



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Extracción y caracterización química de las
fracciones proteicas de la harina de chícharo
(*pisum sativum*).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

MARIELY SALDAÑA FLORES

ASESORES:

DRA. MARÍA ANDREA TREJO MÁRQUEZ

M. EN C. DAVID RODRIGO LÓPEZ SOTO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Extracción y caracterización química de las fracciones proteicas de la harina de chícharo (*Pisum sativum*).

Que presenta la pasante: **Mariely Saldaña Flores**

Con número de cuenta: 310327648 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de agosto de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
VOCAL	Dra. Carolina Moreno Ramos	
SECRETARIO	Dra. María Andrea Trejo Márquez	
1er. SUPLENTE	I.A. Miriam Alvarez Velasco	
2do. SUPLENTE	M. en C. Selene Pascual Bustamante	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

El presente trabajo fue financiado por el proyecto: Desarrollo tecnológico para el aprovechamiento integral de frutas y hortalizas (PAPIIT IT201216) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM.

Agradecimientos

A **Dios** y a la **virgen de Guadalupe** por permitirme llegar a este momento tan importante de mi vida, por llenarme de bendiciones y mantener mi fe encendida.

A mis padres, **Yaneli y Rolando**, por apoyar siempre mis decisiones, por esos consejos y palabras de aliento cuando más lo necesitaba y por su inmenso amor. Les agradezco infinitamente por darme la oportunidad de estudiar y nunca dejarme sola en este camino. ¡Los amo!

A mis hermanos, **Rolando y Mauricio**, por impulsarme a ser un mejor ejemplo cada día.

A mi familia paterna, en especial a mis tíos, **Isaías, Valentina, Armando y Alicia** y a mi abuelita **Amalia**, por apoyarme siempre en todos los sentidos, por sus palabras de motivación y por su cariño.

También a mi familia materna, en especial a mis tíos, **Alejandro, Luz María, Jesús, Leticia y Pedro**, y mis abuelitos **Ana y Luis**, por preocuparse siempre por mí y por su apoyo incondicional.

Mil **gracias** a todos ustedes por formar parte de este gran logro.



Agradecimientos

A mi alma máter, la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por darme la oportunidad de pertenecer a su comunidad y por permitir mi formación como profesionista.



Mi profundo agradecimiento a mi asesora, **Dra. María Andrea Trejo Márquez**, por todo su apoyo brindado en la última y más importante etapa de mi carrera, por las experiencias vividas y por sus gratos consejos. Gracias por su tiempo, disposición y motivación para que este proyecto se llevara a cabo.

A mi asesor, **M. en C. David Rodrigo López Soto**, por su dedicación y tiempo brindado a este proyecto. Gracias por los consejos y motivación cuando más los necesitaba.

A la **Dra. Alma Adela Lira Vargas** y a la **M. en C. Selene Pascual Bustamante**, por compartirme parte de sus conocimientos, por sus aportaciones a este proyecto y por hacer una agradable estancia en el Laboratorio de Postcosecha.

A la **Dra. Carolina Moreno Ramos**, por su tiempo, dedicación y apoyo a este proyecto. Gracias por compartir sus conocimientos, por sus buenos consejos y por ser una excelente persona.

También agradezco a mis sinodales la **Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz** y la **I.A. Miriam Alvarez Velasco**, por sus comentarios y tiempo dedicado a este proyecto.

Agradecimientos

A mis compañeros de laboratorio: **Alejandra, Angélica, Aurora, Bárbara, Jessica, Johana, Jossafath, Karen, Mara, Melina, Miriam y Wendy**, por los momentos agradables en el taller, por las risas interminables y por su apoyo brindado.

A mis amigos de la carrera: **Carlos Enrique, Gabriela, Mario Isaac, Juan Carlos, Laura Beatriz y Laura Concepción**, por ser parte de esta gran aventura, gracias por sus locuras, chistes, risas y por los buenos momentos vividos.

Con amor, admiración y respeto.

Mariely

“Por mi raza hablará el espíritu”



Índice General

Índice de tablas.....	III
Índice de figuras.....	IV
Resumen.....	2
1. Introducción.	4
2. Antecedentes.	7
2.1. Generalidades del chícharo (<i>Pisum sativum</i>).	7
2.1.1. Origen e historia.....	7
2.1.2. Taxonomía y fisiología.	8
2.1.3. Variedades de chícharo.	9
2.1.4. Importancia económica.	10
2.1.5. Composición química y valor nutrimental del chícharo.....	12
2.2. Proteína de chícharo.	13
2.3. Caracterización de las proteínas.	15
2.3.1 Perfil de proteínas por solubilidad.	15
2.4. Hidrolizados proteicos.	16
2.4.1. Métodos de obtención de hidrolizados proteicos.....	17
2.4.1.1. Método químico.....	17
2.4.1.2. Método enzimático.....	18
2.5. Tipos y aplicaciones de hidrolizados proteicos vegetales.	20
2.6. Métodos analíticos para estudio de proteínas.....	22
2.6.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS).	22
2.6.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).	24
3. Objetivos.	26
4. Metodología experimental.	28
4.1. Cuadro metodológico.	28
4.2. Material biológico.	29
4.3. Tratamiento de la muestra.....	29
4.4. Análisis químico proximal de la harina de chícharo.	30
4.5. Técnicas analíticas.....	30
4.6. Hidrólisis alcalina de la harina de chícharo.....	31

4.7. Cuantificación de proteínas totales.....	32
4.8. Perfil de proteínas por solubilidad de acuerdo al método de Osborne.	34
4.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.....	35
4.10. Perfil de aminoácidos de la fracción mayoritaria.....	36
4.11. Análisis estadístico.....	37
5. Resultados y discusión.....	39
5.1. Análisis químico proximal de la harina de chícharo.	39
5.2. Hidrólisis alcalina.....	40
5.3. Análisis del perfil de proteínas por el método de Osborne.....	43
5.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.....	47
5.5. Perfil de aminoácidos de la fracción mayoritaria.....	50
6. Conclusiones.....	54
7. Recomendaciones.....	56
8. Bibliografía.....	58
Anexo.....	67
Procedimiento de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.....	67

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía del chícharo.....	8
Tabla 2. Clasificación de las variedades de chícharo.	9
Tabla 3. Composición nutricional del chícharo fresco y seco.....	12
Tabla 4. Características de las fracciones proteicas.....	15
Tabla 5. Composición proteica según el fraccionamiento de Osborne, para las principales leguminosas (g/100g de proteína).	16
Tabla 6. Función y uso de los hidrolizados proteicos.....	17
Tabla 7. Condiciones de obtención de hidrolizados con bases fuertes.....	18
Tabla 8. Hidrolizados para alimentación especializada.	22
Tabla 9. Composición química de las harinas de chícharo.....	39
Tabla 10. Contenido de proteína en las muestras para el perfil de aminoácidos.....	51
Tabla 11. Perfil de aminoácidos de las fracciones de globulinas y glutelinas.	51
Tabla 12. Reactivos para preparar la solución de acrilamida/bisacrilamida al 30%..	67
Tabla 13. Reactivos para preparar el gel separador con 12 % de acrilamida.	68
Tabla 14. Reactivos para preparar el gel concentrador con 5% de acrilamida.	69
Tabla 15. Reactivos para preparar buffer de electroforesis.	70

Índice de figuras

Figura 1. Fisiología de la planta <i>Pisum sativum</i>	8
Figura 2. Producción de chícharo en México en los últimos diez años.	11
Figura 3. Estados con mayor producción de chícharo en México.	11
Figura 4. Modelos tridimensionales de las diferentes proteasas.	19
Figura 5. Cuadro metodológico.	28
Figura 6. Diagrama de proceso para la elaboración de la harina de chícharo.....	29
Figura 7. (A) Método de Bradford. (B) Determinación de fibra cruda.	30
Figura 8. Determinación de humedad por estufa.....	30
Figura 9. Determinación de fibra cruda.	31
Figura 10. Diagrama de proceso de extracción de proteínas por hidrólisis alcalina. 32	
Figura 11. (A) Gráfica de curva patrón. (B) Obtención de curva patrón, de menor a mayor concentración (de izquierda a derecha).....	33
Figura 12. Diagrama del fraccionamiento de proteínas por el método de Osborne. 34	
Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.....	36
Figura 14. Contenido proteico de hidrolizados obtenidos a diferentes condiciones de extracción.	41
Figura 15. Rendimiento en contenido proteico de hidrolizados obtenidos a diferentes condiciones de extracción.	42
Figura 16. Rendimiento en masa obtenido de hidrolizados obtenidos a diferentes condiciones de extracción..	43
Figura 17. Perfil de proteínas de la harina de chícharo..	44

Figura 18. Perfil de proteínas del hidrolizado con bajo rendimiento proteico, obtenido a las condiciones de extracción de 20°C y 16 horas.	46
Figura 19. Perfil de proteínas del hidrolizado con alto rendimiento proteico, obtenido a las condiciones de extracción de 30°C y 24 horas.	47
Figura 20. Perfil electroforético de la harina de chícharo y las fracciones proteicas del hidrolizado del mayor rendimiento proteico (24 horas, 30°C).....	49
Figura 21. Perfil electroforético de la harina de chícharo y las fracciones proteicas del hidrolizado del menor rendimiento proteico (16 horas, 20°C).....	50
Figura 22. Instalación de placas de vidrio.	69
Figura 23. Polimerización del gel concentrador con el peine colocado.	70
Figura 24. Colocación de las muestras en los pozos.	71
Figura 25. Instalación de la cámara electroforética y la fuente de poder.....	71
Figura 26. Separación del gel de las placas y su tinción.	72
Figura 27. Decoloración de los geles.	72

RESUMEN

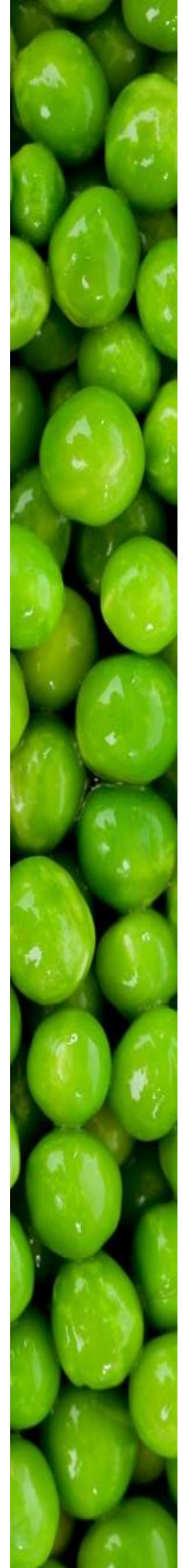


Resumen

La legumbre *Pisum sativum*, conocida como chícharo, es rica en proteínas de alta calidad, ésta contiene a todos los aminoácidos esenciales que el organismo humano requiere. En México se producen anualmente más de 66 mil toneladas de chícharo, dónde el Estado de México es el principal productor con un 47 % de la producción total. El objetivo del presente trabajo es la extracción y caracterización química de las fracciones proteicas de la harina de chícharo, mediante el cual se pretende encontrar una funcionalidad a la fracción mayoritaria, y proponer una aplicación tecnológica.

Chícharo de variedad "*Early perfection*" se utilizó para obtener una harina mediante una operación de secado (50 °C por 24 horas) y molienda. A partir de esta harina se realizó un tratamiento de hidrólisis alcalina a diferentes condiciones de temperatura (20 y 30 °C) y tiempo (16 y 24 horas), se cuantificó la proteína y se calcularon rendimientos. A los hidrolizados de mayor y menor rendimiento se les realizó un fraccionamiento de proteínas por el procedimiento de Osborne y una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Por último a las fracciones predominantes se determinó el perfil de aminoácidos por cromatografía líquida de alta eficacia. Las condiciones de hidrólisis con mayor rendimiento fueron las de 30 °C y 24 horas reportando una concentración de 0.34 mg de proteína/g harina, obteniendo 0.92 % albúminas, 24.09 % globulinas, 3.4 % prolaminas y 41.51 % de glutelinas en el fraccionamiento de Osborne; cuyos pesos moleculares fueron de 14.2 a 45 kDa. Las fracciones presentaron un perfil de aminoácidos con 61 % de arginina en la fracción de globulinas y 34 % en las glutelinas. Como conclusión se recomienda el tratamiento a 30 °C durante 24 horas para obtener una fracción enriquecida de glutelinas con un alto contenido en arginina. El posible uso de la fracción proteica de glutelinas es en la industria alimentaria, ya que se utilizan para conferir viscosidad y elasticidad a los alimentos, principalmente en la industria panadera. Y la importancia que posea un alto contenido de arginina, radica en que puede ser utilizado como aditivo alimenticio y esto ayuda en las funciones del organismo humano por su importante participación en las vías metabólicas.

INTRODUCCIÓN



1. Introducción.

Las leguminosas forman parte de los primeros productos alimenticios que fueron cultivados por el hombre (Gil, 2010). Son plantas que pertenecen a la Familia *Fabaceae*, ésta es la tercera familia más grande con 946 géneros y 24 505 especies aceptadas; se distinguen por producir frutos tipo vainas que contienen semillas en su interior (Rathi *et al.* 2016).

Se entiende por legumbres a las semillas secas de plantas leguminosas y éstas a su vez se diferencian de las semillas oleaginosas de leguminosas por su bajo contenido de grasa (FAO/CODEX, 2007). Las legumbres destacan por su alto contenido en proteínas, ya que éstas poseen el doble o triple de las proteínas en comparación con los cereales, lo que las convierte en una importante fuente de proteínas vegetales (Astiasarán & Martínez, 2003 FAO/SMIA, 2001). El valor biológico de las proteínas de las legumbres es menor que el de las carnes, debido a su deficiencia en aminoácidos azufrados, también a que la estructura de las proteínas dificulta la acción de las enzimas digestivas; y a la presencia de inhibidores de proteasas que inhiben la acción de las enzimas digestivas. Los anteriores factores reducen la digestibilidad de las proteínas de las legumbres. Sin embargo, es posible mejorar la calidad proteica en la alimentación, combinando las legumbres con los cereales, ya que estos últimos son ricos en aminoácidos azufrados (Gil, 2010).

Entre las legumbres, la soja es la que presenta mayor contenido proteico con 35 g/100g, pero esta legumbre contiene más lípidos que el resto de los alimentos de este grupo. Por lo cual el chícharo es un buen candidato para satisfacer las necesidades proteicas, ya que posee un bajo contenido en grasas y un favorable aporte de carbohidratos.

El chícharo es una legumbre perteneciente al género *Pisum* y especie *sativum*, siendo ésta la especie más extendida en la alimentación humana (Mateo, 1961). Este guisante es reconocido por ser rico en su contenido de proteínas y además que éstas son de alta calidad, ya que contiene a todos los aminoácidos esenciales para el organismo (Ordoñez, 2010).

Las proteínas presentes en el chícharo pueden clasificarse como proteínas foliares, de semillas, de tallo y raíz. Las proteínas que se encuentran en las semillas se denominan

proteínas de almacenamiento o de reserva. Osborne (1924) clasificó las proteínas de la semilla con base en su solubilidad en cuatro tipos: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas. En general, las proteínas de reserva tienen un contenido de nitrógeno relativamente alto en comparación con las de los animales (17-19%). También tienen un alto contenido de arginina, ácidos decarboxílicos y nitrógeno amídico (Danielson, 1952), las prolaminas y las principales globulinas de semillas funcionan principalmente como recursos de nitrógeno y carbono para germinar las semillas (Gupta & Mahajan, 2010).

La versatilidad de usos del chícharo van desde el consumo humano en fresco, hasta pasar por diversos procesos agroindustriales para su conservación (enlatado, deshidratados, congelados, harinas), o como fuente de proteína a partir de hidrolizados proteicos (Ordoñez, 2010). Los hidrolizados proteicos son los productos que se obtienen después de un proceso de hidrólisis química o enzimática de las proteínas. Este proceso se basa en la rotura del enlace peptídico y en consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres. La rotura de estos enlaces puede producirse por métodos químicos o biológicos (Clemente *et al.*, 1999).

El método biológico es aquel que utiliza una enzima (proteasa) para hidrolizar los enlaces peptídicos. Este método se realiza en condiciones específicas de pH y temperatura que van a reducir la formación de compuestos indeseables. Mientras que el método químico produce hidrolizados a través de un tratamiento con ácidos o bases. El efecto que generan las condiciones alcalinas severas son perjudiciales sobre la calidad nutricional del hidrolizado, ya que se destruyen L-aminoácidos (en las proteínas sólo se encuentran aminoácidos de configuración L), se forman D-aminoácidos y compuestos tóxicos como la lisinoalanina (Clemente *et al.*, 1999).

Por esta razón el objetivo del presente estudio es la extracción y caracterización química de las fracciones proteicas de la harina de chícharo, mediante el cual se pretende encontrar una funcionalidad a la fracción proteica mayoritaria, y así poder solucionar parte del problema de absorción de proteínas, ya que se encontrarán totalmente disponibles

ANTECEDENTES



2. Antecedentes.

2.1. Generalidades del chícharo (*Pisum sativum*).

2.1.1. Origen e historia.

El cultivo de este guisante se cree que fue uno de los primeros en ser domesticado por el hombre en la región del Cercano Oriente, en la región actual de Iraq, hace más de 7000 - 6000 a.C. en conjunto con otros cultivos como el trigo, la cebada y la lenteja. La especie cultivada y la silvestre convivieron juntas durante un gran periodo de tiempo, existiendo hibridaciones entre ambas. Dos tipos de guisantes silvestres parecen estar relacionados genéticamente con la especie cultivada: *Pisum sativum elatius*, distribuyéndose por las zonas húmedas de la cuenca mediterránea; y *P. humile Boiss et Nöe*, que se encuentra en la zona del Cercano Oriente. Lo anterior se puede confirmar con el hallazgo de restos de semillas carbonizadas que se han descubierto al norte de Iraq, en el sudeste de Turquía y en Jericó. Vavilov, botánico ruso y autor del libro “Origin and Geography of Cultivated Plants” (1987); distinguió cuatro centros de origen, hoy considerados de diversidad: el del Próximo Oriente, verdadero Centro de origen, el abisínico (Etiopía), el mediterráneo (Turquía, Grecia, Yugoslavia, Líbano), y el de Asia Central (noroeste de la India, Pakistán, Afganistán, Rusia); los tres últimos son centros secundarios (Nadal *et al.*, 2004).

Hasta el siglo XVI no se utilizó como planta hortícola, dándose este uso primeramente en Inglaterra, pasando luego a Francia donde se impuso en el reinado de Luis XIV, amante del guisante verde en su mesa (Nadal *et al.*, 2004). Fueron los primeros colonizadores ingleses quienes llevaron el guisante a Norteamérica en el siglo XVII, donde prosperó gracias a la temperatura y humedad del clima de la región. En esa región se constituyó como el alimento preferido por los indios, que lo comían cocido con trozos de carne de búfalo (Giambanco de Ena, 2018).

Actualmente el chícharo junto con otras legumbres es la base de la dieta de la población, ya que sus proteínas son ricas en lisina, aminoácido esencial, y se complementan con los cereales que contienen aminoácidos azufrados (metionina y cisteína).

2.1.2. Taxonomía y fisiología.

El botánico sueco Carlos Linneo, en su libro “*Species Plantarum*” (1753) le asigna a esta planta el nombre científico de “*Pisum Sativum*” o cultivado. El chícharo (también llamado guisante o arveja) pertenece a la familia *Fabaceae*, género *Pisum*, cuya taxonomía completa se presenta en la tabla 1. En la actualidad se reconocen dos especies dentro del género *pisum*, estos son: el guisante cultivado *Pisum sativum* L. y *Pisum fulvum* (Nadal *et al.*, 2004).

Tabla 1. Taxonomía del chícharo.

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Fabales</i>
Familia	<i>Fabaceae</i>
Sub familia	<i>Faboideae</i>
Tribu	<i>Fabeae</i>
Género	<i>Pisum</i>
Especie	<i>Pisum sativum</i>

Fuente: Botanical-online (2017)

El guisante es una planta anual herbácea cuya altura varía entre 30 y 150 centímetros (figura 1). Consta de una raíz principal con un gran número de raíces laterales; y de un tallo débil. Sus hojas de forma pinnada están compuestas con folíolos en pares de 1 a 3 por cada una de ellas, cuyos peciolo terminan en zarcillos que le sirven para guiar. Las flores son blancas o púrpuras y crecen a partir de las axilas de las hojas y forman frutos en vainas que pueden contener de 2 a 10 semillas, estas pueden ser esféricas o angulosas, verdes o amarillas, llamadas chícharos (Parsons *et al.*, 1981).



Figura 1. Fisiología de la planta *Pisum sativum*.

2.1.3. Variedades de chícharo.

Existen muchas variedades de chícharos cultivados en el mundo y éstos se han clasificados por diferentes criterios que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de las variedades de chícharo.

	Características	Variedades	Imagen
Por su tamaño	<ul style="list-style-type: none"> Variedades enanas: Son aquellas que no superan los 45cm de altura y no precisan tutor para sostenerse. 	<p><i>Aureola</i> y <i>Negret.</i></p>	
	<ul style="list-style-type: none"> Variedades trepadoras: Son aquellas que pueden alcanzar hasta los dos metros de altura. Precisan de algún asidero o tutor para poder trepar. 	<p><i>Astérix</i> y <i>Lincoln.</i></p>	
Por la fecha cuando se siembran	<ul style="list-style-type: none"> Variedades tempranas: Son aquellas que se siembran en octubre y producen fruto a lo largo del invierno porque son capaces de aguantar las temperaturas frías. 	<p><i>Froger</i> y <i>Frimas.</i></p>	
	<ul style="list-style-type: none"> Variedades tardías: Son aquellas que se siembran en primavera. 	<p><i>Early</i> <i>Perfection.</i></p>	

Tabla 3. Clasificación de las variedades de chícharo (Continuación).			
	Características	Variedades	Imagen
Por las características del fruto	<ul style="list-style-type: none"> • Variedades de fruto liso. 	<i>Voluntario.</i>	
	<ul style="list-style-type: none"> • Variedades de fruto rugoso. 	<i>Televisión.</i>	
Por el color de los frutos	<ul style="list-style-type: none"> • Colores verde claro, destinados a ser utilizados en conserva. 		
	<ul style="list-style-type: none"> • Colores verde oscuro, destinados a ser comido directamente frescos o congelados. 		

Fuente: Botanical-online (2017)

2.1.4. Importancia económica.

El cultivo del chícharo se encuentra en prácticamente todos los lugares del mundo. El principal país productor es la India, seguido de China y Estados Unidos. En Europa los principales productores son Francia y el Reino Unido. En América del Sur se encuentra Perú como primer productor seguido de México y Colombia. En el continente africano Egipto es el mayor productor seguido de Argelia y Marruecos. Otros países con abundante producción son Pakistán, Turquía y Rusia (FAO/STAT, 2016).

En la figura 2 se muestra la producción de México en los últimos diez años, en la cual se observa que ha tenido variaciones, esto debido a que entre cada año difieren en la cantidad de hectáreas de superficie sembrada y en consecuencia la cosechada; también debido a superficie siniestrada como consecuencia de factores ambientales y de plagas. Los tres últimos años han sido los de mayor producción por arriba de las 60 mil toneladas.

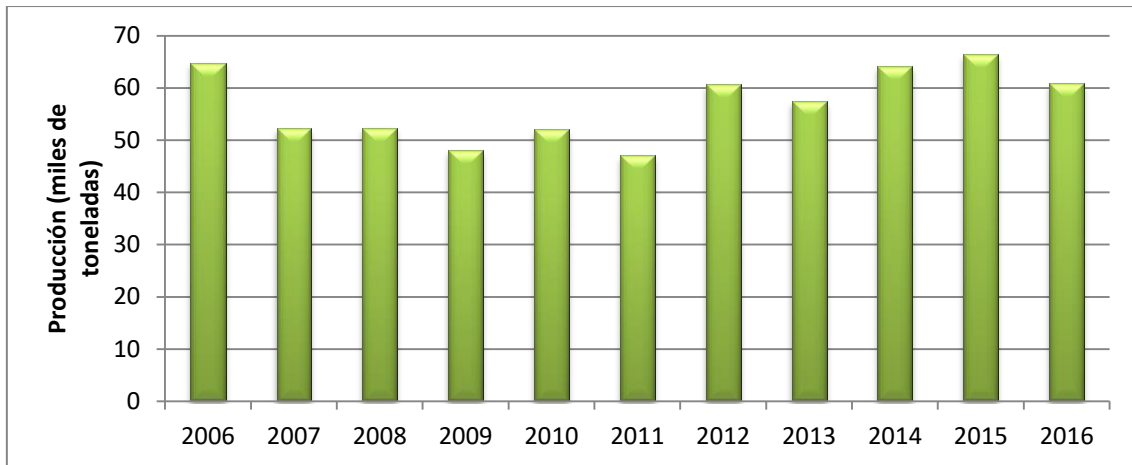


Figura 2. Producción de chícharo en México en los últimos diez años.
Fuente: Elaborado con información obtenida de SIAP/SAGARPA (2016).

En México se destinan más de 12 mil hectáreas para su cultivo, produciéndose más de 66 mil toneladas de chícharo anualmente. El principal productor es el Estado de México con 31 mil toneladas anuales seguido de Puebla con 13 mil y Baja California con 7 mil toneladas (SIAP/SAGARPA, 2016). En la figura 3 se pueden observar los valores porcentuales de la producción nacional por estado.

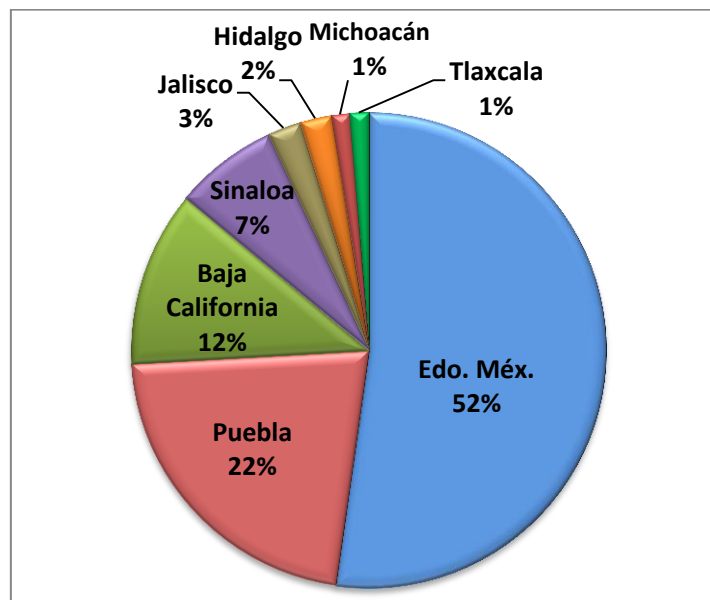


Figura 3. Estados con mayor producción de chícharo en México.
Fuente: Elaborado con información obtenida de SIAP/SAGARPA (2016).

En el Estado de México la siembra de chícharos de variedades tempranas se da entre el 1 de junio al 15 de julio y posteriormente la cosecha entre los meses de septiembre y octubre,

cuando las vainas estén verdes y la semilla haya crecido por completo. Las variedades que más se cultivan son *Early Perfection*, *Perfection 326* y *Rogger* (ICAMEX, 2018).

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación informó que al cierre del año 2016, las exportaciones agroalimentarias que realiza México a Canadá aumentaron en 11.2 %, en relación a lo registrado en el año previo, lo que ubica a esta nación como el segundo socio comercial de México en materia agroalimentaria gracias a la calidad de los productos nacionales. Las verduras congeladas entre ellas los chícharos, son uno de los bienes agroalimentarios de gran importancia, el cual registró un crecimiento de 28.8% (SAGARPA, 2016).

2.1.5. Composición química y valor nutrimental del chícharo.

La composición química del chícharo es distinta si se trata de chícharo fresco o seco. La composición nutritiva del guisante fresco y seco (referido a 100 gramos de peso) es la mostrada en la tabla 3.

Tabla 4. Composición nutricional del chícharo fresco y seco.

Componente	Guisante fresco	Guisante seco
Valor energético	84 cal	341 kcal
Agua	78 %	11.2 %
Proteínas	6.3 g	24.5 g
Carbohidratos	14.4 g	60.3 g
Grasas	0.4 g	1.1 g
Fibra	4.3 g	25.5 g
Cenizas	0.9 g	2.6 g
Calcio	26 mg	55 mg
Fósforo	116 mg	366 mg
Hierro	1.9 mg	4.4 mg
Sodio	2 mg	15 mg
Potasio	316 mg	981 mg
Tiamina	0.35 mg	0.73 mg
Riboflavina	0.14 mg	0.22 mg
Niacina	2.9 mg	2.8 mg
Ácido ascórbico	27 mg	2 mg

Fuente: RDU/UNAM (2017), INCAP (2012)

Los granos de chícharos lisos contienen aproximadamente el 45 % del peso de la semilla en almidón. Los rugosos contienen un 55% de almidón, un 22 % de proteína y un 2 % de grasa. La velocidad de transformación de azúcares en almidón es más rápida en los chícharos de semilla lisa y más lenta en los de semilla rugosa, información que se tiene que tener en

cuenta a la hora de fijar la fecha de recolección. El componente mayoritario, como en otras leguminosas, es el de los carbohidratos, siendo el más abundante de ellos el almidón (37-49%), teniendo la amilosa el 34% del peso de la semilla (Nadal *et al.*, 2004).

Los chícharos tienen un alto contenido de fibra, que aumenta el peristaltismo intestinal y favorece la expulsión de las heces por lo que previene la aparición del estreñimiento. Son muy ricos en vitaminas del grupo B, como la tiamina (vitamina B1) que es necesaria para que el sistema nervioso se nutra de glucosa adecuadamente, la niacina (vitamina B3) junto con la tiamina, piridoxina y la rivo flavina, contribuyen en mantener el sistema nervioso en buen estado. Además contiene una cantidad importante de minerales como el hierro, que es necesario para la prevención de la anemia, el calcio interviene en la formación de los huesos y puede prevenir la osteoporosis y el fósforo, además de ser necesario para la producción de energía corporal, constituye el segundo mineral más importante después del calcio en la formación de los huesos (Marinangeli *et al.*, 2009).

Las legumbres en general son alimentos ricos en proteínas, calcio, hierro, magnesio, fósforo, hidratos de carbono y vitaminas. No contienen grasas saturadas que pueden ser dañinas, además de que, gracias a la fibra que contienen, benefician al sistema digestivo ayudando a eliminar toxinas (Pylar & Gorton, 2008).

2.2. Proteína de chícharo.

Las proteínas son moléculas esenciales para el cuerpo durante la etapa de crecimiento y el mantenimiento de los tejidos, como son los músculos, la piel, el pelo, las uñas, los órganos internos y hasta la sangre. Las proteínas están formadas por cadenas de aminoácidos, de estos existen los llamados no esenciales, que pueden ser sintetizados por el cuerpo humano, y los esenciales, que se obtienen a partir de alimentos de la dieta (Ordoñez, 2010).

La proteína presente en el chícharo es una proteína completa, ya que cuenta con casi todos los aminoácidos esenciales y es particularmente alta en aminoácidos ramificados así como en arginina, lisina y fenilalanina. La proteína del chícharo es una de las mejores fuentes de origen no animal de aminoácidos esenciales y cuenta con una absorción del 83 % - 93 %, esto quiere decir la porción que el cuerpo absorbe y posteriormente digiere (Vidal *et al.*, 2003).

El chícharo es una de las fuentes más ricas del aminoácido L-arginina (Boza-López, 1991), no es un aminoácido esencial, pero tiene una participación importante en la formación del músculo. Es capaz de estimular la secreción de hormonas como insulina, glucagón, catecolaminas, prolactina y hormona de crecimiento; además de ser precursor metabólico del óxido nítrico que es responsable de la circulación sana, mejorando la salud cardiovascular. El chícharo también es una gran fuente del aminoácido esencial L-lisina (Boza-López, 1991), que es el precursor de la carnitina, ésta es responsable de convertir los ácidos grasos a energía. Este aminoácido tiene un papel importante en la formación de colágeno, que es el bloque de construcción de las regiones del tejido conectivo como huesos, cartílago, piel y tendones (Martínez & Sánchez, 2004).

Por otro lado, se ha realizado investigaciones sobre la proteómica vegetal en el cual se pretende estudiar y descifrar todo el repertorio de proteínas presentes en el organismo de estudio, ha este catálogo de proteínas se le denomina proteoma. Con estos estudios se ha podido reportar que las leguminosas establecen interacciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno a través de los nódulos; las nodulinas son enzimas metabólicas asociadas con la nodulación y desarrollo de las raíces. En la hoja y el tallo existen proteínas relacionadas con la fotosíntesis, como la rubisco, rubiscoactivasa; y en el tallo se encuentran las proteínas implicadas en el metabolismo secundario. El proteoma de la flor está dominado por aquellas proteínas que participan en el metabolismo energético, la síntesis de proteínas y la focalización. En la vaina el proteoma está representado por las proteínas de almacenamiento de semillas que sirven como fuente de nutrientes para el desarrollo de plántulas. Y por último en la semilla se compone en mayor abundancia por proteínas de almacenamiento, seguidas de las que participan en la división celular y el metabolismo de carbono (Rathi *et al.*, 2016).

Estas proteínas de almacenamiento o de reserva presentes en embriones y células vegetativas de plantas, son sintetizadas durante el desarrollo de la semilla e hidrolizadas durante la maduración, absorción de agua y germinación de éstas, proporcionando una de las principales fuentes de carbono, nitrógeno y azufre para el subsiguiente crecimiento y desarrollo. Estas proteínas de reserva (albúminas, prolaminas y glutelinas) en células vegetativas proporcionan una base para las semillas y frutos durante el crecimiento reproductivo y para una rápida expansión de las estructuras vegetativas después del periodo de dormancia y durante la germinación (Bewley & Black, 1994).

2.3. Caracterización de las proteínas.

2.3.1 Perfil de proteínas por solubilidad.

La solubilidad de una proteína depende del tipo de aminoácidos que contenga, de tal manera que aquella que posea muchos residuos hidrófobos será menos soluble en agua que la constituida por un elevado número de grupos hidrofílicos (Badui, 2006).

La clasificación de proteínas más utilizada es de acuerdo a su solubilidad, siendo el procedimiento de Osborne, el más conocido y que reporta cuatro tipos de proteína; albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), prolaminas (solubles en alcohol) y glutelinas (solubles en álcalis diluidos) (Chel *et al.*, 2003); cuyas características se muestran en la tabla 4.

Tabla 5. Características de las fracciones proteicas.

Fracción	Característica
Albúminas	Solubles a valor de pH 6.6 Constituidas en mayor parte de proteínas que presentan actividad catalítica. En las leguminosas, esta fracción contiene aminoácidos azufrados y lisina. Precipitan con sulfato de amonio al 50%. Ejemplos: seroalbúminas, ovoalbúminas, α -lactoalbúminas.
Globulinas	Soluble a valor de pH 7 Son ricas en ácido glutámico y aspártico Ejemplo: β -lactoglobulina, miosina
Prolaminas	Solubles en etanol al 70% Son proteínas monoméricas compactas y presentes en agregados enlazados por puentes disulfuro. Tienen alto contenido de ácido glutámico, glutamina y prolina. Pueden ser subdivididas a su vez y formar subclases basadas en su estructura, tamaño, solubilidad o reactividad. Ejemplos: zeína, gliadinas
Glutelinas	Solubles sólo en ácidos (pH 2) o bases (pH 12). Son proteínas oligoméricas, compuestas de subunidades que se encuentran unidas por enlaces disulfuro, formando complejos de alto peso molecular. Tiene alta cantidad de ácido glutámico, glutamina y prolina. Ejemplos: gluteninas de trigo, oriceninas del arroz

Fuente: Elaborado con información de Primo, (2007); Ibañez-Carranza (1991); Vasco-Méndez (1994).

Las fracciones más importantes de las leguminosas son las albúminas y las globulinas. Ya que las albúminas incluyen enzimas que metabolizan las sustancias almacenadas en la semilla, un ejemplo de estas enzimas son las glicosidasas y las proteasas, que tienen un papel importante en la degradación proteica durante la germinación. Otras participan en la defensa de la planta, como son los inhibidores de tripsina y las lectinas (Guéguen & Cerletti, 1994). Mientras que las globulinas son el grupo principal ya que se encuentra con un mayor contenido que va del 35 a 72% de la composición proteica de las leguminosas (Chel *et al.*, 2003).

El contenido de fracciones proteicas en las principales leguminosas se muestra en la tabla 5. En el cual se muestra que la fracción predominante en el guisante son las globulinas con un 66%, seguido de las albúminas y con un valor nulo para las prolaminas.

Tabla 6. Composición proteica según el fraccionamiento de Osborne, para las principales leguminosas (g/100g de proteína).

Grano de leguminosa	Fracciones			
	Albúminas	Globulinas	Prolaminas	Glutelinas
Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	27.6 – 36.6	35 – 39.3	0.1 – 0.2	0.4 – 0.2
Canavalia (<i>Canavalia ensiformis</i>)	14	66	14	0.8
Canavalia (<i>Canavalia gladiata</i>)	12	79	6	0.3
Lupino (<i>Lupinus mutabilis</i>)	11.2	71.8	1.0	5.5
Chicharo (<i>Pisum sativum</i>)	21	66	0	12
Soya (<i>Glicine max</i>)	10	90	0	0

Fuente: Chel *et al.* (2003).

2.4. Hidrolizados proteicos.

Los hidrolizados proteicos por definición son los productos que se obtienen después de someter a un proceso de hidrólisis a las proteínas. Este proceso puede lograrse mediante proteasas si es por un método biológico o a través de un ácido o álcali fuerte si se utiliza un método químico. El principio de la hidrólisis proteica es la rotura del enlace peptídico y en consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres (Clemente *et al.*, 1999).

Los hidrolizados se utilizan ampliamente en la tecnología alimentaria por sus propiedades nutricionales o funcionales (solubilidad, poder emulsificante, capacidad espumante) (Benítez *et al.*, 2008). En la tabla 6 se muestran algunos ejemplos.

Tabla 7. Función y uso de los hidrolizados proteicos.

Función	Uso	Referencia
Espumante	Producción de pasteles, pan, helados y postres.	(Chaplin & Andrew, 1989).
Emulsificante	Fabricación de mayonesas, carne picada y embutidos.	(Turgeon <i>et al.</i> , 1992).
Absorción de aceite o agua	Derivados cárnicos y en productos bajos en grasas	(Mannheim & Cheryan, 1992).

2.4.1. Métodos de obtención de hidrolizados proteicos.

2.4.1.1. Método químico.

Una proteína se puede hidrolizar, ya sea en presencia de un ácido o de una base fuerte. En esta reacción se introduce una molécula de agua, que rompe el enlace peptídico para producir los aminoácidos que la constituyen (Martínez, 2014).

La hidrólisis ácida se basa en la ebullición prolongada de la proteína con soluciones ácidas fuertes (HCl y H₂SO₄). Este método destruye completamente el triptófano y parte de la serina y la treonina. Mientras que la hidrólisis alcalina no destruye esos tres aminoácidos, pero forma fácilmente racematos; se utilizan bases fuertes como (NaOH e BaOH).

El estudio de los hidrolizados proteicos a partir de productos vegetales ha ido en aumento gracias a la gran disponibilidad de proteínas y su buena calidad. En la tabla 7 se muestran algunas investigaciones sobre la obtención de hidrolizados a partir de bases fuertes, y sus respectivas condiciones experimentales.

Tabla 8. Condiciones de obtención de hidrolizados con bases fuertes.

Hidrolizado	Condiciones	Referencia
Harina de chícharo (<i>Pisum sativum</i> L.)	1:15 p/v pH 9.5 NaOH 1.0 M 1 hora 21-23 °C	Stone <i>et al.</i> (2015)
Harina de chícharo (<i>Pisum sativum</i> L.)	1:10 p/v pH 9.0 NaOH 2 M 1 hora	Liang & Tang (2013)
Harina de piñón (<i>Jatropha curcas</i> L.)	1:6 p/v pH 10.5 NaOH 1N 1 hora 25 °C	Gallegos-Tintoré (2012)

2.4.1.2. Método enzimático.

Los métodos enzimáticos son aquellos en donde se utiliza una enzima de naturaleza proteasa para hidrolizar los enlaces peptídicos (Clemente *et al.*, 1999). Las proteasas, también llamadas proteinasas, peptidasas o proteolíticas son enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas, esto significa que introducen una molécula de agua en el enlace peptídico lo que provoca la separación del enlace (Smith & Martínez, 2012).

La Comisión de Enzimas (EC o *Enzyme Commission*) es una organización que clasifica a las peptidasas en exo- y endopeptidasas. Las exopeptidasas hidrolizan enlaces próximos al extremo amino o carboxilo terminal del sustrato, llamadas amino- o carboxipeptidasas respectivamente. Las endopeptidasas hidrolizan las cadenas peptídicas en regiones internas alejadas de los extremos amino o carboxilo terminal; son clasificadas por dicha comisión en base al mecanismo catalítico en serínicas, cisteínicas, aspárticas y metaloendopeptidasas (figura 4) (NC-IUBMB, 1992).

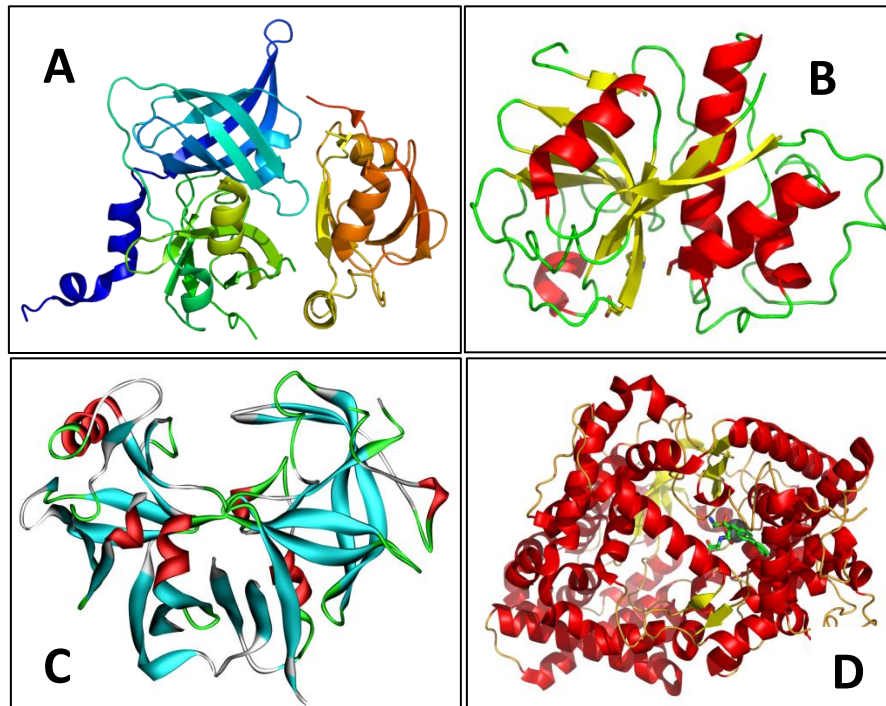


Figura 4. Modelos tridimensionales de las diferentes proteasas: **(A)** Peptidasa serínica, **(B)** Peptidasa cisteínica, **(C)** Peptidasa aspártica, **(D)** Metaloendopeptidasa.

Las peptidasas en las cuales el mecanismo catalítico depende del hidroxilo de un residuo de serina que actúa como nucleófilo sobre el enlace peptídico son llamadas peptidasas serínicas. Su actividad máxima se da a valores de pH alcalinos (López, 1995). Por otro lado las peptidasas cisteínicas presentan similitud en el mecanismo catalítico de las serínicas, ya que en ambos grupos la enzima y el sustrato forman un complejo covalente debido a que el nucleófilo es parte de un aminoácido. El dador de protones en todas las peptidasas cisteínicas identificadas es un residuo de histidina (al igual que en la mayoría de las peptidasas serínicas) y el nucleófilo es el grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína (Barrett *et al.*, 1998). Son peptidasas cisteínicas la papaína, la quimopapaína, la bromelina, la cruzipaina, las caspasas; cuya actividad se da a valores de pH variables, según el tipo de enzima y sustrato (Llorente, 2000).

Y por último se encuentran las peptidasas aspárticas, cuyo mecanismo catalítico involucra residuos de ácido aspártico en el sitio activo de la cadena peptídica, unidos a una molécula de agua que es la que actúa como nucleófilo (Barrett *et al.*, 1998). Generalmente actúan

mejor sobre uniones peptídicas de aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas (Leu-Tyr, Phe-Phe, Phe-Tyr, etc.) pero la afinidad por el sustrato varía grandemente: la pepsina degrada la mayor parte de las proteínas hasta pequeños péptidos (Llorente, 2000).

La hidrólisis proteica se realiza normalmente en un reactor, con control de agitación, pH, temperatura y tiempo del proceso; el sustrato se disuelve en agua hasta que el pH y la temperatura se estabilizan, y por último se agrega la proteasa dando inicio a la hidrólisis. A medida que la hidrólisis progresa se produce una disminución del pH debido a la rotura de los enlaces peptídicos. El pH debe ser mantenido en el óptimo de la enzima mediante la adición de base diluida. Para finalizar la hidrólisis proteica la enzima puede ser inactivada con calor, mediante una disminución del pH o con una combinación de ambos. O también puede ser retirada del medio mediante filtración y la proteína finalmente precipitada (Benítez *et al.*, 2008).

Sin embargo, existe ventajas y desventajas de la hidrólisis enzimática: la primera es la selectividad de las enzimas, las proteasas son específicas para un tipo determinado de enlace y, por tanto, no es frecuente la aparición de productos de degradación. En cambio, la poca selectividad de los ataques ácido y básico y su difícil control conduce inevitablemente a la aparición de productos de degradación que pueden llegar a ser tóxicos. La segunda desventaja son las condiciones moderadas de temperatura y pH. La hidrólisis enzimática transcurre generalmente en el intervalo de 40° a 60°C y pH entre 4-8. La tercera es que no se añaden sustancias extrañas. Evidentemente no es así en los procesos de hidrólisis química, ya que la necesaria neutralización posterior eleva considerablemente el contenido en sales. Y la cuarta desventaja es que se mantiene el valor nutritivo, ya que no se produce degradación de los componentes separados, mientras que la hidrólisis alcalina destruye los aminoácidos arginina y cisteína y la hidrólisis ácida elimina el triptófano y desamina los aminoácidos serina y treonina (Guadix *et al.*, 2000).

2.5. Tipos y aplicaciones de hidrolizados proteicos vegetales.

Las características del hidrolizado que se obtenga vendrán determinadas evidentemente por el uso que se le quiera dar a éste. Así, el grado y tipo de hidrólisis va a determinar el resto de las propiedades del hidrolizado. En este sentido, dependiendo de estos factores el hidrolizado tendrá una aplicación u otra (Vioque *et al.*, 2001). Hoy en día, los hidrolizados

proteicos vegetales que se producen para uso alimenticio se pueden agrupar en tres grandes grupos.

1. Hidrolizados con bajo grado de hidrólisis

La hidrólisis proteica va a producir un incremento de la solubilidad, necesaria para la mejora de otras propiedades funcionales (Soral-Smietana *et al.*, 1998). Otro factor que también va a influir en la funcionalidad de estos hidrolizados es la exposición de residuos hidrófobos de la proteína que estaban inmersos en el interior de la proteína intacta (Panyam & Kyrala 1996). En este sentido, se ha demostrado que una hidrólisis limitada mejora propiedades funcionales de la proteína original, además de la solubilidad, como poder emulsificante, espumante o absorción de agua o aceite (Vioque *et al.*, 2001).

2. Hidrolizados con grado de hidrólisis variable

Otro tipo de hidrolizados son aquellos con un grado de hidrólisis variable, generalmente alto, para ser usados como saborizantes. En este sentido, los hidrolizados según el sustrato usado y las condiciones de hidrólisis, también pueden aportar sabor y olor a los alimentos que se añadan. Tradicionalmente los hidrolizados usados como saborizantes se han obtenido mediante la hidrólisis ácida de proteínas vegetales con HCl durante 4 a 24 horas y a temperaturas entre 100 y 125°C. Así, el grado de hidrólisis va a depender del tiempo, temperatura y concentración de ácido usada, todo lo cual va a influir en los atributos sensoriales del producto (Manley *et al.*, 1981). El sabor del producto va a depender de la cantidad y tipo de péptidos o amino ácidos liberados.

3. Hidrolizados extensivos

Estos hidrolizados cuentan, con un grado de hidrólisis superior al 10%, tienen un uso en alimentación especializada, como suplemento proteico o en dietas médicas (Clemente *et al.*, 1999) descritos en la tabla 8.

Tabla 9. Hidrolizados para alimentación especializada.**Suplemento alimenticio**

La elevada solubilidad del hidrolizado le permite utilizarlo en alimentos líquidos. La absorción gastrointestinal de los pequeños péptidos que componen el hidrolizado, principalmente di- y tripéptidos, parece ser más efectiva en comparación con las proteínas intactas o amino ácidos.

Los sectores de la población a los que van dirigidos estos alimentos son diversos aunque, por diferentes razones, con necesidades todos ellos de un sobre aporte proteico. Entre los cuales se encuentran:

- Alimentación de la tercera edad
- Nutrición deportiva
- Dietas equilibradas

Dietas médicas

Los hidrolizados tienen una composición definida para el tratamiento de enfermedades o síndromes específicos. En este grupo se alcanza el máximo de especialización en lo que respecta al diseño del alimento ya que se obtiene un producto muy específico para un objetivo muy concreto.

Las aplicaciones medicinales de los hidrolizados proteicos, sin duda la más conocida e importante por su impacto en nutrición haya sido la producción de hidrolizados hipoalergénicos.

Fuente: Elaborado con información de Meredith *et al.* (1990); Periago *et al.* (1998); Lahl & Braun, (1994); Vioque *et al.* (2001).

La producción de hidrolizados proteicos vegetales está recibiendo un gran impulso en los últimos años debido a la demanda de alimentos específicos y para el aprovechamiento de fuentes proteicas alternativas a las actuales de origen animal. En este sentido, en los próximos años se espera una generación de nuevos alimentos para aplicaciones muy concretas a partir de hidrolizados proteicos. Entre estos podemos destacar la producción de péptidos bioactivos con efectos fisiológicos directos, como actividades inmunomoduladoras o hipotensoras (Vioque *et al.*, 2001).

2.6. Métodos analíticos para estudio de proteínas.

2.6.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS).

Los métodos de electroforesis separan las sustancias de acuerdo con sus relaciones de carga a masa usando el efecto de un campo eléctrico sobre las cargas de esas sustancias.

Estos métodos se usan mucho para separar partículas coloidales cargadas o iones macromoleculares, como los de proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos (Gary, 2009).

Existen diferentes técnicas y aparatos para el uso de separación de proteínas por electroforesis. Sin embargo, la técnica más empleada es la formación de una placa de gel de poliacrilamida en la que se utiliza el método desarrollado por Laemmli (1970). En este método se lleva a cabo la preparación de placas de gel de poliacrilamida que contienen dodecil sulfato de sodio, denominando esta técnica como “SDS-PAGE”, por las siglas en inglés de *Sodium Dodecil Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*. Este tratamiento asegura la desnaturalización total de la proteína por pérdida de su estructura tridimensional debido a la acción del detergente (Pérez *et al.*, 2015).

La electroforesis en geles con una matriz de poliacrilamida, es sin duda alguna una de las técnicas más ampliamente usada para caracterizar mezclas complejas de proteínas. Las placas de gel de poliacrilamida se forman por la co-polimerización de la acrilamida para lo cual se utiliza un agente entrecruzador como la N,N'-metileno bis-acrilamida (Pérez *et al.*, 2015). La polimerización se inicia con la formación de radicales libres de la acrilamida, que se producen por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones persulfato. Las aminas terciarias como el N, N, N, N'-tetrametileno-diamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato (Morales & Gallo, 2006).

La porosidad del gel, la determinan las proporciones relativas de acrilamida y bis-acrilamida, siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida haya en relación a la concentración de acrilamida. El porcentaje total de acrilamida/bis-acrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del porcentaje de acrilamida/bisacrilamida que contienen. Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango de 5 a 10%. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño (Pérez *et al.*, 2015). Se puede determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos (Weber & Osborn, 1969).

Actualmente se han realizado estudios sobre proteínas vegetales en el cual han utilizado este método de electroforesis en gel de poliacrilamida. Algunos de esos estudios en leguminosas son los realizados por Guleria y colaboradores (2009) en la India, en el cual se analizaron las semillas de diez variedades de chícharos, las fraccionaron de acuerdo a su

solubilidad y encontraron de 20 a 21 bandas iguales en la electroforesis en gel de poliacrilamida de las diez variedades. Otro estudio fue el realizado por Rubio y colaboradores (2013), llevaron a cabo una extracción de las albúminas y globulinas 7S y 11S de la harina de chícharo, realizaron un perfil electroforético en el cual se encontraron 6 bandas en albúminas y de 9 a 12 bandas en las fracciones de globulinas.

2.6.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

La cromatografía líquida, es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase móvil (líquido) que circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmisible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir, estarán separadas (Bussi, 2007).

Los dos tipos principales de cromatografía son la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos. En la cromatografía de gases se separan sustancias gaseosas con base en su adsorción o partición en una fase estacionaria a partir de una fase gaseosa. La cromatografía de líquidos comprende técnicas como la de exclusión de tamaño (separación basada en el tamaño molecular), de intercambio iónico (separación basada en cargas eléctricas) y de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC, por las siglas en inglés *High-Performance Liquid Chromatography*), basada en la adsorción o separación de una fase líquida (Gary, 2009).

La técnica de HPLC se usa mucho en numerosas aplicaciones debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales incluyen los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, drogas, terpenoides, plaguicidas, antibióticos esteroides, especies organometálicas y una cierta variedad de sustancias inorgánicas (Gomis-Yagües, 2008).

OBJETIVOS



3. Objetivos.

Objetivo General

Obtener un hidrolizado proteico de chícharo (*Pisum sativum*) mediante la extracción por hidrólisis alcalina, así como caracterizar las distintas fracciones obtenidas a través del procedimiento de Osborne para determinar el tipo de proteína, calidad y aplicación de la fracción mayoritaria.

Objetivos particulares

Objetivo particular 1. Evaluar la composición química de la harina de chícharo mediante un análisis químico proximal para determinar las propiedades y potencial tecnológico como fuente de proteína vegetal.

Objetivo particular 2. Establecer las condiciones de extracción de las proteínas del chícharo mediante una hidrólisis alcalina, variando la temperatura (20 y 30 °C) y el tiempo (16 y 24 h), evaluando el rendimiento del proceso.

Objetivo particular 3. Realizar la caracterización de las proteínas de la harina de chícharo y el hidrolizado proteico con el menor y mayor rendimiento obtenido, mediante el método de Osborne para conocer su distribución en función de la solubilidad.

Objetivo particular 4. Evaluar el hidrolizado proteico con el menor y mayor rendimiento obtenido mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS para determinar la distribución del tamaño molecular de las proteínas en el hidrolizado.

Objetivo particular 5. Conocer el perfil de aminoácidos de la fracción que obtuvo mayor predominio mediante cromatografía líquida de alta resolución, que permita determinar la calidad de la proteína de chícharo.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL



4. Metodología experimental.

4.1. Cuadro metodológico.

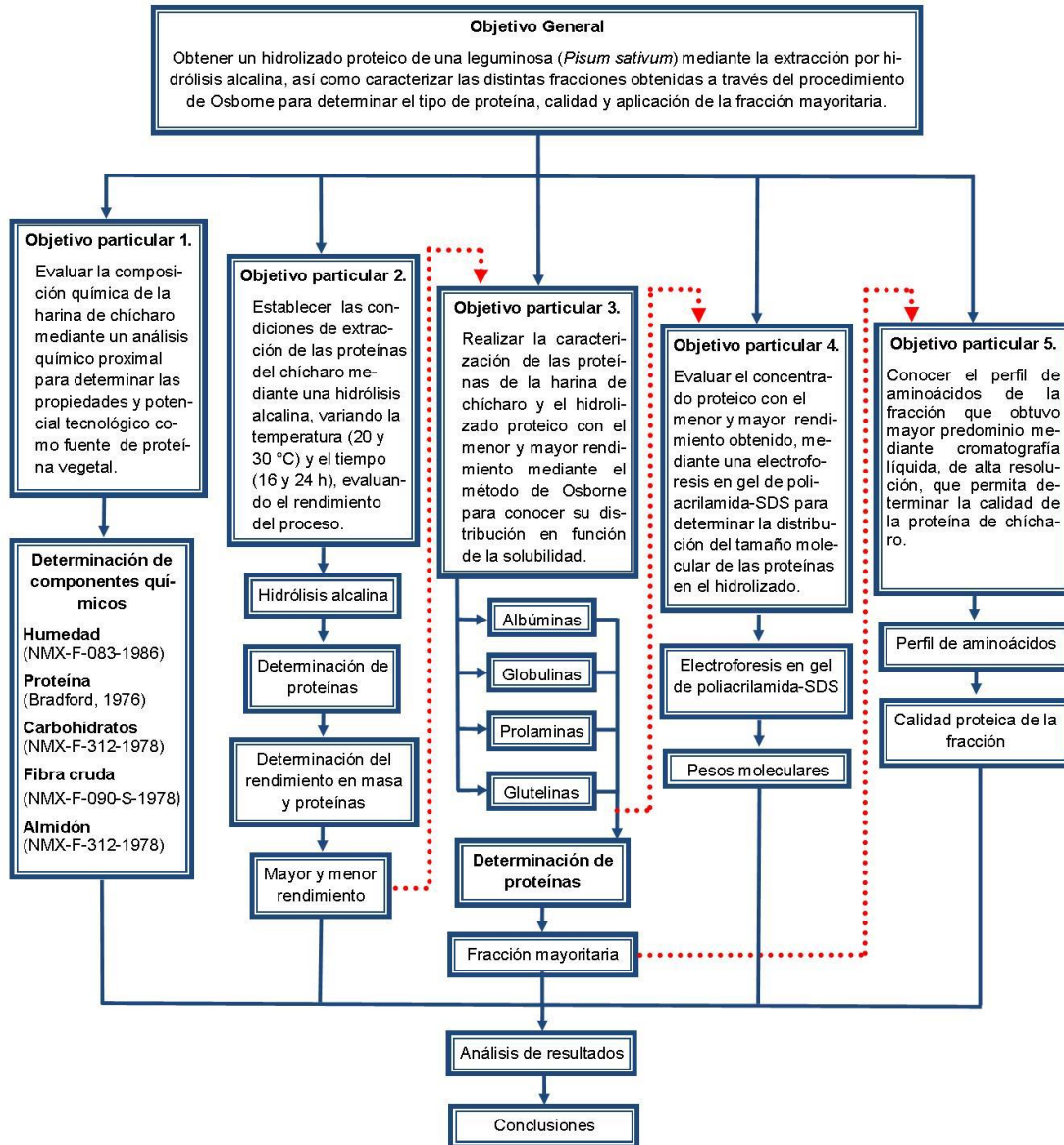


Figura 5. Cuadro metodológico.

4.2. Material biológico.

En el presente estudio se trabajó con chícharo de la variedad “*Early perfection*” obtenido del mercado del Carmen ubicado en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México. Los chícharos se trasladaron al Laboratorio de Postcosecha de Productos Vegetales de la UNAM, donde, se limpiaron, seleccionaron y se colocaron en el refrigerador hasta su tratamiento.

4.3. Tratamiento de la muestra.

La preparación de la muestra se realizó como se muestra en la figura 6. Los chícharos se desvainaron quedándose únicamente con la semilla, posteriormente fueron escaldados con agua a 80 °C durante 5 minutos. Al término del escaldado se realizó un secado en estufa (marca Luzeren) a 40 °C durante 24 horas y por último la muestra seca se molió (molino marca Oster) para obtener una harina. La harina obtenida se almacenó en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente.



Figura 6. Diagrama de proceso para la elaboración de la harina de chícharo.

4.4. Análisis químico proximal de la harina de chícharo.

La composición química de la harina de chícharo se determinó por los métodos establecidos en las normas mexicanas. Contenido de humedad (NMX-F-083-1986), carbohidratos y almidón (NMX-F-312-1978) y fibra cruda (NMX-F-090-S-1978). Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método espectrofotométrico de Bradford (1976).



Figura 7. (A) Método de Bradford. (B) Determinación de fibra cruda.

4.5. Técnicas analíticas.

Contenido de humedad (NMX-F-083-1986).

La determinación de secado en estufa se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua. Para esto se requiere que la muestra sea térmicamente estable y que no contenga una cantidad significativa de compuestos volátiles. El principio operacional del método de determinación de humedad utilizando estufa y balanza analítica, incluye la preparación de la muestra, pesado, secado, enfriado y pesado nuevamente de la muestra. Los resultados son expresados en porcentaje (figura 8).



Figura 8. Determinación de humedad por estufa.

Carbohidratos y almidón (NMX-F-312-1978).

El método descrito es el volumétrico de Lane-Eynon que se basa en la determinación del volumen de una disolución de la muestra, que se requiere para reducir completamente un volumen conocido del reactivo alcalino de cobre. El punto final se determina por el uso de un indicador interno, azul de metileno, el cual es reducido a blanco de metileno por un exceso de azúcar reductor. Los resultados son expresados en porcentaje.

Fibra cruda.

Este método se basa en la digestión ácida y alcalina de la muestra obteniéndose un residuo de fibra cruda y sales que con calcinación posterior se determina la fibra cruda **(NMX-F-090-S-1978)**. Los resultados son expresados en porcentaje (figura 9).



Figura 9. Determinación de fibra cruda.

4.6. Hidrólisis alcalina de la harina de chícharo.

Para la obtención del hidrolizado proteico se utilizó la metodología descrita por Moguel *et al.*, 1996, que se muestra en la figura 10. Se preparó una dispersión de 28.6 gramos de harina de chícharo con 200 mililitros de agua purificada. Una vez obtenida la solución se ajustó el pH a un valor de 12 utilizando hidróxido de sodio 1N, dejando reposar de acuerdo a la temperatura de experimentación (20 y 30°C) y el tiempo establecido (16 y 24 horas). Transcurrido el tiempo se realizó una filtración, separando la fracción líquida del precipitado formado. Una vez obtenida la fracción líquida se realizó una precipitación de la proteína solubilizada utilizando ácido clorhídrico 1N hasta obtener un pH 4.9. El precipitado se recuperó centrifugando la fracción líquida a 10000 rpm durante 10 minutos. El precipitado

proteico obtenido se secó a 40 °C durante 4 horas y por último se realizó la molienda y la muestra obtenida se almacenó a temperatura ambiente.

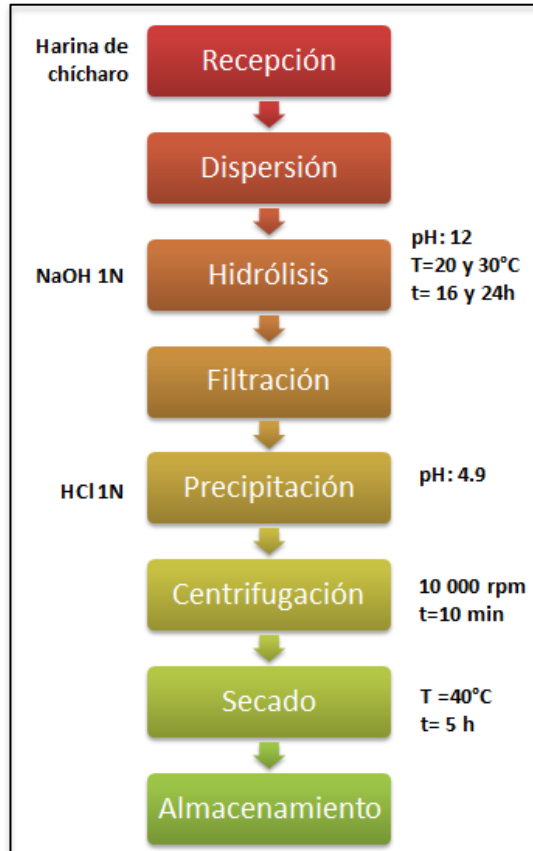


Figura 10. Diagrama de proceso de extracción de proteínas por hidrólisis alcalina.

4.7. Cuantificación de proteínas totales.

Para la cuantificación de proteínas en el concentrado de la muestra, se utilizó el método descrito por Bradford (1976), que se basa en la unión de Coomassie Brilliant Blue G-250 a los aminoácidos aromáticos presentes en las proteínas. Se pesó 0.1g de la muestra en un tubo eppendorf y se le agregó 1 mL de solución de NaCl al 0.9 % (p/v). La mezcla se homogenizó empleando un vortex (marca Science MED) durante 30 segundos. Se procedió a centrifugar a 3 000 rpm durante 30 minutos utilizando una microcentrifuga (marca Daigger 4350) y se extrajo 50 µL del sobrenadante. El volumen recolectado se mezcló con el reactivo de Bradford en tubos de ensayo y se midió sus absorbancias en un espectrofotómetro (marca Velab 5600UVPC) a una longitud de onda de 595nm. Para conocer la concentración proteica se realizó una curva patrón (figura 11) utilizando como estándar la albúmina sérica

bovina (Sigma-Aldrich 9048-46-8). Cada muestra se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron en mg/mL.

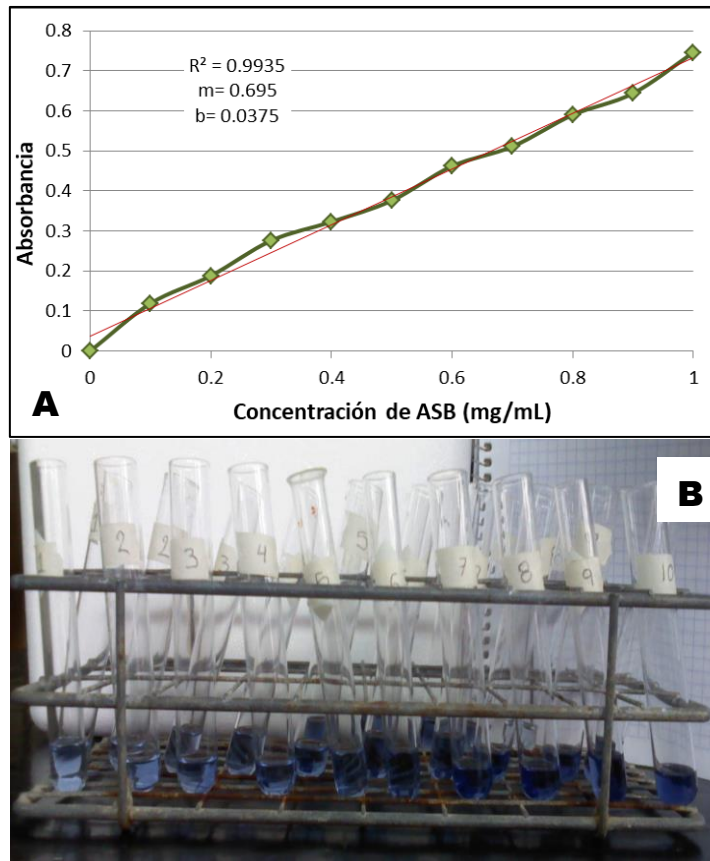


Figura 11. (A) Gráfica de curva patrón. **(B)** Obtención de curva patrón, de menor a mayor concentración (de izquierda a derecha).

El rendimiento en masa de cada extracción de proteínas se calculó dividiendo el peso del hidrolizado obtenido entre el peso de la muestra inicial (harina de chícharo), como se muestra en la siguiente ecuación:

$$R = \frac{\text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} * 100$$

Ecuación 1.

Para el cálculo del rendimiento en proteínas se utilizó la misma ecuación, dividiendo la concentración proteica del hidrolizado obtenido entre la concentración proteica de la harina de chícharo.

4.8. Perfil de proteínas por solubilidad de acuerdo al método de Osborne.

Para realizar el fraccionamiento de las proteínas se utilizó el método de Osborne (1907) descrito por Ramírez-López (2011), como se muestra en la figura 12; el cual consiste en separar a las proteínas con base en su solubilidad en los siguientes disolventes: agua purificada (albúminas), solución de NaCl 0.5 M (globulinas), etanol al 70 % (prolaminas) y NaOH 0.1 N (glutelinas). Las muestras sometidas al fraccionamiento de Osborne fueron la harina de chícharo y los hidrolizados obtenidos con alto y bajo rendimiento proteico.

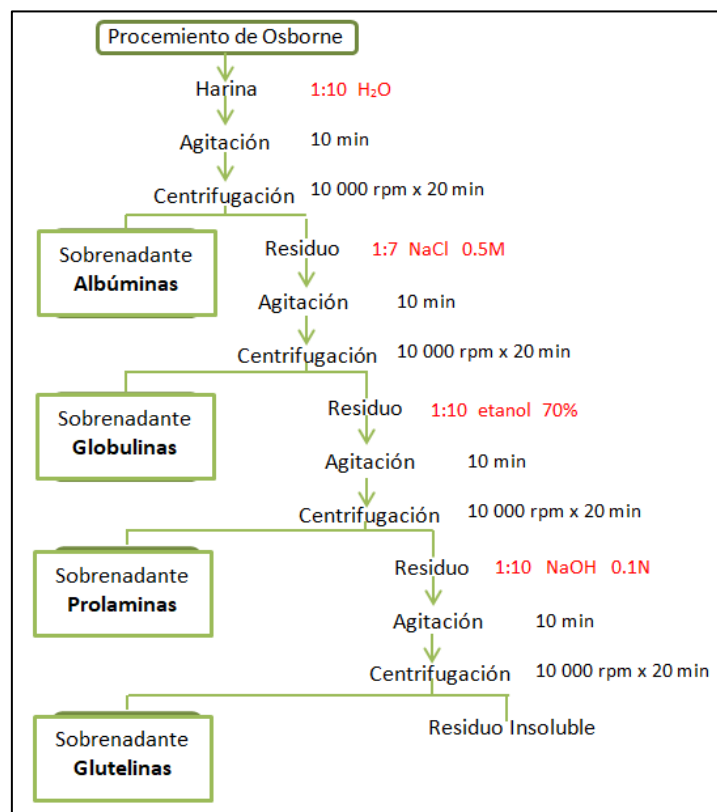


Figura 12. Diagrama del fraccionamiento de proteínas por el método de Osborne.

El primer paso del método consiste en la separación de la fracción correspondiente a las albúminas. Se pesaron 100 mg de harina de chícharo en un tubo de micro centrífuga (marca eppendorf) y se le agregó agua purificada en una relación masa: volumen, 1:10; se agitó por 15 minutos en un vortex (marca Science MED). Transcurrido el tiempo se centrifugó a 10000rpm en una microcentrífuga (marca Daigger 4350) durante 20 minutos. Por último se

recolectó en un tubo el sobrenadante obtenido. Para cada una de las fracciones el método se realizó por triplicado.

El siguiente paso corresponde a las globulinas. El residuo obtenido de la fracción anterior se disolvió en una solución de NaCl 0.5 M en una relación 1:7, se agitó y centrifugó bajo las mismas condiciones antes mencionadas, recolectando el sobrenadante al final de la centrifugación.

A partir del precipitado obtenido de la fracción anterior se extrajeron las prolaminas, para esto el precipitado se disolvió en etanol al 70 % con una relación 1:10; se agitó, se centrifugó y se recolectó el sobrenadante.

Para finalizar el fraccionamiento se extrajeron las glutelinas, del precipitado obtenido del fraccionamiento anterior se disolvió en NaOH 0.1 N con una relación 1:10, se agitó, se centrifugó y se recolectó el sobrenadante.

Las fracciones correspondientes a las albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas, fueron almacenadas en congelación hasta el momento de su análisis. La cuantificación de proteínas en las fracciones obtenidas se hizo mediante el método espectrofotométrico de Bradford (1976).

4.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

Para determinar los pesos moleculares de las proteínas de los hidrolizados y sus respectivas fracciones proteicas, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida, de acuerdo al método de Laemmli (1970) descrito por Guleria *et al.*, 2009. El procedimiento se encuentra en el Anexo.

Se realizó un gel de poliacrilamida de 1mm de espesor, con una concentración del 5% de acrilamida para el gel concentrador y 12% para el separador. Las muestras se prepararon con buffer de muestra Laemmli (compuesto por 31.5 mM Tris-HCl a pH de 6.8, 10% glicerol, 1% SDS y 0.005% azul de bromofenol; obtenido de BIO-RAD #161-0737) y 2µL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20 %. El gel se corrió a 80V durante 90 minutos. El marcador de peso molecular fue adquirido en Sigma-Aldrich #S8445, con un rango de tamaño de 6.5 kDa a 200 kDa (figura 13).

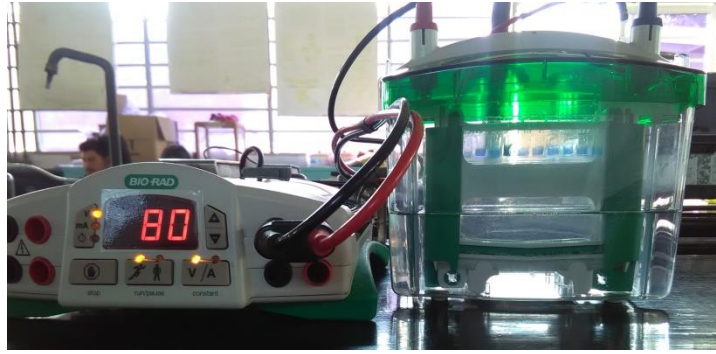


Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

4.10. Perfil de aminoácidos de la fracción mayoritaria.

El perfil de aminoácidos de las fracciones predominantes de acuerdo al procedimiento de Osborne, fue determinado por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en la Unidad de Servicios de Facultad de Química, UNAM.

Previo a la determinación las muestras fueron concentradas hasta obtener una concentración de globulinas 0.28 mg/mL y glutelinas 0.66 mg/mL. Las fracciones se sometieron a ebullición por 10 minutos y posteriormente se les agregó sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ al 50%. Se centrifugaron y el precipitado obtenido fue resuspendido en agua purificada para la cuantificación proteica por el método de Bradford (1976). También se realizó el análisis de humedad, proteínas y perfil de aminoácidos de acuerdo a las siguientes técnicas:

Proteína: AOAC Official Method 978.04. Nitrógeno total.

Perfil de aminoácidos: Por el método descrito en el AOAC (2005), Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C. La derivación de aminoácidos con reactivos AccQ•Tag se realizó de acuerdo con el protocolo de Waters AccQ•Tag (manual número WAT052874, rev 0 abril 1993). Brevemente, se mezclaron 20 μL de una solución de mezcla de aminoácidos estándar, o muestra con 60 μL de tampón de borato AccQ•Tag Ultra, y 20 μL de reactivo AccQ•Tag, el cual previamente fue disuelto en 1.0 mL de diluyente de reactivo AccQ•Tag Ultra. La reacción se agitó durante 1 min y se dejó durante 10 minutos a 55°C. Se utilizó como fase estacionaria una columna AccQ•Tag 3.9 x 150 mm con detector de fluorescencia a $\lambda_{\text{excitación}} = 250 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 395 \text{ nm}$; y una fase móvil

que consistió en un gradiente en el tiempo de los solventes A (20 mM de buffer acetato de sodio pH 5.75) y B (20 mM de buffer acetato de sodio pH 6: acetonitrilo (30:70), con un flujo de 1 mL/min a temperatura ambiente y un volumen de inyección de 10 µL. El gradiente utilizado fue el siguiente:

Tiempo	%A	%B
0	100	0
0.5	98	2
11	93	7
19	87	13
25	72	28
32	72	28
35	70	30
40	67	33
45	0	100
48	0	100
50	100	0
53	100	0

4.11. Análisis estadístico.

Los cálculos estadísticos fueron realizados utilizando el programa computacional IBM SPSS Statistics. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con diseño factorial (dos factores: temperatura y tiempo) para analizar los resultados de la determinación de las condiciones de extracción de proteínas. Y para los resultados del fraccionamiento de Osborne se realizó un ANOVA de un factor.

Para ambos análisis se realizaron pruebas de Tukey y Duncan con un nivel de significación de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



5. Resultados y discusión.

5.1. Análisis químico proximal de la harina de chícharo.

Los guisantes están dentro de las leguminosas más importantes en cuanto a contenido nutrimental, ya que destacan por ser una fuente importante de sacarosa y aminoácidos. En la tabla 9 se muestra la composición química de la harina de chícharo variedad *Early perfection* que se utilizó en la experimentación y la harina de chícharo comercial.

Tabla 10. Composición química de las harinas de chícharo (experimental y del Dry Pea & Lentil Council).

Parámetro	Harina de chícharo (<i>Early perfection</i>)	Harina de chícharo (Dry Pea & Lentil Council)
Humedad (%)	14.98 ± 7.16	10.7
Proteína (g/100 g)	43.36 ± 1.17	25
Carbohidratos (g/100 g)	58.24 ± 4.0	60
Fibra cruda (g/100 g)	9.36 ± 0.32	25

Fuente: Servicio de Investigación Agrícola del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (2016).

El primer parámetro químico fue la humedad con valor de 14.9 % para la harina de chícharo (*Early perfection*), este valor se encuentra dentro del rango que marca CODEX STAN 152-1985 para harinas de trigo para consumo humano, que es del 15.5 % máximo de humedad.

El siguiente parámetro evaluando fue la proteína con un valor experimental de 43.3 g/100 g, el cual resulta 18 unidades mayor que el valor expuesto por el Consejo Dry Pea & Lentil. La diferencia entre el contenido de proteínas de las dos harinas radica en la maduración y la variedad del chícharo, como lo menciona Sell y colaboradores en el 2005, el aumento en la cantidad de proteínas puede justificarse por la síntesis de nuevas proteínas y en la alteración

de proteínas de peso molecular grande en fragmentos, durante la maduración de los guisantes.

En los resultados de contenido de carbohidratos los valores de ambas harinas de chícharo fueron similares, con 58.2 g/100 g obtenidos experimentalmente y 60 g/100 g reportados por el Consejo Dry Pea & Lentil. Los carbohidratos más comunes en los vegetales son la glucosa y fructuosa las cuales se van transformando en almidón, disminuyendo el sabor dulce y la calidad.

Por último se encuentra el contenido de fibra cruda con un valor de 9.3 g/100 g para la harina de la variedad *Early perfection* y 25 g/100 g de la harina Dry Pea & Lentil. Siendo este componente químico de suma importancia debido a su función en el colon del ser humano. La fibra tiene la capacidad de hincharse al absorber agua y así aumentar el volumen de la materia fecal, como resultado hay un incremento en los movimientos peristálticos del intestino y facilita el tránsito, la distensión intestinal, la absorción rápida de los nutrientes y, consecuentemente, la defecación (Badui, 2006).

El valor bajo de fibra encontrado en la harina de la variedad *Early perfection* se debe a dos razones. La primera es que el contenido de fibra depende del estado de madurez de la legumbre; y la segunda que en los tratamientos con ácidos y bases fuertes se pierde un gran porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina, que son los componentes más destacados de la fibra (Badui, 2006).

Con estos datos se puede asegurar que el guisante de variedad *Early perfection* es apropiado para su uso en el presente proyecto, ya que su contenido proteico es elevado.

5.2. Hidrólisis alcalina

La proteína de chícharo es una proteína completa ya que cuenta con aminoácidos esenciales y es particularmente alta en aminoácidos ramificados así como arginina, lisina. La concentración de proteínas de acuerdo a cada condición de extracción, se muestran en la figura 14. Se puede observar que las condiciones de hidrólisis de temperatura y el tiempo tuvieron un efecto proporcional en la concentración proteica obtenida en los hidrolizados. Siendo en las condiciones de 24 horas y 30 °C las que permitieron obtener hidrolizados con un contenido de proteínas 37 % mayor que el experimento realizado con la misma

temperatura pero a 16 horas, 48 % mayor que a 24 horas y 20 °C y 54 % mayor que a 16 horas y 20°C. A mayor tiempo de exposición de la muestra en un medio alcalino es mayor la rotura de los enlaces con las macromoléculas y a su vez la rotura del enlace peptídico, generando péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres, dando por resultado una mayor concentración de proteínas (Vioque *et al.*, 2001). Ya a que a mayor temperatura, la energía cinética de las proteínas aumenta, destruyendo las interacciones débiles que conforman su estructura (González, 2012).

Sin embargo el experimento con 16 horas y 20 °C presentó la concentración más baja, debido a lo anteriormente mencionado, el tiempo de exposición fue muy corto para generar hidrólisis de los enlaces peptídicos; y la temperatura no produjo un aumento en la energía cinética de las proteínas.

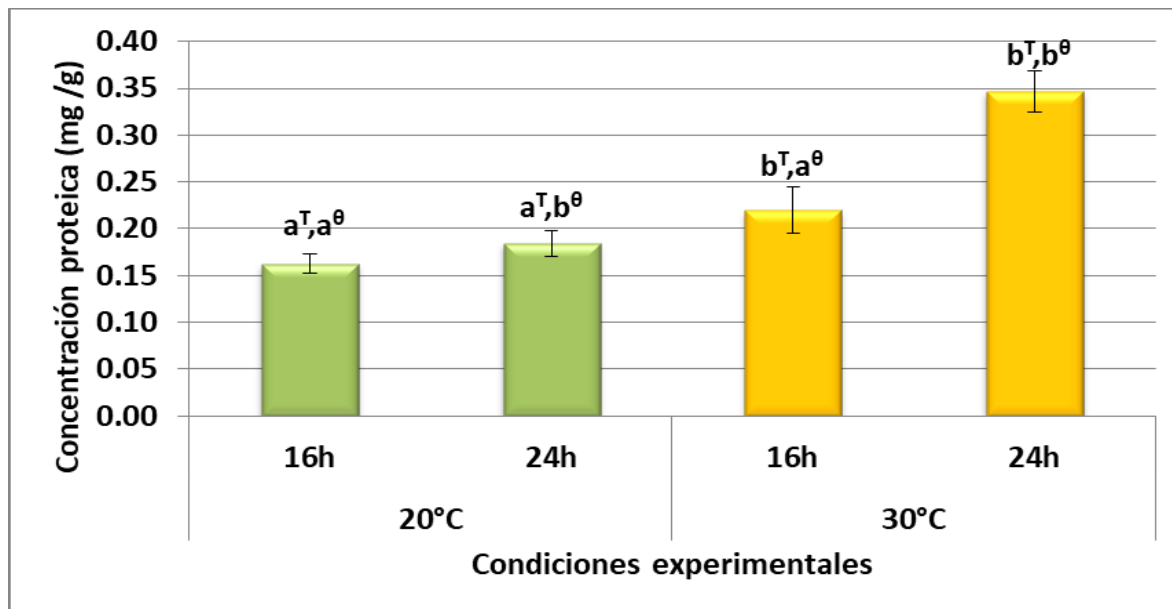


Figura 14. Contenido proteico de hidrolizados obtenidos a diferentes condiciones de extracción. Las letras diferentes en cada barra indican que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

La concentración de proteína obtenida a 24 horas y 30 °C fue 18 % menor con respecto a la materia prima (0.433 mg/g harina de chícharo), estos resultados están por debajo de lo reportado por Moguel *et al.* (1996), quienes obtuvieron 14 % de recuperación de proteína de *Canavalia ensiformis* usando un tratamiento alcalino variando pH (10 y 12), temperatura (4 y 32 °C) y tiempo de reposo (12 y 36 horas).

El análisis estadístico, indicó que la temperatura y el tiempo de reposo presentaron un efecto significativo ($p \leq 0.05$) en las concentraciones de proteínas, lo que indicó que ambas condiciones influyen sobre el tipo de hidrolizado que se obtuvo. Como lo menciona Vioque y colaboradores en el 2001, que a mayor tiempo de exposición de la muestra en un medio alcalino es mayor el rompimiento de los enlaces con macromoléculas y del enlace peptídico; debido a la incorporación de moléculas de agua en la estructura química de los aminoácidos.

El rendimiento proteico obtenido por cada combinación de variables se muestra en la figura 15. Se puede observar que 24 horas y 30 °C se obtiene el mayor rendimiento, debido a que con estas condiciones se obtuvieron la mayor concentración de proteínas (figura 14); cabe recordar que el rendimiento es el cociente entre la concentración proteica final (hidrolizado) y la concentración proteica inicial (harina). Y de igual forma el rendimiento más bajo fue 16 horas y 20 °C, siendo este 53 % menor que el rendimiento más alto (24 horas y 30 °C).

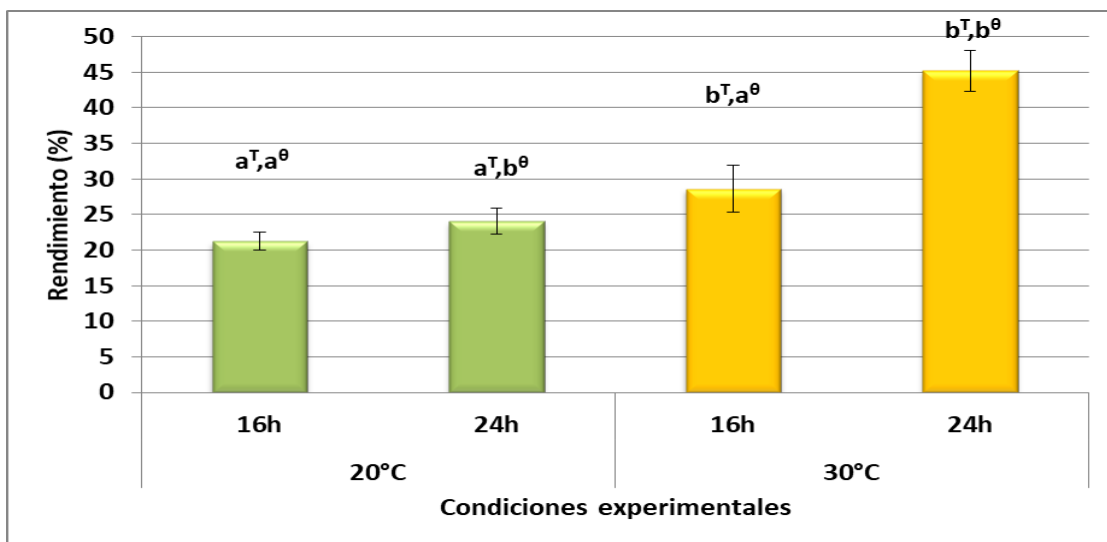


Figura 15. Rendimiento en contenido proteico de hidrolizados obtenidos a diferentes condiciones de extracción. Las letras diferentes en cada barra, indican la diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

En la figura 16 se muestra el rendimiento en masa (gramos de sólidos solubles), en el cual se aprecia que la temperatura y el tiempo tuvieron un efecto inverso con respecto al rendimiento. Se observó que a 16 horas y 20 °C se obtuvo un mayor rendimiento, 13 % más con la misma temperatura pero a 24 horas y 67 % más que a 24 horas y 30 °C, en el cual se obtuvo en menor rendimiento. Esto es lo contrario al rendimiento proteico en las mismas condiciones (figura 15). La fibra es un componente nutricional de los alimentos, constituida por los componentes estructurales de las paredes celulares de los vegetales como la

celulosa, hemicelulosa, pectina, rafinosa y estafinosa. Los últimos dos compuestos son oligosacáridos que presentan propiedades solubles en agua y no son hidrolizables, sólo con la enzima α -galactosidasa. La rafinosa se encuentra principalmente en las legumbres, como el chícharo (Badui, 2006). Probablemente estos dos oligosacáridos se solubilizaron durante el proceso de hidrólisis, y conforme aumentaba el tiempo y la temperatura fue perdiendo su estructura y perdiendo solubilidad; provocando que el rendimiento en masa vaya decreciendo al paso del tiempo y aumento de temperatura.

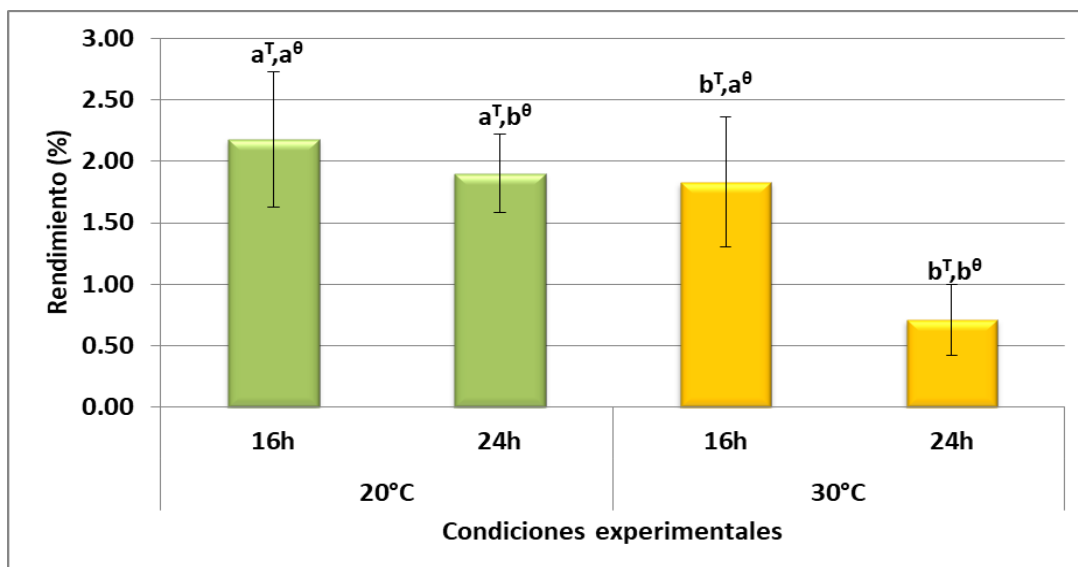


Figura 16. Rendimiento en masa obtenido de hidrolizados obtenidos a diferentes condiciones de extracción. Las letras diferentes en cada barra indican la diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

El análisis estadístico, muestra diferencias significativas ($p \leq 0.05$), en los rendimientos de proteínas y de masa por efecto de la temperatura y el tiempo de reposo. Lo que significa que se van a obtener distintos rendimientos si se aplican 20 °C o 30 °C y 16 horas o 24 horas, que los rendimientos van a depender de la combinación de variables.

5.3. Análisis del perfil de proteínas por el método de Osborne.

La solubilidad de una proteína depende del tipo de aminoácidos que contenga, de tal manera que aquella que posea mayor cantidad de aminoácidos hidrófobos será menos soluble en agua que la constituida por un elevado número de grupos hidrofílicos (Badui, 2006). Por lo tanto la clasificación de proteínas más utilizada es de acuerdo a su solubilidad, siendo el procedimiento de Osborne, el más conocido y que reporta cuatro tipos de proteína;

albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), prolaminas (solubles en alcohol) y glutelinas (solubles en álcalis diluidos) (Chel *et al.*, 2003).

En la figura 17 se muestra el gráfico de las fracciones proteicas obtenidas de la harina de chícharo, dónde se puede observar que la fracción que predomina son las glutelinas con un 9.6 %, seguido de las albúminas con un 19 % menos. El contenido de glutelinas es 58 % mayor que la fracción de globulinas, mientras que las prolaminas apenas conforman el 1 %. Guleria, Dua y Chongtham en el 2009, realizaron el fraccionamiento de Osborne con harina de chícharo (*Pisum sativum*) y obtuvieron como resultados una predominación de globulinas con un rango de 7.9 a 10.5 %, seguidas de albúminas con una fracción del 3.3 a 6.3 %, glutelinas con 1.1 a 3 % y prolaminas con 0.4 a 1.5 %. De igual forma coincidieron con los resultados de Gupta y Mahajan en el 2010, donde las globulinas fueron la fracción mayoritaria que obtuvieron. Estos resultados experimentales no coinciden con los obtenidos en el presente proyecto, aunque se trabajó con la misma especie *Pisum sativum*, la variedad fue distinta a la que utilizaron Guleria y colaboradores en el 2009. Y como mencionan Turner y colaboradores en 1990, que la variabilidad en la composición del chícharo es resultado de factores genotípicos como morfológicos. La síntesis de las proteínas de almacenamiento depende del nitrógeno disponible en la semilla, el cual puede ser controlado por la importación de aminoácidos a través de transportadores específicos (Rolletschek *et al.*, 2005).

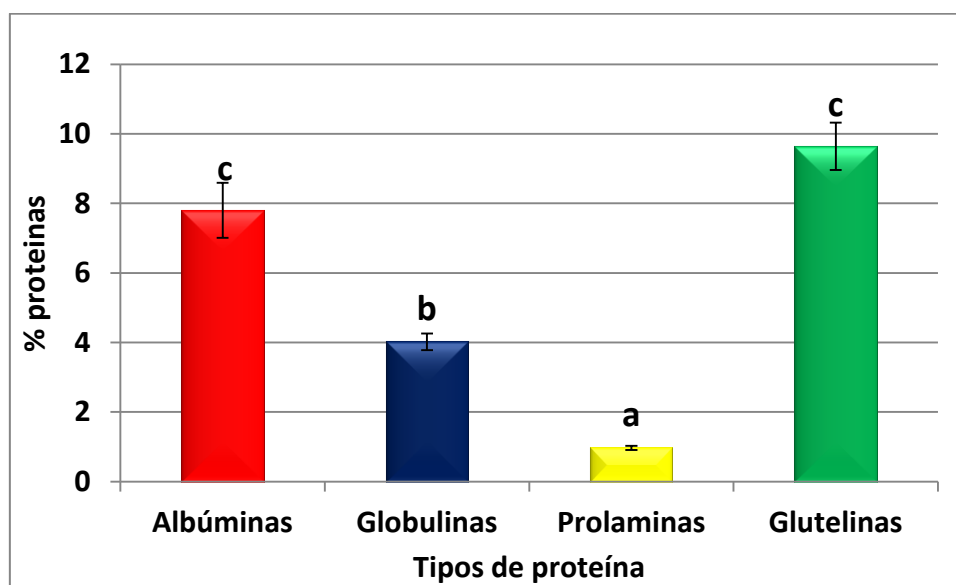


Figura 17. Perfil de proteínas de la harina de chícharo. Las letras diferentes en cada barra indican la diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

El análisis estadístico indicó que no existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre albúminas y glutelinas; pero sí tienen diferencias significativas con las globulinas y prolaminas. El contenido de proteínas de cada fracción se ve afectado por la maduración de la planta. Sell y colaboradores en el 2005 observaron que el contenido de albúminas fue aumentando conforme a la maduración de la semilla; mientras que el contenido de globulinas se mantiene y las glutelinas disminuyen.

En la figura 18 se muestra el gráfico del fraccionamiento de proteínas del hidrolizado con el menor rendimiento proteico (20 °C y 16 horas). En esta figura se puede ver que se mantiene la misma tendencia, teniendo a las glutelinas como fracción mayoritaria, seguidas de las globulinas y prolaminas respectivamente. Inmediatamente se observa que la fracción de albúminas disminuyó drásticamente, alcanzando apenas el 1 % en contenido proteico. Raya y colaboradores en el 2012, menciona que la fracción de albúminas presentan su mayor solubilidad en agua a valores de pH de 6, 7 y 12; por lo que probablemente las albúminas se solubilizaron durante la hidrólisis con pH de 12 y la posible causa de la ausencia de albúminas, es que no hayan precipitado con HCl a un valor de pH de 4.9, ya que su punto isoeléctrico se encuentra en un rango de 4.6 a 4.9; y se encuentren solubles en el sobrenadante resultante de la centrifugación. Esto es debido a que la composición química de cada proteína es característica y presenta un número diferente de grupos ionizables que se neutralizan a diferente pH (Segal & Ortega, 2005), esta es la razón por la cual posiblemente no existe un valor único de pH como punto isoeléctrico, ya que éste depende de la naturaleza de la proteína, es decir, de los aminoácidos y péptidos que la constituyen, al igual que de las interacciones que existan entre estas moléculas y el medio (Serpa *et al.*, 2014).

En cuanto al contenido de globulinas, se observa que hay un incremento del 83 % con respecto a la harina. Este resultado favorece en que éstas forman anticuerpos que regulan la actividad y el funcionamiento de las células, regulan el pH sanguíneo y defienden el organismo de las infecciones; su función va a depender del grupo al que pertenezcan, globulinas α -1, α -2, β , γ (Rueda, 2010).

Y con respecto al contenido de glutelinas, el hidrolizado se enriqueció con un 76 % con respecto a la harina. Esta fracción proteica favorece su uso ya que en la industria alimentaria se utilizan para conferir viscosidad y elasticidad a los alimentos, principalmente en la industria panadera; evitando que la masa se extienda demasiado y colapse, ya sea durante la fermentación como en la etapa de cocción (Álvarez, 2001). Esta función la posee

principalmente el gluten del trigo, que está compuesto por gliadinas (prolaminas) y gluteninas (glutelinas). Y no existe algún problema con respecto a la enfermedad celíaca, la cual se refiere a una enteropatía causada por la sensibilidad al consumir alimentos que contengan algún tipo de prolamina, aunque comúnmente se le asocia a esta enteropatía con la ingesta de alimentos que contengan gluten (Hernández *et al.*, 2015); ya que el único componente responsable de dicha enfermedad es la fracción de gliadinas (prolaminas) (DeGeorge *et al.*, 2017).

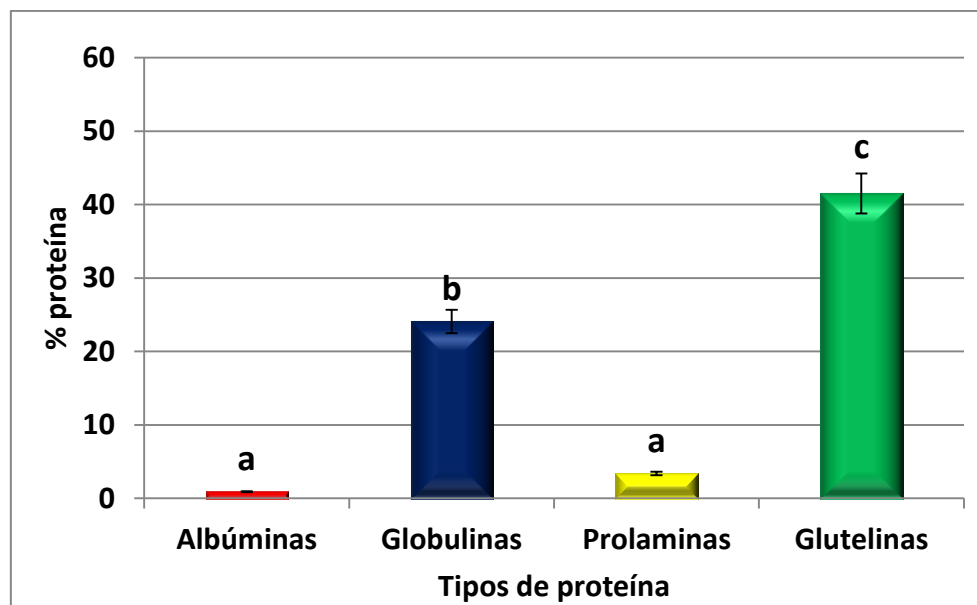


Figura 18. Perfil de proteínas del hidrolizado con bajo rendimiento proteico, obtenido a las condiciones de extracción de 20°C y 16 horas. Las letras diferentes en cada barra indican la diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

El fraccionamiento de proteínas del hidrolizado con el mayor rendimiento proteico (30 °C y 24 horas) se muestra en la figura 19, el mismo comportamiento que el hidrolizado de menor rendimiento proteico, mostrando a las glutelinas como la fracción mayoritaria, seguidas de las globulinas, prolaminas y por último las albúminas. Sin embargo, varían en el porcentaje de proteínas de cada fracción; esto es debido a los rendimientos en proteínas.

Como se muestra en la figura 19, el contenido de albúminas es 10 % menor que la fracción de albúminas del hidrolizado de menor rendimiento (figura 18), y 89 % menor que las albúminas de la harina de chícharo (figura 17). Este resultado probablemente se debe, como se mencionó anteriormente, a que las albúminas no precipitaron a un pH de 4.9 y quedaron solubilizadas en el sobrenadante. El contenido de globulinas resultó ser 22 % mayor que la fracción de globulinas del hidrolizado de menor rendimiento, y 87 % mayor que la fracción de

globulinas de la harina de chícharo. En cuanto a la fracción de prolaminas se obtuvo un 22 % mayor que las prolaminas del hidrolizado de menor rendimiento, y un 77 % mayor que el contenido de prolaminas de la harina. Por último se observa que el contenido de glutelinas es 28 % mayor que la fracción correspondiente del hidrolizado de menor rendimiento, y con un 83 % mayor que las glutelinas de la harina de chícharo.

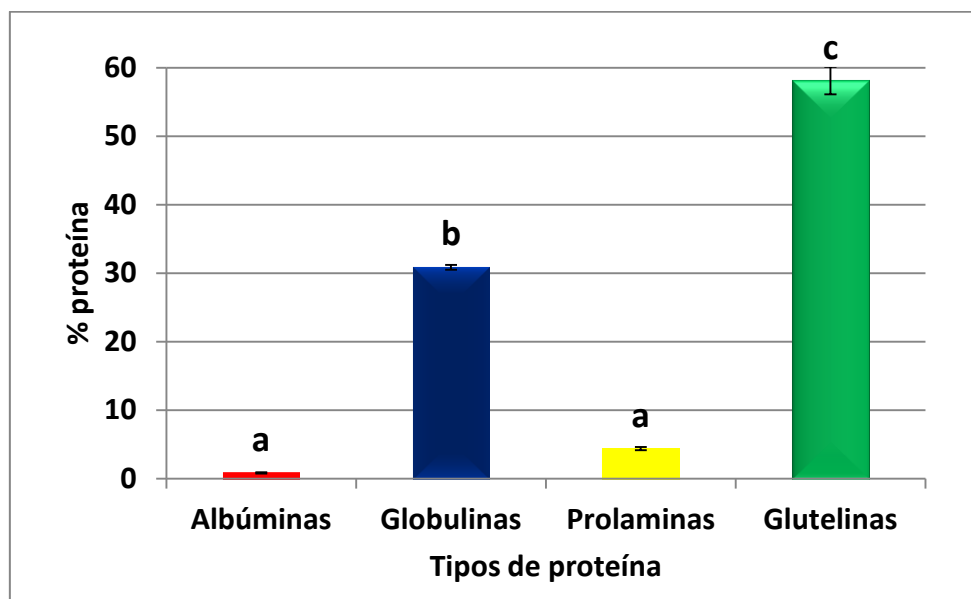


Figura 19. Perfil de proteínas del hidrolizado con alto rendimiento proteico, obtenido a las condiciones de extracción de 30°C y 24 horas. Las letras diferentes en cada barra indican la diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

El análisis estadístico de los dos gráficos indicó que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre albúminas, globulinas, globulinas y prolaminas. Es decir, que el porcentaje de proteínas que se obtiene sí depende de la fracción proteica.

5.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

Los métodos de electroforesis logran separar las sustancias de acuerdo a las relaciones de carga a masa usando el efecto de un campo eléctrico sobre las cargas de esas sustancias, estos métodos se usan mucho en la investigación bioquímica para separar las macromoléculas como las proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos (Gary, 2009).

Por lo tanto, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las fracciones proteicas correspondientes a las albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas. Las fracciones proteicas fueron sometidas a una precipitación tipo *Salting-out* utilizando la sal de

Sulfato de Amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ al 50 % con una temperatura de 100 °C. Los precipitados de cada fracción se utilizaron para cargar los geles de poliacrilamida. El marcador de peso molecular seleccionado para esta prueba tiene un rango de tamaños de 6.5 a 200 kDa.

En la figura 20 se muestra el perfil electroforético en gel de poliacrilamida-SDS, en el cual se observan 7 pozos. El primer pozo corresponde al marcador de peso molecular, el siguiente pozo a las albúminas, seguidas de las globulinas, prolaminas, glutelinas, sobrenadante (resultante de la centrifugación en la hidrólisis), y el último es de la harina de chícharo. El pozo 7 que corresponde a la harina de chícharo, mostró 5 bandas electroforéticas con pesos moleculares que van desde 14.2 a 45 kDa. Nikolić y colaboradores en el 2012 caracterizaron las proteínas de almacenamiento de las semillas de leguminosas (guisante, frijol de campo y lupino), con SDS-PAGE; encontraron que las bandas con mayor énfasis fueron las de peso molecular de 30, 36, 45 y 60 kDa. Estos resultados concuerdan con los que se obtuvieron para la harina de chícharo (variedad *Early perfection*), ya que las bandas con mayor intensidad fueron de 20, 24, 30 y 45 kDa.

En el tercer pozo que corresponde a la fracción de globulinas, en el cual se observa una banda de gran intensidad con peso molecular de 20 kDa, este tamaño se encuentra en el rango de pesos moleculares reportados por Rubio *et al.*, (2013) que presenta un rango de tamaños de 14 a 66 kDa; Rubio y colaboradores realizaron un análisis SDS-PAGE de las fracciones de albuminas y globulinas (7S y 11S) de la harina de guisante (*Pisum sativum cv. Bilbo*), utilizando un gel separador de 12 % de poliacrilamida, un marcador de pesos moleculares de 2.5 a 200 kDa y un voltaje de 200 V durante 50 minutos. La fracción de globulinas que se muestra en la figura 19 coincide con el perfil electroforético ya que es una de las fracciones de gran predominio; por lo cual se puede mencionar que la fracción de globulinas del hidrolizado de alto rendimiento contiene proteínas de peso molecular de 20 kDa.

El pozo de menor intensidad fue el de prolaminas, cuya concentración proteica es muy baja, mientras que el pozo de la harina es de alta intensidad debido a las concentraciones de proteínas altas.

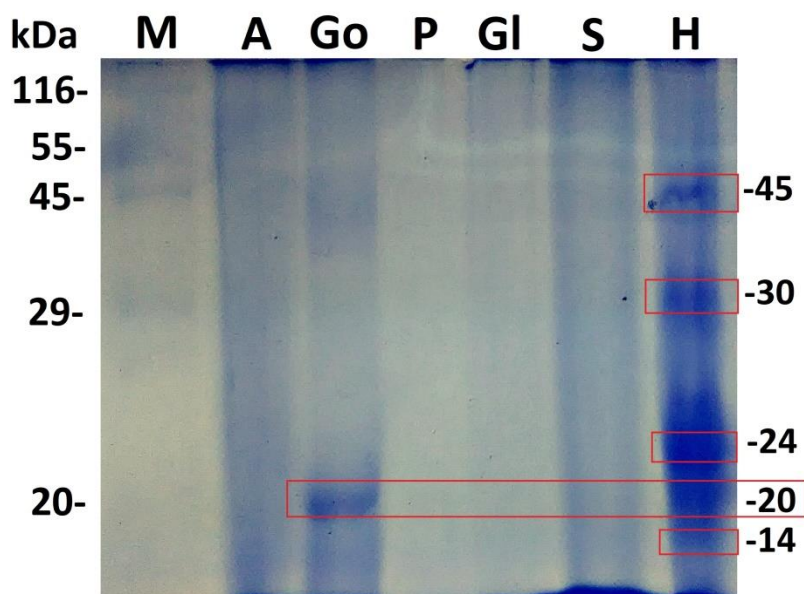


Figura 20. Perfil electroforético de la harina de chícharo y las fracciones proteicas del hidrolizado del mayor rendimiento proteico (24 horas, 30°C). Donde M: marcador molecular, A: albúminas, Go: globulinas, P: prolaminas, Gl: glutelinas, S: sobrenadante, H: harina de chícharo.

El perfil electroforético de las fracciones del hidrolizado de menor rendimiento se muestra en la figura 21. En el cual se muestran 7 pozos de diferentes intensidades; el pozo uno corresponde al marcador de peso molecular, el segundo pozo a las albúminas, el siguiente a las prolaminas, glutelinas, sobrenadante y el último a la harina de chícharo. En el pozo de las globulinas (pozo 3) se observa una banda de baja intensidad que corresponde al peso molecular de 20 kDa; este dato coincide con el obtenido con el hidrolizado de mayor rendimiento (figura 20). De igual forma en el pozo 7 se pueden apreciar 3 bandas que corresponden a pesos moleculares que van de 24 a 45 kDa. En el pozo de prolaminas se observa con una muy baja intensidad el cual indica que la concentración proteica que se encuentra en esta fracción es muy baja, y comparando con las intensidades de los pozos de las glutelinas y harina de chícharo, que estas son de alta intensidad debido a que mostraron concentraciones proteicas altas.

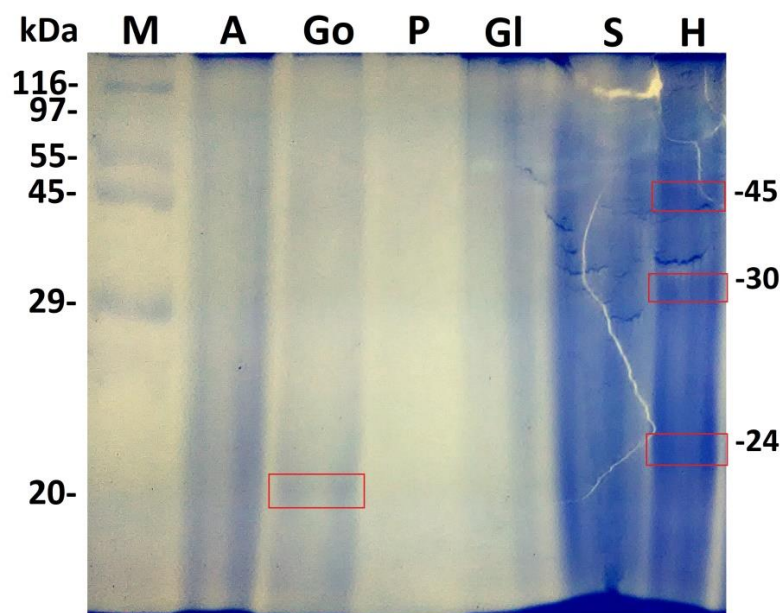


Figura 21. Perfil electroforético de la harina de chícharo y las fracciones proteicas del hidrolizado del menor rendimiento proteico (16 horas, 20°C). Donde M: marcador molecular, A: albúminas, Go: globulinas, P: prolaminas, Gl: glutelinas, S: sobrenadante, H: harina de chícharo.

Como se puede observar en las figuras 20 y 21, las bandas electroforéticas no son muy visibles por lo que se sugiere analizar los pesos moleculares mediante otra técnica. Se propone que sea a través de una electroforesis capilar, ya que es un método de alta resolución y sensibilidad capaz de analizar pequeñas cantidades de muestra en tiempos muy cortos; y así con esto tener una mejor resolución de los resultados.

5.5. Perfil de aminoácidos de la fracción mayoritaria.

La cromatografía líquida, es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase móvil (líquido) que circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmisible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir, estarán separadas (Bussi, 2007).

Se realizó el perfil de aminoácidos de las fracciones proteicas mayoritarias, globulinas y glutelinas. Las fracciones proteicas fueron sometidas a una precipitación tipo Salting-out utilizando la sal de Sulfato de Amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ al 50 % con una temperatura de 100 °C. Los precipitados de cada fracción fueron evaluados para conocer la concentración de proteína, encontrándose una mayor concentración de globulinas que de glutelinas. La concentración de proteína que presentaron se muestra en la tabla 10.

Tabla 11. Contenido de proteína en las muestras para el perfil de aminoácidos.

Muestra	Proteína* (g/100 mL)
Globulinas	0.880
Glutelinas	0.695

*%N*6.25= proteína

Los resultados obtenidos del perfil de aminoácidos se muestran en las tabla 11. Se puede observar que los aminoácidos predominantes en la fracción de globulinas son la arginina, seguida del ácido glutámico e isoleucina. Mientras que en la fracción de glutelinas los predominantes son arginina, valina, ácido aspártico y glutámico e isoleucina.

Tabla 12. Perfil de aminoácidos de las fracciones de globulinas y glutelinas.

Aminoácido	Globulinas (g aa/100 g proteína)	Glutelinas (g aa/100 g proteína)
Ácido aspártico	3.09	12.38
Ácido glutámico	10.24	10.44
Serina	1.76	1.75
Glicina	1.75	0.56
Lisina	0.30	0.54
Histidina	0.86	0.21
Treonina	0.54	0.60
Arginina	61.98	34.58
Alanina	0.08	0.72
Prolina	0.52	0.94
Cisteína	0.41	0.49
Tirosina	2.79	1.94
Valina	1.41	19.19
Metionina	0.72	1.53
Isoleucina	9.06	7.63
Leucina	0.95	1.38
Fenilalanina	1.90	2.46
Amoniaco residual	0.20	0.26

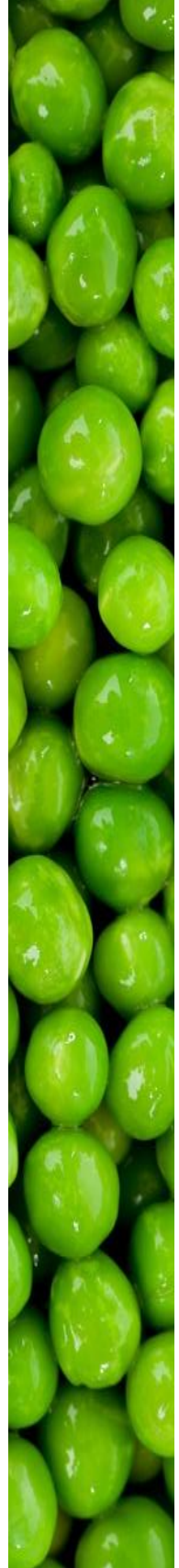
El contenido de arginina en la fracción globulinas es 44 % mayor que en la fracción de glutelinas. El hecho que la arginina sea el aminoácido predominante, coincide con la hipótesis propuesta por Boza-López en 1991 la cual menciona que el chícharo es una de las fuentes más ricas de este aminoácido, aunque no es un aminoácido esencial, es primordial para la construcción de los músculos. Es capaz de estimular la secreción de hormonas como insulina, glucagón, catecolaminas, prolactina y hormona de crecimiento; además de ser precursor metabólico del óxido nítrico que es responsable de la circulación sana, mejorando la salud cardiovascular (Martínez & Sánchez, 2004).

Además, según Shi (2000), la arginina también tiene funciones en el mantenimiento del balance nitrogenado positivo, la liberación de factores de crecimiento, la estimulación de linfocitos T y la participación en la vías metabólicas (síntesis de la urea, el óxido nítrico, y el fosfato creatina). Aunque la arginina se sintetiza en cantidades adecuadas para mantener la masa muscular y del tejido, en situaciones de estrés o lesión, tiende a disminuir rápidamente. Es en esos momentos, en la que su síntesis es insuficiente para satisfacer las demandas de un mayor volumen, la arginina se convierte en un aminoácido esencial en el proceso de cicatrización de heridas y en el mantenimiento de un balance positivo de nitrógeno.

En la fracción de glutelinas el segundo aminoácido predominante es la valina, es un aminoácido esencial que desempeña un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de las estructuras tridimensionales de las proteínas. Además, en conjunto con la leucina e isoleucina se les conocen como aminoácidos de cadena ramificada porque sus cadenas laterales de átomos de carbono contienen ramificaciones; estos incrementan la resistencia del organismo frente al esfuerzo, mejora la producción de fibras musculares y las hace más gruesas y resistentes, aumentando el volumen (Horton *et al.*, 2008).

Por lo anteriormente mencionado, la fracción de globulinas y glutelinas se pueden utilizar como aditivos alimenticios, enriqueciendo con proteínas algún alimento o bebida; además de saber que poseen un alto contenido en arginina y que éste es de gran importancia para las funciones del organismo.

CONCLUSIONES



6. Conclusiones.

Con base en los resultados anteriores se concluye lo siguiente:

1. La harina de chícharo de variedad *Early perfection* presenta un alto contenido de proteínas, carbohidratos y fibra; por lo que es una buena fuente de estos macronutrientes.
2. Las condiciones para la extracción de proteína de chícharo variedad *Early perfection* que permitió el mayor rendimiento fueron a 24 horas y 30 °C, se obtuvo el hidrolizado con mayor contenido proteico y en consecuencia el mayor rendimiento proteico; sin embargo se obtuvo el menor rendimiento en masa.
3. El método de extracción por hidrólisis alcalina, resultó no ser un buen método de hidrólisis; ya que las fracciones proteicas mayoritarias perdieron en gran parte el contenido de aminoácidos esenciales, entre ellos la lisina que es un aminoácido característico de las legumbres.
4. Las fracciones proteicas mayoritarias en la harina de chícharo fueron las glutelinas y albúminas, mientras que en los hidrolizados predominaron las glutelinas y globulinas.
5. En la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS se visualizaron los pesos moleculares de las proteínas de la harina de chícharo que van desde los 14.2 kDa hasta los 45 kDa. Además de las fracciones de globulinas con pesos moleculares de 20 kDa.
6. La fracción de globulinas presentó un alto contenido en el aminoácido arginina; mientras que la fracción de glutelinas también el predominante fue la arginina seguida de la valina; el cual son muy importantes para diversas funciones del organismo.
7. En general se puede concluir que para obtener un fracción enriquecida en glutelinas y está a su vez en arginina, se debe aplicar un hidrólisis que a 24 horas y 30 °C, y así garantizar un alto contenido proteico y alto rendimiento.

RECOMENDACIONES



7. Recomendaciones.

Para mejorar la experimentación de este proyecto se sugiere las siguientes recomendaciones:

1. Realizar un experimento para llegar al punto isoeléctrico en el cual precipite la mayor cantidad de proteínas, dentro del procedimiento de hidrólisis alcalina de la harina de chícharo. Además realizar el mismo experimento para encontrar el punto isoeléctrico de las albúminas, ya que esta fracción se vio afectada después de la hidrólisis.
2. Analizar los pesos moleculares mediante otra técnica. Se propone que sea a través de una electroforesis capilar, ya que es un método de alta resolución y sensibilidad capaz de analizar pequeñas cantidades de muestra en tiempos muy cortos; y así con esto tener una mejor resolución de los resultados. Evaluar el método de hidrólisis enzimática, ya que las condiciones alcalinas extremas destruyeron gran parte de los aminoácidos esenciales que posee la semilla de chícharo.
3. Aplicar el hidrolizado obtenido; para en la elaboración de una masa destinada a panadería para evaluar el efecto en la viscosidad y elasticidad, y comprobar que sea apto para la población celiaca como se analizó en este proyecto.
4. Aplicar el hidrolizado como aditivo en un alimento o bebida para facilitar la ingesta de aminoácidos arginina y valina, cuyo papel es importante para diversas funciones que realiza el organismo humano.

BIBLIOGRAFÍA



8. Bibliografía.

- Álvarez, L. (2001). Proteínas del grano de trigo: gliadinas y gluteninas. Recuperado el 30 de abril del 2018. Disponible en: http://members.tripod.com/lucrecia_alvarez/gliadinas%20y%20gluteninas.htm
- ARS/USDA (2016). Servicio de Investigación Agrícola del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Recuperado el 10 de abril del 2018. Disponible en: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show?ndbno=16085&fg=16&man=&facet=&format=Abridged&count=&max=25&offset=150&sort=f&qlookup=&rptfrm=nl&nutrient1=203&nutrient2=205&nutrient3=291&subset=0&totCount=288&measureby=g>
- Astiasarán, I., y Martínez, J.A. (2003). *Alimentos. Composición y propiedades*. España: Mc Graw Hill.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. (4ª ed.). México: Pearson Educación.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D. and Woessner, J. F. (1998). *Handbook of Proteolytic Enzymes*. UK: Academic Press.
- Benítez R., Ibarz A. y Pagan J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 42(2): 227-236.
- Bewley, J. D., Black, M. (1994). *Seeds. Physiology of development and germination*, (2nd ed., p. 445). New York: Plenum Press.
- *Botanical online* (2017). Propiedades de los guisantes. Recuperado el 7 de febrero de 2017. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/guisantes.htm>
- Boza-López, J. (1991). Valor nutritivo de las leguminosas grano en la alimentación humana y animal. Recuperado el día 8 de marzo de 2018. Disponible en: <http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/3797/03-1991-07.pdf?sequence=1>
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Bussi, J. (2007). Cromatografía líquida de alta eficacia. Recuperado el día 5 de junio del 2018. Disponible en: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf

- Chaplin, L., and Andrew, A. (1989). Functional properties of peptides derived from casein proteolysis. *J. Dairy Res.* 56: 544-552.
- Chel, L. A., Corzo, L. y Betancur, D.A. (2003). Estructura y propiedades funcionales de proteínas de leguminosas. Recuperado el día 14 de junio del 2018. Disponible en: <http://www.cirsociales.uady.mx/revUADY/pdf/227/ru2275.pdf>
- Clemente, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Bautista, J., and Millán, F. (1999). Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Food Chem.* 67,269-274.
- Danielson, C.E. (1952). A contribution to the study of the synthesis of the reserve proteins in ripening pea seeds. *Acta Chem. Scand.* 6: 139.
- DeGeorge, K. C., Frye, J. W., Stein, K. M., Rollins, L. K., and McCarter, D. F. (2017). Celiac disease and gluten sensitivity. *Prim Care Clin Office Pract.* 44: 693-707.
- FAO (2016). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Beneficios nutricionales de las legumbres. Recuperado el día 17 de enero de 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i5384s.pdf>
- FAO/CODEX (2007a). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Codex Alimentarius. Norma Del Codex para la harina de trigo. CODEX-STAN 152-1985. Cereales, Legumbres, Leguminosas y Productos Proteínicos Vegetales. Primera edición. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-a1392s.pdf>
- FAO/CODEX (2007b). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Codex Alimentarius. Norma del codex para determinadas legumbres. CODEX STAN 171-1989. Cereales, Legumbres, Leguminosas y Productos Proteínicos Vegetales. Primera edición. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-a1392s.pdf>
- FAO/SMIA (2001). Sistema Mundial de Información y Alerta. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Perspectivas alimentarias. Departamento económico y social. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/y6027s/y6027s06.htm>
- FAO/STAT (2016). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Recuperado el día 8 de marzo del 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Gallegos-Tintoré, S. M. (2012). Actividad antioxidante y quelante de los productos de hidrólisis de proteínas de *Jatropha curcas* L. Tesis de grado de doctorado en ciencias en desarrollo de productos bióticos. Centro de desarrollo de productos bióticos IPN.

Disponible en:
tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/13451/Tesis%202012%20Santiago%20Moisés%20Gallegos%20Tintoré.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Gary, D. C. (2009). *Química Analítica*. Washington: The McGraw-Hill.
- Giambanco de Ena, H. (2018). Historia del guisante. Recuperado el día 10 de enero de 2018. Disponible en: <http://www.horticom.com/pd/imagenes/70/695/70695.pdf>
- Gil-Hernández, A. (2010). *Composición y calidad nutritiva de los alimentos*. Granada: Médica Panamericana.
- Gomis-Yagües, V. (2008). Cromatografía de líquidos de alta resolución. Consultado el 19 de julio de 2018. Disponible en: <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8248/4/T4cromatliquid.pdf>
- González, J. M. (2012). Curso de biomoléculas. Recuperado el día 31 de enero de 2018. Disponible en: <http://www.ehu.eus/biomoleculas/index.htm>
- Guadix, A., Guadix, E. M., Páez-Dueñas, M. P., González-Tello, P., y Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*. 41 (1): 79-89.
- Guéguen, J. and Cerletti, P. (1994). *Proteins of some legumes seeds: Soybean, pea, fababean and lupin*. In: *New and Developing Sources of Food Proteins*. Hudson: Chapman & Hall USA.
- Guleria, S., Dua, S. and Chongtham, N. (2009). Analysis of variability in different genotypes of pea (*Pisum sativum* L.) on the basis of protein markers. *Legume Res.*, 32 (4): 265-269.
- Gupta, P., and Mahajan, R. (2010). Characterization of variation in seed protein fractions and total proteins in garden pea (*Pisum sativum* L.) genotypes. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*. 7(1): 401-405.
- Hernández-Espinosa, N., Reyes-Reyes, M., González-Jiménez, F. E., Núñez-Bretón, C. L., y Cooper-Bribiesca, B. L. (2015). Importancia de las proteínas de almacenamiento en cereales (prolaminas). *VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud*. 18(1):3-7. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2015/vre151a.pdf>
- Horton, H. R., Moran, L. A., Scrimgeour, K. G., Perry, M. D. and Rawn, J. D. (2008). *Principios de bioquímica*. México: Pearson Educación.

- Ibañez-Carranza, A. M. (1991). *Aislamiento y caracterización parcial de las fracciones proteínicas de avena cubierta var. Páramo y avena desnuda var. Dorada*. Tesis de maestría. ENCB. IPN. México.
- ICAMEX (2018). Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México. Recuperado el día 15 de enero de 2018. Disponible En:
<https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=7&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiK-KjK9NrYAhUMyVMKHUXLBx0QFghJMAY&url=http%3A%2F%2Ficamex.edomex.gob.mx%2Fchicharo&usg=AOvVaw3Dw71waHFrPpGnc509eMX7>
- INCAP (2012). Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. Recuperado el día 16 de enero de 2018. Disponible en:
<http://www.incap.int/mesocaribefoods/dmdocuments/TablaCAAlimentos.pdf>
- Lahl, W., and Braun, S. (1994). Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.* 48: 68-71.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. 227: 680-685.
- Liang, H., Tang, C. (2013). pH-dependent emulsifying properties of pea [*Pisum sativum* (L.)] proteins. *Food Hydrocolloids*. 33: 309-319.
- Llorente, B. E. (2000). *Aislamiento, purificación, caracterización y producción in vitro de peptidasas de alcaucil coagulantes de la leche*. Tesis de doctorado en Ciencias Exactas. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- López, L. (1995). *Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas presentes en el látex de frutos de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (Moraceae)*. Tesis de doctorado en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Manley, C., McCann, J., and Swaine, R. (1981). In *The Quality of Foods and Beverages*. Vol. 1. G. Charalambous and G. Inglett. (Eds.). London: Academic Press.
- Mannheim, A., and Cheryan, M. (1992). Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *JAOCS*. 69: 1163-1169.
- Marinangeli, C., Kassis, A., and Jones, P., (2009). Glycemic Responses and Sensory Characteristics of Whole Yellow Pea Flour Added to Novel Functional Foods. *Journal of Food Science*. 74 (9): 385.

- Martínez-Augustin, O., and Sánchez de Medina, F. (2004). Arginina, óxido nítrico y función endotelial. *Ars Pharm.*, 45 (4): 303-317. Disponible en: <http://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/5121/4933>
- Martínez, J. J. (2014). *Libro electrónico de Bioquímica*. Recuperado el día 19 de enero de 2018. Disponible en: <http://libroelectronico.uaa.mx/capitulo-4-aminoacidos-y/hidrolisis-de-los-peptidos.html>
- Mateo-Box, J.M. (1961). *Leguminosas de grano*. España: Salvat.
- Meredith, J., Ditesheim, J., Zaloga, G. (1990). Visceral protein levels in trauma patients are greater with peptide diet than with intact protein diet. *J. Trauma*. 30: 825-828.
- Moguel, O., Betancur, A. y Chel, G. (1996). Aprovechamiento integral del grano *Canavalia ensiformis*: Extracción de proteína y almidón. *Tecnol. Aliment. (Méx.)*. 31(1):11-16.
- Morales, D. y Gallo, L. E. (2006). *Plataformas de proteómica*. Instituto de Biotecnología, UNAM. Recuperado el día 20 de enero de 2018. Disponible en: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/plataformas_de_proteomica.pdf
- Nadal-Moyano, S., Moreno-Yangüela M., y Cubero-Salmerón J. (2004). Las leguminosas grano en la agricultura moderna. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- NC-IUBMB (1992). Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes. (NC-IUBMB). *Academic Press*. Orlando. Florida. USA.
- Nikolić, Z., Đorđević, V., Torbica, A., and Mikić, A. (2012). Legumes seed storage proteins characterization by SDS-PAGE and Lab-on-a-Chip electrophoresis. *Journal of Food Composition and Analysis*. 28: 75-80.
- NORMEX (1978). NMX-F-090-S-1978. Determinación de fibra cruda en alimentos.
- NORMEX (1978). NMX-F-312-1978. Determinación de azúcares directos y totales en alimentos.
- NORMEX (1986). NMX-F-083-1986. Alimentos. Determinación de humedad en productos alimenticios.
- Ordoñez, N. (2010). La versatilidad del chícharo *Pisum sativum*. *Tecno Agro*. Recuperado el 18 de febrero de 2017. Disponible en: <https://tecnoagro.com.mx/revista/2009/no-52/la-versatilidad-del-chicharo-pisum-sativum/>

- Osborne, T. B. (1907). *The proteins of the wheat kernel*. Washington: Carnegie Institution.
- Panyam, D., and Kilara, A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Sci. & Technol.* 7:120-125.
- Parsons, D. B., Mondoñedo, J. R., Kirchner, F., y Atilano, M. T. (1981). *Frijol y Chícharo*. Trillas: México.
- Pérez-Chabela, M., Soriano-Santos, J., Ponce-Alquicira, E., y Díaz-Tenorio, L. M. (2015). Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. *NACAMEH*, 9(2): 77-96. Recuperado el día 21 de enero de 2018. Disponible en: http://cbs.izt.uam.mx/nacameh/v9n2/Nacameh_v9n2_077_PerezCh-et al.pdf
- Periago, M., Vidal, V., Ros, G., Rincón, F., Martínez, C., and López, G. (1998). Influence of enzymatic treatment on the nutritional and functional properties of pea flour. *Food Chem.* 63: 71-78.
- Primo, E. (2007). *Química orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria*. Tomo II. España: Reverté. 795p.
- Pyler, E. J., and Gorton, L. A. (2008). *Baking Science and Technology*, (3a. ed., Vol. I., pp. 234-250). Kansas: Sosland Publishing Company.
- RDU/UNAM (2017). Revista Digital Universitaria. Recuperado el día 12 de febrero del 2017. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num9/art88/popups/popup11.htm>
- Ramírez-López, G. (2011). *Caracterización bioquímica de la fracción de prolaminas de la semilla de chíá (Salvia hispanica L.) de los estado de Colima y Puebla*. Tesis de maestría en ciencias de los alimentos. IPN Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México. pp. 79.
- Rathi, D., Gayen, D., Gayali, S., Chakraborty, S., y Chakraborty, N. (2016). Legume proteomics: Progress, prospects, and challenges. *Proteomics Journal.* 16:310-327.
- Raya-Pérez, J.C., Aguirre-Mancilla, C.L., Tapia-Aparicio, R., Ramírez-Pimentel, J.G., y Covarrubias-Prieto, J. (2012). Caracterización de las proteínas de reserva y composición mineral de la semilla de capulín (*Prunus serotina*). *Polibotánica.* 34(1405-2768): 223-235.
- Rolletschek, H., Hosein, F., Miranda, M., Heim, U., Gotz, K.P., Schlereth, A., Borisjuk, L., Saalbach, I., Wobus, U. and Weber, H. (2005). Ectopic expression of an amino

- acid transporter (*VfAAP1*) in seeds of *Vicia narbonensis* and pea increases storage proteins. *Plant Physiol.* 137: 1236–1249.
- Rueda, A. (2010). Albúminas y globulinas. Recuperado el día 30 de abril del 2018. Disponible en: <http://proteinasalbuminasyglobulinas.blogspot.mx/>
 - Rubio, L. A., Pérez, A., Ruiz, R., Guzmán, M. A., Aranda, I. y Clemente, A. (2013). Characterization of pea (*Pisum sativum*) seed protein fractions. *J Sci Food Agric.* 94:280–28.
 - SAGARPA (2016). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Exportaciones agroalimentarias. Recuperado el día 15 de enero de 2018. Disponible en: www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/Paginas/JAC_00137_16.aspx
 - Segal-Kischinevzky, C. A., y Ortega-Lule, G. J. (2005). Manual de prácticas de Biología Molecular de la célula I. Facultad de Ciencias de la UNAM, México.
 - Sell, M., Steinhart, H., Paschke, A. (2005). Influence of Maturation on the Alteration of Allergenicity of Green Pea (*Pisum sativum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 53:1717–1722.
 - Serpa-Guerra, A. M., Hincapié-Llano, G., y Álvarez-López, C. (2014). Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas presentes en cuatro fuentes foliares: yuca (*Manihot esculenta* Crantz) variedades verónica y tai, jatropha (*Jatropha curcas* L.) y gmelina (*Gmelina arborea*). *Prospect.* 2(1): 30-39. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/prosp/v12n1/v12n1a04.pdf>
 - Shafee, T. (2013). Protease mechanisms summary. Recuperado el día 25 de marzo de 2018. Disponible en: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Protease_mechanisms_summary.png
 - Shi, H. P., Efron, D. T., Most, D., Tantry, U. S., and Barbul, A. (2000). Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Surgery.* 128: 374.
 - SIAP/SAGARPA (2016). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Recuperado el día 7 de febrero de 2017. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx/agricola_siap_gb/identidad/index.jsp
 - Smith, A. y Martínez R. (2012). Proteasas: Innovación en alimentación. Recuperado el 19 de enero de 2018. Disponible en:

<http://jornadasavicultura.com/2012/docs/conferenciantes/ponencias/15-20120508-Ricardo-Martinez-Aleson-PROTEASAS-DSM.pdf>

- Soral-Smietana, M., Swigon, A., Amarowicz, R., and Sijtsma, L. (1998). The solubility of trypsin pea protein hydrolysates. *Nahrung* 42:217-218.
- Stone, A. K., Karalash, A., Tyler, R. T., Warkentin, T. D., and Nickerson, M. T. (2015). Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Research International*. 76: 31-38.
- Turner, S., Barratt, D. and Casey, R. (1990). The effect of different alleles at the r locus on the synthesis of seed storage proteins in *Pisum sativum*. *Plant Mol. Biol.* 14:793-803.
- Turgeon, S., Gauthier, S., and Paquin, P. (1992). Emulsifying property of whey peptide fractions as a function of Ph and ionic strength. *J. Food Sci.* 57: 601-604, 634.
- Vasco, N. L. (1994). *Caracterización bioquímica e inmunológica de las glutelinas de amaranto para determinar homología con otras proteínas de reserva*. Tesis de maestría. ENCB. IPN. México.
- Vavilov, N. I. (1987). *Origin and Geography of Cultivated Plants*. Russian: Nauka.
- Vidal-Guevara, M.L., Periago, M.J., and Ros, G. (2003). Influencia del tratamiento enzimático sobre la calidad de la proteína del guisante. *An. Vet. (Murcia)*. 19: 43-60.
- Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. y Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos. *ResearchGate*. 52(2): 132-136.
- Weber, K., Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*. 244: 4406-4412.
- Yábar-Varas, C. A. (2003). *Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN*. Lima: Artes & diseños LASER S.R.LTDA. Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual%20Electroforesis%2038.pdf>

ANEXO



Anexo

Procedimiento de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

Para determinar los pesos moleculares de las proteínas de los hidrolizados y sus respectivas fracciones proteicas, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida, de acuerdo al método de Laemmli (1970) descrito por Yábar en el 2003.

1.- Preparación de los geles de poliacrilamida

Se utilizó la electroforesis de proteínas con sistema discontinuo, es decir, que está conformado por dos geles de poliacrilamida un concentrador y un separador que presentan diferente concentración, composición y pH. Ambos geles se encuentran unidos pero limitados por una fase de separación visible al trasluz. Debido a que en estado líquido ambos geles pueden mezclarse fácilmente, deben ser preparados por separado esperando la total polimerización del primero para continuar con la polimerización del otro. El gel concentrador generalmente se localiza en la parte superior del sistema formando los pocillos donde se depositarán las muestras. El gel separador por su parte forma el cuerpo del gel por donde migrarán y se separarán las proteínas.

Preparación del gel separador

Para poder preparar el gel separador, primero se procedió a preparar cada uno de los componentes como se muestran a continuación:

- a) Solución de trabajo acrilamida/bisacrilamida al 30%.

Tabla 13. Reactivos para preparar la solución de acrilamida/bisacrilamida al 30%.

Reactivos	Cantidad (g)	Concentración final (%)
Acrilamida	29.2	29.2
Bisacrilamida	0.8	0.8
Mezcla total	30	30

Se disolvieron los componentes de la tabla 12 con 100 mL de agua destilada. Filtrar para remover las impurezas y verter la mezcla en un frasco ámbar.

b) Buffer Tris 1.5 M pH=8.8

Se mezclaron 18.165 g de tris base con agua destilada y se aforó a un volumen de 100 mL. Se ajustó el pH a 8.8 con HCl.

c) Persulfato de amonio (PSA 10 %)

Se mezclaron 100 mg en 1 mL de agua destilada, se almacenó en un envase heméricamente cerrado.

d) SDS 20 %

Se disolvieron 20 g de SDS en 80 mL de agua destilada, luego se ajustó el pH 7.2 con NaOH al 10 N, y finalmente se completó un volumen de 100 mL con agua destilada.

e) TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina)

Fue adquirido por Laboratorios Bio-Rad, Cat. #161-0800

Una vez obtenidos los componentes, se procedió a preparar el gel separador a una concentración del 12 % de acrilamida. Se mezclaron los componentes para un volumen de 20 mL aproximadamente, como se muestra en la tabla 13:

Tabla 14. Reactivos para preparar el gel separador con 12 % de acrilamida.

Reactivos	Cantidad
Agua destilada	6.6 mL
Acrilamida/bisacrilamida 30 %	8 mL
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	5 mL
SDS 20 %	200 µL
Persulfato de amonio 10 %	100 µL
TEMED	10 µL

Una vez instaladas las placas de vidrio (figura 22), se procedió a agregar la mezcla entre las placas de vidrio, con ayuda de una pipeta. Se dejó polimerizar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se realizó el gel de poliacrilamida de 1mm de espesor.



Figura 22. Instalación de placas de vidrio.

Preparación del gel concentrador

f) Buffer Tris 0.5 M pH=6.8

Se mezclaron 6.055 g de tris base con agua destilada y se aforó a un volumen de 100 mL. Se ajustó el pH a 6.8 con HCl.

Posteriormente, se procedió a preparar el gel concentrador a una concentración del 5 % de acrilamida. Se mezclaron los componentes para un volumen de 6 mL aproximadamente, como se muestra en la tabla 14:

Tabla 15. Reactivos para preparar el gel concentrador con 5% de acrilamida.

Reactivos	Cantidad
Agua destilada	7.394 mL
Acrilamida/bisacrilamida 30 %	1.246 mL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.26 mL
SDS 20 %	100 μ L
Persulfato de amonio 10 %	100 μ L
TEMED	20 μ L

Una vez que se obtuvo la mezcla, se agregó entre las placas de vidrio y sobre el gel separador polimerizado. Inmediatamente se colocó el peine entre las placas de vidrio, para moldear los pozos (figura 23). Se dejó polimerizar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Una vez polimerizado se retiró el peine cuidadosamente.



Figura 23. Polimerización del gel concentrador con el peine colocado.

2.- Preparación de la muestra

Para preparar la muestra, se pesó en un tubo eppendorf 1mg del hidrolizado obtenido, se le agregó 30 μ L de buffer de muestra Laemmli (compuesto por 31.5 mM Tris-HCl a pH=6.8, 10% glicerol, 1% SDS y 0.005% azul de bromofenol; Obtenido de Laboratorios BIO-RAD Cat. #161-0737) y 2 μ L de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20%, se agitó 15 segundos en un vortex, después se sometió a ebullición por 10 minutos y se dejó enfriar.

Las fracciones proteicas obtenidas del procedimiento de Osborne, fueron sometidas a ebullición durante 15 minutos, posteriormente se les agregó sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ al 50%. Por último se centrifugaron a 10 000 rpm por 15 minutos y los precipitados fueron recolectados en tubos eppendorf. Se tomó 1mg de los precipitados y fueron depositados en tubos eppendorf, se les agregó 30 μ L de buffer de muestra Laemmli y 2 μ L de SDS al 20%, se agitaron 15 segundos en un vortex y finalmente fueron sometidas a ebullición durante 10 minutos.

3.- Electroforesis

Para llevar a cabo la separación de las proteínas se procedió a preparar el Buffer de corrida mezclando los componentes que se muestran en la tabla 15:

Tabla 16. Reactivos para preparar buffer de electroforesis.

Reactivos	Cantidad	Concentración final
Tris base	3.038 g	0.25 M
Glicina	15.01 g	2 M
SDS	1 g	1 %

Todos los componentes anteriores se mezclaron y disolvieron en 100 mL de agua destilada.

Se armó la cámara de electroforesis, colocando los geles polimerizados dentro de ella. Para agregar la muestra se tomaron 15 μ L de ellas y fueron depositadas en los pozos del gel con ayuda de la guía de pocillos (figura 24), y 1 μ L del peso molecular estándar. Se añadió el buffer de corrida hasta dónde marca la cámara.



Figura 24. Colocación de las muestras en los pozos.

Como marcador de pesos moleculares se utilizó un estándar de proteínas obtenido de SIGMA-ALDRICH #S8445, compuesto de miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa B (97 kDa), albúmina (66 kDa), deshidrogenasa glutámica (55 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa), α -lactoalbúmina (14.2 kDa) y apronitina (6.5 kDa).

Posteriormente se cerró la cámara de electroforesis y se conectaron los cables correspondientes de los electrodos en la fuente de poder. Se encendió la fuente de poder ajustando un voltaje de 80 V durante 90 minutos (figura 25).



Figura 25. Instalación de la cámara electroforética y la fuente de poder.

Ya finalizada la corrida, se procedió a apagar y desconectar los cables de la fuente de poder, y a desmontar los geles.

4.- Tinción de los geles de poliacrilamida

Para poder continuar con la tinción se preparó con una semana de anticipación, la solución de tinción de azul brillante de Comassie R250. Se disolvieron 0.25 g de azul brillante de Comassie R250 en 90 mL de metanol:H₂O (v/v 1:1) y 10 mL de ácido acético glacial. Se filtró la solución para eliminar residuos extraños y se dejó reposar en un frasco ámbar.

Después de la electroforesis, el gel fue separado de las placas de vidrio muy cuidadosamente con ayuda de una espátula y fue sumergido en la solución de tinción (figura 26). Se dejó teñir las proteínas durante toda una noche.



Figura 26. Separación del gel de las placas y su tinción.

También se preparó la solución de decoloración, mezclando 10 mL de ácido acético glacial con 50 mL de metanol, completando un volumen de 100 mL con 40 mL de agua destilada.

Una vez transcurrido el tiempo de tinción, el gel fue sumergido en la solución de decoloración, agitando durante 60 minutos, para eliminar el exceso de colorante (figura 27).

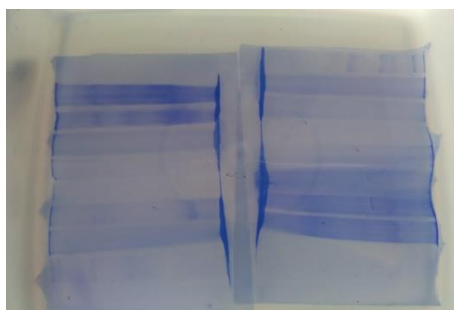


Figura 27. Decoloración de los geles.

Y por último se procedió a visualizar y analizar los geles de poliacrilamida.