

MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL  
CONCENTRADO PROTEÍNICÓ DE  
*VIGNA UNGUICULATA* PARA SU  
INCORPORACIÓN A UN ALIMENTO  
PARA RÉGIMEN ESPECIAL

---

**Lucía Espinosa-García, Luis Chel-Guerrero,  
Santiago Gallegos-Tintoré, Arturo Castellanos-Ruelas,  
David Betancur-Ancona\***

Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida,  
Yucatán, México.

[bancona@correo.uady.mx](mailto:bancona@correo.uady.mx)\*

<https://doi.org/10.3926/oms.326>

Espinosa-García, L., Chel-Guerrero, L., Gallegos-Tintoré, S., Castellanos-Ruelas, A., & Betancur-Ancona, D. (2016). Modificación enzimática del concentrado proteínico de *Vigna unguiculata* para su incorporación a un alimento para régimen especial. En M.E. Ramírez Ortiz (Ed.). *Alimentos Funcionales de Hoy*. Barcelona, España: OmniaScience. 219-246.

## Resumen

Los hidrolizados proteínicos son utilizados ampliamente en la industria alimentaria debido a que presentan mejores características nutrimentales y funcionales (solubilidad, poder emulsificante, capacidad espumante) comparativamente con la proteína nativa. El objetivo de este trabajo fue hidrolizar enzimáticamente la proteína de *Vigna unguiculata*, mediante la acción independiente de proteasas comerciales (Alcalase<sup>MR</sup> y Flavourzyme<sup>MR</sup>), realizándose la reacción a 50°C y pH 8.0. De cada cinética se seleccionó el producto con mayor grado de hidrólisis (GH), estimado por el método de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético. A los dos productos elegidos, se les evaluó su solubilidad de nitrógeno, hidrofobicidad superficial, perfil electroforético y digestibilidad aparente. Asimismo, se incorporaron de manera individual, en concentrados de horchata a los cuales se les determinó su caracterización proximal y fueron evaluados sensorialmente por personas de la tercera edad. Los hidrolizados enzimáticos de *Vigna unguiculata* seleccionados para su estudio fueron los obtenidos tras 60 min de hidrólisis cuyo GH fueron de 7.27% para el elaborado con Flavourzyme<sup>MR</sup> (HF) y 23.61% con Alcalase<sup>MR</sup> (HA). En cuanto a la solubilidad de nitrógeno se encontró que HF presentó mayores valores (93.67%) con respecto al preparado con HA (34.35%). La hidrofobicidad superficial (Ho) de HF fue mayor (291.52) que la presentada por HA (30.18). De igual manera, HA presentó mayor número de bandas (60, 51, 37, 31, 24 y 21 kDa) respecto a las encontradas en HF (60, 40, 30 y 22 kDa). La digestibilidad aparente de ambos hidrolizados fue alta (99%) y semejante a la obtenida con caseína (99%). La evaluación sensorial de los concentrados de horchata (bebida refrescante a base de arroz) enriquecidos con los hidrolizados proteínicos de *Vigna unguiculata* indicó que estos presentaron calificaciones dentro de los niveles de aceptación. El contenido proteínico de estos alimentos fue enriquecido hasta niveles del 4.8%. Tanto la solubilidad presentada por HF, así como la alta digestibilidad de ambos hidrolizados (HA y HF), aunado a las calificaciones obtenidas en la evaluación sensorial, hacen recomendable y factible la inclusión de éstos hidrolizados en alimentos dirigidos a individuos con dificultades de absorción de proteínas, como es el caso de las personas de la tercera edad así como en fórmulas infantiles.

## Palabras clave

*Vigna unguiculata*, hidrolizados proteínicos, digestibilidad, régimen especial.

## 8.1. Introducción

Los alimentos son materiales biológicos constituidos por sustancias químicas complejas que los seres humanos ingieren de manera continua y directa. Los productos procedentes de animales, como carne, leche de vaca y huevo así como los de origen vegetal, como soya y nueces, son conocidos como buenas fuentes proteínicas. Sin embargo, debido a que las proteínas animales generalmente contienen grandes cantidades de grasa saturada, el consumo de alimentos provenientes de vegetales es recomendado para reducir los riesgos de ciertas enfermedades coronarias. Esto, aunado a la reducción de fuentes alimentarias, ha favorecido la búsqueda de nuevas alternativas proteínicas de origen poco convencional (Yoshie-Stark & Wäsche, 2004).

Las leguminosas representan una fuente rica en carbohidratos y proteínas, las cuales son cada vez más utilizadas en la industria alimenticia debido a que resultan ser una alternativa para sustituir o complementar a las proteínas animales tan importantes en la nutrición humana (Akinjayeju & Tolú, 2004)

La *Vigna unguiculata* ha sido reconocida como una fuente importante de proteínas, carbohidratos y otros nutrimentos como fibra, algo de grasa, vitaminas del complejo B y minerales, a individuos de los países en vías de desarrollo, donde funciona como fuente económica de proteína en lugar de otras más caras como las proteínas animales. Sus granos contienen 20-35% de proteína y es especialmente rica en lisina y otros aminoácidos esenciales, excepto aquellos azufrados (Cai, Hettiarachchy & Jalaluddin, 2003). Es ampliamente cosechada en el Estado de Yucatán, sin embargo, debe tenerse en cuenta que el consumo de proteínas vegetales en su estado nativo, se encuentra limitado debido a su baja digestibilidad y su carácter potencialmente alergénico. Es por esto que resulta relevante buscar procesos que permitan explotarla como materia prima en el desarrollo de nuevos productos y que ayuden a mejorar sus características funcionales para facilitar su incorporación en sistemas alimenticios de consumo humano (Freitas, Teixeira & Ferreira, 2004).

A pesar del alto contenido proteínico (20-30%), de la *Vigna unguiculata* su uso en alimentos para ancianos y niños se ha restringido por la presencia de oligosacáridos indigeribles que inducen flatulencias, particularmente rafinosa y estaquiosa, así como la presencia de factores antinutrimientales. Una de las alternativas para combatir este problema, es el cultivo o técnicas de biología molecular o el procesamiento de los granos por métodos específicos, como es el caso de la hidrólisis

enzimática con la cual se pueden obtener productos nutracéuticos (Uwaegbute, Iroegbu, & Eke, 2000).

La modificación parcial, del tipo hidrolítica, de la estructura proteínica mediante el empleo de proteasas, puede contribuir al desarrollo de nuevos productos proteínicos con características nutrimentales o funcionales definidas. Los hidrolizados enzimáticos han sido empleados para muchos propósitos, como por ejemplo para reducir la alergenicidad de la proteína, producir péptidos bioactivos, conseguir requerimientos para dietas específicas o para mejorar sus propiedades funcionales (Doucet, Otter, Gauthier & Foegeding, 2003). Este proceso es realizado en condiciones moderadas de pH y temperatura (pH 5-9; 40-60°C) lo cual ayuda a conservar la calidad de la proteína. Particularmente es empleada para incrementar el índice de solubilidad de nitrógeno (ISN) en un intervalo amplio de pH así como para mejorar otras propiedades funcionales de las proteínas. La hidrólisis proteínica conduce un gran número de alteraciones en las características funcionales de la proteína, como viscosidad, sabor y propiedades de formar espuma y emulsión, entre otras. Estos parámetros funcionales son importantes para la aplicación de los hidrolizados en productos alimentarios y en la formulación de productos farmacéuticos y especiales para aplicaciones clínicas (Tardioli, Fernández-Lafuente, Guisán & Giordano, 2003).

La incorporación de hidrolizados proteínicos en las formulaciones alimenticias permite desarrollar productos para uso general o para personas con requerimientos especiales como podría ser el caso de personas de la tercera edad, deportistas, niños, etc. Estos hidrolizados son considerados benéficos para pacientes que sufren de desórdenes digestivos como fibrosis cística o síndrome de intestino corto o pueden utilizarse en dietas altas en proteínas en casos de desnutrición. Además, los hidrolizados libres de fenilalanina podrían ser ingeridos por pacientes con fenilcetonuria previniendo las lesiones cerebrales resultantes (Tardioli et al., 2003). Sin embargo, durante el proceso de hidrólisis de proteínas pueden llegar a producirse sabores amargos indeseables que limitan la aplicación del hidrolizado como aditivo en la formulación de productos alimenticios. No obstante, el uso de proteasas comerciales específicas como la Alcalase<sup>MR</sup> y Flavourzyme<sup>MR</sup> disminuye dicha característica en los hidrolizados lo cual depende básicamente del grado de hidrólisis. Con base en lo expuesto, en el presente trabajo se obtuvieron hidrolizados proteínicos de *Vigna unguiculata* mediante esas proteasas para su incorporación en un alimento para régimen especial destinado a personas de la tercera edad, evaluando sensorialmente el nivel de agrado de los productos desarrollados.

## 8.2. Materiales y métodos

### 8.2.1. *Obtención de la harina de Vigna unguiculata*

Se utilizaron granos secos de *Vigna unguiculata* provenientes de la cosecha del municipio de Umán, Yucatán, México. Los granos de frijol fueron sometidos a secado solar durante 8 h. Posteriormente se quebraron en un molino manual de rodillos y se les realizó una separación de partículas con aire comprimido con el objeto de eliminar la cáscara del grano. Finalmente, los granos quebrados y limpios se molieron en un equipo Cyclotec (Tecator) para obtener una harina con tamaño de partícula de 0.5 mm.

### 8.2.2. *Obtención del concentrado proteínico de Vigna unguiculata*

Se utilizó una modificación de los métodos reportados por Segura-Campos, Chel-Guerrero y Betancur-Ancona (2011). Se procesó la harina suspendiéndola en agua destilada en una relación 1:6 p/v (harina-agua), se ajustó el pH de la suspensión a 11 con NaOH 1N y se agitó a 400 rpm por 1 h con un agitador mecánico (Caframo RZ-1 marca Heidolph). Posteriormente, la suspensión se pasó secuencialmente a través de dos tamices malla 80 y 100 (0.190 y 0.140 mm de abertura de poro, respectivamente) para separar el bagazo (rico en fibra) de la mezcla de almidón y proteína. Este bagazo se lavó con agua destilada en una relación 1:1 p/v (bagazo-agua) recuperando el agua de lavado que junto con el filtrado se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reposo, la suspensión lechosa (proteína en solución), se separó para obtener sedimento rico en almidón. A la proteína separada, se le ajustó el pH a 4.5 con HCl 1N, se centrifugó a  $1317 \times g$  por 12 min eliminando el sobrenadante y el precipitado se secó a  $-47^{\circ}\text{C}$  y  $13 \times 10^{-3}$  Mbars por 48 h en un liofilizador marca Labcono.

### 8.2.3. *Obtención del hidrolizado proteínico de Vigna unguiculata*

Se utilizó el método reportado por Segura-Campos et al. (2011). empleando un diseño de bloques aleatorios para preparar los hidrolizados, donde los bloques fueron las enzimas empleadas (Alcalase<sup>MR</sup> o Flavourzyme<sup>MR</sup>), el factor a evaluar fue el tiempo de reacción (5, 15, 30 y 60 min) y la variable de

respuesta fue el grado de hidrólisis. Se preparó una suspensión de concentrado proteínico (5 g de proteína en 250 ml de agua), se le ajustó el pH a 8 con NaOH 1N, se le adicionaron 25 mg de enzima y se realizó la reacción a 50°C, manteniéndose en agitación constante durante 1 h. Se tomaron muestras de 25 ml a los 5, 15, 30 y 60 min para la determinación del correspondiente grado de hidrólisis (GH). Los hidrolizados se prepararon utilizando individualmente las preparaciones enzimáticas. Para finalizar la hidrólisis, las proteasas se inactivaron mediante el calentamiento a 85°C durante 10 min. Se determinó el GH utilizando el método reportado por Kim, Byun, Park y Shahidi (2001). Este se estimó midiendo la cantidad de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 10% y su proporción con respecto a la cantidad de nitrógeno total en la suspensión de concentrado proteínico según la fórmula:

$$\%GH = \frac{\text{Nitrógeno soluble en TCA al 10\%}}{\text{Nitrógeno total}} \times 100$$

Para evaluar la cantidad de nitrógeno soluble en TCA se tomaron 10 ml del hidrolizado y se mezclaron con 10 ml de TCA al 20%. Esta mezcla se centrifugó a 12100  $\times$  g por 15 min y el nitrógeno presente en el sobrenadante se determinó por el método Kjeldahl (AOAC, 1997). El nitrógeno total se midió tomando 10 ml de una suspensión de proteína preparada de forma similar a la utilizada para desarrollar la hidrólisis enzimática pero sin la presencia de enzima y se le determinó el contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl (AOAC, 1997). En las determinaciones de nitrógeno se utilizó un sistema Kjeltex (Tecator, Sweden) y el método 954.01 de la AOAC (1997).

De acuerdo a las cinéticas de hidrólisis obtenidas, se seleccionaron las condiciones correspondientes al mayor grado de hidrólisis logrado con cada una de las enzimas empleadas. A estos hidrolizados se les determinó: la solubilidad de nitrógeno (Were, Hettiarachchy & Kalapathy, 1997) y perfil electroforético (Schagger & Jagow, 1987). Asimismo, se les evaluó su calidad nutrimental mediante la determinación del coeficiente de digestibilidad aparente (Calderón de la Barca, Medrano, Jara-Marini, González & Ruiz, 2000a). Finalmente, con los hidrolizados seleccionados se prepararon concentrados para elaborar horchata los cuales fueron evaluados sensorialmente por personas de la tercera edad y a los cuales se les determinó su composición proximal (AOAC, 1997).

#### 8.2.4. Solubilidad de nitrógeno

Se evaluó según el método propuesto por Were et al. (1997). Se prepararon 25 ml de una suspensión del hidrolizado al 0.5% (base seca), se ajustó el pH (2, 4, 6, 8, 10) con NaOH 0.01 N y HCl 0.01 N y se mantuvo en agitación durante 30 min. Posteriormente se centrifugaron a 4320 *xg* durante 30 min. y se tomaron 20 ml del sobrenadante para la determinación del contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl (AOAC, método 954.01). La solubilidad de nitrógeno se expresó como el porcentaje de nitrógeno solubilizado con relación al contenido de nitrógeno de la muestra.

#### 8.2.5. Perfil electroforético de los hidrolizados proteínicos

El análisis electroforético en condiciones desnaturalizante (SDS-PAGE), se aplicó a los hidrolizados de *Vigna unguiculata* mediante la técnica de Schagger y Jagow (1987). Se colocó el gel separador (Tabla 37) hasta un nivel de aproximadamente 1 cm antes de la orilla de las placas de vidrio, donde se le colocó agua destilada para nivelar el gel, al cual ya solidificado, se le eliminó el agua de la superficie. A continuación, se vertió el gel concentrador (Tabla 37) y antes de que este solidificara se colocaron los peines para la formación de los pocillos los cuales se retiraron al solidificar el gel.

	Gel separador 10%	Gel concentrador
Acris-bis (ml)	2.0	0.7
Regulador de gel (ml)	3.3	1.35
Glicerol (g)	1.3	–
Agua (ml)	3.3	4.0
Persulfato de amonio (μl)*	50	32
TEMED (μl)	8	8

\*Solución al 10%.

Tabla 37. Relación y cantidad de reactivos para la preparación de geles.

Para la conducción de la corriente eléctrica durante el proceso de electroforesis, se emplearon las soluciones del Ánodo y Cátodo, las cuales fueron colocadas en la cubeta de electroforesis que contenía las placas de vidrio con el gel. Para la determinación de los pesos moleculares (PM) de los hidrolizados, se tomó 1  $\mu\text{g}$  de cada uno de los hidrolizados y se disolvieron en 200  $\mu\text{l}$  de buffer de muestra y se colocaron 4  $\mu\text{l}$  de esta solución por pozo. Asimismo, se inyectaron 5  $\mu\text{l}$  de un estándar de pesos moleculares preteñido de bajo rango para SDS-PAGE Biorad (Cat. 161-0305) compuesto por las siguientes proteínas: Fosforilasa b (103 kDa), Albúmina sérica bovina (77 kDa), Ovalbúmina (50 kDa), Anhidrasa carbónica (34.3 kDa), Inhibidor de tripsina (28.8 kDa) y Lisozima (20.7 kDa). El proceso de electroforesis se realizó con una corriente constante de 20 mA/gel con una fuente de poder durante 1.15 h. Terminada la electroforesis, los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie al 0.10% en agua:metanol:ácido acético en una relación 4:1:5 (v/v/v) durante 30 min en constante agitación. Posteriormente se decoloraron con una mezcla de agua:ácido acético:metanol en una relación 5:1:2 (v/v/v) durante 24 h. Para la estimación de los PM, primero se procedió a medir las distancias desde el inicio de la separación hasta el final de la misma para tener el valor que se llamó  $b$ , seguidamente se midió la distancia desde el inicio hasta la primera banda del estándar y el valor de esa distancia se llamó  $a$ , se calculó el valor de  $a$  en todas las bandas del estándar para posteriormente calcular el RF que es igual a la razón de  $a/b$ . Con los valores de RF calculados se realizó una regresión lineal graficando en el eje de las ordenadas el valor logarítmico del peso molecular en el eje de las abscisas el RF correspondiente para cada banda. Se calcularon los RF de las bandas de proteína de las fracciones y se interpolaron los valores en la ecuación, obteniendo así la estimación de los PM.

### **8.2.6. Digestibilidad aparente (DA)**

Se determinó realizando una adaptación del método utilizado por Calderón de la Barca et al. (2000a). Se prepararon las dietas las cuales difirieron en su contenido y fuente proteínica tal como se indica en el (Tabla 38).

Para este estudio se utilizaron 24 ratas machos Sprague Dawley de 24 a 31 días, cuyos pesos variaron de acuerdo a la edad (99-130 g), las cuales fueron colocadas en jaulas individuales, a 25 °C, con ciclos luz-oscuridad de 12 h, humedad relativa de 50-65% y libre acceso a dieta con caseína y agua durante 7 días de adaptación. Tras esta fase, las ratas fueron aleatorizadas, en 4 grupos de 6 ratas

Ingredientes (g)	Dietas			
	SP	C	HA (64%)	HF (64%)
Hidrolizado de <i>Vigna unguiculata</i>	0.00	10.0	15.6	15.6
Glucosa (dextrosa)	15.0	15.0	15.0	15.0
Almidón de maíz	76.9	67.9	61.2	61.2
Aceite de maíz	5.0	5.0	5.0	5.0
Celulosa	2.0	2.0	2.0	2.0
Mezcla de vitaminas <sup>a</sup>	0.5	0.5	0.5	0.5
Mezcla de minerales <sup>b</sup>	0.6	0.6	0.6	0.6

<sup>a</sup>AIN-93-VX y <sup>b</sup>AIN-93M-MX, adquiridas de Harlan, México. SP) Dieta sin proteína; (HA) Dieta con hidrolizado con Alcalase<sup>MR</sup>; (HF) Dieta con hidrolizado con Flavourzyme<sup>MR</sup>; (C) Dieta con caseína.

Tabla 38. Composición de las dietas experimentales (%).

cada uno (HA, HF, C y SP) para la asignación de la dieta a evaluar. Durante la etapa de experimentación se tomó diariamente el peso, proteína ingerida así como las heces con sus respectivos pesos. Asimismo, se determinó el contenido de nitrógeno en heces y dietas para evaluar la digestibilidad aparente, tal como se indica a continuación:

$$DA = 100 (I - F)$$

Donde:

I = N<sub>2</sub> ingerido

F = N<sub>2</sub> en heces

### 8.2.7. Obtención del producto a base de hidrolizado de *Vigna unguiculata*

Se elaboraron 3 concentrados de horchata de *Vigna unguiculata* (Tabla 39): uno sin la incorporación de fuente proteínica (SP) el cual sirvió como control con un

Ingredientes	Concentrado SP	Concentrado con HA	Concentrado con HF
Arroz (g)	41.8	41.8	41.8
Azúcar (g)	41.8	41.8	41.8
Agua purificada (ml)	15.6	15.6	15.6
Almendra pelada (g)	0.2	0.2	0.2
Vainilla (ml)	0.2	0.2	0.2
Canela (g)	0.4	0.4	0.4
Hidrolizado en seco (g)	–	3.0	3.0

(SP) sin proteína; (HA) con hidrolizado con Alcalase<sup>MR</sup>; (HF) con hidrolizado con Flavourzyme<sup>MR</sup>.

*Tabla 39. Formulación del concentrado de borchata con y sin hidrolizado proteínico de *Vigna unguiculata*.*

contenido proteínico de 2.3%, y dos concentrados más con la incorporación de los hidrolizados de *V. unguiculata* seleccionados tras la cinética de hidrólisis (HA y HF) de manera independiente, los cuales presentaron 4.8% de proteínas.

### **8.2.8. Evaluación sensorial de los productos obtenidos**

El análisis sensorial de los productos con hidrolizado proteínico de *Vigna unguiculata* se realizó en el Centro Geriátrico «La tercera edad», empleando como jueces afectivos 20 personas de la tercera edad (59 y 98 años), población a la cual se destinó el producto. En algunos casos, debido a la avanzada edad de las personas, así como diversas enfermedades de los mismos, la evaluación se realizó de manera gesticular, observando el comportamiento de las personas, así como su aceptación hacia el producto.

La prueba consistió en evaluar el nivel de agrado de los productos elaborados por parte de los panelistas mediante una escala hedónica de cinco puntos (5 = Me gusta mucho, 4 = Me gusta, 3 = Ni me gusta ni me disgusta, 2 = Me disgusta, 1 = Me disgusta mucho), en la cual los jueces probaron los dos productos obteni-

dos (con Flavourzyme<sup>MR</sup> y Alcalase<sup>MR</sup>) así como la bebida a base de concentrado de horchata sin hidrolizado (control).

### **8.2.9. Caracterización proximal de los productos obtenidos**

A las horchatas preparadas con los respectivos hidrolizados proteínicos se les determinó por triplicado: Humedad (925.09); Nitrógeno (954.01), este parámetro se determinó mediante el método Kjeldahl y el contenido de proteína se calculó como  $N \times 6.25$ ; Grasa cruda (920.39), empleando sistema Soxtec; Fibra cruda (956.09); Cenizas (923.03) y Carbohidratos totales como Extracto Libre de Nitrógeno (AOAC, 1997). Todos los análisis fueron realizados en la bebida diluida 1:5 (v/v, concentrado:agua), la cual para determinados análisis (grasa, fibra y cenizas) fue secada en estufa a 60°C. Para la evaluación del contenido proteínico, se empleó la dilución directamente.

### **8.2.10. Análisis estadístico**

Los resultados de las cinéticas enzimáticas de los hidrolizados proteínicos de *Vigna unguiculata* fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para bloques completos aleatorizados, donde las enzimas empleadas se consideraron como bloques y el factor a evaluar fueron los diferentes tiempos de reacción, para establecer diferencias estadística significativas ( $P < 0.05$ ). La solubilidad de los hidrolizados se evaluó mediante el estadístico de prueba *t* de Student con un 95% de confianza, para establecer diferencia entre ellos. La digestibilidad *in vivo*, se realizó mediante un ANOVA simple, para establecer la existencia de diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ). En cuanto a los resultados obtenidos de la prueba sensorial así como la caracterización proximal de los concentrados de horchata preparados, se analizaron mediante un ANOVA de una vía para un diseño completamente aleatorizado con la finalidad de determinar la existencia de diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre los tres productos. En los casos donde existió diferencia significativa ( $P < 0.05$ ), las comparaciones de las medias se analizaron mediante el método de la diferencia significativa mínima (DSM). Para realizar el análisis estadístico de todos los resultados, se empleó el paquete computacional Statgraphics plus versión 5.1.

### 8.3. Resultados y discusión

#### 8.3.1. Cinéticas de hidrólisis del concentrado proteínico de *Vigna unguiculata*

Se realizaron las cinéticas de hidrólisis del concentrado proteínico (CP) de *V. unguiculata* obteniéndose ocho hidrolizados cuyos grados de hidrólisis (GH) oscilaron entre 3.26% y 23.61%. El análisis de varianza (ANOVA) de los hidrolizados obtenidos con Alcalase<sup>MR</sup> y Flavourzyme<sup>MR</sup>, estableció que tanto la enzima añadida como el tiempo de reacción influyeron de manera significativa ( $P < 0.05$ ) sobre el grado de hidrólisis del concentrado proteínico de *V. unguiculata*. Al comparar las medias de los tratamientos, se pudo detectar que todos los GH resultantes de la hidrólisis fueron diferentes entre sí ( $P < 0.05$ ).

Como puede observarse en la Figura 22, la hidrólisis enzimática del CP con Alcalase<sup>MR</sup> se desarrolló rápidamente en el inicio y continuó en ascenso aun hasta los 60 min de la reacción. Con esta proteasa, se obtuvo un hidrolizado con 10.56% de GH en los primeros 5 min de incubación, el cual continuó hasta alcanzar 23.61% de GH al final del tiempo de reacción (60 min). Por otro lado, al

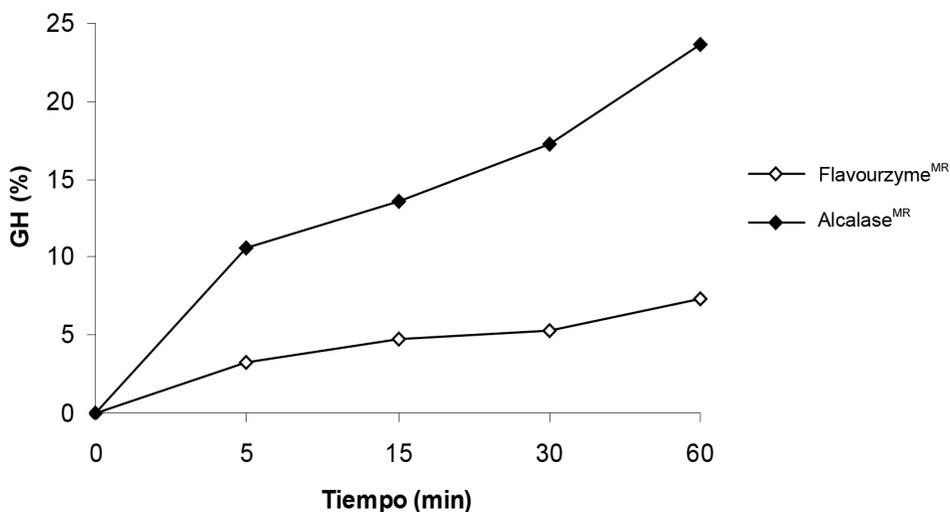


Figura 22. Cinéticas de hidrólisis del concentrado proteínico de *Vigna unguiculata* empleando dos proteasas comerciales.

emplear el preparado comercial Flavourzyme<sup>MR</sup> la cinética de hidrólisis fue más lenta desde el inicio, sin embargo, mostró constante incremento hasta el final de la hidrólisis (60 min). Con esta exoproteasa, se obtuvo un GH de 3.26% en los primeros 5 min de reacción incrementándose hasta llegar a 7.27% a los 60 min de incubación. Este comportamiento fue similar al observado por Betancur-Ancona, Martínez-Rosado, Corona-Cruz, Castellanos-Ruelas, Jaramillo-Flores y Chel-Guerrero (2009), quienes prepararon hidrolizados proteínicos de *Phaseolus lunatus* empleado las mismas enzimas (Alcalase<sup>MR</sup> y Flavourzyme<sup>MR</sup>) realizando la reacción a los 5, 10, 15 y 60 min. En este estudio, la reacción con Alcalase<sup>MR</sup> fue de 11%GH en los 5 primeros min de reacción incrementándose hasta 16.9%GH a los 60 min. Asimismo, con la Flavourzyme<sup>MR</sup> la hidrólisis fue de 2.8%GH en los primeros minutos terminando con 7.7% GH al final de la misma.

Por otra parte, Megías, Pedroche, Yust, Alaiz, Girón-Calle, Millán y Vioque (2009) realizaron la hidrólisis de la proteína de semillas de girasol con tres diferentes preparaciones, con la endoproteasa Alcalase<sup>MR</sup>, con Flavourzyme<sup>MR</sup> y una mezcla de ambas. Con la primera obtuvieron un hidrolizado de 34.7%GH, en tanto que con la segunda el GH fue de 42.2%, ambas después 180 min, que comparándola con la acción de la Alcalase<sup>MR</sup>, la hidrólisis fue más lenta, quizás por su actividad de exopeptidasa. Vioque, Sánchez-Vioque, Clemente, Pedroche, Bautista y Millán (1999), hidrolizaron durante 180 min semillas de rabino con una mezcla de endoproteasa (Alcalase<sup>MR</sup>) y exoproteasa (Flavourzyme<sup>MR</sup>) mediante el método pH-stat obteniendo 60% GH. En este mismo trabajo también se presentó un rápido incremento en el GH al emplear Alcalase<sup>MR</sup> en los primeros minutos de la reacción en tanto que con la Flavourzyme<sup>MR</sup> la hidrólisis fue más lenta debido probablemente a la actividad de exoproteasa de esta preparación comercial.

Como es bien sabido, la generación de hidrolizados proteínicos favorece la producción de péptidos amargos que limitan su uso en los alimentos. Vioque et al. (1999), en su estudio sobre semillas de rabino, señalaron que la presencia de sabor amargo parece ser producida por la exposición de residuos hidrofóbicos como consecuencia de la hidrólisis proteínica. Sin embargo, en otras investigaciones se ha reportado que la producción de estos péptidos puede reducirse mediante el uso de exopeptidasas, tal como ocurrió en un estudio sobre hidrolizados de huevo de gallina, donde Cigić & Zelenik-Blatnik (2004), reportaron que el uso de exopeptidasas como Flavourzyme<sup>MR</sup> redujo el sabor amargo de los hidrolizados en comparación de aquellos producidos con Alcalase<sup>MR</sup>. Es por todo esto, que en el presente trabajo se decidió determinar la hidrofobicidad superficial de los hi-

hidrolizados seleccionados para evaluar la presencia de péptidos amargos así como para establecer si la intensidad del sabor amargo de los péptidos fraccionados dependió del grado de hidrólisis obtenido.

Desde una perspectiva clínica, las nuevas tecnologías de obtención de hidrolizados proteínicos a partir de fuentes no convencionales de proteínas, podrían aportar soluciones a muchos aspectos de la terapéutica nutricional. Es por esto que para evaluar las características y propiedades de los hidrolizados proteínicos de *Vigna unguiculata* obtenidos con las dos proteasas comerciales evaluadas y de acuerdo a las cinéticas de hidrólisis obtenidas, se decidió emplear, de manera independiente, los hidrolizados con mayor GH derivados de la reacción a los 60 min (HA y HF) para su caracterización e incorporación en la elaboración de un producto destinado a situaciones en las que resulte necesario un mayor grado de hidrólisis de la fuente proteínica como es el caso de la alimentación en personas de la tercera edad tal como lo señalan Morris, Almarales, Carrillo y Abdala (2001) en su estudio sobre hidrolizados enzimáticos de *Chlorella vulgaris*.

### **8.3.2. Solubilidad de nitrógeno**

Se obtuvieron las curvas correspondientes a la solubilidad de nitrógeno (Figura 23) de los dos hidrolizados seleccionados (HA y HF) así como del concentrado proteínico de *Vigna unguiculata* (CPV) a diferentes valores de pH (2, 4, 6, 8 y 10). Como se puede observar, la solubilidad del hidrolizado con Alcalase<sup>MR</sup> (HA) presentó valores que se encontraron entre 29.05% y 34.35%, en tanto que para el hidrolizado con Flavourzyme<sup>MR</sup> (HF) esta propiedad funcional osciló entre 27.18% y 93.67%. De acuerdo a la t de Student aplicada a esta propiedad funcional, se detectó que éste parámetro es directamente dependiente ( $P < 0.05$ ) de la enzima que se emplee durante la modificación de la proteína del x'pelón.

En la Figura 23, se puede ver que las tres curvas realizadas presentaron el patrón típico de solubilidad en forma de «V» siendo la menos pronunciada la obtenida con HA. Megías et al. (2009), en su trabajo sobre hidrolizados proteínicos de las semillas de girasol, mencionan que algunos hidrolizados proteínicos exhiben alta solubilidad a través de un amplio intervalo de pH y temperaturas, a diferencia de las proteínas nativas que poseen baja solubilidad en los valores de pH alrededor del punto isoeléctrico y altas temperaturas. Este comportamiento, se pudo detectar en este estudio, ya que las menores solubilidades obtenidas se encontraron

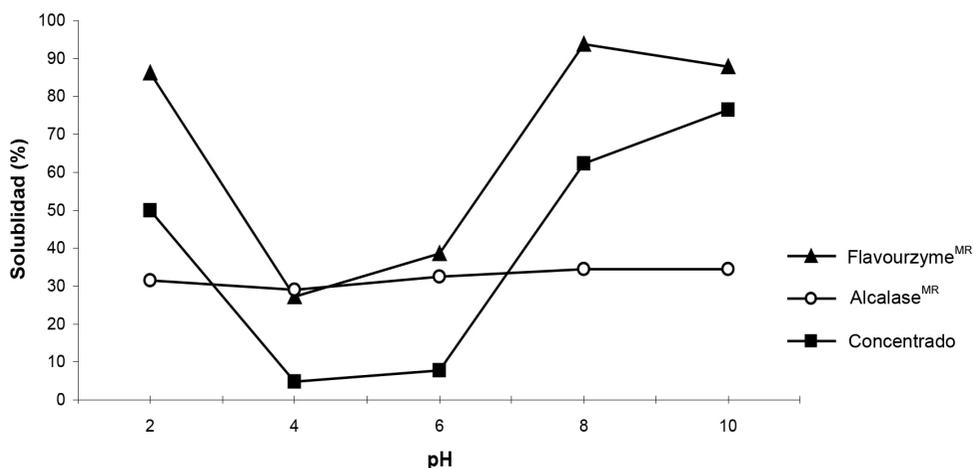


Figura 23. Solubilidad de nitrógeno del concentrado e hidrolizados proteínicos de *Vigna unguiculata*.

en los valores de pH de 4.0 y 6.0, rango cercano al punto isoeléctrico de las proteínas provenientes de leguminosas, siendo efectivamente, la curva obtenida con CPV la que arrojó menor solubilidad. Esta poca solubilidad, presentada en ciertos valores de pH de los hidrolizados, es un factor muy importante que podría limitar el uso de este tipo de productos al incorporarlo en algún alimento con este rango de pH, ya que pudiese ocasionar una apariencia poco atractiva y una sensación arenosa en la boca al degustar el producto final de acuerdo a lo reportado por Kristinsson y Rasco (2000) en su trabajo sobre la hidrólisis enzimática del músculo de salmón.

Por otra parte, a pH's ácidos los hidrolizados con HA y HF presentaron valores de solubilidad de nitrógeno del 29% y 27%, respectivamente, en tanto que el menor valor fue obtenido por el CPV (4%). En cuanto al rango de pH alcalinos, tanto los hidrolizados proteínicos (HA y HF) como la proteína nativa presentaron los mayores valores de solubilidad (34%, 87% y 78%, respectivamente), comportamiento también reportado en un trabajo sobre las gluteínas de las semillas de guayaba (Bernardino-Nicanor, Añón, Scilingo & Dávila-Ortíz, 2005). Asimismo, Mimouni, Azanza y Raymond (1999) en sus trabajos sobre hidrolizados de gluten y diferentes fuentes proteínicas, reportaron que este incremento en la solubilidad en los diferentes rangos de pH puede ser influenciado no solamente por el grado de hidrólisis alcanzado, sino también por los cambios presentados en los péptidos resultantes de la modificación enzimática de la proteína entre los

que se pueden mencionar la alteración de su peso molecular, cambios en su carga neta, hidrofobicidad, así como cambios conformacionales debido a los diferentes modos de acción de las proteasas. En este sentido, en el presente trabajo se puede observar que el hidrolizado obtenido con Flavourzyme<sup>MR</sup>, presentó mayor solubilidad a pH 2, 6, 8 y 10, en comparación con los obtenidos con la endoproteasa Alcalase<sup>MR</sup>.

Como es bien sabido, la solubilidad de nitrógeno es una de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas, de modo que la pérdida de ésta ha sido empleada como un indicador de la pérdida de funcionalidad tal como lo mencionan Bernardino-Nicanor et al. (2005). Por lo que debe resaltarse que el incremento de solubilidad de nitrógeno presentada por ambos hidrolizados, especialmente con el obtenido con Flavourzyme<sup>MR</sup>, es un comportamiento que favorece y facilita la incorporación de éstos productos en ciertos sistemas alimentarios: bebidas fortificadas, suplementos para deportistas o ancianos así como en jugos de frutas tal como lo mencionan Calderón de la Barca, Ruiz-Salazar & Jara-Marini (2000b) en su estudio sobre hidrolizados proteínicos de soya.

### **8.3.3. Perfil electroforético de los hidrolizados proteínicos**

La degradación de las proteínas ocurrida durante la hidrólisis enzimática del concentrado proteínico de *V. unguiculata* fue verificada mediante su análisis electroforético (Figura 24). Como puede observarse, el concentrado proteínico (CPV) mostró bandas con pesos moleculares (PM) de 112, 84, 68, 55, 48, 34, 29 y 26 kDa. La electroforesis realizada, reveló que los hidrolizados presentaron marcada diferencia en sus PM siendo el HA el que presentó mayor número de bandas comparado con las bandas obtenidas con Flavourzyme<sup>MR</sup>, lo cual se esperaba debido al mayor GH obtenido con la proteasa Alcalase<sup>MR</sup>. Estos resultados son similares a los encontrados por Bandyopadhyay y Ghosh (2004) respecto a que la hidrólisis de la proteína produce péptidos de menor tamaño molecular y a lo reportado por Kristinsson y Rasco (2000) quienes indican que esta conducta está asociada con la especificidad de las enzimas empleadas sobre sustratos específicos.

La electroforesis realizada, reveló que los hidrolizados presentaron marcada diferencia en sus PM siendo el HA el que presentó mayor número de bandas

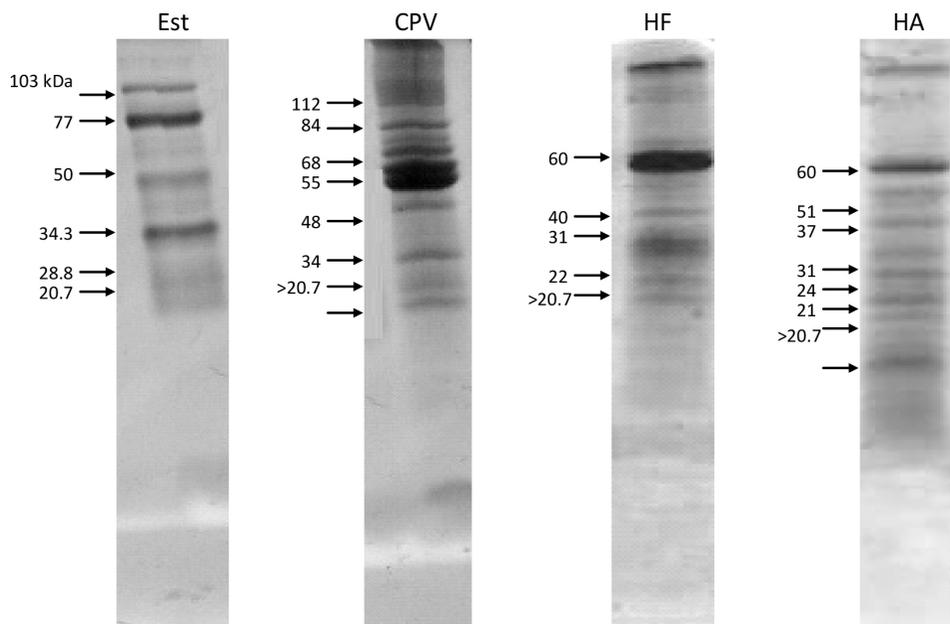


Figura 24. Perfil electroforético del concentrado e hidrolizados proteínicos de *Vigna unguiculata*.

comparado con las bandas obtenidas con Flavourzyme<sup>MR</sup>, lo cual se esperaba debido al mayor GH obtenido con la proteasa Alcalase<sup>MR</sup>. Estos resultados son similares a los encontrados por Bandyopadhyay & Ghosh (2004) respecto a que la hidrólisis de la proteína produce péptidos de menor tamaño molecular y a lo reportado por Kristinsson y Rasco (2000) quienes indican que esta conducta está asociada con la especificidad de las enzimas empleadas sobre sustratos específicos.

Como se muestra en la figura anterior, los PM de los polipéptidos obtenidos con Flavourzyme<sup>MR</sup> fueron de 60, 40, 30 y 22, además este hidrolizado presentó una banda menor a 20.7 kDa. En cuanto al hidrolizado con Alcalase<sup>MR</sup>, pueden observarse bandas con PM de 60, 51, 37, 31, 24, 21 kDa así como dos bandas menores a 20.7 kDa. A este respecto, Freitas et al. (2004), en un estudio sobre las proteínas de la semilla de *Vigna unguiculata*, reportaron la presencia de una banda con PM de 20 kDa y la asociaron con un polipéptido ligado mediante enlaces disulfuro. Debido a que ambos hidrolizados presentaron bandas menores a 20.7 kDa, esto podría indicar que dicho péptido pudiera estar presente en los productos estudiados.

### 8.3.4. Digestibilidad aparente (DA)

Los datos empleados para la determinación de la digestibilidad aparente (DA) de los hidrolizados proteínicos de *V. unguiculata*, se muestran en la Tabla 40.

Como era de esperarse (debido a la ausencia de fuente proteínica) y acorde a lo establecido en el cuadro anterior, se puede apreciar que el grupo de ratas alimentadas con la dieta libre de proteína (SP), presentaron una pérdida de peso de 8.04% a lo largo del período de experimentación. Asimismo, puede observarse que tanto el grupo de animales alimentados con las dietas HF y C, presentaron mayor ganancia de peso de 11.71 y 12.16%, respectivamente, lo cual pudo deberse a que en promedio, las ratas pertenecientes a estos dos grupos desde un principio presentaron mayor peso corporal y por lo tanto mayor consumo de alimento, comportamiento similar al reportado por Fraga (1998) en su estudio sobre la caracterización de las proteínas empleadas para la formulación de dietas para conejos. Esta conducta, puede comprobarse al observar el promedio de alimento ingerido por el grupo HF, el cual fue mayor que los demás. Pese a esta situación, en general los 4 grupos presentaron valores semejantes en cuanto al alimento ingerido así como las cantidades recolectadas de excretas durante este período de experimentación.

	Dieta			
	SP	HA	HF	C
Peso inicial (g)	92.87 ± 9.17	79.80 ± 16.68	92.02 ± 19.91	88.18 ± 33.41
Peso final (g)	85.45 ± 9.13	86.45 ± 17.09	102.80 ± 17.47	98.90 ± 36.58
Peso ganado (g)	-7.47 ± 1.75	6.65 ± 3.89	10.78 ± 2.73	10.72 ± 4.85
Alimento ingerido (g)	8.29 ± 0.70	8.22 ± 0.77	9.62 ± 0.74	8.66 ± 0.78
Heces excretadas (g)	0.49 ± 0.28	0.58 ± 0.31	0.81 ± 0.35	0.59 ± 0.32

(SP) Dieta sin proteína; (HA) Dieta con hidrolizado con Alcalase<sup>MR</sup>; (HF) Dieta con hidrolizado con Flavourzyme<sup>MR</sup>; (C) Dieta con caseína. Nota: Los valores son el promedio y la DS de 4 grupos de 6 ratas por dieta evaluadas durante los 7 días de experimentación.

Tabla 40. Datos reportados durante el período de experimentación para la determinación de la DA.

Para la determinación del CDA de los hidrolizados, se decidió comparar estos productos con los obtenidos con la dieta compuesta de Caseína (Tabla 41), ya que es una proteína de alta calidad. Cabe aclarar, que debido a la gran cantidad de animales a evaluar, para la determinación del contenido de nitrógeno en las heces excretadas durante el período de experimentación, se decidió formar subgrupos (HA<sub>1</sub>, HA<sub>2</sub>, HF<sub>1</sub>, HF<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>) dentro de los mismos 4 grupos experimentales, los cuales fueron agrupados de acuerdo al peso de las ratas dentro del grupo sin mezclar las dietas seleccionadas en un principio. Asimismo, los resultados encontrados en este estudio se compararon con datos de digestibilidad reportados en la literatura para diferentes fuentes proteínicas.

El ANOVA de la digestibilidad aparente de las dietas con hidrolizado así como con caseína, indicó que no existe diferencia estadística significativa (P>0.05), es decir que las fuentes proteínicas estudiadas presentaron igual calidad biológica. Con base a este parámetro, en el cuadro anterior, se puede observar que tanto el hidrolizado con Alcalase<sup>MR</sup> como con Flavourzyme<sup>MR</sup>, presentan muy buena digestibilidad, ya que sus valores fueron muy cercanos a los encontrados para las dietas con caseína, lo cual indica que la proteína del hidrolizado está siendo absorbida en un 99% en todos los casos. Este comportamiento es muy significativo, ya que hay que recordar que la digestibilidad aparente es un parámetro esencial para evaluar la calidad de un ingrediente, por lo que los resultados derivados de esta experimentación muestran que la calidad nutricional de los hidrolizados estudiados fue buena, es decir que son digeridos y absorbidos casi por completo.

	<b>N<sub>2</sub> ingerido (g/100 g)</b>	<b>N<sub>2</sub> excretado (g/100 g)</b>	<b>CDA (%)</b>
HA	8.22 ± 0.77	0.02 ± 0.01	99.79 ± 0.10 <sup>a</sup>
HF	9.62 ± 0.74	0.02 ± 0.01	99.78 ± 0.09 <sup>a</sup>
C	8.66 ± 0.78	0.01 ± 0.01	99.87 ± 0.06 <sup>a</sup>

(HA) Dieta con hidrolizado con Alcalase<sup>MR</sup>; (HF) Dieta con hidrolizado con Flavourzyme<sup>MR</sup>; (C) Dieta con caseína. \*Letras iguales en la misma columna indican que no existe diferencia estadística (P>0.05).

Tabla 41. N<sub>2</sub> ingerido, excretado y Coeficiente de digestibilidad aparente (CDA%) de los hidrolizados proteínicos de *Vigna unguiculata*.

De manera general, los CDA obtenidos establecen que los hidrolizados presentan una mayor digestibilidad compararlos con valores reportados en la literatura para otras fuentes. Estos resultados simplemente confirman la propiedad que tienen los hidrolizados de ser más digeribles que las proteínas nativas, lo cual hace a estos productos viables para su incorporación en dietas para personas de la tercera edad que se sabe presentan padecimientos crónico-degenerativos que disminuyen su capacidad de absorción de nutrimentos como las proteínas. Van der Ven, Gruppen, De Bont y Voragen (2002) en su trabajo sobre hidrolizados de soya y suero de leche, así como Calderón de la Barca et al. (2000a) en su estudio sobre la modificación enzimática de soya para alimentación especial, reportaron que este tipo de resultados en lo que respecta a la digestibilidad de los hidrolizados permitirían su incorporación en fórmulas hipoalérgicas, productos para deportistas, entre otros, ya que su absorción intestinal resulta ser muy efectiva.

### ***8.3.5. Obtención del producto a base de hidrolizado de *Vigna unguiculata****

Cabe mencionar que los productos adicionados con los hidrolizados de *Vigna unguiculata* presentaron contenido proteínico mayores a los encontrados en varias bebidas comerciales a base de soya, de venta en el mercado: Ades<sup>MR</sup> (0.6%), Solé<sup>MR</sup> (1.1%) y SoyFru<sup>MR</sup> (0.6%).

La razón por la cual se decidió añadir los hidrolizados hasta esa concentración de proteínas, fue esencialmente para garantizar que los productos elaborados se encontraran dentro de las Ingestas Recomendadas (IR) para personas de la tercera edad. Estas IR se han estimado en 0.8 g de proteína/kg de peso corporal/día y algunos estudios han indicado que ingestas de 1 g/kg podrían favorecer un mejor balance nitrogenado, estimulando la formación de masa muscular. En el caso de pérdida de peso o estados hipercatabólicos, las IR pueden llegar a 1.5 g/kg de peso. Sin embargo, las bebidas preparadas, no sólo pueden emplearse en personas de la tercera edad, ya que su aporte de proteínas se encuentra dentro del rango establecido para niños (1.85 g/kg durante los primeros 6 meses, 1.65 g/kg de los 6-9 meses, y 1.5 g/kg de los 9-12 meses, 1.2 g/kg de los 12-24 meses, 1 g/kg hasta los 16 años y 0.95 g/kg hasta la edad adulta) y adultos (0.75 g/kg) (Serralda, Meléndez & Pasquetti, 2003).

### 8.3.6. Evaluación sensorial

El análisis de varianza de los resultados de la evaluación sensorial, indicó que las calificaciones de los concentrados de horchata, presentaron diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ), siendo las calificaciones de los tres productos evaluados, SP (499), con HA (602) y con HF (563) de 4.1, 3.75 y 4.3, respectivamente (Figura 25). La comparación de medias, indicó que las formulaciones con HF y SP fueron iguales, en tanto que la adicionada con HA fue diferente estadísticamente ( $P < 0.05$ ) a las dos anteriores.

Como puede apreciarse en la Figura 25, todas las calificaciones emitidas por los jueces estuvieron dentro de los niveles de agrado (3.75 – 4.3 puntos) lo cual indica que todos los productos evaluados fueron calificados por a encima del punto de indiferencia (3). Igualmente, en esta figura, se puede ver que la formulación que obtuvo un promedio de calificación más alta fue aquella con el hidrolizado con Flavourzyme<sup>MR</sup> (563), mientras que la que presentó en promedio menores calificaciones fue aquella con Alcalase<sup>MR</sup> (602).

En cuanto a las menores calificaciones del concentrado de horchata con Alcalase<sup>MR</sup>, hay que mencionar que algunos jueces percibieron un sabor amargo y/o «medicinal» en este producto. Esta característica, atribuida tanto a la fuente

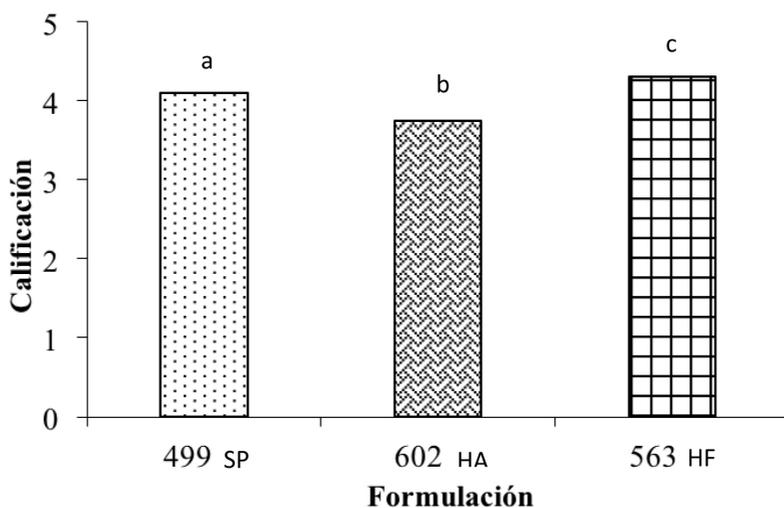


Figura 25. Nivel de agrado de los concentrados de horchata evaluados sensorialmente.

proteínica así como a la especificidad de la enzima empleada para la hidrólisis enzimática, podría resultar ser una restricción del uso de esos hidrolizados, particularmente en bebidas, tal como lo indica Van der Ven et al. (2002) en sus resultados sobre hidrólisis proteínica de soya. Así mismo, el sabor amargo encontrado en este producto puede deberse a que la Alcalase<sup>MR</sup> así como la mayoría de las endoproteasas, generan cierta cantidad de péptidos amargos para lo cual se deben añadir exopeptidasas como la Flavourzyme<sup>MR</sup>, al final del proceso de hidrólisis, para reducir o eliminar esta característica desfavorable. Esta alternativa puede verificarse tomando en cuenta los resultados encontrados por Cigic y Zelenik-Blatnik (2004) en su trabajo sobre hidrolizados de huevo de gallina, en el cual evaluaron sensorialmente los hidrolizados obtenidos tanto con Alcalase<sup>MR</sup> como con la mezcla Alcalase<sup>MR</sup>-Flavourzyme<sup>MR</sup> mediante la dilución en agua de estos a una concentración proteínica de 30 mg/ml. El sabor amargo lo compararon con respecto a la concentración isointensiva de cafeína, encontrando que la introducción de Flavourzyme<sup>MR</sup> generó un hidrolizado con sabor amargo moderado (4.2 mM) presentando mismo sabor que 4 mM de cafeína. En tanto que las muestras tratadas solo con Alcalase<sup>MR</sup> presentaron doble sabor amargo (8.2 mM).

Así mismo, los jueces también encontraron en la horchata con HA, una sensación granulosa del arroz empleado para la formulación, lo cual puede atribuirse a que este hidrolizado presentó menor solubilidad respecto al HF, característica que de acuerdo a lo reportado por Kristinsson y Rasco (2000) puede generar una sensación arenosa en los productos, pero sobre todo se debió a los sólidos característicos de este tipo de bebida, ya que cabe recalcar que su elaboración fue de manera casera.

### ***8.3.7. Caracterización proximal de los productos obtenidos***

Los resultados del análisis proximal realizado a los concentrados de horchata se indican en el Tabla 42 y están reportados en base seca (b.s). Los productos elaborados presentaron contenidos de humedad entre 76.94 y 85.26%, encontrándose diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre ellos. Al comparar la media de los tratamientos, se encontró que todos las formulaciones fueron diferentes ( $P < 0.05$ ) entre sí. Dado que el concentrado de horchata sin adición de proteína (SP) difiere con respecto al preparado con HA y HF en cuanto a la incorporación de los mismos, esta diferencia de humedad pudo deberse al incremento del contenido de agua proporcionado por los hidrolizados. En cuanto al contenido

Componente (%)	SP	HA	HF
Humedad	76.95 ± 0.61 <sup>a</sup>	83.87 ± 0.26 <sup>b</sup>	85.26 ± 0.86 <sup>c</sup>
Proteína cruda	2.26 ± 0.35 <sup>a</sup>	4.85 ± 0.22 <sup>b</sup>	4.79 ± 0.62 <sup>b</sup>
Fibra cruda	0.18 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.15 ± 0.02 <sup>c</sup>
Grasa	0.43 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.21 ± 0.00 <sup>c</sup>
Cenizas	0.10 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.12 <sup>a</sup>
E.L.N	97.02 ± 0.34 <sup>a</sup>	96.14 ± 1.80 <sup>b</sup>	95.43 ± 1.46 <sup>c</sup>

(SP) Dieta sin proteína; (HA) Dieta con hidrolizado con Alcalase<sup>MR</sup>; (HF) Dieta con hidrolizado con Flavourzyme<sup>MR</sup>. Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística (P<0.05).

Tabla 42. Caracterización proximal de los concentrados de horchata (% b.s.).

proteínico de las horchatas los valores se encontraron entre 2.25 y 4.8%. El análisis de varianza verificó que la concentración de proteína fue estadísticamente diferente (P<0.05). Al realizar la comparación de medias, se pudo detectar que la adición de hidrolizados al producto influyeron de manera significativa (P<0.05) sobre este parámetro nutrimental. Este resultado confirma la presencia de los hidrolizados en las formulaciones e igualmente asegura que éstas fueron mejoradas en lo que respecta al contenido de proteínas.

El contenido de grasas de los productos, se encontró entre 0.12% y 0.34%, valores que se encontró fueron estadísticamente diferentes (P<0.05). La comparación de medias de los mismos indicaron que la grasa encontrada en las horchatas fue diferente entre sí (P<0.05). Debido a que los valores obtenidos de este parámetro son muy bajos, debe indicarse que la metodología empleada para esta determinación conduce a mucha variabilidad en el análisis, lo cual pudo influir en el análisis graso de los productos elaborados. En lo que respecta al contenido de cenizas, el análisis de varianza indicó que no existió diferencia estadística (P>0.05) entre los concentrados evaluados. Los valores oscilaron entre 0.10% y 0.19%, notándose un ligero aumento en las formulaciones adicionadas con los hidrolizados, quizás debido al contenido de cenizas presente en los mismos.

A manera de discusión general, se puede señalar que esta investigación consistió en desarrollar la hidrólisis enzimática del concentrado proteínico de *Vigna unguiculata*

mediante las proteasas comerciales Alcalase<sup>MR</sup> y Flavourzyme<sup>MR</sup>, seleccionándose para su estudio fisicoquímico y nutricional así como para su incorporación en un producto destinado a personas de la tercera edad, aquellos productos con mayor grado de hidrólisis; los cuales fueron obtenidos a los 60 min de reacción (23.61% y 7.27%, respectivamente). Los resultados de las cinéticas enzimáticas realizadas indicaron que la reacción con Alcalase<sup>MR</sup> fue más rápida desde el inicio de la misma comparada con la hidrólisis realizada con Flavourzyme<sup>MR</sup>, comportamiento reportado por varios autores y que ha sido atribuido a la actividad exoproteasa de Flavourzyme<sup>MR</sup>. Es decir, sus péptidos son aún de cadena larga y presenta menor %GH debido a su preferencia por los grupos presentes en el exterior de la cadena.

Los resultados de solubilidad de nitrógeno indicaron que los productos de hidrólisis del concentrado proteínico de *V. unguiculata* presentaron menor solubilidad en el rango de pH entre 4.0 a 6.0, posiblemente porque las proteínas están cerca de su isoelectrico. Las mayores solubilidades en los dos hidrolizados (HA y HF) se encontraron en los valores de pH alcalinos, siendo el hidrolizado con Flavourzyme<sup>MR</sup> el que presentó mayor solubilidad (93.67%). Es importante señalar que ésta alta solubilidad hace viable la incorporación de éste hidrolizado en diferentes sistemas alimentarios.

Del perfil electroforético, se pudo observar que el que presentó mayor número de bandas fue el obtenido con Alcalase<sup>MR</sup>, con lo cual se verifica el mayor %GH obtenido con respecto a Flavourzyme<sup>MR</sup>. Asimismo, este resultado está directamente relacionado con la especificidad de las proteasas, ya que las endopeptidasas debido a que reaccionan en el interior de la molécula peptídica, produce mayor cantidad de péptidos con menor tamaño molecular, comparado con la acción de la endopeptidasa cuyos péptidos son más largos y en menor cantidad. Sin embargo, tanto HA como HF presentaron bandas menores a 20 kDa.

En lo que respecta a la digestibilidad aparente de los hidrolizados comparados con caseína (C), los resultados indicaron que los productos obtenidos de la hidrólisis enzimática presentaron 99% de digestibilidad, lo cual indica que son productos con alta calidad nutricional y fáciles de digerir. Esto hace viable la incorporación de estos hidrolizados en sistemas alimentarios destinados a personas que presenten dificultad de asimilar las proteínas.

La evaluación sensorial de los concentrados de horchata elaborados adicionando los hidrolizados (HA y HF), indicó que todos los productos presentaron cali-

ficaciones superiores al punto de indiferencia (3), siendo el mejor calificado el elaborado con Flavourzyme<sup>MR</sup> (4.3). Asimismo, la prueba sensorial indicó que en el concentrado con HA se detectó un ligero sabor amargo y/o «medicinal», que de acuerdo a lo establecido en la literatura se debe a su actividad endoproteasa y a la posible generación de más péptidos amargos.

Las características químicas de los concentrados de horchata elaborados con los hidrolizados fueron muy similares respecto al producto control preparado sin hidrolizado, destacando un incremento del contenido proteínico a niveles aproximados de 4.8% al adicionar los hidrolizados (4.85 y 4.79%).

#### 8.4. Conclusiones

Los hidrolizados enzimáticos de *Vigna unguiculata* con mayor GH se obtuvieron haciendo reaccionar el concentrado proteínico con las proteasas comerciales Flavourzyme<sup>MR</sup> y Alcalase<sup>MR</sup>, durante 60 min alcanzándose valores de 7.27 y 23.61%, respectivamente. El hidrolizado obtenido con Flavourzyme<sup>MR</sup> presentó mayores valores (93.67%) de solubilidad de nitrógeno con respecto al preparado con Alcalase<sup>MR</sup> (34.35%). La hidrofobicidad superficial (Ho) del hidrolizado con Flavourzyme<sup>MR</sup> fue mayor (291.52) que la presentada por el hidrolizado con Alcalase<sup>MR</sup> (30.18). El perfil electroforético del hidrolizado con Alcalase<sup>MR</sup> indicó mayor número de bandas (60, 51, 37, 31, 24 y 21 kDa) respecto a las encontradas en el hidrolizado con Flavourzyme<sup>MR</sup> (60, 40, 30 y 22 kDa). En ambos se detectaron bandas menores a los 20 kDa. La digestibilidad *in vivo* de los hidrolizados fue alta (99%) y comparada con la obtenida para caseína (99%). Se desarrollaron fórmulas de concentrados de horchatas enriquecidos con los hidrolizados proteínicos de *Vigna unguiculata* que al ser evaluados sensorialmente por personas de la tercera edad obtuvieron calificaciones dentro de los niveles de aceptación. La incorporación de los hidrolizados en la formulación de los concentrados de horchata logró un enriquecimiento en el contenido de proteínas de los productos hasta niveles del 4.8%. La solubilidad presentada por el hidrolizado con Flavourzyme<sup>MR</sup>, así como la alta digestibilidad de ambos hidrolizados (HA y HF), aunado a las calificaciones obtenidas en la evaluación sensorial, hace útil y factible su incorporación como ingrediente en sistemas alimentarios destinados a personas o situaciones donde sea difícil la absorción de las proteínas, como es el caso de las personas de la tercera edad así como en fórmulas para niños.

## Referencias

- Akinjayeju, O., & Tolú, B.K. (2004). Comparative studies of some properties of undehulled, mechanically dehulled and manually dehulled cowpea (*Vigna unguiculata* Walp. L.) flours. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 355-360. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00792.x>
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1997). *Methods of analysis of association of official analytical chemists*. 16 th Edition. Washington, D.C.
- Bandyopadhyay, K., & Ghosh, S. (2002). Preparation and characterization of papain-modified sesame (*Sesamum indicum* L.) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6854-6857. <https://doi.org/10.1021/jf020320x>
- Bernardino-Nicanor, A., Añón, C., Scilingo, A.A., & Dávila-Ortíz, G. (2005). Functional properties of guava seed glutelins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3613-3617. <https://doi.org/10.1021/jf0400359>
- Betancur-Ancona, D., Martínez-Rosado, R., Corona-Cruz, A., Castellanos-Ruelas, A., Jaramillo-Flores, M.E., & Chel-Guerrero, L. (2009). Functional properties of hydrolysates from *Phaseolus lunatus* seeds. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 128-137. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01690.x>
- Cai, R., Hettiarachchy, N.S., & Jalaluddin. (2003). High-performance liquid chromatography determination of phenolic constituents in 17 varieties of cowpeas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1623-1627. <https://doi.org/10.1021/jf020867b>
- Calderón de la Barca, M.A., Medrano, A.W., Jara-Marini, E.M., González, C.A.F., & Ruiz, S.A. (2000a). Modificación enzimática de las propiedades funcionales, nutricias y sensoriales de la soya para alimentación especial. *Archivos Latino-americanos de Nutrición*, 50(1), 26-34.
- Calderón de la Barca, M.A., Ruiz-Salazar, A.R., & Jara-Marini, E.M. (2000b). Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. *Journal of Food Science*, 65(2), 246-253. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb15988.x>

- Cigic, B., & Zelenik-Blatnik, M. (2004). Preparation and characterization of chicken egg white hydrolysate. *Acta Chimica Slovenica*, 51, 177-188.
- Doucet, D., Otter, D.E., Gauthier, S.F., & Foegeding, E.A. (2003). Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6300-6308. <https://doi.org/10.1021/jf026242v>
- Fraga, M.J. (1998). Some characteristics of main protein sources included in rabbit diets. En *Protein Digestión. The Nutrition of the Rabbit*, 39-53.
- Freitas, R.L., Teixeira, A.R., & Ferreira, R.B. (2004). Characterization of the proteins from Vigna unguiculata seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1682-1687. <https://doi.org/10.1021/jf0300588>
- Kim, S-K., Byun, H-G., Park, P-J., & Shahidi, F. (2001). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2992-2997. <https://doi.org/10.1021/jf001119u>
- Kristinsson, H.G., & Rasco, B.A. (2000). Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 657-666. <https://doi.org/10.1021/jf990447v>
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M.M., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Millán, F., & Vioque, J. (2009). Sunflower protein hydrolysates reduce cholesterol micellar solubility. *Plant Foods for Human Nutrition*. 64, 86-93. <https://doi.org/10.1007/s11130-009-0108-1>
- Mimouni, B., Azanza, J.L., & Raymond, J. (1999). Influence of double enzymatic hydrolyses on gluten functionality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1048-1053. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990515\)79:7<1048::AID-JSFA327>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990515)79:7<1048::AID-JSFA327>3.0.CO;2-Y)
- Morris, Q.H.J., Almarales, A.A., Carrillo, F.O., & Abdala, D.R.T. (2001). Combinaciones enzimáticas en la obtención de hidrolizados proteicos a partir de *Chlorella vulgaris*. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 15(2), 85-89.

- Schägger, H., & Jagow, G.V. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166, 368-379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2011). Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a cowpea (*Vigna unguiculata*) enzymatic hydrolysate. *Process Biochemistry*, 46, 864-872. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.12.008>
- Serralda, Z.A.E., Meléndez, M.G. & Pasquetti, C.A. (2003). Requerimientos y recomendaciones proteicas, referencias internacionales y mexicanas. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 11(2), 73-79.
- Tardioli, P.W., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., & Giordano, R.L.C. (2003). Design of new immobilized-stabilized carboxypeptidase A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. *Biotechnology Progress*, 19(2), 565-574. <https://doi.org/10.1021/bp0256364>
- Uwaegbute, A.C., Iroegbu, C.U., & Eke, O. (2000). Chemical and sensory evaluation of germinated cowpeas (*Vigna unguiculata*) and their products. *Food Chemistry*, 68(2), 141-146. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00134-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00134-X)
- Van der Ven, C., Gruppen, H., De Bont, D.B.A., & Voragen, A.G.J. (2002). Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2938-2946. <https://doi.org/10.1021/jf011190f>
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedoche, J., Bautista, J. & Millán F. (1999). Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(7), 819-823. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0071-x>
- Were, L., Hettiarachchy, L. & Kalapathy, U. (1997). Modified soy proteins with improved foaming and water hydration properties. *Journal of Food Science*, 62(4), 821-824. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb15463.x>
- Yoshie-Satrk, Y. & Wäsche, A. (2004). In vitro binding of bile acids by lupin protein isolates and their hydrolysates. *Food Chemistry*, 88(2), 179-184. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.033>