



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS



Proyecto de Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, presentado como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniería en Alimentos

TEMA: Caracterización de las Proteínas de Tocte (*Juglans neotropica* Diels) y su Digestibilidad Gastrointestinal *in vitro*

Este trabajo es parte del proyecto: “**Aislamiento y caracterización de nuevos ingredientes funcionales a partir de proteínas de *Amaranto* y *Quinoa* para la elaboración de un alimento funcional**” aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por la Dirección de Investigación y Desarrollo (DIDE) de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución 1373-CU-P-2014. Coordinado por Ing. PhD Ismael Carrillo.

Autora: Silvia Estefania León Morejón
Tutor: PhD. Wilman Ismael Carrillo Terán

AMBATO – ECUADOR

Abril-2016

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Wilman Ismael Carrillo Terán

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.



Ph.D. Wilman Ismael Carrillo Terán

C.I: 17570800-4

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Silvia Estefanía León Morejón, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniería en Alimentos son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Silvia Estefanía León Morejón

C.I. 020208939-7

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:


Presidente del Tribunal


CL. 050187305-4
Mg. Ing. Mayra Liliana Paredes Escobar


CL. 050263518-8
Mg. Ing. María Teresa Pacheco Tigselema

Ambato, 25 de Febrero del 2016

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de éste proyecto de investigación o parte de él un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de éste Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando ésta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Silvia Estefania León Morejón

C.I. 020208939-7

AUTORA

DEDICATORIA

A toda mi familia, especialmente a mis padres Daniel y Marlene que en todo momento supieron darme fuerza y apoyo, a mis Hermanos Geovany, Patricio y Fernanda que de igual forma me brindaron un apoyo incondicional para culminar esta etapa Universitaria y cumplir con una meta más en mi vida.

A Oscar mi esposo, que ha sido mi apoyo incondicional, fue quien más me reto y me apoyo siempre para continuar la carrera estudiantil y el pilar principal para cumplir una más de mis metas, con su apoyo constante y amor incondicional.

Silvia

AGRADECIMIENTO

A Dios por haberme dado fortaleza para cumplir con mis metas propuestas durante mi vida estudiantil.

A la Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, por haberme capacitado en la Ciencia de los Alimentos y por la oportunidad de formarme como profesional.

Mi más sincera gratitud a mi tutor Dr. Ismael Carrillo, por haber aceptado guiarme en la ejecución del presente estudio. Gracias por su amistad, dedicación, tiempo y confianza depositada en mí, siendo una guía para la culminación de este trabajo.

Al Ing. Ruben Vilcacundo por brindarme su ayuda en la parte experimental de este trabajo.

A la Ing. Cecilia Carpio, por la ayuda brindada para el desarrollo de la investigación, por los conocimientos compartidos, gracias por ayudarme a resolver las dificultades y dudas originadas en este trabajo

Un agradecimiento al grupo que conforma Bio-Propepti por estar ahí presentes y dispuestos a compartir sus conocimientos, por haberme brindado su colaboración en la ejecución de este trabajo.

A mis amig@s, Johana, Belén, Vanessa, Fernanda, Wilma, Víctor, Alberto, quienes con una sonrisa supieron alegrarme y brindarme su amistad.

Silvia

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

| | |
|----------------------------------|----|
| 1.1 Tema de Investigación | 18 |
| 1.2 Justificación..... | 18 |
| 1.3 OBJETIVOS | 20 |
| 1.3.2 Objetivos Específicos..... | 20 |

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

| | |
|--|----|
| 2.1 Antecedentes investigativos | 21 |
| 2.2 Hipótesis..... | 22 |
| 2.2.1 Rendimiento de la proteína de Tocte aislada a diferentes pHs | 22 |
| 2.3 Señalamiento de variables de la hipótesis | 22 |

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|--------------------------|----|
| 3.1 Materiales..... | 23 |
| 3.1.1Materia prima | 23 |
| 3.1.2 Equipos..... | 23 |
| 3.1.3 Reactivos | 24 |

| | |
|---|----|
| 3.1.4 Insumos y utensilios | 24 |
| 3.2.1 Análisis proximal | 25 |
| 3.2.2 Precipitación Isoeléctrica | 25 |
| 3.2.3 Desengrasado de la harina de Tocte..... | 26 |
| 3.2.4 Aislamiento de la proteína de Tocte..... | 26 |
| 3.2.5 Fraccionamiento de la proteína de Tocte | 26 |
| 3.2.6 Cuantificación proteica | 27 |
| 3.2.7 Electroforesis SDS-PAGE 1D..... | 27 |
| 3.2.8 Digestibilidad gastrointestinal <i>in vitro</i> | 29 |
| 3.2.9 Digestión gástrica..... | 29 |
| 3.2.10 Digestión duodenal..... | 30 |
| 3.2.11 Actividad antioxidante del aislado proteico de Tocte | 30 |
| 3.2.12 Análisis estadístico..... | 30 |

CAPÍTULO IV

RESUSTADOS Y DISCUSIÓN

| | |
|--|----|
| 4.1 Análisis y discusión de resultados..... | 31 |
| 4.1.1 Análisis proximal | 31 |
| 4.3 Aislamiento de la proteína de Tocte..... | 32 |
| 3.2.5 Fraccionamiento de la proteína de Tocte (<i>Juglans neotropica</i> Diel)..... | 33 |
| 4.3 Cuantificación proteica | 34 |
| 4.4 Electroforesis SDS-PAGE 1D..... | 36 |
| 4.5 Geles SDS-PAGE a diferentes concentraciones de proteína de Tocte | 36 |
| 4.6 Electroforesis (SDS-PAGE) en ausencia y presencia de β -mercaptoetanol | 36 |
| 4.7 Fraccionamiento de las proteínas con diferentes solventes..... | 38 |

| | |
|--|----|
| 4.8 Digestibilidad gastrointestinal de las proteínas de Tocte..... | 39 |
| 4.8 Digestibilidad gastrointestinal de las proteínas fraccionadas..... | 41 |

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

| | |
|---------------------------------|----|
| 5.1 Conclusiones | 46 |
| 5.2 Recomendaciones..... | 47 |
| Referencias bibliográficas..... | 48 |
| Anexos..... | 55 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla I. Composición proximal de la harina y del aislado de Tocte | 31 |
| Tabla II. Rendimiento de la proteína de Tocte en base a 10 g | 33 |
| Tabla III. Rendimiento de la proteína fraccionada de Tocte en base a 10 g. | 34 |
| Tabla IV. Concentración de la proteína de Tocte en base a 10 g..... | 35 |
| Tabla V. Capacidad antioxidante de la proteína de Tocte. | 45 |
| Tabla VI. Datos de pesos a los diferentes pHs analizados para la determinación del rendimiento (en base a 10 g de muestra)..... | 57 |
| Tabla VII. Rendimientos en (%) calculados de lo pHs analizados, (en base a 10 g de muestra)..... | 57 |
| Tabla VIII. Datos de pesos de proteína fraccionada con diferente solvente | 59 |
| Tabla IX. Datos para la construcción de la curva estándar de BSA | 61 |
| Tabla X. Valores de rendimientos en (%)..... | 65 |
| Tabla XI. ANOVA para el rendimiento (%)..... | 65 |
| Tabla XII. Valores de concentración de proteína de Tocte mediante el método Biuret..... | 67 |
| Tabla XIII. ANOVA para la cuantificación proteica de Tocte (%) | 67 |
| Tabla XIV. Rendimientos en (%) de la proteína fraccionada de Tocte en base a 10 g. | 69 |
| Tabla XV. ANOVA para el rendimiento de la proteína de Tocte fraccionada (%)... .. | 69 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. A: nuez de Tocte (<i>Juglans neoropica</i> Diel), B: proceso de desengrasado de la harina de Tocte, C: Harina de Tocte después del desengrasado y secado a 40°C, D: aislado de Tocte liofilizado. | 26 |
| Figura 2. Aislados de proteína de Tocte a los pHs de 3,0; 4,0; 5,0; 6,0..... | 33 |
| Figura 3. Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA)..... | 35 |
| Figura 4. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2-β-mercaptoetanol. Línea 1: estándar de proteínas; línea 2: aislado de Tocte a 10 mg/ml; línea 3: aislado de Tocte a 5,0 mg/ml; línea 4: aislado de Tocte a 2,5 mg/ml; línea 5: aislado de Tocte a 1,25 mg/ml. | 36 |
| Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2-β-mercaptoetanol. Simulación gastrointestinal de albúminas aisladas con cloruro de sodio. Línea 1: estándar de proteínas; línea 2: aislado de Tocte a pH 5,0 (10 mg/ml); línea 3: proteínas aisladas con cloruro de sodio (albúminas), línea 4: digestión gástrica de Tocte a pH 3,0; línea 5: digestión duodenal a pH 7,0..... | 41 |
| Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2-β-mercaptoetanol. Simulación gastrointestinal de globulinas aisladas con cloruro de sodio (1 M). Línea 1: Estándar de proteínas; línea 2: aislado de Tocte a pH 5,0 (10 mg/ml); 3: proteínas aisladas con cloruro de sodio (globulinas); línea 4: digestión gástrica de Tocte a pH 3,0; línea 4: digestión duodenal a pH 7,0..... | 42 |
| Figura 7. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2-β-mercaptoetanol. Simulación gastrointestinal de globulinas aisladas con hidróxido de sodio (1 M). Línea 1: estándar de proteínas; línea 2: aislado de tocte a pH 5,0 (10 mg/ml); línea 3: digestión gástrica a pH 3,0; línea 4: digestión duodenal a pH 7,0..... | 43 |
| Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2-β-mercaptoetanol. Simulación gástrica de aislados proteicos de Tocte (<i>Juglans neotropica</i> Diels) Línea 1: estándar de proteínas; línea 2: aislado de Tocte a pH 5,0 (10 mg/ml); línea 3: prolaminas extraídas con etanol al 70%; línea 4: digestión gástrica de Tocte a pH 3,0; línea 5: digestión duodenal a pH 7,0..... | 44 |
| Figura 9. Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA)..... | 61 |
| Figura 10. Curva estándar de Trolox (μmoles/g)..... | 63 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| AOAC | Asociación de Química Analítica Oficial |
| ABTS: | Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenziazolina-6-sulfónico |
| C.V | Coefficiente de variación |
| D.S: | Desviación estándar |
| EtOH | Etanol |
| FAO: | Organización de Agricultura y Alimentos |
| MCDS: | Ministerio de Coordinación de Desarrollo Social |
| NaCl-P | Precipitado de cloruro de sodio |
| NaCl-S | Sobrenadante de cloruro de sodio |
| p/v: | Peso/volumen |
| PAGE: | Electroforesis en gel de poliacrilamida |
| PI: | Punto isoeléctrico |
| PM: | Peso molecular |
| PSA: | Persulfato de amonio |
| SGF | Fluido gástrico simulado |
| SIG: | Fluido intestinal simulado |
| SENPLADES: | Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo |
| TEMED: | Tetrametiletilenediamina |

RESUMEN

El Tocte (*Juglans neotropica* Diels) es una especie nativa de América del Sur, especialmente se encuentra en Ecuador, Colombia, Venezuela y Perú. Esta especie se halla en peligro de extinción. Al analizar la nuez se encontró que posee un 49,1% de grasa, 14,3% de carbohidratos y 17,7% de proteína. Por esta razón, la nuez de Tocte se convierte en una fuente de proteína vegetal para consumo humano. En el presente estudio se caracterizaron las proteínas de reserva Tocte (*Juglans neotropica* Diels), para ello las proteínas fueron aisladas mediante el método de precipitación isoeléctrica. El aislado proteico obtenido a pH 5,0 presentó el mayor rendimiento con un valor de 21,64% con un elevado contenido de proteína igual a 74,8%. Por el método de electroforesis SDS-PAGE se identificaron los pesos moleculares aproximados de las proteínas, observándose bandas entre 10-75 kDa. Mediante solubilización con diferentes solventes se fraccionaron las proteínas de reserva presentes en la nuez de Tocte, logrando obtener albúminas, globulinas, glutelinas y prolaminas la fracción mayoritaria fueron las albúminas con un valor de 34,38% y la fracción minoritaria fueron las prolaminas con un 7,12%. Se evaluó la digestibilidad *in vitro* de las proteínas de Tocte, encontrándose que fue totalmente hidrolizada al pH 1,0; mientras que a pH 2,0 y 3,0 se observó una banda con peso molecular de 6 kDa y en la digestión duodenal todas las proteínas fueron totalmente hidrolizadas. Finalmente, se determinó la actividad antioxidante mediante el método ABTS⁺ de los aislados proteicos encontrándose que fueron activos.

Palabras claves: Tocte, proteínas, digestibilidad gastrointestinal *in vitro*, actividad antioxidante

SUMMARY

The Tocte (*Juglans neotropica* Diels) is a native species from South America, especially found it in Ecuador, Colombia, Venezuela and Peru. This species is endangered. Assay shows the nut have 49,1% fat, 14,3% carbohydrate and 17,7% protein. Therefore, Tocte nut becomes a source of vegetable protein for human. On this study are characterized Tocte, the protein were separated by isoelectric precipitation method. The protein solution obtained at pH 5,0 has the highest yield 21,64% with high protein content 74,8%. The approximate molecular weights of protein were identified by SDS-PAGE electrophoresis method, observed between 10-75 kDa bands. Proteins storage of Tocte were fractionated with different solvents, managing to get albumins, globulin, glutelin and prolamin, where albumin was higher with 34,38% and prolamins was lower 7,12%. Digestibility in vitro of tocte's protein was evaluated, it were totally hydrolyzed at pH 1,0, while to pH 2,0 and 3,0 were seen a 6 kDa molecular weight band and the duodenal digestion all proteins were fully hydrolyzed. Finally, the antioxidant activity was determined by the ABTS method of protein isolates were found to active.

Keywords: Tocte, proteins, digestibility in vitro, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

El Tocte es una especie monoica perteneciente a la familia botánica *Juglandaceae* y del género *Juglans* originario de (Ecuador, Colombia, Venezuela y Perú), en el Ecuador es conocida con los nombres comunes de Nogal y Tocte. Tiene múltiples usos, genera madera de alta calidad, produce una nuez muy apetecida, contiene aproximadamente el 66% de ácidos grasos insaturados, 18% de proteínas y es una fuente importante de potasio, hierro, fósforo y vitaminas E, A, C; la corteza, las hojas y los frutos son ricos en taninos que se usan como tintes para textiles (**Forestal (2007); (Nieto y Rogríguez, 2010)**). El fruto es una drupa de color pardo a negro, son comestibles, pues al romperlas se obtiene una nuez de buen sabor, también usada en la elaboración de artesanías; y sus hojas poseen propiedades medicinales (**Forestal, 2007; Vargas, 2002**).

Desde la antigüedad se estudian componentes de los alimentos como ingredientes de interés para la salud de las personas, componentes derivados de las proteínas, lípidos, oligosacáridos, minerales, vitaminas y antioxidantes, por ejemplo los péptidos que se encuentran inactivos dentro de las proteínas, pero que pueden liberarse mediante hidrólisis *in vitro* y pueden ejercer distintas funciones fisiológicas en el organismo de las personas. En estudios recientes se han identificado péptidos con actividad antihipertensiva péptidos con propiedades antitrombóticas, antimicrobianos, sedantes, analgésicas y los antioxidantes con beneficios frente ciertos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (**Juárez y Perote, 2010; M. Juárez, 2007; Rada, 2012**). Según **Sakanaka et al., (2004)** los aminoácidos de dichas proteínas son conocidos como efectivos antioxidantes primarios y sinergistas. Tales proteínas también desempeñan un papel importante en la dieta diaria de las personas por su aporte de aminoácidos esenciales (aminoácidos que no puede sintetizar el cuerpo humano). Las proteínas con mejores propiedades son de origen animal debido a que cumplen con los requerimientos nutricionales para los humanos y presentan funcionalidades adecuadas pero debido al alto costo de las mismas, las proteínas vegetales son el principal componente en la dieta equilibrada para gran parte de la población mundial (**Grajales Muñiz, 2005; Mora, 2007; Pilosof y Bartholomai, 2000**).

Las proteínas poseen propiedades y características físico-químicas que las diferencian unas de otras, por medio de ellas pueden ser separadas y aisladas de sus fuentes. Entre las propiedades más importantes se menciona la solubilidad, el punto isoeléctrico, la desnaturalización, la solvatación o hidratación, la densidad y el comportamiento en presencia de sales. Tales propiedades se pueden aprovechar para el aislamiento y purificación, mediante diferentes métodos, uno de los más utilizados es el de precipitación isoeléctrica, algunos autores utilizan para la precipitación de proteínas de origen vegetal (**Grajales Muñiz, 2005**). Diferentes estudios utilizan la solubilidad de las proteínas para obtener diferentes fracciones. Para ello, utilizan diferentes solventes por ejemplo las albuminas son solubles en agua, pero también solubles en soluciones salinas, en cambio las globulinas son insolubles en agua, pero se disuelven en soluciones neutras de sales como el cloruro de sodio y las proteínas coaguladas son insolubles en agua, soluciones salinas, ácidos y álcalis diluidos, estas proteínas se disuelven en ácidos minerales y álcalis fuertes (**Rivera, 2005**).

Uno de los métodos más utilizados para la caracterización de las proteínas es la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) el cual permite determinar el peso molecular (PM) de las proteínas, donde el SDS es un detergente aniónico, que otorga a todas las proteínas de carga negativa (-) facilitando la migración hacia el ánodo que posee carga positiva (+), separando las proteínas por tamaño (**Arias, 2013**).

La obtención de hidrolizados proteicos se puede llevar a cabo mediante métodos físicos, químicos o enzimáticos, estos últimos son utilizados específicamente para producir hidrolizados con finalidades nutricionales. Tal hidrólisis es llevada a cabo por proteasas, las cuales hidrolizan enlaces peptídicos, dando lugar a la mezcla de péptidos y aminoácidos (**Vioque, 2000**). La digestibilidad es uno de los parámetros más utilizados para determinar la calidad de las proteínas. Uno de los métodos que generalmente se aplica para la digestibilidad de las proteínas es el enzimático, ensayo que se basa en crear un medio muy similar al de las personas con una mezcla de enzimas y sales biliares (**Jiménez et al., 2011**). Los métodos *in vitro* e *in vivo* tienen una correlación entre 0.9 y 0.99, razón por la cual es un método recomendado para estudios nutricionales, también algunos estudios sugieren como un método de identificación de proteínas alergénicas (**Moreno, 2007**).

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 Tema de Investigación

Caracterización de las proteínas de Tocte (*Juglans neotropica* Diels) y su digestibilidad gastrointestinal *in vitro*.

1.2 Justificación

En la industria alimentaria durante la elaboración de diversos aceites como el de soja, girasol o colza se generan productos de desecho llamados harina o tortas (**Terwitte *et al.*, 1987; Vioque *et al.*, 2006**). Se ha visto que estos sub-productos contienen una elevada cantidad de proteína que podría ser empleada como ingrediente funcional. Sub-productos similares con un elevado contenido en proteína se desechan durante la obtención de aceites reconocidos por sus propiedades beneficiosas para la salud, como podría ser el aceite de Tocte (*Juglans neotropica* Diels), rico en ácidos grasos insaturados omega 3 y 6. Sin embargo, a pesar del elevado valor potencial de estos sub-productos, no hay suficiente información en la bibliografía, sobre las características y las propiedades de las proteínas contenidas en los mismos. Según **Valencia *et al.* (2015)** la torta y demás residuos sólidos de la extracción del aceite de soja, ingresará al Ecuador sin pagar aranceles hasta diciembre del 2016, beneficiando así algunas industrias ecuatorianas, que podrían hacer uso de este sub-producto para la obtención de aislados proteicos para la industria alimentaria. El aislado proteico de Tocte puede ser una alternativa para sustituir estas importaciones.

En la actualidad existe un interés creciente por la obtención de productos proteicos vegetales destinados para consumo humano debido, principalmente a los beneficios que nos pueden aportar las proteínas con sus diferentes propiedades nutricionales como son los aminoácidos esenciales, propiedades funcionales de hidratación, espumante, emulsionante, gelificante y propiedades biológicas como antioxidante, antitumoral, antitrombótica, opioide e inmunomoduladora (**Añon, 2009**).

Los consumidores están cada vez más concienciados de la relación existente entre la dieta y la salud, lo que ha impulsado el desarrollo y comercialización de alimentos con propiedades beneficiosas como son los alimentos funcionales, que son componentes biológicamente activos que ofrecen beneficios para la salud (**Juárez y Perote, 2010**).

En el Ecuador el 26 % de niños sufre de desnutrición por una alimentación pobre en proteína animal (**MCDS, 2013**). El consumo de proteínas de origen vegetal, aunque bajos en ciertos aminoácidos podría complementar las proteínas de origen animal (**FAO, 2013**). En el país existe un problema de desnutrición infantil, obesidad y sobrepeso, donde algunos de los objetivos que plantea **Senplades (2013)** es erradicar la desnutrición crónica en niños menores de 2 años y revertir la tendencia de la incidencia de obesidad y sobrepeso en niños de 5 a 11 años, para así mejorar la calidad de vida y garantizar la salud de la población ecuatoriana.

Actualmente, en el Ecuador el Tocte es una especie en peligro de extinción, se encuentra afectada por la deforestación, debido a su alto valor comercial para la industria maderera (**Cárdenas y Salinas, 2006; Ortega, 2007; Quintero y Villegas, 2012**). Por tal razón, la caracterización de las proteínas y la descripción de sus actividades biológicas permitirán revalorizar a la nuez de Tocte, incentivando así a los agricultores a producir esta planta en peligro de extinción. Otra de las razones por la que se desea investigar el Tocte es con el fin de brindar a la población nuevas fuentes alternativas de proteína que tenga un buen balance nutricional, proteínas con alta digestibilidad y que sean de fácil extracción a nivel industrial, beneficiando así a la industria ecuatoriana, siguiendo la línea de la nueva matriz productiva donde el actual gobierno del Ecuador busca fomentar el consumo de productos elaborados con materia prima ecuatoriana, aumentando la productividad de los sectores agrícolas y evitando así las importaciones. También este proyecto será un aporte en el área de investigación de los alimentos funcionales.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Caracterizar las proteínas de Tocte (*Juglans neotropica* Diels) y su digestibilidad gastrointestinal *in vitro*.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Aislar las proteínas de harina de Tocte.
2. Identificar el perfil de proteínas mediante electroforesis unidimensional.
3. Evaluar la actividad antioxidante de las proteínas.
4. Determinar la digestibilidad gastrointestinal *in vitro* de las proteínas.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes investigativos

En lo que se refiere a investigaciones de caracterización de las proteínas de Tocte (*Juglans neotropica* Diels) no se ha encontrado antecedentes investigativos acerca del aislamiento de las proteínas, específicamente de la especie que se encuentra en el Ecuador y se ha tomado como referencia algunas de las investigaciones realizadas con la especie de (*Juglans regia* L.).

Según, **Sze-Tao y Sathe (2000)**, la nuez de Tocte por su valioso contenido en proteínas de 16,66%, en el estudio encontraron que las glutaminas forman la mayor parte con el 70,11% seguido de las globulinas con 17,57% y en menor cantidad las albúminas con 6,81% y finalmente las prolaminas con 5,33%.

Según un estudio realizado por **Mao et al. (2014)**, en el estudio de composición de aminoácidos, distribución de pesos moleculares de nogal (*Juglans regia* L.) y el fraccionamiento de proteínas, las glutaminas representan el 72,06% aisladas con NaOH seguidas de las globulinas con el 15,67 %, aisladas con NaCl. En el análisis de (SDS-PAGE) los autores mencionan que las glutaminas se encuentran con bandas de peso molecular entre 14,4 y 66,2 kDa.

Los primeros estudios de caracterización de proteínas se han encontrado sobre el amaranto (*Amaranthus caudatus* L). **Añón y Martínez (1996)** realizaron la extracción de la proteína de amaranto a diferentes pHs de solubilidad y precipitación, dichos autores evaluaron la influencia que tiene los pHs en la composición y precipitación de las proteínas de amaranto. También se han realizado investigaciones de la caracterización de otras proteínas de diferentes fuentes vegetales como la de la quinua, chíá, girasol entre otras. (**Manzo, 2006; Oliveros y Paredes, 2012; Salgado, 2009**).

Debido a la escases de la planta de Tocte (*Juglans neotropica* Diels) en toda Latinoamérica la mayor parte de estudios realizados de esta especie son relacionados con el rescate y germinación, por su baja capacidad germinativa (**Peña et al., 2014**;

Villegas, 2012), también en el Ecuador se han realizado estudios de extracción de aceite y el respectivo análisis de ácidos grasos (Calapiña, 2014).

2.2 Hipótesis

2.2.1 Rendimiento de la proteína de Tocte aislada a diferentes pHs

Hipótesis Nula

Ho: El pH no tiene influencia en el rendimiento de la proteína de Tocte y en la cuantificación proteica.

Hipótesis Alternativa

Ha: El pH si tiene influencia en el rendimiento de la proteína de Tocte y en la cuantificación proteica.

2.3 Señalamiento de variables de la hipótesis

2.3.1 Variables independientes

- Diferentes pHs de precipitación de la proteína.

2.3.2 Variables dependientes

- Rendimiento de la proteína de Tocte
- Contenido proteico de Tocte

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas experimentales se desarrollaron en el laboratorio de Alimentos Funcionales en el Grupo Biopropepti en la Facultad Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

3.1 Materiales

3.1.1 Materia prima

Para los primeros ensayos se utilizó torta de Tocte, luego se utilizó la nuez de Tocte proveniente de la Provincia Bolívar, Cantón San José de Chimbo.

3.1.2 Equipos

- Agitador VWR
- Agitador eléctrico vortex Mixer
- Balanza analítica Precisa gravimétrica AG Pietikon
- Balanza analítica OHAUS Modelo V71P30T
- Balanza granataria Modelo VWR-224AC
- Cámara Fotográfica
- Congelador Panasonic Healthcare ultra-low Temperature freezer
- Centrifuga, eppendorf Modelo 5702
- Liofilizador Bench Top Pro with Omnitronics Modelo BTP-3ES0VW
- Congelador Mabe
- Equipo de electroforesis, mini-protean, Tetra System, BIO-RAD
- Espectrofotómetro convencional de haz simple Modelo DR-500
- Estufa lan incubator Modelo In-010
- Microcentrifuga Labnet Modelo C2400-B
- Micro incubador, Esco, Provolcell Shaking
- pHmetro Mettler Toledo
- pHmetro Thermo Scientific Orion Star A211
- Refrigerador Indurama Modelo RI-470

- Kit para electroforesis Bio-Rad
- Unidad destiladora de agua, Easy Linea 150

3.1.3 Reactivos

- Ácido acético glacial
- Azul de bromofenol, # 161-0404, BIO-RAD
- Bis-acrilamida, # 161-0158, BIO-RAD
- Bis-acrilamida, # 15512-023, Invitrogen
- Bicarbonato de sodio
- Cloruro de sodio
- Cloroformo
- Coomassie blue R, Blue R-250, # 161-011, BIO-RAD
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) # 161-0302, BIO-RAD
- Estándar de proteínas, Dual Color, # 161-0374, BIO-RAD
- Estándar de proteínas SDS-PAGE, # 161-0318, BIO-RA
- Glicina # 161-0724, BIO-RAD
- Glicerol, Invitrogen # 15514-011
- Hidróxido de sodio
- Hidróxido de potasio
- 2-β-mercaptoetanol # 161-0710, BIO-RAD
- Persulfato de amonio (PSA), # 161-0700, BIO-RAD
- Pepsina from porcine gastric mucosa # P6887-106
- Pancreatina
- Sulfato de cobre pentahidratado
- Tris (C₄H₁₁NO₃) # 161-0716, BIO-RAD
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyletilendiamina), BIO-RAD
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyletilendiamina), Invitrogen
- Yoduro de potasio

3.1.4 Insumos y utensilios

Agua destilada, guantes, material de vidrio, bandejas plásticas, espátulas, gradillas, papel absorbente, papel de filtro, parafilm, tubos eppendorf , tubos para centrifuga de

50, 1 y 2 mL, micropipetas, puntas, mortero, pistilo, papel filtro, envases de plásticos, papel de aluminio.

3.2 Métodos

3.2.1 Análisis proximal

Se realizó el análisis proximal: humedad, carbohidratos, proteína, grasa y fibra de la harina de Tocte y del aislado proteico a pH 5.0 en el Laboratorio de Control y Análisis de Alimentos (LACONAL), mediante métodos de la (AOAC, 2012).

3.2.2 Precipitación Isoeléctrica

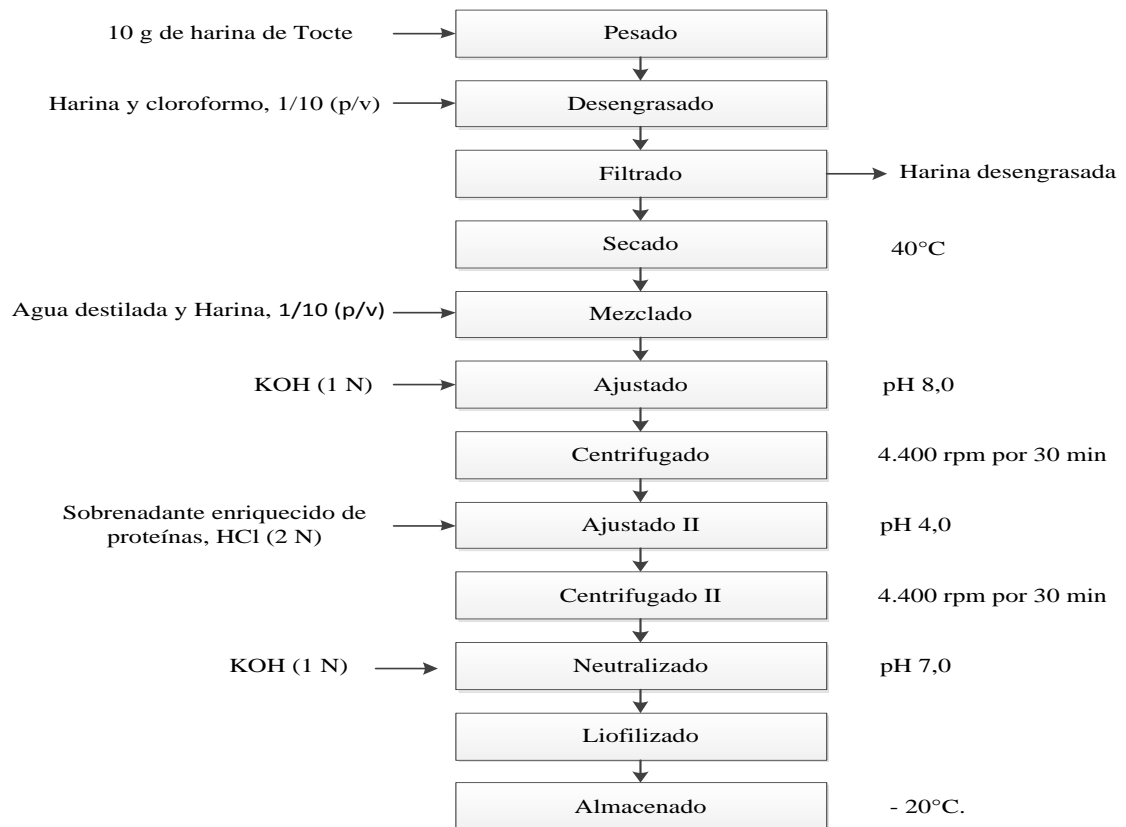


Figura 1. Diagrama de flujo para la precipitación isoelectrica de la proteina.

Elaborado por: Silvia León.

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales (Ambato-2016).

3.2.3 Desengrasado de la harina de Tocte

La harina de Tocte se desengrasó con solvente (cloroformo) en relación 1:10 (p/v), con agitación constante durante 12 horas, a continuación se filtró en papel de filtro y se secó en una estufa de convección lan incubator Modelo In-010 a 40°C. .

3.2.4 Aislamiento de la proteína de Tocte

Para el aislamiento de la proteína se aplicó el método de precipitación isoelectrica descrito por (Añón y Martínez, 1996) con algunas modificaciones. Se disolvió la harina de Tocte en agua destilada en una relación 1:10 (p/v) y se ajustó a pH 8,0 con KOH 1,0 N a continuación se realizó una agitación constante durante 10 minutos, centrifugando a 4.400 rpm durante 30 minutos, el sobrenadante resultante se ajustó a pH 4,0 con HCl 2,0 N y se mantuvo por 20 minutos en agitación constante, a continuación se realizó una segunda centrifugación a 4.400 rpm durante 30 minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante para desecharlo, finalmente la proteína aislada se ajustó a pH 7,0 con KOH 2,0 N con el fin de neutralizar la proteína. En un liofilizador Bench Top Pro with Omnitronics modelo BTP-3ES0VW las muestras aisladas fueron liofilizadas y se almacenó -20°C hasta sus respectivos análisis. Se realizó por triplicado a los pHs de 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 y se calculó el porcentaje de proteína en peso seco de Harina de Tocte liofilizada. (Anexo A).

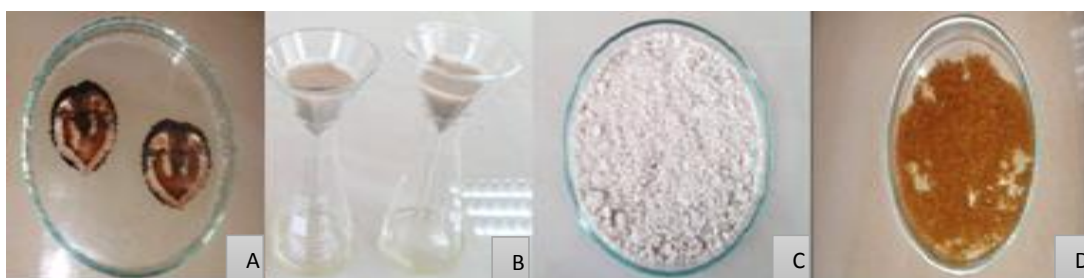


Figura 1. A: nuez de Tocte (*Juglans neoropica* Diel), B: proceso de desengrasado de la harina de Tocte, C: Harina de Tocte después del desengrasado y secado a 40°C, D: aislado de Tocte liofilizado.

3.2.5 Fraccionamiento de la proteína de Tocte

Para el fraccionamiento de la proteína de Tocte se utilizó el método de (Osborne, 1924) con algunas modificaciones.

Se realizó la fracción de (albuminas+globulinas) con NaCl 1,0 M en una relación 1:10 (p/v), se ajustó a pH 8,0 con agitación constante por 10 minutos, se centrifugó a 4.400 rpm durante 30 minutos, el precipitado (albuminas) y sobrenadante (globulinas) se ajustó a pH 5,0 también se fraccionó con NaOH 0.1 M para la extracción de las (gluteninas) y el etanol al 70% para las (prolaminas), los precipitados se almacenaron a -86 °C para luego ser liofilizadas.

3.2.6 Cuantificación proteica

El método utilizado para la cuantificación de la proteína aislada de Tocte fue el método de Biuret descrito por (**Gornall *et al.*, 1949**).

Reactivo Biuret: para la solución se utilizó tartrato sódico-potasico (9 g), sulfato de cobre pentahidratado (3 g) y yoduro de potasio (5 g). Los reactivos mencionados se disolvieron en el orden mencionado en 400 mL de NaOH 0,2 M y se agregó 600 mL de agua destilada.

Preparación de la muestra: en un tubo eppendorf se pesó entre 7,8 a 8 mg de proteína aislada, se agregó 1 mL de agua destilada a continuación se adicionó 0,75 µl NaOH 0,2 M y se mantuvo en agitación por 15 minutos.

Se preparó una segunda muestra en una relación 1:5 (1,25 ml de reactivo de Biuret + 250 µl de muestra), luego se centrifugó por 30 minutos a 13.000 rpm, durante este tiempo la base de los tubos eppendorf se dejó reposar en congelación, luego con mucho cuidado se procede a realizar la lectura en un espectrofotómetro modelo DR 5000 a 550nm frente a un blanco sin proteína.

Preparación del Blanco: 1 mL de agua destilada + 75 µl NaOH 0,2 M.

Los resultados obtenidos se extrapolaron a una gráfica patrón elaborada con concentración conocida de albúmina de suero bovino (BSA).

3.2.7 Electroforesis SDS-PAGE 1D

Para el análisis de las proteínas del Tocte se utilizó el método descrito por (**Laemmli, 1970**).

Se preparó una solución de Tocte a una concentración de 10 mg/mL, luego para la preparación de la muestra se tomaron 200 µl de la solución y se mezcló con 200 µl

de una solución tampón (agua destilada, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; glicerol, SDS al 10%, 2-β-mercaptoetanol y azul de bromofenol), calentando la muestra en un microincubador por 10 minutos, 400 rpm a 80°C.

Para el análisis de la muestra se utilizó un equipo de electroforesis Mini-protean Tetra System, formando geles con 1mm de espesor, a diferentes concentraciones de poliacrilamida, el gel concentrador o superior se realizó con una concentración del 4% y el gel separador o inferior del 12%, algunos geles también se realizaron a una concentración del 16%, en ausencia y presencia de 2-β-Mercaptoethanol (β-ME) para la reducción de los puentes disulfuro S-S. En el gel separador se utilizó agua destilada, Tris HCl 1M pH 8,8; acrilamida (30%), SDS (10%), tetrametiletilenediamina (TEMED), persulfato amónico, PSA, (10%) y para el gel separador Tris-HCl 1,5 M pH 6,8; acrilamida (30%), SDS (10%), TEMED, PSA (10%). Para determinar los pesos moleculares de las proteínas del Tocte se utilizó un estándar pesos moleculares de la marca Bio Rad # 161-0317 el cual abarca la franja de pesos moleculares de 6 a 198 kDa, también se utilizó para algunos ensayos un estándar con franjas de colores Dual Color de Bio Rad # 161-03734 el cual abarca las franjas de 10 a 250 kDa.

La separación de las proteínas de Tocte se realizó en una cámara de electroforesis vertical utilizando el equipo BIO-RAD Mini-protean Tetra System, con una solución de tampón de corrida (Tris-HCL, Glicina, SDS).

El volumen de la muestra que se adicionó en los pocillos para el análisis fue de 20 µl, las corridas se llevaron a 200 [V] continuos durante 30 minutos. Finalizada la electroforesis los geles fueron teñidos con una solución de Coomassie brilliant blue R-250 durante toda la noche. Al día siguiente los geles fueron desteñidos con una solución formada por (50 % Metanol, 5% Ácido acético y 45% Agua). Una vez desteñidos se realiza un lavado con agua destilada y se procedió a realizar las fotografías de los geles con una cámara digital de 5 megapíxeles.

3.2.8 Digestibilidad gastrointestinal *in vitro*

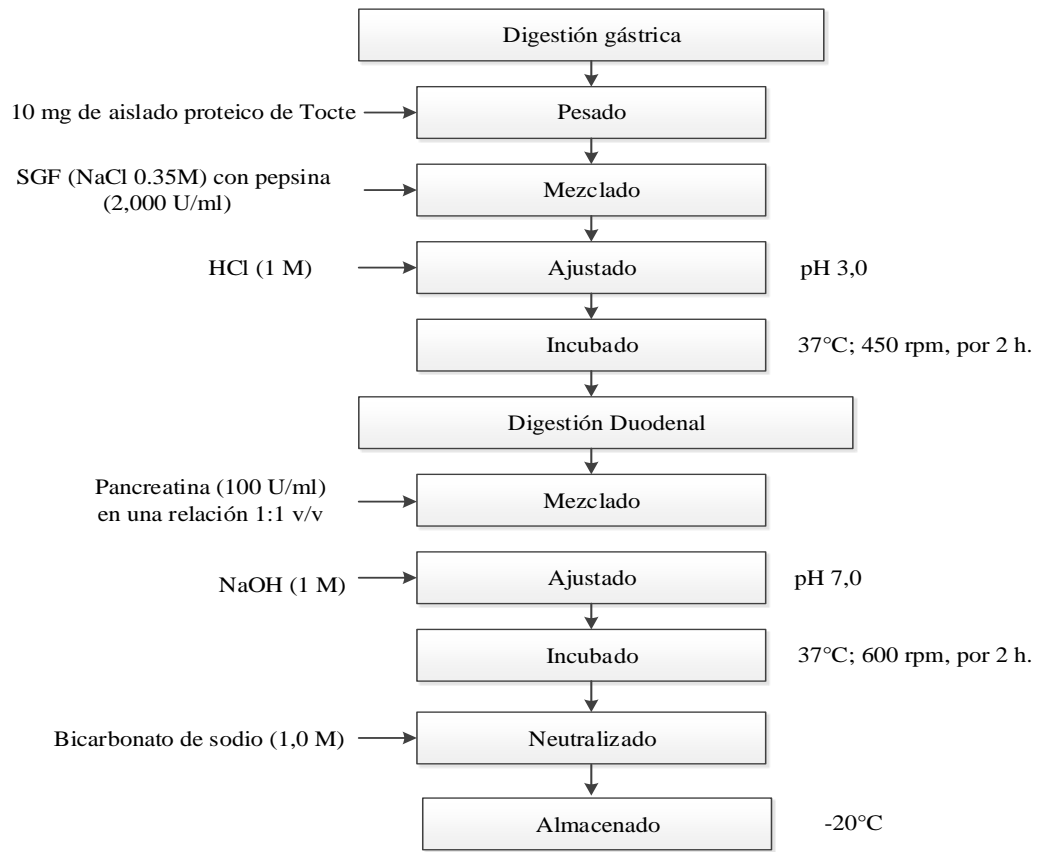


Figura 1. Diagrama de flujo para la digestibilidad gastrointestinal de las proteínas de Tocte (*Juglans neotropica* Diels)

Fuente: (Minekus *et al.*, 2014).

3.2.9 Digestión gástrica

Para la digestión gástrica se pesó 10 mg/ml de la proteína de Tocte liofilizada, en tubos eppendorf de 2 mL, luego las muestras fueron sometidas a digestión gástrica en (SFG) formado por NaCl 0,35 M a los pHs de 1,2; 2,0; 3,0. La mezcla se realizó en una relación 1:1 (2,000 U pepsina/mL de SGF). La digestión se llevó a cabo en un microincubador Esco, Provolcell Shaking a 37°C por 2 horas y 450 rpm, una vez terminada la digestión se adicionó 200 µl de bicarbonato de sodio 1 M para la inactivación de la enzima. A continuación se llevó a 80°C a 450 rpm por 10 minutos para asegurarnos que la enzima se inactive completamente. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su respectivo análisis en electroforesis SDS-PAGE.

3.2.10 Digestión duodenal

Para la fase duodenal se realizó la mezcla en una relación 1:1 v/v, 1 mL de hidrolizado de la fase gástrica con 1 mL de una solución formada por (100 U de pancreatina, 10nM de sales biliares, 1,5 mM CaCl₂) y se ajustó a pH 7,0. La digestión se llevó a cabo en el microincubador Esco, Provolcell Shaking en las mismas condiciones de la digestión gástrica. De igual manera se almacenaron las muestras a -20°C hasta su análisis en electroforesis SDS-PAGE.

3.2.11 Actividad antioxidante del aislado proteico de Tocte

Se estudió la actividad antioxidante de la proteína aislada, mediante el método de ABTS^{•+} (Re *et al.*, 1999).

Según la metodología desarrollada por Re *et al.* (1999). El radical ABTS^{•+} se obtuvo tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final), donde se incubado a temperatura ambiente 25°C y en la oscuridad durante 16 horas. Una vez formado el radical ABTS^{•+} se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0,70 a 754 nm.

Con el fin de evaluar la capacidad antioxidante de la proteína liofilizada a pH 5,0 de Tocte, se preparó mezclas de 1 mL de la solución diluida de ABTS^{•+} con 7-8 mg de proteína de Tocte se diluyo con etanol hasta que se producir una inhibición del 20%, en comparación con la absorbancia del blanco, tras añadir 20 µL de la muestra, a 980 µL de la dilución del radical ABTS^{•+} así generado se determinó la absorbancia 754 nm, y se procedió a añadir 20 µL de la muestra y nuevamente se repitió la absorbancia 754 nm pasado 1 minuto. La absorbancia se mide de forma continua transcurridos 7 minutos.

3.2.12 Análisis estadístico

Las variables de respuesta fueron el rendimiento de la proteína aislada a los pHs 3,0; 5,0; 5,0; 6,0 y la cuantificación de la proteína mediante el método de Biuret, a los resultados se les aplico un análisis de varianza, utilizando statgraphics Centurion XV.II con el fin de determinar la diferencia estadísticamente significativa entre los valores obtenidos para cada variable respuesta.

CAPÍTULO IV

RESUSTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis y discusión de resultados

4.1.1 Análisis proximal

Alimentos como el huevo y la leche contienen entre un 13% y 3,5% de proteína respectivamente (FAO, 2015). La albúmina en el huevo y la caseína en la leche tienen un valor biológico entre 0,9 y 1 (eficacia del 90-100%, por lo que se usan como proteínas de referencia), se consideran así por poseer todos los aminoácidos esenciales en buenas proporciones y nutricionalmente son superiores a otras proteínas como el maíz, trigo, soja entre otras (FAO, 1992). En cuanto a la calidad proteica de la nuez de Tocte existen muy pocas investigaciones y se ha tomado de referencia algunas investigaciones de la especie de (*Juglans regia* L) y de otras fuentes proteicas.

Tabla I. Composición proximal de la harina y del aislado de Tocte

| Componente | Proteína (%) | Grasa (%) | Cenizas (%) | Fibra (%) | Carbohidratos (%) | Humedad (%) |
|------------|--------------|-----------|-------------|-----------|-------------------|-------------|
| Harina | 17,7 | 49,1 | 2,10 | 10,6 | 14,3 | 6,22 |
| Aislado | 74,8 | 10,5 | 2,66 | 0,13 | 6,7 | 5,23 |

Fuente: Laboratorio de control y Análisis de Alimentos (LACONAL).

La **Tabla I** muestra los resultados de la composición proximal en base seca de la nuez de Tocte (*Juglans neotropica* Diels), los análisis revelaron que la nuez posee un alto contenido en grasa de 49,1% seguido de un contenido significativo de proteína de 17,7%, un valor cercano a la especie de (*Juglans regia* L) la cual contiene 16,66% de proteína descrito por **Sze-Tao y Sathe (2000)**. Se puede considerar un valor alto de proteína con respecto a las reportadas de otras fuentes vegetales como son los cereales entre el 7-13% (**Vioque et al., 1999**). Los pseudocereales como la quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) con el 15% de proteína y el amaranto (*Amaranthus caudatus* L) aproximadamente con el 14-18 % (**Abugoch James, 2009; Bressani et al., 1989**).

También se realizó el análisis proximal del aislado (**ANEXO I**) con el fin de analizar el contenido de proteína y los componentes no proteicos. La **Tabla I** muestra el análisis proximal del aislado a pH 5,0 presentando una riqueza proteica del 74,8%, un valor cercano a la especie (*Juglans regia* L) el cual contiene una riqueza de 75,56%, descrito por **Mao y Hua (2012)**. Comparando con otras fuentes vegetales como el amaranto (*Amaranthus caudatus* L) que posee el 90% reportado por **Añón y Martínez (1996)** y el de quinua (*Chenopodium quinoa*) con 83,5% (**Manzo et al., 2006**), todos estas especies vegetales presentan valores altos en comparación con el Tocte. La concentración proteica puede variar dependiendo de la especie, el método aplicado o el pH del aislado usado para el análisis proximal. El aislado también posee un contenido alto de grasa con un 10,5%, esto podría deberse a que la nuez de Tocte que se utilizó sin un prensado previo para la eliminación del aceite, también tiene un contenido bajo en carbohidratos con 6,7% y cenizas con un valor de 2,66%.

4.3 Aislamiento de la proteína de Tocte

Se utilizó la harina desengrasada de Tocte para obtener aislados proteicos, aplicando el método de precipitación isoeléctrica, uno de los primeros trabajos con dicho método es de los autores **Añón y Martínez (1996)** que evaluaron el efecto de las condiciones de la extracción de la proteína, eligiendo diferentes combinaciones de pH de solubilidad y precipitación. En el presente trabajo también se tomaron en cuenta diferentes pHs de precipitación (pI) con el fin de determinar si el pH influye en el rendimiento de la proteína de Tocte. En la **Figura 2**, se observa la precipitación de la proteína a los pHs 3,0; 4,0; 5,0; 6,0. La proteína precipitada a los pHs mencionados presentaron un color blanco y en el sobrenadante se visualiza cambios de color especialmente a los pH 3,0 y 4,0 presentando un color más transparente lo que no sucede a los pHs 5,0 y 6,0 esto podría deberse a las proteínas que no lograron precipitar (proteínas solubles). Algunos autores mencionan que el punto isoeléctrico de la proteína (pI), el pH de solubilidad y el de precipitación influye en los atributos de calidad de un aislado como por ejemplo el contenido de proteína, índice de blancura, temperatura de desnaturalización y en el rendimiento (**Callisaya y Alvarado, 2009; Salcedo et al., 2002**).

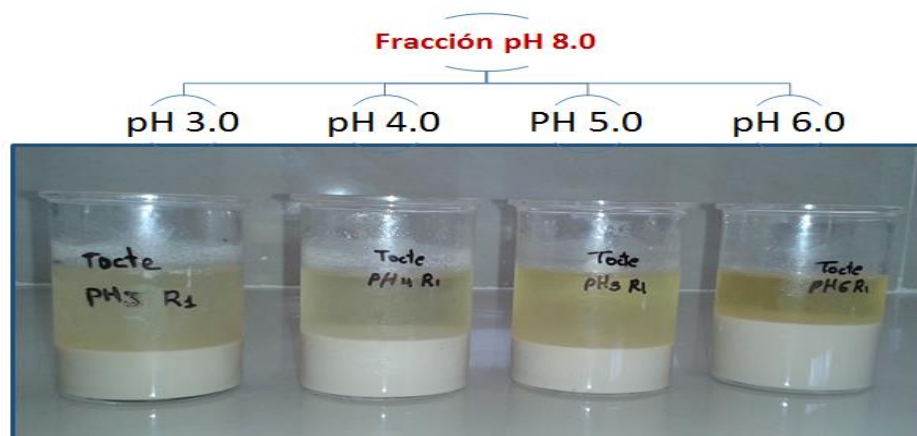


Figura 2. Aislados de proteína de Tocte a los pHs de 3,0; 4,0; 5,0; 6,0.

Tras aislar la proteína de Tocte se calcularon los rendimientos en porcentaje de los pHs 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 realizado con tres réplicas. El aislado a pH 5,0 presentó el mayor rendimiento con un 21,64%, seguido del pH 6,0 con 20,46% y en menor cantidad los pH 3,0 y 4,0 con 15,79 y 16,72% (**Tabla II**). Según **Angélica et al. (2014)** es fundamental conocer su punto isoeléctrico, el pH en el cual la proteína presenta su mínima solubilidad y por tanto precipita, lo que significa que el aislado a pH 5,0 podría encontrarse cerca del punto isoeléctrico, por su alto rendimiento de proteína de Tocte (*Juglan neotropica* Diels). Finalmente, se determinó la existencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos (% rendimiento) de los aislados a los pHs 3,0, 4,0, 5,0, 6,0. (**Ver Tabla XI, XII, Anexo E**)

Tabla II. Rendimiento de la proteína de Tocte en base a 10 g

| Parámetro | Rendimientos (%) | CV |
|-----------|---------------------------|------|
| pH 3,0 | 15,793 ± 0,2 ^a | 1,46 |
| pH 4,0 | 16,724 ± 0,5 ^a | 3,58 |
| pH 5,0 | 21,648 ± 0,4 ^b | 2,27 |
| pH 6,0 | 20,468 ± 0,2 ^b | 2,35 |

Los resultados son los promedios ± desviación estándar. Se realizó un ANOVA y comparación de medias por prueba del test de Tukey al 95% de confianza, las letras diferentes (en superíndices) en un misma columna indican diferencias significativas

3.2.5 Fraccionamiento de la proteína de Tocte (*Juglans neotropica* Diel)

Para la caracterización de las proteínas de la nuez de Tocte se fraccionaron en base a su solubilidad, mediante el método de (**Osborne, 1924**). Se utilizaron diferentes

solventes para la extracción de (globulinas + albuminas) en cloruro de sodio, las (glutelinas) en hidróxido de sodio y en etanol al 70% para las (prolaminas). Los ensayos se realizaron por triplicado. La **Tabla III**, contiene los diferentes valores en porcentaje de las fracciones, siendo las globulinas la fracción mayoritaria con un 34,38% seguido de las albuminas con un 20,21%, gluteninas con un 14,13% y en menor cantidad las prolaminas con un 6,69 %, los datos para el análisis se presenta en el (**ANEXO B**). Al comparar con la especie (*Juglans regia* L) la fracción mayoritaria son las glutelinas con el 72,06%, globulinas con 15,67%, (**Mao et al., 2014**). Estas diferencias podrían deberse a la fuente botánica, a la metodología aplicada para la extracción de la harina y aislado (**Betancur et al., 2004; Delgado y Cecilia, 2015**). El patrón del fraccionamiento del Tocte (*Juglans neotropica* Diels) que se presenta en la **Tabla III** es casi similar a otra fuente vegetal como es el amaranto (*Amaranthus caudatus* L) presentando la mayor fracción a las albúminas (49-65%), globulinas (22-42%), glutelinas (14-18%) y las prolaminas en menor proporción (1-3,2%) descrito por **Delgado (2015)**.

Tabla III. Rendimiento de la proteína fraccionada de Tocte en base a 10 g.

| Parámetro | Rendimiento (%) | C.V |
|------------------|---------------------------|------------|
| Globulinas | 45,591 ± 0,6 ^a | 0,717 |
| Albuminas | 26,798 ± 0,7 ^b | 0,697 |
| Glutelinas | 18,736 ± 0,3 ^c | 0,308 |
| Prolaminas | 8,873 ± 0,5 ^d | 0,575 |

Los resultados son los promedios ± desviación estándar. Se realizó un ANOVA y comparación de medias por prueba del test de Tukey al 95% de confianza, las letras diferentes (en superíndices) en un misma columna indican diferencias significativas

4.3 Cuantificación proteica

Una vez realizado el aislamiento de la proteína se analizó el contenido de proteína a los pHs 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 mediante el método colorimétrico de Biuret, en la **Figura 5**, se observa la curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA), utilizada para el cálculo de la concentración de proteína de Tocte.

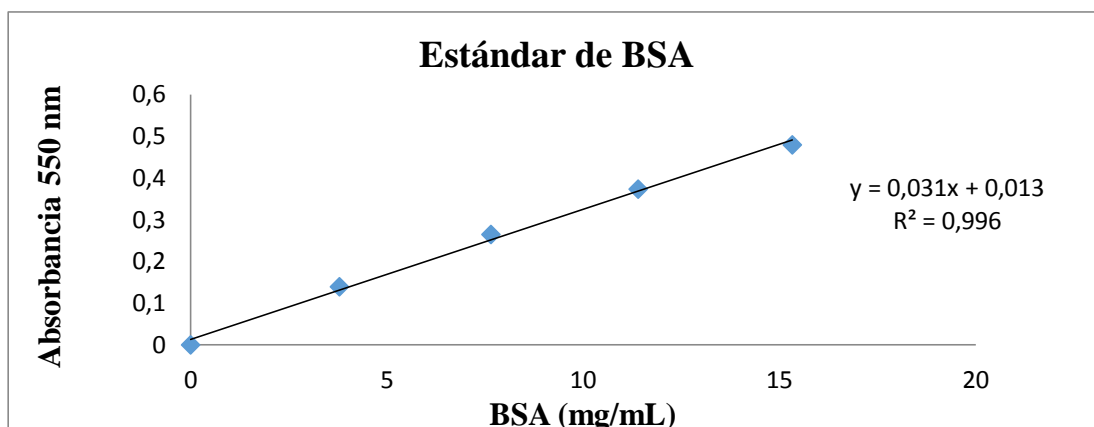


Figura 3. Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA)

En la curva estándar se observa una correlación (R^2) de 0.996 que revelan una correlación superior al 99%, mostrando una relación directamente proporcional entre el color y las concentraciones seleccionadas de pepsina dando como resultado la ecuación de la recta $y = 0,031x + 0,013$ (**Figura 3**). El ensayo de la cuantificación proteica de Tocte se realizó por cuadruplicado, (**ANEXO C**).

Tabla IV. Concentración de la proteína de Tocte en base a 10 g

| Parámetro | Concentración (mg/mL) | C.V |
|-----------|---------------------------|------|
| pH 3,0 | 1,154 ± 0,06 ^a | 0,05 |
| pH 4,0 | 1,116 ± 0,02 ^a | 0,02 |
| pH 5,0 | 1,154 ± 0,09 ^a | 0,08 |
| pH 6,0 | 0,667 ± 0,06 ^b | 0,09 |

Los resultados son los promedios ± desviación estándar. Se realizó un ANOVA y comparación de medias por prueba del test de Tukey al 95% de confianza, las letras diferentes (en superíndices) en un misma columna indican diferencias significativas

Para la proteína de Tocte el ensayo de Biuret no fue el más adecuado, la **Tabla IV** desglosa los resultados donde a pHs 3,0; 4,0 y 5,0 el porcentaje es mayor al 100%, en cambio a pH 6,0 presenta una concentración del 66,7% que podría ser un valor real, comparando con el contenido de proteína a pH 5,0 de 74,8%, (**Anexo I**). Estos resultados pocos satisfactorios para la cuantificación de la proteína de Tocte podría deberse a la interferencia de la grasa o moléculas que se encuentran interfiriendo al momento de medir la absorbancia de la proteína. Estas moléculas podrían ser los ácidos nucleicos que se encuentran asociadas a la proteína de Tocte, como es la guanina que producen 50% más de color. Los frutos secos son una excelente fuente

de proteínas y la mayor parte de las variedades de nueces contienen altos niveles de ácidos nucleicos (Arellano y Duhalt, 1998; Morato y Barrios, 2015).

Según (Salvador, 2006) el desarrollo de colores diferente para cada proteína, y los lípidos e hidratos de carbono interfieren al formar complejos con el ión coordinado.

4.4 Electroforesis SDS-PAGE 1D

4.5 Geles SDS-PAGE a diferentes concentraciones de proteína de Tocte

Para la caracterización de la proteína mediante electroforesis SDS-PAGE primeramente se realizó las siguientes diluciones (10, 5,0; 2,5; 1,25 mg/ml) del aislado de Tocte a pH 5,0. En la línea 2, con la concentración de 10 mg/ml de proteína de Tocte se observaron bandas cercanas a 21 kDa (Figura 4), con alta expresión. En la línea 5, con la concentración de 1,25 mg/ml las bandas que se aproximan a 45 kDa no se lograron observar claramente, concluyendo que, a medida que la concentración de la proteína disminuye el ancho de las bandas y la intensidad se reducen, identificando que la concentración de 10 mg/ml de proteína es la más adecuada para colocar en los pocillos de los geles de poliacrilamida.

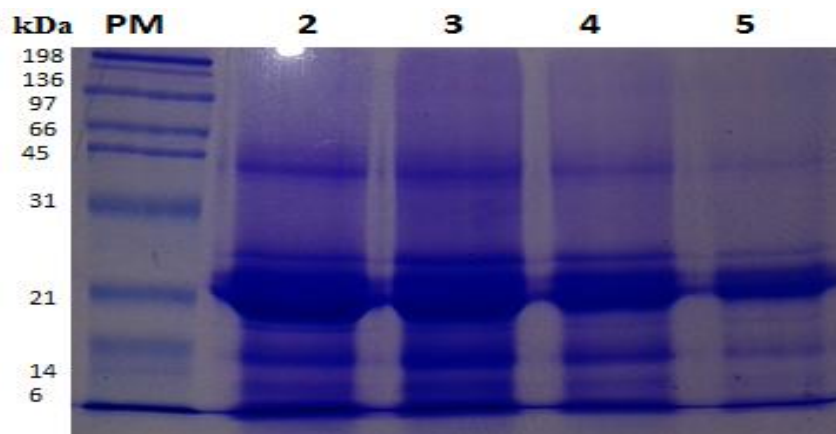


Figura 4. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2- β -mercaptoetanol. Línea 1: estándar de proteínas; línea 2: aislado de Tocte a 10 mg/ml; línea 3: aislado de Tocte a 5,0 mg/ml; línea 4: aislado de Tocte a 2,5 mg/ml; línea 5: aislado de Tocte a 1,25 mg/ml.

4.6 Electroforesis (SDS-PAGE) en ausencia y presencia de 2- β -mercaptoetanol

Según Shewry y Halford (2002) las proteínas de reserva que se encuentran en leguminosas y oleaginosas son las globulinas y albúminas. Las albúminas se

clasifican en base al coeficiente de sedimentación en 2S albúminas, las globulinas en 7S o vicilinas y en 11S o leguminas. Las globulinas son hexámeros que contienen dos subunidades y cada una está formada por una subunidad ácida con pesos moleculares entre (29-35 kDa) y la subunidad básica (18-28 kDa) estas subunidades se encuentran unida entre sí mediante uno o más puentes disulfuro descrito por (Zepeda y Lopez, 1995).

En la **Figura 5**, se muestra el perfil de los aislados proteicos de Tocte en condiciones reductoras en presencia de (+2 β ME). Las bandas tienen mayor expresión y son más definidas en el aislado proteico de Tocte a pH 5,0. A todos los pHs ensayados se observaron un conjunto de bandas de bajo peso molecular comprendido entre 10-15 kDa. Estas bandas corresponden a la 2S albúminas. Esta banda es muy intensa especialmente a los pHs 4,0 y 6,0. Se identificó un primer conjunto de bandas con pesos moleculares comprendidos entre 18-20 kDa. Estas bandas corresponden a las 11S globulinas básicas. También se identificó un segundo conjunto de bandas con pesos moleculares entre los rangos de 35-37 kDa. Estas bandas fueron identificadas como la fracción 11S globulinas ácidas. Un tercer conjunto de bandas con pesos moleculares entre los rangos de 50-70 kDa fueron identificadas a todos los pHs ensayados, estas bandas corresponden a la fracción 7S globulinas.

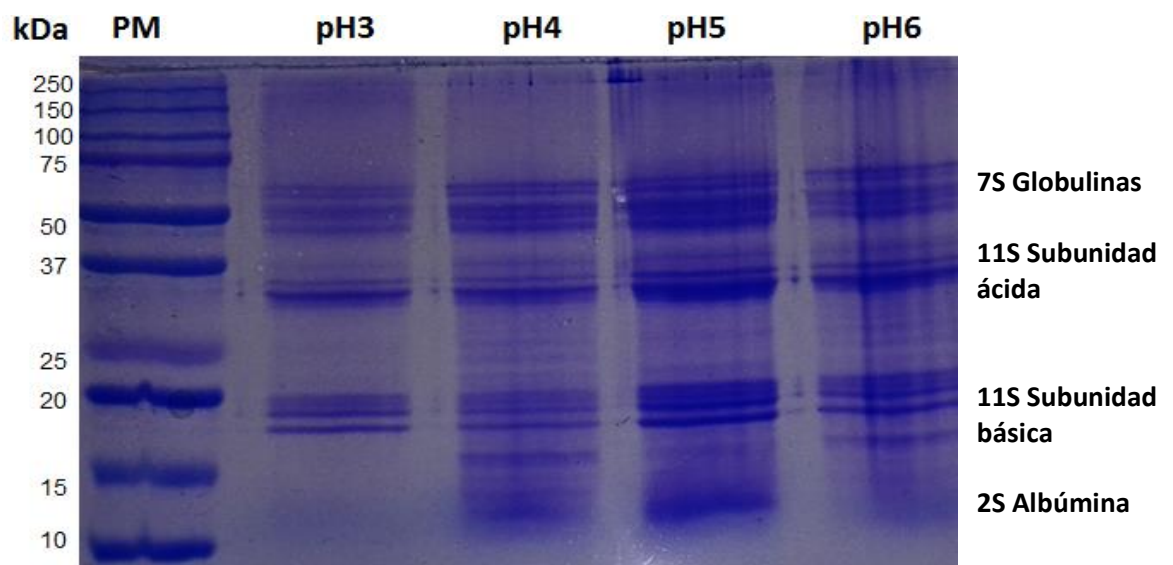


Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2- β -mercaptoetanol. Línea 1: estándar de proteínas; línea 2: aislado de Tocte pH 3,0; línea 3: aislado de Tocte pH 4,0; línea 4: aislado de Tocte pH 5,0; línea 5: aislado de Tocte pH 6,0.

En la **Figura 6** se observa el perfil de las proteínas de aislados proteicos de Tocte obtenidos por precipitación isoeléctrica a pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; en condiciones no reductoras sin (-βME). El perfil de las proteínas se comprende de bandas entre los rangos de 10-50 kDa. Se logró identificar dos bandas entre 10-15 kDa, otras dos bandas entre 35-37 kDa y tres bandas con alto peso molecular de 50 kDa, con un total de siete bandas. Estos resultados indican que las proteínas de Tocte se encuentran conformadas por puentes disulfuro (-S - S-) y al romper los enlaces con el agente reductor (SDS), las proteínas de mayor peso molecular se convirtieron en proteínas de menor peso.

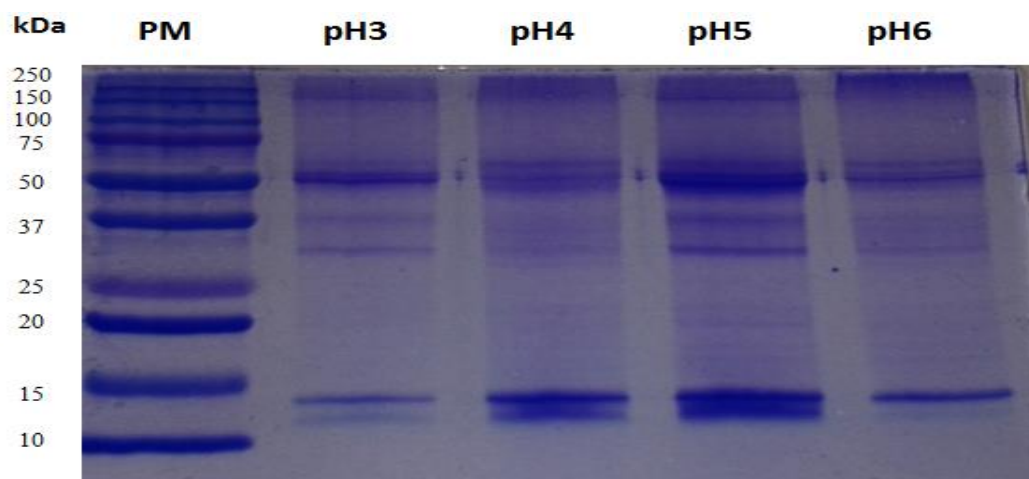


Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE en ausencia de 2-β-mercaptoetanol. Línea 1: estándar de proteínas; línea 2: aislado de Tocte pH 3,0; línea 3: aislado de Tocte pH 4,0; línea 4: aislado de Tocte pH 5,0; línea 5: aislado de Tocte pH 6,0.

Las proteínas de la variedad de (*Juglans neotropica* Diels) muestra un perfil electroforético que se encuentra distribuido en un conjunto de tres bandas proteicas con pesos moleculares entre 10 a 75 kDa, (Figura 6), similar al presentado por **Mao y Hua (2012)** de la variedad de (*Juglans regia* L), el peso molecular de dicha especie presenta bandas entre 12 a 67 kDa.

4. Fraccionamiento de las proteínas con diferentes solventes

El fraccionamiento de las proteínas de reserva de la nuez de Tocte pertenecientes a la especie (*Juglans neotropica* Diels) se realizó con el fin de investigar las proteínas mayoritarias presentes en la nuez de Tocte, para así continuar sus estudios caracterizando el peso molecular de cada una de ellas y la digestibilidad que podrían poseer las diferentes fracciones. La **Figura 7**, presenta el gel realizado al 12% de

acrilamida de las diferentes fracciones, en el gel se observa (línea 3), las albúminas con tres juegos de proteína que se encuentran entre 14-70 kDa, las glutelinas fraccionadas con hidróxido de sodio, línea 4, se visualiza dos bandas intermedias con pesos moleculares entre 30-70 kDa. Para las globulinas extraídas con cloruro de sodio, línea 5, se aprecia un perfil de proteínas con bandas similares al de las albúminas con pesos moleculares entre 14-70 kDa. Por último, tenemos en la línea 6, a las prolaminas aisladas con el 70% de etanol, las bandas que se observa son poco definidas pero se puede ver una banda de bajo peso molecular aproximadamente de 31 kDa.

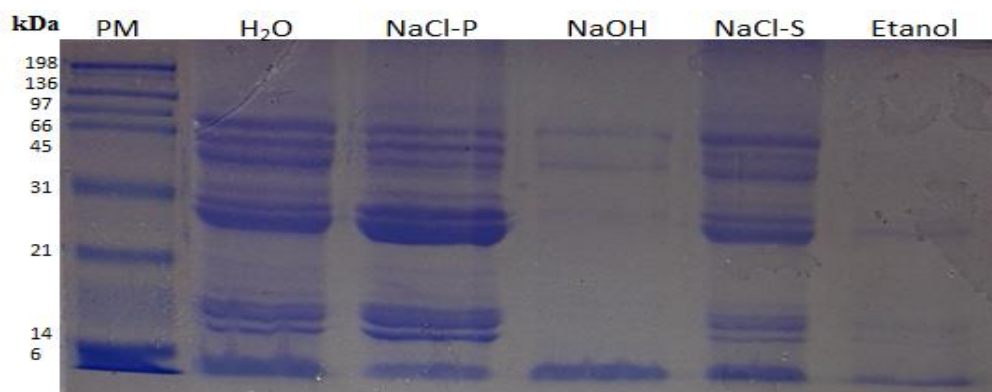


Figura 7. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2-β-mercaptoetanol. Línea 1: estándar de proteínas; línea 2: aislado con Agua; línea 3: aislado con cloruro de sodio precipitado (albúminas); línea 4: aislado con hidróxido de sodio (glutelinas) línea 5: aislado con cloruro de sodio sobrenadante (globulinas); línea 6: con etanol (prolaminas).

El perfil electroforético de las globulinas y albúminas de Tocte (*Juglans neotropica* Diels) son casi similares con pesos moleculares entre 14 a 70 kDa (**Figura 7**), un rango similar a la nuez de (*Juglans regia* L) de 14 a 66 kDa reportado por **Sze-Tao y Sathe (2000)**.

4.8 Digestibilidad gastrointestinal *in vitro* de las proteínas de Tocte

La digestión de los alimentos empieza en la boca con hidrólisis parcial de carbohidratos por acción de la α-amilasa, razón por la cual se ha omitido este pasó. El proceso digestivo de las proteínas empieza en el estómago (**Minekus et al., 2014**). Según lo descrito por **Carrillo (2014)** el pH aplicado en los estudios de digestión con pepsina influye en la digestibilidad de ciertas proteínas. A pH 2,0 algunas proteínas alergénicas presentan resistencia a la digestión por la pepsina, en algunos casos se

forman fragmentos estables que conservan el potencial alergénico de la proteína nativa, por ejemplo la lisozima de clara de huevo presenta resistencia a la hidrólisis con pepsina a pH 2.

Simulando las condiciones del estómago con un fluido gástrico simulado (SGF) compuesto por 0,35 M NaCl. Con este modelo se evaluó la influencia del pH desde valores más bajos 1,0 y 2,0 y valores más altos, característicos en estómagos de niños. La pepsina hidrolizo casi totalmente los tres grupos de bandas comprendidas entre 15-50 kDa. Mientras que se observa una banda con peso molecular de 6.5 kDa que podrían corresponderse con la 2S albúminas, (**Figura 8**).

Según **Orruño y Morgan (2011)** las 2S albúminas presentan resistencia a la hidrolisis con pepsina por ejemplo el maní y de ajonjolí presentan albúminas 2S extremadamente resistentes a la hidrolisis con pepsina.

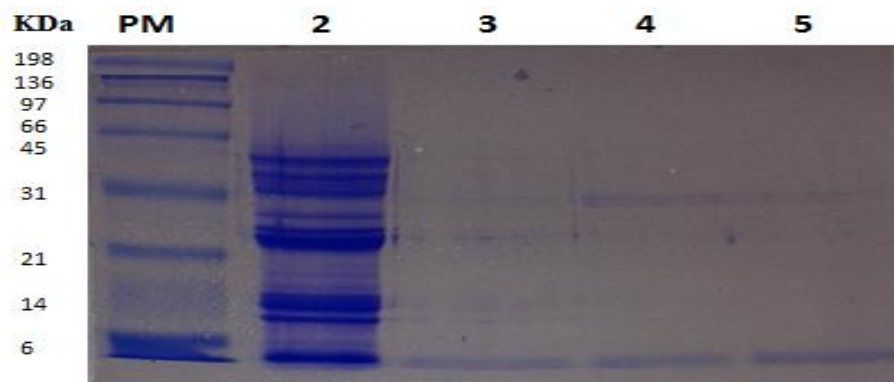


Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2-β-mercaptoetanol. Simulación gástrica de aislados proteicos de Tocte (*Juglans neotropica* Diels) Línea 1: estándar de proteínas; línea 2: aislado de Tocte a pH 5,0 (10 mg/ml); línea 3: digestión gástrica de Tocte a pH 1,0; línea 4: digestión gástrica de Tocte a pH 2,0; línea 5: digestión gástrica de Tocte a pH 3,0.

Astwood y Fuchs (1996) Compararon la digestibilidad de proteínas alimentarias alergénicas frente a proteínas no alergénicas, en SGF (Fluido Gástrico Simulado consistente de 0,035 M NaCl a pH 1,2 con pepsina). En el estudio algunos alérgenos fueron estables durante 60 minutos de digestión. Mientras, que las proteínas no alergénicas fueron digeridas fácilmente, sin formar fragmentos peptídicos estables.

El **Codex (2003)** recomiendan para los ensayos de seguridad alimentaria de proteínas modificadas genéticamente usar pH 1,2 – 2 en los ensayos de digestión y sugiere pH 1,2 como el pH óptimo para las condiciones de la digestión gástrica.

Para la digestión duodenal se utilizó una solución de pancreatina de origen porcino compuesta por una serie de enzimas proteolíticas que participan en la digestión duodenal (lipasa, colipasa, tripsina) esta solución contiene además CaCl_2 y sales biliares. En la **Figura 9** se puede observar en la (línea 4), las proteínas fueron hidrolizadas totalmente. Concluyendo que la 2S alúminas de Tocte presentan resistencia a las hidrolisis con pepsina. Mientras que todas las proteínas de Tocte fueron fácilmente digeridas con pepsina más pancreatina incluida las 2S albúminas.

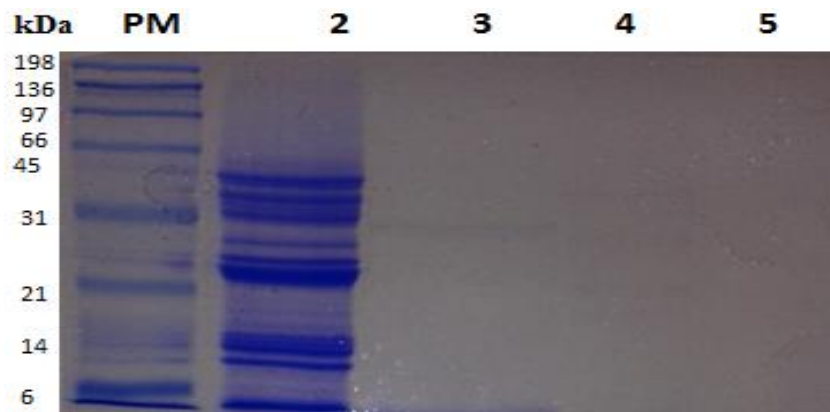


Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2- β -mercaptoetanol. Simulación gástrica de aislados proteicos de Tocte (*Juglans neotropica* Diels) Línea 1: estándar de proteínas; línea 2: aislado de Tocte a pH 5,0 (10 mg/ml); línea 3: digestión gástrica de Tocte a pH 3,0; línea 4: digestión duodenal a pH 7,0.

4.8 Digestibilidad gastrointestinal *in vitro* de las proteínas fraccionadas

4.8.1 Digestibilidad gastrointestinal de la fracción proteína (albúminas)

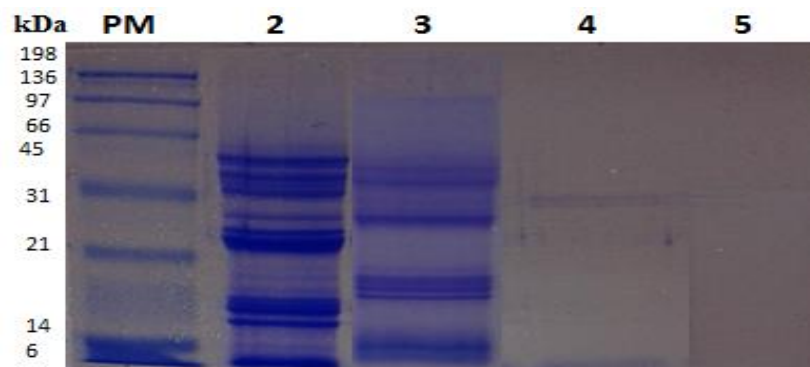


Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2- β -mercaptoetanol. Simulación gastrointestinal de albúminas aisladas con cloruro de sodio. Línea 1: estándar de proteínas; línea 2: aislado de Tocte a pH 5,0 (10 mg/ml); línea 3: proteínas aisladas con cloruro de sodio (albúminas), línea 4: digestión gástrica de Tocte a pH 3,0; línea 5: digestión duodenal a pH 7,0.

Según **Osborne (1924)** las albúminas son proteínas solubles que se pueden extraer con agua y soluciones salinas. La **Figura 10** muestra el gel de SDS-PAGE al 16% de acrilamida. En el gel se puede observar la digestibilidad gastrointestinal de las albúminas. La fase gástrica fue realizada con pepsina a pH 3,0 (línea 3), observando una banda de bajo peso molecular aproximadamente de 6 kDa que se corresponde con 2S albúminas. Esta banda muestra resistencia a la hidrólisis con pepsina. Mientras que en la digestión duodenal con pepsina más pancreatina todas las bandas son totalmente hidrolizadas. La banda correspondiente a la 2S albúmina fue susceptible a la hidrólisis a duodenal a estas condiciones.

4.8.1 Digestibilidad gastrointestinal de la fracción proteína (globulinas)

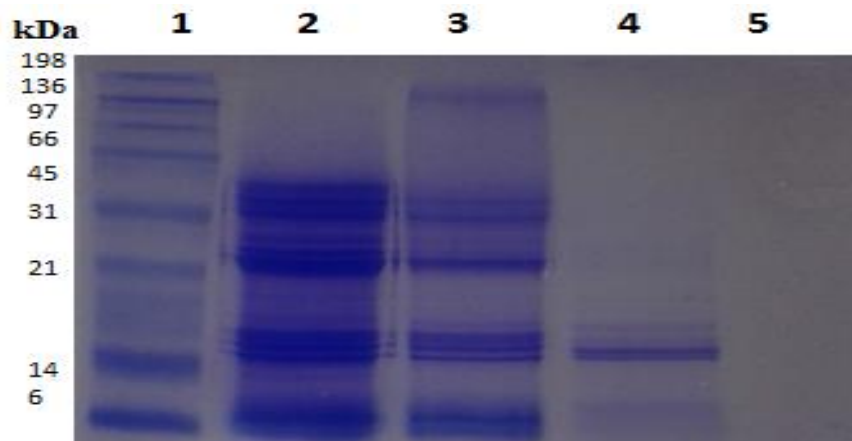


Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2- β -mercaptoetanol. Simulación gastrointestinal de globulinas aisladas con cloruro de sodio (1 M). Línea 1: Estándar de proteínas; línea 2: aislado de Tocte a pH 5,0 (10 mg/ml); 3: proteínas aisladas con cloruro de sodio (globulinas); línea 4: digestión gástrica de Tocte a pH 3,0; línea 4: digestión duodenal a pH 7,0.

Las globulinas y albúminas son proteínas ampliamente estudiadas ya que se encuentran abundantemente presentes en cereales y leguminosas representando alrededor del 10% de proteínas en granos de cereales y más del 85% en leguminosas (**Fujiwara et al., 2002**). Según **Johnson (2002)** la pepsina sólo inicia la digestión de las proteínas y contribuye con un 10 a 20 % del proceso total de conversión de estas macromoléculas en proteosomas, peptonas y algunos polipéptidos. En la fase duodenal a pH 7,0 las diferentes enzimas proteolíticas hidrolizaron totalmente a las proteínas de Tocte, línea 4, (**Figura 11**).

Las bandas que se lograron observar en la Figura 11 podrían contener péptidos bioactivos, que pueden ejercer su acción en el tracto gastrointestinal (Vermeirssen *et al.*, 2004), dichos péptidos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos a través de la circulación sanguínea (Teschmacher *et al.*, 1997; Vermeirssen *et al.*, 2004). Para comprobar esta hipótesis es necesario realizar pruebas *in vitro* e *in vivo* de algunas de las actividades biológicas (antitumoral, antimicrobina, antihipertensiva, antitrombotica, antioxidante, entre otras) que en la actualidad son de gran interés, actividades que podrían poseer los péptidos de la proteína de Tocte liberados tras la digestión gástrica.

4.8.1 Digestibilidad gastrointestinal de la fracción proteína (glutelinas)

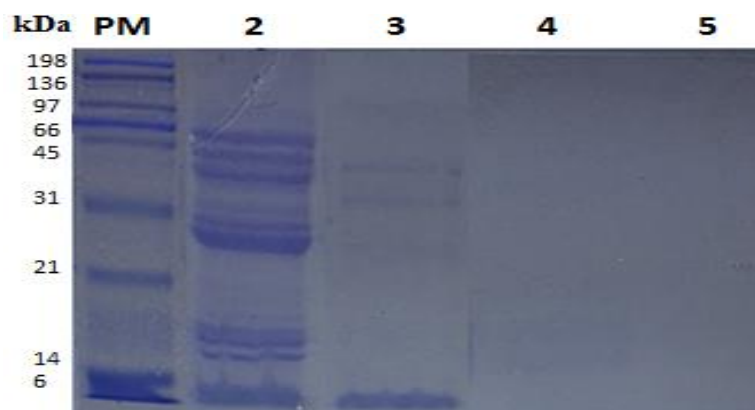


Figura 7. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2-β-mercaptoetanol. Simulación gastrointestinal de globulinas aisladas con hidróxido de sodio (1 M). Línea 1: estándar de proteínas; línea 2: aislado de tocte a pH 5,0 (10 mg/ml); línea 3: digestión gástrica a pH 3,0; línea 4: digestión duodenal a pH 7,0

Las glutelinas son proteínas solubles en soluciones alcalinas o ácidas, razón por la que se aislaron en hidróxido de sodio 0,5 M. Según herrera (2003) las glutelinas son proteínas importantes para la industria alimentaria ya que se encargan de conferir viscosidad y elasticidad a los alimentos y cada vez se investigan más las fracciones de proteínas de origen vegetal.

En la fase gástrica con (SGF 0,35 M NaCl) se evaluó la digestión de las proteínas de Tocte, mediante el uso de electroforesis SDS-PAGE en presencia del agente reductor 2-β-Mercapthoetanol en un gel de poliacrilamida al 16%. En el gel se observaron dos bandas, comprendidas entre 31 a 45 kDa. En la fase duodenal realizada a pH 7,0 (Figura 12) se observaron que las proteínas fueron totalmente hidrolizadas.

4.8.1 Digestibilidad gastrointestinal de la fracción proteína (prolaminas)

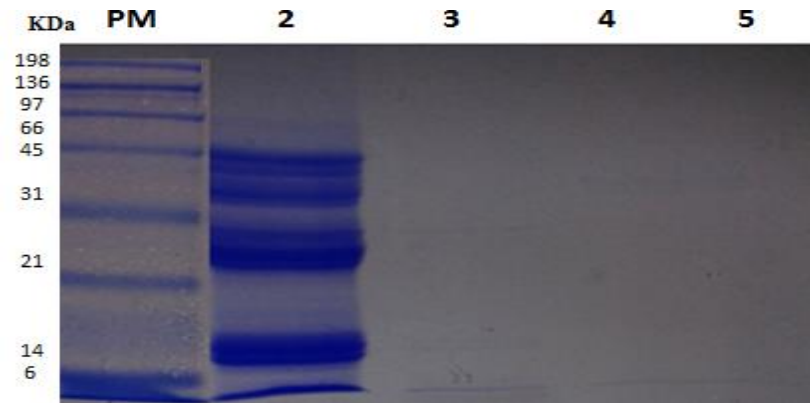


Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2- β -mercaptoetanol. Simulación gástrica de aislados proteicos de Tocte (*Juglans neotropica* Diels) Línea 1: estándar de proteínas; línea 2: aislado de Tocte a pH 5,0 (10 mg/ml); línea 3: prolaminas extraídas con etanol al 70%; línea 4: digestión gástrica de Tocte a pH 3,0; línea 5: digestión duodenal a pH 7,0.

En el Tocte (*Juglans neotropical* Diel) las prolaminas representaron una concentración de 7.12%. En la **Figura 13** se aprecia el gel de electroforesis (SDS-PAGE), observando en la línea 3, bandas poco visibles lo que da a entender que existe muy poca cantidad de dicha proteína. Comparando con la variedad de (*Juglans regia* L), presenta tres bandas con pesos moleculares de bajo peso molecular entre 10 a 14 kDa (Sze-Tao y Sathe, 2000). Esta diferencia podría deberse al método aplicado para la extracción de las prolaminas o a la especie diferente con la que se realizó el estudio. En la digestión gástrica y duodenal no se observa ninguna banda concluyendo que la pepsina consumió en su totalidad a las prolaminas.

4.8.3 Actividad antioxidante

Actualmente el estudio de alimentos con propiedades antioxidantes ha aumentado considerablemente debido al interés que se tiene sobre los efectos benéficos a la salud. El método ABTS es un ensayo de decoloración que permite determinar la capacidad de neutralizar radicales libres de antioxidantes de carácter hidrofílico e hidrofóbico (Delgado y Cecilia, 2015). En la **Tabla V** se muestra los resultados de la capacidad antioxidante de los aislados proteicos de Tocte a los pHs 3,0; 4,0; 5,0; 6,0. Se puede ver claramente que el pH 3,0 posee una alta capacidad antioxidante con un valor de 130,40 uM Trolox/L seguido del pH 4,0 con 123,40 uM Trolox/L y los pH 5,0 y 6,0 presentaron valores más bajos de 32,55 y 97,07 uM Trolox/L.

Tabla V. Capacidad antioxidante de la proteína de Tocte.

| Parámetro | Capacidad antioxidante uM Trolox/L |
|------------------|---|
| pH 3,0 | 130,40 ± 0.3 |
| pH 4,0 | 124,40 ± 0.4 |
| pH 5,0 | 32,55 ± 0.2 |
| pH 6,0 | 97,07 ± 0.3 |

Los resultados son los promedios ± desviación estándar.

No se encontrado estudios de evaluación antioxidante de aislados proteicos. La mayor parte de investigaciones se han realizado en hidrolizados proteicos de diferentes fuentes vegetales. Según **Moure et al. (2006)** los hidrolizados proteicos de soja posee una alta actividad antioxidante entre 820 y 3280 μM Trolox/L, frente a los radicales ABTS. La evaluación antioxidante de Tocte se realizó en los diferentes aislados extraídos a diferentes pHs obteniendo valores más bajos que los hidrolizados de soja, estos resultados podría deberse a que los péptidos producidos durante la hidrólisis enzimática poseen propiedades fisicoquímicas únicas conferidas por su secuencia de aminoácidos (**Piga et al., 2003**).

4.7 Verificación de Hipótesis

Para el análisis de varianza realizado a la variable de respuesta rendimiento, el análisis mostró diferencias significativas entre los tratamientos (pHs). Por lo tanto, a un nivel de confianza del 95% se acepta la hipótesis alternativa que indica que el pH si influye en el rendimiento de los aislados proteicos de Tocte (**ANEXO D**).

Para el análisis de varianza realizado a la variable de respuesta concentración proteica, el análisis mostró diferencias significativas. Por lo tanto, a un nivel de confianza del 95% se acepta la hipótesis alternativa que indica que el pH si influye en la concentración de los aislados proteicos de Tocte. (**ANEXO E**).

CAPÍTULO VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Dentro de la caracterización de las proteínas de Tocte (*Juglans neotropica* Diels) se evaluó diferentes tratamientos determinando que al aplicar el método de precipitación isoeléctrica (pH 5,0) se obtuvo mayor rendimiento (21,64%) de aislado proteico; la nuez es considerada una fuente proteica importante; estos resultados fueron confirmados mediante un análisis proximal donde se estableció que la harina de nuez presenta un 17,7% de proteína; en la digestibilidad gastrointestinal *in vitro*, el aislado proteico se hidrolizo totalmente al pH 1,0.
- La fracción con mayor presencia en la nuez de Tocte fueron las globulinas con 34,38%; además mediante electroforesis SDS-PAGE se identificaron bandas con alta expresión de las cuales destacaron ocho mayoritarias con pesos entre 6-70 kDa.
- Mediante electroforesis SDS-PAGE se determinó que los aislados proteicos de Tocte a pHs 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 presentaron bandas de alto y bajo peso molecular comprendidas entre 6 a 75 kDa, identificando las proteínas 7S globulinas, 11S subunidad ácida y básica y las 2S albuminas .
- Los aislados proteicos de Tocte realizado a los pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 presentaron una alta capacidad antioxidante realizado por el método ABTS⁺; el aislado a (pH 3,0) presento mayor actividad con un valor de 130,40 uM Trolox/L.
- En la digestibilidad gastrointestinal *in vitro*, la fracción 2S albúminas de Tocte presentó resistencia a la hidrolisis con pepsina a los pHs ensayados 1,0; 2,0; 3,0; esta fue susceptible a la hidrolisis duodenal con pepsina más pancreatina, lo cual se le considera como buena digestibilidad que se considera como un parámetro de calidad nutrimental de las proteínas de Tocte (*Juglans neotropica* Diels).

5.2 Recomendaciones

- Se recomienda ampliar el rango de pH de solubilización de las proteínas y de precipitación.
- Para el análisis de cuantificación proteica mediante el método de Biuret en el estudio el método no fue satisfactorio y se recomienda realizar estudios de las moléculas que podrían estar interfiriendo con el mencionado método.
- Determinar el perfil de aminoácidos que puede poseer la proteína de Tocte.
- Realizar estudios de los péptidos liberados tras la digestión gástrica de los hidrolizados de Tocte variedad (*Juglan neotropica* Diel) con el fin de conocer las propiedades biológicas que pueden poseer estos péptidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abugoch James, L. E. (2009). Chapter 1 Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): Composition, Chemistry, Nutritional, and Functional Properties *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. Volume 58, pp. 1-31): Academic Press.
- Angélica, M., Guerra, S., Llano, G. H., y López, C. Á. (2014). Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas presentes en cuatro fuentes foliares: yuca (*Manihot esculenta* Crantz) variedades verónica y tai, jatropha (*Jatropha curcas* L.) y gmelina (*Gmelina arborea*). *12*(1), 30-39.
- Añón, C., y Martínez, N. (1996). Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study. *Agricultural and Food Chemistry*, *44*(9), 2523–2530. doi: 10.1021/jf960169p
- Añón, M. C. (2009). Propiedades fisiológicas de péptidos y proteínas de amaranto: Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA).
- AOAC. (2012). Official methods of analysis. USA: Chemistry.
- Arellano, H. G., y Duhalt, R. V. (1998). Cuantificación de proteínas: una revisión. *Biotecnología*, *3*, 77-88.
- Arias, E. B. (2013). *Biomoléculas*: Ediciones Universidad de Salamanca.
- Astwood, J., y Fuchs, R. (1996). Allergenicity of foods derived from transgenic plants. *Monogram Allergy*, *32*, 105–120.
- Bressani, R., Elias, L., y Garcia, A. (1989). Limiting amino acids in raw and processed amaranth grain protein from biological tests. *Plant Foods for Human Nutrition*, *39*(3), 223-234.
- Calapiña, L. A. C. (2014). *Diseño de un procesopara la obtención de compuestos fenólicos del pericarpio de la similla del nogal (Juglans neotropical Diels) y extracción de la aceite de la Nuez*. (Pregrado), Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.

- Callisaya, C., y Alvarado, A. (2009). Aislados Proteínicos de granos altoandinos Chenopodiaceas; quinua “Chenopodium Quinoa” - *Cañahua* “*Chenopodium Pallidicaule*” por Precipitación Isoeléctrica. *Revista Boliviana de Química*, 26(1).
- Cárdenas, D., y Salinas, N. (2006). *Libro Rojo de Plantas de Colombia* (Vol. 4). Bogota, Colombia.
- Carrillo, W. (2014). Digestibilidad de las proteínas alergénicas. *Revista Química Viva*(2).
- Codex. (2003). Alinorm 03/34: Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, Twenty-Fifth (pp. 47–60). Rome, Italy
- Delgado. (2015). *Amaranto como ingrediente funcional: Propiedades antioxidantes de proteínas y peptidos*. (Pregrado), Universidad Nacional de la Plata, México.
- Delgado, y Cecilia, M. (2015). *Amaranto como ingredientes funcionales: propiedades antioxidantes de proteínas y peptidos* (Posgrado), Universidad nacional de la Plata.
- FAO. (1992). Nutrición Humana en el Mundo en Desarrollo from <http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s01.htm#TopOfPage>
- FAO. (2013). Panorama de la Seguridad Alimentaria Nutricional en América Latina y el Caribe. from <http://www.fao.org/>
- FAO. (2015). El huevo en cifras. from <http://www.fao.org/assets/infographics/FAO-Infographic-egg-facts-es.pdf>
- Forestal, E. (2007). Ficha Técnica N°2 Nogal. Retrieved 30 de Julio, 2015, from <http://ecuadorforestal.org/>
- Fujiwara, T., Nambara, E., Yamagishi, K., Goto, D. B., y Naito, S. (2002). Storage Proteins. *American Society of Plant Biologists*. doi: 10.1199/tab.0020

- Gornall, A., Bardawill, C., y David, M. (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177, 751-766
- Grajales Muñiz, O. (2005). *Apuntes de Bioquímica Vegetal. Bases Para Su Aplicación Fisiológica*: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan.
- Jiménez, Martos, Carrillo, López-Fandiño, y Molina. (2011). Susceptibility of lysozyme to in-vitro digestion and immunoreactivity of its digests. *Food Chemistry*, 127, 1719-1726.
- Johnson, L. R. (2002). *Gastrointestinal Physiology* (Sixth Edition ed.).
- Juárez, y Perote, A. (2010). *Alimentos saludables y Diseño Específico: Alimentos funcionales*. Madrid.
- Juárez, M. (2007). *Mesa Redonda sobre "Perspectivas en la seguridad alimentaria y nutrición" Alimentos funcionales. La evaluación de las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos*. Universidad Internacional Menéndez Pelayo
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 217, 680-685.
- Manzo, J. A. S. (2006). *Obtención, caracterización y relación estructura - funcionalidad de un aislado proteico de quinua (Chenopodium quinoa) orgánica proveniente de la región de Chile*. (Posgrado), Universidad de Chile Santiago, Chile.
- Mao, X., y Hua, Y. (2012). Composition, Structure and Functional Properties of Protein Concentrates and Isolates Produced from Walnut (*Juglans regia* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 1561.
- Mao, X., Hua, Y., y Chen, G. (2014). Amino Acid Composition, Molecular Weight Distribution and Gel Electrophoresis of Walnut (*Juglans regia* L.) Proteins and Protein Fractionations. *International Journal of Molecular Sciences*(15). doi: 10.3390/ijms15022003

- MCDS. (2013). Ministerio de Coordinación de Desarrollo Social. Proyecto para la reducción acelerada de la malnutrición en el Ecuador– Inti.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, S., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D., J., M., O, Recio, I., Santos, C. I., Singh, R. P., Vegarud, N. B., Wickham, J., Weitschies, M. W., y Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *The Royal Society of Chemistry*.
- Mora, S. Q. (2007). *Manual de experimentos de laboratorio para bioquímica*: Euned.
- Morato, M. M., y Barrios, V. (2015). Ácidos nucleicos. from <http://g-se.com/uploads/biblioteca/acidosnucleicos-pdf>
- Moreno, F. J. (2007). Gastrointestinal digestion of food allergens: Effect on their allergenicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 61(1), 50-60. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2006.10.005>
- Moure, A., Domínguez, H., y Parajó, J. (2006). Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Biochemistry*, 41(2), 447-456.
- Nieto, V. M., y Rogríguez, J. (2010). Juglans neotropica Diels, *Corporación Nacional de Investigación o Forestal*, pp. 528-529.
- Oliveros, M., y Paredes, O. (2012). *Aislamiento y Caracterización de las proteínas de reserva de chia (Salvia hispánica L)*. (Tesis de posgrado), Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, México.
- Orruño, E., y Morgan, M. R. A. (2011). Resistance of purified seed storage proteins from sesame (*Sesamum indicum* L.) to proteolytic digestive enzymes. *Food Chemistry*, 128(4), 923-929. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.120>

- Ortega, H. M. (2007). *Estudio del ataque de Gretchena garai Miller EN NOGAL (Juglans Neotropica Diels) en plantación sola y asociada con cuatro especies forestales en dos sitios.* (Tesis de posgrado), Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador.
- Osborne, T. B. (1924). *The vegetable proteins ed. . Longmans, Green new York*, 452.
- Peña, D., Rocano, M., Salazar, J., y Torres, C. (2014). Inducción de la brotación in vitro de microplántulas de Nogal (*Juglans neotropica*) tratadas con Thidiazuron (TDZ) y 6-Bencilaminopurina (BAP). *Revista semestral de la DIUC*, 5.
- Piga, A., Caro, A. D., y Corda, G. (2003). From Plums to Prunes: Influence of Drying Parameters on Polyphenols and Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3682–3687. doi: 10.1021/jf0340963
- Pilosof, A. M., y Bartholomai, G. B. (2000). *Caracterización funcional estructural de proteínas* (Cyted-Eudeba. ed.). Buenos Aires, España.
- Quintero, O. D. G., y Villegas, S. J. (2012). Rescate y germinación in vitro de embriones inmaduros de cedro negro (*Juglans neotropica* Diels). *Revista Acta Agronómica*, 61, 52-60.
- Rada, G. R. (2012). Los alimentos funcionales: Un tesoro cuestionado. from <http://www.encuentros-multidisciplinares.org/>
- Re, R., Pellegrini, N, Proteggente, A., Pannala, A., y Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(10), 1231–1237.
- Rivera, E. I. V. (2005). *Prácticas de Bioquímica Descriptiva*: Uson.
- Salcedo, C. C., Osuna, C. J., Guevara, L. F., Dominguez, D. J., y Paredes, L. O. (2002). Optimization of the isoelectric precipitation method to obtain protein

- isolates from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*(50), 6515-6520.
- Salgado, P. (2009). *Proteínas de Girasol: aislamiento, caracterización y aplicación en la industria alimentaria*. (Posgrado), Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Salvador, B. (2006). *Química de los alimentos* (E. Q. Duarte Ed. Cuarta edición ed.). México.
- Senplades. (2013). Plan Nacional de Desarrollo / Plan Nacional para el Buen Vivir, Objetivos nacionales para el Buen Vivir: Plan Nacional del Buen Vivir.
- Shewry, P. R., y Halford, N. G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Experimental Botany*, 53(370), 947–958. doi: 10.1093/jexbot/53.370.947
- Sze-Tao, K., Wai. Clara., y Sathe, S. K. (2000). Walnuts (*Juglans regia* L): proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein in vitro digestibility. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(9), 1393-1401.
- Terwitte, Koester, y Oilseeds. (1987). Proteins and cereal substitutes: Economic contribution and political realities. *Revista de estudios Agro-Sociales*, 133-155.
- Teschemacher, H., Koch, G., y Brantl, V. (1997). Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Peptide Science*, 43(2), 99-117.
- Valencia, B., Villacrés, A., Saab, A., Alvear, J., Romo, G., Orellana, J., Tapia, M., Romero, C., Pazmiño, F., y Egas, V. (2015). Alimentos Balanceados, Salud Animal, Industrial y Nutrición. *Revista Técnica del Maíz & Soya*.
- Vargas, W. G. (2002). *Guía ilustrada de las plantas de las montañas del Quindío y los Andes Centrales*: Editorial Universidad de Caldas.

- Vermeirssen, V., Van Camp, J., y Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92(03), 357-366.
- Villegas, O. D. Q. G. S. J. (2012). Rescate y germinación in vitro de embriones inmaduros de cedro negro (*Juglans neotropica* Diels). *Acta agrónomica*, 61(1), 52-60.
- Vioque, J. (2000). *Jornada internacional sobre proteínas alimentarias*: Universidad de Sevilla, Secretariado de Publicaciones.
- Vioque, J., MM, P. Y., Megías, L., Girón-Calle, Alaiz, y Millán. (2006). Bioactive Peptide in storage proteins *Barz. J. Food Technol.*(III JIPCA).
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., y Millán, F. (1999). Purification and Partial Characterization of Chickpea 2S Albumin. *Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1405–1409. doi: 10.1021/jf980819k
- Zepeda, H. R., y Lopez, O. P. (1995). Isolation and characterization of amarantin, the 11s amaranth seed globulin. *Food Biochemistry*, 19(5), 329–339. doi: 10.1111/j.1745-4514.1995.tb00538.x

ANEXOS

ANEXO A
RENDIMIENTOS A LOS DIFERENTES pHs

Tabla VI. Datos de pesos a los diferentes pHs analizados para la determinación del rendimiento (en base a 10 g de muestra).

| Parámetro | Replica 1 | Replica 2 | Replica 3 | *Media | *S.D |
|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|-------------|
| pH 3,0 | 1,604 | 1,576 | 1,558 | 1,579 | 0,023 |
| pH 4,0 | 1,685 | 1,725 | 1,607 | 1,672 | 0,059 |
| pH 5,0 | 2,148 | 2,126 | 2,220 | 2,165 | 0,049 |
| pH 6,0 | 2,073 | 2,076 | 1,991 | 2,047 | 0,048 |

*Valores promedio y desviación estándar de tres repeticiones

A partir de los diferentes pesos se calculó el rendimiento con la siguiente formula:

$$\% \text{ de Proteína} = \frac{\text{proteína aislada (g)}}{\text{cantidad de harina (g)}} * 100$$

Tabla VII. Rendimientos en (%) calculados de lo pHs analizados, (en base a 10 g de muestra)

| Parámetro | Replica 1 | Replica 2 | Replica 3 | *Media | *S.D |
|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|-------------|
| pH 3,0 | 16,038 | 15,761 | 15,581 | 15,793 | 0,230 |
| pH 4,0 | 16,850 | 17,251 | 16,072 | 16,724 | 0,599 |
| pH 5,0 | 21,480 | 21,261 | 22,202 | 21,648 | 0,492 |
| pH 6,0 | 20,730 | 20,761 | 19,912 | 20,468 | 0,481 |

*Valores promedio y desviación estándar de tres repeticiones

ANEXO B
FRACCIONAMIENTO DE LA PROTEÍNA

Tabla VIII. Datos de pesos de proteína fraccionada con diferente solvente

| Parámetro | Replica 1 | Replica 2 | Replica 3 | *Media | *S.D |
|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|-------------|
| Globulinas | 3.510 | 3.389 | 3.516 | 3.472 | 0.072 |
| Albúminas | 2.102 | 1.982 | 1.979 | 2.021 | 0.070 |
| Glutelinas | 1.421 | 1.379 | 1.439 | 1.413 | 0.031 |
| Prolaminas | 0.712 | 0.604 | 0.692 | 0.669 | 0.057 |

*Valores promedio y desviación estándar de tres repeticiones

ANEXO C

CUANTIFICACIÓN PROTEICA MEDIANTE EL MÉTODO DE BIURET

Tabla IX. Datos para la construcción de la curva estándar de BSA

| Concentración de BSA (mg/ml) | Absorbancia (nm) |
|---|-----------------------------|
| 0,000 | 0,000 |
| 3,794 | 0,139 |
| 7,656 | 0,265 |
| 11,402 | 0,373 |
| 15,324 | 0,479 |

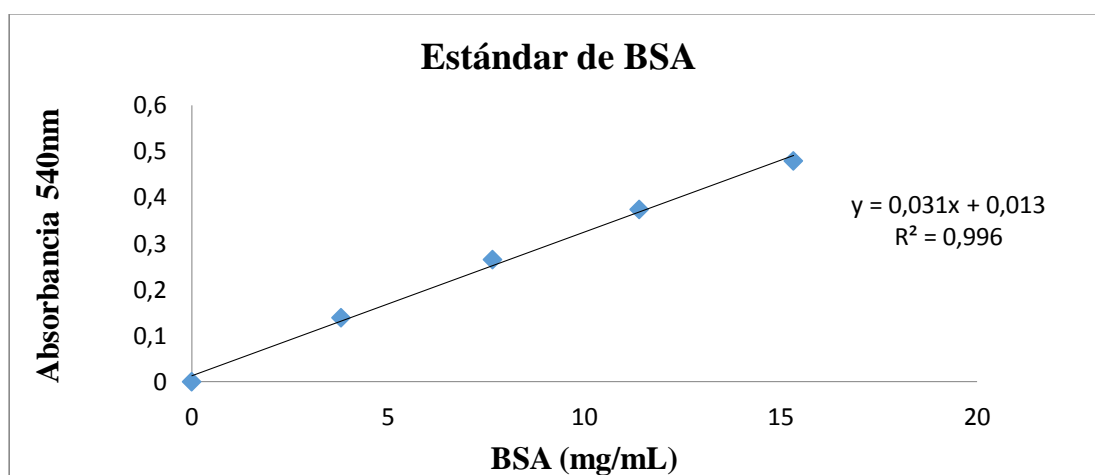


Figura 9. Curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA)

De la curva de calibración se obtuvo la siguiente ecuación

$$A = m * C + B$$

A: Absorbancia

m: Pendiente de la ecuación de calibración

C: Concentración (mg/mL)

B: Interacción del valor de la absorbancia

ANEXO D

CURVA ESTARNDAR UTILIZADA PARA LA CAPACIDAD

ANTIOXIDANTE DE TOCTE

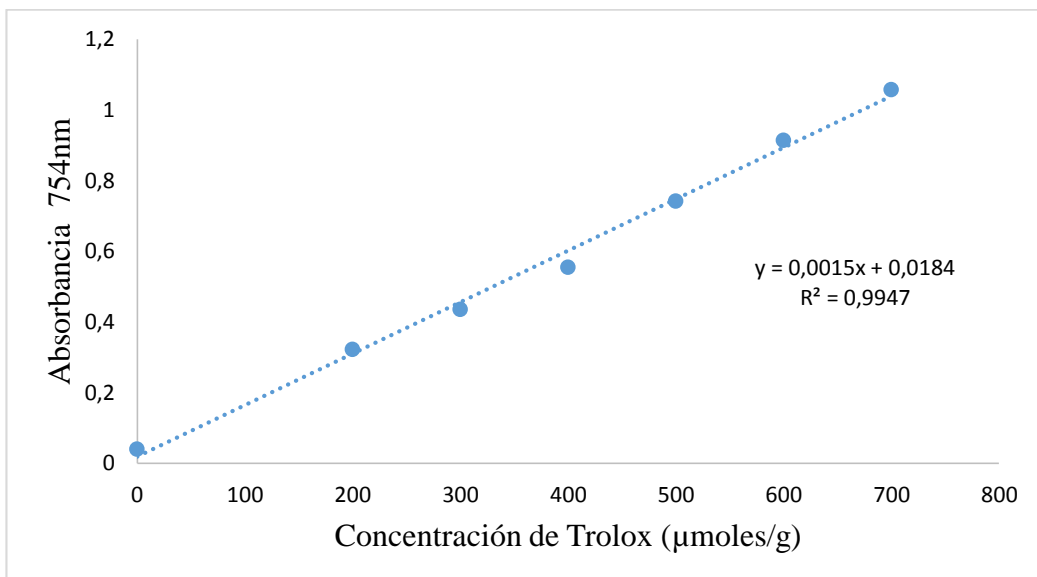


Figura 10. Curva estándar de Trolox (µmoles/g)

ANEXO E
ANALISIS ESTADISTICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL MEJOR
TRATAMIENTO A PARTIR DEL PORCENTAJE DEL RENDIMIENTO DE
PROTEÍNA DE TOCTE

Tabla X. Valores de rendimientos en (%)

| Parámetro | Replica 1 | Replica 2 | Replica 3 | *Media | *S.D |
|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|-------------|
| pH 3,0 | 16,038 | 15,761 | 15,581 | 15,793 | 0,230 |
| pH 4,0 | 16,850 | 17,251 | 16,072 | 16,724 | 0,599 |
| pH 5,0 | 21,480 | 21,261 | 22,202 | 21,648 | 0,492 |
| pH 6,0 | 20,730 | 20,761 | 19,912 | 20,468 | 0,481 |

*Valores promedio y desviación estándar de tres repeticiones

Tabla XI. ANOVA para el rendimiento (%)

| Factor | Suma de Cuadrados | g.l | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-------------------------|--------------------------|------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Tratamientos | 72,475 | 3 | 24.1584 | 108,99 | 0,000 |
| Replicas | 1,773 | 8 | 0.221655 | | |
| Total(Corregido) | 74,248 | 11 | | | |

ANEXO F
ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA DETERMINACION DEL MEJOR
TRATAMIENTO A PARTIR DE LA CONCENTRACION PROTEICA DE
TOCTE

Tabla XII. Valores de concentración de proteína de Tocte mediante el método Biuret.

| Parámetro | Replica 1 | Replica 2 | Replica 3 | Replica 4 | *Media | *S.D |
|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|-------------|
| pH 3,0 | 1,224 | 1,065 | 1,143 | 1,186 | 1,154 | 0,059 |
| pH 4,0 | 1,150 | 1,150 | 1,113 | 1,096 | 1,117 | 0,020 |
| pH 5,0 | 1,179 | 1,208 | 1,221 | 1,011 | 1,155 | 0,085 |
| pH 6,0 | 0,597 | 0,670 | 0,654 | 0,642 | 0,640 | 0,027 |

*Valores promedio y desviación estándar de tres repeticiones

Tabla XIII. ANOVA para la cuantificación proteica de Tocte (%)

| Factor | Suma de Cuadrados | g.l | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-------------------------|--------------------------|------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Tratamientos | 0.766 | 3 | 0.255 | 64.39 | 0,000 |
| Replicas | 0.047 | 12 | 0.003 | | |
| Total(Corregido) | 0.813 | 15 | | | |

ANEXO G
ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EL FRACCIONAMIENTO DE LAS
PROTEINAS DE TOCTE CON DIFERENTES SOLVENTES

Tabla XIV. Rendimientos en (%) de la proteína fraccionada de Tocte en base a 10 g.

| Parámetro | Replica 1 | Replica 2 | Replica 3 | *Media | *S.D |
|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|-------------|
| Globulinas | 34,100 | 33,890 | 35,160 | 34,383 | 0,683 |
| Albúminas | 21,020 | 19,820 | 19,790 | 20,210 | 0,702 |
| Glutelinas | 14,210 | 13,790 | 14,390 | 14,130 | 0,307 |
| Prolaminas | 7,120 | 6,040 | 6,920 | 6,693 | 0,575 |

*Valores promedio y desviación estándar de tres repeticiones

Tabla XV. ANOVA para el rendimiento de la proteína de Tocte fraccionada (%).

| Factor | Suma de Cuadrados | g.l | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-------------------------|--------------------------|------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Tratamientos | 1239,59 | 3 | 413.197 | 1197.09 | 0.0000 |
| Replicas | 2,761 | 8 | 0.345 | | |
| Total(Corregido) | 1242,352 | 11 | | | |

ANEXO H
RESULTADOS DE ANALISIS PROXIMAL DE LA HARINA DE TOCTE




UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERIA EN ALIMENTOS
LABORATORIO DE CONTROL Y ANALISIS DE ALIMENTOS



Dír: Av. Los Chasquis y Río Payamino, Huachi, Ambato Ecuador Telefonos: 2400987 Correo: laconal@uta.edu.ec

CERTIFICADO DE ANALISIS DE LABORATORIO

| Certificado No: 15-292 | | | | | | R01-5.10 06 |
|---|------------------------|----------------|---|---|-----------|--------------|
| Solicitud N°: 15-292 | | | | | | Pág.: 1 de 1 |
| Fecha recepción: 27 octubre 2015 | | | Fecha de ejecución de ensayos: 27 -30 oct 2015 | | | |
| Información del cliente: | | | | | | |
| Empresa: | | | C.I./RUC: 0202089397 | | | |
| Representante: Silvia Estefanía León Morejón | | | Tif: 097923179 | | | |
| Dirección: Arequipa y Rivera | | | Email: leon.silvia.e@gmail.com | | | |
| Ciudad: Riobamba | | | | | | |
| Descripción de las muestras: | | | | | | |
| Producto: Tocte | | | Peso: 400g | | | |
| Marca comercial: | | | Tipo de envase: | | | |
| Lote: n/a | | | No de muestras: | | | |
| F. Elb.: n/a | | | F. Exp.: n/a | | | |
| Conservación: Ambiente: X Refrigeración: Congelación: | | | Almac. en Lab: 7 días | | | |
| Cierres seguridad: Ninguno: X Intactos: Rotos: | | | Muestreo por el cliente: 27 octubre 2015 | | | |
| RESULTADOS OBTENIDOS | | | | | | |
| Muestras | Código del laboratorio | Código cliente | Ensayos solicitados | Métodos utilizados | Unidades | Resultados |
| Tocte | 29215885 | Ninguno | Cenizas | PE01-5.4-FQ . AOAC Ed 19, 2012 923.03 | % | 2.1 |
| | | | Proteína | PE03-5.4-FQ . AOAC Ed 19, 2012 2001.11 | %(Nx6.25) | 17.7 |
| | | | Humedad | PE02-5.4-FQ. AOAC Ed 19, 2012 925.10 | % | 6.22 |
| | | | Grasa | PE13-5.4-FQ. AOAC Ed 19, 2012 2003.06 | % | 49.1 |
| | | | *Fibra cruda | INEN 522 | % | 10.6 |
| | | | *Carbohidratos Totales | Cálculo | % | 14.3 |
| Conds. Ambientales: 19.2 °C; 49%HR | | | | | | |
| | | |  Ing. Gladys Risueño Directora de Calidad | | | |
| Autorización para transferencia electrónica de resultados: Si | | | | | | GR |

Nota: Los resultados consignados se refieren exclusivamente a la muestra recibida. El Laboratorio no es responsable por el uso incorrecto de este certificado. No es un documento negociable. Sólo se permite su reproducción sin fines de lucro y haciendo referencia a la fuente.

"La información que se está enviando es confidencial, exclusivamente para su destinatario, y no puede ser vinculante. Si usted no es el destinatario de esta información recomendamos eliminarla inmediatamente. La distribución o copia del mismo está prohibida y será sancionada según el proceso legal pertinente".

ANEXO I
RESULTADOS DE ANALISIS PROXIMAL DEL AISLADO DE TOCTE A
pH 5,0




UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERIA EN ALIMENTOS
LABORATORIO DE CONTROL Y ANALISIS DE ALIMENTOS



Dir: Av. Los Chasquis y Río Payamino, Huachi, Telf.: 2 400987 ext. 114, e-mail: laconal@uta.edu.ec; laconal@hotmail.com
Ambato-Ecuador

CERTIFICADO DE ANALISIS DE LABORATORIO

| Certificado No:15-344 | | | | | | R01-5.10.06 |
|--|------------------------|----------------|---|--|-----------|--------------|
| Solicitud N°: 15-344 | | | | | | Pág.: 1 de 1 |
| Fecha recepción: 14 diciembre 2015 | | | Fecha de ejecución de ensayos: 15-18 diciembre 2015 | | | |
| Información del cliente: | | | | | | |
| Empresa: | | | C.I./RUC: 0202089397 | | | |
| Representante: Silvia Estefanía Leon Morejon | | | TIF: 0997923179 | | | |
| Dirección: Arequipa y Rivera | | | Email: leon.silvia.e@gmail.com | | | |
| Ciudad: Riobamba | | | | | | |
| Descripción de las muestras: | | | | | | |
| Producto: Aislado de tocte | | | Peso: 12 g aprox | | | |
| Marca comercial: n/a | | | Tipo de envase: plástico | | | |
| Lote: n/a | | | No de muestras: una | | | |
| F. Elb.: n/a | | | F. Exp.: n/a | | | |
| Conservación: Ambiente: x Refrigeración: Congelación: | | | Almac. en Lab: 15 días | | | |
| Cierres seguridad: Ninguno: x Intactos: Rotos: | | | Muestreo por el cliente: 14/12/2015 | | | |
| RESULTADOS OBTENIDOS | | | | | | |
| Muestras | Código del laboratorio | Código cliente | Ensayos solicitados | Métodos utilizados | Unidades | Resultados |
| Aislado de Tocte | 344151078 | Ninguno | Cenizas | PE01-5.4-FQ. AOAC Ed 19, 2012 923.03 | % | 2.66 |
| | | | Proteína | PE03-5.4-FQ. AOAC Ed 19, 2012 2001.11 | %(Nx6.25) | 74.8 |
| | | | Humedad | PE02-5.4-FQ. AOAC Ed 19, 2012 925.10 | % | 5.23 |
| | | | Grasa | PE13-5.4-FQ. AOAC Ed 19, 2012 2003.06 | % | 10.5 |
| | | | *Fibra cruda | INEN 522 | % | 0.13 |
| | | | *Carbohidratos Totales | Cálculo | % | 6.7 |
| Conds. Ambientales: 19.8 °C; 52%HR | | | | | | |
|  Ing. Gladys Risueño Directora de Calidad | | | | | | GR |
| Autorización para transferencia electrónica de resultados: No | | | | | | |

Nota: Los resultados consignados se refieren exclusivamente a la muestra recibida. El Laboratorio no es responsable por el uso incorrecto de este certificado.
No es un documento negociable. Sólo se permite su reproducción sin fines de lucro y haciendo referencia a la fuente.

"La información que se está enviando es confidencial, exclusivamente para su destinatario, y no puede ser vinculante. Si usted no es el destinatario de esta información recomendamos eliminarla inmediatamente. La distribución o copia del mismo está prohibida y será sancionada según el proceso legal pertinente".

ANEXO J
FOTOGRAFIAS

Aislamiento de la proteína de Tocte



Figura 16. Proceso de filtrado



Figura 17. Secado de la Harina después del desengrasado



Figura 18. Harina desengrasada



Figura 19. Pesado de la harina

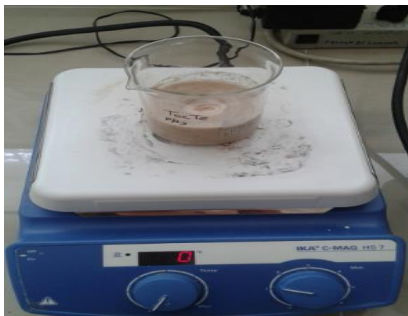


Figura 20. Agitación de la muestra



Figura 21. Determinación del pH



Figura 22. Centrifugación



Figura 23. Precipitado de la proteína



Figura 24. Proteína congelada a -86°C



Figura 25. Liofilizando la proteína



Figura 26. Proteína Liofilizada

Electroforesis (SDS-PAGE)



Figura 27. Equipo listo para agregar el gel de separación



Figura 28. Peines colocados para la formación de los pocillos

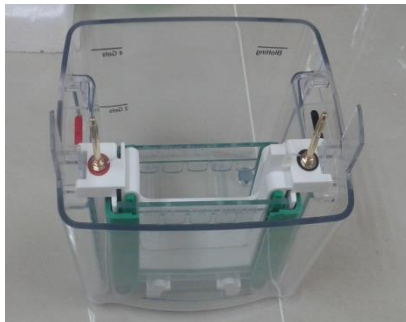


Figura 29. Pocillos listos para agregar las muestras



Figura 30. Corriendo la electroforesis



Figura 32. Teñido con Coomassie, Blue R-250

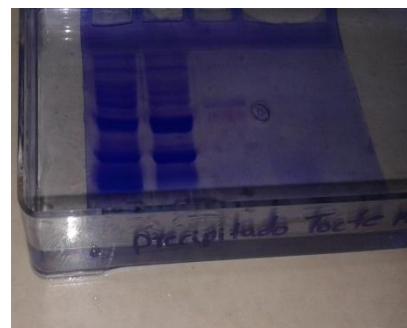


Figura 33. Desteñido de la muestra

Cuantificación de las proteínas de Tocte mediante el método de Biuret

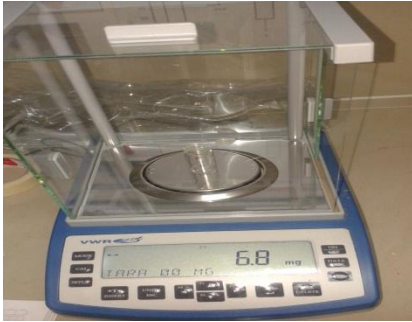


Figura 34. Peso de la proteína



Figura 35. Agitación durante 15 minutos



Figura 36. Muestras de proteína de Tocte y blanco



Figura 37. Corriendo la electroforesis