ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERÍA EN MECÁNICA Y CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN

"Obtención de Concentrado Proteico por Hidrólisis Enzimática a partir del Salvado de Arroz de Variedades Ecuatorianas"

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERAS DE ALIMENTOS

Presentado por:

María Fernanda Naranjo Bravo

Miriam Tatiana Suquilanda Piedra

GUAYAQUIL-ECUADOR

Año: 2013

AGRADECIMIENTO

A Dios por llenarnos de paciencia y seguridad cuando más necesitamos para poder culminar con este proyecto. A mi tutora de tesis, Ing. Grace Vásquez por darnos la oportunidad de aprender mucho sobre investigación y también por su apoyo en todo el proceso del presente trabajo.

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) especialmente al Dr. Efrén Santos y su equipo colaborador, Ing. Roberto Haz, Ing. Iván Chóez, Ing. Roberto Celi, Ing. Fabiola Cornejo; gracias a su apreciable ayuda en el desarrollo de esta tesis, nos han permitido terminar con éxitos esta investigación.

María Fernanda

AGRADECIMIENTO

A Dios por ser el motor de mi vida, y por su respaldo para poder terminar este proyecto a pesar de las adversidades que se presentaron. A mi directora de tesis, Ing. Grace Vásquez por aportar con su tiempo y su valioso conocimiento a favor de nosotras.

De igual manera agradezco de todo corazón al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) en especial al PhD. Efrén Santos y a todo su equipo colaborador, PhD. Tulio Orellana, Ing. Iván Chóez, a la Bolsa de Productos y al Programa del Arroz del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) pues sin su valiosa ayuda no hubiera sido posible la culminación de esta investigación.

Miriam

DEDICATORIA

A Dios por la toda la paciencia que puso en mi para seguir adelante en esta etapa de mi vida. A mis padres, Alcides y Carmita, que son los seres que más amo con todo mi corazón, por su apoyo incondicional que siempre me han brindado, por llenarme de valor, por su constante motivación, por ser mi guía y por estar conmigo cuando más los he necesitado. A mis hermanas, Nathalia y Belén, por ser ejemplos a seguir. A mi novio Ricardo R., por su constante apoyo y fuerza para no desvanecer. A mi abuelita Tere y Ñaña Paqui por su cariño y preocupación que pusieron en mi para culminar mis estudios, por ser ejemplos de vida, las adoro. A mi prima Vanessa, su recuerdo siempre me da fuerzas para seguir adelante. A mi familia y amigos que estuvieron en esta importante etapa de mi vida.

María Fernanda

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico principalmente al ser más grande en mi vida, Dios, pues Él es quien conoce los deseos de mi corazón, Él es mi fortaleza y mi inspiración para alcanzar mis sueños y dar lo mejor de mí en todo lo que emprendo. A mis padres, Edgar y Miriam, por su esfuerzo y apoyo incondicional en la culminación de mis estudios universitarios y por hacer de mí una persona con sólidos valores éticos y morales. A mi hermano Edgar, por estar junto a mí. A mi novio Tito, por todo su amor, ánimo y ayuda incondicional. A la memoria de mi primo, Mario, por ser un ejemplo a mi vida de entrega y perseverancia, que durante el tiempo de vida que estuvo con nosotros me mostró que con esfuerzo y paciencia podemos lograr lo que nos propongamos. A todos mis queridos amigos y familia por su interés y preocupación en la culminación de esta etapa estudiantil.

Miriam

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Dr. Kleber Barcia V., Ph. D.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

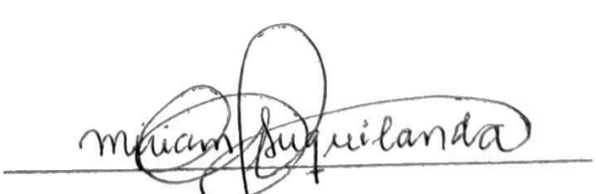
Ing. Grace Vásquez V.
DIRECTORA DE TESIS

Ing. Fabiola Cornejo Z.
VOCAL PRINCIPAL

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL"

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).



Miriam Tatiana Suquilanda Piedra

María Fernanda Naranjo Bravo

RESUMEN

El arroz (*Oryza sativa L*.) es el cultivo más extenso y de mayor consumo en el Ecuador. Uno de sus principales subproductos es el salvado de arroz, el cual ha sido destinado en su gran mayoría a la alimentación de animales, siendo subutilizada una proteína de excelente calidad nutricional y funcional. El salvado de arroz (SA) es considerado una buena fuente de proteína hipoalergénica debido a su alto contenido de lisina en relación a otros cereales.

Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como principal objetivo la obtención de un concentrado proteico a partir del SA de variedades ecuatorianas con excelentes propiedades nutritivas para uso en alimentación humana; para lo cual se inició con la caracterización físico-química de las fracciones de pulido de tres variedades de arroz de mayor consumo en nuestro país (INIAP 14, 15, 17) con la finalidad de determinar la influencia de la variedad y grado de pulido sobre el contenido proteico del salvado de arroz.

Se trabajó como sustrato con SA desgrasado y sin desgrasar de la variedad INIAP 15, debido a su mayor contenido en proteínas (Pulido 1: 13,50±0,03%; Pulido 2: 12,86±0,07%).

El proceso de hidrólisis proteica se lo realizó en dos etapas. La primera corresponde a una extracción y solubilización donde se aplicaron dos métodos de extracción: alcalina y enzimática para cada sustrato; en ambos casos se trabajó con una relación SA:buffer de (1:5) y bajo condiciones controladas de pH, temperatura y tiempo, en la extracción enzimática se trabajó con xilanasa; observándose que las mejores condiciones de extracción fue usando sustrato desgrasado por método alcalino a 120 minutos, donde se obtuvo un extracto con un 63,56±0,05% de proteína total. La segunda etapa consistió en la hidrólisis enzimática de proteínas donde se trabajó con una proteasa bacteriana sobre el extracto proteico obtenido en la primera etapa.

Finalmente, se obtuvo un concentrado proteico con un contenido de proteína total del 75% y nitrógeno soluble de 53%, en un tiempo óptimo de 180 minutos por el método alcalino. Sensorialmente el concentrado presentó un sabor ligeramente ácido y salado, y un dulzor casi imperceptible.

INDICE GENERAL

RESUMEN ..... **II**

INDICE GENERAL ..... **IV**

ABREVIATURAS ..... **VII**

INDICE DE FIGURAS ..... **VIII**

INDICE DE TABLAS ..... **X**

INTRODUCCIÓN **1**

CAPITULO 1

1. GENERALIDADES 3

1.1. Antecedentes 3

1.2. Planteamiento del problema 6

1.2.1 Justificación 8

1.3. Objetivos 10

1.3.1. Objetivo general 10

1.3.2. Objetivos específicos 10

1.4. Hipótesis 11

1.5. Metodología de la tesis 11

CAPITULO 2

2. MARCO TEÓRICO 14

2.1. Salvado de arroz 14
2.1.1. Morfología de la semilla del arroz 16
2.1.2. Descripción del proceso de pilado del arroz 19
2.1.3. Valor nutricional 28
2.2. Proteína del salvado de arroz 29
2.2.1. Calidad proteica 31
2.2.2. Métodos de extracción de proteína 34
2.3. Hidrólisis enzimática 39
2.3.1. Enzimas 40
2.3.1.1. Tipos 42
2.3.1.2. Mecanismo de hidrólisis 51
2.4. Hidrolizados proteicos del salvado de arroz 56
2.4.1. Propiedades funcionales y nutricionales 57
2.4.2. Hidrolizados proteicos comerciales 62
2.5. Análisis Crítico de la Biosíntesis de Proteínas en el arroz 65

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS 70
3.1 Materiales 70
3.1.1 Sustrato: Salvado de Arroz 71
3.1.2 Enzimas 76
3.2 Metodología 78
3.2.1 Caracterización físico-química del salvado de arroz 78
3.2.2 Hidrólisis enzimática 82

3.2.2.1 Pre tratamiento del sustrato..... 82
3.2.2.2 Condiciones de Hidrólisis 83
3.2.2.3 Grado de hidrólisis..... 89
3.3 Cuantificación del concentrado proteico..... 90
3.3.1 Nitrógeno soluble 90
3.3.2 Sabor 91

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS..... 94
4.1. Caracterización del salvado de arroz 94
4.2 Cuantificación del concentrado proteico..... 113
4.2.1 Grado de hidrólisis 113
4.2.2 Nitrógeno soluble 115

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 118

ANEXOS

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

BSA	Albumina bovina sérica
D	Desgrasado
g	Gramo
kg	Kilogramo
µg	Microgramos
ml	Mililitros
min	Minutos
nm	Nanómetros
SA	Salvado de Arroz
SD	Sin desgrasar
TM	Tonelada métrica

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Metodología de la Tesis 13

Figura 2.1. Productos de la Molienda del Arroz y sus Rendimientos 15

Figura 2.2. Partes Constitutivas del Grano o Semilla de Arroz 16

Figura 2.3. Diagrama de Flujo del Proceso Industrial de Pilado del Arroz 21

Figura 2.4. Representación Esquemática de la Estructura de una Enzima 41

Figura 2.5. Formación de Complejo Enzima-Sustrato (ES) 42

Figura 2.6. Estructura de los Carbohidratos 48

Figura 2.7. Efectos Antinutricionales de los Ax 50

Figura 2.8. Mecanismo Catalítico de una Proteasa 53

Figura 3.1. Determinador de Impurezas de Granos 72

Figura 3.2. Descascarador de Arroz FC2K 73

Figura 3.3. Pulidor Continuo Temporizado Ricepal U32 74

Figura 3.4. Niveles de Pulimento 75

Figura 3.5. Medidor de Humedad Gac 2100 79

Figura 3.6. Medidor de Blancura Kett C-300 80

Figura 3.7. Metodología de la Experimentación 84

Figura 3.8. Centrifugadora 85
Figura 3.9. Productos de Centrifugación en Extracción Alcalina..... 86
Figura 3.10. Incubadora..... 87
Figura 4.1. Gráfica de Residuos para Proteína..... 99
Figura 4.2. Diagrama de Cajas para el Contenido Proteico entre Variedades 102
Figura 4.3. Contenido Proteico en SA Desgrasado por Tratamiento ... 103
Figura 4.4. Contenido Proteico en SA sin Desgrasar por Tratamiento 104
Figura 4.5. Gráfica de Residuos para Proteína..... 108
Figura 4.6. Efectos Principales para Proteína (BSA) 109
Figura 4.7. Diagrama de Caja para Proteína 111
Figura 4.8. Extracto Proteico Liofilizado..... 112
Figura 4.9. Curva de Grado de Hidrólisis de SDA 180 Min..... 114
Figura 4.10. Gráfica Perfil de Sabor de Concentrado Proteico 117

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido Aproximado de Proteína del Arroz con Cáscara y sus Fracciones de Molienda 20

Tabla 2. Características de las Especies Producidas en la Hidrólisis de Proteínas 52

Tabla 3. Codificación de Muestras 88

Tabla 4. Concentraciones Usadas para la Elaboración de la Curva Patrón de Serina. 90

Tabla 5. Concentraciones para cada Sabor Básico 91

Tabla 6. Caracterización Física y Rendimientos de las Variedades de Arroz INIAP 14, 15 Y 17 95

Tabla 7. Caracterización Físico-Química de las Fracciones de Pulido. . 96

Tabla 8. Análisis de Varianza para Proteínas en Fracciones de Pulido. 98

Tabla 9. Método de Tukey para Análisis de Factor Pulido y Variedad 101

Tabla 10. Análisis de Varianza para Proteína 107

Tabla 11. Contenido de Proteína Total en los Productos Finales de la Etapa de Extracción y Solubilización 112

Tabla 12. Resultados Grado de Hidrólisis 113

Tabla 13. Caracterización del Concentrado Proteico 115

Tabla 14. Perfil de Sabor del Concentrado Proteico 116

INTRODUCCIÓN

El cultivo del arroz es el más extenso del Ecuador, la mayoría de esta producción está en manos de pequeños agricultores que desarrollan la labranza mediante la aplicación de diversas tecnologías. Según el III CNA y SIGAGRO, en el 2010 se produjo 1.123.267 TM de arroz en cáscara, lo que representa aproximadamente 100.000 TM de salvado de arroz.

La actual situación nutricional de la población ecuatoriana, evidencia una deficiencia de micronutrientes, desnutrición y sobrepeso por el consumo de dietas que no cubren las necesidades energéticas y proteínicas básicas. Por ello, la importancia de la búsqueda de soluciones oportunas a esta carencia para contribuir a mejorar el estado nutricional, que integre aspectos sociales y económicos.

Las proteínas ejercen un papel básico en la nutrición, y en el aporte de sus propiedades físicas y químicas a los productos en los que se emplean en la industria alimentaria con fines tecnológicos y funcionales. A partir de esta necesidad, se han desarrollado distintos métodos con la finalidad de extraer proteínas a partir de fuentes animales o vegetales y obtener así los concentrados proteicos, la más común la extracción alcalina. Sin embargo, este método puede causar la formación de compuestos tóxicos como

lisinoalanina y la desnaturalización de la proteína lo que baja la calidad nutricional y funcional del concentrado proteico obtenido. Para mejorar la calidad de la proteína también existen métodos enzimáticos donde se han obtenido mejores resultados de rendimientos y porcentajes de proteína.

Desde hace varios años se ha fortalecido el interés mundial de buscar nuevas fuentes proteicas subexplotadas, no solamente por el aspecto agronómico, sino también, principalmente por su valor nutritivo y calidad biológica, como el salvado de arroz que ha sido destinado en nuestro país mayoritariamente para la alimentación de animales y fertilización de suelos.

El salvado de arroz es considerado como una buena fuente energética (12-15% de grasa y 23-28% almidón), y de antioxidantes con efectos hipocolesterolémicos, tiene un alto contenido de fibra (20%) y un 14% de proteína de buena calidad biológica e hipoalergénicas. La proteína del SA tiene una excelente calidad nutritiva superando así cualquier proteína del salvado de otros cereales; contiene en mayor proporción de ácido glutámico y aspártico (FAO, 2004) y en menor cantidad aminoácidos esenciales como treonina, valina, tirosina, histidina y arginina (Tang *et al*., 2003).

De esta forma se considera importante obtener un concentrado proteico a partir del salvado, aprovechando una de las muchas variedades de arroz ecuatorianas existentes.

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

1.1. Antecedentes

El arroz (*Oryza sativa L.)* constituye uno de los principales alimentos para el 60% de la población mundial y uno de los cultivos más importantes. En los últimos años se ha reportado una producción anual de arroz blanco de 380 millones de toneladas métricas alrededor del mundo (United States Department of Agriculture & Economic Research Service, 2003); y según las perspectivas actuales, la utilización mundial de arroz en 2012-2013 podría aumentar en un 2% a 477 millones de toneladas, con un consumo humano de 402,6 millones de toneladas y una gesta media anual per cápita de 57,0 kilos. En

2013, el consumo mundial de arroz podría aumentar debido al descenso de los precios en muchas regiones.

La proteína del arroz es excepcionalmente saludable y deseable para el consumo humano y es en el salvado de arroz (SA) donde se encuentra el mayor porcentaje de esta valiosa proteína, alrededor del 12%, lo cual ha despertado el interés en la industria y en diversos investigadores a nivel mundial para darle un valor agregado a este importante subproducto de la industria arrocera, que ha reportado un rendimiento anual de 50 millones de toneladas métricas en el mundo.

Las proteínas del SA han sido el centro de muchas investigaciones, donde se han evidenciado su alto valor nutricional (Kennedy & Burlingame, 2003) al ser ricas en albuminas, globulinas y en aminoácidos esenciales como la lisina (HAMADA, 2000) (Prakash, 1996), y además pueden ser hipoalergénicas (Tsuji, y otros, 2001). El principal problema que limita el uso de dichas proteínas es su alta insolubilidad debido a la agregación causada por enlaces disulfuro (Parrado *et al*, 2006). Por lo que, se han desarrollado diversas metodologías para extraer dichas proteínas la más común es la extracción

alcalina (Cahamphng , 1966; Betshart *et al*, 1977).) (Gnanasambandam & Hettuarachchy, 1995) sin embargo, las condiciones de pH alcalinos que se manejan pueden causar modificaciones indeseables en la proteína dando como resultado la formación de compuestos tóxicos como lisinoalanina (Cheftel *et al*, 1993; Otterbum, 1989) y la desnaturalización de la proteína lo que baja la calidad nutricional y funcional del concentrado o aislado proteico obtenido. Para mejorar la calidad de la proteína del SA y así poder ser usada en la industria alimentaria se han desarrollado métodos enzimáticos donde se han empleado una amplia gama de enzimas de grado alimentario, siendo las proteasas las que mejores resultados de rendimientos y porcentajes de proteína han dado en comparación con las carbohidrasas, (Hanmoungjai, Pyle, & Kiranjan, 2002) demostró que el uso de carbohidrasas seguidas de un tratamiento con proteasas no mejoró significativamente los rendimientos de proteína en comparación con los resultados obtenidos con el uso de sólo Alcalasa (57%) y de Papaína (43%). (Wang, Hettiarachchy, M., Burks, & Siebenmorgen, 1999) logró obtener exitosamente un aislado proteico que contenía cerca de 92% proteína, a partir de

salvado sin estabilizar y desgrasado, usando fitasa y xilanasa juntas.

Según estudios el SA está compuesto por un 18% de lípidos, dentro de los cuales hay un alto porcentaje de lípidos insaponificables, constituido de 43% de ácidos grasos poliinsaturados, 37% de monoinsaturados y 20% de saturados (Kahlon & Chaow, 2000) (Pacheco, Peña, & Ortiz, 2002); además esta fracción lipídica contiene un complejo único de compuestos antioxidantes, de los cuales los tocoferoles, tocotrienoles y orizanoles han recibido el mayor interés (Lloyd, Siebenmorgen, & Brees, 2000)

1.2. Planteamiento del problema

En Ecuador, el sector agropecuario siempre ha constituido un sector importante para el desarrollo económico del país. Según cifras oficiales al 2009 (Banco Central del Ecuador, Producto Interno Bruto por Industria Período 2009), el sector agropecuario y piscicultor, representó el 9% (USD 2´076,144 millones) del PIB en términos reales. A su vez, en dicho sector, el arroz ha sido un componente clave, debido a que es uno de

los cultivos más extensos a nivel nacional con alrededor de 382,880 hectáreas sembradas (Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua 2008, ESPAC), constituyéndose en un producto de consumo masivo.

A partir del pilado del arroz se obtienen subproductos industriales como el arroz partido y el SA, este último más conocido en nuestro medio como polvillo, los cuales no poseen un alto valor comercial por su escasa funcionalidad. Sin embargo, a partir de estos residuos agroindustriales se pueden obtener ingredientes que presentando buenas propiedades nutricionales y funcionales, constituyan un aporte para nuestra industria alimentaria.

Según la FAO el crecimiento demográfico hasta el 2030 triplicará la población de 1965, y aumentará de un 59% la población actual. Por tanto, el incremento en la producción de alimentos tendrá que realizarse en función de mejorar la tecnología y aprovechar los recursos disponibles, que en nuestro país son en su mayoría agrícolas.

En Ecuador, el SA se lo ha destinado a la alimentación de animales y fertilización de suelos; desaprovechando así el

valioso contenido de nutrientes que aún quedan en este desperdicio de bajo valor añadido, pero que podría aprovecharse para la obtención de productos de alto valor como los hidrolizados proteicos.

1.2.1 Justificación

En general, las proteínas representan uno de los principales componentes de los alimentos, por su aporte nutricional, al ser una importante fuente de energía, nitrógeno y aminoácidos esenciales para el ser humano. Por tanto, los requerimientos nutricionales de la población son cada vez más exigentes en cuanto al aporte proteico en su alimentación, requiriendo nuevas fuentes para su consumo; como es el caso de las personas ancianas, deportistas, hospitalizados, y alérgicos a la proteína de la leche de vaca.

La obtención de hidrolizados proteicos ha cobrado mucho interés en los últimos años pues muchas investigaciones se han centrado en su estudio, debido a la creciente demanda de alimentos más saludables, y en el interés del aprovechamiento de fuentes proteicas alternativas.

El SA presenta un contenido de proteínas entre 11-16%, que para ser de origen vegetal es elevado, además es hipoalergénica y de alta digestibilidad (Helm & Burks, 1996). Lo cual puede contribuir a mejorar la salud de las personas con alergias alimentarias, al tomar dietas constituidas por hidrolizados proteicos hipoalergénicos; lo que a su vez, añade variedad a sus dietas restringidas. Por tanto, se adapta a las actuales demandas en el mercado de alimentos que se consuman como parte de una dieta normal, pero que a su vez ofrezcan mejoría a la salud del consumidor.

El enfoque de este trabajo es darle un valor agregado a la proteína del salvado de arroz porque no ha sido utilizado en su potencial, y de esta manera poder contribuir con la revalorización de este subproducto, el desarrollo de nuevos alimentos, alimentos más sanos y beneficiar a los pequeños productores de arroz que se encuentran ubicados mayoritariamente en las provincias de Guayas y Los Ríos, con el aprovechamiento a gran escala del salvado.

Por tanto, mediante esta investigación se espera poder obtener un concentrado proteico a partir del SA, teniendo en cuenta las condiciones óptimas para realizar la extracción de su proteína.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Obtener un concentrado proteico a partir del salvado de arroz ecuatoriano con excelentes propiedades nutritivas para uso en alimentación humana.

1.3.2. Objetivos específicos

- Establecer diferencias en la composición proximal de las fracciones del salvado provenientes tres variedades ecuatorianas.

- Determinar diferencias significativas en cuanto al porcentaje de proteína entre variedades y pulidos, a través de un análisis de varianza (ANOVA), para así escoger la muestra con el mayor porcentaje de proteína que servirá como sustrato en la obtención del concentrado proteico.

- Aplicar dos métodos de extracción de proteína: alcalino y enzimático, en la obtención de extractos con alto contenido de proteína.

- Establecer el tiempo óptimo para la hidrólisis proteica del extracto obtenido a partir del sustrato escogido.

- Caracterizar fisicoquímica y sensorialmente el concentrado proteico obtenido.

1.4. Hipótesis

Un método adecuado de extracción y purificación permitirá la obtención de un concentrado proteico de SA con características biológicas y sensoriales aceptables para el consumo humano.

1.5. Metodología de la tesis

La investigación que se plantea en este trabajo es de tipo exploratoria y descriptiva, centrándose en los comportamientos bioquímicos y sensoriales que se deriven de la extracción e hidrolisis enzimática de la proteína del SA; esta se llevó a cabo

en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) y en el Laboratorio de Bromatología de la carrera de Ingeniería en Alimentos de la FIMCP. La metodología de la tesis está descrita en la FIGURA 1.1, la cual comienza con la identificación y caracterización físico-química de las fracciones del SA proveniente del pilado de arroz; con la finalidad de determinar estadísticamente la influencia de la variedad del arroz y/o del número de pulidos sobre el contenido de proteína presente en el salvado, para así escoger la muestra con el mayor porcentaje de proteína bruta que se usará como sustrato.

Luego, la proteína del sustrato (desgrasado y sin desgrasar) fue extraída por dos métodos: en un medio alcalino, y por la acción enzimática de una xilanasa fúngica. Donde al producto obtenido, por ambos métodos, se le determinó su contenido de proteína con la finalidad de escoger el método más adecuado y las condiciones óptimas de incubación. Posteriormente, al mejor extracto se lo purificó por acción de una proteasa bacteriana, donde el tiempo óptimo de incubación fue establecido por determinación de grado de hidrólisis. Finalmente el concentrado proteico obtenido se caracterizó en

términos de porcentaje de proteína total, nitrógeno soluble, y sabor.

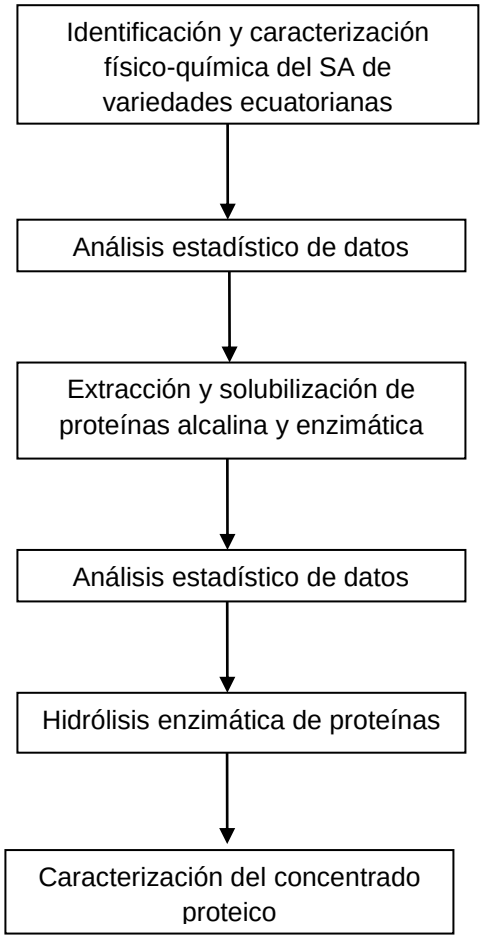


FIGURA 1.1. METODOLOGÍA DE LA TESIS

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Salvado de arroz

El salvado de arroz es uno de los subproductos más abundantes e infrautilizados del proceso de molienda al que se somete el arroz integral (sin cáscara) para obtener el arroz blanco, constituye el pericarpio y el germen de las semillas de *Oryza sativa* (Parrado J., 2006). El salvado de arroz comprende aproximadamente 10% en peso de arroz con cáscara (Figura 2.1), aunque esto depende de la variedad del arroz, con una producción anual de unos 50 millones de toneladas métricas en todo el mundo como un producto secundario de la molienda del arroz. Contiene aproximadamente 12-14% de proteína (Shih, 2003), 12-13% de aceite, 4,3% de componentes altamente

insaponificables y un alto nivel de fibras dietéticas (beta-glucano, pectina y goma); se usa principalmente como ingrediente en la elaboración de pienso para animales.

Los esfuerzos por agregar valor a este subproducto, como las mejoras introducidas en los últimos 25 años en cuanto a su estabilización, han permitido aumentar las posibilidades de su utilización, pero no han sido un éxito total debido a las dificultades en el procesamiento del componente proteico.

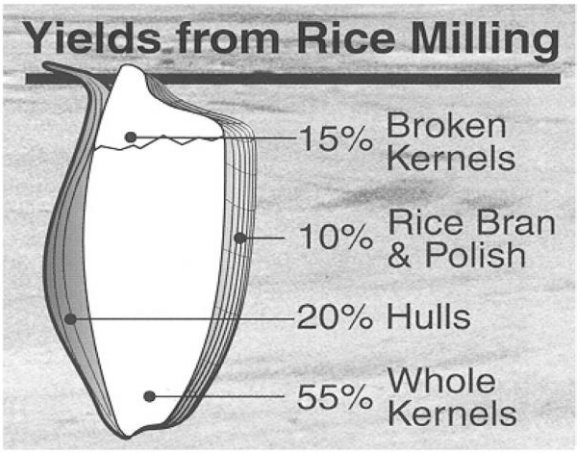


FIGURA 2.1 PRODUCTOS DE LA MOLIENDA DEL ARROZ Y SUS RENDIMIENTOS (SHIH, 2003)

2.1.1. Morfología de la semilla del arroz

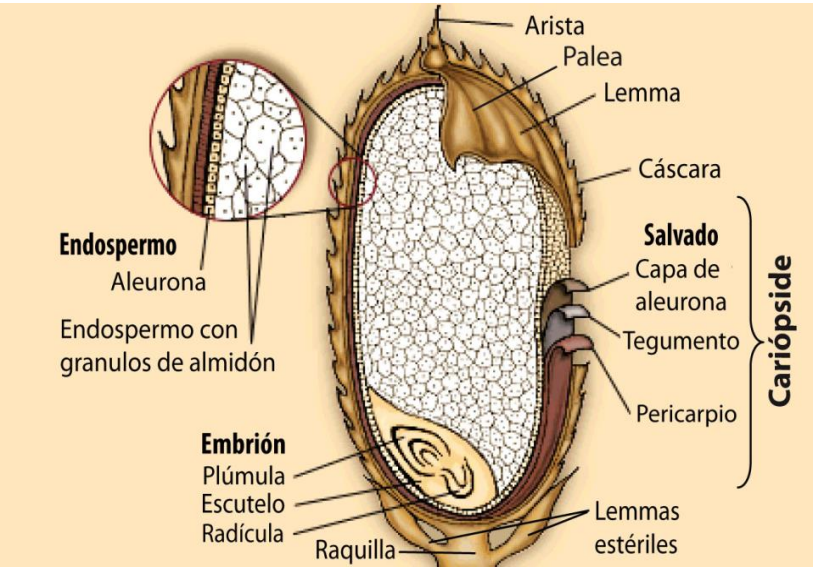


FIGURA 2.2. PARTES CONSTITUTIVAS DEL GRANO O SEMILLA DE ARROZ

El grano de arroz, comúnmente llamado semilla, se forma en un período de tiempo variable, oscilante entre los 30 y los 60 días después de la floración; sin embargo, el embrión se encuentra ya morfológicamente completo a los 10-15 días. Una vez formado el embrión, el grano de arroz se ensancha en su porción basal, y más tarde se

alarga; la última parte en formarse es la central, donde en algunas variedades puede quedar una banda amilácea blanca, que resulta ser un índice o indicador de una maduración imperfecta. Ésta se completa 40-70 días después de la floración. Como consecuencia de ello, y después del transporte de los elementos plásticos acumulados por la planta en sus diversos órganos vegetativos, se forma el fruto llamado comercialmente arroz cáscara o “paddy” (Franquet Bernis & Borràs Pàmies, 2004), que es una cariópside cubierta por una cáscara constituida por la palea y lema, y sus estructuras asociadas como la raquilla, lemas estériles y la arista (Figura 2.2). Al aplicar una presión giratoria al grano de arroz se puede retirar la cascara quedando un grano de arroz descascarado, cariópside, del color del pericarpio que lo cubre que usualmente es marrón que comercialmente es conocido como arroz integral.

La cariópside está envuelta por el pericarpio, este es fibroso y varia en su espesor (Bardenas & Chang, 1965), se retira durante el pulido del arroz. Debajo del pericarpio se encuentran dos capas de células, la aleurona rica en

proteínas y el tegumento seminal. El embrión y endospermo o albumen también forman parte de la cariópside o semilla de arroz.

El embrión de 1,5 a 2,5 mm de longitud está situado en el lado ventral de la cariópside, en una cavidad del endospermo y separado de este tejido por una membrana celular llamada escutelo; está formado por la radícula o raíz embrionaria primaria y por las hojas embrionarias o plúmula, envueltas respectivamente por la coleorriza y el coleóptilo.

El endospermo está delimitado por la capa de aleurona, consiste en células de parénquima que se elongan en forma radial y está compuesto por gránulos de almidón y algunos cuerpos proteicos (Juliano, 1980) (Juliano, 1985), que proveen alimento al embrión durante la germinación.

Los granos de arroz pueden clasificarse según su longitud en (González & Rosero, 1981):

Extralargo (EL) 7,6 mm o más

Largo (L) 7,5 mm a 6,6 mm

Medio (M) 6,5 mm a 5,6 mm

Corto (C) 5,5 mm o menos

2.1.2. Descripción del proceso de pilado del arroz

A continuación en la Figura 2.3 se presenta un diagrama de flujo de la tecnología del proceso industrial al que es sometido el arroz después de haber sido secado, madurado (almacenamiento 30-60 días) y alcanzando las condiciones necesarias. La determinación de la idoneidad del grano para ser pilado se comprueba mediante la cocción del arroz, si resulta pegajoso, es necesario que siga en la etapa de maduración.

A través de este proceso conocido como pilado se transforma el arroz paddy en un arroz blanco apto para el consumo humano. En este diagrama se muestra también

que además del grano entero de arroz se obtiene varios subproductos como el tamo o cascarilla, arrocillo y el salvado o polvillo de arroz; todos ellos de bajo valor comercial por su escasa funcionalidad, pero que presentan en su mayoría, especialmente el salvado, un contenido más elevado de proteínas en comparación con el arroz blanco como se indica en la Tabla 1. La eficacia del proceso está determinada por la cantidad de arroz blanco obtenido en el pilado.

TABLA 1. CONTENIDO APROXIMADO DE PROTEÍNA DEL ARROZ CON CÁSCARA Y SUS FRACCIONES DE MOLIENDA

Fracciones de arroz	**Proteína Bruta (g *N* x 5.95)**
Arroz con cascara	5.6 - 7.7
Arroz integral	7.1 - 8.3
Arroz blanco	6.3 - 7.1
Salvado de arroz	11.3 - 14.9
Cascara de arroz	2.0 - 2.8

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

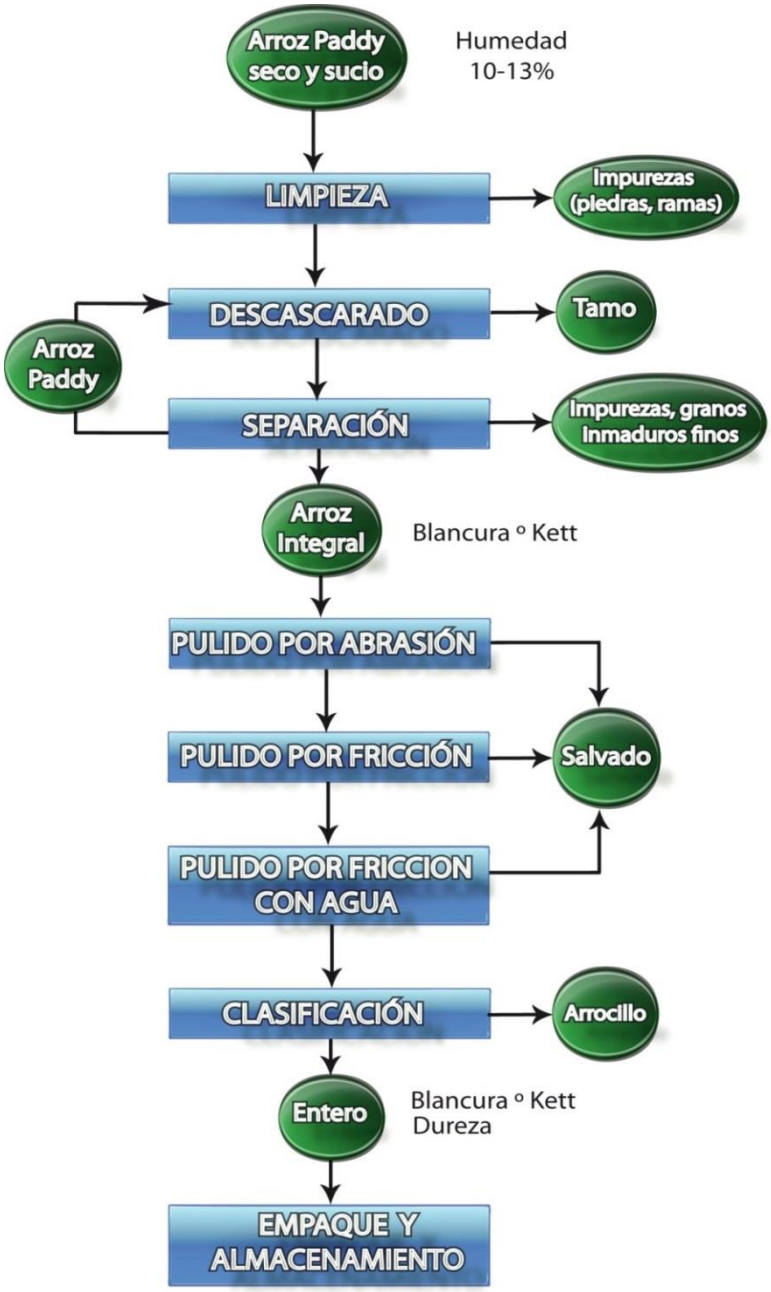


FIGURA 2.3. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO INDUSTRIAL DE PILADO DEL ARROZ

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

A continuación se describe brevemente cada etapa del proceso del pilado descrito en el diagrama de flujo:

Limpieza: El arroz viene del campo con impurezas como piedras, ramas, pajas, entre otros objetos extraños; por ello se pasa el arroz por un tamiz vibratorio con un diámetro de apertura de 1,27 cm para obtener un arroz limpio y listo para poder entrar a la descascaradora.

Descascarado: Durante esta operación se elimina la cáscara que cubre al grano de arroz para producir arroz integral, mediante la fricción que ejercen los rodillos de caucho sobre el grano al girar en direcciones opuestas con diferentes velocidades en la superficie; separando así la cáscara también conocida como tamo, luego ésta es aspirada y llevada por medio de tuberías fuera de la planta donde será recogida, mientras que el arroz integral pasa a la siguiente etapa. Según la FAO, las cáscaras no tienen ningún valor nutricional, pero pueden utilizarse como combustible, tal vez en la operación de secado del

arroz, y las cenizas como fuente de carbón puro para la producción de acero.

Separación: No todo el arroz que se obtuvo en el proceso anterior es integral, existe un porcentaje de arroz que la máquina no logra descascarillar, y es por ello que se lo pasa por una:

- *Mesa separadora de paddy:* separa con base en las diferencias de densidad el arroz sin cáscara del arroz paddy (con cáscara); este último es regresado al descascaradora y el arroz integral es llevado hacia los pulidores por medio de elevadores de balde.
- *Zarandas cilíndricas***:** Antes de proseguir a la etapa de pulido se debe rectificar el arroz integral, para separar piedras, ramas.
- *Máquina Separadora por grosor:* Clasifica por grosor, separando lo granos inmaduros finos.

Pulido: En esta etapa del proceso se remueve la mayor parte de las capas que recubren el arroz integral, que corresponden al salvado y al germen, y así obtener el

arroz blanco. En este diagrama se presenta una combinación de máquinas que realizan el pulido por Abrasión-Fricción-Pulido de agua, sin embargo muchas piladoras de la región en especial las semi-artesanales utilizan un pulido solo por abrasión. El método de pulido triple ofrece la ventaja de obtener un arroz más traslúcido y menos quebrado que un sistema de Abrasión-Abrasión-Fricción. Al final se obtiene como subproductos de esta etapa cierta cantidad de granos partidos (medianos y quebrados) y el salvado, eliminándose así gran parte de proteínas, fibra, vitaminas y minerales presentes en estos ‘‘desechos’’.

Clasificación: Aquí el objetivo es separar los granos enteros de los partidos, puesto que estos últimos presentan un rápido deterioro, obteniéndose como subproductos el arrocillo ($^{3}/_{4}$) y yelén ($^{1}/_{2}$).

- *Zaranda clasificadora:* El grano que ha sido pulido se lo separa de los granos quebrados; los granos finos y medianos resultantes pasan a la siguiente clasificación.

- *Cilindro clasificador:* Clasifica arroz blanco por longitud separando el grano partido del entero, se usa para dar el porcentaje de arroz partido que se requiera. Internamente tiene unas cavidades en formas de bolsa, donde los granos quebrados se asientan y por la fuerza centrífuga son retenidos ahí hasta que la gravedad de los granos sobrepase la fuerza centrífuga y los deje caer. Los granos mayores que no pueden asentarse en las cavidades, corren por las hendiduras de salida del revestimiento hacia la compresa de salida.
- *Clasificación electrónica:* Esta máquina clasifica el arroz por color utilizando un sensor de imagen CCD y lentes de alta precisión para tomar imágenes, adopta un algoritmo inteligente basado en el color y tamaño, separando así al arroz de segunda categoría que comprende arroz manchado y de longitud indeseada.

Empaque y Almacenamiento: En esta etapa se empaca el arroz blanco según calidades y presentaciones.

Entre las variedades ecuatorianas de arroz existentes, se puede detallar las siguientes:

INIAP 14: También conocida como Filipino, fue introducida en 1993 desde el PHIL RICE de Filipinas por FENARROZ (Feria Nacional del Arroz en Brasil). Fue implantada con el nombre clave PSBRC12. En Filipinas fue entregada como la variedad CALIRAYA. En nuestro país ha sido evaluada bajo condiciones de lluvia en la Estación Experimental Tropical Pichilingue (Quevedo), el Vergel (Valencia), provincia de los Ríos; y bajo riego en Daule y Samborondón, Provincia del Guayas. INIAP 14-FILIPINO presenta un tamaño de grano largo, resistencia al acame, resistencia a piricularia, moderada resistencia al virus de la hoja y precocidad con un ciclo vegetativo que va de 115 a 127 días en siembra de trasplante y 110 a 117 días en siembra directa.

INIAP 15: Conocida como Boliche, la cual fue desarrollada por el Programa Nacional de Arroz del INIAP desde el año 2000 por medio de hibridaciones.

Luego de ser evaluada con segregante hasta el 2003, se valoró en ensayos de rendimiento hasta el 2006 en las zonas de Boliche, Taura, Daule, Santa Lucia y Samborondón bajo condiciones de riego.

Es una variedad de arroz de alto rendimiento y calidad de grano superior para condiciones de riego; fue evaluada en condiciones de campo en las principales zonas arroceras presentando resistencia a quemazón. Además, presenta un tamaño de grano extra largo, una buena calidad culinaria, amplio rango de adaptación, resistencia al acame, resistencia a piricularia, moderada resistencia al virus de la hoja blanca y precocidad con un ciclo vegetativo que va de 117 a 128 días en siembra de trasplante.

INIAP 17: Fue obtenida por el Programa Nacional de Arroz del INIAP, durante el periodo comprendido entre los años 2001 y 2009. Proviene del cruce de las líneas IN69-M-9-1/IN19-3-M-M-M-2-M, realizadas en la estación del Litoral Sur y su pedigree es IN198-m-2-1 (INIAP

2010). Evaluada como segregante hasta el 2004 y líneas homocigóticas hasta el 2006, posteriormente en ensayos de rendimiento y ensayos regionales en los cantones Yaguachi, Santa Lucia y Samborondón (Guayas), y Rocafuerte (Manabí), entre las que sobresalió la línea Go-37763 (INIAP 17) por sus excelentes características.

INIAP 17 es un grano extra largo, con un ciclo vegetativo de 117 a 140 días, tolerante al acame y piricularia, moderada resistencia al virus de la hoja blanca.

2.1.3. Valor nutricional

Las concentraciones más altas de nutrientes del SA son las de grasa y proteínas, además de otros nutrientes. Según las condiciones de procesado, el SA comercial contiene 11,5-17,2% de proteína, 12,8-29,6% de grasa, 6,2-31,5% de fibra (de la cual el 1,9-2,5% es fibra alimentaria soluble) y 8,0-17,7% de cenizas. El contenido de almidón del salvado oscila entre el 10 y el 55%, dependiendo del grado de extracción. Uno de los principales minerales es el fósforo, principalmente en forma de fitatos; también hay grandes cantidades de

potasio, magnesio, silicio y cantidades menores de sodio y calcio. Tiene abundantes vitaminas del grupo B, y además es una fuente valiosa de antioxidantes naturales, como tocoferoles, tocotrienoles y orizanoles.

Estudios realizados en seres humanos y animales con hipercolesterolemia indicaron que el consumo de SA disminuye el colesterol. Las reducciones se producen en la fracción LDL (aterogénica). Las fracciones del SA que presentan actividad hipocolesterolemiante son el aceite, la materia insaponificable y la proteína. Las hemicelulosas solubles también pueden contribuir a la reducción de los niveles de colesterol por fijación de ácidos biliares; la capacidad de fijación depende de los cultivos, de las variedades o de la climatología.

2.2. Proteína del salvado de arroz

El SA es considerado como una buena fuente de proteínas hipoalergénicas, y como tal, la proteína de SA puede servir como un ingrediente adecuado para formulaciones de alimentos

infantiles (Burks & Helm, 1994), lo que añade variedad a las dietas de niños con alergias a alimentos.

La proteína del SA se la extrae fácilmente por tratamiento alcalino de tipo industrial y por su alta calidad puede ser utilizada en la industria de procesamiento de alimentos (Kumagai, y otros, 2006).

Entre las dificultades para la extracción de las proteínas del SA se encuentra su insolubilidad en agua, algunos investigadores han llegado a la conclusión de que esto se debe a que se encuentran fuertemente unidas por enlaces disulfuro que forman complejos de alto peso molecular (Hamada, 1999). Las proteínas del SA tienden a unirse con otros componentes del salvado como el fitato y la fibra, los cuales presentan un alto contenido de 1,76% y de 12% respectivamente (Juliano, 1985), lo cual hace muy difícil la separación de la proteína de otros componentes. Por otro lado, el SA tiende a un rápido deterioro al enranciarse por la acción de la lipasa sobre los lípidos presentes en el mismo, siendo necesario que sea estabilizado ya sea por calor o tratamiento con ácido para desactivar la lipasa o sometiéndolo a un desgrasado para eliminar los lípidos.

Sin embargo, estos tratamientos pueden causar una desnaturalización o agregación de la proteína que reduce la solubilidad de la misma.

2.2.1. Calidad proteica

La función fundamental de la proteína en la dieta es la de proporcionar aminoácidos esenciales y nitrógeno aminoacídico para la síntesis de las proteínas y otras sustancias nitrogenadas que intervienen en la composición corporal (Cheftel, Cuq, & Lorient, 1993).

La proteína del SA es de buena calidad nutritiva para alimentación humana por su composición aminoacídica al tener según la FAO un contenido abundante de ácido glutámico y aspártico; y aunque la lisina es el aminoácido limitante, se encuentra en mayor proporción que en la proteína del endospermo del arroz y que en cualquier proteína del salvado de otros cereales (Juliano, 1985). Se ha encontrado en salvado una cantidad de lisina/100g de proteína entre 3,99 y 5,3g (Wang, Hettiarachchy, M., Burks, & Siebenmorgen, 1999).

El coeficiente de eficacia proteica ha sido ampliamente utilizado como un indicador de la calidad nutricional de la proteína, y en el SA es de 1,6 a 1,9, sin embargo al extraer la proteína, y gracias a la eliminación de componentes como la fibra y el ácido fítico éste valor podría oscilar entre 2,0-2,5 y su digestibilidad también aumentaría a un 90%.

Las prolaminas poseen altos contenidos de glutamina, histidina, cisteína y metionina (Mandac & Juliano, 1978) (Padhye & Salunkhe, 1979) (Shyur, Wen, & Chen, 1994). Esta fracción es rica en leucina, tirosina, fenilalanina pero es la que presenta menor contenido de arginina y glicina (Juliano, 1980). Se diferencian de las prolaminas de maíz, trigo, cebada y centeno, ya que no presentan secuencias repetitivas ricas en prolina. La fracción globulinas es rica en aminoácidos azufrados cisteína y metionina (Juliano, 1985). Los aminoácidos más abundantes en fracción glutelinas son ácido glutámico/glutamina, ácido aspártico/asparagina, arginina, glicina, alanina y treonina (Wen & Luthe, 1985) (Juliano, 1985). Esta composición influye en gran medida

sobre su solubilidad, donde los grupos aminos en las cadenas de glutamina y asparagina juegan un importante rol promoviendo la asociación de las moléculas de glutelinas mediante puentes hidrógeno (Anderson & Guraya, 2001). No obstante las subunidades tienen diferente composición aminoacídica, la subunidad básica tiene más leucina, tirosina, ácido aspártico y menos glutámico que la subunidad ácida (Villareal & Juliano, 1978).

Estudios realizados sugieren que la proteína producida mediante extracción alcalina presenta mayor digestibilidad que la de la harina (Kumagai, y otros, 2006) y que la obtenida por degradación del almidón (Morita & Kiryama, 1993) (Kumagai, y otros, 2006). (Morita & Kiryama, 1993) han encontrado que dietas con un 40-50% de aislado proteico de harina de arroz tiene digestibilidad similar a formulaciones con un 25% de caseína.

La digestibilidad varía según las fracciones proteicas, estudios realizados por (Steemson & Sathe, 1995)

indican que las prolaminas son más resistentes a la digestión enzimática in vitro que las albúminas y globulinas.

2.2.2. Métodos de extracción de proteína

Los métodos más usados en la extracción y solubilización de proteínas para el control del proceso y caracterización de los extractos obtenidos son:

Extracción ácida:

Al degradar a la proteína rompe las cadenas polipeptídicas en desorden generando un bajo grado de hidrólisis. Este tipo de extracción realiza su acción en menor tiempo, y se fundamenta en la ebullición prolongada de la proteína con soluciones ácidas fuertes (HCl y H2SO4). Los análisis de estos extractos muestran que tienen una cantidad elevada de nitrógeno amínico comparado con los demás; y tiene un alto contenido de sales. Este método destruye completamente el triptófano, provoca una pérdida severa de cistina y pérdida leve de

la serina y la treonina, así como la conversión en sus formas ácidas de la glutamina y asparagina (Bridson E. , 1998) (Bridson & Brecker, 1970).

Extracción básica / alcalina:

Si bien es cierto que las condiciones alcalinas son efectivas en la extracción y solubilización de las proteínas del SA también presentan deficiencias. Los contenidos de proteína alcanzados a ph 9,5 por 30 minutos en SA sin estabilizar y estabilizado fueron de 71,5% y 50,9%, respectivamente (Gnanasambandam & Hettuarachchy, 1995). Los aminoácidos cisteína y arginina se destruyen pero a la vez con gran facilidad, forman racematos. Al hidrolizar las proteínas con un álcali concentrado se obtiene una mezcla racémica de aminoácidos (conversiones de enantiómeros D y L). De su configuración depende el sabor proporcionado de los aminoácidos, de tal forma que los D-aminoácidos proporcionan un sabor especifico ligeramente amargo mientras que los L-aminoácidos proporcionan un sabor dulce; y las mezclas racémicas no poseen sabor (Kirk &

Othmer, 1963). Normalmente en este método se utiliza NaOH o BaOH.

Extracción enzimática:

En este método se someten proteínas a la acción de enzimas específicas, capaces de reconocer el enlace peptídico y separar los aminoácidos sin destruirlos. Se obtienen L-alfa-aminoácidos, aminoácidos 100% levógiros.

Extracción física:

Es más deseable que otros métodos en el procesamiento de alimentos, debido a que normalmente inducen alteraciones menos no naturales en los alimentos y causan menos problemas de salud, pero son costosos. (Anderson & Guraya, 2001) utilizaron alta velocidad de molienda de alto cizallamiento antes de la extracción con agua en el procesamiento de SA y en la separación de las proteínas del arroz. Por SA sin desgrasar, el contenido de proteína del sobrenadante aumentó desde

21,8 hasta 33,0% después de la molienda coloidal de alto cizallamiento de alta velocidad, y de 38,2% con un tratamiento de homogeneización adicional. Por salvado de arroz desengrasado, los valores fueron mucho más bajos después de los tratamientos similares, el aumento de 13,9 a 14,7% y a18.7%, respectivamente.

Existen algunas ventajas en cuanto a la extracción enzimática y química (alcalina y ácida):

- Selectividad: Las enzimas son muy específicas para un tipo de enlace, por lo que no hay productos de degradación en los resultados, sin embargo en la extracción alcalina y ácida se presenta poca selectividad y al ser más difícil de controlar se forman productos de degradación que pueden llegar a ser tóxicas.
- Parámetros controlados de temperatura y pH: La extracción enzimática ocurre generalmente en un rango de 40ºC a 60 ºC y en pH de 4 a 8.
- Sustancias extrañas: Solo se añaden en la extracción química por lo que es necesario la

neutralización posterior en la cual aumenta el contenido de sales, mientras que en la enzimática no se añade ninguna sustancia.

- Valor nutritivo: En la extracción enzimática se mantiene por lo que no se produce compuestos de degradación, mientras que en la extracción ácida se elimina triptófano lo que desamina los aminoácidos serina y treonina; por otro lado, la extracción alcalina destruye los aminoácidos arginina y cisteína y con los altas condiciones de pH que se manejan en este método se podría desarrollar modificaciones indeseables en las proteínas como el entrecruzamiento de las moléculas y rearreglos que resultan en la formación de compuestos tóxicos como lisinoalanina (Cheftel, Cuq, & Lorient, 1993) (Otterbum, 1989), reduciendo así las propiedades funcionales y calidad nutricional de las proteínas en su posible uso en alimentos. Sin embargo en la extracción enzimática de proteínas es necesario desnaturalizar la enzima y trabajar en condiciones

asépticas evitando una contaminación microbiana de la mezcla a trabajar.

2.3. Hidrólisis enzimática

Por lo general, la hidrólisis proteica se realiza en un reactor, con control de agitación, pH, temperatura y tiempo del proceso. El sustrato se suspende en agua hasta que el pH y la temperatura se estabilizan; en seguida se agrega la proteasa dando apertura a la hidrólisis. A medida que ésta avanza se produce disminución del pH debido a la rotura de los enlaces peptídicos; para hidrólisis enzimática el pH debe de mantenerse en el óptimo de la enzima por medio de una base diluida. Para finalizar la hidrólisis proteica, la enzima puede ser inactivada por disminución de pH, con calor o combinación de ambos, o puede ser retirada del medio mediante filtración y la proteína se puede precipitar.

Para la elección de una fuente proteínica adecuada debe tenerse en cuenta el uso que vaya a tener el hidrolizado, así como el valor agregado del producto final con respecto al sustrato inicial (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008).

2.3.1. Enzimas

Las enzimas son biocatalizadores de naturaleza proteica de las reacciones biológicas específicas, siendo muy eficaces en pequeñas cantidades, por lo que se caracterizan por acelerar la velocidad de reacción sin afectar su equilibrio. No se alteran durante las reacciones en las que participa, reducen la energía de activación de las mismas y lo más importante es que muestran especificidad de acción.

En cuanto a la estructura de las enzimas, presentan las mismas características al igual que las proteínas, teniendo las cuatro estructuras; se ha podido comprobar que las enzimas pierden su actividad catalítica cuando sufren de desnaturalización por efecto de los mismos agentes que afectan a las demás proteínas.

Las enzimas actúan mejor a una Temperatura en un rango de 25-50°C, aunque también mantienen una buena actividad a temperaturas de refrigeración y congelación.

Los primeros experimentos dieron como evidencia de que la enzima (E) se une a un substrato (S) y forma el complejo enzima-substrato (ES) (Figura 2.5). El sustrato se une a la enzima por medio de enlaces de interacción débiles como: puentes de hidrógeno, electrostática, hidrófobas, etc., en un lugar específico que es el sitio o centro activo (Figura 2.4).

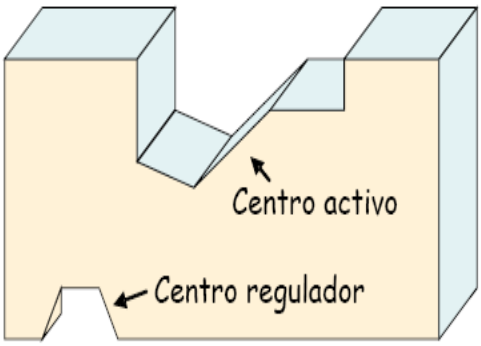


FIGURA 2.4. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA DE UNA ENZIMA

Los complejos ES se forman cuando los ligandos se fijan covalentemente en los sitios activos de la hendidura del sitio activo, y es aquí donde el sustrato reacciona con el catalizador proteínico para formar el producto (P) de la reacción.

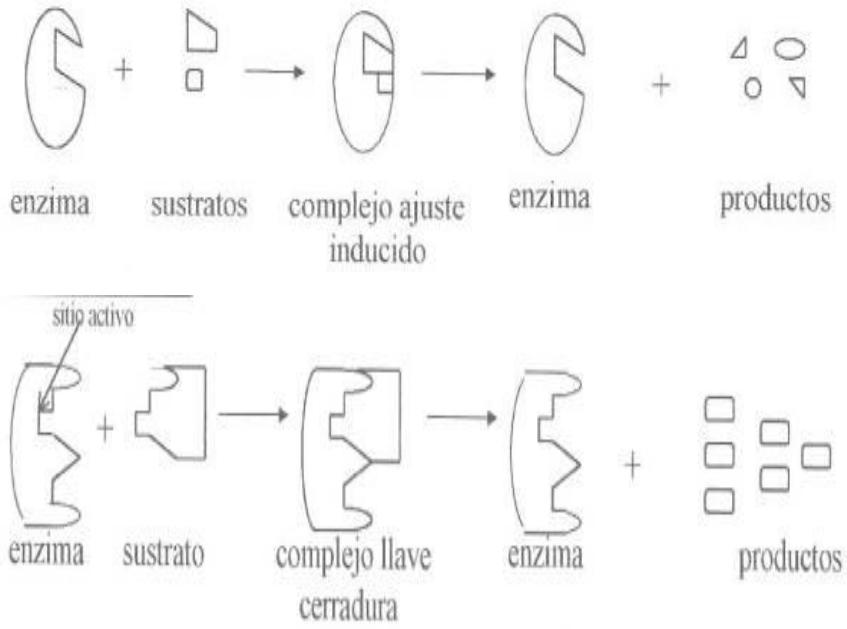


FIGURA 2.5. FORMACIÓN DE COMPLEJO ENZIMA-SUSTRATO (ES)

2.3.1.1. Tipos

Las enzimas proteolíticas o proteasas hidrolizan los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y selectividad. En un proceso de hidrólisis se utilizará la enzima más adecuada de acuerdo a la necesidad de la transformación requerida (Badui, 1994).

En el procesamiento de alimentos, se utilizan diferentes preparaciones de proteasas, las mismas que se detallan en el Anexo A.

Existen muchas proteasas de grado alimenticio disponibles comercialmente, se pueden clasificarse según:

- Su origen: animal, vegetal, bacteriano o fúngico
- Su modo de acción catalítica: existen dos tipos de proteasas: las endoproteasas y las exoproteasas. Las endoproteasas son aquellas proteasas que hidrolizan enlaces amídicos en el interior de las cadenas peptídicas; y las exoproteasas son aquellas proteasas que eliminan o liberan un aminoácido a la vez, de la parte terminal N (aminopeptidasa) o terminal C (carboxipeptidasa) (Adler-Nissen, Proteases, 1993).

- La naturaleza del centro catalítico: de las proteasas depende de los aminoácidos y otros ligandos que actúan en la formación del complejo de enzima sustrato. Según intervengan los aminoácidos de serina, cisteína o ácido aspártico como una parte esencial en el centro activo, se denominaran: serinproteasas, cisteinproteasas, aspartatoproteasas respectivamente. Estos grupos de enzimas son endoproteasas y alguna modificación o bloqueo de ese punto en la cadena produce una completa inactivación de la enzima. Cada una de estas enzimas tiene condiciones óptimas de acción: las cisteinaproteasas tienen una actividad máxima a pH neutro, las serinaproteasas a pH alcalino y las aspartatoproteasas a pH ácido. Esta especificidad la podemos encontrar en el organismo humano, por ejemplo, las enzimas proteolíticas digestivas presentan su máxima actividad

de acuerdo con el pH del tracto digestivo (Adler-Nissen, 1993).

En el caso de que sea un ion metal se denomina metalo-proteasas, son exoproteasas (Whitaker, 1994).

Las exopeptidasas pueden ser: aminopeptidasas, caboxipeptidasas o dipeptidasas. Por su parte, las carboxipeptidasas se dividen de acuerdo a la naturaleza del sitio catalítico en serinacarboxipeptidasa, metalocarboxipeptidasa y cisteinacarboxipeptidasa.

Algunas de las endoproteasas importantes que tienen aplicación industrial se pueden observar en el Anexo B.

Las endopeptidasas son las proteasas más utilizadas en la industria alimentaria debido a la hidrólisis extensiva que producen, aunque en

ocasiones su acción se complementa con exopeptidasas con el fin de eliminar aminoácidos hidrofóbicos de los extremos N y C, que producen el sabor amargo en los hidrolizados proteicos (Adler-Nissen, 1993) (Noboru & Tokuyasu, 1997)

Xilanasa fúngica: son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos ß-1,4 presentes en los polisacáridos de hemicelulosa. Son producidas por una gran variedad de microorganismos, de aquí que tenga dos orígenes bacteriana y fúngica.

Las xilanasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de xilanos que forman parte de las hemicelulosas presentes en las fibras celulósicas. Estas hemicelulosas se encuentran, en cierta forma, en una situación intermedia entre las cadenas ordenadas de celulosa y la fracción amorfa de lignina. El efecto positivo de la xilanasa se atribuye a la eliminación de estos

xilanos (de la Rosa, 2003) (Roncero, Colom, & Vidal, 2003), haciendo que desaparezca la unión existente entre celulosa lignina, por lo que al encontrarse más libre ésta última facilita su eliminación en posteriores etapas de blanqueo.

Las xilanasas actúan sobre los polisacáridos, como los arabinoxilanos, los cuales están presentes principalmente en los cereales.

Los carbohidratos los encontramos en la mayoría de las materias primas vegetales. Entre la parte digestible tenemos el azúcar y el almidón, y la fracción de carbohidratos de origen vegetal contiene compuestos indigestibles los cuales son: celulosa, hemicelulosa, pectina, betaglucanos, lignina. Estos compuestos pocos digestibles, menos la lignina, forma parte de los Polisacáridos no almidonosos, PNA (Figura 2.6).

FIGURA 2.6. ESTRUCTURA DE LOS CARBOHIDRATOS

Los arabiloxilanos, AX, se encuentran en la pared celular de las plantas dándole soporte en su estructura. Los mismos tienen una desventaja por lo que abundan, por su ubicación dentro del material vegetal y su estructura molecular, lo cual reduce el valor nutricional de la materia prima haciendo efecto en la digestibilidad.

Los AX se dividen en solubles e insolubles en agua (VER ANEXO C). Los AX solubles en agua tienen una alta capacidad para retener agua lo que estimula un aumento de la viscosidad del contenido intestinal afectando la absorción e incluso la consistencia de las heces, formando un efecto anti-nutricional. Al mismo tiempo, el aumento de la viscosidad tiene sus efectos, entre los cuales: no permite una homogenización de los alimentos con las enzimas y las sales biliares, provoca la fermentación en el intestino grueso y disminuye la reserva de nutrientes y la absorción. Por lo tanto la microflora intestinal fermenta los PNA estimulando gases y ácidos grasos volátiles en el tracto intestinal del animal provocando alteraciones digestivas y un desperdicio de esos azucares como energía.

Mientras que los AX insolubles en agua producen un encapsulamiento de los nutrientes digestibles como el almidón y la proteína, permanezcan atrapados ya sea en grupos de material de la

pared celular o ligados a las cadenas laterales de los AX. Dichos nutrientes atrapados no podrán ser digeridos ni absorbidos posteriormente en el intestino delgado de tal forma que se van a eliminar por las heces dando como resultado una pérdida de nutrientes como un efecto anti-nutricional (Figura 2.7).

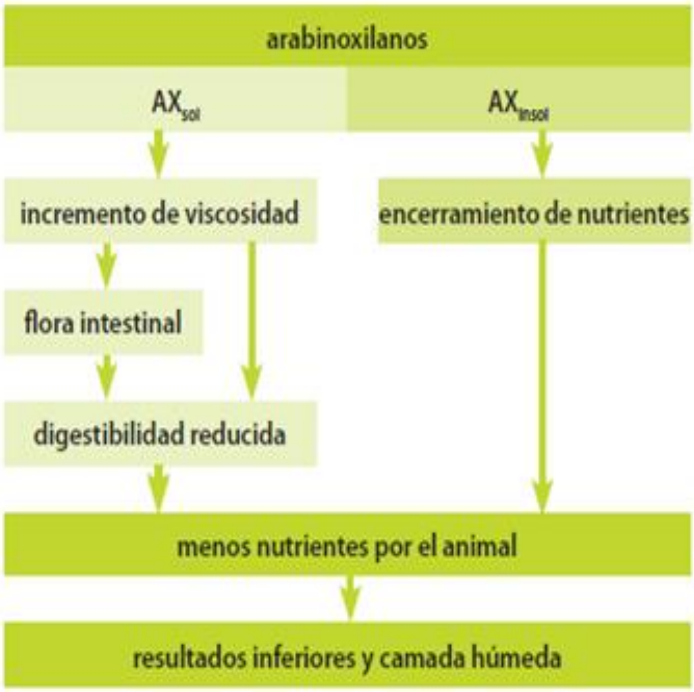


FIGURA 2.7. EFECTOS ANTINUTRICIONALES DE LOS AX

Las xilanasas son producidas por una gran variedad de microorganismos entre los que se encuentran hongos y bacterias. Las xilanasas fúngicas tienen mayor actividad a pH ácidos, mientras que las bacterianas trabajan mejor en medios alcalinos.

Las xilanasas pertenecen al grupo de las enzimas hidrolíticas que se encargan de la hidrólisis de los enlaces glicosídicos B 1,4 presentes en la hemicelulosa.

2.3.1.2. Mecanismo de hidrólisis

La hidrólisis enzimática de proteínas da lugar a las siguientes especies intermedias:

Proteínas → proteosas → peptonas → péptidos → aminoácidos

TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPECIES PRODUCIDAS EN LA HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS

Especie	MW	AN/TN
Proteínas	>20000	< 0.01
Proteosas	5000 – 10000	< 0.01
Pentosas	1000 – 6000	0.1 – 0.5
Péptidos	200 – 500	0-5 – 0.8
Aminoácidos	75 – 200	0.8 – 0.9

La diferencia entre éstas especies intermediarias es la solubilidad, que corresponde a los tamaños moleculares medios y con la relación nitrógeno amino/nitrógeno total (Tabla 2) (Knights, 1985).

La reacción de la hidrólisis consiste en la ruptura del enlace existente entre los aminoácidos que componen la cadena peptídica, proceso que cataliza las proteasas, consumiéndose una

molécula de agua por cada enlace roto (Figura 2.8) (Adler-Nissen, 1993).

$$E + S \underset{\text{k1}}{\leftrightarrow} ES \underset{k2}{\rightarrow} EP + H - P'$$

$$\overset{H2O}{\longrightarrow} E + P - OH + H - P'$$

E: enzima, S: sustrato, P,P': péptidos resultantes, k: constantes de velocidad de reacción

FIGURA 2.8. MECANISMO CATALÍTICO DE UNA PROTEASA

Primero se da la formación del complejo enzima sustrato, luego la proteasa actúa sobre el enlace peptídico rompiéndolo dando la liberación del grupo amino y grupo carboxilo, finalmente el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua:

$$\mathrm{P - CO - NH - P + H2O \rightarrow P - COOH + P - NH2}$$

Los grupos aminos y carboxilos formados tras la hidrólisis pueden estar parcialmente ionizados, dependiendo del pH del proceso de hidrólisis:

$$P - COOH \leftrightarrow P - COO^- + H^+$$

$$P - NH_3^+ \leftrightarrow P - NH_2 + H^+$$

Este proceso puede volver a darse sobre los dos nuevos péptidos o sobre uno de ellos.

Durante el proceso de reacción proteolítica, el Ph cambiará, excepto en la región de 5.0 – 6.0 donde la captura y liberación de protones está en equilibrio. A pH menor a 3.1 – 3.6 el grupo carboxílico estará más del 50% disociado y el grupo amino completamente protonado; presentándose una captura de 0.5 a 1.0 equivalentes de H^+ por cada equivalente de enlaces peptídicos rotos, incrementando el pH si

éste no es controlado. Si el pH es superior a 7.5 – 7.8, el grupo amino estará menos del 50% protonado y el carboxílico completamente disociado, liberándose de 0.5 a 1.0 de H^+, disminuyendo en consecuencia el pH si éste no es controlado. De modo que, si se quiere realizar una hidrólisis a pH constante, deberá adicionarse ácido o base para titular los grupos carboxilo o amino liberados.

Durante las condiciones comunes de la hidrólisis de proteínas alimentarias, la saturación de sustrato prevalece durante todo el curso de la reacción; los péptidos resultantes del primer ataque de la proteasa sobre la molécula de proteína actúan posteriormente como sustrato para siguientes degradaciones a péptidos más pequeños. Este proceso da como resultado una competencia de sustratos entre la proteína original y los péptidos formados (Adler-Nissen, Enzymic hydrolysis of food proteins, 1986).

El grado de hidrólisis máximo que se puede obtener depende de la proteína y la especificidad de la enzima, además, el tiempo de reacción para obtener cierto grado de hidrólisis puede reducirse aumentando la concentración de la enzima.

2.4. Hidrolizados proteicos del salvado de arroz

La proteína del SA se la ha estado usando en la leche hipoalergénica para reemplazarlo en las formulaciones de infantes. En la industria alimentaria se usa ampliamente los hidrolizados de proteínas, usualmente como fuente de nitrógeno al incorporarlos en la fórmula de nutrición enteral en personas que no pueden satisfacer sus requerimientos nutricionales con la dieta oral normal o habitual. Para que un hidrolizado pueda entrar en una dieta enteral debe de ser hipoalergénico, dar un aporte total o parcial de nutrientes, tener un valor nutritivo alto comparado con el nivel de proteína de partida, tener un sabor agradable, ser osmóticamente equilibrado. (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008)

El uso de los hidrolizados proteicos dependerá de la enzima proteasa utilizada, de la fuente proteica, de las condiciones de hidrólisis y del grado de hidrólisis que haya alcanzado en la reacción.

2.4.1. Propiedades funcionales y nutricionales

El salvado de arroz tiene propiedades benéficas para la salud, puesto que se utiliza para tratar la acidez del estómago, el estreñimiento, para controlar la cantidad de azúcar y los niveles de grasa. El SA cuenta con un alto contenido de vitamina B, minerales, proteínas, hidratos de carbono y grasas naturales bajos en colesterol que surgen a partir del pericarpio que recubren al grano de arroz; considerándose a este cereal como un alimento funcional, teniendo propiedades hipoalergénicas y anticancerígenas, la calidad nutricional de sus proteínas es superior a la del maíz y el trigo pero inferior a la de la avena.

Con respecto a las propiedades funcionales, estas depende de la forma de la proteína, de su tamaño molecular, la composición aminoacídica, la secuencia,

carga y distribución de la misma, estructura secundaria, ordenamiento terciario y cuaternario de los segmentos peptídicos, relación hidrofobicidad/hidrofilicidad y relación rigidez/flexibilidad en respuesta a las condiciones externas. Pero estas mismas propiedades pueden ser alteradas por distintas circunstancias como las condiciones del proceso, métodos de aislamiento, factores ambientales, concentración de la proteína, interacción con otros componentes, entre otros.

En sí, las propiedades funcionales pueden clasificarse de acuerdo a la interacción que influya en el proceso (Cheftel, Cuq, & Lorient, 1989) (Bourgeois & Le Roux, 1986):

- Propiedades dependientes de la interacción agua-proteína (solubilidad, hidratación, capacidad de retención de agua, capacidad de imbibición de agua)
- Propiedades dependientes de la interacción proteínas-lípidos
- Propiedades dependientes de la interacción proteínas-lípidos

- Propiedades dependientes de la interacción proteína-proteína (gelificación, texturización: formación de películas por coagulación térmica, formación de fibras)
- Propiedades superficiales (habilidad para formar espumas y emulsiones)

Las propiedades de hidratación que intervienen en la formulación, procesamiento y almacenamiento de alimentos está determinado por la interacción proteína-agua que ocurre a través de los grupos polares y no polares presentes en la estructura de las proteínas, los grupos polares interactúan con el agua por medio de enlaces dipolo-dipolo, puentes de hidrogeno e interacción con grupos ionizados. Cuando la interacción es con grupos ionizados, la polaridad es afectada por las condiciones de pH. Es decir que cuando el pH esta cerca del punto isoeléctrico, la retención de agua es mínima pero crece cuando el pH disminuye o aumenta. Mientras que los grupos no polares lo realiza a través de hidratación hidrofóbica.

Para que una proteína sea soluble, debe interaccionar tanto pueda con el disolvente a través de los enlaces mencionados anteriormente. Pero existen factores que influyen con la solubilidad, como: el pH, la fuerza iónica y temperatura.

A pH mayores o menores al punto isoeléctrico hay solubilización, por lo que la proteína arrastra la carga positiva o negativa que tenga y las moléculas de agua interactúan con éstas. A pH alejados del punto isoeléctrico, existe una precipitación de la proteína porque las cargas son muy bajas como para que exista interacción con las cadenas polipeptídicas y no se forman agregados. La fuerza iónica influye de manera en que si la concentración salina es mayor, hay una solubilización menor y por ende puede existir una precipitación de la proteína. Con respecto a la temperatura, la solubilidad de las proteínas aumenta con la Tº.

La capacidad de retención de agua es la capacidad que un alimento tiene para retener agua en su matriz proteica cuando es sometida a fuerzas externas como: presión osmótica, presión, centrifugación, vacio. Esta propiedad depende de las interacciones/uniones y parámetros descritos anteriormente; y está vinculada directamente con la solubilidad.

Las propiedades superficiales requieren un grado de hidratación y solubilización de proteína elevado. Las espumas o emulsiones son una dispersión de una fase de burbujas de gas o gotas en una fase liquida o semilíquida, ambas fases no miscibles. Las proteínas actúan como agentes tensioactivos formando una barrera protectora conteniendo las burbujas o gotas, de manera que absorben a las interfases, reducen la tensión interfasial y forman un film cohesivo.

Las propiedades dependientes de la interacción proteína-lípido se refiere a la capacidad que tiene ciertos ingredientes proteicos deshidratados para adsorber una

cantidad de aceite y poder retenerla, como la mayonesa, embutidos, aderezos. Este tipo de interacciones se realiza a través de enlace hidrofóbico entre las cadenas alifáticas apolares de los lípidos y regiones polares de las proteínas. Esta propiedad está relacionado con la solubilidad de la proteína, es decir que las proteínas solubles son las que mayor cantidad de aceite precisan y aún más cuanto más hidrófobas sean.

2.4.2. Hidrolizados proteicos comerciales

En el mercado, los primeros concentrados y aislados proteicos que aparecieron fueron los de soya seguidos el de gluten de trigo (Hettiarachchy, Griffin, & Gnanasambandam, 1996) y el de maíz (Lin & Zayas , 1987), siendo los más utilizados como agentes emulsificantes o potenciadores de sabor (Kammoun, Bejar, & Ellouz, 2003) (Li, Zheng, & Kong , 2002)

Se han aprovechado también otras fuentes vegetales como colza (Mahajan & Dua, 1995), garbanzo (Sánchez-Vioque, Clemente, Vioque, Bautista , & Millán, 1999),

girasol (Saeed & Cheryan, 1988), *Phaseolus* (Apostolatos, 1984) y amaranto (Martínez & Añón, 1996).

En los últimos años los procesos de obtención de hidrolizados proteicos y mejora de las proteínas vegetales para la alimentación humana han tenido un gran desarrollo; debido a la disponibilidad de fuentes proteicas vegetales y a la preferencia del consumidor por dietas bajas en proteínas animales sin dejar de ingerir las cantidades necesarias para la síntesis de tejido proteico.

Para que los hidrolizados de proteínas puedan ser aprovechados en la formulación de dietas deben de ser alergénicos, estudios han concluido que los hidrolizados de alto peso molecular causan problemas de alergenicidad. También los hidrolizados debe de presentar un sabor agradable, que por lo general en el proceso de hidrólisis se produce un cierto amargor pero esto depende de la fuente proteínica usada y con la hidrofobicidad de las cadenas laterales, pero en péptidos de peso molecular inferior a 1000 Da, esta propiedad sensorial desaparece.

Las propiedades funcionales de los hidrolizados de proteínas son también aprovechados en las industrias alimentarias como su solubilidad, capacidad gelificante y poder espumante a diferencia de la proteína nativa; con el fin de mejorar la nutrición de tal manera que el uso de estos hidrolizados se puedan incorporar en formulaciones tanto para niños, adultos, para personas que tengan alteraciones específicas en su salud o brindando beneficios a personas con un alto nivel de colesterol o triglicéridos en sangre (Vioque, Sánchez-Vioque, Pedroche, & Yust, 2001)

Las principales características sensoriales y fisicoquímicas que debe tener un hidrolizado proteico son: ausencia de péptidos amargos, presentar un patrón de pesos moleculares acorde a su destino comercial y propiedades funcionales adecuadas que permitan utilizarlo como suplemento proteico (Mahmoud, 1994).

2.5. Análisis Crítico de la Biosíntesis de Proteínas en el arroz

De manera general, las semillas constan de tres grupos de proteínas: las estructurales, las biológicamente activas y las de almacenamiento. Las proteínas de almacenamiento, también llamadas de reserva, son las que influyen mayormente en la calidad nutricional de la semilla por lo que forma parte del 80%. A medida que la semilla va desarrollándose, la velocidad de síntesis de este grupo de proteínas va incrementándose y se va almacenando en grupo proteicos en forma de vesículas. Con el fin del crecimiento del brote y un desarrollo luego de la germinación, estas proteínas son degradadas para proporcionar nitrógeno reducido y carbono.

De acuerdo a la solubilidad de las proteínas del arroz, se clasifican en (Osborne, 1924):

- Globulinas, solubles en soluciones salinas diluidas y neutras
- Albúminas, solubles en agua
- Prolaminas, solubles en alcohol o en mezclas de alcohol-agua
- Glutelinas, solubles en soluciones alcalinas o acidas

El grano de arroz está constituido por un 75-90% de glutelinas formando la fracción mayoritaria de las proteínas de almacenamiento del arroz. Esta fracción determina el valor nutricional de la proteína de arroz convirtiéndola en una de las mejores proteínas vegetales, y en menor proporción por albuminas. Las albuminas poseen pesos moleculares que van desde 8,5 a 95 kDa, con tres polipéptidos principales de 8,5; 11 y 16 kDa (Juliano, 1980). Los mismos que se localizan en la aleurona (Juliano, 1985).

Las globulinas presentan polipéptidos de 25 y 16 kDa localizándose fundamentalmente en las capas externas del pericarpio del grano y en el embrión (Krishnan et al, White, & Pueppke, 1992) (Juliano, 1980) (Sawai & Morita, 1970). Las prolaminas están formados por polipéptidos heterogéneos con pesos moleculares entre 10 y 23 kDa. Las glutelinas se ubican en el endospermo del grano, son insolubles por lo que posee puentes disulfuro que forma agregados de alto peso molecular (Juliano, Rice Chemestry and Technology, 1985)

Las proteínas de los cereales se caracterizan por acumularse en el endospermo en lugar de hacerlo en el embrión como en las leguminosas, por modificaciones en los mecanismos de síntesis, transporte y/o almacenamiento en las semillas.

Las prolaminas son sintetizadas y se acumulan en cuerpos proteicos en el retículo endoplasmático. Las glutelinas son sintetizadas como preproglutelina de 59 kDa en la membrana del RE, posteriormente pasan al Aparato de Golgi formándose en proglutelinas de 57 kDa. Por último son procesadas en subunidades acidas y básicas o alfa y beta con pesos moleculares de 37-39 kDa y 20-22 kDa respectivamente. Son almacenados en cuerpos proteicos o vacuolas y presentan diferentes puntos isoeléctricos. (Yamagata, Sugimoto, Tanaka, & Kasai, 1982) (Qu, Satoh, Ogawa, & Wei, 2001).

En el arroz a diferencia de los demás cereales y leguminosas, las proteínas se acumulan en dos tipos de cuerpos proteicos. Los cuerpos proteicos tipo I se encuentran asociados en el RE rodeados de una membrana con ribosomas y se encuentran compuestos principalmente por prolaminas; mientras que los cuerpos proteicos tipo II se los asocia con el AG, se almacenan

en vacuolas y están constituidos por glutelinas. Ambos tipos de grupos proteicos se encuentran distribuidos a lo largo del endospermo, sin embargo si hay un aumento en el contenido proteico del grano de arroz se incrementa el número de grupos proteicos.

La distribución de las proteínas de reserva en los cuerpos proteicos del endospermo es variable, en el tipo I se encuentran entre 60-65% de estas proteínas, en el tipo II entre 20-25% y los restantes están ubicadas en el citoplasma y serian albuminas y globulinas.

En la primera etapa del desarrollo del grano, etapa de llenado, éste pasa por un estado acuoso que posteriormente tiene un estado de grano lechoso, y sucesivamente el grano va pasando de blando a duro alcanzo su madurez fisiológica. Durante esta primera etapa las proteínas se van acumulando en distinto orden, a los 5 días de la antesis (floración) se van formando las glutelinas en forma de subunidades acidas y básicas, 37-39 y 22-23 kDa respectivamente. Luego de 10 días aparecen las prolaminas, polipéptidos de bajo peso molecular de 10-16 kDa. Los polipéptidos de mayor tamaño de 57-76 kDa empiezan a

aparecer en el desarrollo del carióspe acumulándose en el grupo proteico tipo II con las globulinas.

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Para el desarrollo de esta investigación se trabajó con semillas registradas de 3 variedades de arroz (*Oryza sativa*): INIAP 14, 15 y 17. La Estación Experimental Boliche del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), donó 45 kg de cada variedad, las cuales fueron cosechadas entre los meses de Febrero y Mayo; y almacenadas en cámaras de refrigeración a una temperatura de 14 °C aproximadamente, garantizando un buen acondicionamiento del grano.

3.1.1 Sustrato: Salvado de Arroz

Las variedades de arroz antes mencionadas fueron procesadas en el Laboratorio de Granos y Cereales de la Bolsa de Productos de Guayaquil, una corporación privada que busca proporcionar la innovación de los procesos de comercialización de productos y servicios agropecuarios. Este laboratorio está provisto con equipos modernos que están en la capacidad de determinar resultados garantizados de acuerdo a la Norma INEN (Instituto Ecuatoriano de Normalización), y que simulan el proceso de pilado a nivel industrial lo cual permitió obtener el SA. A continuación se describe las etapas de proceso de pilado a nivel de laboratorio que se realizó.

Limpieza de arroz paddy

El proceso inicia con una limpieza del arroz paddy, para eliminar impurezas y cuerpos extraños. Para esta operación se utilizó un separador de impurezas de granos (Figura 3.1), que consta de un sistema de aspiración con aire y un sistema de extracción de

impurezas especiales con “riddle”; es decir un grupo de tres zarandas oscilatorias.

FIGURA 3.1. DETERMINADOR DE IMPUREZAS DE GRANOS

Luego de la limpieza del arroz paddy, este fue homogenizado manualmente para proceder a la medición de su contenido de humedad, temperatura y peso hectolítrico en muestra en grano.

Descascarado

Una vez que se obtuvo los datos de humedad, se procedió al descascarillado del arroz por medio de un equipo marca YAMAMOTO modelo FC2K (Figura 3.2).

FIGURA 3.2. DESCASCARADOR DE ARROZ FC2K

Es recomendable que este equipo trabaje con muestras que no superen el 16% de humedad, puesto que un valor superior a éste puede dar lugar a quebraduras en el grano.

Pulido

Posterior a esta etapa, se tomó el arroz integral obtenido del descascarador y se lo llevó a un pulidor continuo temporizado marca YAMAMOTO, modelo RICEPAL VP-32T (Figura 3.3). Es un molino de fricción vertical, con un grado de pulimento fácilmente graduable (Figura 3.4), tiene una capacidad de muestra desde 200 gramos en adelante permitiendo una recolección limpia del salvado. Este pulidor tiene dos criterios de trabajo: el flujo del grano del arroz integral (abertura) y el grado de molienda.

FIGURA 3.3. PULIDOR CONTINUO O TEMPORIZADO RICEPAL U32

Se utilizó el nivel 4 para el flujo de grano; y en cuanto al grado de molienda se usó el nivel 3 para el primer pulido y 2.5 para el segundo pulido.

FIGURA 3.4. NIVELES DE PULIMENTO

Se estableció 3 grados de pulido para realizar las pruebas de laboratorio, y así escoger el más conveniente en base a la blancura del arroz; donde se observó que con 2 grados de pulido, el arroz cumplía con un grado de blancura aceptable cuyo valor se situó entre 37-38 Grados de Blancura o Kett.

Es importante determinar el nivel de blancura en esta etapa porque de esta manera cuidamos de que no se esté pasando arroz de alto precio u otros componentes diferentes al salvado.

Una vez obtenido el SA se lo tamizó en malla 80 y se procedió a almacenar las dos fracciones de pulido obtenidas por variedad en fundas ziploc a -20ºC hasta su posterior uso.

3.1.2 Enzimas

Las enzimas utilizadas en el presente estudio son de marca comercial VERON® las cuales fueron donadas por Granotec Ecuador.

VERON® 292: Es una preparación de enzima hemicelulítica para el tratamiento de harinas. La enzima es obtenida a partir de cultivos específicos de *Aspergillus niger*, es un polvo fino de color claro amarillento con olor aromático y está compuesto por harina de trigo, xilanasa y aceite de girasol. Presenta una actividad mínima de 1700 XylH g^{-1}, donde 1 XylH corresponde a esa actividad

enzimática donde se libera a partir de xilano una cantidad reducida de grupos equivalentes a 1 µMol de xilosa / min. a 30°C en condiciones estándar. Se la almacenó herméticamente a temperatura de refrigeración.

VERON® HPP: Es una preparación de proteasa bacteriana producida a partir de una cepa seleccionada de *Bacillus subtilis*. Cumple con las especificaciones FCC y JECFA recomendadas para enzimas grado alimenticio. Es un polvo de color marrón claro con un olor característico, presenta una actividad mínima de 1116 $U_{Hb}\ g^{-1}$, donde 1 U_{Hb} corresponde a esa actividad enzimática donde se libera el equivalente a 1 µMol de tirosina en TCA-hidrolizados solubles de hemoglobina dentro de un minuto y 37°C condiciones estándar.
Se la almacenó herméticamente a temperatura de refrigeración.

3.2 Metodología

3.2.1 Caracterización físico-química del salvado de arroz

Caracterización física del arroz paddy

Se debe caracterizar el arroz paddy a ser utilizado en la obtención del SA, con el fin de tener un proceso estandarizado. Para establecer los requisitos que debe cumplir en cuanto a su caracterización física se utilizó como referencia la norma INEN 186.

Se determinó la humedad, temperatura y densidad del arroz paddy de las variedades estudiadas; para lo cual se usó un Analizador de Grano marca Dickey-John, modelo GAC 2100 (Figura 3.5) donde los resultados de la prueba se calculan automáticamente, estas mediciones se las realizó por triplicado para poder tener datos más confiables.

FIGURA 3.5. MEDIDOR DE HUMEDAD GAC 2100

Para el control del proceso de pulido se evalúan los parámetros descritos a continuación:

- *Blancura del arroz:* Se obtiene mediante un equipo marca KETT modelo C-300 (Figura 3.6); el cual funciona bajo el principio del índice de reflectividad de la superficie al reflejarse la luz de una fuente por la superficie de la muestra, la cantidad de luz reflejada por la muestra creará una corriente eléctrica que podrá ser leída en el equipo. El índice de blancura reflejado que produce la quema de óxido de magnesio fino es leída como 100, las lecturas son divididas en números hasta 100 (EDIAGRO).

FIGURA 3.6. MEDIDOR DE BLANCURA KETT C-300

- *Rendimientos:* Se determinó el porcentaje de los rendimientos de los subproductos de la etapa de pilado para cada variedad de arroz, mediante la aplicación de fórmula:

$$\boldsymbol{Tamo}\ \% = \frac{\text{gr. tamo}}{\text{gr. paddy}} \times 100\%$$

$$\boldsymbol{Arroz\ Intregral}\ \% = \frac{\text{gr. arroz integral}}{\text{gr. paddy}} \times 100\%$$

$$\boldsymbol{Arroz\ Blanco}\ \% = \frac{\text{gr. arroz blanco}}{\text{gr. paddy}} \times 100\%$$

$$\boldsymbol{Salvado\ de\ Arroz}\ \% = \frac{\text{gr. SA pulido 1 y 2}}{\text{gr. paddy}} \times 100\%$$

En cuanto a los requisitos físicos químicos que debe cumplir el SA se tomó como referencia la norma INEN 1 690. En el SA se determinó por triplicado humedad, cenizas, fibra digerible ácida, fibra digerible neutra, grasa y proteína a través de un análisis NIR (Espectroscopía de Infrarrojo Cercano) en un equipo marca FOSS NIR Systems Type 461046.

Luego, por medio del programa estadístico Minitab versión 16.0 se realizó un análisis de varianza de los datos obtenidos para cada variedad y fracción de pulido en función del contenido de proteína; con el fin de establecer la fracción de la variedad que tenga el contenido más alto, el cual se usará como sustrato para la obtención del concentrado proteico.

Como factores o variables independientes se consideraron:

1) Variedad de arroz: INIAP 14, 15, 17.
2) Fracción de pulido: Pulido grado 1 y grado 2.

La variable de respuesta fue el contenido de proteína expresado en porcentaje (%).

3.2.2 Hidrólisis enzimática

3.2.2.1 Pre tratamiento del sustrato

Para la hidrólisis, se trabajó con dos tipos de sustratos: salvado de arroz sin desgrasar y desgrasado.

El desgrasado del SA se realizó en base al método de (Wang, Hettiarachchy, M., Burks, & Siebenmorgen, 1999) modificado, donde se mezcló salvado más hexano en una relación de (1:3) por un tiempo de 30 minutos con agitación constante a 250 rpm. Se lo dejó en reposo por 24 horas en un matraz hermético y protegido de la luz. Posteriormente, se filtró la mezcla en papel cualitativo y el residuo se colocó en cajas Petri y se llevó a secar a 35°C por un tiempo de 30 minutos para evaporar el hexano remanente. Las muestras secas fueron almacenadas en bolsas ziploc a -20ºC.

3.2.2.2 Condiciones de Hidrólisis

El proceso de hidrolisis se lo realizó en dos etapas. La primera corresponde a una extracción y solubilización de proteínas, donde el objetivo fue liberar la mayor cantidad de proteínas del resto de componentes no proteicos del sustrato y posteriormente solubilizarla en medio alcalino para finalmente extraerla por centrifugación y lavados con agua ajustada a su punto isoeléctrico, esta etapa se realizó utilizando un método alcalino y enzimático.

La segunda etapa fue la hidrólisis enzimática de proteínas, donde el objetivo fue obtener un extracto más puro rico en péptidos y di-péptidos. El procedimiento se presenta a continuación:

Extracción y solubilización

En la Figura 3.7 se muestra un diagrama de la metodología de experimentación que se empleó

para definir las condiciones óptimas de esta primera fase de extracción y solubilización de proteínas.

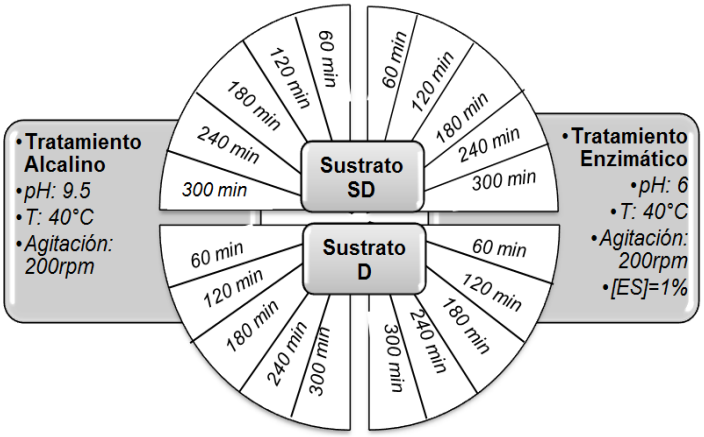


FIGURA 3.7. METODOLOGÍA DE LA EXPERIMENTACIÓN

Elaborado por: Naranjo y Suquilanda, 2013

Como se aprecia para cada sustrato desgrasado (D) y sin desgrasar (SD) se realizó la extracción de proteínas a través de un tratamiento alcalino (A) y enzimático (E) por un tiempo total de 300 minutos, donde se tomó cada 60 minutos una alícuota que fue analizada por el método de Biuret (Anexo D).

Método alcalino

Se mezcló SA con agua Milli-Q en una relación de (1:5) y se ajustó el pH a 9.5 con NaOH 1N. Luego se incubó a una temperatura de 40ºC con agitación continua en un agitador-incubador modelo Innova 40, marca New Brunswick Scientific; hasta obtener la máxima cantidad de proteínas en la reacción, tomando alícuotas cada 60 minutos; las mismas que se centrifugaron a 10000 Xg por 20 minutos a 10ºC (Figura 3.8).

FIGURA 3.8. CENTRIFUGADORA

Al sobrenadante se le midió proteína total por el método de Biuret (Anexo D). La parte restante del sobrenadante se lo llevó a punto isoeléctrico ajustando su pH a 4.5 con HCl 1N, una vez llegado a este pH se dejó reposar en frío y luego se centrifugó a 10ºC por 20 minutos a una velocidad de 10000 Xg. Finalmente se retiró el precipitado (Figura 3.9) y se lo almacenó a -20ºC hasta su posterior liofilización.

FIGURA 3.9. PRODUCTOS DE CENTRIFUGACIÓN EN EXTRACCIÓN ALCALINA

Método enzimático

Para la extracción por método enzimático se procedió como en el caso anterior, con la diferencia de que el SA se mezcló con buffer citrato en una relación de (1:5), se acondicionó la mezcla a 40ºC para luego agregar la enzima Xilanasa (VERON® 292) al 1% en relación al sustrato y se siguió incubando a dicha temperatura (Figura 3.10).

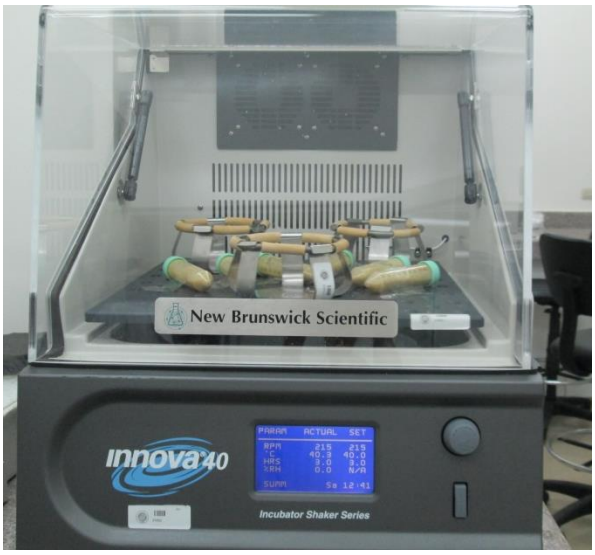


FIGURA 3.10. INCUBADORA

En esta etapa, las muestras fueron identificadas para posteriormente realizar la hidrolisis

enzimática de proteínas, de la siguiente manera:

TABLA 3. CODIFICACIÓN DE MUESTRAS

Código	Descripción
DA	Salvado de arroz desgrasado por método alcalino
SDA	Salvado de arroz sin desgrasar por método alcalino
DE	Salvado de arroz desgrasado por método enzimático
SDE	Salvado de arroz sin desgrasar por método enzimático

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

Hidrólisis enzimática de proteínas

Se mezcló extracto proteico liofilizado con buffer fosfato 0.1M pH 9 en una relación de (1:5), se acondicionó la mezcla a 40ºC para luego agregar la enzima Proteasa (VERON® HPP) al 1% en relación al sustrato y se siguió incubando a dicha temperatura con agitación constante

hasta obtener el mayor grado de hidrólisis en la reacción. Una vez cumplido el tiempo óptimo de incubación, se llevó a baño María a 90ºC para inactivar enzimas y finalmente se centrifugó a 10000 Xg por 20 minutos a 10ºC, separando el sobrenadante que se llevó a liofilizar.

3.2.2.3 Grado de hidrólisis

El grado de hidrolisis (GH) tiene como objetivo medir los enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original por medio de la acción de la enzima en el método empleado. Se utilizó la técnica descrita por (Church , Swaisgood , Porter , & Catignani , 1983), la cual se basa usando ortoftaldialdehido (OPA).

Se comparó la absorbancia obtenida con una curva patrón de Serina (Anexo E) donde se determinó la cantidad de grado de hidrólisis, para cada muestra, mediante la interpolación de estos valores en la curva patrón y despejando

los valores respectivos de x de ecuación de la recta ($y = mx + b$).

Se preparó la curva patrón de L-serina a una concentración de 0.1mg/ml de acuerdo a las diluciones que se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4. CONCENTRACIONES USADAS PARA LA ELABORACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE SERINA.

Tubo	Serina (µl)	H_2O destilada (µl)	Concentración (µg/ ml)
A	0	1000	0
B	150	850	0.75
C	250	750	1.25
D	500	500	2.5
E	750	250	3.75
F	1000	0	5

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

3.3 Cuantificación del concentrado proteico

3.3.1 Nitrógeno soluble

La muestra fue disuelta en buffer ClNa 0.1 M, pH 8,0 a una concentración de 1,0% p/v, durante 60 minutos a

temperatura ambiente con agitación. Se centrifugó la disolución a 1000xg durante 30 minutos a 20°C; se tomó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por el método de Kjeldahl. Luego se determinó el porcentaje de nitrógeno soluble relacionando este valor con el de proteína total para la muestra (Foschiatti, Perduca, Santiago, Rubiolo , & Carrara, 2009) y el porcentaje de nitrógeno soluble fue calculado a través de la siguiente ecuación:

$$\text{NS}\,\% = \frac{\text{nitrogen in the supernatant (mg)} \times 100}{\text{total nitrogen in a 100 mg sample}}$$

3.3.2 Sabor

Para determinar el sabor del concentrado proteico obtenido se realizó un perfil de sabor con la ayuda de diez panelistas, los cuales fueron entrenados mediante una prueba de umbral con escala de g2 a g6 de los cuatro sabores básicos: dulce, amargo, ácido y salado.

TABLA 5. CONCENTRACIONES PARA CADA SABOR BÁSICO

Sabor básico	Sustancia	Concentración
Dulce	Sacarosa	1,0% p/v
Salado	Cloruro de sodio	0,2% p/v
Ácido	Ácido cítrico	0.04% p/v
Amargo	Cafeína	0.05% p/v

FUENTE: (Watts, Ylimaki , Jeffery, & Elías, 1989).

Las soluciones presentes en la Tabla 5 se prepararon con agua destilada un día antes de la prueba para permitir que se equilibren durante la noche. Se prepararon aproximadamente entre 30 ml por panelista. Para la degustación, las soluciones se sirvieron en pequeños vasos codificados. Entre las 4 soluciones básicas se pusieron al azar una a dos muestras que contenían agua. Se instruyó a cada panelista para que se enjuagaran la boca con agua entre una muestra y otra. La ficha que se empleó para esta prueba se presenta en el Anexo I (Watts *et al*, 1989).

Luego de que hayan sido entrenados, se procedió a presentar la muestra del concentrado y el formato empleado para la

prueba, la cual se aprecia en el Anexo J, en donde el catador asigna una calificación de acuerdo a los atributos detectados y su intensidad. La escala de intensidad empleada para la prueba sensorial fue de 0 a 5, donde 0= ausencia total y 5= extrema.

Para realizar el análisis de la data, se colocan los datos en una tabla, se promedian los puntajes asignados por cada uno de los panelistas y se analizan de forma gráfica. (Hernandez , 2005)

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización del salvado de arroz

Los resultados de la caracterización física del arroz paddy previo a su procesamiento y los rendimientos de los productos del pilado por variedad se presentan en la Tabla 6.

Según la norma INEN 186 las condiciones de humedad en el arroz paddy deben ser hasta del 14% para evitar su deterioro por la activación de la flora micótica presente y fermentaciones derivadas, además el grano adquiere mayor dureza y consistencia para soportar mejor las operaciones de pilado.

TABLA 6. CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y RENDIMIENTOS DE LAS VARIEDADES DE ARROZ INIAP 14, 15 Y 17

CARACTERIZACIÓN FÍSICA ARROZ PADDY			
Parámetros	**INIAP 14**	**INIAP 15**	**INIAP 17**
Humedad Paddy (%)	14 ± 0,13	12,9 ± 0,09	13,6 ± 0,09
Temperatura Paddy (°C)	27,1	26,97 ± 0,11	27,33 ± 0,04
Densidad Paddy (kg/hl)	54,4 ± 0,27	54 ± 1,13	57,87 ± 0,24
RENDIMIENTOS EN LA ETAPA DE PILADO			
Tamo (%)	20,62	19,7	18,86
Arroz Integral (%)	79,12	80,01	80,75
Arroz Blanco (%)	71,63	73,34	73,19
Salvado (%)	6,91	6,12	6,61
Blancura arroz °Kett	37,4	37,2	38,7

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

A las fracciones obtenidas de los pulidos de cada variedad se les realizó análisis físico-químico por medio del método NIR, donde los resultados se muestran en la Tabla 7.

TABLA 7. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS FRACCIONES DE PULIDO

	INIAP 14		INIAP 15		INIAP 17	
Parámetros (%)	**Pulido 1**	**Pulido 2**	**Pulido 1**	**Pulido 2**	**Pulido 1**	**Pulido 2**
Proteína	13,24 ± 0,11	12,02 ± 0,15	13,50 ± 0,03	12,86 ± 0,07	12,3 ± 0,33	10,8 ± 0,13
Grasa	18,88 ± 0,04	17,33 ± 0,53	17,47 ± 0,16	17,07 ± 0,38	17,16 ± 0,49	14,39 ± 0,37
Ceniza	11,05 ± 0,08	10,56 ± 0,26	9,69 ± 0,1	9,45 ± 0,24	9,32 ± 0,29	8,84 ± 0,16
Humedad	10,21 ± 0,15	10,45 ± 0,1	10,89 ± 0,13	10,94 ± 0,17	9,89 ± 0,2	10,99 ± 0,33
Fibra digerible neutra	19,99 ± 0,17	13,06 ± 0,48	20,65 ± 0,39	14,12 ± 0,7	18,92 ± 0,61	11,87 ± 0,28
Fibra digerible ácida	8,76 ± 0,07	5,60 ± 0,06	9,14 ± 0,17	6,20 ± 0,27	8,42 ± 0,02	5,56 ± 0,07

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

De estos parámetros el de mayor relevancia para la presente investigación es el contenido de proteína, puesto que se

requiere elegir una variedad de arroz y su respectiva fracción de pulido con mayor contenido de este nutriente para la obtención del concentrado proteico.

Primero se formuló una prueba de hipótesis con el fin de determinar si existe diferencia significativa en el contenido proteico entre variedades.

H_0: No existe diferencia significativa en el contenido proteico de las variedades del SA.

H_1: Existe diferencia significativa en el contenido proteico de las variedades del SA.

De igual manera se formuló una prueba de hipótesis para determinar diferencias significativas en el contenido proteico entre las fracciones de pulido.

H_0: No existe diferencia significativa en el contenido proteico del SA de las fracciones de pulido.

H_1: Existe diferencia significativa en el contenido proteico del SA de las fracciones de pulido.

Se procedió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) para los factores: Variedad y Pulidos, los resultados del análisis se muestran en la Tabla 8.

TABLA 8. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PROTEÍNAS EN FRACCIONES DE PULIDO

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajustada	CM Ajustada	F	P
Variedad	2	8.2406	8.2406	4.1203	119.10	0.00
Pulido	1	5.6448	5.6448	5.6448	163.17	0.00
S = 0.185996 $R^2 = 97.21\%$ R^2 **ajustado** $= 96.05\%$						

ELABORADO POR: NARANJO – SUQUILANDA, 2013

Se observa que ambos factores presentan un valor P menor a 0.05, teniendo suficiente evidencia estadística para rechazar H_0 a favor de H_1, para concluir que existe diferencia significativa en

el contenido proteico de las tres variedades y entre las fracciones de los pulidos de dichas variedades.

En la Figura 4.1 se muestra la gráfica para los residuos en la que se evidencia la normalidad del error, homogeneidad en las varianzas de los residuos y la independencia del error, cumpliéndose con los supuestos del modelo.

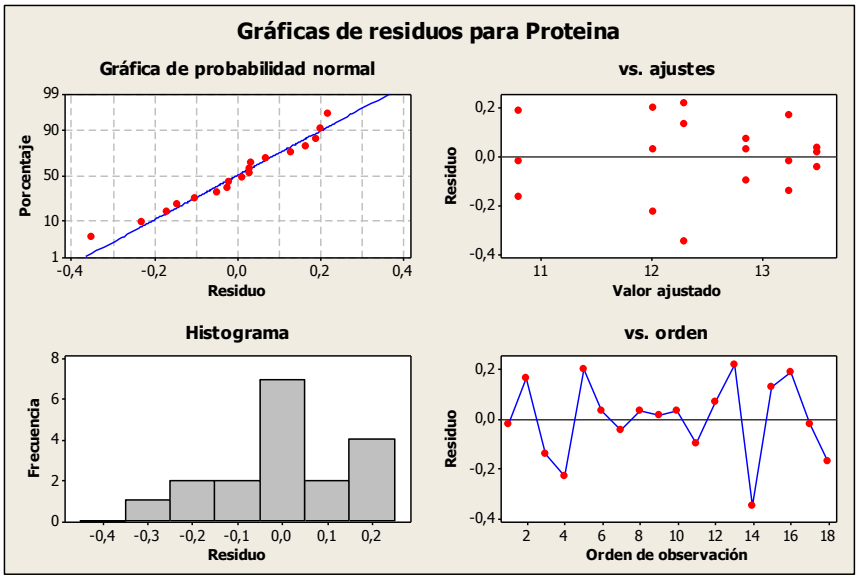


FIGURA 4.1. GRÁFICA DE RESIDUOS PARA PROTEÍNA

ELABORADO POR: NARANJO – SUQUILANDA, 2013

Seguidamente, se realizó la prueba de Tukey con un 95% de confianza (ver Tabla 9), donde se observa que la variedad con el mayor contenido de proteína corresponde a INIAP 15,

seguido de la 14 y de la 17 respectivamente. Por otro lado, también se observó que el salvado obtenido en el Pulido 1 contiene mayor cantidad de proteína que el Pulido 2, lo cual se corresponde lo observado por (Vargas & Aguirre, 2010) en la caracterización de las fracciones de pulido de variedades colombianas analizadas, donde se observó que la distribución de proteínas es heterogénea y la mayoría está concentrada de forma decreciente desde las capas externas hacia el centro, evidenciándose mayores contenidos de proteína en la primera fracción de pulido. Así también la composición del SA no sólo está en función de la variedad sino también del grado de tecnificación del pilado y de las condiciones de cosecha del arroz.

TABLA 9. MÉTODO DE TUKEY PARA ANÁLISIS DE FACTOR PULIDO Y VARIEDAD

PULIDO	N	MEDIA	AGRUPACIÓN
1	9	13,0	A
2	9	11,9	B
VARIEDAD	**N**	**MEDIA**	**AGRUPACIÓN**
15	6	13,2	A
14	6	12,6	B
17	6	11,5	C
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.			

ELABORADO POR: NARANJO - SUQUILANDA, 2013

La Figura 4.2 muestra un diagrama de cajas, en el cual se puede apreciar la diferencia existente entre las medias del contenido proteico por variedad de SA.

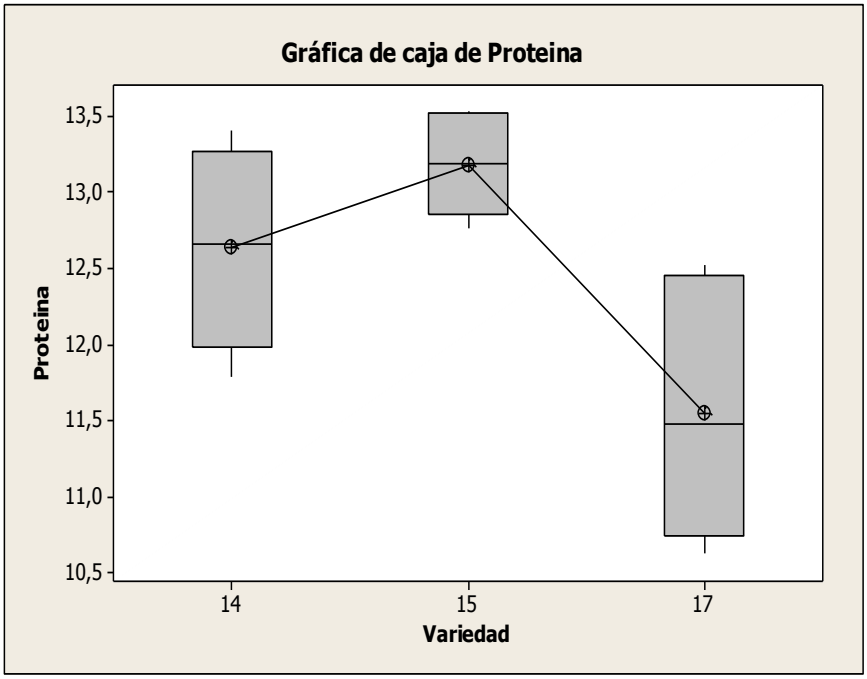


FIGURA 4.2. DIAGRAMA DE CAJAS PARA EL CONTENIDO PROTEICO ENTRE VARIEDADES

ELABORADO POR: NARANJO – SUQUILANDA, 2013

Una vez analizados estadísticamente los datos, se concluyó usar como sustrato el SA de la variedad INIAP 15, puesto que presentó el mayor porcentaje de proteína y, se mezclaron los pulidos 1 y 2 de dicha variedad para conformar la muestra como la obtenida en el proceso de las piladoras industriales. De esta manera se espera obtener un mayor contenido de nitrógeno en los extractos.

Extracción y solubilización de proteínas

Las medias de los resultados de este análisis, los cuales se obtuvieron por duplicado (Anexo G), se presentan en las siguientes gráficas:

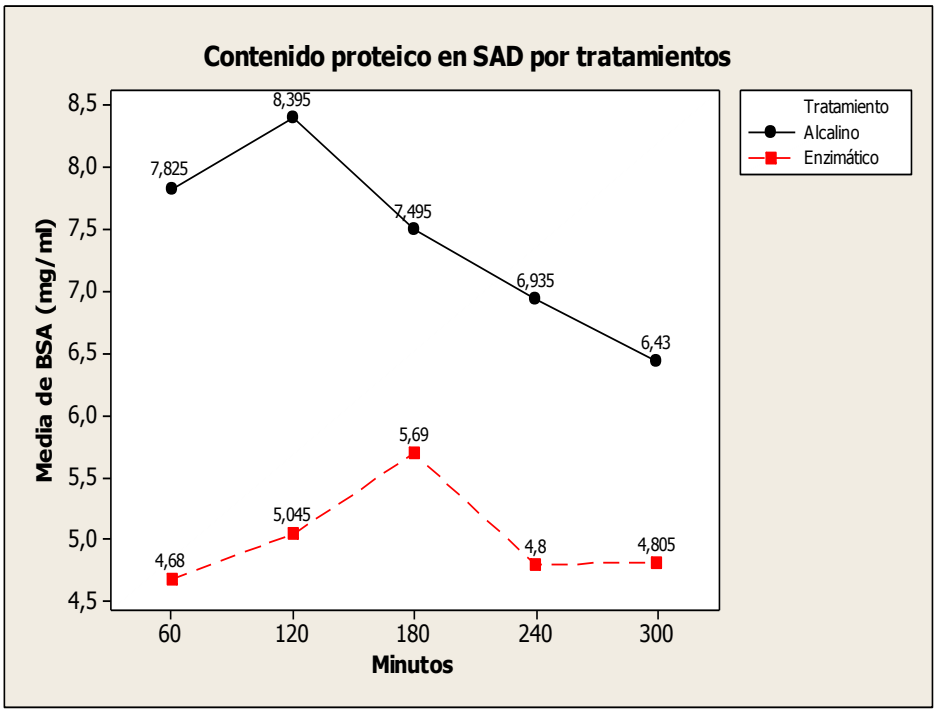


FIGURA 4.3. CONTENIDO PROTEICO EN SA DESGRASADO POR TRATAMIENTO

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

La Figura 4.3 muestra que el tiempo óptimo en la extracción y solubilización de proteínas en el sustrato D con el método

alcalino fue a los 120 minutos, dando el mayor contenido de proteína en el extracto liofilizado de 8,4 mg/ml, mientras que con el método enzimático el tiempo óptimo de incubación fue a los 180 minutos dando como resultado un contenido de proteína de 5,7 mg/ml.

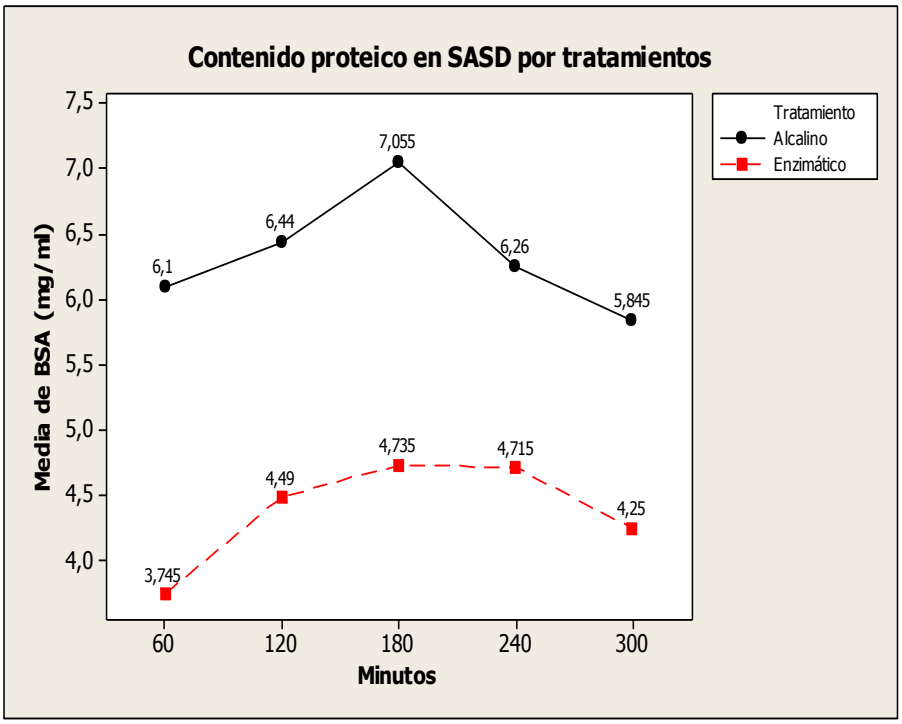


FIGURA 4.4. CONTENIDO PROTEICO EN SA SIN DESGRASAR POR TRATAMIENTO

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

La Figura 4.4 muestra que el tiempo óptimo en la extracción y solubilización de proteínas en el sustrato SD con el método alcalino fue a los 180 minutos, dando una concentración de proteína en el extracto liofilizado de 7,01 mg/ml mayor que el obtenido con método enzimático, donde el tiempo óptimo de incubación también fue a los 180 minutos con una concentración de proteína menor de 4,73 mg/ml.

Se realizó pruebas de hipótesis con el fin de determinar la influencia de los factores: tipo de sustrato, tipo de tratamiento y tiempo de incubación sobre el contenido de proteína (BSA) de la muestra.

Tipo de sustrato:

H_0: El tipo de sustrato no influye significativamente en el contenido proteico del extracto.

H_1: El tipo de sustrato si influye significativamente en el contenido proteico del extracto.

Tipo de tratamiento:

H_0: El tipo de tratamiento al que fue sometido el sustrato no influye significativamente en el contenido proteico del extracto.

H_1: El tipo de tratamiento al que fue sometido el sustrato si influye significativamente en el contenido proteico del extracto.

Tiempo:

H_0: El tiempo de incubación no influye significativamente en el contenido proteico del extracto.

H_1: El tiempo de incubación si influye significativamente en el contenido proteico del extracto.

Puesto que los datos obtenidos que se presenta en las Figuras 4.3 y 4.4 cumplen con una distribución normal y una igualdad en las varianzas poblacionales (ver Anexo H) se procedió a realizar un ANOVA, los resultados del análisis se muestran en la Tabla 10.

TABLA 10.

ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PROTEÍNA

Fuente	GL	SC Sec	SC Ajust	MC Ajust	F	P
Tiempo	4	4,48	4,48	1,12	18,98	0,000
Tratamiento	1	47,63	47,63	47,63	806,88	0,000
Sustrato	4	7,17	7,17	7,17	121,38	0,000
Tratamiento * Sustrato	10	0,53	0,53	0,53	8,92	0,006
Error	24	1,42	1,42			
Total	39	64,66				
$S = 0{,}24297$	$R^2 = 97{,}81\%$		R^2 ajustado $= 96{,}44\%$			

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

Se observa que los tres factores y la interacción entre el tipo de tratamiento y sustrato presentan un valor P menor a 0.05, existiendo suficiente evidencia estadística para rechazar H_0 a favor de H_1, para concluir que el tratamiento, tipo de sustrato y tiempo de incubación influyen significativamente en el contenido proteico de los extractos analizados. Así también se observa que hay una interacción entre el tratamiento y tipo de sustrato que afecta significativamente al contenido proteico.

El estadístico R-Cuadrado afirma que el modelo es adecuado para este diseño experimental.

En la Figura 4.5 se muestra la gráfica para los residuos, en la cual se evidencia la normalidad del error, homogeneidad en las varianzas de los residuos e independencia del error cumpliéndose con los supuestos del modelo.

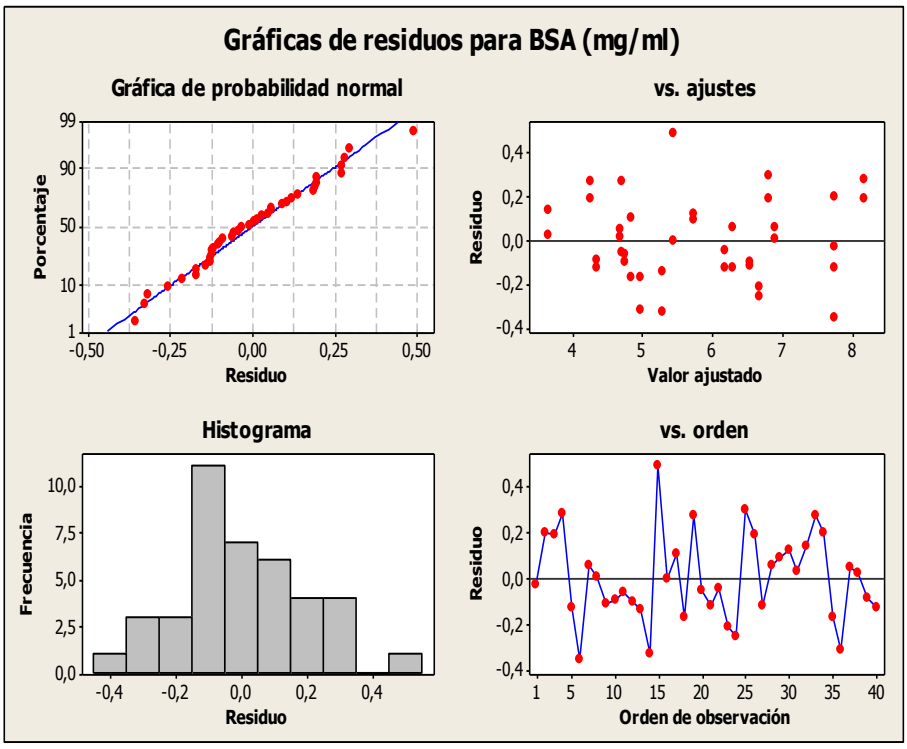


FIGURA 4.5. GRÁFICA DE RESIDUOS PARA PROTEÍNA

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

La Figura 4.6 permite visualizar el efecto del tipo de sustrato y tratamiento sobre la variable de respuesta, donde se aprecia que el método alcalino y el sustrato desgrasado dan mayores concentraciones de proteína en el extracto.

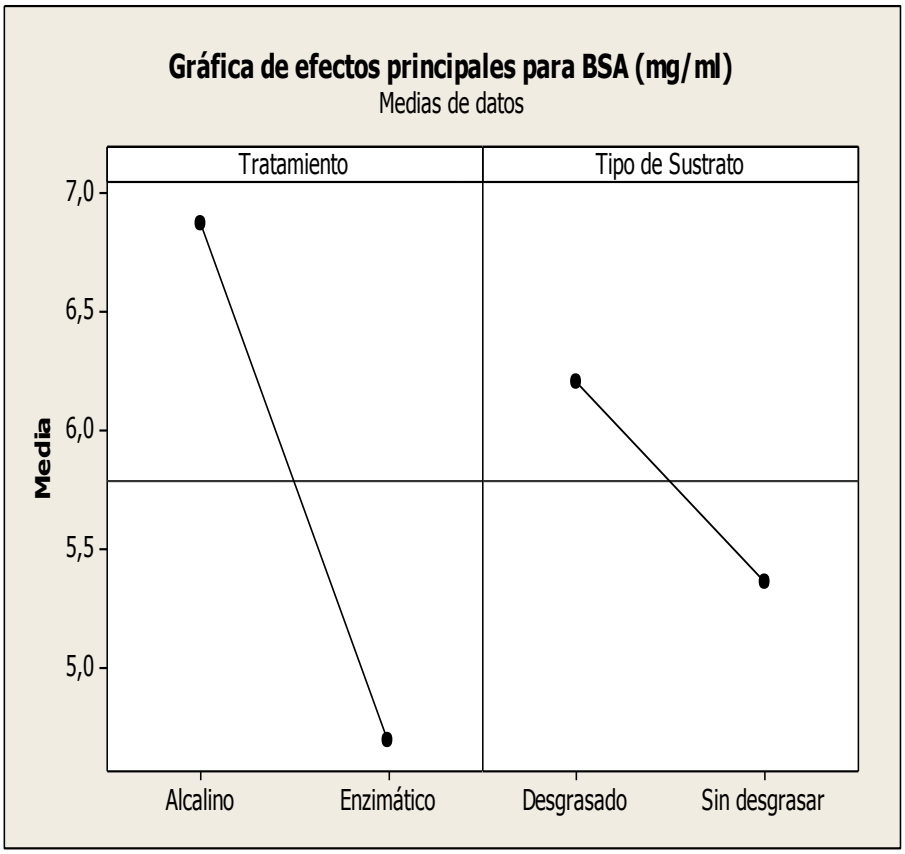


FIGURA 4.6. EFECTOS PRINCIPALES PARA PROTEÍNA (BSA)

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

El diagrama de caja de la Figura 4.7 muestra el comportamiento de las medias aritméticas del tipo de sustrato y tratamiento. La media correspondiente al tratamiento por método alcalino y con sustrato desgrasado presentó el mayor contenido proteico.

Según el análisis estadístico las mejores condiciones para la fase de extracción de proteína es evidentemente usando como sustrato SAD por el método alcalino a 120 minutos. Sin embargo desde el punto de vista tecnológico y por cuestiones de costos resulta más conveniente usar un SA SD a fin de no encarecer el producto final.

En conclusión, la mejor condición que se usó bajo estas observaciones fue la del SA SD por el método alcalino a 180 minutos.

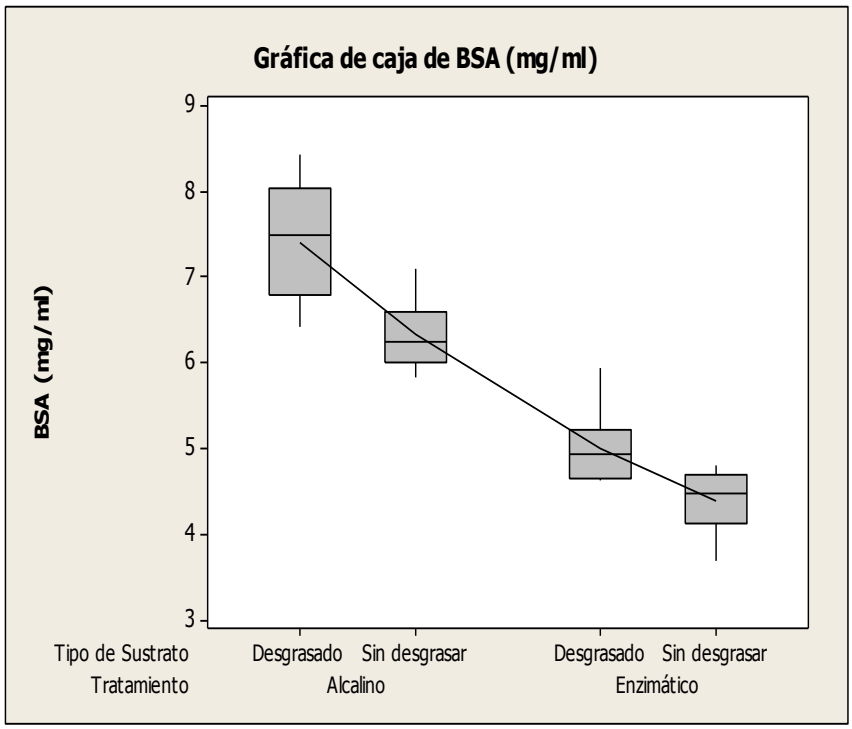


FIGURA 4.7. DIAGRAMA DE CAJA PARA PROTEÍNA

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

La determinación de la cantidad de proteína de los productos obtenidos en esta etapa bajo las condiciones escogidas, se presenta en la Tabla 11 y en la Figura 4.9 el extracto proteico liofilizado.

TABLA 11. CONTENIDO DE PROTEÍNA TOTAL EN LOS PRODUCTOS FINALES DE LA ETAPA DE EXTRACCIÓN Y SOLUBILIZACIÓN

Muestra	Proteína Total (%)
Precipitado	8,48±0,04*
Extracto proteico liofilizado	63,56±0,05

*Resultado expresado en base húmeda

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

FIGURA 4.8. EXTRACTO PROTEICO LIOFILIZADO

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

4.2 Cuantificación del concentrado proteico

4.2.1 Grado de hidrólisis

Una vez realizada la hidrólisis se procedió a establecer el tiempo en el cual se obtiene la mayor cantidad de productos en la reacción. Los datos obtenidos de la reacción se muestran en Tabla 12.

TABLA 12. RESULTADOS GRADO DE HIDRÓLISIS

Tiempo (minutos)	Absorvancia	Serina (µg/ml)	Promedio
90	0,45	3,03	2,60
	0,33	2,17	
135	0,64	4,11	4,25
	0,60	4,39	
180	0,79	5,47	5,33
	0,75	5,18	
225	0,58	3,96	4,11
	0,62	4,25	
270	0,58	3,96	4,00
	0,59	4,04	

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

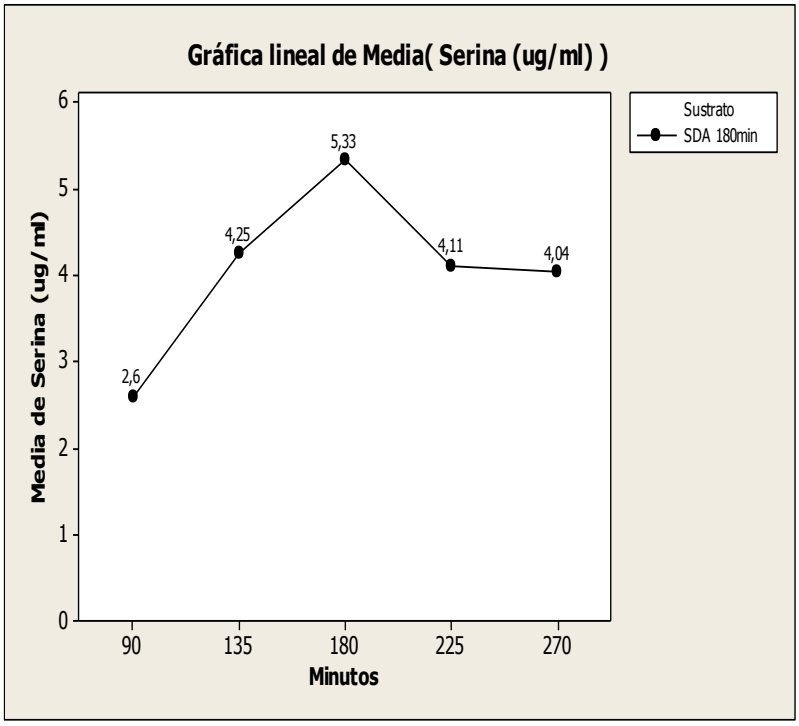


FIGURA 4.9. CURVA DE GRADO DE HIDRÓLISIS DE SDA 180 MIN

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

Se puede observar en la Fig. 4.9 que el tiempo óptimo en la hidrólisis de proteínas en el sustrato SD con el método alcalino fue de 180 minutos con una concentración de 5,3 µg/ml de serina.

4.2.2 Nitrógeno soluble

La determinación de la cantidad de proteína y del nitrógeno soluble del concentrado proteico, se presenta en la Tabla 13.

TABLA 13. CARACTERIZACIÓN DEL CONCENTRADO PROTEICO

Parámetro	Concentrado Proteico
Proteína	75%
Nitrógeno Soluble	53%

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

Sabor

De acuerdo a los resultados tabulados que se muestran en el Tabla 14, se concluye que el concentrado proteico no presenta un sabor amargo, tiene un sabor ligeramente ácido y salado, y un dulzor casi imperceptible; no deja

sabor residual, lo cual es algo deseable. (KAEWKA, 2009) indicó que las notas saladas de los hidrolizados incrementa mientras que el aroma dulce decrece luego del secado y se evidencia más en un secado por aspersión que en el concentrado liofilizado.

TABLA 14. PERFIL DE SABOR DEL CONCENTRADO PROTEICO

Características Sabor	Total Puntaje 10 Panelistas	Promedio Aritmético
Dulce	11	1
Ácido	15	2
Amargo	2	0
Salado	23	2

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

La figura 4.10 muestra el análisis gráfico de las evaluaciones de los perfiles de sabor del producto.

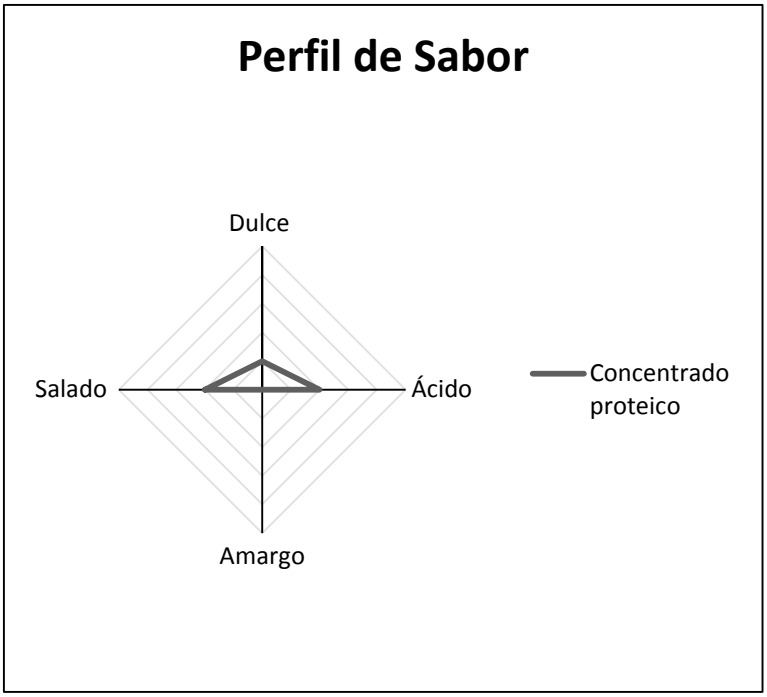


FIGURA 4.10. GRÁFICA PERFIL DE SABOR DE CONCENTRADO PROTEICO

ELABORADO POR: NARANJO Y SUQUILANDA, 2013

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES:

- De las variedades ecuatorianas analizadas la que mayor contenido de proteína presentó fue INIAP 15 con 13,50 ± 0,03%, seguido de INIAP 14 con 13,24 ±0,11% e INIAP 17 12,3 ± 0,33% respectivamente. En todos los casos el alto contenido proteico se corresponde a las fracciones de pulido 1.

- El diseño experimental aplicado para analizar el efecto del tipo de sustrato, tratamiento al momento de la obtención de extractos proteicos, demostró que estos factores influyen significativamente en el contenido proteico del concentrado. Siendo la extracción alcalina con sustrato desgrasado la mejor

con 8,4 mg/ml de BSA. Por otro lado, el mejor resultado en la extracción enzimática fue de 5,7 mg/ml empleando sustrato desgrasado.

- Para la hidrólisis proteica se empleó el extracto proveniente del método alcalino con sustrato sin desgrasar, pues desde el punto de vista tecnológico y por cuestiones de costos resulta más conveniente usar este con el fin de no encarecer el producto final. El tiempo óptimo en el que se obtiene la mayor cantidad de productos en esta reacción fue a 180 minutos con una concentración de 5,3 µg/ml de serina.

- Se obtuvo un concentrado proteico con una cantidad de 75% de proteínas y nitrógeno soluble de 53%, presentando un sabor ligeramente salado y acido, y un dulzor casi imperceptible; a partir de salvado de arroz de la variedad INIAP 15 por un método alcalino.

RECOMENDACIONES:

- Se usó como sustrato SA de la variedad INIAP 15 y se mezclaron los pulidos 1 y 2 de dicha variedad para conformar la muestra como la obtenida en el proceso de las piladoras industriales.

- Con el fin de no encarecer el producto final se usó SA sin desgrasar, pues desde el punto de vista tecnológico y por cuestiones de costos resulta más conveniente usar este.

- Realizar este estudio empleando otro tipo de enzimas, con el fin de encontrar mejores resultados en cuanto a rendimientos y contenido proteico.

- Analizar las propiedades funcionales y cuantificar las proteínas del concentrado proteico obtenido para poder recomendar su uso en otras matrices alimentarias.

ANEXOS

ANEXO A

PREPARACIONES ENZIMÁTICAS UTILIZADAS EN EL PROCESADO DE ALIMENTOS

Enzimas Proteasas	Origen	Reacciones catalizadas
Bromelaina	Piñas tropicales: Anancis comosus, Ananas bacteatus (L).	En general hidrolizan proteínas y polipéptidos dando péptidos de menor peso molecular
Ficina	Higueras: Ficus sp.	Las proteasas vegetales hidrolizan, en general, polipéptidos, amidas y ésteres (especialmente en enlaces de aminoácidos básicos, leucina o glicina) dando preparación de hidrolizados péptidos de menor peso molecular.
Papaina	Papaya: Curica papaya (L).	
Proteasas fúngicas	Aspergillus niger Aspergillus oryzae	Las proteasas microbianas hidrolizan los polipéptidos para dar péptidos de peso molecular más bajo
Proteasas bacterianas	Bacillus subtilis Bacillus licheniformis	
Pepsina	Estómagos de cerdo u otros animales	Hidrólisis de polipéptidos, incluyendo los que tienen enlaces adyacentes a residuos de aminoácidos aromáticos o dicarboxilos, dando péptidos de menor peso molecular
Tripsina	Páncreas animales	Hidrólisis de polipéptidos amidas y esteres, en enlaces en que participa el grupo carboxílico de la L-arginina y L-lisina, dando péptidos de menor peso molecular

FUENTE: (Fennema & Tannenbaum, 1993)

ANEXO B

CLASIFICACIÓN DE LAS ENDOPROTEASAS

Tipo de proteasa	Fuente	Nombres comunes o comerciales	pH de acción	Temperatura de operación (Cº)
Serino-proteasas	Bacillus licheniformis	Subtilisin Carlsberg	6 – 10	10 – 80
		Alcalase		
	Bacillus lentus	Subtilisin Esperase	7 – 12	10 – 80
	Bacillus GMO	Subtilisin Savinase	8 – 11	15 – 80
	Pancreaticas	Novo-Pro D		
		Tripsina	7 – 9	10 – 55
Metalo-proteasa	Bacillus amyloliquefacus	Neutrase	6 – 8	10 – 65
Aspartato-proteasa	Rhizomucor miehi	Hannilase	– 6	10 – 50
		Fromase		
	Cuajo	Rennet	3 - 6	10 – 50
Mezcla de aspartato proteasas, metaloproteasas y carboxilpeptidasas	Bacillus	Protamex	6 – 8	10 – 65
	Aspergillus Oryzae	Flavourzyme	4 - 8	10 – 55

ANEXO C

CONTENIDO DE PNA EN DIFERENTES TIPOS DE CEREALES

(% DE MATERIA SECA)

	AX SOL	AX INSOL	β-GLUCANOS	CELULOSA	MANOSA	GALACTOSA	PNA	AX/PNA
Trigo	1.8	6.3	0.8	2.0	T	0.3	11.4	71 %
Centeno	3.4	5.5	2.0	1.5	0.3	0.3	13.2	67 %
Maíz	0.1	5.1	T	2.0	0.2	0.6	8.1	64 %
Salvado de trigo	1.1	20.8	0.4	10.7	0.4	0.8	35.3	62 %
Sorgo	0.12	3.8	0.2	2.0	0.1	0.15	6.45	62 %
DDGS de trigo	4.9	13.4	2.3	5.8	T	0.9	33.2	55 %
Cebada	0.8	7.1	4.3	3.9	0.2	0.2	16.7	47 %
DDGS de maíz	0.4	12.6	T	7.1	0.7	2.1	28.6	45 %
Salvado de arroz	0.2	8.3	T	1.2	0.4	1.2	21.8	39 %
Arroz	T	0.2	0.1	0.3	T	0.1	0.8	25 %
Harina de girasol	0.8	5.2	-	12.3	1.2	1.3	31.5	19 %
Harina de soja	0.75	2.25	-	6.2	1.3	4.1	21.7	14 %

T= Cantidades traza no cuantificables

ANEXO D

MÉTODO DE BIURET

Para la cuantificación de la cantidad de proteína se utilizó el método de Biuret, cuyo procedimiento se detalla a continuación:

a) Se colocó 600 µl de la muestra problema en un tubo eppendorf, la misma que corresponde a 3,8 µl del sobrenadante proveniente de la extracción y solubilización de proteínas (literal e) diluido en 1496 µl de agua destilada.
b) Se añadió 900 µl de reactivo de Biuret.
c) Se agitó en el vórtex para homogenizar la muestra.
d) Se dejó reaccionar en un baño de temperatura controlada a 37^0C por 15 min y en oscuridad.
e) Se colocó la muestra en una cubeta de cuarzo, cuidando de que los dedos solo toquen la parte esmerilada del mismo.
f) Se realizó la lectura de la absorvancia a 540 nm en un espectrofotómetro modelo Genesys 5 (Spectronic), previamente se tomó la lectura del blanco y se enceró con el botón Autozero.
g) Se comparó la absorvancia con una curva patrón de BSA donde se determinó la cantidad de proteína total, para cada muestra, mediante la interpolación de estos valores en la curva patrón y despejando los valores respectivos de x de ecuación de la recta (y=mx+b).

El blanco se preparó con 600 µl de agua destilada siguiendo el mismo procedimiento.

Curva patrón de albumina (biuret)

Se preparó la curva patrón a partir de albúmina de suero bovino (BSA) 10mg/ml de acuerdo a las diluciones que se muestran en la siguiente Tabla.

Concentraciones usadas para la elaboración de la curva patrón de BSA

Tubo	Solución patrón BSA (ml)	H_2O destilada (ml)	Concentración (mg/ml)
A	0	2	0
B	0.4	1.6	2
C	0.8	1.2	4
D	1.2	0.8	6
E	1.6	0.4	8

La metodología para la curva patrón de BSA fue la siguiente:

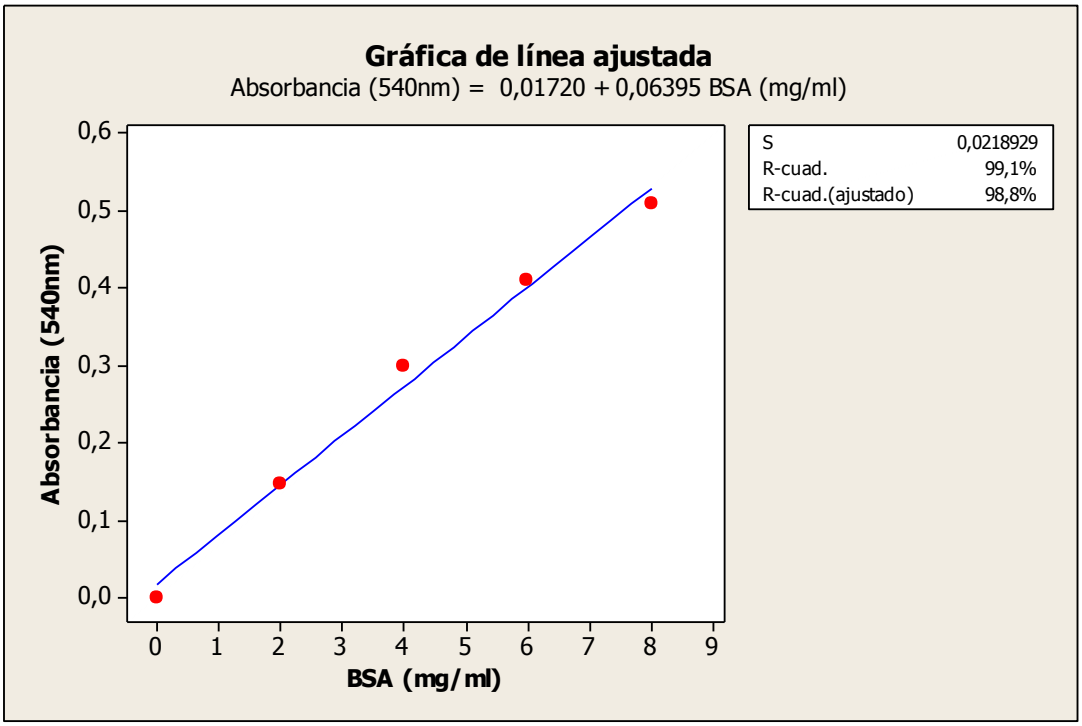
a) A partir de esta solución madre se realizaron las diluciones descritas en la tabla.
b) Al tubo A se le añadió 3 ml de reactivo de Biuret.
c) Se agitó el tubo en el vórtex para homogenizar la muestra.
d) Se dejó reaccionar en un baño de temperatura controlada a 37^0C por 15 min y en oscuridad.

e) Se colocó la muestra en una cubeta de cuarzo, cuidando de que los dedos solo toquen la parte esmerilada del mismo.

f) Se realizó la lectura de la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro modelo Genesys 5 (Spectronic), previamente se tomó la lectura del blanco y se enceró con el botón Autozero.

Se llevó a cabo el mismo procedimiento para los tubos B, C, D y E.

Obtenidas las absorbancias para cada tubo, se las graficó respecto a la concentración de BSA correspondiente, como se muestra en la figura



Los resultados del análisis de regresión lineal entre absorbancia y concentración de BSA, se indican a continuación:

La ecuación de regresión es: **Absorbancia (540 nm) = 0,0172 + 0,0640 BSA (mg/ml)**				
Predictor	**Coef**	**SE Coef**	**T**	**P**
Constante	0,01720	0,01696	1,01	0,385
BSA (mg/ml)	0,006395 0	0,003462	18,47	0,000
S = 0,0218929 R-cuad. = 99,1% R-cuad. (ajustado) = 98,8%				

De acuerdo a los datos de la Tabla, el valor de la pendiente de la curva es de 0.00640, con un valor P de 0.000 con un nivel de confianza de 95%. El coeficiente de correlación indica el 98.8% de variabilidad de los datos, por lo tanto con un valor R mayor a 70% se tiene que el modelo planteado para describir la curva de regresión es robusto.

ANEXO E

CURVA PATRÓN DE SERINA

La metodología para la curva patrón fue la siguiente:

a) Se preparó una solución de L-serina (Ser) con una concentración de 0,1 mg/ml: se pesó 1,25 mg de Ser y se llevó a 12,5 ml.
b) A partir de esta solución madre se realizaron las diluciones descritas en la tabla A.
c) Se colocó en una microplaca 50 µl del tubo A y luego se le adicionó 250 µl de reactivo revelador (OPAr+ME).
d) Se dejó reposar a temperatura ambiente por dos minutos, e inmediatamente se agitó 5 segundos.
e) Se leyó la absorvancia a 340 nm en un espectrofotómetro modelo Synergy HT (Biotek).

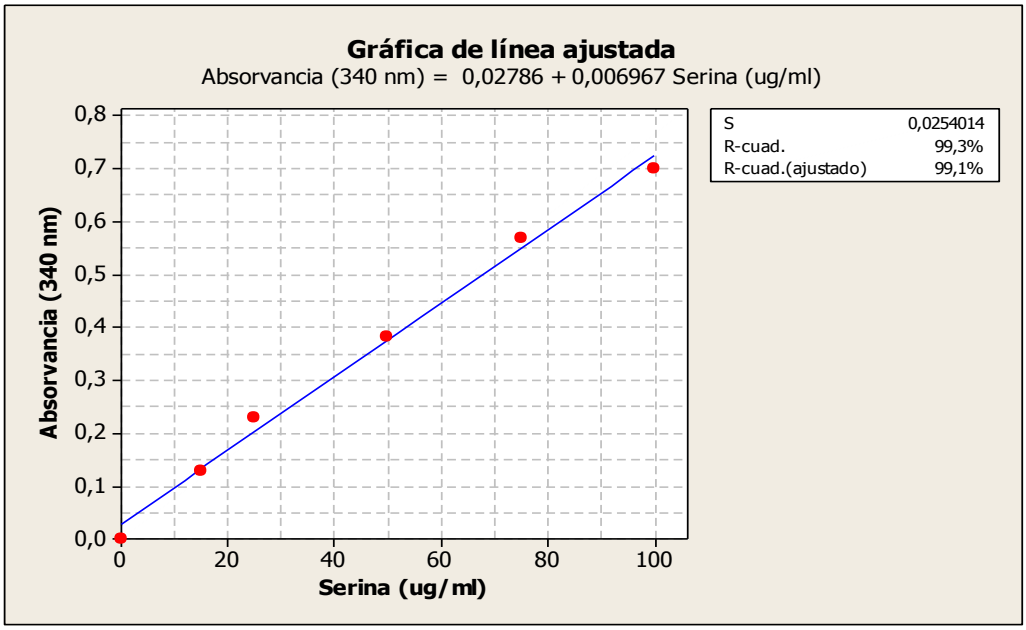
Se llevó a cabo el mismo procedimiento para los tubos B, C, D, E y F.

Obtenidas las absorvancias para cada tubo, se las graficó respecto a la concentración de Serina correspondiente, como se muestra a continuación:

Serina (ug/ml)	Absorvancia (540 nm)
0	0,0000
15	0,1300
25	0,2310
50	0,3835
75	0,5685
100	0,7005

Elaborado por: Naranjo y Suquilanda, 2013

Se graficaron los datos de la tabla con respecto a la concentración de Serina (µg/ml) correspondiente y se realizó un ajuste de datos por regresión lineal simple, donde el coeficiente de correlación fue de 0,9927. La curva patrón se muestra en la Figura a continuación:



Los resultados del análisis de regresión lineal entre absorvancia y concentración de Serina, se indican a continuación:

La ecuación de regresión es: **Absorbancia (340 nm) = 0,0279 + 0,00697 Serina (µg/ml)**				
Predictor	**Coef**	**SE Coef**	**T**	**P**
Constante	0,02786	0,01675	1,66	0,172
Serina (µg/ml)	0,0069673	0,0002979	23,39	0,000
S = 0,0254014 R-cuad. = 99,3% R-cuad. (ajustado) = 99,1%				

De acuerdo a los datos, el valor de la pendiente de la curva es de 0.0070, con un valor P de 0.000 con un nivel de confianza de 95%. El coeficiente de correlación indica el 99.3% de variabilidad de los datos, por lo tanto con un valor R mayor a 70% se tiene que el modelo planteado para describir la curva de regresión es robusto.

ANEXO F

GRADO DE HIDROLISIS

Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

Solución A.

1,905 g de tetraborato disodico decahidratado (TB)

50 mg de dodecilsulfato sódico (SDS)

40ml de agua desionizada

Solución B.

40 mg de OPA

1 ml de etanol.

50 ml de agua desionizada

Preparación de solución A:

a) Se disolvió en 40 ml de agua destilada 1,905 g de TB y 50 mg de SDS.

Preparación de solución B:

a) Se disolvió 40 mg de OPA en 1 ml de etanol.

La determinación del grado de hidrólisis de proteínas se la realizó con Ortoftaldialdehido reactivo (OPAr). Para la preparación de este reactivo fue la siguiente:

a) En la preparación de la solución A cuidar de que se disuelva totalmente el TB, caso contrario se filtra por gravedad.
b) Se juntó las soluciones A y B, agitando con suavidad para no formar espuma y enrasar a 50 ml con agua desionizada. La disolución resultante será el OPA reactivo (OPAr). Guardar en frasco de topacio en nevera.
c) Unos minutos antes de empezar, se sacó el OPAr de la nevera para que se atempere.
d) Se calculó el volumen de reactivo necesario para el día (250 µl por muestra). Se preparó el reactivo mezclando OPAr y 2-mercaptoetanol (ME) tal que el ME este al 5% en peso, es decir, se añadió 4,49 ml de ME por cada 100 ml de reactivo. Esto se calculó como sigue:

$$V_{OPAr=0,9551V} \; ; \; V_{ME=0,0449V}$$

ANEXO G

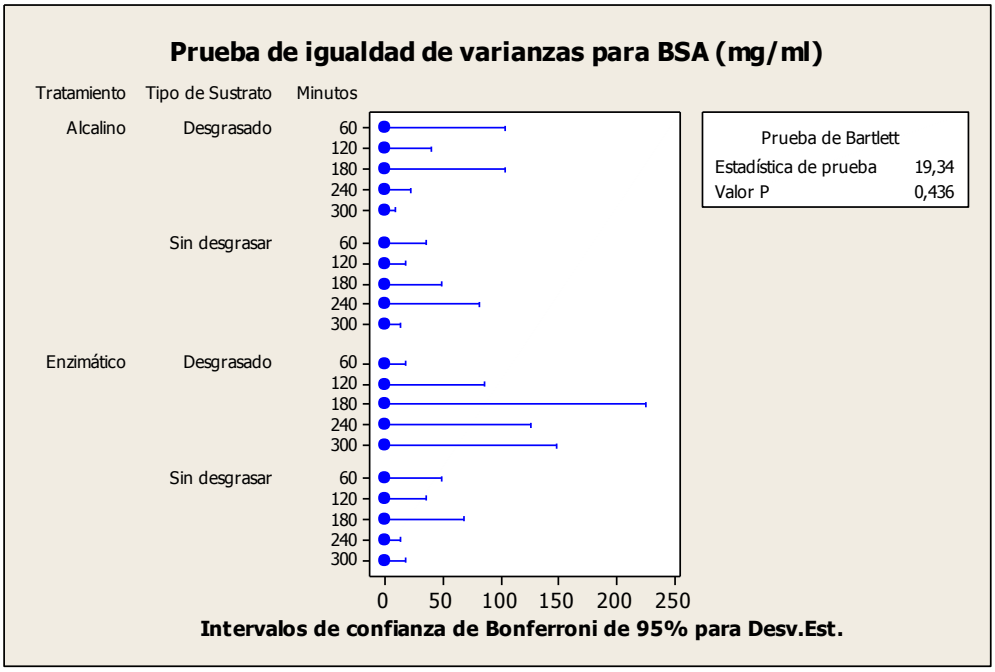
Tiempo (minutos)	Absorvancia	BSA (mg/ml)	Promedio	Muestra
60	0,51	7,71	7,82	DA
	0,525	7,94		
120	0,55	8,35	8,39	
	0,557	8,44		
180	0,504	7,61	7,49	
	0,489	7,38		
240	0,462	6,96	6,93	
	0,459	6,91		
300	0,428	6,42	6,43	
	0,429	6,44		
60	0,41	6,06	6,10	SDA
	0,41	6,14		
120	0,43	6,46	6,44	
	0,428	6,42		
180	0,472	7,11	7,06	
	0,465	7,00		
240	0,412	6,17	6,26	
	0,423	6,35		
300	0,39	5,83	5,85	
	0,392	5,86		
60	0,253	3,69	3,74	SDE
	0,260	3,80		
120	0,307	4,53	4,49	
	0,302	4,45		
180	0,325	4,81	4,73	
	0,315	4,66		
240	0,320	4,73	4,72	
	0,318	4,70		
300	0,290	4,27	4,25	
	0,288	4,23		
60	0,32	4,70	4,68	DE
	0,32	4,66		
120	0,35	5,14	5,05	
	0,33	4,95		
180	0,40	5,94	5,69	
	0,37	5,44		
240	0,33	4,94	4,80	
	0,32	4,66		
300	0,34	4,97	4,81	
	0,31	4,64		

ANEXO H

COMPROBACIÓN DE REQUISITOS DEL ANOVA PARA CONCENTRACIÓN DE PROTEINAS BSA (MG/ML)

Homocedasticidad

$$\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \cdots = \sigma_k^2 = \sigma^2$$



***H₀*:** Las varianzas son homogéneas.

***H₁*:** Las varianzas no son homogéneas.

Con un valor de P= 0.158 existe suficiente evidencia estadística para no rechazar *H₀*, por lo tanto la varianza de los datos presentan homocedasticidad.

ANEXO I

FORMATO PARA PRUEBA UMBRAL DE SABORES BÁSICOS

Nombre: **Fecha:**

Reconocimiento de sabores básicos

Pruebe, en orden descendente, cada una de las soluciones en el orden indicado en la ficha. Las soluciones pueden tener un gusto dulce, ácido, salado o amargo. Entre las soluciones con sabores básicos puede haber una o más muestras que tienen solamente agua. Identifique el sabor de la solución de cada uno de los vasos codificados. Enjuáguese la boca con agua antes de degustar y también entre muestra y otra.

CODIGO	SABOR

ANEXO J

FORMATO PARA PRUEBA DE PERFIL DE SABOR

Ficha de cata para CONCENTRADO PROTEICO de Salvado de Arroz

Perfil de Sabor

Nombre: **Fecha:**

Frente a Ud. hay una muestra de CONCENTRADO PROTEICO, pruébela y describa las características de sabor que están presentes en la misma

Marque con una X la casilla del término que más describe lo que usted siente por la muestra.

Atributos	**Intensidad percepción***					
Sabor	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Dulce						
Acido						
Amargo						
Salado						

*La intensidad de percepción está de acuerdo a la siguiente codificación:
0 = Ausencia total
1 = Casi imperceptible
2 = Ligera
3 = Media
4 = Alta
5 = Extrema

Comentarios: _____

_____

_____

MUCHAS GRACIAS!

BIBLIOGRAFÍA

1. ADLER-NISSEN, J. "Enzymatic hydrolysis of food proteins". Elsevier Applied Science Publishers. 1986

2. ADLER-NISSEN, J. "Proteases (T. Nagodawithana, & G. Reed, Éds)" Academic Press. 1993. 159-203.

3. ANDERSON, A. K., & GURAYA, H. S. "Extractability of protein in physically processed rice bran". Journal of American Oil Chemistry Society. 2001. 78 (9): 969-972.

4. APOSTOLATOS, G. "Protein isolate rich in methionine from the edible dry bean (*Phaseolus vulgaris L*.)". Journal Food Technology. 1984. 19: 233-237.

5. BADUI, S. "Química de los Alimentos". Ud. Alhambra Mexicana. 1994

6. BARDENAS, E., & CHANG, T.-T. "The Morphology and Varietal Characteristics of the Rice Plant". Los Baños, Laguna, The Philippines: IRRI. 1965.

7. BENITEZ, R., IBARZ, A., & PAGAN, J. "Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones". Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 2008. 42 (2): 227-236. Popayán, Colombia.

8. BETSCHART, A., FONG, R., & SAUNDERS, R. "Rice by products, Comparative extraction and precipitation of nitrogen from U.S. and Spanish bran and germ". Journal of Food Science. 1977. 42: 1088.

9. BOURGEOIS, C., & LE ROUX, P. "Proteínas animales". Primera Edición. México. 1986.

10. BRIDSON, E. "The development, Manufacture and control of Microbiological Cultura Media. Octava Edición. Basingtoke: Oxoid Ltd. 1998.

11. BRIDSON, E., & BRECKER, A. "Design and formulation of microbial culture media. Methods in Microbiology". Oxford (UK): Academic Press. 1970

12. BURKS, A., & HELM, R. "Hypoallerginicity of rice protein". The annual meeting of the American Association of Cereal Chemists. 1994

13. CAGAMPANG, G., CRUZ, L., ESPIRITU, S., & JULIANO, B. "Studies on the extraction and composition of rice proteins". Cereal Chemistry. 1966. 43: 145-155.

14. CHEFTEL, J., CUQ, J. L., & LORIENT, D. "Aminoácidos, péptidos, y proteínas". Food Chemistry. Director O. Fennema. Editorial Acribia S.A., Zaragoza – España. 1993. Pág. 275-414.

15. CHEFTEL, J., CUQ, J., & LORIENT, D. "Proteínas alimentarias". Editorial Acribia S.A., Zaragoza – España, 1989.

16. CHURCH , F., SWAISGOOD , H., PORTER , D., & CATIGNANI , G. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. J Dairy Sci. 1983. Pág. 66:1219-1227.

17. DE LA ROSA, A. Utilización papelera de fibras no madereras (kenaf y *Miscanthus sinensis*). Estudio de secuenciasde blanqueo ECF y TCF. Tesis doctoral, Departament d' Enginyeria Téxtil i Paperera, Universitat Politécnica de Catalunya. 2003.

18. EDIAGRO. (s.d.). Manual de instrucciones para operación y mantenimiento de medidor digital de blancura para arroz KETT C-300, Versión en español. Colombia.

19. FAO/WHO. Energy and Protein Requirements. FAO Nutrition Meetings Report Series No.52. WHO, Geneva, FAO, Rome. 1973.

20. FENNEMA, O., & TANNENBAUM, S. Introducción a la Química de los Alimentos (Ed. 2da.). Acribia. 1993

21. FOSCHIATTI, M., PERDUCA, M., SANTIAGO, L., RUBIOLO , A., & CARRARA, C. Estudio de formación y estabilidad de espumas formuladas con WPI y un galactomanano. XII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XII CYTAL). 2009.

22. FRANQUET BERNIS, J. M., & BORRAS PAMIES, C. Economia del arroz: Variedades y Mejora. Tortosa. 2004

23. GNANASAMBANDAM, R., & HETTUARACHCHY, N. J.Food Sci. 1995. Pág. 60:1066-1069, 1074.

24. GONZÁLEZ , J., & ROSERO, M. Morfología de la planta de arroz (éd. Segunda). Cali, Colombia: CIAT. 1981

25. HAMADA, J. Use of proteases to enhance solubilization of rice bran proteins. Journal of Food Biochemistry 1999. Pág. 23: 307-321.

26. HAMADA. Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases. Food Chemistry and Toxicology. 2000. Pág. 65 (2): 305-310.

27. HANMOUNGJAI, P., PYLE, D., & KIRANJAN, K. Enzyme-assisted water-extraction of oil and protein from rice bran. Journal Chemistry Technol. Biotechnol. 2002. Pág. 77: 771-776.

28. Helm, R., & Burks, A. (1996). Hypoallergenicity of rice bran protein. Cereal Food World, 41 (11): 839-843.

29. Hernandez , E. (2005). Evaluación Sensorial. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). Facultad de Ciencias Básicas e Ingeniería, 71-75.

30. Hettiarachchy, N. S., Griffin, V. K., & Gnanasambandam, R. (1996). Preparation and functional properties of a protein isolate from defatted wheat germ. Cereal. Cereal Chemistry, 73: 364-367.

31. Juliano, B. (1980). Properties of rice caryopsis. (L. B. S., Éd.) AVI Publishing Company.

32. Juliano, B. (1985). Rice Chemestry and Technology. (B.O.Juliano, Éd.) American Association of Cereal Chemists, 774.

33. KAEWKA, K., THERAKULKAIT, C., CADWALLADER, K. "Effect of preparation conditions on composition and sensory aroma. characteristics of acid hydrolyzed rice bran protein concentrate. Journal of Cereal Science. 2009.

34. Kahlon, T., & Chaow, F. (2000). In Vitro Binding of Bile Acids by Rice Bran, Oat Bran, Wheat Bran, and Corn Bran. Cereal Chemistry, 77 (4): 518-521.

35. Kammoun, R., Bejar, S., & Ellouz, R. (2003). Protein size distribution and inhibitory effect of wheat hydrolysates on Neutrase (R). Bioresource Technology, 90 (3): 249-254.

36. Kennedy, G., & Burlingame, B. (2003). Analysis of food composition data on rice from a plante genetic resources perspective. . Food Chemistry , 80, 589-596.

37. Kirk , R., & Othmer, D. (1963). Enciclopedia de Tecnología Química (éd. 10ma., Vol. 2). Boradd New York.

38. Knights, R. (1985). Processing and evaluation of the antigenicity of protein hydrolysates. Nutrition for station needs in infancy. (F. Lisshlpz, Éd.) Protein hydrolysates, 105-115.

39. Krishnan et al, H., White, J., & Pueppke, S. (1992). Characterization and localization of rice (Oryza sativa L.) seed globulins. Plant Science, 81: 1-11.

40. Kumagai, T., Kawamura, H., Fuse, T., Watanabe, T., Saito, Y., Masumura, T., Kadowaki , M. (2006). Production of rice protein by alkaline extraction improves its digestibility. Nutrition Science Vitaminol, 52: 467- 442.

41. Li, S., Zheng, D., & Kong , B. (2002). Study on function and characteristics of corn protein hydrolyzates. Shipin Gongye Keji, 23 (11): 42-45.

42. Lin, C., & Zayas, J. (1987). Functionality of defatted corn germ proteins in a model system: fat binding capacity and water retention. Journal of Food Science, 52: 1308-1311.

43. Lloyd, B. J., Siebenmorgen, T. J., & Brees, K. W. (2000). Effects of Commercial Processing on Antioxidants in Rice Bran. Cereal Chemistry, 77 (5): 551-555.

44. Mahajan, A., & Dua, S. (1995). Functional properties of rapeseed protein isolates. Journal of Food Science Technology, 32: 162-165.

45. Mahmoud, M. (1994). Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutrional products . Food Tech. , October: 89-94.

46. Mandac, B., & Juliano, B. (1978). Properties of prolamin of mature and developing rice grain. Phytochemistry. 17: 611-614.

47. Martínez, E. N., & Añón, M. C. (1996). Composition and structural characterization of Amaranthus protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. Journal of Agricultural Food Chemistry, 44: 2523-2530.

48. Morita, T., & Kiryama, S. (1993). Mass production method for rice protein insolate and nutricional evaluation. Journal of Food Science, 58: 1393-1396, 1406.

49. Noboru, I., & Tokuyasu, K. (1997). Debittering of protein hydrolysates usin Aeromonas caviae aminopeptidase . J. Agric. Food Chem., 45 (3): 543-545.

50. Osborne, T. (1924). The Vegetable Proteins (éd. 2nd). New York: Longmans and Green.

51. Otterbum, M. S. (1989). Dans Protein Quality and the Effects of Processing (p. 247). New York.

52. Pacheco, D. E., Peña, J., & Ortiz, A. (2002). Composición físico-química del aceite de salvado de arroz estabilizado por calor. Agronomía Tropical, 52 (2): 173-186.

53. Padhye, V., & Salunkhe, D. (1979). Extraction ad characterization of rice proteins. Cereal Chemistry. 56 (5): 389-393.

54. Parrado J., M. E. (2006). Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. Journal of Food Chemistry , 98:742-748.

55. Parrado, J., Miramontes, E., Jover, M., Gutierrez, J., Terán, L., & Bautista, J. (2006). Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. Food Chem, 98: 742-748.

56. Prakash, J. (1996). Rice bran proteins: Properties and food uses. Crit. Rev. Food Science. Nutr., 36 (6): 537-552.

57. Qu, e., Satoh, H., Ogawa, M., & Wei, X. (2001). Improved electrophoretical analyses for rice seed storage protein. Acta Genetica Sinica, 28 (8): 730-737.

58. Roncero, M., Colom, J., & Vidal, T. (2003). Influencia de los tratamientos enzimáticos con xilanasas en la composición de hidratos de carbono de pastas para papel. 8-15.

59. Saeed, M., & Cheryan, M. (1988). Sunflower protein concentrates and isolates low in polyphenols and phytate. . Journal of Food Science, 53: 1127-1131.

60. Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Vioque, J., Bautista , J., & Millán, F. (1999). Protein isolates from chickpea (Cicer arietinum L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. . Food Chemistry, 64: 237-243.

61. Sawai, H., & Morita, Y. (1970). Studies of γ globulin of rice embryo. Part II. Separation of three components of γ globulin by ion exchange chromatography. Agricultural Biology and Chemistry, 34:53.

62. Shih, F. (2003). Review: An update on the processing of high-protein rice products. Nahrung/Food, 47 (6): 420-424.

63. Shyur, L., Wen, T., & Chen, C. (1994). Purification and characterization of rice prolamins. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 35: 65-71.

64. Steemson, D., & Sathe, S. (1995). Characterization and digestibility of Basmati rice (Oryza sativa L. var. Dehraduni) storage proteins. Cereal Chemistry. 72 (3): 275-280.

65. Tsuji, H., Hiemori, M., Kimoto, M., Yamashita, H., Kobatake, R., Adachi, M., Utsumi, S. (2001). Cloning of cDNA encoding a soybean allergen, Gly m Bd 28K. Biochim. Biophys. Acta 1518, (pp. 178-182).

66. United States Department of Agriculture, & Economic Research Service. (2003, Marzo 12). Rice Outlook.

67. Vargas, E. M., & Aguirre, M. (2010). Estabilización y usos potenciales del salvado de arroz Colombiano para su aprovechamiento industrial sin afectar su calidad nutricional y funcional. Bogotá: Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano - UTADEO.

68. Villareal, R. M., & Juliano, O. B. (1978). Properties of glutelin of mature and developing rice grain. Phytochemistry. 17: 177-182.

69. Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., & Yust, M. y. (2001). Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. Grasas y Aceites, 52 (2): 127 – 131.

70. Wang, M., Hettiarachchy, N. S., M., Q., Burks, W., & Siebenmorgen, T. (1999). Preparation and functional properties of rice bran protein isolate . Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 411-416.

71. Watts, B., Ylimaki , G., Jeffery, L., & Elías, L. (1989). Métodos sensoriales básicos para la evaluación de los alimentos. Guatemala.

72. Wen, T., & Luthe, D. (1985). Biochemical characterization of rice glutelin. Plant Physiology. 78: 172-177.

73. Whitaker, J. (1994). Principles of enzymology for the food sciences. New York: Marcel Dekker.

74. Yamagata, H., Sugimoto, T., Tanaka, K., & Kasai, Z. (1982). Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds. Plant Physiology, 70-1094