citados por Saadi *et al.*, 2015). Algunos de los péptidos liberados tras la acción de los microorganismos durante la fermentación de la leche, pueden ejercer actividad inhibitoria de la ECA - I, por lo que los productos fermentados podrían ser empleados en la prevención y tratamiento de la hipertensión. Sin embargo, los resultados de los estudios difieren de unos autores a otros. Esto puede ser debido a determinados factores que pueden influir de manera importante en el desarrollo de la actividad. Los péptidos procedentes de los procesos fermentativos difieren en función de las propiedades cuali- y cuantitativas de las proteínas lácteas de las distintas especies. Además, la acción de los fermentos es decisiva, por lo que las características del producto final dependerán de la especie y cepa del cultivo iniciador empleada en el proceso de fermentación (Hernández, 2002).

c. Producción de biopéptidos con hidrólisis enzimática

Generalmente, para mejorar y modificar las funciones fisiológicas de las proteínas/péptidos, la hidrólisis enzimática es la mejor técnica y en la mayoría de casos debe ser controlada bajo condiciones operacionales específicas (Saadi *et al.*, 2015). Esta técnica, que se lleva a cabo empleando enzimas originarias de diferentes fuentes tales

como el tracto gastrointestinal, plantas y microorganismos así como fermentación microbiana en múltiples rutas, ha mostrado un impacto significativo en la diversificación biológica de muchos precursores proteicos, lo que a su vez, ha contribuido significativamente a la obtención de fragmentos peptídicos multifuncionales (Korhonen y Pihlanto, 2006).

La hidrólisis enzimática permite la selección de la proteína a hidrolizar, de la enzima específica para llevar a cabo la hidrólisis, así como de las condiciones del proceso (pH, temperatura y tiempo), lo cual optimiza la obtención de péptidos bioactivos. Además, este proceso puede optimizarse aún más mediante técnicas de enriquecimiento de las fracciones y de aislamiento de los péptidos deseados dentro del hidrolizado total, para lo que se utilizan técnicas de precipitación, ultrafiltración y cromatografía (Ruíz, 2013).

Las enzimas pancreáticas, principalmente tripsina, han sido usadas para liberar muchos péptidos bioactivos conocidos de las proteínas de la dieta. Otras enzimas y combinaciones diferentes de enzimas incluyendo alcalasa, quimotripsina, pancreatina y pepsina así como de fuentes bacterianas y fúngicas han sido aplicadas para generar péptidos bioactivos a partir de varias fuentes proteicas (cereales, leguminosas, productos lácteos, cárnicos, etc). Además se pueden liberar péptidos bioactivos por hidrólisis durante la elaboración o el procesamiento de algunos alimentos (quesos y sueros de quesería) o por acción de enzimas proteolíticas nativas (leche) o enzimas bacterianas usadas en la preparación del alimento (Korhonen y Pihlanto, 2006; reportados por Caffini, 2009). Hasta ahora, la hidrólisis enzimática de las moléculas de proteína enteras ha sido la forma más común de producir péptidos bioactivos (Korhonen y Pihlanto, 2006).

El siguiente diagrama (Figura 3) explica el comportamiento degradativo de las enzimas proteolíticas antes y después de la hidrólisis enzimática. Esta figura permite entender el comportamiento de la enzima en la biodegradación proteica y su agregación y ensamble en la superficie lateral del sustrato atacado. Una vez que esas enzimas se someten a condiciones óptimas de pH, temperatura y dosis requerida, su mecanismo de reacción

comienza, ayudándolas a penetrar luego de mayores tiempos de incubación asegurando la mayor actividad enzimática, cuando su endo-acción comienza a ser más marcada (Saadi et al., 2015).

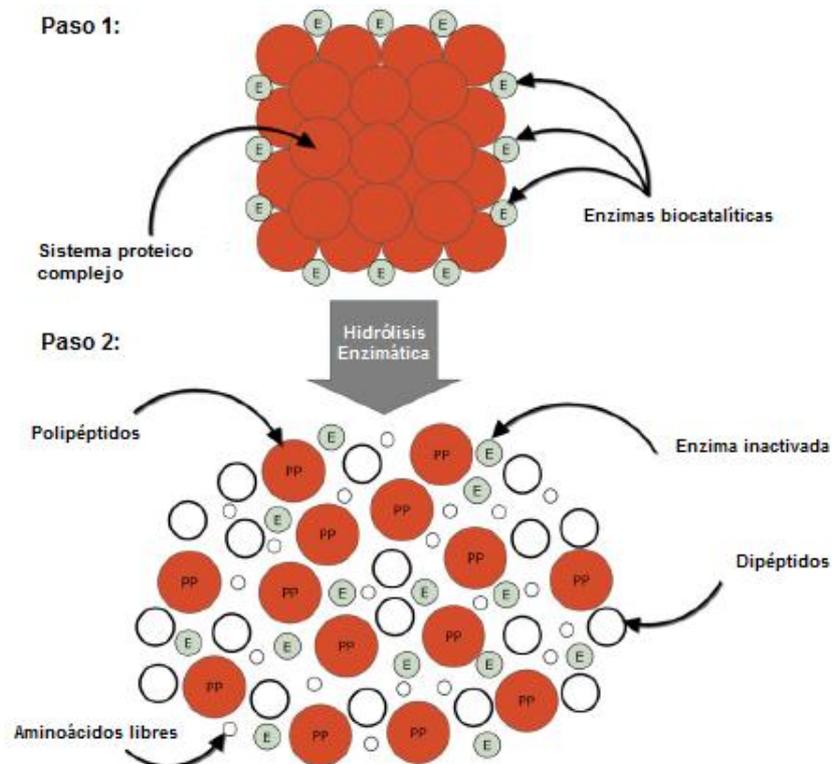


Figura 3: Esquema de la proteína antes (paso 1: las enzimas están en estado activo) y después (paso 2: desactivación de las enzimas luego de la hidrólisis completa) de la hidrólisis enzimática

FUENTE: Saadi *et al.* (2015)

2.2.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

El creciente interés en los péptidos bioactivos ha estimulado la investigación en este campo. Los tópicos en los que se está trabajando activamente incluyen: la obtención de péptidos bioactivos, caracterización funcional y estructural de los péptidos bioactivos (identificación de la bioactividad, determinación de la estructura, relación estructura-función), efectos *in vivo* (evidencia del rol fisiológico, efectos nocivos, tóxicos y

alergénicos) y uso potencial para la promoción de la salud (alimentos funcionales y nutracéuticos) (Caffini, 2009). Un péptido puede poseer más de una función biológica.

También se han encontrado secuencias sobrepuestas de péptidos con diferentes funciones formando parte de la estructura de ciertas proteínas, como las caseínas (Meisel, 1998; citado por Caffini, 2009).

Entre los efectos fisiológicos más conocidos de los péptidos bioactivos se encuentran su capacidad de actuar sobre los sistemas inmune, cardiovascular, endócrino y digestivo. Las actividades que han sido estudiadas comprenden aspectos muy variados, destacándose las siguientes: antitumoral, antimicrobiana, opioide, antihipertensiva, inmunomoduladora, transportadora de calcio, antitrombótica, hipocolesterolémica y antioxidante; es así que actualmente, determinados péptidos son empleados en el tratamiento de enfermedades dentales, de mala absorción de minerales, diarrea, hipertensión, trombosis e inmunodeficiencias (Caffini, 2009). A continuación se detallan las principales actividades de los péptidos bioactivos.

a. Péptidos con capacidad antioxidante

Los radicales libres son unas moléculas que están en continua formación en las células, y son neutralizados de manera natural por las defensas antioxidantes del organismo. El estrés oxidativo se produce como resultado de un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la disponibilidad de compuestos endógenos antioxidantes. Sin embargo, existen factores que producen un desequilibrio en el número de radicales libres, y un exceso de éstos puede dar lugar a un envejecimiento celular o al desarrollo de enfermedades (Bray, 2000; citado por Mulero *et al.*, 2011). El agotamiento de los compuestos antioxidantes endógenos y/o producción excesiva de ROS puede dañar las membranas, proteínas, enzimas y ADN, lo que resulta en el desarrollo de condiciones de enfermedades crónicas (Ray *et al.*, 2012). Los antioxidantes endógenos pueden clasificarse

en antioxidantes primarios y secundarios. La superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatiónperoxidasa son las enzimas antioxidantes que inactivan los ROS en intermediarios. Además de las enzimas antioxidantes, los antioxidantes primarios son hidrosolubles y liposolubles. El ascorbato, glutatión, ácido úrico, etc. son hidrosolubles y los liposolubles son los tocoferoles, ubiquinoles y carotenoides, etc. Las enzimas antioxidantes secundarias son glutatión reductasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glutatión-S-transferasa y la ubiquinona que trabajan directamente para desintoxicar los ROS mediante la disminución del nivel de peróxidos y suministrando continuamente NADPH y glutatión para las enzimas antioxidantes primarias para mantener su correcto funcionamiento. El cobre, hierro, manganeso, zinc, selenio mejoran la actividad antioxidante de las enzimas (Vertuani *et al.*, 2004, citados por Noori, 2012). Los antioxidantes exógenos, en cambio, se derivan principalmente de alimentos y otras fuentes dietéticas. Varias hierbas, especias, vitaminas, alimentos, verduras, etc. exhiben actividades antioxidantes a través de los flavonoides, isoflavonas, flavonas, antocianinas, cumarinas, lignanos, catequinas, isocatequinas, epicatequinas, etc. derivados de ellos. Por lo tanto, los fármacos basados en antioxidantes para el tratamiento de diversas enfermedades patológicas han ganado atracción tanto en áreas clínicas como de investigación (Noori, 2012). En este sentido, los antioxidantes no sólo son importantes en la prevención de la oxidación en los alimentos, sino también a nivel fisiológico. Todo esto ha llevado a la búsqueda de compuestos antioxidantes naturales para la prevención de la oxidación por parte de los radicales libres (Yongvanit *et al.*, 2012).

Los péptidos antioxidantes pueden obtenerse a partir de la digestión de proteínas de origen animal o vegetal, ya sea empleando enzimas endógenas o exógenas, fermentación microbiana, procesamiento y durante la digestión gastrointestinal (Smaranayaka y Li-Chan, 2011). La hidrólisis con enzimas se ha utilizado ampliamente en la producción de péptidos antioxidantes a partir de proteínas alimentarias. Las enzimas comerciales Alcalasa®, Flavourzyme® y Protamex® derivadas de microorganismos, así como la papaína (fuente vegetal) y pepsina-tripsina (fuente animal) se han empleado también en la producción de péptidos antioxidantes (Gallegos-Tintore *et al.*, 2011; Pihlanto, 2006; Sarmadi y Ismail, 2010). En productos alimentarios los péptidos antioxidantes también

pueden producirse por la acción de microorganismos o enzimas proteolíticas endógenas (Samaranayaka y Li-Chan, 2011).

El estudio de los péptidos antioxidantes presentes en alimentos ha sido un reto en los últimos años, habiéndose identificado numerosos péptidos que presentan actividad antioxidante en diferentes alimentos (Gibbs *et al.*, 2004 y Dávalos *et al.*, 2004) y en derivados de ellos, como hidrolizados de gelatina (Kim *et al.* 2001), hidrolizados de clara de huevo (Graszkiewicz *et al.*, 2007) y productos lácteos (Gobetti *et al.*, 2002), entre otros. Estos péptidos actúan impidiendo que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres que con el resto de las moléculas presentes en un determinado microambiente de membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular (Venéreo, 2002).

b. Péptidos con actividad antihipertensiva

La presión arterial es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de los vasos arteriales al ser bombeada por el corazón. Una persona adulta y sana muestra valores de presión o tensión arterial en reposo de 120 mmHg cuando el corazón se contrae (presión sistólica), y de 80 mmHg cuando el corazón se relaja (presión diastólica) (Fernández, 2015). La hipertensión se define como una elevación crónica de la presión arterial sistémica por encima de determinados valores umbral; constituye la causa prevenible más importante de enfermedades cardiovasculares del mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala como prehipertensión, valores hasta 139 mmHg de presión sistólica/89 mmHg de presión diastólica, e hipertensión cuando los valores son iguales o mayores a 140/90 mmHg. Cuanto más alta es la tensión arterial, mayor es el riesgo de daño al corazón y a los vasos sanguíneos de órganos principales como el cerebro y los riñones (OMS, 2015).

La hipertensión es la principal causa de enfermedad no trasmisible en los países industrializados. El 35 por ciento de la mortalidad en estos países se debe a esta enfermedad o a alguna de sus complicaciones renales, cardíacas o cerebrales (Mulero *et al.*; 2011). La presión arterial y homeostasis en los humanos son reguladas por diferentes mecanismos, tales como el reflujo baroreceptor, liberación de aldosterona y el sistema renina-angiotensina (SRA). El reflujo baroreceptor hace referencia a la regulación nerviosa de la presión arterial determinada por la acción de distintos barorreflejos que modifican la hemodinámica cardiovascular y que, en general, actúan en forma de retroalimentación negativa manteniendo estable la presión arterial a través de un mecanismo buffer (Robles *et al.*, 2014). La aldosterona, principal y más potente hormona mineralocorticoide en el ser humano, se sintetiza en la corteza de la glándula adrenal a partir del colesterol y es la responsable fisiológica del balance electrolítico renal. En el individuo sano, la aldosterona mantiene entre sus efectos el óptimo equilibrio que permite mantener saludable el sistema vascular. Sin embargo, cuando este está dañado, los efectos beneficiosos de la aldosterona se pierden y predominan los deletéreos para el sistema vascular, por lo que se producen disfunción orgánica e hipertensión arterial (Abad *et al.*, 2013). Actualmente, el SRA es el objetivo principal de la farmacología para el tratamiento de la hipertensión, en la cual la enzima convertidora de angiotensina (ECA - I) juega un rol importante (Elavarasan *et al.*, 2016). La actividad inhibitoria de la enzima ECA - I es una de las funciones biológicas que puede ejercer efectos protectores hacia el organismo humano, protegiéndolo de varias enfermedades cardiovasculares (Phelan *et al.*, 2009). El funcionamiento del SRA, que se esquematiza en la Figura 4, es el siguiente: cuando la presión arterial disminuye, se libera al torrente sanguíneo la renina, una proteasa sintetizada en el riñón. En los vasos sanguíneos, la renina actúa sobre el angiotensinógeno, péptido de 14 aminoácidos sintetizado en el hígado, liberando un decapeptido inactivo, la angiotensina I (ang - I) de secuencia DNVYIHPFHL. A continuación, se escinde el dipéptido carboxilo terminal His-Leu (C-terminal) de la ang-I por la acción de la ECA - I formándose el potente octapéptido vasopresor angiotensina II (ang - II), DNVYIHPF, que permanece en la sangre hasta ser inactivada por un conjunto de enzimas denominadas angiotensinasas (Carey y Siragy, 2003, reportados por Fernández, 2015).

- **Mecanismo de inhibición de la ECA – I**

Los hidrolizados y péptidos pueden emplear múltiples mecanismos para exhibir sus efectos antihipertensivos. En estudios *in vitro* en células y animales, se ha demostrado que los péptidos alimenticios pueden inhibir el sistema renina endotelina (inhibición de la enzima convertidora de endotelina, responsable de la vasoconstricción), servir como fuentes de arginina para la producción de óxido nítrico (potente vasodilatador) y bloquear los receptores de angiotensina (agentes hipertensivos) y canales de calcio (reduciendo el flujo de Ca^{2+} a las células musculares vasculares y por ende la vasoconstricción) (Udenigwe y Mohan, 2014).

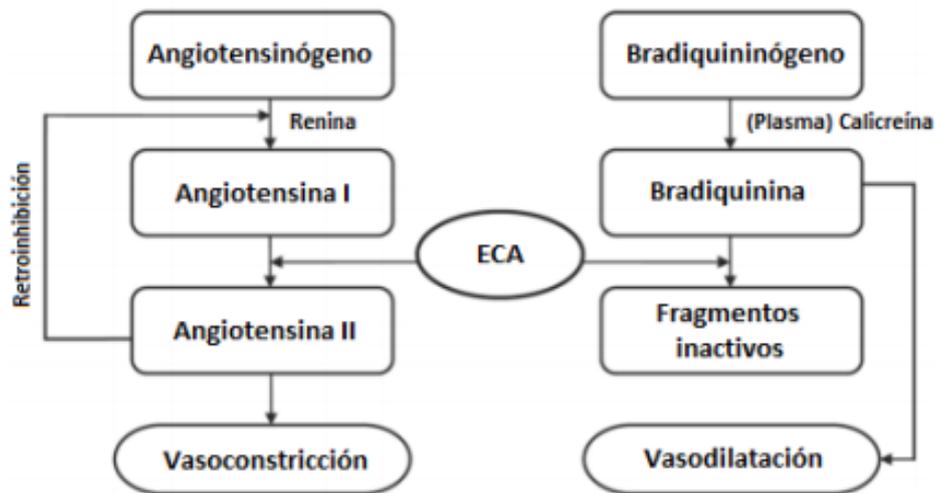


Figura 4: Representación del SRA y del sistema quinina-caliceína donde se observa su interconexión por la acción de la ECA

FUENTE: Fernández (2015)

El mecanismo antihipertensivo más estudiado como actividad de los péptidos bioactivos es la inhibición de la actividad de la ECA - I. La renina por sí misma no tiene una función fisiológica; funciona únicamente como una enzima proteolítica. Su sustrato es una proteína

circulante, el angiotensinógeno, que es producido por el hígado. El angiotensinógeno es escindido por la renina para producir un péptido de 10 aminoácidos, la ang-I, que tampoco tiene función fisiológica conocida y se escinde adicionalmente a un péptido de ocho aminoácidos, la angiotensina II, mediante la ECA encontrada en la superficie de las células endoteliales vasculares. Las células endoteliales pulmonares y renales son sitios importantes para la conversión de la ang - I a la ang – II. La ang - II es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora, estimulando la secreción de aldosterona por las glándulas suprarrenales, hormona que induce la excreción de potasio y la retención de sodio y agua y provoca el incremento del volumen extracelular, y la neutralización de la producción de renina encargada de liberar la ang - I del SRA (Koeppen y Stanton, 2013).

La figura 5 resume los componentes esenciales del SRA. La activación de este sistema resulta en una disminución de la excreción de Na⁺ y agua por los riñones. La ECA - I actúa simultáneamente en el sistema caliceína - cinina catalizando la degradación de las bradiquininas, compuestos de potente acción vasodilatadora que favorecen el incremento de la presión arterial (Mulero *et al.*, 2011).

La ECA - I (peptidil carboxipeptidasa, EC 3.4.15.1) pertenece a la clase de las proteasas que requieren zinc y cloruro para su activación. El sitio activo de la enzima ECA está constituido por tres subsitios (S1, S1', S2') en los cuales se acoplan los tres residuos hidrofóbicos C-terminales de su sustrato, la angiotensina I, donde son luego “cortados” los dos últimos residuos aminoácidos produciendo la angiotensina II. De acuerdo a la evidencia acumulada hasta el momento, los péptidos que muestran actividad inhibitoria de la ECA poseen residuos hidrofóbicos, tales como triptófano (Trp), tirosina (Tyr) o fenilalanina (Phe), en por lo menos una de las tres posiciones C-terminales con los cuales se unen a los sitios activos de la enzima ECA, bloqueando su actividad (Otte *et al.*, 2007; Vinderola *et al.*, 2008, citados por Alvarado, 2012). Se ha observado que secuencias de péptidos de cadena corta que portan residuos de prolina (Pro), en combinación o no con residuos hidrofóbicos, también tienen actividad inhibitoria de la enzima ECA (Murakami *et al.*, 2004). Adicionalmente, la potencia inhibitoria se puede incrementar con la presencia, en esta posición terminal, de las cargas positivas de Lys (grupo ε-amino) y Arg (grupo

guanidino) (Hernández-Ledesma et al., 2008). En general, se reconoce que los péptidos que ofrecen consistentemente una mayor actividad inhibidora de la enzima ECA: a) son de

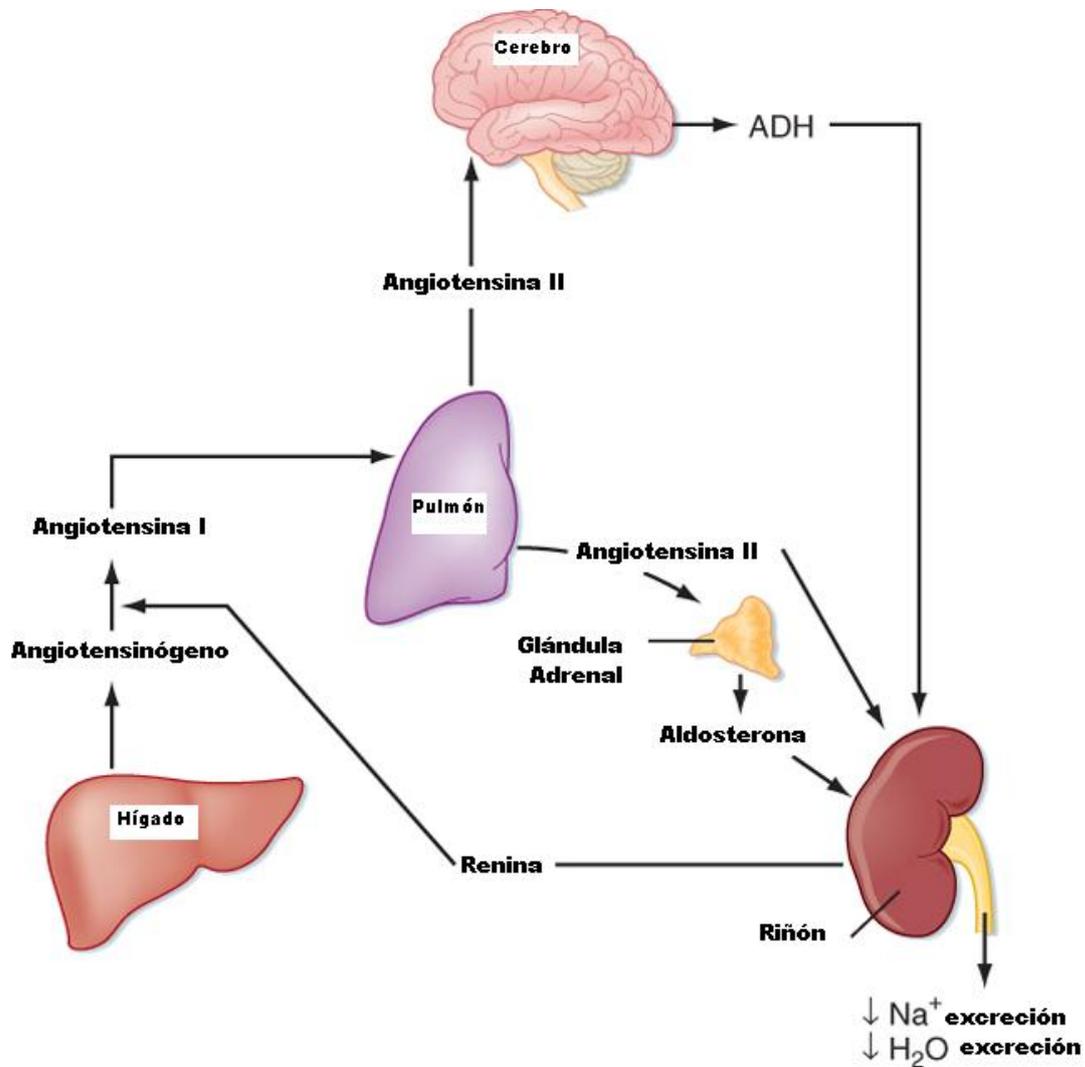


Figura 5: Sistema renina-angiotensina-aldosterona. La activación de este sistema resulta en una disminución de la excreción de Na⁺ y agua por los riñones.

FUENTE: Koeppen y Stanton (2013)

peso molecular menor a 3 kDa; b) de cadena corta, de 3 a 20 residuos de aminoácidos por molécula; y c) frecuentemente portadores de residuos polares como la prolina (Hartmann y Meisel, 2007).

La ECA - I (peptidil carboxipeptidasa, EC 3.4.15.1) pertenece a la clase de las proteasas que requieren zinc y cloruro para su activación. El sitio activo de la enzima ECA está constituido por tres subsitios (S1, S1', S2') en los cuales se acoplan los tres residuos hidrofóbicos C-terminales de su sustrato, la angiotensina I, donde son luego “cortados” los dos últimos residuos aminoácidos produciendo la angiotensina II. De acuerdo a la evidencia acumulada hasta el momento, los péptidos que muestran actividad inhibidora de la ECA poseen residuos hidrofóbicos, tales como triptófano (Trp), tirosina (Tyr) o fenilalanina (Phe), en por lo menos una de las tres posiciones C-terminales con los cuales se unen a los sitios activos de la enzima ECA, bloqueando su actividad (Otte *et al.*, 2007; Vinderola *et al.*, 2008, citados por Alvarado, 2012). Se ha observado que secuencias de péptidos de cadena corta que portan residuos de prolina (Pro), en combinación o no con residuos hidrofóbicos, también tienen actividad inhibidora de la enzima ECA (Murakami *et al.*, 2004). Adicionalmente, la potencia inhibidora se puede incrementar con la presencia, en esta posición terminal, de las cargas positivas de Lys (grupo ϵ -amino) y Arg (grupo guanidino) (Hernández-Ledesma *et al.*, 2008). En general, se reconoce que los péptidos que ofrecen consistentemente una mayor actividad inhibidora de la enzima ECA: a) son de peso molecular menor a 3 kDa; b) de cadena corta, de 3 a 20 residuos de aminoácidos por molécula; y c) frecuentemente portadores de residuos polares como la prolina (Hartmann y Meisel, 2007).

Numerosas proteínas alimenticias tienen secuencias de péptidos con potencial actividad inhibidora de la enzima ECA (Murakami *et al.*, 2004). Tsai *et al.* (2008) señalan que estudios clínicos han demostrado que los inhibidores de la enzima ECA, reducen significativamente la morbilidad y mortalidad de pacientes con problemas cardíacos; indicaron además que se han aislado varios péptidos inhibidores de la enzima ECA a partir de hidrólisis enzimática de proteínas lácteas (tipo Val-Arg-Tyr-Leu) y de la fermentación de la leche con bacterias ácido lácticas (tipo Ile-Pro-Pro y Val-Pro-Pro). En general, la “potencia” de los péptidos inhibidores-ECA va a depender del tipo de enzima y/o bacteria láctica utilizada en la hidrólisis (Pihlanto *et al.*, 2010).

Actualmente el fármaco más empleado para el control de la hipertensión es el captopril, con un valor de IC_{50} (cantidad mínima necesaria para inhibir en un 50% la actividad de la ECA - I) de 0.006 μM ; sin embargo, este fármaco así como el enapril, alecepril, el lisinopril entre otros, pueden causar efectos secundarios como la hipotensión, el incremento de los niveles de potasio y la reducción de la función renal (Fitzgerald *et al.*, 2004). Por ello, algunos trabajos se han centrado en la producción y el aislamiento de péptidos inhibidores de la ECA - I, procedentes de proteínas de diferentes alimentos (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005; Miguel *et al.*, 2005 y Silva-Sánchez *et al.*, 2008). Se ha encontrado que, en productos fermentados, péptidos con actividad inhibitoria de la ECA - I podrían, también, presentar actividad antioxidante, sugiriendo la presencia de actividad multifuncional en estos compuestos (Silva-Sánchez *et al.*, 2008).

c. Péptidos con actividad hipocolesterolémica

Recientemente se ha demostrado que los péptidos de la soja pueden ser responsables, al menos en parte, de su actividad hipocolesterolémica, ya que se ha observado que hidrolizados de proteína de soja mostraron un mayor descenso del colesterol plasmático que la proteína de soja intacta. Además de los péptidos derivados de la soja, otros péptidos bioactivos con efecto hipocolesterolémico han sido obtenidos a partir de B-Lactoglobulina, hidrolizado de proteína de carne de cerdo y proteína vegetal (*Brassica carinata*) (Mulero *et al.*, 2011).

d. Péptidos inmunomoduladores

El mecanismo de acción por medio del cual estas secuencias actúan sobre el sistema inmune no está totalmente explicado. Se sabe que atraviesan el epitelio intestinal y entran a la circulación, o se unen directamente a receptores de la superficie celular intraepitelial específica, lo que desencadena diferentes funciones fisiológicas a través de la señalización celular, al suprimir o estimular ciertas respuestas que involucran tanto al sistema inmune

innato como al adaptativo. El efecto culmina en la regulación de respuestas inmunes específicas (activación y proliferación de linfocitos, síntesis de anticuerpos, expresión de citocinas) y/o inespecíficas (actividad fagocítica de macrófagos, funciones de células granulocíticas y natural killer) (LeBlanc *et al.*, 2002; Danquah y Agyei, 2012; citados por Reyes *et al.*, 2016). En el caso de los péptidos inmunomoduladores, éstos son liberados de las proteínas que los contienen de manera natural durante el proceso de la digestión en el tracto gastrointestinal, lo que afecta a la respuesta inmunológica y a la función celular en el mismo (Mulero *et al.*, 2011).

e. Péptidos con actividad opiácea

Los péptidos con actividad opiácea, también llamados exorfinas, se definen como péptidos que presentan afinidad por receptores opiáceos y actúan, mediante la unión a receptores, como moduladores exógenos de la motilidad intestinal, de la permeabilidad epitelial y de la liberación de hormonas (Mulero *et al.*, 2011). Estos péptidos pueden interactuar con diferentes receptores específicos, y sus efectos fisiológicos dependerán del tipo de receptor al que se unan. Es así que los receptores opioides μ están vinculados al control de la motilidad intestinal y comportamiento emocional; los receptores δ , al control del comportamiento emocional, y los receptores κ están relacionados con la analgesia y la saciedad (Torres-Llana *et al.*, 2005; citados por Caffini, 2009).

2.2.3 DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Las proteínas alimentarias representan una fuente muy importante de péptidos bioactivos que pueden ser liberados por degradación proteolítica tanto *in vivo* como *in vitro*. Durante la digestión gastrointestinal, tanto a nivel de las enzimas gastrointestinales como de las enzimas de la flora intestinal, pueden liberarse péptidos bioactivos a partir de las proteínas de la dieta. Los péptidos bioactivos pueden ser producidos a partir de proteínas precursoras

por hidrólisis enzimática *in vitro* con enzimas digestivas o derivadas de microorganismos o plantas (Caffini, 2009).

En el laboratorio se pueden simular las condiciones de hidrólisis en los distintos compartimentos del tracto gastrointestinal ajustando las variables de temperatura, pH, tiempo de digestión, así como concentración y tipo de proteasas para producir hidrolizados proteicos como los que surgirían en la digestión humana en adultos. La hidrólisis se puede llevar a cabo directamente en una celda de ultrafiltración con agitación a fin de remover, inmediatamente luego de la digestión, los péptidos de bajo peso molecular que se generan (Nass *et al.*, 2008; reportados por Caffini, 2009).

El interés por el estudio de dichos péptidos se ha enfatizado debido a la importancia que tiene el consumo de alimentos en la salud debido a que estudios epidemiológicos han demostrado que existe una buena relación entre la dieta de las personas y la incidencia de enfermedades crónico degenerativas (Dávila *et al.*, 2003; reportados por Segura *et al.*, 2010). Sin embargo, la elevada inestabilidad de los péptidos en el entorno biológico, la rápida eliminación del plasma, pobre transportabilidad a través de las membranas y fácil metabolismo en el tracto gastrointestinal ha limitado su uso terapéutico. Los experimentos *in vivo*, y los ensayos clínicos son necesarios para demostrar los efectos fisiológicos de los péptidos, siendo los estudios *in vitro* una alternativa temprana para evaluar la funcionalidad de los mismos por estar basados en mecanismos biológicos. Sin embargo, es difícil establecer una relación directa entre la actividad biológica *in vitro* y el efecto *in vivo*, jugando un papel importante la biodisponibilidad de los péptidos después de su administración oral (Segura *et al.*, 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

La investigación se realizó en los laboratorios del Área de Biotecnología Industrial del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2 MATERIA PRIMA E INSUMOS

3.2.1 CAÑIHUA

Se utilizó harina desgrasada de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) con un contenido en proteína de 17.6 % en base seca, de la variedad Cupis, provenientes de la estación agronómica experimental INIA (Instituto Nacional de Investigación Agraria) Puno, Perú.

3.2.2 ENZIMAS

- Alcalasa[®] 2.4 L: Es una endoproteasa bacteriana altamente eficaz, desarrollada especialmente para la hidrólisis de todo tipo de proteínas cuya presentación es como líquido claro y translucido, de color marrón rojizo, completamente soluble en agua. Tiene una actividad declarada de 2.4 Unidades Anson por gramo (UA/g) y cumple

con las especificaciones de pureza recomendadas por enzimas grado alimenticio establecidas por la Junta del Comité de expertos de la FAO/OMS JECFA y FCC.

- Flavourzyme® 500 L: Es un complejo proteasa/peptidasa de origen fúngico, desarrollada para la hidrólisis de proteínas bajo condiciones neutras o ligeramente ácidas. La actividad se especifica en unidades Leucina aminopeptidasa por gramo (LAPU/g). Una LAPU es la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ mol de L- leucina p-nitroanilida por minuto. Presenta actividad endoproteasa y exoproteasa, es líquida y cumple con las especificaciones de pureza recomendadas por enzimas grado alimenticio establecidas por la Junta del Comité de expertos de la FAO/OMS.
- Neutrasa® 5.0 BG: Es una proteasa aplicable en la mayoría de los casos en que deba degradarse, de manera moderada o extensa, una sustancia proteica en péptidos. Es un polvo aglomerado de color marrón claro, fácilmente soluble en agua en todas las concentraciones de uso normal. Tiene una actividad declarada de 5.0 Unidades Anson por gramo (UA/g) y cumplen con las especificaciones de pureza recomendadas por enzimas grado alimenticio establecidas por la Junta del Comité de expertos de la FAO/OMS JECFA y FCC.

3.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.3.1 MATERIALES

- Buretas
- Beaker
- Matraz Kitasato
- Matraz Erlenmeyer
- Matraz volumétrico
- Micropipetas de 5-50; 20-200; 100-1000; 1000-5000 μ l
- Papel de filtro Whatman N°1

- Pipetas graduadas
- Placas petri
- Probetas de 5, 10, 20, 50, 100 y 250 ml
- Tamiz de malla N° 28 (500 μm)
- Termómetro 0 – 100 °C
- Tips de micropipetas de 200, 500, 1000 y 5000 μl
- Tubos de centrifuga de 15 y 50 ml (Falcon, USA)
- Tubos ependorf de 1, 1.5 y 2.0 ml (Safeclick, USA)
- Tubos de ensayo de 15x150 y 18x200 mm

3.3.2 EQUIPOS

- Agitador magnético (Cat, Modelo M6, Alemania)
- Agitador Vórtex (VELP Scientific, modelo F202A0175, Europa)
- Balanza analítica (OHAUS, modelo AR2 140, USA)
- Baño María con agitación (GFL, modelo 1083, Alemania).
- Bomba de vacío (Vacuumbrand, modelo ME2C, Alemania)
- Bomba peristáltica (Cole Pamer Instrument Co. Masterflex LIS, USA)
- Centrifuga refrigerada (Hettich, modelo Rotofix 32, Alemania)
- Centrifuga refrigerada (Hettich, modelo Rotina 420, Alemania)
- Congeladora (Electrolux, modelo H300, Brasil)
- Cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC) (Waters Associates, Sistema Acquity UPLC con detector DAD (Waters Associates, modelo 2489, USA)
- Columna Kinetex C₁₈ fase reversa 2.1 x 30 mm (Phenomenex, USA) y Pre columna Acquity 2.1 x 5 mm (Waters Associates, Vanguard, USA)
- Espectrofotómetro UV/Vis (Thermo Scientific, Genesys 10 UV, USA)
- Liofilizador (Labconco, modelo Freezone Benchtop, USA)
- Potenciómetro (0-14) (Thermo Orion, modelo 410, USA)
- Refrigerador (LG, modelo GR-482 BEF, Corea)

3.3.3 REACTIVOS

- Acetonitrilo (Ferment, México)
- Ácido clorhídrico 37% (J.T. Baker, México)
- Ácido hipúrico 98% (Sigma Aldrich, India)
- Ácido picrilsulfónico 5% (Sigma Aldrich, India)
- Ácido trifluoroacético (Merck, Alemania)
- Albúmina de suero bovina (BSA, Sigma Aldrich, USA)
- Carbonato de sodio anhidro (J.T. Baker, USA)
- Cloruro de potasio (J.T. Baker, USA)
- Cloruro de sodio cristal (J.T. Baker, USA)
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma Aldrich, USA)
- Éter de petróleo (J.T. Baker, USA)
- Enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Sigma Aldrich, USA)
- Enzima Alcalasa 2.4L (Novo Nordisk)
- Enzima Neutrasa 4.5 BG (Novo Nordisk)
- Enzima Flavourzyme 500L (Novo Nordisk)
- Enzimas pancreatina (páncreas porcino) y pepsina (mucosa gástrica porcina) (Sigma Aldrich, USA)
- Folin Ciocalteau 2N (Merck, Alemania)
- Fosfato de potasio monobásico (Merck, Alemania)
- Fosfato de sodio monobásico (Merck, Alemania)
- Fosfato de sodio dibásico (Merck, Alemania)
- Hidróxido de sodio en perlas (J.T. Baker, USA)
- N-Hipuril-histidil-leucina hidratada 95% (Sigma Aldrich, India)
- L –leucina 99% (Sigma Aldrich, USA)
- Pancreatina (pancreas porcino) (Sigma Aldrich, USA)
- Pepsina (mucosa gástrica porcina) (Sigma Aldrich, USA)
- Tetraborato de sodio anhidro 99.99% (Sigma Aldrich, USA)
- 2.2' azinobis (3 etil benzotiazoline 6 sulfonato) (ABTS) (Sigma Aldrich, USA)
- 2,4,6- ácido trinitrobencensulfonico (TNBS) (Sigma Aldrich, USA)

3.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.4.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD Y PROTEÍNA TOTAL

- Humedad por el método AOAC (930.15, 2007), que se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa, de la muestra desecada hasta masa constante en estufa al vacío. Los resultados se expresaron en porcentaje.
- Proteína cruda por el método AOAC (920.87, 2007), que se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, formándose sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoníaco, el que se destila recibiendo en ácido sulfúrico donde se forma sulfato de amonio y el exceso de ácido es valorado con hidróxido de sodio en presencia de rojo de metilo. El contenido de nitrógeno total se convirtió a contenido de proteína al multiplicarse por el factor 5.85 empleado en el caso de cereales (Shoenlechner *et al.* 2008). Los resultados se expresaron en porcentaje.

3.4.2 PROTEÍNA SOLUBLE

Se determinó según la metodología propuesta por Lowry *et al.*, (1951), que se basa en que ciertos amonio ácidos como tirosina, triptófano y cisteína reaccionan en un medio-alcalino con ácido fosfotungsténico y ácido molibídico del reactivo de Folin (color amarillo) para dar un complejo incoloro que se puede reducir mediante una reacción lenta con fenol en un complejo de coloración azul detectable por espectrofotometría a 650 nm. La cantidad de proteínas en la muestra se estimó a partir de una curva estándar de una solución proteica

estándar de Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Anexo 1b). Los resultados se expresaron en mg de BSA/ml.

3.4.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Se determinó la capacidad antioxidante utilizando el método de ABTS^{•+} (Torruco-Uco *et al.*, 2009), que se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS^{•+}, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico ABTS^{•+} es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio. La capacidad antioxidante se estimó a partir de una curva estándar empleando Trolox (Anexo 1c). Los resultados se expresaron como μmol Trolox equivalente (TE)/g de muestra.

3.4.4 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

El grado de hidrólisis del hidrolizado (% , GH) se determinó mediante el método de Addler-Nielsen (1979), basado en la determinación de los grupos amino libres con ácido 2.4.6-trinitrobenzenilsulfónico (TNBS). Las aminas primarias, al reaccionar con el TNBS forman un cromógeno que puede ser medido a 340 nm utilizando una curva patrón de L-Leucina (Anexo 1a). Para el cálculo se empleó la siguiente ecuación:

$$GH(\%) = \left(\frac{h}{h_{tot}} \right) * 100$$

Donde: h es el número de enlaces peptídicos separados (en el hidrolizado) y h_{tot} es el total del número de enlaces por unidad de peso (correspondiente a la hidrólisis total de la proteína).

3.4.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA ECA - I E IC₅₀

La actividad inhibitoria ECA-I se midió utilizando la metodología de Wu *et al.* (2002), modificado por Barbana y Boye (2011) donde se determinó la actividad inhibitoria mediante cromatografía líquida de ultra performance (UPLC) en una columna Kinetex® C₁₈ de fase reversa monitoreada a 229 nm, utilizando como sustrato el hipuril-histidil-leucina (HHL) donde se determinó la cantidad de ácido hipúrico. Una solución de buffer borato salino (BBS) conteniendo buffer borato 0.2 M a pH 8.3 con 300 mM de NaCl fue usado para la preparación del sustrato Hipuril-histidil-leucina (HHL) 2.17 mM en un volumen de 10 ml. La enzima ACE que contenía 1 unidad (U) fue disuelta en el BBS y se utilizaron 2 mU (10 µl) de enzima para el procedimiento. El ácido hipúrico (AH) se preparó a partir de una solución madre cuya concentración fue de 10 mM preparada en BBS. Esta solución se usó para la diferenciación de picos cromatográficos entre el AH y HHL, trabajando a concentraciones de 0.15 y 0.54 mM respectivamente. El volumen total de la reacción fue de 70 µl, de los cuales 50 µl estuvieron conformados por 2.17 mM de HHL, 10 µl de 2 mU de ACE y 10 µl de los diferentes hidrolizados (diluídos a concentraciones de 0.1; 0.25; 0.5 y 0.75 mg/ml en BBS). La reacción se llevó a cabo en ependorfs de 250 µl bajo agitación constante durante 30 min a 37°C en baño maría. La reacción se detuvo con la adición de 85 µl de HCl 1N. Las muestras fueron comparadas con un control y un blanco. En el Cuadro 5, se presenta un resumen del procedimiento seguido.

Terminada la reacción, las muestras fueron filtradas (filtro de 0.45 µm) y luego inyectadas (10 µl) al UPLC. La separación en el UPLC se realizó en una columna Kinetex® C₁₈ de 5 µm (4.6 x 150 mm) de Waters, utilizando como fase móvil a dos solventes, el solvente A fue agua con 0.05 por ciento de ácido trifluoroacético (TFA) y el solvente B 0.05 fue acetonitrilo con 0.05 por ciento de TFA. La corrida se realizó a 30°C, bajo un flujo de 0.5mL/min y los resultados fueron monitoreados a 229 nm.

La actividad inhibitoria ECA-I fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad inhibitoria ECA - I (\%)} = [(Ac - As)/(Ac - Ab)] \times 100$$

Donde: Ac es la absorbancia del control, As es la absorbancia de la muestra y Ab es la absorbancia del blanco.

El IC₅₀ se calculó como la concentración de hidrolizado que permite una inhibición del 50 por ciento de la actividad ECA - I expresada en mg proteína/ml. Se utilizó el método de Asoodeh *et al.* (2012). Este valor se determinó mediante un análisis de regresión de la inhibición de ECA-I (porcentaje) frente al logaritmo de la concentración de péptidos (mg proteína/ml).

3.4.6 EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ESTABILIDAD DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS FRENTE A CONDICIONES DE DIGESTIÓN

Se trabajó con el hidrolizado proteico con mayor actividad inhibitoria ECA - I (porcentaje) utilizando un modelo *in vitro*, sometiéndolo a una hidrólisis secuencial con las enzimas digestivas pepsina y pancreatina (mayor detalle en el ítem 3.5.3) para posteriormente determinar sus valores de inhibición ECA - I expresados en porcentaje, calculados según la ecuación indicada previamente (ítem 3.4.5).

3.5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología experimental se dividió en tres etapas que se describen a continuación:

Cuadro 5: Procedimiento para la determinación de la actividad inhibitoria ECA - I

	Blanco (μl)	Control (μl)	Muestra (μl)
ECA	10	-	-
HCl 1 N	85	-	-
HHL	50	50	50
Hidrolizado	10	-	10
BBS	-	10	-
ACE	-	10	10
HCl 1N para la inactivación después de la incubación a 37° C durante 30 minutos.	-	85	85

3.5.1 OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO PROTEICO DE CAÑIHUA

Se obtuvo siguiendo el flujo de operaciones que se muestra en la Figura 6, el cual se detalla a continuación:

- **Acondicionamiento:** Se limpió la cañihua de forma manual retirando impurezas, luego se lavó con agua potable varias veces y se secó en una estufa a 60°C por 6 horas.
- **Molienda y tamizado:** Se molió en un molino para granos manual seguido de un tamizado (0.5 mm).

- Desgrasado: Se mezcló la cañihua con éter de petróleo en una relación 1/10 respectivamente y se llevó a refrigeración (4°C) con agitación lenta y constante por 16 a 24 horas.

- Filtrado: Se filtró al vacío, usando papel whatman N°1

- Secado: Se colocó la torta en la estufa a 45°C hasta evaporar el éter residual, posteriormente se guardó en un congelador. Esta fue la harina desgrasada de cañihua (HDC).

- Se suspendió la harina desgrasada de cañihua en agua destilada (1/40) y se reguló el pH a 9.5 con NaOH 1N, manteniéndose a 32°C con agitación lenta por 10 min

- Se centrifugó a 10°C a 9760 g por 30 min y se recuperó el sobrenadante (S₁). La torta remanente fue sometida nuevamente a un proceso de extracción bajo las condiciones utilizadas previamente. El sobrenadante obtenido (S₂) se mezcló con el sobrenadante de la primera extracción, obteniéndose la mezcla (S₃).

- Se ajustó el pH del sobrenadante (S₃) a 4.8 con HCl 1N, con agitación lenta por 5 min y luego se centrifugó a 5°C a 9760 g por 30 min, procediendo a recuperar el precipitado con agua destilada y se reguló a pH 4.8, seguido de agitación lenta por 5 min. Luego se centrifugó a 5°C a 9760 g por 30 min.

- Se recuperó el precipitado y se resuspendió en agua destilada suficiente para poder ajustar el pH entre 6.8 – 7 con NaOH 0.1 N y se congeló a -20°C para una liofilización posterior.

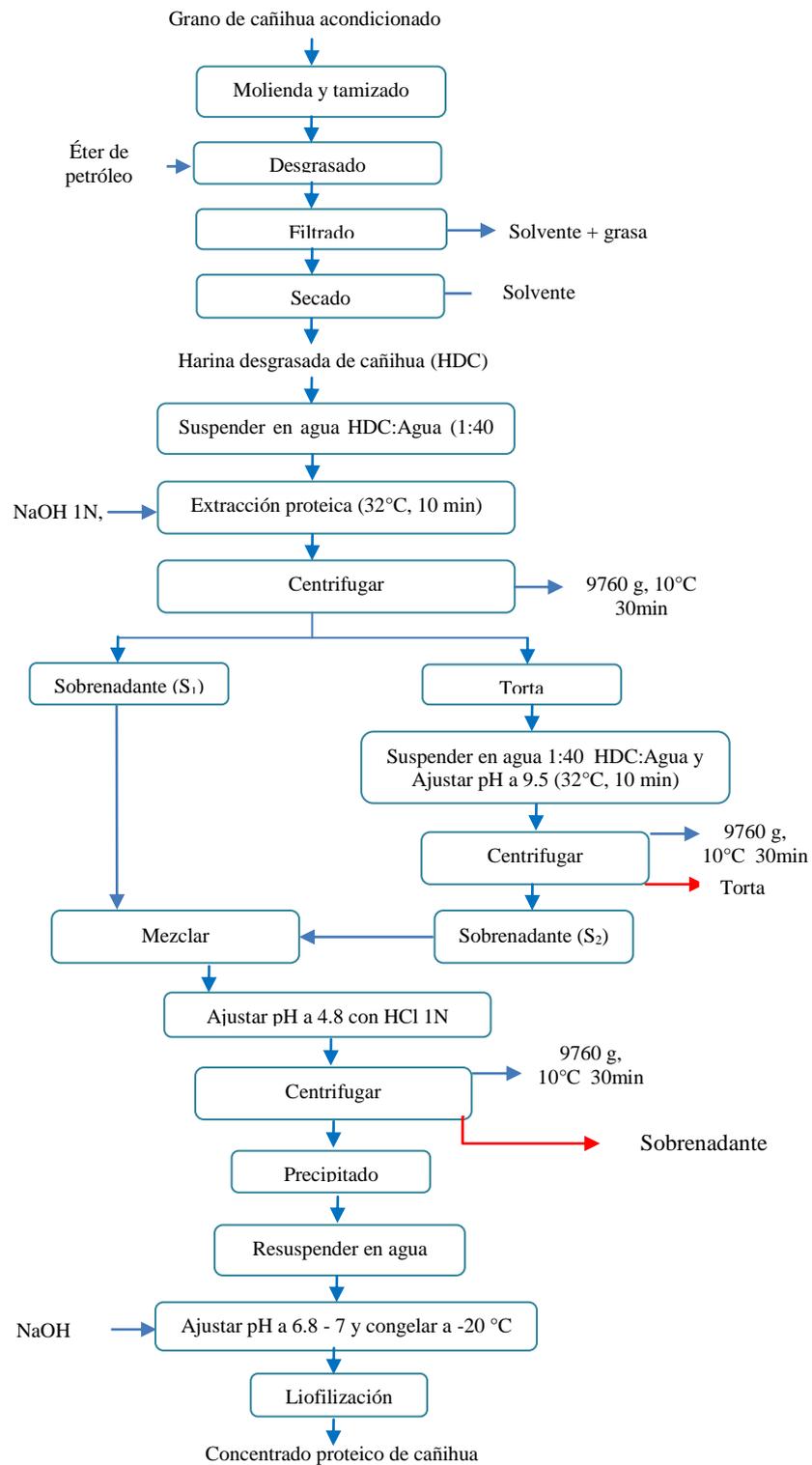


Figura 6: Obtención de concentrado proteico de cañihua

3.5.2 OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS A PARTIR DEL CONCENTRADO PROTEICO CAÑIHUA

Para la hidrólisis del concentrado proteico de cañihua (CPC) se utilizó la metodología de Fritz *et al.* (2011), Torruco-Uco *et al.* (2009) y Li *et al.* (2011) con ligeras modificaciones. La reacción se realizó en una o en dos etapas de acuerdo a lo mostrado en el Cuadro 6, con tres enzimas de grado alimentario cuyos mecanismos de acción son diferentes: a) endopeptidasa alcalina (Alcalasa®), b) Flavourzyme (exo-endo-peptidasa) ®) y c) Neutrasa® (endopeptidasa). Se evaluó la influencia de estas enzimas en la obtención de péptidos. El CPC fue mezclado con buffer borato 0.2 M a pH 8.3 para la Alcalasa® y buffer fosfato 0.2 M a pH 7.0 para Flavourzyme® y Neutrasa®, a la concentración de 2.34% de la relación proteína: buffer (p/v), lo que correspondió a 0.385 unidades Anson (AU) para la Alcalasa y Neutrasa y 50 unidades LAPU para la Flavourzyme.

Todas las reacciones se realizaron a 50 °C bajo agitación constante a 488 g con temperatura controlada; seguidamente la solución enzimática fue agregada, de acuerdo a la concentración que se muestra en el Cuadro 6; a partir de ese momento se tomaron muestras a los 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 y 240 min, las cuales fueron inmediatamente inactivadas a 100 °C por 10 min, para luego ser centrifugadas a 16270 g por 10 min, recuperándose el sobrenadante (conteniendo los péptidos) y conservándose a -20 °C hasta su evaluación. Para las reacciones en dos etapas, la segunda etapa comenzó adicionando la segunda enzima a los 120 min. A cada muestra se le determinó el GH (%), proteína soluble, capacidad antioxidante (ABTS⁺) y actividad antihipertensiva (inhibición de la enzima convertidora de angiotensina ECA - I (%)) y los valores de IC₅₀ (mg/ml). El hidrolizado con mayor valor ECA - I y menor valor de IC₅₀ pasó al proceso de digestión *in vitro*.

Cuadro 6: Formas de reacción de las enzimas, concentración y parámetros

Enzima/reacción	Concentración de enzima	pH inicial y Temperatura
Reacciones en una etapa		
Alcalasa®	0.385 AU ⁽¹⁾ /g de proteína	8.3 y 50 °C
Flavourzyme®	50 LAPU ⁽²⁾ /g de proteína	7.0 y 50 °C
Neutrasa®	0.385 AU/g de proteína	7.0 y 50 °C
Reacciones en dos etapas		
Primera etapa Alcalasa® Segunda etapa Flavourzyme® (Alcalasa y Flavourzyme)	0.385 AU/ g de proteína 50 LAPU/ g de proteína	8.3 y 50 °C 7.0 y 50 °C
Primera etapa Alcalasa® Segunda etapa Neutrasa® (Alcalasa y Neutrasa)	0.385 AU/ g de proteína 0.385 AU/g de proteína	8.3 y 50 °C 7.0 y 50 °C
Primera etapa Neutrasa® Segunda etapa Flavourzyme® (Neutrasa y Flavourzyme)	0.385 AU/g de proteína 50 LAPU/ g de proteína	7.0 y 50 °C 7.0 y 50 °C
Primera etapa Neutrasa® Segunda etapa Alcalasa® (Neutrasa y Alcalasa)	0.385 AU/ g de proteína 0.385 AU/g de proteína	7.0 y 50 °C 8.3 y 50 °C

⁽¹⁾ Unidades Anson (UA)

⁽²⁾ Unidades Leucina aminopeptidasa (LAPU)

3.5.3 EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LOS PÉPTIDOS DURANTE DIGESTIÓN *IN VITRO*

La simulación del tracto gastrointestinal *in vitro* se llevó a cabo usando secuencialmente las enzimas digestivas pepsina – pancreatina tomando como referencia los métodos citados por Tiengo *et al.* (2009), Lin *et al.* (2011), adaptado para la materia prima usada.

El hidrolizado proteico seleccionado fue liofilizado y utilizado para evaluar su estabilidad frente a las enzimas digestivas. Para ello 20 mg del péptido fue disuelto en 5 mL de agua

miliQ; esta solución fue ajustada a pH 2 con HCl 1N e incubada a 37 °C por 10 min , seguidamente se agregó la enzima pepsina en una relación de 0.05 mg/ml y la mezcla fue llevada a agitación por 2 horas a una temperatura de 37°C. Inmediatamente después, el pH fue ajustado a 5.3 con una solución saturada de NaHCO₃ 0.9M y a continuación se reajustó a 7 con NaOH 1N para luego agregar la enzima pancreatina a la solución en una relación 0.05 mg/ml. La mezcla fue incubada a 37°C con agitación durante 4 horas. Para terminar el proceso digestivo in vitro se sumergió la solución en agua a 90°C por 10 minutos para inactivar la enzima. Las soluciones fueron luego centrifugadas y se les determinó la actividad inhibitoria ECA – I e IC₅₀ (ítem 3.4.5).

3.5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) para determinar el grado de significancia entre: grado de hidrólisis (GH), actividad inhibidora de la ECA - I, IC₅₀ y la capacidad antioxidante para cada tiempo (t₀, t₁, t₂, t₃, t₄, t₅, t₆, t₇, y t₈), para cada enzima (Alcalasa®, Flavourzyme® y Neutrasa®) utilizada y combinación de ellas, además del Análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Duncan, a un nivel de significación del 5% por ciento. Para el análisis de los datos se utilizó el software Statgraphics Centurión XV (Statpoint Technologies INC, 2006).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DESGRASADA Y CONCENTRADO PROTEICO DE LA CAÑIHUA

El contenido de proteína de la harina desgrasada y del concentrado proteico de cañihua (CPC) se muestra en el Cuadro 7.

Cuadro 7: Contenido de proteína de la harina desgrasada y del concentrado proteico de cañihua

Producto	Contenido de proteína en base seca (b.s, %)	Rendimiento de proteína (RP) (%)
Harina desgrasada de Cañihua*	17.6	-
Concentrado proteico de Cañihua*	79.38	56.7

(*) Factor de conversión del nitrógeno a proteína 5.85

Se determinó un contenido de proteína cruda para la harina desgrasada de cañihua (HDC) y el CPC de 17.6 g/100 g y 79.38 g/100g, respectivamente. En un estudio previo, Espinoza (2015) trabajó con cañihua de la variedad Cupis rosada y obtuvo 16.85 por ciento de proteína en la HDC y 85.36 por ciento en el CPC. Estas diferencias podrían atribuirse a la diferente procedencia de la materia prima, las condiciones medio ambientales a las que estuvieron sujetas durante su crecimiento, posibles condiciones de stress entre otros (Salazar-Vega *et al.* 2012; reportados por Espinoza, 2015), así como a las condiciones de extracción de la proteína para la obtención del CPC. Aunque en ambos casos se empleó una extracción alcalina seguida de la precipitación isoeléctrica de la proteína, los parámetros óptimos del proceso fueron diferentes.

4.2 GRADO DE HIDRÓLISIS

La evolución de la hidrólisis (GH) de la proteína de la cañihua, obtenida con las enzimas Alcalasa®, Flavourzyme®, Neutrasa® y combinaciones de ellas, se presentan en los Cuadros 8 y 9, respectivamente. De los resultados se observa que el GH depende del tipo de enzima o combinación de enzimas empleada y del tiempo de reacción (Anexos 2 y 3). Para la reacción en una etapa (Cuadro 8) con la Alcalasa, una proteasa de amplio espectro de actividad; así como con la Neutrasa, en los primeros 60 minutos se observa un aumento importante en el GH, después de este tiempo el aumento es lento hasta los 240 minutos. Los menores valores de GH se obtuvieron con la Flavourzyme® para todos los tiempos evaluados, mientras que los valores más altos de GH se obtuvieron empleando la Alcalasa (Anexos 4 y 5).

Cuadro 8: Grado de hidrólisis (%) para cada tiempo de hidrólisis enzimática de la proteína de la cañihua en una etapa

Tiempo de reacción enzimática (min)	(Grado de hidrólisis, %)*		
	Alcalasa 0.385 UA	Neutrasa 0.385 UA	Flavourzyme 50 LAPU
0	0.00 ± 0.00 ⁱ	0.00 ± 0.00 ⁱ	0.00 ± 0.00 ^h
10	12.99 ± 0.51 ^h	12.73 ± 0.11 ^h	2.19 ± 0.05 ^g
20	21.11 ± 0.62 ^g	16.81 ± 0.37 ^g	4.10 ± 0.13 ^f
30	22.65 ± 0.21 ^f	18.85 ± 0.45 ^f	4.56 ± 0.09 ^{ef}
60	24.64 ± 0.43 ^e	22.43 ± 0.43 ^e	4.84 ± 0.30 ^d
90	31.72 ± 0.75 ^d	26.38 ± 0.41 ^d	7.75 ± 0.28 ^c
120	33.46 ± 0.75 ^c	30.34 ± 0.36 ^c	8.14 ± 0.14 ^{bc}
180	36.72 ± 0.29 ^b	31.53 ± 0.37 ^b	8.50 ± 0.24 ^b
240	42.82 ± 0.32 ^a	35.96 ± 0.52 ^a	9.63 ± 0.31 ^a

* Los valores están expresados como promedio ± d.s. (desviación estándar) de tres experimentos independientes. Los valores que presentan diferentes letras indican que existen diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Duncan ($p < 0.05$)

Después de 240 min de reacción con Alcalasa y Neutrasa se alcanzó un 42.82 ± 0.32 y 35.96 ± 0.52 por ciento de hidrólisis, respectivamente; mientras que con Flavourzyme sólo se obtuvo 9.63 ± 0.31 por ciento de hidrólisis. Espinoza (2015) empleando Alcalasa para hidrolizar la proteína de cañihua Cupis rosada, obtuvo a los 180 minutos de hidrólisis 25.2 ± 1.53 por ciento de GH; mientras que en el presente estudio, para el mismo tiempo de hidrólisis se obtuvo 36.7 ± 0.29 por ciento, lo cual se podría atribuir a la distinta procedencia de la materia prima y a las condiciones de obtención del concentrado proteico, además de la distinta concentración de enzima (0.3 UA/g vs 0.385 UA/g empleada en este estudio).

Campos *et al.* (2012) trabajaron en la hidrólisis de la proteína de dos variedades de quinua la Blanca Huallhuas y Pasankalla y después de 240 min de reacción con Alcalasa, Flavourzyme y Neutrasa obtuvieron GH de 36.8 y 41.2; 11.8 y 8.4; y 33.52 y 39.38 por ciento, respectivamente. Por su parte, Velásquez (2016) en la hidrólisis del concentrado proteico de kiwicha, en una etapa de reacción logró un GH de 49.2; 24.3 y 19.6 por ciento a los 240 minutos de reacción con las enzimas Alcalasa, Neutrasa y Flavourzyme, respectivamente. Al comparar los resultados obtenidos con ambos cereales andinos, se puede notar que la tendencia es similar, donde los GH mayores se obtienen con Alcalasa, seguidos de los obtenidos con Neutrasa y Flavourzyme.

Torruco-Uco *et al.* (2009) al evaluar la hidrólisis de la proteína del frijol reportaron valores de GH de hasta 49.48 por ciento a un tiempo de 30 minutos con la Alcalasa. Luna *et al.* (2015), señalan que, en la obtención de péptidos bioactivos a partir de hidrolizados de frijol común, los valores de GH obtenidos son altamente variables, dependiendo de las condiciones de extracción de la proteína, pre-tratamientos, especificidad de la enzima, entre otros. Sin embargo, la Alcalasa presenta mayor probabilidad de generar péptidos (GH de 8 a 35 por ciento). En otro trabajo, Zhao *et al.* (2012) emplearon las proteasas Alcalasa, Tripsina, Neutrasa, Flavourzyme y Protamex para la hidrólisis de la proteína de brotes de arroz observando un rápido aumento del GH hasta los 30 minutos, encontraron que las enzimas más eficientes fueron la Protamex y la Tripsina y la menos eficiente la Flavourzyme alcanzado a los 240 min de reacción valores de GH de 16.89; 15.35 y 2.95 por ciento, respectivamente; mientras que los GH de Alcalasa y Neutrasa fueron 14.51 y 12.56 por ciento, respectivamente para el mismo tiempo. Los autores señalan que las

proteasas alcalinas (Tripsina y Alcalasa) exhiben mayor actividad que las proteasas ácidas o neutras (Protamex, Neutrasa y Flavourzyme), demostrando con ello que, la susceptibilidad de los hidrolizados está relacionada al tipo de enzima utilizado. Es así que, Boboev *et al.* (2012) mencionan que las proteínas alcalo solubles tienen mayor velocidad de hidrólisis enzimática cuando se utiliza una proteasa ácida. Al respecto, Saadi *et al.* (2015) mencionan que el rol de las enzimas hidrolíticas depende de su eficacia, especificidad, y otras propiedades incluyendo el peso molecular, polaridad y carga; cada enzima es responsable de la generación de diferentes fragmentos de péptidos que varían de peso molecular bajo medio y alto, lo que también influiría en sus características de bioactividad. Además, varios estudios examinan la hidrólisis de proteínas ya sea utilizando enzimas individuales o combinadas y que esta última es una estrategia de mucha utilidad en la mejora de la producción de biopéptidos de acuerdo a la especificidad de las enzimas utilizadas, lo cual significa que la combinación de más enzimas tomando en cuenta las condiciones óptimas de cada enzima podría ayudar a generar diferentes fragmentos de biopéptidos teniendo diferentes posiciones de los aminoácidos N-terminales y C-terminales. Alcalasa es una endopeptidasa, que rompe enlaces peptídicos de aminoácidos no terminales, mientras que Flavourzyme es una exopeptidasa que rompe el extremo N-terminal de las cadenas de péptidos; sin embargo la Alcalasa podría incrementar también el número de sitios N-terminales para la acción de una exopeptidasa (Vioque *et al.* 1999, reportados por Ambipaigapalan *et al.* (2015)). Es así que la hidrólisis con Flavourzyme resulta en la liberación de aminoácidos N-terminal de orden secuencial Xaa+, Yaa-, donde Xaa representa el primer aminoácido hidrolizado y es preferiblemente leucina, aunque pueden ser otros, incluyendo prolina pero no arginina o lisina; Yaa representa el segundo aminoácido hidrolizado y puede ser prolina (Hammershøj *et al.*, 2008). Por su parte, la Alcalasa, la cual pertenece a un grupo de serina proteasas que inician el ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico (amida) a través de un residuo de serina en el sitio activo (típicamente Asp-His-Ser) (Montoya *et al.*, 2015).

De acuerdo a lo mencionado, es que en el presente estudio se evaluó la combinación de las enzimas: Neutrasa seguida de la adición de Flavourzyme Alcalasa seguido de la adición de Neutrasa, Neutrasa seguido de la adición de Alcalasa y con Alcalasa seguido de la adición de Flavourzyme. La adición de la segunda enzima (segunda etapa) se realizó a los 120 minutos de iniciada la primera etapa de acción enzimática, ello obedece a que a partir de

este tiempo en adelante la velocidad de reacción (incremento en el GH y CAOX) disminuyó significativamente (Anexos 2 y 3). Para todas las combinaciones de enzimas evaluadas se observa que se produjo un aumento importante en el GH, respecto a las hidrólisis en una etapa (Cuadro 9).

Los GH para las mezclas: Neutrasa/Flavourzyme, Neutrasa/Alcalasa, Alcalasa/Neutrasa y Alcalasa/Flavourzyme a los 240 minutos de reacción produjeron un GH de 40.8 ± 0.26 ; 44.9 ± 0.17 ; 46.8 ± 0.26 , y 60.28 ± 0.56 por ciento, respectivamente; destacando la combinación Alcalasa/Flavourzyme. Valores similares de GH determinaron Campos *et al.* (2012) quienes a los 240 minutos de la hidrólisis de la proteína de las variedades de quinua, blanca Huallhuas y Pasankalla, en dos etapas con las enzimas Alcalasa/Flavourzyme, Flavourzyme/Alcalasa, Alcalasa/Neutrasa y Neutrasa/Alcalasa, obtuvieron GHs de 61.8 y 58.9; 62.6 y 55.23; 49.75 y 44.84; y 47.85 y 42.21 por ciento, respectivamente. Por su parte, Velásquez (2016), determinó en hidrolizados de kiwicha con Alcalasa/Neutrasa; Alcalasa/Flavourzyme y Neutrasa/Flavourzyme, valores de GH de 57.44; 76.32 y 44.82 por ciento, respectivamente a los 240 min de reacción enzimática, indicando que las diferencias en la especificidad entre enzimas son importantes como una guía para la elección de la proteasa de acuerdo con la fuente de proteína a ser hidrolizada.

Ambigaipalan *et al.* (2015) evaluaron la actividad antioxidante y la ECA - I de la semilla de dátil hidrolizada con las enzimas comerciales Alcalasa, Flavourzyme, Termolysina y combinaciones de ellas, determinando que las diferentes combinaciones de enzimas exhibieron casi el mismo grado de hidrólisis (entre 11.29 y 14.02 por ciento) indicando que podría deberse a que cuando se combinan enzimas el pH óptimo para cada enzima también varía y la segunda enzima ataca a los péptidos fraccionados lo que podría afectar el GH, hecho que no se produjo en este estudio ya que, previo a la adición de cada enzima hubo un ajuste del pH a su óptimo dado que durante la reacción enzimática el pH descendió entre 0.3 a 0.5 unidades a los 120 minutos lo que posiblemente disminuyó la velocidad de reacción. Li-Chan (1999; citado por Salwanee *et al.*, 2013) señalan que cuando la enzima se agrega a un sustrato, la enzima será absorbida en las partículas en suspensión, donde la hidrólisis de los enlaces peptídicos susceptibles a la enzima tendrá lugar simultáneamente.

Después de una fase rápida inicial de hidrólisis, la velocidad de hidrólisis tenderá a disminuir, entrando en una fase estacionaria. En este punto, el aumento de la concentración de la enzima utilizada puede no resultar en un mayor grado de hidrólisis ya que la concentración de los enlaces peptídicos disponibles para la hidrólisis pueden convertirse en el factor limitante.

Cuadro 9: Grado de hidrólisis (%) para cada tiempo de hidrólisis enzimática de la proteína de la cañihua en dos etapas

Tiempo de reacción enzimática (min)	Grado de hidrólisis *			
	Neutrasa Flavourzyme 0.385 UA/50 LAPU	Neutrasa Alcalasa 0.385 UA/0.385 UA	Alcalasa Neutrasa 0.385 UA/0.385 UA	Alcalasa Flavourzyme 0.385 UA/50 LAPU
0	0.00 ± 0.00 ⁱ	0.00 ± 0.00 ⁱ	0.00 ± 0.00 ⁱ	0.00 ± 0.00 ⁱ
10	14.54 ± 0.37 ^h	13.83 ± 0.43 ^h	13.26 ± 0.32 ^h	13.97 ± 0.19 ^h
20	19.63 ± 0.74 ^g	17.59 ± 0.26 ^g	21.03 ± 0.5 ^g	20.64 ± 0.17 ^g
30	22.83 ± 0.75 ^f	19.99 ± 0.89 ^f	23.78 ± 0.18 ^f	23.39 ± 0.24 ^f
60	25.70 ± 0.5 ^e	23.58 ± 0.51 ^e	26.87 ± 0.79 ^e	27.07 ± 0.72 ^e
90	28.78 ± 0.39 ^d	28.27 ± 0.64 ^d	28.83 ± 0.38 ^d	28.82 ± 0.61 ^d
120	34.22 ± 0.54 ^c	33.50 ± 0.54 ^c	33.83 ± 0.58 ^c	36.37 ± 0.49 ^c
180	38.86 ± 0.29 ^b	42.19 ± 0.33 ^b	39.67 ± 0.4 ^b	46.62 ± 0.4 ^b
240	40.85 ± 0.26 ^a	44.932 ± 0.18 ^a	46.756 ± 0.47 ^a	60.28 ± 0.56 ^a

* Los valores están expresados como promedio ± d.s. (desviación estándar) de tres experimentos independientes. Los valores que presentan diferentes letras indican que existen diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Duncan ($p < 0.05$)

Como señalan Segura *et al.* (2012), la producción de hidrolizados extensivos (ej. > 50% GH) requiere el uso de más de una proteasa debido a que una sola enzima no logra obtener tales GHs en un período de tiempo razonable, es así que cuando emplearon un sistema secuencial con Alcalasa y Flavourzyme para hidrolizar proteína de chía, obtuvieron un GH de 43.8 por ciento a los 150 minutos; señalando que el fraccionamiento de los enlaces peptídicos por la endopeptidasa incrementa el número de sitios terminales de los péptidos

expuestos a la acción de la exoproteasa por lo cual la hidrólisis es más eficiente cuando se usa Flavourzyme en segunda instancia; tal como se evidenció en este trabajo ya que con las combinaciones donde se empleó Flavourzyme en la segunda etapa, se obtuvieron los mayores GH.

4.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los resultados de la capacidad antioxidante (CAOX) determinada por el método ABTS⁺ para los tratamientos enzimáticos de la proteína de la cañihua en una y dos etapas se muestran en los Cuadros 10 y 11, respectivamente. De acuerdo a los resultados encontrados, se observa que la CAOX aumenta con el incremento del tiempo de hidrólisis (y el GH), siendo este valor mayor en las reacciones enzimáticas en dos etapas. Dong y Hyung (2015) indican que el radical ABTS⁺, al ser hidrosoluble, podría alcanzar rápidamente péptidos en la solución acuosa y, por lo tanto, reaccionar efectivamente con los péptidos en el hidrolizado proteico. También, Nollet y Toldrá (2012) señalan que el ensayo puede medir la capacidad antioxidante de compuestos hidrofílicos y lipofílicos, debido a que el radical ABTS⁺ puede solubilizarse en medio acuosos y orgánicos y no se ve afectado por la fuerza iónica; sin embargo tiene como limitante que evalúa la capacidad de la muestra de reaccionar con el radical ABTS⁺ en lugar de inhibir el proceso oxidativo, además que este compuesto no es similar a los radicales encontrados en sistemas biológicos.

En la hidrólisis en una etapa (Cuadro 10), con Alcalasa y Neutrasa se obtuvieron valores de CAOX a los 240 min de 3.22 ± 0.04 y 1.94 ± 0.01 μmol de TE/mg de proteína, respectivamente (para GH de 42.82 y 35.96 por ciento); mientras que con la reacción de Flavourzyme en una etapa (GH 9.63 por ciento) se obtuvo el valor más bajo (1.20 ± 0.01 μmol de TE/mg de proteína). Espinoza (2015) determinó en hidrolizados proteicos de cañihua una capacidad antioxidante de 1.47 μmol de TE/mg de proteína a los 180 minutos de hidrólisis con Alcalasa (GH 25.2 por ciento). En este estudio, para un GH similar (a los 60 min) se obtuvo 2.03 μmol de TE/mg de proteína; sin embargo, también se evidenció un incremento de esta propiedad con el progreso de la reacción enzimática.

Resultados similares obtuvieron He *et al.* (2013) en hidrolizados purificados de proteína de colza, donde los hidrolizados con Alcalasa tuvieron mayor capacidad antioxidante (alrededor de 2.5 μmol de TE/mg de proteína) en comparación a los obtenidos con Proteinasa K, Pepsina+Pancreatina, Termolysina y Flavourzyme. Memarpoor *et al.* (2012) determinaron valores de capacidad antioxidante ABTS de 1.91 ± 0.13 ; 2.57 ± 0.19 y 2.82 ± 0.14 μmol de TE/mg proteína (en el tiempo de 240 minutos) para hidrolizados de lisozima de clara de huevo con tripsina, papaína y tripsina – papaína, respectivamente. Para la misma materia prima, Jovanovic *et al.* (2016) por su parte, prepararon hidrolizados con Alcalasa 2.4 L, sometidas a pre tratamientos con calor (75°C por 30 min) y ultrasonido (40 Hz por 15 min), obteniendo con los últimos los valores más altos de capacidad antioxidante DPPH y ABTS⁺ (28.10 ± 1.38 y 79.44 ± 2.31 %, respectivamente).

Cuadro 10: Capacidad antioxidante ABTS⁺ durante la hidrólisis enzimática de la proteína de la cañihua en una etapa

Tiempo de reacción enzimática (min)	Capacidad antioxidante (μmol TE/mg proteína)*		
	Alcalasa 0.385 UA	Neutrasa 0.385 UA	Flavourzyme 50 LAPU
0	0.64 ± 0.02^h	0.53 ± 0.02^g	0.09 ± 0.00^h
10	1.65 ± 0.06^g	1.14 ± 0.01^f	0.22 ± 0.01^g
20	1.73 ± 0.05^f	1.27 ± 0.03^e	0.41 ± 0.01^f
30	1.89 ± 0.02^e	1.51 ± 0.01^d	0.44 ± 0.01^f
60	2.03 ± 0.06^d	1.65 ± 0.03^c	0.69 ± 0.01^e
90	2.40 ± 0.03^c	1.71 ± 0.02^b	1.00 ± 0.02^d
120	2.87 ± 0.08^b	1.88 ± 0.02^a	1.05 ± 0.02^c
180	2.95 ± 0.07^b	1.92 ± 0.01^a	1.11 ± 0.02^b
240	3.22 ± 0.04^a	1.94 ± 0.01^a	1.20 ± 0.01^a

* Los valores están expresados como promedio \pm d.s. (desviación estándar) de tres experimentos independientes. Los valores que presentan diferentes letras indican que existen diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Duncan ($p < 0.05$)

Respecto a la hidrólisis en dos etapas (Cuadro 11), los valores más altos de CAOX ABTS⁺ (a los 240 min de hidrólisis enzimática) se obtuvieron con las mezclas Alcalasa/Flavourzyme y Alcalasa/Neutrasa siendo 3.50 ± 0.06 y 3.13 ± 0.06 μmol de TE/mg de proteína, respectivamente. Estos resultados son correspondientes a los obtenidos por Campos *et al.* (2012) quienes reportaron en hidrolizados de quinua, una mayor CAOX ABTS⁺ con la mezcla Alcalasa/Flavourzyme (2.31 ± 0.08 μmol de TE/mg de proteína) al tiempo de 240 min (GH de 61.8 y 58.9 para las variedades de quinua Huallhuas y Pasankalla). Por su parte, Velásquez (2016), en las reacciones conducidas en una etapa de hidrólisis de kiwicha, obtuvo el valor máximo de CAOX ABTS⁺ de 1.71 μmol TE/mg de proteína, obtenido con la Alcalasa a los 240 min (GH 49.2 por ciento); mientras que para las hidrólisis conducidas en dos etapas logró alcanzar como máximo valor de CAOX ABTS⁺ el de 2.15 μmol TE/mg de proteína, para la combinación Alcalasa-Flavourzyme, a los 240 minutos (GH 76.32 por ciento).

Cian *et al.* (2015), indican que, para el caso de la proteína del gluten, los componentes del medio y la hidrofobicidad de sus hidrolizados son responsables primarios de la actividad antiradical ABTS⁺, reportándose que esta propiedad depende de la presencia de aminoácidos hidrofóbicos. Por su parte, Kitts y Weiler (2003, reportados por Luna *et al.* 2015) señalan que los péptidos son capaces de actuar sinérgicamente con antioxidantes no peptídicos incrementando de esta forma su efecto protector.

Jae *et al.* (2009) encontraron que en los hidrolizados sujetos a dos etapas, se obtuvieron péptidos con mayor poder antioxidante respecto a los de una etapa, señalando que muchos estudios han mostrado que el tiempo de hidrólisis y la especificidad de las enzimas pueden afectar la actividad antioxidante de los hidrolizados. Chang *et al.* (2007) citados por Jae *et al.* (2009) indican que los hidrolizados de bajo peso molecular (1-3 kDa) tienen mayor capacidad antioxidante que los hidrolizados con mayor peso molecular. Una tendencia similar ha sido reportada por Campos *et al.* (2012) en hidrolizados de quinua.

Por su parte, Luna *et al.* (2015) determinaron en hidrolizados de frijol con Alcalasa (GH 12 por ciento), Alcalasa/Flavourzyme (GH 32 por ciento) y Pepsina/Pancreatina (GH 43 por ciento), valores de CAOX ABTS⁺ entre 2.83; 6.4 y 8.1 mM TE/mg de proteína, respectivamente. Por otro lado, Ambigaipalan *et al.* (2015) determinaron que para un grado de hidrólisis similar obtenido en la proteína de semilla de dátil (entre 11 a 13 por ciento), los hidrolizados preparados utilizando Alcalasa tuvieron la menor actividad ABTS con un valor de 0.46 ± 0.00 μmol de TE/mg de proteína, mientras que los hidrolizados con las combinaciones de enzimas Alcalasa/Flavourzyme y Alcalasa/Flavourzyme/Termolysina mostraron los mayores valores con 0.80 ± 0.01 y 0.82 ± 0.01 μmol de TE/mg de proteína, respectivamente; valores inferiores a los obtenidos en este estudio. Estas variaciones pueden deberse a que la CAOX de los hidrolizados proteicos depende de las proteasas y las condiciones de hidrólisis empleadas, donde cambios de tamaño, nivel y composición de los aminoácidos libres y pequeños péptidos afectan la capacidad antioxidante, tal como señalan Dong y Hyung (2015).

Singh (2016) menciona que la presencia de una gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos, es una característica típica de los péptidos inhibidores de la ECA - I y de los péptidos antioxidantes. Borja (2014) señala también que las propiedades antioxidantes de los péptidos están más relacionadas con su composición, estructura e hidrofobicidad, donde la Tyr, Trp, Met, Lys, Cys, son ejemplos de aminoácidos que causan la actividad antioxidante. Por otra parte, Yu *et al.* (2013) señalan que los aminoácidos aromáticos como tirosina y fenilalanina pueden considerarse atrapadores de radicales directos, mientras que la fenilalanina juega un rol importante debido a su donación de protones y estabilidad. Al respecto, Nollet y Toldrá (2015) señalan que comúnmente, los péptidos antioxidantes contienen aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) en adición a otros aminoácidos tales como metionina, lisina, cisteína e histidina. Los aminoácidos con residuos aromáticos pueden donar protones de electrones a los radicales deficientes. Esta propiedad mejora las propiedades captadoras de radicales de los residuos de aminoácidos (Borja, 2014).

Zhuang *et al.* (2013) evaluaron la capacidad antioxidante de los péptidos de gluten de maíz encontrando la presencia de leucina en todas las secuencias peptídicas, mostrando un papel importante atribuido a su larga cadena alifática lateral que es capaz de interactuar con las cadenas acílicas de los ácidos grasos susceptibles. Por su parte, Kim *et al.* (2007) extrajeron péptidos bioactivos (Glu-Ser-Thr-Val-Pro-Glu-Arg-Thr-His-Pro-Ala-Cys-Pro-Asp-Phe-Asn) con actividad antioxidante a partir del hidrolizado de proteínas de residuos de Hoki (*Johnius belengerii*) después de someterlo a ultrafiltración por membranas y métodos cromatográficos consecutivos llegando a tener una masa molecular menor a 1.8 kDa. Se propone que la actividad antioxidante de péptidos que contienen His está en relación con el donante de hidrógeno, captura de radicales peroxilo de lípidos y/o con la capacidad quelante de iones metales del grupo imidazol. Asimismo, el grupo SH de la cisteína tiene una acción antioxidante independientemente crucial debido a su interacción directa con los radicales (Borja, 2014).

Cuadro 11: Capacidad antioxidante ABTS⁺ durante la hidrólisis enzimática de la proteína de la cañihua en dos etapas

Tiempo de reacción enzimática (min)	Capacidad antioxidante (µmol TE/mg proteína) *			
	Neutrasa Flavourzyme	Neutrasa Alcalasa	Alcalasa Neutrasa	Alcalasa Flavourzyme
	0.385 UA/50 LAPU	0.385 UA/0.385 UA	0.385 UA/0.385 UA	0.385 UA/50 LAPU
0	0.61 ± 0.02 ^g	0.58 ± 0.02 ⁱ	0.64 ± 0.01 ⁱ	0.65 ± 0.02 ^h
10	1.19 ± 0.02 ^f	1.18 ± 0.02 ^h	1.61 ± 0.04 ^h	1.69 ± 0.03 ^g
20	1.23 ± 0.03 ^f	1.31 ± 0.02 ^g	1.76 ± 0.04 ^g	1.82 ± 0.06 ^f
30	1.56 ± 0.02 ^c	1.49 ± 0.02 ^f	1.92 ± 0.04 ^f	1.94 ± 0.03 ^e
60	1.64 ± 0.01 ^d	1.61 ± 0.02 ^e	2.12 ± 0.02 ^e	2.04 ± 0.02 ^e
90	1.78 ± 0.03 ^c	1.73 ± 0.02 ^d	2.24 ± 0.03 ^d	2.23 ± 0.05 ^d
120	1.87 ± 0.01 ^b	1.95 ± 0.02 ^c	2.40 ± 0.04 ^c	2.36 ± 0.03 ^c
180	1.98 ± 0.02 ^a	2.12 ± 0.03 ^b	2.77 ± 0.05 ^b	3.13 ± 0.05 ^b
240	2.01 ± 0.02 ^a	2.46 ± 0.05 ^a	3.13 ± 0.06 ^a	3.50 ± 0.06 ^a

* Los valores están expresados como promedio ± d.s. (desviación estándar) de tres experimentos independientes. Los valores que presentan diferentes letras indican que existen diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Duncan ($p < 0.05$)

Se estableció la correlación entre el GH y CAOX ABTS⁺ para todos los tratamientos enzimáticos estudiados. Los resultados muestran una relación lineal entre el GH y CAOX ABTS⁺ (Figura7), con coeficientes de regresión R² en el rango entre 0.96 a 0.99 excepto para el caso del tratamiento con Neutrasa (R² = 0.866, correlación moderada) donde la capacidad antioxidante tiende a estabilizarse cuando el GH supera el 20 por ciento. Chabeaud *et al.* (2009), citados por Cirillo y Iemma (2012) señalaron la importancia de las condiciones de trabajo de la enzima (pH y temperatura) para obtener hidrolizados antioxidantes del músculo del carbonero (*P. viridens*) con Alcalasa, no encontrando relación entre la actividad antioxidante y el grado de hidrólisis, indicando la importancia de las características de los péptidos (composición y secuencia de aminoácidos en la capacidad antioxidante, la cual no se puede atribuir a una fracción de peso molecular específico. Sin embargo, otros estudios reportan una relación lineal entre el GH y la actividad antioxidante (peroxidación del ácido linoleico y la captura de radicales hidroxilo) (Cirillo y Iemma, 2012). También Liu *et al.* (2010, reportados por Ling *et al.* 2013) señalan que el GH está relacionado con la actividad antioxidante para la mayoría de hidrolizados proteicos. Altos valores de GH pueden estar asociados a la producción de cadenas más pequeñas o cortas y por lo tanto mayor capacidad antioxidante. Péptidos antioxidantes son aquellos péptidos, de 4 a 20 kDa, que tienen la habilidad de inhibir los daños causados por la oxidación lipídica. Esta habilidad parece estar relacionada con la presencia de ciertos residuos de aminoácidos, tales como tirosina, metionina, histidina, lisina y triptófano, los cuales pueden quelar iones metálicos pro-oxidantes, capturar radicales libres y/o extinguir el oxígeno reactivo (Erdmann *et al.*, 2008, citados por Alvarado, 2012).

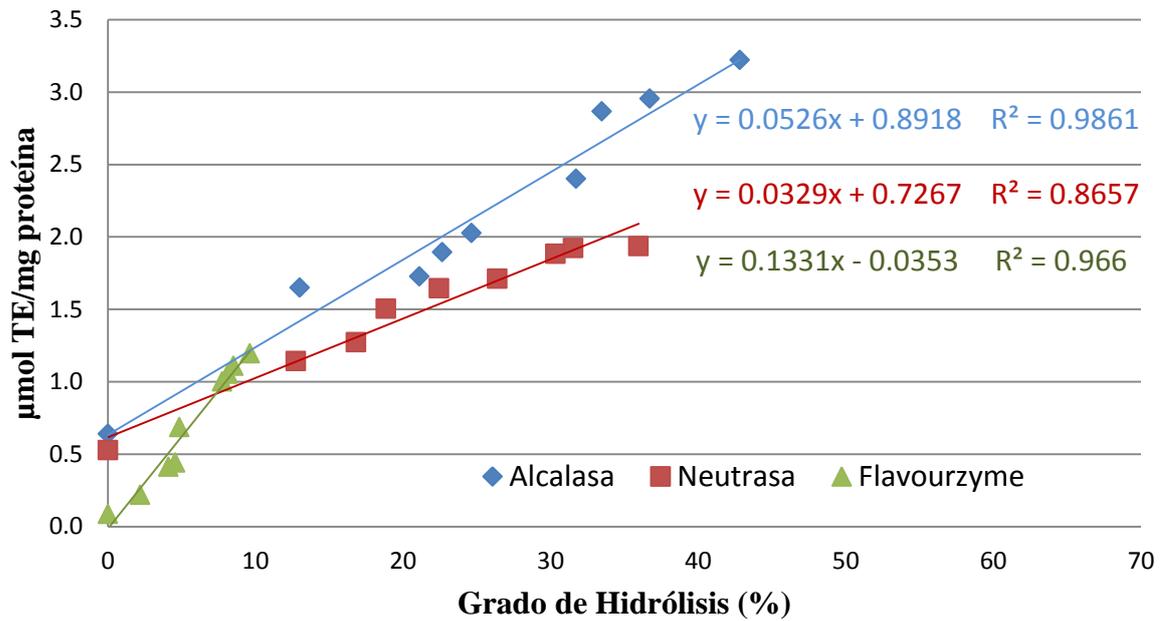
Yang *et al.* (2011) sugieren que la estructura estérica y el peso molecular de los péptidos juegan un papel importante en la actividad antiradical de los aminoácidos. Según su modo de acción, el hidrolizado proteico antioxidante puede actuar como antioxidante que interfiere con la cadena de reacción o como antioxidante preventivo. Generalmente los antioxidantes preventivos inhiben o reducen la velocidad de reacción de cadena de los radicales libres, mientras que los del segundo tipo, interfieren con la cadena de propagación de los radicales libres, por lo cual los hidrolizados con mayor GH pueden considerarse como antioxidantes potenciales con la habilidad de inhibir radicales libres en

su ambiente (Ling *et al.* 2013). De otro lado, Segura *et al.* (2013) no encontraron relación entre la capacidad antioxidante y los hidrolizados con la mayor actividad inhibitoria ACE, lo que sugiere que la actividad antioxidante de los péptidos puede depender de las proteasas utilizadas para su producción; el GH logrado, la naturaleza de los péptidos liberados (peso molecular, composición y secuencia de aminoácidos) así como de los efectos combinados de sus propiedades (por ejemplo la capacidad de localización de radicales libres, quelación de iones metálicos y/o donación de electrones); aunque el tamaño del péptido también puede jugar un rol importante dado que los péptidos antihipertensivos son cortos, con sólo dos a nueve aminoácidos, mientras que los péptidos antioxidantes contienen de tres a dieciséis residuos de aminoácidos (Kitts y Weiler, 2003, reportados por Segura *et al.* 2013).

4.4 INHIBICIÓN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA I (ECA - I)

Con la inhibición de la actividad ECA – I se reduciría la formación de angiotensina II (vasoconstrictor) y la degradación de la bradiquinina (vasodilatador), lo que puede contribuir a la reducción de la presión arterial (He *et al.* 2013). En este sentido, se consideró necesario buscar la actividad inhibidora de ECA de la proteína hidrolizada de la cañihua a diferentes tiempos de los tratamientos enzimáticos. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la ECA (a la concentración de proteína 0.5 mg/ml). En el Cuadro 12 (Anexo 6a) se observa que el porcentaje de inhibición aumenta con el incremento del GH. En las reacciones en una etapa a los 240 min de hidrólisis se alcanzaron los mayores valores de inhibición de la ECA, es así que con Alcalasa y Neutrasa se obtuvieron un 62.98 ± 1.07 y 64.37 ± 1.28 por ciento, respectivamente; sin embargo, en las reacciones en dos etapas, los mayores porcentajes de inhibición ECA - I se dieron a los 180 min de hidrólisis, obteniéndose 69.15 ± 1.23 ; 69.13 ± 0.02 ; 56.99 ± 1.52 y 47.38 ± 0.07 por ciento para los tratamientos enzimáticos Neutrasa/Alcalasa; Alcalasa/Neutrasa; Alcalasa /Flavourzyme y Neutrasa/Flavourzyme, respectivamente. Del mismo modo, Velázquez (2016) en hidrolizados de kiwicha con Alcalasa, Neutrasa y Flavourzyme determinó las mayores actividades inhibitorias ECA - I con Alcalasa y Neutrasa de 64.37 y 58.89 por ciento a los 90 min de reacción; mientras que

a



b

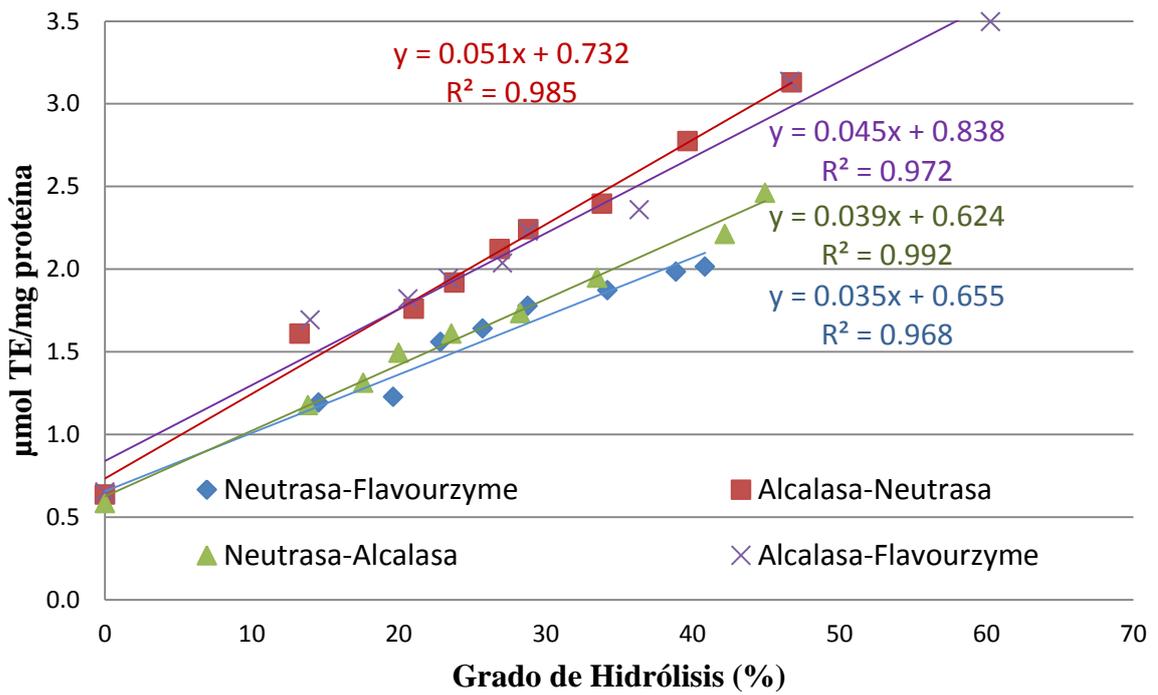


Figura 1: Correlación entre el grado de hidrólisis y la capacidad antioxidante ABTS⁺ de la proteína de cañihua obtenida mediante diferentes tratamientos enzimáticos

con Flavourzyme se alcanzó a los 240 min con 19.41 por ciento. En las reacciones en dos etapas; sin embargo, las reacciones Alcalasa-Neutrasa y Alcalasa-Flavourzyme y Neutrasa-Flavourzyme tuvieron porcentajes de inhibición de 72.83 (240 min); 56.89 (120 min) y 58.89 (90 min), respectivamente.

He *et al.* (2013) evaluaron la inhibición de la actividad ECA-I de hidrolizados de colza usando varias enzimas (Termolysina, Proteinasa K, Alcalasa, Pepsina+Pancreatina y Flavourzyme, E/S: 4/100) encontrando a los 240 minutos, mayor porcentaje de inhibición de la ECA - I con Proteinasa K y Termolysina (entre 75 a 85 por ciento) debiéndose ello a la acción de péptidos con peso molecular entre 5 a 10 kDa; sin embargo en la evaluación en sistemas *in vivo* con ratas hipertensas, fue con la Alcalasa donde se obtuvo una mayor reducción de la presión sanguínea.

En otro estudio, Ambipaigapalan *et al.* (2015) en hidrolizados proteicos de semilla de dátil (hidrólisis de 60 a 180 min a 50°C) encontraron que, los hidrolizados utilizando Alcalasa tuvieron la mayor actividad ECA - I (31.7 ± 2.4 %) a 0.5 mg de proteína/ml. Siow y Gan (2013) en hidrolizados de semillas de frijol *Parkia speciosa* con Alcalasa (tiempos de hidrólisis de 120 a 300 min a 50 °C) obtuvieron valores de inhibición ECA - I en el rango de 50.6 a 80.2 % (E/S: 2/100), mientras que las muestras no hidrolizadas no mostraron ninguna actividad inhibitoria ECA - I.

De otro lado, aunque los mayores GH se obtuvieron con la combinación Alcalasa/Flavourzyme (Cuadro 9), el mayor porcentaje de inhibición de la actividad ECA - I se logró con la combinación Neutrasa/Alcalasa a los 180 minutos de hidrólisis (69.15 ± 1.23 por ciento), lo que evidencia que no existe necesariamente una relación directa entre el GH y la inhibición de la actividad de la ECA - I. Resultados similares obtuvieron Campos *et al.* (2012) en hidrolizados de quinua y Velásquez (2016) en hidrolizados de kiwicha, donde no hubo correspondencia entre el GH con la actividad inhibitoria ECA - I. Por su parte, Wu *et al.* (2016) en hidrolizados de proteína de sorgo dulce con Alcalasa reportaron que un incremento en el GH de 19 a 22 por ciento no mostró un incremento

etapas; sin embargo, las reacciones Alcalasa-Neutrasa y Alcalasa-Flavourzyme y Neutrasa-Flavourzyme tuvieron porcentajes de inhibición de 72.83 (240 min); 56.89 (120 min) y 58.89 (90 min), respectivamente.

He *et al.* (2013) evaluaron la inhibición de la actividad ECA-I de hidrolizados de colza usando varias enzimas (Termolysina, Proteinasa K, Alcalasa, Pepsina+Pancreatina y Flavourzyme, E/S: 4/100) encontrando a los 240 minutos, mayor porcentaje de inhibición de la ECA - I con Proteinasa K y Termolysina (entre 75 a 85 por ciento) debiéndose ello a la acción de péptidos con peso molecular entre 5 a 10 kDa; sin embargo en la evaluación en sistemas *in vivo* con ratas hipertensas, fue con la Alcalasa donde se obtuvo una mayor reducción de la presión sanguínea.

En otro estudio, Ambipaigapalan *et al.* (2015) en hidrolizados proteicos de semilla de dátil (60 a 180 min a 50°C) encontraron que, los hidrolizados utilizando Alcalasa tuvieron la mayor actividad ECA-I (31.7 ± 2.4 %) a 0.5 mg de proteína/ml. Siow y Gan (2013) en hidrolizados de semillas de frijol *Parkia speciosa* con Alcalasa (tiempos de hidrólisis de 120 a 300 min a 50 °C) obtuvieron valores de inhibición ECA - I en el rango de 50.6 a 80.2 % (E/S: 2/100), mientras que las muestras no hidrolizadas no mostraron ninguna actividad inhibitoria ECA - I.

De otro lado, aunque los mayores GH se obtuvieron con la combinación Alcalasa/Flavourzyme (Cuadro 9), el mayor porcentaje de inhibición de la actividad ECA - I se logró con la combinación Neutrasa/Alcalasa a los 180 minutos de hidrólisis (69.15 ± 1.23 por ciento), lo que evidencia que no existe necesariamente una relación directa entre el GH y la inhibición de la actividad de la ECA - I. Resultados similares se obtuvieron por Campos *et al.* (2012) en hidrolizados de quinua y por Velásquez (2016) en hidrolizados de kiwicha, donde no hubo correspondencia entre el GH con la actividad inhibitoria ECA - I. Por su parte, Wu *et al.* (2016) en hidrolizados de proteína de sorgo dulce con Alcalasa reportaron que un incremento en el GH de 19 a 22 por ciento no mostró un incremento

Cuadro 12: Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina ECA - I (%) para distintos tiempos de hidrólisis enzimática llevada a cabo en una y dos etapas

Tratamiento enzimático	Tiempo de hidrólisis (min)	Inhibición de actividad ECA - I (%) *
Alcalasa	120	45.67 ± 0.18 ^e
	180	55.03 ± 2.75 ^d
	240	62.98 ± 1.07 ^c
Neutrasa	120	48.32 ± 0.26 ^e
	180	61.18 ± 3.04 ^c
	240	64.37 ± 1.28 ^{bc}
Flavourzyme	120	0.00 ± 0.00 ^h
	180	2.02 ± 0.86 ^{gh}
	240	4.24 ± 0.66 ^g
Neutrasa-Flavourzyme	120	48.32 ± 0.26 ^e
	180	47.38 ± 0.07 ^e
	240	33.22 ± 3.67 ^f
Neutrasa-Alcalasa	120	48.32 ± 0.26 ^e
	180	69.15 ± 1.23 ^a
	240	63.29 ± 2.05 ^c
Alcalasa-Neutrasa	120	45.67 ± 0.18 ^e
	180	69.13 ± 0.02 ^a
	240	66.98 ± 1.06 ^{ab}
Alcalasa-Flavourzyme	120	45.67 ± 0.18 ^e
	180	56.99 ± 1.52 ^d
	240	56.72 ± 0.00 ^d

* Los valores están expresados como promedio de dos experimentos independientes para un contenido de proteína de 0.5 mg/ml. Los valores medios que presentan diferentes letras indican que existen diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Duncan ($p < 0.05$).

significativo en la actividad inhibitoria ECA - I de los hidrolizados, indicando que un mayor GH no garantiza una mayor actividad inhibitoria ECA - I. Los mismos autores señalan que esto podría deberse a que los hidrolizados parciales podrían ser hidrolizados en moléculas (péptidos) con actividad baja o sin actividad cuando se incrementa el grado de hidrólisis. Según Kristinsson y Rasco (2000, citados por Jamdar *et al.*, 2010) el GH afecta

el tamaño y por lo tanto la composición de aminoácidos de los péptidos, que pueden afectar el sabor del hidrolizado de proteínas produciendo péptidos amargos a altos GH; además, el cambio en la composición de aminoácidos afectada por el GH podría también modular la actividad biológica de los péptidos formados durante la hidrólisis.

Hernández (2002) señala que la unión de los péptidos a la ACE está influida por la secuencia tripeptídica C terminal de los mismos, que puede interaccionar con tres regiones del centro activo de la ACE, así, los aminoácidos de carácter hidrofóbico, como Trp, Tyr, Phe o Pro favorecen la unión a estas zonas. El péptido con secuencia C-terminal PheAla-Pro, análogo al encontrado en el inhibidor presente en el extracto del veneno de serpiente es uno de los más favorables para unirse al centro catalítico. La carga positiva del grupo guanidino o del grupo ϵ -amino de la Arg o Lys, respectivamente, contribuyen a la potencia inhibidora. La presencia de aminoácidos dicarboxílicos en la secuencia peptídica o de Pro como penúltimo aminoácido disminuye o anula la actividad inhibitoria de la ACE. El extremo N-terminal también influye en la actividad, y así, la presencia de Val o de Ile en esta posición incrementa la actividad inhibitoria de la ACE en el péptido.

El IC_{50} se define como la concentración de péptido en mg de proteína/ml requerida para producir una inhibición del 50% de la actividad ECA-I, mientras menor sea este valor, el hidrolizado tendrá mejor actividad inhibitoria. Se determinó los valores de IC_{50} , los cuales se presentan en el Cuadro 13 (Anexo 6a). Los menores valores de IC_{50} en las reacciones en una etapa se obtuvieron a los 240 min de hidrólisis con la Alcalasa y Neutrasa (0.32 ± 0.01 y 0.32 ± 0.02 mg/ml, respectivamente); sin embargo, en las reacciones en dos etapas, fueron menores los valores de IC_{50} alcanzados con la Neutrasa/Alcalasa (180 min de hidrólisis) y Alcalasa/Neutrasa (240 min de hidrólisis) siendo 0.12 ± 0.05 y 0.13 ± 0.01 mg/ml, respectivamente. Se apreció también que en las reacciones en dos etapas, con las combinaciones que inician la hidrólisis con Neutrasa se obtuvieron valores IC_{50} (mg/ml) menores a los obtenidos con Alcalasa como primera enzima, además con Neutrasa se requiere un tiempo de reacción menor (180 vs. 240 min) para obtener valores IC_{50} (mg/ml) más bajos. El análisis estadístico indicó que no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$, Anexos 6a y 6b) entre la actividad inhibitoria ECA - I y el IC_{50} entre los 180 y 240

minutos para la combinación Neutrasa/Alcalasa, por lo que se puede considerar como tiempo óptimo de reacción 180 min. Campos *et al.* (2012), en hidrolizados de quinua encontraron que a mayor tiempo de hidrólisis los valores IC₅₀ son menores (similar a lo encontrado en las reacciones en una etapa), excepto en el caso de la hidrólisis con Neutrasa donde a los 120 min de hidrólisis se obtuvo un menor valor de IC₅₀ (0.06 mg/ml), seguido de las combinaciones Neutrasa/Alcalasa y Alcalasa/Neutrasa. Velásquez (2016) determinó valores IC₅₀ (240 min de hidrólisis) en un rango de 0.30 y 3.92 mg/mL, en hidrolizados de kiwicha; siendo significativamente más bajo ($p < 0,05$) el valor alcanzado por la combinación de las enzimas Alcalasa/Neutrasa (0.30 mg/ml) y el más alto por el obtenido con Flavourzyme en una etapa (3.92 mg/ml). Cabe resaltar que en todos los casos, los valores IC₅₀ de los hidrolizados de cañihua fueron mucho mayores que los de captopril, un medicamento sintético inhibidor de la ECA (0.00000478 mg/ml) (Lee *et al.*, 2009; citados por Ambipaigapalan *et al.*, (2015).

El valor IC₅₀ encontrado para el hidrolizado de la cañihua con Neutrasa/Alcalasa (0.12 mg/ml) es menor al reportado para otras fuentes proteicas, es así que Wu *et al.* (2016) en hidrolizados de proteína de sorgo dulce determinaron un IC₅₀ de 1.13 mg/ml; pero al dividirlo por ultrafiltración en cuatro fracciones de > 10 kDa, 5-10 kDa, 1-5 kDa y < 1 kDa, la fracción más pequeña exhibió la mayor actividad inhibitoria ECA - I con un IC₅₀ de 0.116 mg/ml. En semillas de dátil, Ambipaigapalan *et al.* (2015) encontraron que la combinación Alcalasa/Termolysina exhibió la mayor actividad inhibitoria ECA - I con un valor IC₅₀ de 0.53 mg/ml. En hidrolizados de frijol, los valores IC₅₀ en investigaciones realizadas en los últimos años, han variado entre 0.001 µg/ml y 6.5 mg/ml, señalando que hay factores a considerar cuando se comparan los tratamientos para obtener hidrolizados con actividad inhibitoria ECA-I, tales como el pretratamiento, cultivar e integridad de las semillas, así como el tratamiento enzimático y fraccionamiento de la proteína (Luna *et al.* 2015). Makinen *et al.* (2012, citados por He *et al.* (2013) determinaron que el hidrolizado proteico de proteína de colza mostró una actividad inhibitoria ECA - I de 89.4 por ciento a una concentración de 1 mg/ml. Por otro lado, Elavarasan *et al.* (2016) en hidrolizados a partir de proteína de pescado (*Cirrhinus mrigala*) con papaína, determinaron actividades inhibitorias ECA - I en el rango de 40 a 72 y 31 a 60 por ciento para muestras secadas en horno y por liofilización; mientras que los valores IC₅₀ fueron 1.15 y 1.53 mg de

proteína/ml, respectivamente; sin embargo no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) lo cual indica que los componentes peptídicos activos, responsables de la inhibición de la actividad ECA-I, no fueron alterados durante el proceso de secado empleado.

Yu *et al.* (2013) señalan que la relación entre la actividad y estructura para la síntesis natural de péptidos inhibidores de ECA resulta de residuos aminoácidos aromáticos, donde la presencia de fenilalanina, tirosina o prolina en el carbono terminal origina di o tripéptidos con mayor actividad inhibitoria potencial; además, los aminoácidos N-terminales con cadenas largas o hidrofóbicas pueden proveer péptidos una gran actividad inhibitoria, mientras que la presencia de fenilalanina, asparagina, serina o glicina en el extremo N-terminal puede mitigar la actividad. Megías *et al.* (2004, citados por Saadi *et al.* 2015) reportaron un péptido inhibidor de la ECA (Phe-Val-Asn-Pro - Gln - Ala - Gly - Ser) generado bajo la acción de pepsina y pancreatina usando G-50 GFC y C₁₈ RP-HPLC en la proteína de girasol.

He *et al.* (2013) señalan que los diferentes potenciales antihipertensivos observados entre hidrolizados dependen principalmente de la proteasa utilizada para la hidrólisis, tal como se evidencia en los resultados obtenidos donde el tratamiento óptimo resultó ser Neutrasa/Alcalasa a 180 minutos de hidrólisis, con el cual se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición ECA - I y menor valor IC₅₀. Sin embargo, como señalan Boscoe y Listow, (2008), los péptidos en el hidrolizado pueden fraccionarse y enriquecerse utilizando diferentes métodos, tales como precipitación selectiva, ultrafiltración o cromatografía de intercambio iónico (Korhonen *et al.*, 1998, citados por Boscoe y Listow, 2008). Los procesos de cromatografía no son ampliamente utilizados a escala industrial debido a su baja productividad y altos costos. La nanofiltración es una técnica prometedora que separa los solutos basados en la carga y el tamaño del soluto. La técnica de ultrafiltración, utilizando membranas con diferentes valores de corte, se ha aplicado con éxito para el enriquecimiento de péptidos antihipertensivos y antibacterianos a partir de hidrolizados de suero.

Cuadro 13: Valores de IC₅₀ obtenidos con diferentes tratamientos enzimáticos y a diferentes tiempos de hidrólisis

Tratamiento enzimático	Tiempo de hidrólisis (min)	IC ₅₀ (mg/ml)
Alcalasa	120	0.62 ± 0.03 ^e
	180	0.46 ± 0.03 ^f
	240	0.32 ± 0.01 ^g
Neutrasa	120	0.51 ± 0.02 ^f
	180	0.35 ± 0.01 ^g
	240	0.32 ± 0.02 ^g
Flavourzyme	180	12.64 ± 0.53 ^b
	240	29.42 ± 1.79 ^a
Neutrasa-Flavourzyme	120	12.34 ± 1.08 ^f
	180	0.64 ± 0.02 ^e
	240	1.4 ± 0.08 ^d
Neutrasa-Alcalasa	120	0.51 ± 0.02 ^f
	180	0.12 ± 0.05 ^h
	240	0.14 ± 0.004 ^h
Alcalasa-Neutrasa	120	0.62 ± 0.03 ^e
	180	0.16 ± 0.00 ^h
	240	0.13 ± 0.01 ^h
Alcalasa-Flavourzyme	120	0.62 ± 0.03 ^e
	180	0.35 ± 0.01 ^g
	240	0.35 ± 0.002 ^g

* Los valores están expresados como promedio de dos experimentos independientes para un contenido de proteína de 0.5 mg/ml. Los valores medios que presentan diferentes letras indican que existen diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Duncan ($p < 0.05$).

4.5 EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ESTABILIDAD DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS FRENTE A CONDICIONES DE DIGESTIÓN

Se trabajó con el hidrolizado proteico que obtuvo una actividad inhibitoria ECA - I de 69.15 por ciento, con IC₅₀ de 0.12 mg/mL (Neutrasa/Alcalasa por 180 min de hidrólisis) con la finalidad de evaluar su estabilidad frente a las condiciones gastrointestinales

utilizando un modelo *in vitro*, para ello el hidrolizado fue sometido a una hidrólisis secuencial con las enzimas digestivas pepsina y pancreatina para posteriormente determinar sus valores de inhibición ECA-I. La actividad inhibitoria ECA - I (concentración de péptidos en el tubo de reacción de 0.5 mg/ml) fue casi constante luego de la digestión con pepsina por 60 minutos obteniéndose un porcentaje de inhibición ECA - I de 71.20 por ciento y la digestión secuencial con pancreatina por 120 minutos aumentó la actividad inhibitoria ECA - I a 74.8 por ciento, siendo el valor inicial de 69.15 por ciento. En el caso del valor IC₅₀, en un inicio se tuvo 0.12 mg/ml mientras que con la pepsina se obtuvo un valor de 0.08 mg/ml y con la pancreatina 0.07 mg/ml de proteína. Los resultados indican que los péptidos fueron relativamente estables durante la digestión secuencial dado que durante el proceso de digestión *in vitro* no hubo una variación significativa ($p > 0.05$) de la actividad inhibitoria de la ECA - I e IC₅₀ (Anexos 6c y 6d). Similares resultados obtuvo Velásquez (2016) en hidrolizados de kiwicha, donde durante el proceso de digestión *in vitro*, el hidrolizado Alcalasa-Neutrasa tratado secuencialmente con pepsina y pancreatina, obtuvo un valor de IC₅₀ de 0.32 mg/mL, siendo el valor inicial de 0.30 mg/mL.

Cuadro 14: Valores de inhibición de la actividad ECA - I (%) e IC₅₀ obtenidos durante el proceso de digestión *in vitro*

Tratamiento	Inhibición de actividad ECA - I (%) *	IC ₅₀ (mg/ml)
Hidrolizado NA 180	69.15 ± 1.23 ^a	0.12 ± 0.004 ^a
Pepsina	71.20 ± 2.47 ^a	0.08 ± 0.04 ^a
Pepsina + Pancreatina	74.80 ± 1.20 ^a	0.07 ± 0.03 ^a

* Los valores están expresados como promedio de dos experimentos independientes para un contenido de proteína de 0.5 mg/ml. Los valores medios que presentan diferentes letras indican que existen diferencias significativas cuando se someten a la prueba de Duncan ($p < 0.05$).

Para ejercer efectos fisiológicos *in vivo*, los péptidos bioactivos deben ser liberados durante la digestión intestinal y deben entonces alcanzar sus sitios objetivo en el lado luminal del

tracto intestinal o después de la absorción en los órganos periféricos (Pihlanto-Leppala, 2001). Según Hernández-Ledesma *et al.* (2004), la resistencia de estos péptidos a las enzimas gastrointestinales está poco documentada. Di y tripéptidos pueden ser absorbidos fácilmente en el intestino, sin embargo, no está claro si los péptidos bioactivos más grandes que contienen más de tres aminoácidos son absorbidos del intestino y alcanzan los órganos objetivo (Shah, 2000; citado por Boscoe y Listow, 2008). Según González *et al.* (2015), el potencial de los péptidos bioactivos depende de su capacidad de alcanzar los órganos objetivo en una conformación intacta. La digestión gastrointestinal es una de las barreras que los péptidos deben superar para ese propósito, por lo cual, para evaluar la resistencia de los péptidos a este proceso, los extractos se someten a un procedimiento de hidrólisis usando condiciones que simulan la digestión gastrointestinal *in vivo*. Es así que Elavarasan *et al.* (2016) determinaron que la actividad inhibitoria ECA - I de hidrolizados de pescado secados en horno fue comparable a los hidrolizados liofilizados y ofrecieron mejor estabilidad ante la digestión secuencial con pepsina (variación ECA - I de 10.3 por ciento) y pancreatina (inhibición ECA - I, 45 por ciento), sugiriendo que el secado en horno a $80 \pm 2^\circ\text{C}$ se puede emplear para la producción de hidrolizado proteico sin una pérdida significativa de la actividad inhibitoria ECA - I. Zarei *et al.* (2015) en la hidrólisis de proteína de torta de palma con pepsina, obtuvo la máxima actividad inhibitoria ECA - I (45 por ciento) luego de treinta horas de hidrólisis; señalan que la pepsina, a diferencia de otras endopeptidasas (tripsina y quimiotripsina) hidroliza sólo enlaces peptídicos más no hidroliza las amidas no peptídicas ni los enlaces éster. La pepsina es más eficiente en la escisión de enlaces peptídicos entre aminoácidos hidrofóbicos, y preferiblemente, aromáticos tales como fenilalanina, triptófano y tirosina (Fruton, 2002; citado por Montoya *et al.*, 2015); mientras que la tripsina divide las cadenas peptídicas principalmente en el lado del grupo carboxilo de los aminoácidos lisina y arginina, excepto cuando alguno de ellos es seguido por la prolina (Rawlings y Barret 1994, citados por Montoya *et al.*, 2015). Por su parte, González *et al.* (2015) sometieron a las fracciones < 3 kDa de hidrolizados de semilla de ciruela a una hidrólisis secuencial utilizando las enzimas pepsina (endopeptidasa que actúa a nivel estomacal) y pancreatina (mezcla de tripsina, alfa quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasa A y B, que actúa a nivel intestinal), encontrando que la digestión gastrointestinal no disminuyó significativamente la capacidad inhibitoria ACE ($p > 0.05$), mientras que el IC_{50} fue de $30 \mu\text{g/ml}$.

V. CONCLUSIONES

1. Los mayores grados de hidrólisis enzimática se obtuvieron a los 240 minutos tanto en las reacciones en una como en dos etapas; alcanzando con la combinación Alcalasa/Flavourzyme un GH de 60.28 ± 0.56 por ciento.
2. Los valores más altos de capacidad antioxidante hidrofílica medida por el método ABTS se lograron a los 240 minutos de reacción, así con la mezcla Alcalasa/Flavourzyme y Alcalasa/Neutrasa se obtuvieron valores de 3.50 ± 0.06 y 3.13 ± 0.06 μmol de TE/mg de proteína, respectivamente; mientras que con la reacción de Flavourzyme en una etapa se obtuvo el menor valor (1.20 ± 0.01 μmol de TE/mg de proteína), observándose en todos los tratamientos enzimáticos un aumento constante de esta propiedad conforme el tiempo de reacción enzimática progresaba hasta los 240 min de reacción.
3. Con la combinación Neutrasa/Alcalasa a los 180 minutos de hidrólisis (GH 42.19 ± 0.33 por ciento) se alcanzó el mayor porcentaje de inhibición de la actividad ECA - I (69.15 ± 1.23 por ciento) con un IC_{50} de 0.12 ± 0.04 mg de proteína/ml.
4. Al evaluar la estabilidad del hidrolizado frente a las condiciones gastrointestinales utilizando un modelo *in vitro* (hidrólisis secuencial con pepsina y pancreatina), luego de la digestión con pepsina por 60 min se obtuvo un porcentaje de inhibición ECA - I de 71.20 por ciento y un IC_{50} de 0.08 mg/ml, mientras que la digestión secuencial con pancreatina por 120 minutos aumentó la actividad inhibitoria ECA - I a 74.8 por

ciento e IC_{50} de 0.07 mg/ml de proteína, siendo el valor inicial ECA - I 69.15 por ciento e IC_{50} de 0.12 mg/ml.

5. Esta investigación destaca que la cañihua podría ser utilizada como materia prima para la obtención de péptidos bioactivos de gran valor biológico mediante un proceso de hidrólisis enzimática aportando beneficios a la salud de los consumidores mediante sus propiedades antioxidantes y antihipertensivas.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos para determinar si la mezcla de péptidos que exhiben actividad inhibitoria ACE y un bajo valor de IC_{50} , exhibe un efecto antihipertensivo *in vivo*.
- Aplicar técnicas de ultrafiltración y cromatografía para concentrar y aislar las fracciones de los péptidos para lograr su purificación y caracterización.
- Evaluar otras propiedades bioactivas de los péptidos tales como antimicrobiana, opioide, inmunomoduladora, etc.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, M.; ÁLVAREZ, B.; LUQUE, L.; FERNÁNDEZ, C.; FERNÁNDEZ, A. y MARTELL, N. (2013). Hipertensión por hiperaldosteronismo: más lesión cardíaca, mayor riesgo cardiovascular. *Revista Especializada Cardiología*. 66:47-52 - Vol. 66 Núm.01.
- ADDLER–NISSEN, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 27(6). 1256–1262.
- AGUILAR, V. y VÉLEZ, J. (2013). Propiedades nutricionales y funcionales del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *Temas Selectos de Ingeniería de Alimento*. Vol. 7. 25 - 34.
- ALVARADO, C. (2012). Aislamiento y aplicación de péptidos bioactivos del lactosuero en un yogurt funcional. Tesis Doctoral. Doctorado en Ciencia de los Alimentos. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.
- AMBIGAIPALAN, P.; AL-KHALIFA, A. y SHAHIDI, F. (2015). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Foods*. Vol. 18. Part B. 1125 – 1137.

- Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.) (2007). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th Edition, 2005. Current through revision 2. Editors Horwitz, W.; Latimer Junior, G., W. Gaithersburg, Maryland. USA.
- ASOODEH, A; MINA, Y; JAMSHIDKHAN, CH. (2012). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from lysozyme hydrolysates. Food Chemistry, 131:291-295
- BAMBAD, F.; DOKHANI, S.; KERAMAT, J. y ZAREIE, R. (2009). The impact of germination and in vitro digestion on the formation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from lentil proteins compared to whey proteins. International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering 3 (1): 103 - 119.
- BARBANA, C. y BOYE, J. (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of lentil protein hydrolysates: Determination of the kinetics of inhibition. Food Chemistry 127(1): 94-101.
- BOBOEV, A.; HASANOV, A.; YOTOVA, L. y H. HASANOV. (2012). Antioxidant activity of peptides obtained from wheat and cottonseed proteins. Bulgarian Journal of Agricultural Science. 18. 103 - 111.
- BOSCOE, A. y LISTOW, C. 2008. Protein Research Progress. Nova Science Publishers, Inc. New York, EE.UU.
- CAFFINI, N. (2009). Enzimas proteolíticas de vegetales superiores: Aplicaciones Industriales. Editorial Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Buenos Aires, Argentina.
- CALLISAYA, J. y ALVARADO, J. (2009). Aislados Proteínicos de granos altoandinos *Chenopodiaceas*; quinoa "*Chenopodium quinoa*"- Cañihua "*Chenopodium*

pallidicaule" por precipitación isoeléctrica. Revista. Boliviana de Química. V. 26. La Paz, Bolivia.

- CAMPOS, D.; CHIRINOS, R.; AGUILAR, A.; YÁBAR, E. (2012). Obtención de péptidos bioactivos con actividades antihipertensiva y antioxidante a partir dos variedades de quinua (*Chenopodium quinoa*) y evaluación de su estabilidad al metabolismo gastrointestinal y biodisponibilidad in vitro. Informe Técnico CONCYTEC. Lima, Perú.
- CIAN, R.; VIOQUE, J. y S. DRAGO. (2015). Structure–mechanism relationship of antioxidant and ACE I inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate fractionated by pH. *Food Research International*. 69. 216–223
- CIRILLO, G. y F. IEMMA. (2012). *Antioxidant Polymers: Synthesis, properties and applications*. John Wiley & Sons.
- CHEN, J.; LIU, S.; YE, R.; CAI, G.; JI, B. y WU, Y. (2013). Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory tripeptides from rice protein hydrolysate: Purification and characterization. *Journal of Functional Foods* 5. 1684 - 1692.
- DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVES, C. y BARTOLOMÉ, B. (2004). Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 48 - 54.
- DONG, O. y HYUNG, J. (2015). Preparation of Egg White Liquid Hydrolysate (ELH) and its radical-scavenging Activity. *Prevention Nutritional Food Science*. 20(3): 183 - 189.
- ELAVARASAN, K.; SHAMASUNDAR, B.A.; BADI, F. y HOWELL, N. (2016). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and structural properties of oven- and freeze-dried protein hydrolysate from fresh water fish (*Cirrhinus mrigala*). *Food Chemistry*. 206: 210 – 216.

- ESCUDERO, E. (2012). Estudio de pequeños péptidos (<1500 Da) con actividad antihipertensiva y antioxidante generados en el jamón curado. Tesis doctoral. Universidad politécnica de valencia, Valencia.
- ESCUDERO, E.; MORA, L. y TOLDRÁ, F. (2014). Stability of ACE inhibitory ham peptides against heat treatment and *in vitro* digestion. Food Chemistry 161: 305–311
- ESPINOZA, E. (2015). Actividad antihipertensiva y actividad antioxidante de hidrolizados de proteína de Cañihua (*Chenopodium pallidicaulle* Aellen). Tesis Mg. Sc. en Tecnología de Alimentos. Escuela de Post Grado. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación). (1994). Neglected crops 1492 from a different perspective. FAO Plant Production and Protection Series. N°26. ISBN 92-5-103217-3.
- FERNÁNDEZ, R. (2015). Péptidos derivados de lactoferrina bovina contra la hipertensión arterial: inhibición de los sistemas angiotensina y endotelina. Tesis Doctoral. en Ciencia de los Alimentos. Universidad de Valencia. Valencia, España.
- FREEMAN, H. (2015). Clinical relevance of intestinal peptide uptake. World Journal Gastrointestinal Pharmacology Ther. 6(2): 22–27.
- FRITZ, M.; VECCHI, B.; RINALDI, G. y AÑÓN, M. (2011). Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. Food Chemistry. 126. 878 - 884.
- GALLEGOS-TINTORÉ, S., TORRES-FUENTES, C., MARTÍNEZ-AYALA, A.L., SOLORZA-FERIA, J., ALAIZ, M., GIRÓN-CALLE, J. y VIOQUE, J. (2011). Antioxidant and chelating activity of *Jatropha curcas* L. proteína hydrolysates. Journal of Science and Food Agriculture. 91, 1618-1624.

- GIBBS, B.; ZOUGMAN, A.; MASSE, R. y MULLIGAN, C. (2004). Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International*. 2004; 37:123-31.
- GOBETTI, M.; STEPANIAK, L.; DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A. y DI CAGNO, R. (2002). Latent bioactive peptides in milk proteins: Proteolytic activation and significance in dairy processing. *Crit Reviews Food Science and Nutrition*. 42:223-39.
- GONZÁLEZ, E.; PUCHALSKA, P.; MARINA, M. y GARCÍA, M. (2015). Fractionation and identification of antioxidant and angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from plum (*Prunus domestica* L.) stones. *Journal of Functional Foods*. 19. 376 - 384.
- GRASZKIEWICZ, A.; ZELAZKO, M.; TRZISZKA, T. y POLANOWSKI, A. 2007. Antioxidative capacity of hydrolysates of hen egg proteins. *Polish Journal of Food Nutrition Science*. 57:195-9.
- GUO, P.; QI, Y.; ZHU, C. y WANG, Q. (2015). Purification and identification of antioxidant peptides from Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus* Lindl.) seeds. *Journal of Functional Foods*. 19. 394 - 403.
- HAMMERSHØJ, M.; NEBEL, C.; CARSTENS, J. (2008). Enzymatic hydrolysis of ovomucin and effect on foaming properties. *Food Research International*, v. 41: 522-531.
- HARTMANN, R., y MEISEL, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 18, 163-169.
- HE, R.; ALASHI, A.; MALOMO, M.; GIRGIH, A.; CHAO, D.; JU, X. y ALUKO, R. (2013). Antihypertensive and free radical scavenging properties of enzymatic rapeseed protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 141. 153 - 159.

- HERNÁNDEZ-LEDESMA, B., RECIO, I., y AMIGO, L. (2008). β -lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino acids*. 35: 257-265.
- HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; MIRALLES, B.; AMIGO, L.; RAMOS, M. y RECIO, I. (2005). Identification of antioxidant and ECA - Inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of Science and Food Agriculture*. 85:1041-8.
- HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. y PUEYO, E. (2003). Assessment of the spectrophotometric method for determination of angiotensin-converting-enzyme activity: Influence of the inhibition type. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 51:4175-9.
- HERNÁNDEZ, B. (2002). Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas mediante hidrólisis enzimática y procesos fermentativos. Tesis Doctoral. Departamento de Nutrición y Bromatología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- HUAMÁN, N. (2011). Evaluación de la difusividad térmica en granos de quinua (*Chenopodium quinoa* Wild) y cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Allen) sometidos a tratamiento térmico. Tesis Mg. Sc. en Tecnología de Alimentos. Escuela de Post Grado. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- JAE, J.; KA, L.; MI, H. y A. CHANG. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*. 42. 1266 - 1272.
- JAMDAR, S.; RAJALAKSHMI, V.; PEDNEKAR, M.; JUAN, F.; YARDI, V. y SHARMA, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*. 121: 178 - 184.

- JOVANOVIĆ, J.; STEFANOVIĆ, A.; ZUZA, M.; JAKOVETIĆ, S. y KNEZEVIĆ, D. (2016). Improvement of antioxidant properties of egg white protein enzymatic hydrolysates by membrane ultrafiltration. *Hemijska industrija*. 70 (4) 419–428.
- KIM, S. y WIJESEKARAA, I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. *Journal of Functional Foods*. 2, 1–9.
- KIM, S.; BYUN, H.; PARK, P. y SHAHIDI, F. (2001). Angiotensin I. converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:2992-7.
- KOEPPEN, B. y STANTON, B. 2013. *Renal Physiology*. Fifth Edition. Mosby, Inc., an affiliate of Elsevier Inc.
- KORHONEN, H. (2002). Technology options for new nutritional concepts. *International Journal of Dairy Technology*. 2002; 55:79-88.
- KORHONEN, H. y PIHLANTO, A. (2006). Review: bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*. 16:945–60.
- INS (INSTITUTO NACIONAL DE SALUD). (2009). *Tablas peruanas de composición de alimentos*. Octava Edición. Lima. Ministerio de Salud.
- LATHAM, M. (2002). *Nutrición humana en el mundo en desarrollo*. Colección de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO): Alimentación y Nutrición N° 29. Roma, Italia.
- LI, H.; PRAIRIE, N.; UDENIGWE, C.; ADEBIYI, A.; TAPPIA, P.; AUKEMA, H.; JONES, P. y ALUKO, R. (2011). Blood pressure lowering effect of a pea protein hydrolysate in hypertensive rats and humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 9854 - 9860.

- LIN, F.; CHEN, L.; LIANG, R.; ZHANG, Z.; WANG, J.; CAI, M. y LI, Y. (2011). Pilot-scale production of low molecular weight peptides from corn wet milling byproducts and the antihypertensive effects in vivo and in vitro. *Food Chemistry*. 124: 801 - 807.
- LING, K.; KHAN, M.; SAID, M.; ANUAR, M. e ISMAIL, A. (2013). Optimization of enzymatic hydrolysis of palm kernel cake protein (PKCP) for producing hydrolysates with antiradical capacity. *Industrial Crops and Products*. 43: 725– 731
- LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FARR, A. y RANDALL, R. (1951). *Anal. Biochem.* 193: 265–275.
- LUNA, D.; MOJICA, L.; GONZÁLEZ, E.; MENDOZA, S. y G. LOARCA. (2015). Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Research International* 76: 39–50.
- MARTÍNEZ, A. y MARTÍNEZ, E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutritional Hospital*. 21:1 -14.
- MASAYO, A. y WATANABE, K. (2010). Functional and Bioactive Properties of Quinoa and Amaranth. *Food Science and Technology Research*. 16 (2): 163 - 68.
- MATSUI, T; HAYASHI, A; TAMAYA, K; MATSUMOTO, K; KAWASAKI, T; MURAKAMI, K. y KIMOTO, K. (2003). Depression effect induced by dipeptide, val-tyr, in hypertensive transgenic mice is due, in part, to the suppression of human circulating renin-angiotensina system. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 30: 262.
- MEISEL, H. (2004). Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors*. 21:55.

- MEMARPOOR, M.; ASOODEH, A. y CHAMANI, J. (2012). A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. 4 (1):278–286
- MIGUEL, M.; LÓPEZ-FANDINO, R.; RAMOS, M. y ALEIXANDRE, A. (2005). Short-term effect of egg-white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. *British Journal of Nutrition*. 94:731-737.
- MONTOYA, A.; GÓMEZ, M.; REYES, C.; MILÁN, J. y GONZÁLEZ DE MEJÍA, E. (2015). Identification of bioactive peptide sequences from Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed proteins and their potential role in the prevention of chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol 14: 139 - 158.
- MULERO, J.; ZAFRILLA, P.; MARTINEZ-CACHA, A.; LEAL, M. y AVELLAN, J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clinical Investigation Arteriosclerosis*. 23 (5): 219 – 227.
- MURAKAMI, M., TONOUCI, H., TAKAHASHI, R., KITAZAWA, H., KAWAI, Y., NEGISHI, H., y SAITO, T. (2004). Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (β -lactosin B) isolated from a commercial whey product. *Journal of Dairy Science*. 87: 1967-1974.
- NOLLET, L. y F. TOLDRÁ. (2015). *Handbook of Food Analysis*. Third Edition - Two Volumen Set. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton, Florida.
- ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN (FAO), Universidad de las Naciones Unidas (UNU) y OMS (Organización Mundial de la Salud). (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation (WHO Technical Report Series 935).

- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). (2015). Preguntas y respuestas sobre hipertensión (En línea). Consultado el 13 de Agosto del 2016. Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/82/es/>
- OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., y PRIOR, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4619-4626.
- PATIÑO, J. (2006). *Metabolismo, nutrición y shock*. Cuarta Edición. Editorial Médica Internacional. Bogotá, Colombia.
- PHELAN, M.; AHERNE, A.; FITZGERALD, R. y O'BRIEN, N. (2009). Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*. 19 (11): 643–654.
- PIHLANTO, A. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Science Technology*. 11:347 – 356.
- PIHLANTO, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*. 16:1306–14.
- PIHLANTO, A. y KORHONEN, H. (2003). Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food Nutrition Research*. 47:175—276.
- QIAN, Z; JUNG, W. y KIM, S. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *rana catesbeiana shaw*. *Bioresource Technology*. 99: 1690–1698.
- RAY, P; HUANG, Y. y TSUJI, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signaling*. 24: 981–990.

- RE, R.; PELLEGRINI, A.; PROTEGGENTE, A.; PANALA, M. YANG y RICE-EVANS, E. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals Chemistry Biological Medicine*. 26: 1231-1237.
- REPO-CARRASCO, R. (2011). Andean indigenous food crops: Nutritional value and bioactive compounds. Doctoral Thesis. Department of Biochemistry and Food Chemistry. University of Turku. Finland.
- REPO-CARRASCO, R.; ACEVEDO, A.; ALVAREZ, J. y KALLIO, H. (2009). Chemical and Functional Characterization of Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) grain, extrudate and bran. *Plant Foods Human Nutrition*. 64: 94 - 101.
- REPO-CARRASCO, R.; ESPINOZA, C. y S. JACOBSEN. (2003). Nutritional Value and Use of the Andean Crops Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). *Food Reviews International*. Vol. 19, Nos. 1 & 2, pp. 179–189.
- REPO-CARRASCO, R. y LI, N. (1993). Elaboración y evaluación de alimentos infantiles con base en cultivos andinos. *Arch. Latinoamericanos de Nutrición* 43(2):168–175.
- REPO-CARRASCO, R. (1992). Andean Crops and Infant Nourishment. Report B 25 Finland: University of Helsinki. Institute of Development Studies.
- REYES, A.; GONZÁLEZ, A.; HERNÁNDEZ, A. y VALLEJO, B. (2016). Péptidos inmunomoduladores derivados de las proteínas de la leche. *Interciencia*. 41 (2): 84-91.
- ROBERT, P. y ZALOGA, G. (1994). Dietary bioactive peptides. *New Horizons*. 1994; 2:237-43.
- ROBLES, A.; MICHEL, A.; CALLEJAS, R.; MALAMUD, C.; DELGADO, G. y ESTAÑOL, B. (2014). Los barorreflejos arteriales cardiovagal, cardiosimpático y

vasosimpático y el control neural de la presión arterial a corto plazo. *Revista Neurología*. 59: 508-16

- RUÍZ, P. (2013). Efecto antihipertensivo, mediante inhibición de la enzima convertora de angiotensina I, de péptidos derivados de lactoferrina bovina y péptidos diseñados rationally. Tesis Doctoral. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- SAADI, S.; SAARI, N.; ANWAR, F.; ABDUL, A. y MOHD, H. (2015). Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnology Advances*. 33. 80 - 116.
- SALWANEE, S.; WAN, W.; MAMOT, W.; MASKAT, M. e IBRAHIM, S. (2013). Effects of Enzyme Concentration, Temperature, pH and Time on the Degree of Hydrolysis of Protein Extract from Viscera of Tuna (*Euthynnus affinis*) by Using Alcalase. *Sains Malaysiana* 42(3): 279–287
- SAMARANAYAKA, A. y LI-CHAN, E. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*. 3(4): 229-254.
- SARMADI, B.H. e ISMAIL, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*. 31(10), 1949-1956.
- SASAKI, K. y MINAMINO, N. (2013). Chapter 243 — Peptidomics strategy for discovering endogenous biologically active peptides: *Handbook of biologically active peptides*. 2nd Ed. p. 1772–9.
- SEGURA, M.; SALAZAR, I.; CHEL, L. y BETANCUR, D. (2013). Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods. *LWT - Food Science and Technology*. 50. 723 -731.

- SEGURA, M.; CHEL, L. y BETANCUR, D. (2010). Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. *Revista Chilena de Nutrición*. Vol. 37 (3): 386-391
- SEMINARIO, J. (2004). Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003) No. 6. Universidad Nacional de Cajamarca, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Lima, Perú.
- SCHOENLECHNER, R., SIEBENHANDL, S. y BERGHOFER, E. (2008). Pseudocereals. In: Arendt, E.K., Bello, F.D. Editors. *Gluten-free cereal products and beverages*. Academic Press. Chapter 7. pp. 149-190.
- SILVA-SÁNCHEZ, C; BARBA DE LA ROSA, A.; LEÓN-GALVÁN, M.; DE LUMEN, BO; DE LEÓN-RODRÍGUEZ, A. y GONZÁLEZ DE MEJÍA, E. (2008). Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 56(4), 1233–1240.
- SINGH, G. (2016). *Protein Byproducts: Transformation from Environmental Burden into Value - Added Products*. Academic Press. Elsevier Inc.
- SIOW, H. y GAN, G. (2013). Extraction of antioxidative and antihypertensive bioactive peptides from *Parkia speciosa* seeds. *Food Chemistry*. 141. 3435–3442
- STATPOINT TECHNOLOGIES INC. (2006). *Statgraphics Centurion Versión XV*. E.U.A: Stat Point, Inc.
- SUÁREZ, M.; KIZLANSKY, A. y LÓPEZ, B. (2006). Evaluación de la calidad de las proteínas en los alimentos calculando el score de aminoácidos corregido por digestibilidad. *Nutrición Hospitalaria*. 21(1):47-51

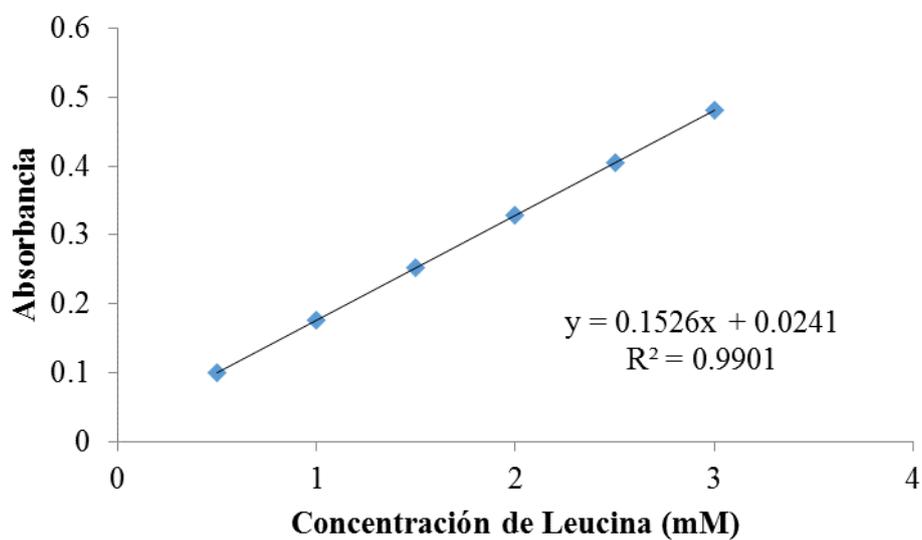
- TAPIA, M. y A. FRIES. (2007). Guía de Campo de los Cultivos Andinos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) y Asociación Nacional de Productores Ecológicos del Perú (ANPE). Lima, Perú.
- TIENGO, A.; FARIA, M. y NETTO, F. (2009). Characterization and ECA - Inhibitory Activity of Amaranth Proteins. *Journal of Food Science*. 74. Issue 5.
- TOLDRÁ, F. y NOLLET, L. (2012). *Proteomics in Foods: Principles and Applications*. Springer Science + Business Media. New York
- TORRUCO-UCO, J.; CHEL-GUERRERO, L.; MARTÍNEZ-AYALA, A.; DÁVILA-ORTÍZ, G. y BETANCUR-ANCONA, D. (2009). Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory and Antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* Seeds. *LWT - Food Science and Technology* 42, (10) 1597-60.
- UDENIGWE, C. y ALUKO, R. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing and potential health benefits. *Journal of Food Science* 77: 11-24.
- VELÁSQUEZ, M. (2016). Hidrólisis enzimática de la proteína de kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.) para obtener péptidos con propiedades antioxidante y antihipertensiva. Tesis Mg. Scientiae en Tecnología de Alimentos. Escuela de Postgrado. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- VENÉREO, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Milenaria*. 31:126 - 33.
- WALTERS, R. (2013). Pseudocereals: Super Foods, or Pantry Hokum (En línea). Disponible en: <http://open-furrow.soil.ncsu.edu/Documents/UTW/Psedocereals.pdf>. Consultado el 10 de Diciembre del 2016.

- WANG, W. y GONZALEZ, E. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 4:63-78.
- WU, J., ALUKO, R. y MUIR, E. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A* 950, 125 - 130.
- YANG, B.; YANG, H.; LI, J.; LI, Z. y Y. JIANG. (2011). Amino acid composition, molecular weight distribution and Antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. *Food Chemistry*. 124: 551 - 555.
- YONGVANIT, P; PINLAOR, S. y BARTSCH, H. (2012). Oxidative and nitrative dna damage: key events in opisthorchiasis-induced carcinogenesis. *Parasitology international*, 130–135.
- ZAREI, M.; FORGHANI, B.; EBRAHIMPOUR, A.; ABDUL, A.; ANWAR, F. y N. SAARI. (2015). *In vitro* and *in vivo* antihypertensive activity of palm kernel cake protein hydrolysates: Sequencing and characterization of potent bioactive peptides. *Industrial Crops and Products*. 76. 112 - 120.
- ZHAO, Q.; XIONG, H.; SELOMULYA, C.; DONG, X.; ZHONG, H.; WANG, S.; SUN, W. y ZHOU, Q. (2012). Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. *Food Chemistry*. 134. 1360 - 1367.
- ZHUANG, H., TANG, N., y YUAN, Y. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. *Journal of Functional Foods*, 5, 1810–1821.

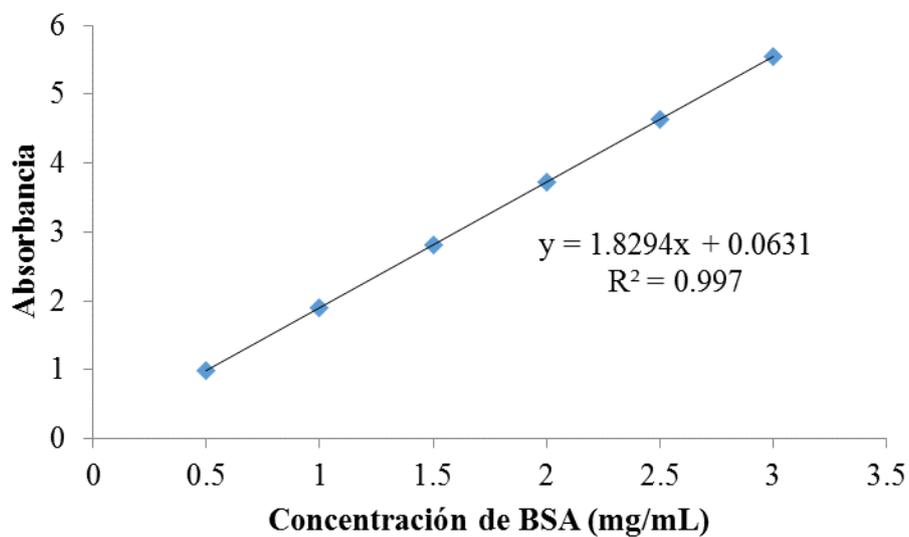
VIII. ANEXOS

ANEXO 1: CURVAS ESTÁNDAR EMPLEADAS EN LA INVESTIGACIÓN

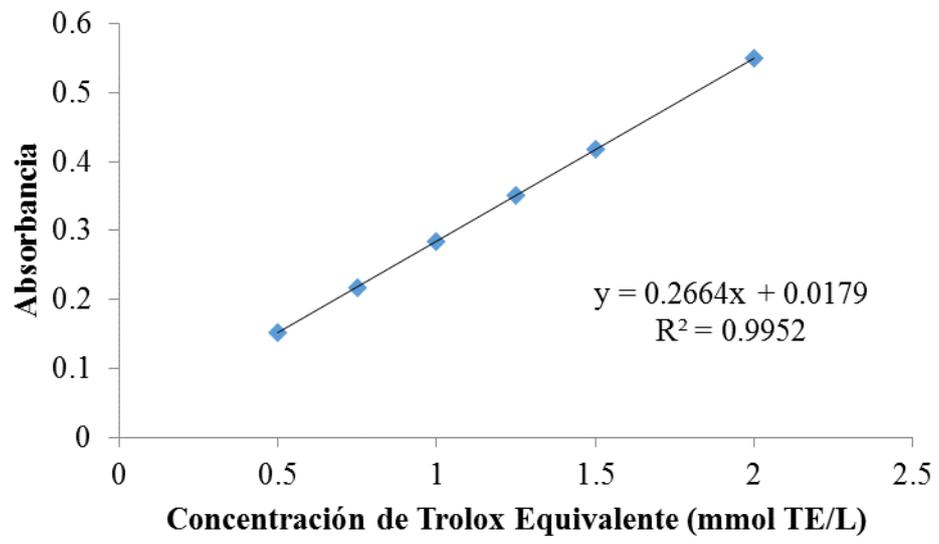
Anexo 1a: Curva Estándar de Leucina para la Determinación de Grado de Hidrólisis



Anexo 1b: Curva Estándar de Proteína Soluble



Anexo 1c: Curva Estándar de Capacidad Antioxidante ABTS



ANEXO 2: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE GRADO DE HIDRÓLISIS POR TIEMPO DE REACCIÓN ENZIMÁTICA

Anexo 2a. ANOVA Simple –GRADO DE HIDRÓLISIS para el Tiempo 10 min de reacción enzimática

Variable dependiente: Grado de Hidrólisis (%GH)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 63

Número de niveles: 7

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	338.718	6	56.453	538.20	0.0000
Intra grupos	1.46848	14	0.104892		
Total (Corr.)	340.186	20			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T-10.Flavourzyme	3	2.19333	X
T-10.Neutrasa	3	12.7257	X
T-10.Alcalasa	3	12.997	XX
T-10.Alcalasa Neutrasa	3	13.261	XXX
T-10.Neutrasa Alcalasa	3	13.8307	XXX
T-10.Alcalasa Flavourzyme	3	13.967	XX
T-10.Neutrasa Flavourzyme	3	14.5373	X

ANEXO 2b. ANOVA Simple –GRADO DE HIDRÓLISIS para el Tiempo 20 min de reacción enzimática

Variable dependiente: Grado de Hidrólisis (%GH)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 63

Número de niveles: 7

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	658.39	6	109.732	537.34	0.0000
Intra grupos	2.859	14	0.204214		
Total (Corr.)	661.249	20			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T-20.Flavourzyme	3	4.10367	X
T-20.Neutrasa	3	16.8093	X
T-20.Neutrasa Alcalasa	3	17.59	X
T-20.Neutrasa Flavourzyme	3	19.63	X
T-20.Alcalasa Flavourzyme	3	20.6413	XX
T-20.Alcalasa Neutrasa	3	21.0257	X
T-20.Alcalasa	3	21.1113	X

ANEXO 2c. ANOVA Simple –GRADO DE HIDRÓLISIS para el Tiempo 30 min de reacción enzimática

Variable dependiente: Grado de Hidrólisis (%GH)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 63

Número de niveles: 7

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	834.749	6	139.125	574.93	0.0000
Intra grupos	3.38778	14	0.241984		
Total (Corr.)	838.137	20			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T-30.Flavourzyme	3	4.56333	X
T-30.Neutrasa	3	18.8507	X
T-30.Neutrasa Alcalasa	3	19.9873	X
T-30.Alcalasa	3	22.6513	X
T-30.Neutrasa Flavourzyme	3	22.8343	X
T-30.Alcalasa Flavourzyme	3	23.3927	X
T-30.Alcalasa Neutrasa	3	23.7793	X

ANEXO 2d. ANOVA Simple –GRADO DE HIDRÓLISIS para el Tiempo 60 min de reacción enzimática

Variable dependiente: Grado de Hidrólisis (%GH)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 63

Número de niveles: 7

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1101.43	6	183.572	603.06	0.0000
Intra grupos	4.26165	14	0.304403		
Total (Corr.)	1105.7	20			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T-60.Flavourzyme	3	4.83533	X
T-60.Neutrasa	3	22.4307	X
T-60.Neutrasa Alcalasa	3	23.5797	XX
T-60.Alcalasa	3	24.6347	XX
T-60.Neutrasa Flavourzyme	3	25.7017	XX
T-60.Alcalasa Neutrasa	3	26.867	X
T-60.Alcalasa Flavourzyme	3	27.068	X

ANEXO 2e. ANOVA Simple –GRADO DE HIDRÓLISIS para el Tiempo 90 min de reacción enzimática

Variable dependiente: Grado de Hidrólisis (%GH)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 63

Número de niveles: 7

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1183.6	6	197.266	732.06	0.0000
Intra grupos	3.77257	14	0.269469		
Total (Corr.)	1187.37	20			

El Stat Advisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 599.079, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Grado de Hidrólisis entre un nivel de Tratamiento Enzimático y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T-90.Flavourzyme	3	7.748	X
T-90.Neutrasa	3	26.3787	X
T-90.Neutrasa Alcalasa	3	28.2717	X
T-90.Neutrasa Flavourzyme	3	28.7767	X
T-90.Alcalasa Flavourzyme	3	28.8207	X
T-90.Alcalasa Neutrasa	3	28.8297	X
T-90.Alcalasa	3	31.7203	X

ANEXO 2f. ANOVA Simple –GRADO DE HIDRÓLISIS para el Tiempo 120 min de reacción enzimática

Variable dependiente: Grado de Hidrólisis (%GH)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 63

Número de niveles: 7

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1725.94	6	287.657	1080.70	0.0000
Intra grupos	3.72646	14	0.266176		
Total (Corr.)	1729.67	20			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T-120.Flavourzyme	3	8.13667	X
T-120.Neutrasa	3	30.3367	X
T-120.Alcalasa	3	33.462	X
T-120.Neutrasa Alcalasa	3	33.5037	X
T-120.Alcalasa Neutrasa	3	33.8253	X
T-120.Neutrasa Flavourzyme	3	34.2153	X
T-120.Alcalasa Flavourzyme	3	36.3667	X

ANEXO 2g. ANOVA Simple –GRADO DE HIDRÓLISIS para el Tiempo 180 min de reacción enzimática

Variable dependiente: Grado de Hidrólisis (%GH)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 63

Número de niveles: 7

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2821.87	6	470.312	4198.02	0.0000
Intra grupos	1.56845	14	0.112032		
Total (Corr.)	2823.44	20			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T-180.Flavourzyme	3	8.50167	X
T-180.Neutrasa	3	31.5257	X
T-180.Alcalasa	3	36.7197	X
T-180.Neutrasa Flavourzyme	3	38.863	X
T-180.Alcalasa Neutrasa	3	39.6663	X
T-180.Neutrasa Alcalasa	3	42.1923	X
T-180.Alcalasa Flavourzyme	3	46.6243	X

ANEXO 2h. ANOVA Simple –GRADO DE HIDRÓLISIS para el Tiempo 240 min de reacción enzimática

Variable dependiente: Grado de Hidrólisis (%GH)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 63

Número de niveles: 7

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4285.76	6	714.294	4543.04	0.0000
Intra grupos	2.2012	14	0.157228		
Total (Corr.)	4287.96	20			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T-240.Flavourzyme	3	9.62733	X
T-240.Neutrasa	3	35.957	X
T-240.Neutrasa Flavourzyme	3	40.8473	X
T-240.Alcalasa	3	42.8153	X
T-240.Neutrasa Alcalasa	3	44.932	X
T-240.Alcalasa Neutrasa	3	46.7557	X
T-240.Alcalasa Flavourzyme	3	60.2817	X

**ANEXO 3: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
POR TIEMPO DE REACCIÓN ENZIMÁTICA**

**ANEXO 3a. ANOVA Simple – CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS para el
Tiempo 0 min de reacción enzimática**

Variable dependiente: Capacidad Antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 63

Número de niveles: 7

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.728875	6	0.121479	403.39	0.0000
Intra grupos	0.004216	14	0.000301143		
Total (Corr.)	0.733091	20			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T-0 Flavourzyme	3	0.0863333	X
T-0 Neutrasa	3	0.527333	X
T-0 Neutrasa Alcalasa	3	0.582333	X
T-0 Neutrasa Flavourzyme	3	0.605667	XX
T-0 Alcalasa Neutrasa	3	0.635333	X
T-0 Alcalasa	3	0.639333	X
T-0 Alcalasa Flavourzyme	3	0.651	X

ANEXO 3b. ANOVA Simple – CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS para el Tiempo 10 min de reacción enzimática

Variable dependiente: Capacidad Antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 63

Número de niveles: 7

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4.69945	6	0.783242	747.13	0.0000
Intra grupos	0.0146767	14	0.00104833		
Total (Corr.)	4.71413	20			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T-10 Flavourzyme	3	0.219333	X
T-10 Neutrasa	3	1.14233	X
T-10 Neutrasa Alcalasa	3	1.176	X
T-10 Neutrasa Flavourzyme	3	1.192	X
T-10 Alcalasa Neutrasa	3	1.60967	X
T-10 Alcalasa	3	1.64967	X
T-10 Alcalasa Flavourzyme	3	1.692	X

ANEXO 3c. ANOVA Simple – CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS para el Tiempo 20 min de reacción enzimática

Variable dependiente: Capacidad Antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 63

Número de niveles: 7

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4.30143	6	0.716905	615.02	0.0000
Intra grupos	0.0163193	14	0.00116567		
Total (Corr.)	4.31775	20			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T-20 Flavourzyme	3	0.411667	X
T-20 Neutrasa Flavourzyme	3	1.22733	X
T-20 Neutrasa	3	1.27233	X
T-20 Neutrasa Alcalasa	3	1.311	X
T-20 Alcalasa	3	1.72733	X
T-20 Alcalasa Neutrasa	3	1.76033	X
T-20 Alcalasa Flavourzyme	3	1.82	X

ANEXO 3d. ANOVA Simple – CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS para el Tiempo 30 min de reacción enzimática

Variable dependiente: Capacidad Antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 63

Número de niveles: 7

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4.92956	6	0.821593	1594.15	0.0000
Intra grupos	0.00721533	14	0.000515381		
Total (Corr.)	4.93677	20			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T-30 Flavourzyme	3	0.440667	X
T-30 Neutrasa Alcalasa	3	1.49233	X
T-30 Neutrasa	3	1.50467	XX
T-30 Neutrasa Flavourzyme	3	1.558	X
T-30 Alcalasa	3	1.89367	X
T-30 Alcalasa Neutrasa	3	1.91767	X
T-30 Alcalasa Flavourzyme	3	1.944	X

ANEXO 3e. ANOVA Simple – CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS para el Tiempo 60 min de reacción enzimática

Variable dependiente: Capacidad Antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 63

Número de niveles: 7

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4.31589	6	0.719316	818.73	0.0000
Intra grupos	0.0123	14	0.000878571		
Total (Corr.)	4.32819	20			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T-60 Flavourzyme	3	0.685333	X
T-60 Neutrasa Alcalasa	3	1.61	X
T-60 Neutrasa Flavourzyme	3	1.639	X
T-60 Neutrasa	3	1.645	X
T-60 Alcalasa	3	2.026	X
T-60 Alcalasa Flavourzyme	3	2.03633	X
T-60 Alcalasa Neutrasa	3	2.12133	X

ANEXO 3f. ANOVA Simple – CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS para el Tiempo 90 min de reacción enzimática

Variable dependiente: Capacidad Antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 63

Número de niveles: 7

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4.07216	6	0.678693	809.39	0.0000
Intra grupos	0.0117393	14	0.000838524		
Total (Corr.)	4.0839	20			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T-90 Flavourzyme	3	1.00033	X
T-90 Neutrasa	3	1.71	X
T-90 Neutrasa Alcalasa	3	1.73333	X
T-90 Neutrasa Flavourzyme	3	1.77633	X
T-90 Alcalasa Flavourzyme	3	2.22933	X
T-90 Alcalasa Neutrasa	3	2.241	X
T-90 Alcalasa	3	2.40033	X

ANEXO 3g. ANOVA Simple – CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS para el Tiempo 120 min de reacción enzimática

Variable dependiente: Capacidad Antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 63

Número de niveles: 7

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	6.27405	6	1.04567	718.79	0.0000
Intra grupos	0.0203667	14	0.00145476		
Total (Corr.)	6.29442	20			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T-120 Flavourzyme	3	1.054	X
T-120 Neutrasa Flavourzyme	3	1.87233	X
T-120 Neutrasa	3	1.88367	X
T-120 Neutrasa Alcalasa	3	1.947	X
T-120 Alcalasa Flavourzyme	3	2.35767	X
T-120 Alcalasa Neutrasa	3	2.39567	X
T-120 Alcalasa	3	2.954	X

ANEXO 3h. ANOVA Simple – CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS para el Tiempo 180 min de reacción enzimática

Variable dependiente: Capacidad Antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 63

Número de niveles: 7

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	8.71431	6	1.45239	842.26	0.0000
Intra grupos	0.0241413	14	0.00172438		
Total (Corr.)	8.73845	20			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T-180 Flavourzyme	3	1.11	X
T-180 Neutrasa	3	1.92333	X
T-180 Neutrasa Flavourzyme	3	1.98433	X
T-180 Neutrasa Alcalasa	3	2.21267	X
T-180 Alcalasa Neutrasa	3	2.77367	X
T-180 Alcalasa	3	2.866	X
T-180 Alcalasa Flavourzyme	3	3.13433	X

ANEXO 3i. ANOVA Simple – CAPACIDAD ANTIOXIDANTE ABTS para el Tiempo 240 min de reacción enzimática

Variable dependiente: Capacidad Antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 63

Número de niveles: 7

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	12.5035	6	2.08392	1290.66	0.0000
Intra grupos	0.0226047	14	0.00161462		
Total (Corr.)	12.5261	20			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T-240 Flavourzyme	3	1.195	X
T-240 Neutrasa	3	1.936	X
T-240 Neutrasa Flavourzyme	3	2.01433	X
T-240 Neutrasa Alcalasa	3	2.46067	X
T-240 Alcalasa Neutrasa	3	3.12833	X
T-240 Alcalasa	3	3.22167	X
T-240 Alcalasa Flavourzyme	3	3.497	X

ANEXO 4: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE GRADO DE HIDRÓLISIS POR TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

ANEXO 4a. ANOVA Simple –GRADO DE HIDRÓLISIS con enzima Alcalasa

Variable dependiente: Grado de Hidrólisis (%)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 24

Número de niveles: 8

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1953.36	7	279.052	1016.89	0.0000
Intra grupos	4.39066	16	0.274417		
Total (Corr.)	1957.75	23			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Alcalasa.T10	3	12.997	X
Alcalasa.T20	3	21.1113	X
Alcalasa.T30	3	22.6513	X
Alcalasa.T60	3	24.6347	X
Alcalasa.T90	3	31.7203	X
Alcalasa.T120	3	33.462	X
Alcalasa.T180	3	36.7197	X
Alcalasa.T240	3	42.8153	X

ANEXO 4b. ANOVA Simple –GRADO DE HIDRÓLISIS con enzima Neutrasa

Variable dependiente: Grado de Hidrólisis (%)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 24

Número de niveles: 8

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1356.23	7	193.747	1241.41	0.0000
Intra grupos	2.49712	16	0.15607		
Total (Corr.)	1358.72	23			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Neutrasa.T10	3	12.7257	X
Neutrasa.T20	3	16.8093	X
Neutrasa.T30	3	18.8507	X
Neutrasa.T60	3	22.4307	X
Neutrasa.T90	3	26.3787	X
Neutrasa.T120	3	30.3367	X
Neutrasa.T180	3	31.5257	X
Neutrasa.T240	3	35.957	X

ANEXO 4c. ANOVA Simple –GRADO DE HIDRÓLISIS por con enzima Flavourzyme

Variable dependiente: Grado de Hidrólisis (%)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 24

Número de niveles: 8

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	144.536	7	20.648	452.43	0.0000
Intra grupos	0.730217	16	0.0456385		
Total (Corr.)	145.266	23			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Flav.T10	3	2.19333	X
Flav.T20	3	4.10367	X
Flav.T30	3	4.56333	XX
Flav.T60	3	4.83533	X
Flav.T90	3	7.748	X
Flav.T120	3	8.13667	XX
Flav.T180	3	8.50167	X
Flav.T240	3	9.62733	X

ANEXO 4d. ANOVA Simple –GRADO DE HIDRÓLISIS con Neutrasa seguida de Flavourzyme

Variable dependiente: Grado de Hidrólisis (%)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 24

Número de niveles: 8

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1815.94	7	259.419	985.91	0.0000
Intra grupos	4.21003	16	0.263127		
Total (Corr.)	1820.15	23			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Neut Flav.T10	3	14.5373	X
Neut Flav.T20	3	19.63	X
Neut Flav.T30	3	22.8343	X
Neut Flav.T60	3	25.7017	X
Neut Flav.T90	3	28.7767	X
Neut Flav.T120	3	34.2153	X
Neut Flav.T180	3	38.863	X
Neut Flav.T240	3	40.8473	X

ANEXO 4e. ANOVA Simple –GRADO DE HIDRÓLISIS con Neutrasa seguida de Alcalasa

Variable dependiente: Grado de Hidrólisis (%)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 24

Número de niveles: 8

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2734.07	7	390.582	1469.78	0.0000
Intra grupos	4.25186	16	0.265741		
Total (Corr.)	2738.33	23			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Neu Alc.T10	3	13.8307	X
Neu Alc.T20	3	17.59	X
Neu Alc.T30	3	19.9873	X
Neu Alc.T60	3	23.5797	X
Neu Alc.T90	3	28.2717	X
Neu Alc.T120	3	33.5037	X
Neu Alc.T180	3	42.1923	X
Neu Alc.T240	3	44.932	X

ANEXO 4f. ANOVA Simple –GRADO DE HIDRÓLISIS con Alcalasa seguida de Neutrasa

Variable dependiente: Grado de Hidrólisis (%)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 24

Número de niveles: 8

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2384.86	7	340.694	1462.95	0.0000
Intra grupos	3.72611	16	0.232882		
Total (Corr.)	2388.59	23			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Alc Neu.T10	3	13.261	X
Alc Neu.T20	3	21.0257	X
Alc Neu.T30	3	23.7793	X
Alc Neu.T60	3	26.867	X
Alc Neu.T90	3	28.8297	X
Alc Neu.T120	3	33.8253	X
Alc Neu.T180	3	39.6663	X
Alc Neu.T240	3	46.7557	X

ANEXO 4g. ANOVA Simple –GRADO DE HIDRÓLISIS con Alcalasa seguida de Flavourzyme

Variable dependiente: Grado de Hidrólisis (%)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 24

Número de niveles: 8

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4786.05	7	683.721	3180.49	0.0000
Intra grupos	3.43958	16	0.214974		
Total (Corr.)	4789.49	23			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Alc Flav.T10	3	13.967	X
Alc Flav.T20	3	20.6413	X
Alc Flav.T30	3	23.3927	X
Alc Flav.T60	3	27.068	X
Alc Flav.T90	3	28.8207	X
Alc Flav.T120	3	36.3667	X
Alc Flav.T180	3	46.6243	X
Alc Flav.T240	3	60.2817	X

ANEXO 5: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

ANEXO 5a. ANOVA Simple –CAPACIDAD ANTIOXIDANTE con Alcalasa

Variable dependiente: Capacidad Antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 27

Número de niveles: 9

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	15.4869	8	1.93586	695.02	0.0000
Intra grupos	0.050136	18	0.00278533		
Total (Corr.)	15.537	26			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Alcalasa- T0	3	0.639333	X
Alcalasa- T10	3	1.64967	X
Alcalasa- T20	3	1.72733	X
Alcalasa- T30	3	1.89367	X
Alcalasa- T60	3	2.026	X
Alcalasa- T90	3	2.40033	X
Alcalasa- T120	3	2.866	X
Alcalasa- T180	3	2.954	X
Alcalasa- T240	3	3.22167	X

ANEXO 5b. ANOVA Simple –CAPACIDAD ANTIOXIDANTE con Neutrasa

Variable dependiente: Capacidad Antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/mg prote\u00edna}$)

Factor: Tratamientos Enzim\u00e1ticos

N\u00famero de observaciones: 27

N\u00famero de niveles: 9

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Raz\u00f3n-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	5.12181	8	0.640226	1913.03	0.0000
Intra grupos	0.006024	18	0.000334667		
Total (Corr.)	5.12783	26			

El Stat Advisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La raz\u00f3n-F, que en este caso es igual a 1913.03, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estad\u00edsticamente significativa entre la media de Capacidad Antioxidante entre un nivel de Tratamiento Enzim\u00e1tico y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Pruebas de M\u00faltiple Rangos

M\u00e9todo: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homog\u00e9neos</i>
Neutrasa- T0	3	0.527333	X
Neutrasa- T10	3	1.14233	X
Neutrasa- T20	3	1.27233	X
Neutrasa- T30	3	1.50467	X
Neutrasa- T60	3	1.645	X
Neutrasa- T90	3	1.71	X
Neutrasa- T120	3	1.88367	X
Neutrasa- T180	3	1.92333	X
Neutrasa- T240	3	1.936	X

ANEXO 5c. ANOVA Simple –CAPACIDAD ANTIOXIDANTE con Flavourzyme

Variable dependiente: Capacidad Antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 27

Número de niveles: 9

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4.15746	8	0.519683	2775.75	0.0000
Intra grupos	0.00337	18	0.000187222		
Total (Corr.)	4.16083	26			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Flavourzyme T0	3	0.0863333	X
Flavourzyme T10	3	0.219333	X
Flavourzyme T20	3	0.411667	X
Flavourzyme T30	3	0.440667	X
Flavourzyme T60	3	0.685333	X
Flavourzyme T90	3	1.00033	X
Flavourzyme T120	3	1.054	X
Flavourzyme T180	3	1.11	X
Flavourzyme T240	3	1.195	X

ANEXO 5d. ANOVA Simple –CAPACIDAD ANTIOXIDANTE con Neutrasa seguida de Flavourzyme

Variable dependiente: Capacidad Antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 27

Número de niveles: 9

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	5.07204	8	0.634006	1377.94	0.0000
Intra grupos	0.008282	18	0.000460111		
Total (Corr.)	5.08033	26			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Neut Flav T0	3	0.605667	X
Neut Flav T10	3	1.192	X
Neut Flav T20	3	1.22733	X
Neut Flav T30	3	1.558	X
Neut Flav T60	3	1.639	X
Neut Flav T90	3	1.77633	X
Neut Flav T120	3	1.87233	X
Neut Flav T180	3	1.98433	X
Neut Flav T240	3	2.01433	X

ANEXO 5e. ANOVA Simple –CAPACIDAD ANTIOXIDANTE con Neutrasa seguida de Alcalasa

Variable dependiente: Capacidad Antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 27

Número de niveles: 9

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	7.68955	8	0.961194	1532.82	0.0000
Intra grupos	0.0112873	18	0.000627074		
Total (Corr.)	7.70084	26			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Neu Alc T0	3	0.582333	X
Neu Alc T10	3	1.176	X
Neu Alc T20	3	1.311	X
Neu Alc T30	3	1.49233	X
Neu Alc T60	3	1.61	X
Neu Alc T90	3	1.73333	X
Neu Alc T120	3	1.947	X
Neu Alc T180	3	2.21267	X
Neu Alc T240	3	2.46067	X

ANEXO 5f. ANOVA Simple –CAPACIDAD ANTIOXIDANTE con Alcalasa seguida de Neutrasa

Variable dependiente: Capacidad Antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 27

Número de niveles: 9

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	12.4265	8	1.55332	1082.56	0.0000
Intra grupos	0.0258273	18	0.00143485		
Total (Corr.)	12.4524	26			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Alc Neu T0	3	0.635333	X
Alc Neu T10	3	1.60967	X
Alc Neu T20	3	1.76033	X
Alc Neu T30	3	1.91767	X
Alc Neu T60	3	2.12133	X
Alc Neu T90	3	2.241	X
Alc Neu T120	3	2.39567	X
Alc Neu T180	3	2.77367	X
Alc Neu T240	3	3.12833	X

ANEXO 5g. ANOVA Simple –CAPACIDAD ANTIOXIDANTE con Alcalasa seguida de Flavourzyme

Variable dependiente: Capacidad Antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/mg proteína}$)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 27

Número de niveles: 9

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	16.3612	8	2.04515	1284.79	0.0000
Intra grupos	0.0286527	18	0.00159181		
Total (Corr.)	16.3899	26			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Alc Flav T0	3	0.651	X
Alc Flav T10	3	1.692	X
Alc Flav T20	3	1.82	X
Alc Flav T30	3	1.944	X
Alc Flav T60	3	2.03633	X
Alc Flav T90	3	2.22933	X
Alc Flav T120	3	2.35767	X
Alc Flav T180	3	3.13433	X
Alc Flav T240	3	3.497	X

ANEXO 6: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE INHIBICIÓN DE LA ECA - I

ANEXO 6a. ANOVA Simple –INHIBICIÓN DE LA ECA - I por Tratamiento Enzimático

Variable dependiente: Inhibición de la ECA - I (%)

Factor: Tratamiento Enzimático

Número de observaciones: 42

Número de niveles: 21

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	17775.2	20	888.76	413.24	0.0000
Intra grupos	45.165	21	2.15071		
Total (Corr.)	17820.4	41			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Flavourzyme 120	2	0.0	X
Flavourzyme 180	2	2.0	XX
Flavourzyme 240	2	4.25	X
Neutrasa Flavourzyme 240	2	33.2	X
Alcalasa Flavourzyme 120	2	45.65	X
Alcalasa 120	2	45.65	X
Alcalasa Neutrasa 120	2	45.65	X
Neutrasa Flavourzyme 180	2	47.35	X
Neutrasa 120	2	48.3	X
Neutrasa Flavourzyme 120	2	48.3	X
Neutrasa Alcalasa 120	2	48.3	X
Alcalasa 180	2	55.05	X
Alcalasa Flavourzyme 240	2	56.7	X
Alcalasa Flavourzyme 180	2	57.0	X
Neutrasa 180	2	61.15	X
Alcalasa 240	2	62.95	X
Neutrasa Alcalasa 240	2	63.29	X
Neutrasa 240	2	64.4	XX
Alcalasa Neutrasa 240	2	67.0	XX
Alcalasa Neutrasa 180	2	69.1	X
Neutrasa Alcalasa 180	2	69.2	X

ANEXO 6b. ANOVA Simple – IC₅₀ por Tratamiento Enzimático

Variable dependiente: IC₅₀ (mg de proteína/ml)

Factor: Tratamientos Enzimáticos

Número de observaciones: 36

Número de niveles: 18

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2.96123	17	0.17419	263.80	0.0000
Intra grupos	0.0118857	18	0.000660317		
Total (Corr.)	2.97312	35			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Neutrasa Alcalasa 180	2	0.1201	X
Alcalasa Neutrasa 240	2	0.1343	X
Neutrasa Alcalasa 240	2	0.1409	X
Alcalasa Neutrasa 180	2	0.15845	X
Neutrasa 240	2	0.31765	X
Alcalasa 240	2	0.3211	X
Alcalasa Flavourzyme 180	2	0.34945	X
Alcalasa Flavourzyme 240	2	0.34955	X
Neutrasa 180	2	0.3503	X
Alcalasa 180	2	0.4614	X
Neutrasa Alcalasa 120	2	0.5117	X
Neutrasa 120	2	0.5117	X
Neutrasa Flavourzyme 120	2	0.5117	X
Alcalasa Neutrasa 120	2	0.6151	X
Alcalasa Flavourzyme 120	2	0.6151	X
Alcalasa 120	2	0.6151	X
Neutrasa Flavourzyme 180	2	0.63735	X
Neutrasa Flavourzyme 240	2	1.3981	X

ANEXO 6c. ANOVA Simple –INHIBICIÓN DE LA ECA - I por Tratamiento Enzimático en la evaluación de la digestibilidad *in vitro*

Variable dependiente: Inhibición de la ECA - I (%)

Factor: Tratamiento Enzimático

Número de observaciones: 6

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	32.7233	2	16.3617	6.48	0.0814
Intra grupos	7.57	3	2.52333		
Total (Corr.)	40.2933	5			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Neutrasa Alcalasa NA 180	2	69.2	X
N A Pepsina	2	71.25	XX
N A Pepsina Pancreatina	2	74.85	X

ANEXO 6d. ANOVA Simple –IC₅₀ por Tratamiento Enzimático en la evaluación de la digestibilidad *in vitro*

Variable dependiente: IC₅₀ (mg/ml)

Factor: Tratamiento Enzimático

Número de observaciones: 6

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.00274808	2	0.00137404	1.71	0.3194
Intra grupos	0.00241001	3	0.000803337		
Total (Corr.)	0.00515809	5			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Duncan

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
N A Pepsina Pancreatina	2	0.06935	X
N A Pepsina	2	0.08335	X
Neutralsa Alcalasa	2	0.1201	X