**UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN – FAIN 2017**

1. **Datos generales**

**Título:** Propiedades antioxidantes y antimicrobianas de hidrolizados proteicos de arveja (*Pisum sativum* L.) de la Región La Libertad

**Línea de investigación:** Proteínas para la Alimentación

**Unidad académica:** Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Facultad de Ciencias Agrarias

**Equipo Investigador:**

Dr. Antonio Ricardo Rodríguez Zevallos

Docente de la Escuela de Ingeniería en Industrias Alimentarias. UPAO

Ing. Juan Carlos Li Rabines

Ingeniero en Industrias Alimentarias. Egresado UPAO

**Responsable del proyect**o: Dr. Antonio Ricardo Rodríguez Zevallos

**Institución y lugar donde se ejecutará el proyecto:**

Institución: Universidad Privada Antenor Orrego (UPAO)

Lugar: Laboratorios de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Facultad de Ciencias Agrarias. Campus Trujillo. UPAO

**Duración:**

Fecha de inicio: 01-10-2017

Fecha de término: 30 -09-2018

Duración: 11 meses

1. **Plan de investigación**
	1. **Planteamiento y formulación del problema**

Las leguminosas son una excelente fuente de proteínas, carbohidratos y fibra, además proporcionan muchas vitaminas y minerales esenciales para la salud humana (Roy y otros, 2010). Las arvejas secas están generalmente compuestas de hidratos de carbono (35%), proteínas (27%), fibras (27%) y una pequeña cantidad de lípidos (Boulter 1983).

Sin embargo, el consumo de proteínas vegetales en estado nativo es limitado, por su baja digestibilidad y su carácter potencialmente alergénico, por lo que es relevante buscar procesos que permitan aumentar su consumo y facilitar su incorporación en la alimentación humana (Freitas y otros, 2004).

De igual forma, las legumbres también contienen muchas proteínas antinutricionales, las cuales generan varios efectos negativos en la salud como hemoaglutinación, distensión abdominal, vómitos y ampliación del páncreas (Roy y otros, 2010).

La hidrolisis de proteínas reduce en un 50% la alergenicidad de las proteínas de los alimentos, como soya, gluten, etc. (Damodaran y otros, 2010).

El proceso de hidrolisis permite la fragmentación de los enlaces peptídicos de las proteínas; lo cual facilita la liberación de péptidos y aminoácidos. Existen tres tipos de hidrolisis: ácida, básica y enzimática (Badui, 2006; Damodaran y otros, 2010; Belitz y otros, 2012; Najafian y Babji, 2014).

De la misma manera, los hidrolizados de proteínas aisladas de cereales y leguminosas se vienen utilizando en diversos productos alimentarios ya sea como suplementos nutritivos, o como agentes funcionales para mejorar textura, también por su actividad antioxidante o actividad antimicrobiana en productos de panificación, yogurt, fideos y otros más (Do Evangelho y otros, 2017; Coscueta y otros, 2016; Wani y otros, 2015¸ Mokni y otros, 2014; Valdez-Ortiz y otros, 2012; Bojórquez-Balam y otros, 2012; Cruz-Cervera y otros, 2010 y Torruco-Uco y otros, 2009).

Los hidrolizados proteicos se obtienen preferencialmente, por medio de tratamiento enzimático de suspensiones de concentrados de proteínas. Las enzimas de mayor uso son la pepsina, la quimitripsina y la alcalasa. La eficiencia de la hidrólisis está relacionada con la concentración de enzima, el tiempo de tratamiento; el pH generalmente entre 7 y 9, en función al tipo de enzima. Mediante hidrólisis de alrededor del 15% de las proteínas, a menudo se logran péptidos con mayor actividad antioxidante o antimicrobiana (Baltodano, 2016).

Por consiguiente, el problema para la presente investigación es:

¿Cuál será el efecto de la concentración de alcalasa (1- 5%) y el tiempo de hidrólisis (15 - 45 minutos) sobre la actividad antioxidante y antimicrobiana de concentrado proteico de arveja (*Pisum sativum* L.) seca utilizando la metodología de diseño factorial completo 2k?

* 1. **Antecedentes**

Do Evangelho y otros (2017) investigaron las propiedades fisicoquímicas y funcionales del hidrolizado proteico del frejol negro (*Phaseolus vulgaris* L.); para lo cual, se utilizó pepsina (37 °C y pH = 2.0) y alcalasa (50 °C y pH = 7.0). La relación enzima: sustrato fue de 1:20 (p:p) y; el tiempo de evaluación del proceso fue a 0, 15, 30, 45, 60 y 120 minutos. Los hidrolizados de proteína de frijol tratado con pepsina presentaron mayor grado de hidrólisis que los hidrolizados de proteínas obtenidos con alcalasa. Por otra parte, los hidrolizados de proteínas provenientes de la alcalasa presentaron mayor estabilidad de la emulsión durante 30 días que los obtenidos a partir de la digestión con pepsina. El concentrado de proteínas y especialmente los hidrolizados obtenidos a partir de la digestión alcalasa tenían buena estabilidad de la emulsión y actividad antioxidante. Por lo tanto, los hidrolizados de proteínas a partir de frejol negro; podrían ser explotados como suplementos de proteína en la dieta como alimentos nutricionales y bioactivos.

Coscueta y otros (2016) realizaron el análisis de las propiedades biactivas de hidrolizados de proteínas a partir de soya desgrasada. La proteína aislada de soya desgrasada se obtuvo a dos condiciones de temperaturas y tiempo (70 °C, 1 hora y 90 °C, 30 minutos). Posteriormente se continuó con la hidrolisis para cada tratamiento. En la proteólisis, se empleó un complejo enzimático Colorase PP, que contiene quimotripsina, elastasa, dipeptidasa, actividades trípticos y aminopeptidasa, junto con la carboxipeptidasa A1, A2, y B; a 50 °C y pH, 8; evaluándose a 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 y 24 horas. La proporción de enzima: sustrato fue de (10 mg de enzima / g SPI-1%, p/p). El grado de hidrolisis presentó diferencia significativa entre ambos tratamientos; siendo el mayor el tratamiento de 90 °C. Los resultados presentados para electroforesis, mostraron un aumento de la susceptibilidad el tratamiento de 90 °C a ser hidrolizada en comparación al tratamiento de 70 °C. Se observó un aumento significativo en capacidades antioxidantes, inhibidores de la ECA para ambos tratamientos. Además, se identificaron cinco péptidos principales lo que puede explicar a través de sus secuencias de las propiedades bioactivas; en ambos tratamientos.

Wani y otros (2015) llevaron a cabo el estudio de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas nativas e hidrolizadas proteicos a partir del frejol, haba riñón (*Phaseolus vulgaris L*.); utilizándose cuatro cultivares: amarillo francés, contenedor, maestro y red local. Se utilizó la papaína para el proceso de digestión; evaluándose a 30 y 60 minutos el tiempo de reacción. El grado de hidrólisis de la proteína de haba de riñón aíslada varió de 3,13 a 4,70% durante 30 min de tratamiento y 6,71 - 8.63% para los 60 min de tratamiento. Las propiedades térmicas de los aislados de proteína de haba de riñón nativo e hidrolizado mostraron dos transiciones endotérmicas. Los aislados de proteína hidrolizada tenían temperaturas de transición más bajas y entalpía de desnaturalización que sus homólogos nativos que indican la hidrólisis de las proteínas. La solubilidad de la proteína, la capacidad de absorción de agua y de grasa aumentó significativamente en la proteólisis. El índice de actividad emulsionante y el índice de estabilidad de emulsión aumentaron significativamente en la proteólisis. La capacidad de formación de espuma de la proteína de haba de riñón nativo aíslada en el intervalo de pH de 2 - 10 varió de 46,0-126,0% y aumentó significativamente en la hidrólisis a 54,9-151,1%.

Mokni y otros (2014) estudiaron las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes del concentrado proteico de garbanzo (GPC) y del hidrólisis enzimática del GPC (GPH) por alcalasa. Las condiciones de hidrólisis fueron pH 8.0 y 50 °C, relación enzima: sustrato 1:10 y un tiempo de 210 min. El hidrolizado obtenido presentó un grado de hidrólisis de 14.67 %. El GPH muestra una mayor actividad antioxidante que el GPC. Este hidrolizado se fraccionó por cromatografía en cuatro fracciones principales (I, II, III, IV). Fracción III exhibió la más alta actividad de captación de DPPH (54% a 1 mg/mL).

Valdez-Ortiz y otros (2012) analizaron la propiedad antioxidante, nutricional e inhibidora de la ECA del hidrolizado de proteínas a partir del frejol azufrado (*Phaseolus vulgaris*). Para lo cual, se utilizaron tres cultivares de frejol azufrado: Azufrado Higuera, Azufrado Noroeste y Azufrado Regional. En el proceso de digestión se usaron tres enzimas y supeditó la temperatura y el pH para cada una de ellas; durante 2 horas (120 minutos): alcalasa (50 °C y pH=8), termolisina (55 °C y pH=9) y pancreatina (39 °C y pH=8). El cultivar Azufrado Higuera mostró la mejor relación proteína rendimiento / concentración, que tiene una mayor cantidad de hidrolizados en comparación con el resto de las variedades. Todos los tratamientos actividad IECA presentado, estos valores oscilaron entre 0,109 a 319,96 metro g / ml. En cuanto a la actividad antioxidante, el Az. Higuera / Alcalase tratamiento mostró la actividad de captación de DPPH más alto (40%), sin embargo, con el método ABTS el Az. Regional ' 87-Alcalase fue el mejor tratamiento (99,89% de barrido). En general, los resultados de nuestro trabajo mostraron que los granos de Azufrados proteínas hidrolizados son adecuados para el desarrollo de un producto nutracéutico para la prevención y control de enfermedades degenerativas como la hipertensión y los derivados de la oxidación celular.

Bojórquez-Balam y otros (2012) emplearon un sistema enzimático secuencial constituido por las enzimas pepsina y pancreatina, para hidrolizar un concentrado proteínico de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). Las condiciones de hidrólisis fueron: 37 °C, relación enzima: sustrato 1:10, pH 2 para pepsina y pH 7.5 para pancreatina, el tiempo total de reacción fue de 10 min (5 min para cada enzima), la concentración de sustrato fue del 4 %. El hidrolizado obtenido presentó un grado de hidrólisis de 5.5 %. Se evaluó la actividad antimicrobiana del hidrolizado contra los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Shigella flexneri*. La mayor actividad antimicrobiana fue generada por la fracción < 10 kDa. La fracción peptídica < 10 kDa presento valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 392.1 μg/mL y 993.2 μg/mL contra *S. aureus* y *S. flexneri*, respectivamente.

Cruz-Cervera y otros (2010) evaluaron el grado de hidrolisis (GH) y la capacidad antioxidante de los hidrolizados enzimáticos obtenidos de la proteína concentrada de los granos de frijol terciopelo (*Mucuna pruriens*) (CPM). Realizaron una hidrólisis enzimática del CPM empleando la enzima Alcalasa (A) a diferentes concentraciones (0.3, 0.06 y 0.03 AU/g), así como de manera secuencial la enzima Flavourzime (F) a diferentes tiempos (5 hasta 120 min). La concentración de F fue de 50 LAPU/g. Las condiciones de hidrólisis fueron: temperatura 50 °C, relación enzima/sustrato 1:10, pH 7.5 para A y 7 para F y la concentración de sustrato fue del 4 %. En los tratamientos con A se observó que el GH se incrementó con el aumento en la concentración de la enzima y el tiempo de hidrolisis aun en periodos de tiempo cortos. Además, los GH más elevados fueron con el sistema secuencial, ya que con A 0.3 AU/g se halló el valor más alto, de 19.50 % a 90 min, mientras que al mismo tiempo con A-F se obtuvo un valor de 24.38 %. La capacidad antioxidante fue independiente del GH, siendo éste de alrededor de 20 mM/mg proteína equivalentes de trolox.

Torruco-Uco y otros (2009) estudiaron las actividades inhibitorias y antioxidantes de los hidrolizados proteicos a partir del frejol (*Phaseolus vulgaris*) y pallar (*Phaseolus lunatus*). Se emplearon en el proceso de digestión las enzimas alcalasa y flavourzyme; a ciertas condiciones de pH (8, alcalasa y 7, flavourzyme) y de temperatura (50 °C para ambas enzimas). Se utilizó 0,3 AU g 1 para alcalasa y 50 LAPU g 1 para flavourzyme y; el tiempo de análisis del proceso fue 0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos. El grado de hidrolisis (DH) más alto (37,94%) fue para el hidrolizado proteico de pallar (*Phaseolus lunatus*) tratado con alcalasa a 45 minutos de tiempo de reacción, mientras que el DH más alto (49,48%) fue para el hidrolizado porteico de frejol (*Phaseolus vulgaris*) tratado con Alcalase a 30 minutos de tiempo de reacción. La actividad inhibidora de ACE-I en el hidrolizados de alcalasa era IC 50 ¼ 0.056 mgml 1 para el pallar (*Phaseolus lunatus*) en 90 min, y IC 50 ¼ 0.061 mgml 1 para el frejol (*Phaseolus vulgaris*) a 60 minutos. En los hidrolizados de flavourzyme esta actividad fue IC 50 ¼ 0,0069 mgml 1 para el pallar (*Phaseolus lunatus*) en 90 minutos y IC 50 ¼ 0.127 mgml 1 para el frejol (*Phaseolus vulgaris*) en 45 minutos. En la electroforesis, los hidrolizados mostraron bandas de bajo peso molecular. La actividad antioxidante fue 11,55 mmol L 1 TEAC mg 1 proteínas para el pallar (*Phaseolus lunatus*) con tratados con flavourzyme en 90 minutos y 10,09 mmol L 1 TEAC mg 1 proteínas para el frejol (*Phaseolus vulgaris*) con tratados con alcalasa a 60 minutos. Composición de aminoácidos exhibió contenido residuos hidrófobos ácido alta amino.

* 1. **Justificación**

Las proteínas son esenciales para la nutrición; debido a que aporta aminoácidos y la energía necesaria para el buen funcionamiento del cuerpo (Torruco y otros, 2009). Las arvejas presentan pocas cantidades de grasa y colesterol y; algo en particular es que su proteína está libre de gluten, por lo cual la convierte en una gran opción para personas con restricciones dietéticas (Davidsson y otros, 2001).

Así mismo, las arvejas contienen aminoácidos en altas cantidades en especial L-Lisina y la L-Arginina (Cabezas, 2016). Al tener altos valores en L-Arginina, resulta beneficioso para promover la liberación de la hormona del crecimiento, ser precursor de la síntesis de óxido nítrico o mejorar la síntesis de creatina (Cabezas, 2016). Sin embargo, no tiene un contenido medio de L-Cisteína o L-Metionina (Luke, 2012).

De igual forma, la proteína de arveja suele tener una textura granulada en comparación con la proteína de leche y tiende a ser más densa, por consiguiente, la sensación de saciedad es mucho mayor comparándola con otro tipo de proteínas, por esta razón son una muy buena fuente de proteína cuando el objetivo es la pérdida de peso y grasa (Reinkensmeier y otros, *2015*).

Por lo cual las leguminosas, en especial la arveja seca, representa en la actualidad una alternativa de origen poco convencional para el desarrollo de nuevos suplementos nutricionales y alimentos para regímenes especiales en virtud de su alto contenido de proteínas (>20%) (Chel-Guerrero y otros, 2011).

De la misma manera, la hidrolisis enzimático de las proteínas de las leguminosas puede mejorar sus propiedades fisicoquímicas, nutricionales y funcionales (Torruco y otros, 2009). Esto conlleva a la adición de un valor agregado; debido a su ampliación de la utilización de las proteínas y aplicación de sus hidrolizados en diversos productos industriales; particularmente, la industria alimentaria y farmacéutica (Do Evangelho y otros, 2017).

Por otra parte, la producción nacional de legumbres fue 26 3495 toneladas durante el año 2016 MINAGRI (2017). En la Figura 1 se muestra que arveja seca es la de mayor producción de leguminosas en la Región La Libertad, 10 209 toneladas MINAGRI (2017). Esto implicaría que el sector agroindustrial aumente la demanda de legumbres, en especial de la arveja seca; pues se podrá ofrecer productos nuevos a partir de las proteínas extraídas, tanto para consumo nacional como para la exportación. Por lo tanto, esto beneficiaría los agricultores, ya que mejoraría su calidad de vida.

**Figura 1. Producción de leguminosas secas en la Región La Libertad - 2016**

 Fuente: MINAGRI (2017)

* 1. **Objetivos**

Objetivo general

* Obtener proteínas con propiedades funcionales a partir de concentrados proteicos de la arveja (*Pisum sativum* L.) seca.

Objetivos específicos

* Evaluar la concentración enzimática (alcalasa) y el tiempo de hidrolisis sobre la capacidad antioxidante y antimicrobiana de concentrado proteico de arveja (*Pisum sativum* L.) seca.
* Determinar que concentración enzimática (alcalasa) y tiempo de hidrolisis permita obtener mayor capacidad antioxidante y antimicrobiana del concentrado proteico de arveja (*Pisum sativum* L.) seca.
* Determinar los tipos de péptidos de los aislados proteicos mediante electroforesis e inferir sobre su potencial uso en diversos alimentos.
	1. **Marco teórico**

Las leguminosas son una excelente fuente de proteínas, carbohidratos y fibra, además proporciona muchas vitaminas y minerales esenciales para la salud humana (Roy y otros, 2010). Pues, el contenido relativamente alto en proteínas permite aportar el 20 % de proteína alimenticia en todo el mundo; por lo cual, se emplea en diversos platos en todo el mundo, como: guisos, harinas, purés, guarniciones, aperitivos o postres (Pimentel y otros, 1975; Belitz y otros, 2012; FAO, 2016).

Además, Roy y otros (2010) menciona que las legumbres presentan propiedades altamente nutritivas que se han asociado con muchas propiedades beneficiosas para la salud; tales como el tratamiento del colesterol alto y la diabetes tipo 2 y en la prevención de diversas formas de cáncer.

Sin embargo, en las legumbres se ha encontrado proteínas antinutricionales, tales como lectinas, inhibidores de proteasa y el compuesto no antinutricionales, la angiotensina I-inhibidor de la enzima convertidora (ACE). Varios efectos deletéreos pueden ocurrir después de la ingestión de semillas crudas o harinas, como la hemoaglutinación, distensión abdominal, vómitos y agrandamiento del páncreas, debido a la actividad de los compuestos antinutricionales (Roy y otros, 2010). Damodaran y otros (2010) menciona que las proteínas de algunos vegetales producen alergias en niños y adultos mayores.

No obstante, se ha estudiado diversos procedimientos que transformar componentes antinutricionales y otros en elementos muy beneficiosas para la salud humana; y a la vez mejorar productos procesados en la industria alimentaria. Uno de ellos, es el hidrolisis.

Los aislados proteicos son la forma comercial más purificada de proteínas, puesto que contienen 90% o más de este nutriente. Se elimina los polisacáridos, oligosacáridos y algunos otros componentes ya sea por: hidrólisis y posterior precipitación, por adición de ácidos minerales, controlando los diferentes parámetros como: el pH, temperatura, solubilidad y otros; por lo que permiten el enriquecimiento de la proteína requerida.

Uno de los métodos de obtención de aislados proteicos de menos complejidad y con altos rendimientos es la extracción a pH alcalino y precipitación isoeléctrica. Este método consiste en el uso de una base para solubilizar las proteínas, (comúnmente, el hidróxido de sodio) en la extracción alcalina; posteriormente, se procede a la precipitación isoeléctrica (solubilidad mínima de proteínas a pH alrededor de 4.5).

El hidrolisis de proteínas es la fragmentación de los enlaces peptídicos de las proteínas, la cual libera péptidos activos y aminoácidos (Badui, 2006; Damodaran y otros, 2010; Belitz y otros, 2012). Existen tres tipos de hidrolisis:

1. Hidrolisis ácido

La proteína se somete a una temperatura de 120 °C, con HCl 6N durante 10-24 horas; produciéndose un hidrolisis total de las proteínas. Lamentablemente, en este tipo de hidrolisis se destruye completamente el Triptófano, porque reacciona probablemente con el cloro; y un porcentaje de Serina y Treonina. Además, no se produce un alto grado de racemización de los aminoácidos (Badui, 2006).

1. Hidrolisis básico

El hidrolisis de la proteína se realiza con NaOH a una temperatura de ebullición. La gran ventaja de este tipo de hidrolisis, es que no se destruye el Triptófano. Sin embargo, se destruye un porcentaje de Cisteína, Serina, Treonina, Asparagina, Glutamina y Lisina (Badui, 2006).

1. Hidrolisis enzimático

El hidrolisis de la proteína se realiza por acción enzimática. Estas enzimas pueden ser de origen vegetal (papaína, ficina y bromelina), origen animal (pepsina, tripsina y quimiotripsina, renina) y de origen microbiano (hongos y bacterias) (Badui, 2006; Damodaran y otros, 2010; Belitz y otros, 2012).

Se utiliza enzimas en el hidrolisis con el objetivo de mejorar propiedades funcionales de las proteínas, tales como solubilidad, dispersabilidad y, capacidad espumante y emulsificante (Badui, 2006; Damodaran y otros, 2010; Belitz y otros, 2012).

Así mismo, los hidrolizados de proteínas son muy recomendables por su rápida digestión en la alimentación humana, especialmente en infantiles y adultos (Badui, 2006; Damodaran y otros, 2010; Belitz y otros, 2012).

En el Cuadro 1 se menciona las principales enzimas comerciales utilizadas en el hidrolisis de proteínas.

**Cuadro 1. Enzimas disponibles comercialmente de grado alimenticio**

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

 Fuente: Benítez y otros (2008)

**Propiedades de los hidrolizados proteicos**

**Alergenicidad**

Las proteínas presentes en la leche de vaca, proteínas de soya, gluten, ovoproteínas y proteínas de cacahuetes originan severas reacciones alérgicas en niños y adultos. No obstante, los hidrolizados de estas proteínas poseen menor alergenicidad que sus homologos en el estado nativo. Un ejemplo, cuando la caseína se hidroliza con pancreatina, se obtiene un 55% del grado de hidrolisis; reduciendo su alergenicidad hasta en un 50%. Por lo tanto, cuando los bebes y niños tienen una predisposición o alto riesgo de desarrollar reacciones alérgicas a las proteínas alimenticias; se recomienda consumir hidrolizados proteicos como fuente de aminoácidos que aseguran un desarrollo normal de su organismo (Damodaran y otros, 2010).

**Péptidos amargos**

El sabor amargo en los hidrolizados proteicos es una propiedad indeseable. Esto se debe a la composición y secuencia de los aminoácidos y tipo de enzimas utilizadas (Damodaran y otros, 2010).

Los hidrolizados de las proteínas altamente hidrofóbicas como la caseína, proteínas de la soya y maíz son muy amargos. Los hidrolizados de las proteínas hidrofilicas como la gelatina son menos amargo. El sabor amargo se puede eliminar o reducir utilizando una mezcla de endo y exopeptidasas que producen un hidrolisis adicional de los péptidos amargos hasta conseguir fragmentos de hidrofobicidad media inferior a 1.3 kcal/mol (Damodaran y otros, 2010).

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

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

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

**Propiedades de los péptidos biactivos**

**Actividad antimicrobiana**

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

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

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

Además, los péptidos bioactivos ejercen un efecto inhibidor sobre los microorganismos, mediante la interacción con los componentes intracelulares aniónicos como el ADN y el ARN, lo que inhibe la síntesis de proteínas y la división celular de los microorganismos. Por otra parte, algunos péptidos están involucrados en la activación autolítica en los microorganismos diana (Cudic y otros, 2002).

**Actividad inmunomoduladora**

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

**Actividad antioxidante**

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

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

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

**Diseño factorial completo 2k**

Un diseño factorial es un tipo de experimento diseñado que permite estudiar el efecto conjunto de los factores sobre una respuesta, es una de las familias de diseños de mayor impacto en la industria y en la investigación, debido a su eficacia y versatilidad. Los factoriales 2k completos son útiles principalmente cuando el número de factores a estudiar está entre dos y cinco (2 < k < 5), rango en el cual su tamaño se encuentra entre 4 y 32 tratamientos. En los diseños factoriales completos 2k (k = factores) cada factor sólo tiene 2 niveles (-1 y +1). El diseño 2k es de particular utilidad en las etapas iniciales del trabajo experimental, cuando probablemente se están investigando muchos factores. Este diseño proporciona un menor número de corridas con las que pueden estudiarse *k* factores en un diseño factorial completo. Puesto que sólo hay dos niveles para cada factor, se supone que la respuesta es aproximadamente lineal en el rango elegido para los niveles de los factores (Gutiérrez y De la Vara, 2008: Montgomery, 2011).

* 1. **Hipótesis**

Con una concentración de 3 % de enzima alcalasa y 30 minutos de hidrólisis se optimizará las capacidades antioxidantes y antimicrobianas de los hidrolizados proteicos de arveja.

* 1. **Metodología**

**Proceso de extracción de proteínas de arveja seca**

A continuación, se describe las operaciones para obtener concentrado proteico (Jarpa-Parra y otros, 2014):

1. Limpieza. La limpieza de los granos se realizará de forma manual retirando toda materia extraña y grano muy pequeño y roto.
2. Molienda. Los granos se triturarán en un molino.
3. Tamizado. La harina se tamizará a través de mallas tamaño 250, 150 y 106 µm.
4. Extracción alcalina. La harina se dispersará en agua en una relación sólido/solvente de 1/15 y el pH de solución para la extracción será regulado a 10.78 con NaOH 1 N. Se agitará la muestra durante 1 h a temperatura ambiente.
5. Centrifugación 1. Los residuos insolubles serán separados del extracto líquido por centrifugación a 9000 rpm por 20 min a 20 °C. Se recogerá el extracto líquido.
6. Precipitación. El extracto líquido se ajustará a pH 4 con HCL 1N y se colocará en refrigeración 15 min.
7. Centrifugación 2. El extracto líquido se centrifuga a 9000 rpm por 20 min a 10 °C.
8. Lavado. Se lavarán los residuos insolubles con agua destilada en relación 1/5 (v/v) y se centrifugará a 9000 rpm por 20 min a 10 °C.
9. Secado. Se procederá a secar las proteínas precipitadas mediante el proceso de liofilización.
10. Las proteínas deshidratadas de frejol se colocarán en bolsas de polietileno de baja densidad y se almacenará a temperatura ambiente.

**Proceso de hidrólisis de proteínas de arveja seca**

A continuación, se describe las operaciones para obtener proteína hidrolizada (Yust y otros,2003):

1. Dilución concentrada/agua. Se empleará como sustrato una solución del concentrado proteico al 4% (p/v).
2. Ajuste de pH. Se ajustará el pH a 7.5 con NaOH 1 N.
3. Calentamiento 1. Se calentará la solución a una temperatura de 50 °C.
4. Digestión. Se efectuará empleando la enzima Alcalasa a diferentes concentraciones 1, 3 y 5 % a diferentes tiempos 15, 30 y 50 minutos con una relación enzima: sustrato de 1: 10 (v/v) en un vaso de precipitado de 2000 mL colocado en un baño de agua. Se empleará un termómetro y un pH metro para mantener constante la temperatura (50°C) y el pH (7.5) respectivamente.
5. Agitación. La agitación será constante durante toda la hidrólisis con un agitador mecánico a 300 rpm.
6. Calentamiento 2. La hidrólisis enzimática se detendrá por calentamiento a 85 ºC por 15 min en un baño de agua.
7. Centrifugación. Se centrifugará a 9000 rpm por 20 min.
8. Envasado. El hidrolizado de frejol se colocará en tubos de ensayo con tapa.
9. Refrigeración. Los tubos con hidrolizado se almacenarán en refrigeración a 0°C.

**Métodos de análisis**

**Análisis proximal de los granos y aislado proteico de arveja seca**

Se efectuará el análisis proximal del grano y del aislado proteico de la arveja (*Pisum sativum* L.) seca.

Primero se determinará la humedad del grano (método gravimétrico 935.29, AOAC, 1998), luego se determinará el contenido de proteínas totales mediante el método 960.52 (Referencia método AOAC, 1998).

Para fibra, se aplicará el método 692.09 (AOAC, 1998) que consiste en la determinación del remanente luego de la eliminación de los carbohidratos solubles por hidrólisis a compuestos más simples (azúcares) mediante la acción de los ácidos y álcalis débiles en caliente.

Para la determinación de grasa se aplicará el método 945.16 (AOAC, 1998), extracción de la grasa con un solvente orgánico (éter de petróleo) en un equipo Soxhlet.

El contenido de cenizas, se determinará de acuerdo al método oficial 923.03 (AOAC, 1998), el cual consiste en calcinar la muestra a 550 ºC, determinándose gravimétricamente el contenido de cenizas.

Finalmente, la determinación de carbohidratos (C) se obtendrá por diferencia entre los demás componentes

**Separación de proteínas en geles de poliacrilamida**

Para realizarlo, se empleará la técnica de la electroforesis en gelpermite analizar la composición proteica de las fracciones de los aislados proteicos.

La separación electroforética se lleva a cabo según el método descrito por Laemmli en geles de poliacrilamida (al 16% en acrilamida)

A 15 μlde las fracciones Fo – F3 se le añaden, en un eppendorf, tampón de carga (x3): (Tris-HCI0,125 M, pH 6,8; SDS4%; glicerol20%; 2-mercaptoetanol10%; Azul de bromo fenol 0,008%).

Calentarlas muestras a 95°Cdurante 3 min.

Cargaren pocillos 10 μl de F3y 5 μl del estándarde proteínas

Correr la electroforesisen tampon Tris-HCl 0,025 M, pH 8,8, glicina 0,192 M y SDS 0,1%, a una intensidad de corriente constante de 30 mA hasta que el azul de bromofenol este aproximadamente a 1 mm del extremo inferior del gel.

Desmontar el gel y teñirlocon metanol/acético/H20 (5/1/5) con azul de Coomassie (1g/l).

Desteñirel gel en metanol/acético/H20 (10/10/80).

**Grado de hidrolisis**

Se determinará el grado de hidrolisis (%GH) utilizando el método reportado por Kim y otros (1990). Este se estimará 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 del concentrado proteínico según la ecuación 1:

$$\%GH=\frac{Nitrogeno soluble en TCA al 10 \%}{Nitrogeno total}x 100$$

(Ec. 1)

Para evaluar la cantidad de nitrógeno soluble en TCA se tomarán 10 mL del hidrolizado y se mezclarán con 10 mL de TCA al 10 %. Esta mezcla se centrifugará a 9000 rpm por 15 min y el nitrógeno presente en el sobrenadante se determinará por el método Kjeldahl (AOAC, 1997). El nitrógeno total se medirá tomando 10 mL de la solución de concentrado proteico al 4% y se le determinará el contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl (AOAC, 1997). En las determinaciones de nitrógeno se utilizará el método 954.01 de la AOAC (1997).

**Acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus***

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los distintos hidrolizados proteicos de arveja seca, se empleará el método Kirby-Bauer desarrollado por Rojas y otros (2005) descrito a continuación:

1. Preparación del inóculo. Se tocará con un hisopo estéril la superficie de del tubo que contiene la cepa de *Staphylococcus aureus* y luego se sumergirá el hisopo en 3 mL de caldo nutritivo hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland cuya turbidez corresponderá a la concentración $10^{-8}$UFC/mL.
2. Método Kirby-Bauer. Se sumergirá un hisopo estéril y seco en el inoculo y se eliminará el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Se inoculará con éste la superficie de las placas de agar Müller Hinton a temperatura ambiente. Luego se embeberán discos de papel filtro whatman número 3 con 60 µL de cada uno de los hidrolizados proteicos de arveja por triplicado y se colocarán sobre las superficies de cada placa. Las placas se incubarán invertidas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, se medirán los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los discos. El control positivo será nisina a una concentración de 20 mg/mL péptido antimicrobiano reconocido por la Food and Drug Administration (FDA) y el control negativo agua destilada estéril y se realizará la misma metodología para ambos controles.

**Procesamiento de imágenes**

Para analizar el área de los halos de inhibición, se tomarán fotografías a las placas petri con una cámara Lumix Panasonic de 10 megapixels, con lente macro de 30 mm, DC Vario-Elmar 1:1.3–5.8/5.2–20.8 ASPH. La iluminación se realizará mediante un sistema de conformado por 4 fluorescentes de 6500 k marca Philips, colocados a 35 cm de altura a un ángulo de 45°, la superficie y paredes serán negras sin brillo, en un ambiente sin ingreso de luz externa (completamente oscura), La toma fotográfica se realizará a 25 cm de la muestra, sin flash ni zoom. Las imágenes se analizarán con el software Fiji is Just, donde la evaluación será en px2 que serán transformados a mm2 (González y Woods, 2008).

**Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante se determinará mediante el método de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). El fundamento de este método fue desarrollado por Brand-Williams y otros (1995) y Bersuder y otros (1998), descrito a continuación:

1. Se mezclará una solución de 2 g de hidrolizado proteico de frejol y arveja en una fiola de 10 mL enrasando con etanol al 96%.
2. Para determinar el porcentaje de inhibición se prepararán diferentes diluciones de la muestra anterior (2, 4, 6, 8 y 10 mg/mL).
3. Se tomará una alícuota de 500 µL de cada dilución y se añadirá 500 µL de una solución de DPPH compuesta por 375 µL de etanol al 96% y 125 µL de DPPH (0.02% en etanol al 96%) en tubos cubierta con papel aluminio para proteger de la luz. La mezcla se agitará a 60 rpm por 30 min a temperatura ambiente, la absorbancia se medirá a 517 nm.
4. Posteriormente se utilizarán los valores de absorbancia para calcular el porcentaje de inhibición del radical DPPH mediante la ecuación 2.

(Ec. 2)

$$\%CRL=100-\frac{Abs muestra}{Abs DPPH} X100$$

Donde:

Abs muestra: Absorbancia de la muestra

Abs DPPH: Absorbancia de la solución de DPPH

1. Los valores de porcentaje de inhibición serán usados para calcular la actividad antioxidante y se expresará como valor $IC\_{50}$, el cual representará la cantidad de muestra (µL) que reduce la concentración inicial de la solución del radical DPPH en un 50%, así un menor valor de $IC\_{50}$ indicará mayor actividad antioxidante porque se requiere menos cantidad de muestra para disminuir en un 50% la concentración inicial de la solución de DPPH (Avalos, 2010).

Método estadístico

En el Cuadro 2, se muestra el diseño factorial completo, donde se tiene a los factores concentración de alcalasa con nivel bajo de 1% (-1) y alto de 5% (+1); y tiempo con nivel bajo de 15 min (-1) y alto de 45 min (+1), y como variables respuesta a la capacidad antimicrobiana y antioxidante. El diseño constará de 4 tratamientos, los cuales serán replicados 3 veces, haciendo un total de 12 unidades experimentales.

**Cuadro 2. Diseño factorial completo 2k**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Réplicas** | **Alcalasa (%)** | **Tiempo (min)** | **Respuestas** |
| **Codificada** | **Real** | **Codificada** | **Real** | **Capacidad antimicrobiana (%)** | **Capacidad antioxidante (%)** |
| I | -1 | 1 | -1 | 15 |   |   |
| 1 | 5 | -1 | 15 |  |  |
| -1 | 1 | 1 | 45 |  |  |
| 1 | 5 | 1 | 45 |   |   |
| II | -1 | 1 | -1 | 15 |   |   |
| 1 | 5 | -1 | 15 |  |  |
| -1 | 1 | 1 | 45 |  |  |
| 1 | 5 | 1 | 45 |   |   |
| III | -1 | 1 | -1 | 15 |   |   |
| 1 | 5 | -1 | 15 |  |  |
| -1 | 1 | 1 | 45 |  |  |
| 1 | 5 | 1 | 45 |   |   |

Se realizará un análisis de varianza para determinar el efecto de cada factor sobre las variables respuesta, se evaluará los gráficos de interacción y se generará un modelo de regresión lineal; para medir la calidad global del modelo los valores de R2 y R2-ajustado deberán ser superiores al 85 y 75%, respectivamente. Se obtendrá la superficie de respuesta y de contornos, a partir de esta se determinará la zona con mejores condiciones de operación de concentración de alcalasa y tiempo que permitan obtener mayor capacidad antimicrobiana y antioxidante.

Todos los análisis se realizarán a un nivel de confianza del 95%, se utilizará el software estadístico R 3.2.5.

* 1. **Bibliografía**

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

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

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

AOAC. 1998. Official Methods of Analysis 16th. Edition. Association of Analytical Chemistry, Arlington, Washington D.C.

Avalos, C. 2010. Evaluación de la capacidad antioxidante de mezclas de zumos de naranja (*Citrus sinensis* L.) var. Washington navel, uva (*Vitis vinífera* L.) var. Alfonso lavallet y carambola (*Averrhoa carambola* L.) var. Golden star. Tesis para optar el título profesional de ingeniero agroindustrial. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.

Badui S. 2006. Química de los alimentos. Cuarta edición. Editorial Pearson Educación. México, D.F., México.

Baltodano, S. 2016. Efecto de la concentración de alcalasa y tiempo de digestión sobre el grado de hidrolisis y acción inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* en el hidrolizado proteico de frijol nuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pava. Tesis para optar el título de Ingeniera en Industrias Alimentarias de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Privada Antenor Orego. Trujillo, Perù.

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

Belitz H., Grosch W. y Schieberle P. 2012. Química de los alimentos. Tercera edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

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

Bersuder, P.; Hole, M., y Smith, G. 1998. Antioxidants from a heated histidine glucose model system. I: Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high performance liquid chromatography. Journal of the American Oil Chemists’ Society, 75(9):181–187.

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

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

Boulter, D. 1983. Regulation of storage protein synthesis and deposition in developing pea seeds. In: Encyclopedia of food science. M.S. Peterson and A.H. Johnson (Ed):221-224. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. y Berset, C. 1995. Use of the radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. Technol 28:25-30.

Cabezas, E. 2016. Caracterización físico, químico, sensorial y funcional de la proteína aislada de la arveja (*Pisum sativum* L.). Tesis para optar el título de Ingeniera Agroindustria Alimentaria de la Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras.

Coscueta, E. R., Amorim, M. M., Voss, G. B., Nerli, B. B., Picó, G. A., & Pintado, M. E. 2016. Bioactive properties of peptides obtained from Argentinian defatted soy flour protein by Corolase PP hydrolysis. Food chemistry, 198: 36-44.

Cruz-Cervera, G.; Castellanos-Ruelas, A.; Rosado-Rubio, G. y Chel-Guerrero, L. 2010. Capacidad antioxidante de hidrolizados enzimáticos de la proteína de frijol terciopelo *Mucuna pruriens.* Revista de la Facultad de Ingeniería Química, 50(12):17-25.

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

Damodaran S., Parkin K. y Fennema O. 2010. Química de los alimentos. Tercera edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

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

Davidsson L, Dimitriou T, Walczyk T, Hurrell RF. 2001. Iron absorption from experimental infant formulas based on pea (Pisum sativum)-protein isolate: the effect of phytic acid and ascorbic acid. Br J Nutr. 85(1):59–63

Do Evangelho, J. A., Vanier, N. L., Pinto, V. Z., De Berrios, J. J., Dias, A. R. G., & da Rosa Zavareze, E. (2017). Black bean (Phaseolus vulgaris L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. *Food chemistry*, *214*, 460-467.

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

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

Jarpa-Parra, M., Bamdad, F., Wang, Y., Tian, Z., Temmelli, F. Han, J y Chen, L. 2014. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. Food Science and Technology, 57(2):461-469.

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

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

Lin, M. J.Y., Humbert E. S., y Sosulski F. W. 1975. Certain functional properties of sunflower meal (Helianthus annuus). Journal of Food Science: 39 (2): 368-370.

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

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

Luke C. 2012. Nueva proteína alternativa para satisfacer la demanda mundial. Industria Alimenticia; [consultado 2016 septiembre 01]. (http://www.industriaalimenticia.com/articles/85915-nueva-proteina-alternativa-para-satisfacer-la-demanda-mundial

Ministerio de Agricultura y Riego del Perú (MINAGRI). 2017. Anuario estadístico de producción agrícola y ganadero 2016. Sistema Integrado de Estadística Agraria (SIEA). Lima, Perú.

Mokni, A.; Sila, A.; Przybylski, R., Nedjar-Arroume, N.; Makhluof, L.; Blecker, C.; Attia, H.; Dhulster, P.; Bougatef, A. y Besbes, S. 2014. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of chickpea (*Cicer arietinum L*.) protein concentrate. Journal of functional foods 12(2015):516–525.

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

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

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

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2016. Legumbres: semillas nutritivas para un futuro sostenible. Consultado el: 17/07/17. Disponible en:

<http://www.fao.org/pulses-2016/en/>

Pimentel, D.; Dritschllo, W.; Krummel, J. y Kutzman, J. 1975. Energy and land constraints in food protein production. Science 190:754-761

Reinkensmeier A, Bußler S, Schlüter O, Rohn S, Rawel HM. 2015. Characterization of individual proteins in pea protein isolates and air classified samples. Food Research International. 76:160–167.

Rojas, J.; García, M. y López, J. 2005. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 4(2):28-32. Universidad de Santiago de Chile. Santiago, Chile.

Roy, F., Boye, J. Y Simpson B. 2010. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. Food Research International 43: 432-442.

Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortíz, G., & 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), 1597-1604.

Valdez-Ortiz, A.; Fuentes-Gutiérrez, C.; Germán-Báez, L.; Gutiérrez-Dorado, R. y Medina-Godoy, S. (2012). Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (Phaseolus vulgaris): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. *LWT-Food Science and Technology*, *46*: 91-96.

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

Wani, I. A., Sogi, D. S., Shivhare, U. S., & Gill, B. S. (2015). Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (Phaseolus vulgaris L.) protein isolates. *Food Research International*, *76*, 11-18.

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

|  |
| --- |
| **CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES** |
| **ACTIVIDAD** | **INICIO** | **FIN** |
| Adquisición de granos y reactivos | 03/07/2017 | 31/08/2017 |
| Acondicionamiento del laboratorio | 03/07/2017 | 31/08/2017 |
| extracción de proteínas | 04/09/2017 | 31/10/2017 |
| Hidrolizado de proteínas | 02/10/2017 | 30/11/2017 |
| Preparación del informe parcial | 01/12/2017 | 29/12/2017 |
| Informe Parcial del Proyecto  | 01/12/2017 | 29/12/2017 |
| Evaluación de propiedadesfuncionales | 02/01/2018 | 30/03/2018 |
| Análisis de resultados | 02/04/2018 | 27/04/2018 |
| Preparación del informe final | 01/05/2018 | 31/05/2018 |
| Informe Final del Proyecto  | 01/05/2018 | 31/05/2018 |
|  |  |  |  |

|  |
| --- |
| **PRESUPUESTO** |
| **DESCRIPCION** | **CANTIDAD** | **PRECIO\_UNITARIO** | **PRECIO\_PARCIAL** |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1 UNI | 389.40 | 389.40 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1 UNI | 59 | 59 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 389.40 | 389.40 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 177 | 177 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 1616.60 | 1616.60 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 1357 | 1357 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 295 | 295 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 82.60 | 82.60 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 1534 | 1534 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 402.38 | 402.38 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 374.06 | 374.06 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 259.60 | 259.60 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 1180 | 1180 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 330.40 | 330.40 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 401.20 | 401.20 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 330.40 | 330.40 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 613.60 | 613.60 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 377.60 | 377.60 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 413 | 413 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 129.80 | 129.80 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 206.50 | 206.50 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 123.90 | 123.90 |
| OTROS | 1UNI | 826 | 826 |
| MATERIAL DE VIDRIO | 1UNI | 141.60 | 141.60 |
| MATERIAL DE VIDRIO | 10 UNI | 4.48 | 44.80 |
| OTROS | 4UNI | 21.24 | 84.96 |
| CONSULTOR | 1UNI | 600 | 600 |
| PASAJES | 1UNI | 180 | 180 |
| ALIMENTACION | 1UNI | 100 | 100 |
| MATERIAL DE VIDRIO | 2UNI | 23.60 | 47.20 |
| MATERIAL DE VIDRIO | 1UNI | 106.20 | 106.20 |
| OTROS | 4UNI | 47.20 | 188.80 |
| OTROS | 1UNI | 200 | 200 |
| TRANSPORTE NACIONAL | 1UNI | 1300 | 1300 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 377.60 | 377.60 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 368.57 | 368.57 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 318.60 | 318.60 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1UNI | 259.60 | 259.60 |
| MATERIAL DE VIDRIO | 2UNI | 14.16 | 28.32 |
| OTROS | 1UNI | 743.40 | 743.40 |
| MATERIAL DE VIDRIO | 4UNI | 33.68 | 134.72 |
| Alimento | 10 KG | 17.70 | 177 |
| MATERIAL DE VIDRIO | 1UNI | 712.21 | 712.21 |
| OTROS | 1UNI | 94.40 | 94.40 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 2UNI | 826 | 1652 |
| OTROS | 1UNI | 47.20 | 47.20 |
| OTROS | 1UNI | 47.20 | 47.20 |
| MATERIAL DE VIDRIO | 4UNI | 17.96 | 71.84 |
| PASAJES | 1UNI | 50 | 50 |
| TOTAL (S/.) | 19 944.66 |
|  |  |  |  |  |