



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción

“Utilización de enzimas Lipasas en la extracción de proteínas del
polvillo de arroz”

EXAMEN COMPLEXIVO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERA DE ALIMENTOS

Presentada por:

Andrea Lissette Cruz Espinoza

GUAYAQUIL-ECUADOR

AÑO 2015

AGRADECIMIENTO

A Dios,

Mi familia,

Mis padres, hermanos

Ing. Grace Vásquez

Centro de Investigaciones

Biotechnológicas del Ecuador

(CIBE)

Facultad de Ingeniería Marítima,

Ciencias Biológicas,

Oceánicas y Recursos

Naturales (FIMCBOR)

DEDICATORIA

A Dios por haberme dado las fortalezas para concluir mi carrera, gracias.

A mis padres, por el sacrificio y paciencia. Que Dios los bendiga.

A mi esposo, hijo, los amo.

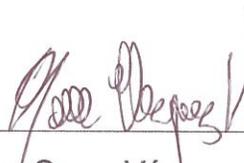
A Ing. Grace Vásquez, apoyo invaluable para terminación del proyecto, gracias. Dios le bendiga

A los laboratorios por la paciencia, confianza, amabilidad y apoyo, gracias. Dios les bendiga.

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN



Ing. Jorge Duque R.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE



Ing. Grace Vásquez V.
DIRECTORA DEL TFG



Efrén Santos O., PhD.
VOCAL



DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este Examen Complexivo, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)



Andrea Lissette Cruz Espinoza

RESUMEN

En el año 2013, la cantidad aproximada de polvillo de arroz fue 155000 TM. La superficie cosechada de arroz a nivel nacional corresponde el 57% al ciclo de invierno y el 43% al ciclo de verano siendo las provincias del Guayas, Los Ríos y Manabí, el 95% de la producción nacional. Así mismo, el porcentaje de polvillo de arroz (PA) generado está entre el 10-12%. El PA está formado por: embrión o germen, capa aleurona, testa y pericarpio constituidos por componentes potencialmente nutritivos. Contiene proteínas de buena calidad biológica con una composición en aminoácidos esenciales bien equilibrada y un alto contenido de carbohidratos complejos siendo el principal componente la celulosa, principal fuente de fibra rica alimentaria.

El objetivo de este estudio fue la extracción de proteínas del polvillo de arroz usando enzimas lipasas de la familia estereasas. Se trabajó con PA de la zona de Yaguachi, el cual se caracterizó físico-químicamente. Para la hidrólisis enzimática se manejaron las siguientes condiciones: Relación de PA: buffer citrato (1:5); enzima 1% (p/p); pH 6 y; temperaturas 40°C. La reacción de hidrólisis fue seguida midiendo DO_{280} (Absorbancia) durante 120 minutos y a los sobrenadantes obtenidos se le determinó nitrógeno soluble. La máxima hidrólisis se alcanzó a los 30 minutos con un valor de DO_{280} (abs) 0.159 y 7,01 \pm 0,5 % de nitrógeno soluble.

Finalmente, se obtuvo un concentrado proteínico con: proteína total 54.41%; humedad 3.07%; cenizas 8.08%; grasa 8.06%; fibra cruda 0.07%; actividad de agua 0.39; pH 4.50 y una perfil peptídico con pesos moleculares entre 2-50 KDa.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	.ii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ABREVIATURAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
INTRODUCCION.....	1
CAPÍTULO 1	
1. GENERALIDADES.....	3
1.1. Antecedentes.....	3
1.2. Planteamiento del problema.....	6
1.2.1. Justificación.....	7
1.3. Objetivos.....	8
1.3.1. Objetivo general.....	8
1.3.2. Objetivo específico.....	8
1.4. Metodología del proyecto.....	9
CAPÍTULO 2	
2. MARCO TEORICO.....	10
2.1. Fuentes no convencionales de proteínas.....	10

2.2. Polvillo de arroz en Ecuador.....	12
2.2.1. Composición nutricional del polvillo de arroz.....	13
2.2.2. Producción del polvillo de arroz en Ecuador.....	20
2.2.3. Métodos de extracción de proteínas.....	22

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y METODOLOGIA.....	26
3.1. Características de materia prima e insumos.....	26
3.2. Proceso de extracción de proteínas - método enzimático.....	28
3.3. Determinación de nitrógeno soluble y total.....	31
3.4. Electroforésis.....	32

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS.....	34
4.1. Cinética de hidrólisis vs. contenido de nitrógeno.....	34
4.2. Caracterización del concentrado proteínico.....	36

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	42
--	----

APÉNDICES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

PA	Polvillo de arroz
MAGAP	Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca
INCCA	Instituto Nacional de Capacitación Campesina
INEC	Instituto Nacional de Estadística y Censos
RIMISP	Centro Latinoamericano de Desarrollo Rural
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
FAO	Food and Agriculture Organization
HA	Hectárea
TM	Toneladas métricas
PER	Radio de eficiencia proteica
NP	Nitrógeno Proteico
NNP	Nitrógeno No Proteico
TCA	Ácido Tricloroacético
DH	Grado de hidrólisis
XG	Fuerza centrífuga
E.C.	Enzyme Comision Numbers
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TEMED	Tetramethylethylenediamine
APS	Persulfato de Amonio
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
TRIS/HCl	Tris (Hidroximetil) Aminometano/Ácido Clorhídrico
KDa	Kilodaltones

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1	Acción enzimática bajo acción de hidrolasas.....26
Figura 3.1	USA Standard Test Sieve.....29
Figura 3.2	Cyclone Sample Mill.....29
Figura 3.3	Eppendorf Thermomixer.....30
Figura 3.4	New Brunswick Scientific, Incubator-Shaker.....31
Figura 3.5	Centrifuge Sorvall ST 16R Thermoscientific.....31
Figura 3.6	Centrifuge 5810 R Eppendorf.....31
Figura 3.7	Placas UV de 96 pocillos.....31
Figura 3.8	Espectrofotómetro BiotekSynergy HT.....34
Figura 3.9	Sistema de Electroforésis.....34
Figura 3.10.	Marcadores de Peso Molecular.....34
Figura 4.1	Nitrógeno Soluble vs. Tiempo.....36
Figura 4.2	SDS-PAGE del Concentrado Proteínico liofilizado.....40

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Contenido de proteínas en los principales cultivos de Cereales y leguminosas en el Ecuador.....	13
Tabla 2. Cosecha, producción y rendimiento, 2011-2012.....	14
Tabla 3. Caracterización física-química del polvillo de arroz Ecuatoriano.....	15
Tabla 4. Patrones de requerimiento de Aminoácidos por edad vs Aminoácidos en PA.....	18
Tabla 5. Variación trimestral por semestre (%), 2011-2014.....	22
Tabla 6. Grado de hidrólisis LIPOPAN.....	35
Tabla 7. Caracterización físico-química del PA fraccionado y concentrado proteínico liofilizado.....	37

INTRODUCCIÓN

El Polvillo de arroz (PA) es un subproducto obtenido de una fuente primaria básica para la alimentación de los ecuatorianos, pues ocupa la tercera parte de la superficie de productos transitorios cultivados. Contiene entre el 12-15% de proteínas de tipo hipo alergénica, muy útil como ingrediente para la formulación de alimentos para regímenes especiales. Por lo tanto, este sustrato resulta atractivo desde el punto de vista industrial para la obtención de concentrados proteínicos, ya que se encuentra de forma abundante y a precio accesible.

El objetivo de este estudio fue la extracción de proteínas del polvillo de arroz usando enzimas lipasas de la familia estereasas. La investigación se estructuró de la siguiente forma:

En el capítulo 1 se describe la problemática entorno al polvillo de arroz y las posibles opciones para la industrialización del mismo. Se establecen los objetivos generales y específicos, así como la metodología para la investigación.

En el capítulo 2 se realiza una explicación de los fundamentos teóricos que soportan la investigación. Se describen aspectos relacionados con procesos tecnológicos y la composición del polvillo de arroz.

En el capítulo 3 se hace una descripción detallada de los materiales y métodos que se empleó en el desarrollo de la investigación.

En el capítulo 4 se expone los resultados obtenidos durante la experimentación; a su vez se realiza un análisis de las variables observadas. También se proporciona una caracterización del producto obtenido (concentrado proteínico liofilizado).

En el capítulo 5 se expone las conclusiones y recomendaciones del presente trabajo.

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

1.1. Antecedentes

La producción de enzimas para uso industrial tuvo sus orígenes en Dinamarca y Japón a finales del siglo XIX cuando se obtuvo las primeras preparaciones de renina a partir del estómago de terneros y de amilasa de origen fúngico (Carrera, J., 2003). Actualmente existen variedad de enzimas comerciales de grado alimenticio para la obtención de concentrados u extractos proteínicos. Gracias a la biotecnología, se ha desarrollado nuevas enzimas con propiedades mejoradas para estudios establecidos y el desarrollo de las mismas para futuras aplicaciones.

Básicamente, las proteínas son macromoléculas orgánicas constituidas por Carbono (C), Oxígeno (O), Hidrógeno (H) y Nitrógeno (N); además contiene elementos muy importante para el ser humano

como azufre (S) y fósforo (P) y en menor proporción, hierro (Fe), cobre (Cu), Magnesio (Mg), Yodo (Y). De acuerdo a la fuente, las proteínas se pueden dividir en: proteínas de origen animal encontradas en la carne, pescados y mariscos, huevos, leche; proteínas del origen vegetal encontradas en cereales, leguminosas, frutas y hortalizas; y proteínas no convencionales entre ellos desechos agroindustriales.

Los desechos agroindustriales son producidos por la transformación de los productos agrícolas. Estos desechos son orgánicos; como las cáscaras de granos, que en ciertos casos contienen un alto contenido de nutrientes de buena calidad para el ser humano.

Los cereales o granos están recubiertos por una cáscara que les ayuda contra el ataque de insectos y otros agentes patógenos. Para obtener un grano comestible, se despoja del recubrimiento siendo éstos los que contienen un alto contenido de elementos equilibrados para el consumidor. Los cereales son gramíneas considerados uno de los más importantes en la dieta humana por sus altas cualidades nutricionales ya que contienen hidratos de carbono, proteínas de alto valor biológico, fibra, sales minerales y vitaminas; nutrientes indispensables para el ser humano.

La calidad proteínica ha sido la razón principal para su obtención y éste hecho convierte a las proteínas del PA en un sustrato muy atractivo desde el punto de vista nutricional capaz de complementar proteínas de otras fuentes.

Hoy en día, la extracción de proteínas consiste en la obtención de concentrados o aislados proteínicos. Para la producción con fines nutricionales, se prefiere el método enzimático. La hidrólisis enzimática, realizada en condiciones moderadas de pH: 5-9 y temperatura: 40-60°C, garantiza una mayor pureza de péptidos o aminoácidos (Clemente, 1997). Los parámetros más críticos en la hidrólisis son: temperatura, tiempo de hidrólisis, pH y como parámetro de control, el grado de hidrólisis (GH). GH es el parámetro más usado para el control del proceso hidrolítico. El proceso de hidrólisis termina con la inactivación enzimática, la cual puede ser modificando el pH o temperatura (Hall y Braun, 1994).

Los análisis físicos químicos evalúan las características de los alimentos y sus constituyentes, la cual es crítica para el entendimiento de los elementos que determinan las propiedades de los alimentos con el fin de producir alimentos que sean consistentemente seguros, nutritivos y deseables para el consumidor.

1.2. Planteamiento del Problema

El polvillo de arroz es un coproducto del pilado del arroz cuya composición bromatológica ha sido ampliamente estudiado en otros países. El PA posee una actividad biológica y nutricional significativa. Sin embargo, aún no se ha implementado su uso para consumo humano debido a la falta de tecnificación viable y sostenible del cultivo en toda la cadena productiva.

Por otro lado, la emanación de partículas del PA ocasiona una contaminación al medio ambiente ya que afecta a las vías respiratorias y oculares, especialmente en las zonas aledañas a los centros de pilado.

Hoy en día, el PA es destinado para consumo animal en aves, cerdos, ganado vacuno y no para consumo humano debido a no presentar valor agregado.

Según FAO - OCDE 2013, las pérdidas en la producción, la volatilidad de precios, las dificultades en el comercio y las presiones de normativas ambientales ocasionarían una amenaza para el abasto de los alimentos en la siguiente década. Por lo tanto, es muy prioritario para el país la búsqueda de nuevas fuentes de proteínas a

partir de materia prima o coproductos locales. Estas nuevas fuentes permitiría el desarrollo de alimentos nutritivos que mejoren la calidad de vida de la población con enfoque social.

El polvillo de arroz constituye una fuente interesante de proteínas subutilizada, en los dos últimos años se ha producido aproximadamente 175.000 TM /anuales y que podrían ser aprovechada con fines industriales para la alimentación humana.

1.2.1. Justificación

En Ecuador, la región donde se localiza la mayor superficie sembrada de arroz es en la Costa y las provincias que aportan con el 94% de la producción total son Guayas y los Ríos. La provincia del Guayas representa un más del 60% de la producción del arroz seguido de la provincia de Los Ríos con una producción entre el 40-60% y las otras provincias menos del 20% excepto Carchi, Imbabura, Santo Domingo, Tungurahua, Chimborazo y Azuay que no producen arroz (Ramírez, C., 2014). El cultivo de arroz es uno de los más extensos y de gran importancia a nivel socio-económico y cultural de los pequeños y medianos productores que se dedican a esta actividad así también, constituye la base de la alimentación de los ecuatorianos. Sin embargo, no existe una tecnificación e

industrialización integral del arroz que provea de insumos a nivel industrial como: almidones, aceites, extractos proteicos.

En la actualidad, frente al cambio de la matriz productiva, es prioritario promover los encadenamientos productivos con valor agregado que privilegien a los factores de la economía popular y solidaria generando industrias básicas y conexas a partir del polvillo de arroz.

Por tal razón, es necesario obtener un ingrediente alimentario rico en compuestos nitrogenados (extracto proteínico) con el fin de desarrollar alimentos nutritivos que mejoren la calidad de vida de la población.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Separar los componentes no proteínicos del PA por método enzimático mediante el uso de enzimas Lipasas para la obtención de concentrados proteínicos.

1.3.2. Objetivo específico.

Analizar propiedades físico-químicas del polvillo de arroz, obtenido de haciendas del cantón Yaguachi, provincia del Guayas.

Establecer la cinética de hidrólisis enzimática mediante la medida de la absorbancia de sus productos a longitud de onda de 280 nm y su contenido de nitrógeno soluble.

Evaluar las características fisicoquímicas del concentrado proteínico liofilizado.

1.4. Metodología del proyecto

Para el presente proyecto, el método desarrollado fue explorativo y experimental. El propósito fue establecer el tiempo máximo de hidrólisis de una enzima sobre un sustrato con alto contenido de lípidos para la obtención de proteínas, medido a 280 nm. Se determinó el grado de hidrólisis al contenido de nitrógeno tanto en la muestra inicial como en los productos de la reacción. Posteriormente, se realizó una caracterización de concentrado proteínico del PA. Además pH, acidez, actividad de agua y electroforesis. Finalmente, conclusiones dirigidas a proporcionar los hallazgos encontrados y recomendaciones o sugerencias observadas de la investigación.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Fuentes no Convencionales de Proteínas.

Las fuentes no convencionales de proteínas son: hongos, algas, bacterias, levaduras, desechos agroalimentarios y residuos industriales. Existen estudios que evidencian el uso de dichas fuentes para obtención de extractos proteínicos como una alternativa importante para suplementar productos de consumo humano.

En Ecuador, la biodiversidad por metro cuadrado es muy amplia. Dentro del sector agrícola, los principales cultivos de cereales y leguminosas son: arroz, maíz, cebada, quinua, soya, trigo y frejol. (Paredes, E., 2009).

En Tabla 1 se resume el valor nutricional proteico obtenido de la Base de Datos Internacional de Composición de Alimentos en Ecuador.

TABLA 1
CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN LOS PRINCIPALES CULTIVOS
DE CEREALES Y LEGUMINOSAS EN EL ECUADOR

Principales cultivos	g proteínas / 100 g
Soya	27,9
Frejol*	15,7
Trigo	11,6
Quinoa	14,2
Cebada	10
Arroz*	8,1
Maíz*	5,6

*Promedio de proteínas por sus variedades.

Elaborado por: Andrea Cruz, 2014

El arroz es un cultivo de gran importancia y de alto consumo en el país; es la principal plantación por hectárea. El cultivo del arroz es el más extenso del Ecuador con un 17% del área agrícola del país de cultivos permanentes y transitorios; además constituye el más importante de los cultivos transitorios, cerca del 40%, seguido del maíz duro con cultivos permanentes y cerca del 30% con cultivos transitorios. (Castillo, M., sf.). Quinoa tiene 2000 ha de área cultivada

(Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, 2013), trigo 23000 ha (Agencia Pública de Noticias de Ecuador y Suramérica Andes, 2013), soya tiene 43000 ha (Gómez, J., 2013), cebada tiene 800 ha (Diario La Hora Nacional, 2013) y fréjol tiene 121591 ha (Ochoa, E., 2013).

La Tabla 2 muestra la estadística de los dos principales cultivos de cereales en el Ecuador.

TABLA 2
COSECHA, PRODUCCIÓN Y RENDIMIENTO, 2011-2012

	2011			2012		
	Cosecha Ha	Producción en cáscara seco y limpio TM	Rendimiento TM/Ha	Cosecha Ha	Producción en cáscara seco y limpio TM	Rendimiento TM/Ha
Arroz	329.957,0	1.477.941,0	4,5	371.170,0	1.565.535,0	4,2
Maíz Duro Seco	262.913,0	830.150,0	3,2	330.057,9	1.215.192,6	3,7

Fuente: INEC-ESPAC

2.2. Polvillo de Arroz en Ecuador

El arroz en cáscara o arroz paddy entra a un proceso llamado “pilado” donde se obtiene arroz blanco originando uno de los subproductos constituidos por componentes potencialmente nutritivos, el polvillo de arroz (PA). El PA está formado por: germen, capa aleurona, testa y pericarpio. El PA con respecto al peso del

grano representa aproximadamente el 1 - 2% del germen y el 9 -10% entre capa aleurona, testa y pericarpio.

2.2.1. Composición Nutricional del Polvillo de Arroz

La Tabla 3 indica la variabilidad en la composición proximal promedio relacionada con la variedad y grado de tecnificación del pilado del polvillo de arroz ecuatoriano proveniente de semilla registrada, variedades INIAP 14, 15 y 17.

TABLA 3
CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL POLVILLO DE
ARROZ ECUATORIANO

	INIAP 14		INIAP 15		INIAP 17	
	Pulido 1	Pulido 2	Pulido 1	Pulido 2	Pulido 1	Pulido 2
Grasa *	18,56%	16,38%	18,44%	17,15%	18,39%	14,76%
Proteína *	12,78%	12,14%	13,35%	13,23%	12,63%	11,29%
Humedad *	10,94%	10,84%	11,20%	10,91%	10,62%	10,95%
Cenizas *	11,05%	9,83%	10,09%	9,48%	9,37%	8,91%
Fibra digerible neutra **	19,99 ± 0,17%	13,06 ± 0,48%	20,65 ± 0,39%	14,12 ± 0,70%	18,92 ± 0,61%	11,87 ± 0,28%
Fibra digerible ácida **	8,76 ± 0,07%	5,60 ± 0,06%	9,14 ± 0,17%	6,20 ± 0,27%	8,42 ± 0,02%	5,56 ± 0,07%
Fuente: * Vidal y Silva, 2012 y Suquilanda y Naranjo, 2013						
** Suquilanda y Naranjo, 2013						

Elaborado por: Andrea Cruz, 2014

Lípidos

La mayoría de los lípidos pertenecen a la categoría de lípidos no amiláceos. Éstos se localizan principalmente en las capas de aleurona y germen, e incluyen lípidos neutros con una pequeña cantidad de glucolípidos y fosfolípidos (Rosell, C., 2007). Dependiendo de la variedad de cultivo de arroz, el polvillo de arroz contiene alrededor de 15 – 20% de lípidos (Vargas Edgar, Aguirre Marisol, 2011) e incluso contenidos entre 17 - 22% (Franco, Daniel, 2012) en los cuales hay un alto porcentaje de lípidos insaponificables, constituido por 43% de ácidos grasos poliinsaturados, 37% de monoinsaturados y 20% de saturados (E. Pacheco Delahaye, et al., 2009). Los principales ácidos grasos contenidos en el PA son: ácido graso esencial poliinsaturado linoleíco, ácido graso monoinsaturado oleico y ácido graso saturado palmítico.

Proteína

Las proteínas de almacenamiento se encuentran en la capa de aleurona, capa externa del pericarpio y germen como cuerpos proteínicos ricos en albúminas: solubles en agua, glutelinas: solubles en soluciones alcalina y ácidas ricas en lisina y globulinas:

solubles en soluciones salinas diluidas y neutra (Pincioli, M., 2010). Además refleja una buena relación de eficiencia proteica, el cual es un método que permite evaluar la calidad de la proteína (PER) que oscila entre 2,03 y 2,18 con respecto a PER referencia de 2.5 (caseína), además los contenidos de lisina disponibles que oscilan entre 5,4 y 5,8 g/100 g proteína (E. Pacheco Delahaye, 2006).

Los cuerpos proteínicos son generalmente esféricos, de 2 a 5 μm de diámetro, contienen inclusiones globoides (lugar de deposición de fitinas, sales de potasio, magnesio y ácido fítico) y ocasionalmente cristaloides proteináceos (cristal de proteínas).

Las albúminas son proteínas globulares compactas con abundante residuos de cisteína, tienen la propiedad de inhibidor de tripsina (moléculas proteicas y que la mayoría de ellos son proteínas solubles de bajo peso molecular (Muñoz, F., 2011) o inhibidor de α -amilasa. Las globulinas son subcategorizadas de acuerdo a su coeficiente de sedimentación:

Vicilinas 7 S: tienen entre 150 y 200 KDa, pierden residuos de cisteína y no forman puentes disulfuro. Se encuentran en el germen

y en la capa de aleurona y son menos abundantes que las leguminas 11 S.

Leguminas 11 S: tienen entre 350 y 400 KDa; tienen subunidades de 60 KDa las que a su vez tienen subunidades de 40 y 20 KDa. Forman puentes disulfuro. (J.R.Soberón, s.f.).

La fracción globulina es rica en aminoácidos azufrados cisteína y metionina (Pincioli, M., 2010).

La FAO ha señalado que una proteína es biológicamente completa cuando contiene todos los aminoácidos esenciales en una cantidad igual o superior a la establecida para cada aminoácido en una proteína de referencia o patrón. En la Tabla 4 se detalla el patrón de aminoácidos recomendado para evaluar la calidad biológica de las proteínas para todas las edades con respecto al contenido de aminoácidos en el PA.

TABLA 4
PATRONES DE REQUERIMIENTO DE
AMINOÁCIDOS POR EDAD VS. AMINOÁCIDOS EN PA

Aminoácidos	Patrón de requerimiento de aminoácidos por edad mg / g de proteína*				AA mg/g de proteína en PA °
	Lactantes 3-4 meses	2-6 años	6-13 años	>13 años	
Histidina	16	19	19	11	27-33
Isoleucina	40	28	28	13	27-41
Leucina	93	66	44	19	69-76
Lisina	60	58	44	16	39,9-53**
Metionina+Cistina	33	25	22	17	42-48
Fenilalanina+Tirosina	72	63	22	19	77-80
Treonina	50	34	28	9	38-42
Triptófano	10	11	9	5	38-42
Valina	54	35	25	13	49-60
Fuente: FAO 1985					
* Los patrones son idénticos a los publicados por WHO (1985) excepto en lactantes, en quienes la diferencia es trivial y la histidina para adultos.					
° Juliano 1994					
**Wang et al., 1999 y Tang et al., 2003					

Elaborado por: Andrea Cruz, 2014

En referencia a los aminoácidos no esenciales, FAO 2004 indica que la proteína en el polvillo de arroz contiene abundante ácido glutámico y aspártico.

Antioxidantes

El PA contiene vitaminas A, C y E conformando el grupo de las vitaminas antioxidantes. La fracción lipídica mencionada contiene un complejo único de compuestos antioxidante entre ellos son de destacar los tocoferoles y tocotrienoles conocido como tocoles y los

ésteres del ácido trans-ferúlico con esteroides y alcoholes triterpénicos, cuya fracción se conoce como γ -orizanol y que presenta una importante actividad. Entre los tocoles presentes en el PA predominan α -, γ - y δ -tocoferol. Estos compuestos tienen actividad antioxidante y desempeñan un papel protector frente a algunas formas de cáncer. El γ -orizanol presenta una alta actividad antioxidante y diversos estudios han demostrado su capacidad para reducir el colesterol plasmático, reducir la absorción del colesterol hepático y prevenir la arteriosclerosis (Vanessa R Pestana, et al. 2009).

Almidón

Dependiendo del grado de pulido se puede encontrar una cantidad entre el 10-25% de almidón en el polvillo de arroz (Narasinga Rao, B.S., 2000) que no es más que dos tipos de polímeros: Amilosa; polímero de unidades de D-glucosa, unidas por enlaces α -1,4 glucosídicos, esencialmente lineal. Las cadenas glucosídicas de la amilosa se disponen en forma de hélice con 6 unidades por vuelta (estructura helicoidal) y Amilopectina; polímero de D-glucosa, unidas por enlaces α -1,4 glucosídicos, presenta ramificaciones con enlaces α -1,6 y existe un punto de ramificación cada 15 – 30 restos de glucosa encontrados en forma de racimo encontradas

mayoritariamente como cadenas de doble hélices ordenadas de forma paralelas (Brumovsky, L., 2010).

Fibra

La fibra proviene de alimentos de origen vegetal, entre ellos: los granos. En el PA se encuentra principalmente celulosa y hemicelulosa como constituyente estructural de las paredes celulares (Vargas, E., 2011) y que abundan en el pericarpio y en el germen. La fibra es un tipo de carbohidrato que el cuerpo no puede asimilar. La fibra no es asimilable por el intestino delgado humano pero sufre una total o parcial fermentación en el intestino grueso. Estas fibras pueden ser: Fibra soluble (FS) y fibra insoluble (FI). El PA tiene un alto valor de fibra insoluble (FI) y la relativa baja de proporción de fibra soluble (FS). Hay estudios que indican una relación de FI/FS 8:1 (Emperatriz Pacheco-Delahaye, et. al. 2004). La fibra cruda es la suma de lignina y celulosa.

Vitaminas y Minerales

Las vitaminas se encuentran en la testa. Lloyd, et. al. (2000) reportó que el PA contiene cantidades elevadas de vitaminas del grupo B.

Las cenizas son el residuo orgánico representado como el contenido de minerales en el alimento. Los minerales, junto con el agua, son los únicos componentes de los alimentos que no se pueden oxidar en el organismo para producir energía. Los minerales en el PA se encuentran en el pericarpio. Lloyd, et.al. (2000) reportó que contiene alto contenido de fósforo, potasio, hierro, cobre y zinc.

Por otro lado, ríos contaminados que inundan los cultivos o el uso de agua de riego con arsénico, cadmio a concentraciones altas pueden acumularse en el PA. Las concentraciones de cadmio y arsénico máximos considerados permisibles para aguas de riego (Cd: 0.01 mg/lit y As: 0.10 mg/lit) (Ayers & Wescott, 1985, Water quality for agriculture, FAO, Nr 29) y para alimentos (< 1 ppm para Cd y As) (World Health Organization -WHO, 1963, International Standards for drinking water).

2.2.2. Producción del polvillo de arroz en el Ecuador.

En los últimos 4 años, las condiciones climáticas del Ecuador han sido muy variadas afectando la producción de arroz, especialmente en la época de invierno. El Banco Central de Ecuador (BCE) indica que las causas principales fueron: las prolongadas inundaciones y sequías seguidas de nuevas plagas y enfermedades como también

la falta de tecnificación en todas las zonas arroceros. Cabe mencionar que en la cosecha 2014, solo en los sectores arroceros de Manabí se trabajó con semillas mejoradas de buena calidad lo que permitió que el volumen de producción y los rendimientos en esta zona sean mayores a los registrados en el primer trimestre de 2013.

En Tabla 5, se muestra el aumento y disminución de la superficie sembrada y volumen de producción del arroz en invierno (Enero, I semestre) y verano (Junio-Julio, II semestre).

Tabla 5
VARIACIÓN TRIMESTRAL POR SEMESTRE (%), 2011-2014.

Años	I Semestre		II Semestre	
	Superficie sembrada	Volumen de producción	Superficie sembrada	Volumen de producción
2011	2%	-25%	9%	21%
2012	-6%	-9%	4%	6%
2013	6%	-3%	8%	9%
2014	-2%	-8%		
Fuente: Banco Central del Ecuador				

Elaborado por: Andrea Cruz, 2014

En el año 2013, la producción aproximada de arroz con cáscara fue 1.555.000 TM.

Según estimado del BCE, para el año 2014 la producción de arroz disminuirá en un 30 por ciento debido a plagas y al clima. Por lo tanto, la producción estimada de polvillo sería de 120.000 TM.

2.2.3. Métodos de extracción de proteínas.

Para la extracción de proteínas se debe empezar con una rotura de la estructura celular. El método de rotura para las células vegetales es depende de la localización de la proteína. Por consiguiente, uno de los métodos para el fraccionamiento celular es: destrucción mecánica; entre ellos la prensa de French, método por el cual se logra pasar las células vegetales a gran velocidad a través de un pequeño orificio.

Un estudio realizado por Larios-Saldaña et al. (2004) indicó que el tamaño de las partículas más abundantes en el PA corresponde a malla N° 30, 50 y 150 (66.13%), seguido de malla N° 40, 60 y 100 (16.36%) y menos abundante, malla N° 120, 180, 200, 250, 300, 325 y >325 (17.5%). El contenido de proteínas experimenta un ligero incremento conforme disminuye el tamaño de las partículas debido a

que éstas poseen una mayor proporción de capa aleurona y germen. Con respecto a la abertura de la malla (tamiz), Rodríguez, M., 2007 indica que las partículas finas corresponde a abertura < 0.425 mm (malla $>N^{\circ} 48$), partículas medianas entre 0.425 y 0.60 mm (malla $N^{\circ} 48$ hasta $N^{\circ} 30$) y partículas gruesas > 0.60 mm (malla $<N^{\circ}30$).

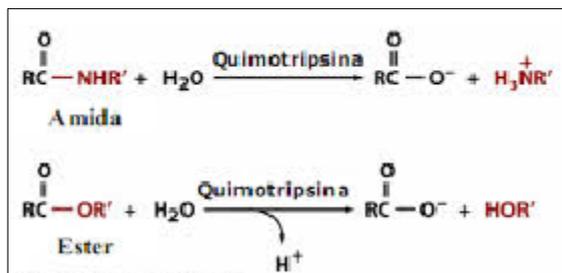
Tras la rotura celular, es necesario utilizar soluciones tampones específicos de extracción para solubilizar las proteínas. Según Guadix et al. (2000), los métodos de extracción son: hidrólisis enzimática e hidrólisis química. Las ventajas en el uso de enzimas vs. químicos son las siguientes:

- Selectividad. Las enzimas son específicas para un tipo determinado de enlace y, por tanto, no es frecuente la aparición de productos de degradación. En cambio, la poca selectividad de los ataques ácido y básico y su difícil control conduce inevitablemente a la aparición de productos de degradación que pueden llegar a ser tóxicos.
- Condiciones moderadas de temperatura y pH. La hidrólisis enzimática transcurre generalmente en el intervalo de 40° a $60^{\circ}C$ y pH comprendido entre 4-8.
- No se añaden sustancias extrañas. Evidentemente no es así en los procesos de hidrólisis química, ya que la necesaria

neutralización posterior eleva considerablemente el contenido en sales. Exponer la proteína a condiciones alcalinas extremas puede cambiar sus características nutricionales como la conversión de la cisteína y serina a residuos de proteína tóxica lisinoalanina.

- Se mantiene el valor nutritivo, ya que no se produce degradación de los componentes separados, mientras que la hidrólisis alcalina destruye los aminoácidos arginina y cisteína y la hidrólisis ácida elimina el triptófano y desamina los aminoácidos serina y treonina.

Las enzimas son proteínas que ayudan a las reacciones químicas siendo uno de los mecanismos más usados en la industria alimentaria para la obtención de productos de interés. Las hidrolasas pertenecen a un grupo de enzimas cuya función es degradar los polisacáridos que constituyen la pared celular del PA. Las hidrolasas introducen una molécula de agua en el sitio de ruptura actuando sobre ésteres de ácido graso, proteínas y carbono. La Figura 2.1 muestra la acción enzimática de una hidrolasa actuando sobre diferentes compuestos orgánicos.



**FIGURA 2.1 ACCIÓN ENZIMÁTICA BAJO ACCIÓN DE UNA
HIDROLASA**

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y METODOLOGIA

3.1. Características de Materia Prima e Insumos.

Polvillo de arroz

El polvillo de arroz se obtuvo del proceso de pulido del grano de arroz blanco en la piladora Johany ubicada en el km 21 de la vía Durán-Yaguachi. El grano de arroz proviene de áreas cultivadas con variedades predominantes INIAP 14 y fue cosechado en el mes de Septiembre 2013, cantón Yaguachi. El PA fue almacenado en fundas ziploc y envases esterilizados cubiertos con papel aluminio a temperatura de -20 °C.

Lipopan F BG

Se empleó la enzima Lipopan F BG con una actividad enzimática de 25 KLU/g obtenida del *Fusarium oxysporum* producido a través de la

fermentación sumergida del microorganismo modificado genéticamente *Aspergillus oryzae*.

Lipopan F BG es una lipasa que hidroliza preferentemente los enlaces éster de la posición 1,3 en los triglicéridos de la glicerina. También actúa en fosfolípidos y glucolípidos (diacilgalactolípidos) produciendo lípidos más polares. (Ángelo, S., et al. 2013). Sin embargo, pueden también catalizar la reacción inversa, es decir esterificación y transesterificación en medios micro acuosos (alcoholólisis, acidólisis e interfestificación) según Camacho, B. 2000 y González, P. 2002.

Buffer citrato

La actividad de la enzima puede funcionar únicamente dentro de límites estrechos de pH y por lo tanto se requiere soluciones de tampón que ayuden a mantener el pH del medio. Un leve cambio en la concentración de hidrogeniones en la célula puede producir un alto en la actividad de las enzimas.

3.2. Proceso de extracción de proteínas - método enzimático.

- 1) La muestra pasó por un tamiz pequeño (Figura 3.1) sólo con el fin de separar partículas extrañas.



FIGURA 3.1 USA STANDARD TEST SIEVE

- 2) A continuación, se usó un molino (Figura 3.2) con el objetivo de fraccionar componentes principales de la pared celular del PA: celulosa, hemicelulosa y lignina



FIGURA 3.2 CYCLONE SAMPLE MILL

- 3) El proceso de extracción se lo realizó bajo las condiciones establecidas de mezcla de PA y Buffer Citrato (1:5), °T de la mezcla a 40°C, enzima al 1% en relación al PA. (Suquilanda y Naranjo, 2013). Al polvillo fraccionado se le añadió un tampón con adecuado pH y la enzima. Para mantener condiciones de °T y agitación constante se usó un agitador-incubador, como muestra la Figura 3.3 y Figura 3.4 cada 10, 20, 30, 40, 60 y 120 minutos originando un homogeneado.



**FIGURA 3.3 EPPENDORF
THERMOMIXER**



**FIGURA 3.4 NEW BRUNSWICK
SCIENTIFIC, INCUBATOR-SHAKER**

- 4) En una centrífuga a temperatura refrigerada (Figura 3.5 y 3.6) se ubicó los tubos; luego se originó dos fases: un precipitado que además de restos celulares también contienen proteínas y un sobrenadante que contiene proteína soluble constituyendo el

extracto crudo. El extracto crudo es la proteína de interés del polvillo de arroz.



**FIGURA 3.5 CENTRIFUGE
SORVALL ST 16 R**



**FIGURA 3.6 CENTRIFUGE
THERMOSCIENFIFIC EPPENDORF**

- 5) Se mezcló una alícuota del extracto crudo y tampón buffer por triplicado y se colocó en pocillos UV. Los pocillos que se usaron poseen muy buenas propiedades ópticas y transparentes. Por tal razón, éste plástico es adecuado para la determinación de proteínas a región ultravioleta 280 nm. medido por un espectrofotómetro (Figura 3.7 y 3.8).



**FIGURA 3.7 PLACAS UV DE
96 POCILLOS (M. BRAND)**



**3.8 ESPECTROFOTÓMETRO
BIOTEK SYNERGYHT**

3.3. Determinación de Nitrógeno Soluble y Total.

El método Kjeldahl mide el contenido total del nitrógeno de la muestra la cual se fracciona en nitrógeno proteico (NP) y nitrógeno no proteico (NNP). El NNP es la fracción nitrogenada que no está constituida por proteína verdadera (NP).

Nitrógeno soluble

Se procedió según el método reportado por M-Segura Campos, et al. 2010. El extracto sobrenadante obtenido durante la hidrólisis enzimática a tiempos: 10, 20, 30, 40 y 60 minutos es tratado con ácido tricloroacético al 20% (TCA) por 1 hora y posterior centrifugación a 15000 x g 10 °C, produciendo un precipitado (NP) y quedando en la fase líquida, el NNP (ácidos nucleicos, sales amoniacales, aminas, amidas, etc.). El contenido de nitrógeno se determinó por kjeldahl.

Nitrógeno total

Se determinó el nitrógeno total según NTE INEN 519 tanto al PA como al extracto proteínico liofilizado obtenido en el tiempo óptimo.

Grado Hidrólisis

El grado de hidrólisis expresa el porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados por la enzima y se estimó midiendo la cantidad de nitrógeno soluble con respecto a la cantidad de nitrógeno total obtenido del PA según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DH} = \frac{\text{Nitrógeno soluble en TCA a 20\%} \times 100}{\text{Nitrógeno total}}$$

3.4. Electroforésis

Mediante la electroforésis es posible separar moléculas biológicas en dependencia fundamentalmente de su carga bajo la influencia de un campo eléctrico. La técnica más usada para separar y determinar el peso molecular de las proteínas es electroforésis en gel de poliacrilamida (PAGE, "polyacrilamide gel electrophoresis") que se realiza en presencia de agentes reductores y SDS. (García, H., 2001).

SDS-PAGE se llevó a cabo bajo condiciones desnaturalizantes de acuerdo con los protocolos descritos por Laemmli (1970) y se usó el equipo MiniProtean® IICell de Biorad (Figura 3.9). Las proteínas fueron visualizadas con tinción del gel con Azul Comaassie de

acuerdo con el protocolo descrito por Maldonado, A., sf. En la Figura 3.10 se muestra marcadores de Peso Molecular según los diferentes sistemas diseñados para determinar el peso molecular aproximado de las proteínas en una muestra.



FIGURA 3.9 SISTEMA DE ELECTROFORÉISIS

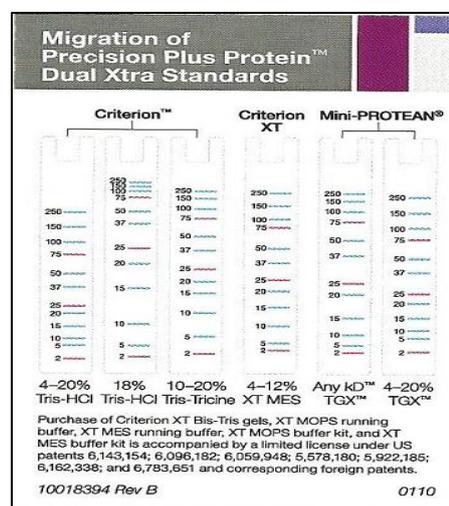


FIGURA 3.10 MARCADORES DE PESO MOLECULAR

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

4.1. Cinética de hidrólisis vs. contenido de nitrógeno.

El máximo grado de hidrólisis durante la experimentación fue a los 30 minutos ya que se logró una mayor extracción de proteínas. A continuación, se muestran los valores de DO_{280} obtenidos durante la hidrólisis.

TABLA 6

GRADO DE HIDROLISIS LIPOPAN

Tiempo Min.	DO₂₈₀ (abs)	GH %
0	0,136	-
10	0,142	1,79
20	0,144	2,48
30	0,159	3,46
40	0,151	2,52
60	0,147	1,93
120	0,128	-

Elaborado por: Andrea Cruz, 2014

La modificación enzimática buscó mejorar la palatabilidad y estabilidad durante el almacenamiento de los recursos disponibles de proteínas en el PA. Comparado con otros métodos enzimáticos de extracción no se logró obtener altos índices de grado de hidrólisis. Sin embargo, desde el punto de vista de las propiedades funcionales y biológicas de las proteínas resulta interesante; ya que al no sufrir grandes cambios estructurales conservaría sus propiedades nativas.

Por otro lado, el contenido de nitrógeno soluble obtenido al finalizar la hidrólisis (30 min.) fue del $7,01 \pm 0,5\%$ lo que representa un 40% de proteína soluble. La Figura 4.1 muestra la cinética de hidrólisis en términos del contenido de nitrógeno soluble durante el tiempo de hidrólisis.

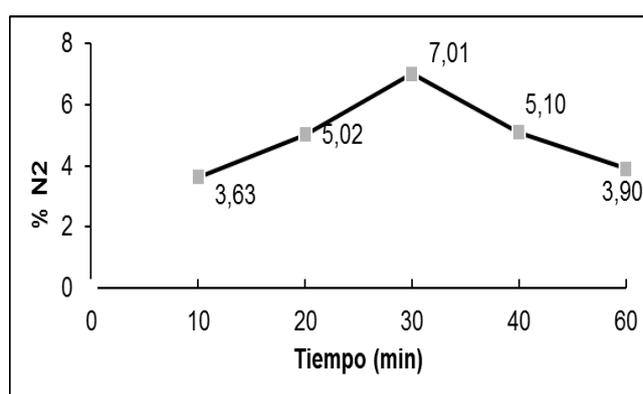


FIGURA 4.1 NITRÓGENO SOLUBLE VS TIEMPO

Así también, Naranjo y Suquilanda (2013) destaca que la hidrólisis química combinada con una enzimática usando Veron® HPP resultó un 53% de nitrógeno soluble en 180 minutos de reacción.

4.2. Caracterización del Concentrado Proteínico.

Los resultados fisicoquímicos de la materia prima fraccionada y el concentrado proteínico se muestran en la Tabla 7.

TABLA 7
CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL PA FRACCIONADO Y
CONCENTRADO PROTEÍNICÓ LIOFILIZADO.

Análisis físico - químico	PA fraccionado	Concentrado proteínico	Método
Humedad	10±0,014%	3,07±0,013%	AOAC 925.10
Cenizas	10,28±0,013%	8,08±0,002%	AOAC 923,03
Proteínas	11,54±0,17%	54,41±0,48%	NTE INEN 519
Grasa	24,36±0,007%	8,06±0,010%	AOAC 2003.05
Fibra cruda	8-12%*	0,07%	AOAC 18th 978.10
AW	0,5±0,022	0.39±0,026	
Ph	6,77±0,342	4.5±0,005	NTE INEN 526
Acidez (% ácido sulfúrico)	0,06±0,004%	0,43±0,173%	NTP ITENTEC 250.027
* Datos obtenidos de la NTE INEN 1690.			

Elaborado por: Andrea Cruz, 2014

Según datos de composiciones físico químico del concentrado proteínico del PA obtenido por método alcalino en la mayoría de los

casos los productos presentaron un contenido proteínico entre 60 - 85 % a pH básico. Excepto Jiamyangyuen, S., et al., 2005 que obtuvo 64.88% a pH 7.

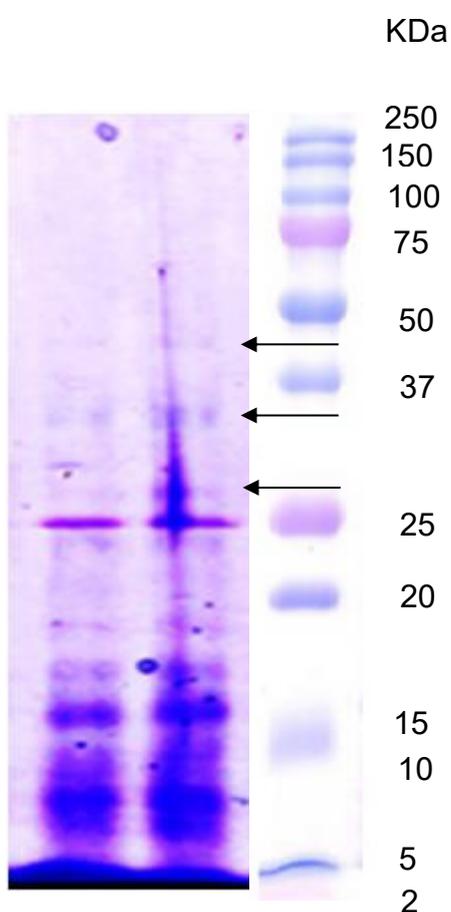
Hay estudios de extracciones por métodos enzimáticos como las proteasas y carbohidrasas realizado por diferentes autores. Hye-Jung Yeom, et al., 2010 usó Alcalase y Flavourzyme y obtuvo $77.62 \pm 2.90\%$ de proteínas a partir de PA desgrasado; Wang., et al., 1999, Fitasa y Xilanasa obtuvo $92 \pm 1.6\%$ de proteínas; S. Tang, et al. , 2006 usó Amilasa, Viscozyme y Celluclast con concentrados proteínicos de 45.4%, 12.1% y 28.35%, respectivamente; Locharoenrat, S. et al., sf empleó Termamyl, Glucoamylase y Alcalase con 16.59% de proteínas. Por otro lado, Naranjo y Suquilanda, 2013 empleó Veron® HPP obtuvo 75% de proteínas.

En todos los casos los contenidos son muy variables y dependen básicamente de la especificidad del enzima por el sustrato. Las condiciones de extracción a diferencia del método alcalino son menos agresivas y por lo tanto no se afecta en gran medida las propiedades de la proteína nativa.

El análisis de electroforésis revela la presencia de polipéptidos de diferentes rangos de pesos moleculares. Juliano, 1980 indica que las albúminas poseen pesos moleculares que van desde 8,5 a 95 kDa, con tres polipéptidos principales de 8,5; 11 y 16 kDa. Las globulinas presentan una banda característica descrita como mayoritaria que corresponde a polipéptidos de 25-26 kDa (Krishnan et al., 1992; Komatsu and Hirano, 1992; Furukawa et al., 2003; Kumagai et al., 2006) y otra a los 16-18 kDa (Juliano, 1980; Krishnan et al., 1992). En grano integral, no se observó polipéptidos de alto peso molecular pero sí con mayor intensidad, la banda de 37-39 kDa que corresponde a la subunidad ácida (Yamagata et al., 1982; Kumagai et al., 2006) de la fracción glutelina. Las prolaminas constituyen polipéptidos heterogéneos con masas moleculares variables entre 10 y 23 kDa, según los diferentes autores. Las bandas más marcadas se corresponde a los 17 y 23 kDa según Juliano (1980) y a los 10, 13 y 16 kDa según estudios más actuales (Furukawa et al., 2003, Kumagai et al., 2006).

La Figura 4.2 muestra la separación de las proteínas en forma de bandas sobre un gel (SDS-PAGE). El concentrado proteínico liofilizado presenta distribuciones polipéptidas con mayor intensidad entre 2-25 kDa y bandas más débiles adicionales entre 25 – 50 kDa

(marcadas con flechas); que refieren a polipéptidos de bajo peso molecular (<12 KDa) y mediano peso molecular (≥ 12 hasta <100 KDa). Con lo cual se puede decir que el concentrado estaría compuesto fundamentalmente por fracciones de albúminas, prolaminas seguido de globulinas y glutelinas.



**FIGURA 4.2: SDS-PAGE DEL CONCENTRADO PROTEÍNICO
LIOFILIZADO**

Los aislados proteínicos a pHs neutros y moderados presenta muy baja solubilidad debido a la abundancia de puentes disulfuro, sumado a su elevado peso molecular (Pincioli, 2010) pero presenta mayor solubilidad a pHs extremos, lo que se corresponde con las características propias de su componente mayoritario, la fracción glutelina (Bera and Mukhejee, 1989; Anderson et al., 2001, Agboola et al., 2005). Los concentrados proteínicos del polvillo de arroz tienen una fuerte influencia del pH y la concentración salina sobre la solubilidad del nitrógeno y la capacidad de formar espumas y emulsiones según Bera and Mukherjee, 1989. Al aumentar la concentración de sales decrece la solubilidad, y la capacidad de formar espumas y emulsiones es inverso el comportamiento con la variación de pH.

La capacidad de absorción de agua se compara con los observados por Chandi and Sogi (2007a) en concentrados proteínicos de polvillo de arroz de distintas variedades de arroz (2,5 y 5,6 g/g) superiores a los encontrados en diferentes concentrados proteínicos de hojas (2,7 g/g) por Aletor et al. 2002 e inferior a aislados proteínicos de soja (4,3 g/g) por Gandhi et al., 2000. Los valores son cercanos a los considerados críticos para alimentos viscosos como sopas, salsas o

jugos por lo que pueden resultar ingredientes de alta calidad para alimentos de estas características (Aletor et al., 2002).

La presencia de estas fracciones proteínicas denota una posible funcionalidad tecnológica y por lo tanto un potencial uso como aditivo alimentario.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES:

Conclusiones

- El polvillo de arroz sin desgrasar es una materia prima que bajo el efecto de enzimas lipasas provoca la rotura de enlaces éster de los lípidos alcanzando una mayor cantidad de proteínas en estado plegado o no desnaturalizado en 30 minutos. Las proteínas mantuvieron su integridad debido a que hubo un hidrolizado proteico bajo o limitado.
- El concentrado proteínico contiene polipéptidos de buena solubilidad lo cual mejoraría la propiedad funcional de hidratación en ingredientes alimentarios; así también poli péptidos como recursos valiosos y disponibles por sus buenas propiedades biológicas (estructurales y metabólicas).

Recomendaciones

- El concentrado proteínico puede ser usado como un ingrediente alimentario ya que sus propias características físico - químicas muestran un extracto nutricional estable.
- Determinar las propiedades funcionales al concentrado proteínico pero incorporado en un alimento bajo condiciones de temperatura, tiempo, pH, etc. Además, evaluar el % de proteínas a la nueva matriz.

BIBLIOGRAFÍAS

1. Agencia Pública de Noticias de Ecuador y Suramérica Andes. “*La reactivación de sembríos de trigo beneficia a agricultores del sur ecuatoriano*”. Loja. (12/Noviembre/2013).
2. Agboola, S.; Darren, N. and Mills, D. “*Characterization and functional properties of Australian rice protein isolates*”. 2005. Journal of Cereal Science, Vol: 41. p: 283-290.
3. Aletor, O., Oshodi, A. A., & Ipinmoroti, K. “*Chemical composition of common leafy vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates*”. Food Chemistry. 2002. Vol. 78. pág: 63–68.
4. Alfredo Larios-Saldaña, Jesús Porcayo-Calderón y Héctor M. Poggi-Varaldo. 3/12/2004. “*Obtención de una harina de pulido de arroz desengrasado con bajo contenido de fibra neutro detergente*”. Interciencia. Caracas. Enero 2005. Vol. 30 No. 1. ISSN 0378-1844.
5. Anderson, A.; Hettiarachchy, N. and Ju, Z. Y. “*Physicochemical properties of pronase-treated rice glutelin*”. 2001. Journal of the American Oil Chemists' Society; Vol: 78. p: 1-6.
6. Ângelo Samir Melim Miguel, Tathiana Souza Martins-Meyer, Érika Veríssimo da Costa Figueiredo, Bianca Waruar Paulo Lobo and Gisela Maria Dellamora-Ortiz. “*Enzymes in Bakery: Current and Future Trends*”. Brasil. Universidad Federal de Rio de Janeiro: Facultad de Farmacia. 2013. DOI: 10.5772/53168.

7. Ansharullah, J.; Hourigan, A.; Chesterman, C. F. "*Application of Carbohydrases in Extracting Protein from Rice Bran*". Journal of the Science of Food and Agriculture. 1997. Vol. 74. No. 2. p: 141–146.
8. Arpon Jarunrattanasri. "*Aroma Formation from Rice Bran Protein Concentrate by Acid Hydrolysis and the Maillard Reaction*". Doctor of Philosophy (Food Science). 2004. Graduate School, Kasetsart University. Thailandia.
9. Avanza, M. V. and Añón, M. C., "*Modificaciones de las proteínas de amaranto por tratamiento térmico*". Universidad Nacional del Nordeste / Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2004.
10. Banco Central del Ecuador, Sector Agropecuario No 86-II-2013 y No 87-I-2014.
11. Bandyopadhyay Kakali., Misra, Gautam y Ghosh, Santinath. "*Preparation and Characterisation of protein hydrolysates from Indian Deffated Rice Bran Meal*". Journal of Oleo Science. 2008. Vol. 57. No. 1. pág: 47-52.
12. Barber, S., & De Barber, C. B. "*Rice bran: chemistry and technology. Rice,*" 1990. Vol. 2. No2. pág: 345.
13. Bera, M. B. and Mukherjee, R. K. "*Solubility, emulsifying and foaming properties of rice bran protein concentrates*". 1989. Journal of Food Science; Vol. 54. No: 1. p:142-145.

14. Brumovsky, L. *“Química del almidón”*. Argentina. 2010. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones.
15. Camacho Páez, B. *“Obtención de lípidos estructurados por acidólisis con lipasas inmovilizadas”*. España. 2000. Tesis Doctoral. Universidad de Almería. Facultad de ciencias Experimentales.
16. Carrera Jorge Eliécer. *“Producción y aplicación de enzimas industriales”*. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia, 2003. Vol 1 No.1. p: 10-15.
17. Castillo, María. *“Consultoría sobre productividad del sector agropecuario ecuatoriano con énfasis en banano, cacao, arroz y maíz duro”*. RIMISP. sf. p: 1-107.
18. Chandi, G. K. and Sogi, D. S. *“Functional properties of rice bran protein concentrates”*. 2007a. Journal of Food Engineering. Vol: 79, p: 592-597.
19. Clemente, A. *“Hidrolizados de proteína de Garbanzo”*. Instituto de la Grasa. 1997. p: 155, 159. Sevilla. España.
20. Diario La Hora Nacional. *“Ecuador produce por primera vez cebada para cerveza”*. (8/Agosto/2013).
21. E. Pacheco de Delahaye, J. Peña y P. Jiménez. *“Efecto del salvado de arroz sobre parámetros químicos, físicos y sensoriales de arepas”*

- precocidas y congeladas*”, Revista de la Facultad de Agronomía. Caracas: Jun, 2006, Vol. 23, No.2. ISSN 0378-7818.
- 22.E. Pacheco de Delahaye, J. Peña y P. Jiménez, “Efecto del salvado de arroz sobre las propiedades físico-químicas y sensoriales de panes de trigo”, Revista de la Facultad de Agronomía, Caracas, Dec, 2009, Vol. 26, No.4. ISSN 0378-7818.
23. Emperatriz Pacheco-Delahaye, Rodrigo Pérez y Mercedes Schnell. “Evaluación nutricional y sensorial de polvos para bebidas a base de papaya, plátano verde y salvado de arroz. Índice glucémico”. Enero 2004. Vol. 29. No 1. p: 46-51.
24. Fabian, C. and Y.H. Ju. “A review on rice bran protein: Its properties and extraction methods”. Crit. Rev. Food Sci. 2011. Vol. 51. N° 9. pág: 816-827.
- 25.Franco, Daniel. “*Aceite del Salvado de Arroz.*” Área de Industria Agroalimentaria-Dirección de Promoción de la Calidad de Productos Agrícolas y Forestales – Subsecretaria de Agregado de Valor y Nuevas Tecnologías, 2012. Argentina.
- 26.FS Taha and MA Ibrahim. “*Effect of degree of hydrolysis on the functional properties of some oilseed proteins*”. 2002. Fats and Oils Department, National Research Center, Cairo, Egypt. Grasas y Aceites. Vol. 53. No. 3 pág. 273-281.

27. Furukawa, S.; Mizuma, T.; Kiyokawa, Y.; Masumura, T.; Tanaka, K. and Wakai, Y. "*Distribution of storage proteins in Low-glutelin rice seed determined using a fluorescent antibody*". 2003. Journal of Bioscience and Bioengineering; Vol: 96. No: p: 467-473.
28. Gandhi, A. P; Khare, S. K. and Jha, K. "*Preparation and characterization of protein isolates from soymeal*". 2000. Journal of Food Science and Technology. Vol: 37. p: 624-626.
29. García Pérez, Hilda Marilín. "*Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia*". Universo Diagnóstico. Revista Médicas Cubanas. Laboratorios BETERÄ. 2000. Vol. 1. No. 2 . p: 31-41.
30. Gellerstedt, G. & Henriksson, G. (2008). "*Lignins: Major sources, structure and properties*". En M. Naceur Belgacem, & A. Gandini (Edits.), Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources (págs. 201- 224). Amsterdam: Elsevier B.V.
31. Gomez, Juan Carlos. "*Con sencillos ajustes tecnológicos se incrementa producción de soya*". En: El Universo. Quevedo (24/Agosto/2013).
32. Gonzales Moreno, P. "*Obtención de lípidos estructurados catalizada con lipasas inmovilizadas*" España. 2002. Tesis doctoral. Universidad de Almería. Facultad de Ciencias.
33. Guadix, A.; Guadix, E. M.; Páez-Dueñas, M. P.; González-Tello, P. Y Camacho, F. "*Procesos tecnológicos y métodos de control en la*

- hidrólisis de proteínas*". Ars Pharmaceutica. 2000. Vol 41. No 1. p: 79-89. Disponible en: farmacia.ugr.es/ars/pdf/183.pdf
34. Gurpreet Kaur Chandi, D.S. Sogi. "*Functional properties of rice bran protein concentrates*". Department of Food Science and Technology, Guru Nanak Dev University. Amritsar. India. Journal of Food Engineering. 2007. Vol. 79. No: 2. pag. 592-597.
35. Hamada, J.S. "*Characterization and Functional Properties of Rice Bran Proteins Modified by Commercial Exoproteases and Endoproteases*". Food Chemistry and Toxicology. 2000. [Abstract]. Vol. 65. No. 2. p: 305 - 310.
36. Hye-Jung Yeom, Eun-Hye Lee, Mi-Sun Ha, Sang-Do Ha and Dong-Ho Bae. "*Production and Physicochemical Properties of Rice Bran Protein Isolates Prepared with Autoclaving and Enzymatic Hydrolysis*". Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 2010. Vol. 53. No 1. pág.62-70
37. INIAP. "*Manual del cultivo de arroz (2da. Ed.)*". 2007. Guayaquil, Ecuador. p: 145
38. J.R. Soberón. (s.f.) *Introducción a la Biotecnología Vegetal: Acumulación y movilización de la reserva de los vegetales*.
39. J.S. Hamada (2000). "*Characterization and Functional Properties of Rice Bran Proteins Modified by Commercial Exoproteases and Endoproteases*". March 2000 Journal of Food Science. Vol: 65, No: 2, p:

- 305–310, Juliano, B. *“Properties of rice caryopsis. (L. B. S., Éd.)”* AVI Publishing Company. 1980.
40. Khuwijitjaru, P., Nualchan, P., & Adachi, S. (2007). Foaming and emulsifying properties of rice bran extracts obtained by subcritical water treatment. *Silpakorn University Science and Technology Journal*, Vol: 1, No: 1, p: 7–12.
41. Komatsu, S. and Hirano, H. Rice seed globulin. A protein similar to wheat seed glutenin *Phytochemistry*. 1992; Vol: 31. No: 10. P: 3455 – 3459.
42. Koolawadee Silpradit, Sukuntaros Tadakittasarn, Hathairat Rimkeeree, Supanida Winitchai and Vichai Haruthaithanasan. *“Optimization of rice bran protein hydrolysate production using alcalase”*. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*. 2010. Nol: 3. No. 2 p: 221-223. ISSN 1906-3040.
43. Krishnan et al, H., White, J., & Pueppke, S. *“Characterization and localization of rice (Oryza sativa L.) seed globulins”*. 1992. *Plant Science*, Vol 81, p : 1-11.
44. Kumagai, T.; Kawamura, H.; Fuse, T.; Watanabe, T.; Saito, Y.; Masumura, T.; Watanabe, R. and Kadowaki, M. *“Production of rice protein by alkaline extraction improves its digestibility”*. 2006. *Nutrition Science Vitaminol*. Vol: 52. p:467-472.

45. Lahl, W. y Braun, S. "*Enzymatic production of protein hydrolysates for food use*". Journal of Food Technology. 1994. Vol. 48. p: 68-71.
46. Lloyd BJ, Siebenmorgen TJ and Beers KW. "*Effect of commercial processing on anti-oxidants in rice bran*". Cereal Chem. 2000. Vol: 77. N°: 5. p: 551-555.
47. M. Segura-Campos, G. López-Von, L. Chel-Guerrero y D. Betancur-Ancona. "*Calidad nutrimental de un hidrolizado proteínico de phaseolus lunatus y su incorporación en una crema de zanahoria*". Revista de la Facultad de Ingeniería Química. Diciembre 2010. No 50. p: 9 – 16. ISSN 0188-5006.
48. M. Segura-Campos, G. López-Von, L. Chel-Guerrero y D. Betancur-Ancona. "*Calidad nutrimental de un hidrolizado proteínico de phaseolus lunatus y su incorporación en una crema de zanahoria*". Revista de la Facultad de Ingeniería Química. Diciembre 2010. No 50. p: 9 – 16. ISSN 0188-5006.
49. Maldonado Alcona Ana Maria, Jesus V. Jorrín Novo. "*Electroforésis desnaturizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de Arabidopsis thaliana*". sf. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario Rabanales. Córdoba, España.
50. Maldonado, L., Latorre, K., Rocha, P., Medrano, A., Abirached, C., Panizzolo, L. A. "*Influencia del pH en la estabilidad de emulsiones*

- elaboradas con proteínas de salvado de arroz*". Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay. 2011. Vol. 28. No. 6. p: 28 – 31.
51. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. "*Ecuador, innovando para la soberanía*": Producción, consumo y comercio quinua. En: IV Congreso Mundial de la Quinua. I Simposio Internacional de Granos Andinos. Junio 2013.
52. Molano, Miguel, Riveros, Diana y Vargas, Edgar. "*Estudio de la hidrólisis del crudo de aceite de palma africana empleando como catalizador la lipasa de la levadura C. rugosa*". Revista de Ingeniería, Facultad de Ingeniería, Universidad de los Andes. Bogotá. Colombia. Julio/Diciembre, 2005. N°. 22. ISSN 0121-4993.
53. Muñoz A., F.E. "*Aislamiento y purificación parcial de los inhibidores de tripsina presentes en semillas de leguminosas y gramíneas producidas en Ecuador*". Quito. 2011. p: 1 – 88. Tesis. Ing. Agroindustrial. Escuela Politécnica Nacional. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria.
54. Naranjo B., María F. y Suquilanda P., Miriam T. "*Obtención de Concentrado Proteico por Hidrólisis Enzimática a partir del Salvado de Arroz de Variedades Ecuatorianas*". Guayaquil-Ecuador. 2013. p: 1 – 120. Tesis. Ing. De Alimentos. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción.

55. Narasinga Rao, B.S. "*Nutritive Value Of Rice Bran*". Nutrition Foundation India Bulletin. 2000. Vol. 21. No. 4. p: 5–8.
56. Ochoa, Emilio. "*Evaluación agronómica de 120 cultivares de fréjol arbustivo (Phaseolus Vulgaris L.) en la zona de Taura, provincia del Guayas*". Guayaquil, Ecuador. 2013. Tesis de Grado. Ingeniero Agrónomo. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Agrarias.
57. Paredes, Edgar. "Análisis de los Principales Cultivos Agrícolas Del Ecuador". MAGAP. Instituto Nacional de Capacitación Campesina – INCCA-. 2009. p: 1-241.
58. Pincioli María. "*Proteína de arroz: Propiedades estructurales y funcionales*". Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos, Programa Arroz. 2010. Universidad Nacional de La Plata. La Plata. Argentina.
59. Prakash, J. "Rice Bran Proteins: Properties and Food Uses". Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 1996. [Abstract] Vol. 36, Issue 6. p: 537-552. ISSN: 10408398.
60. Ramírez Romero Cesar Andrés. "*Estudio de Pre factibilidad Técnico-Económica de la instalación de una planta extractora de aceite de polvillo de arroz*". Quito-Ecuador, 2014. p:1-223. Tesis. Ingeniero Industrial. Escuela Politécnica Nacional.
61. R. Rodríguez J. Sanhueza, A. Valenzuela y S. Nieto. "*Hidrólisis del aceite de coco (Cocos nucifera L.) mediante enzimas*

- estereoespecíficas y sin especificidad posicional*". Grasas y Aceites. Universidad de Chile. Unidad de Bioquímica Farmacológica y Lípidos. INTA. Santiago. Chile. 1997. Vol. 48. No. 1. pág: 6-10.
62. Rodríguez A., Marcela B. "*Determinación de la Composición Química y Propiedades Físicas y Químicas del Pulido de Arroz (Oryza sativa L.)*". Valdivia-Chile. 2007. p: 1 – 44. Tesis. Lic. Ciencias de Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias.
63. Rosell, Cristina M., Brites, Carla., Moita, Elevina., Pérez, Gularte Marcia. "*Arroz*". En: Alberto Edel León y Cristina M. Rosell. De tales panes, tales harinas: granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. Cordoba, Argentina: Hugo Baez, 2007. p: 125-159.
64. Sawai, H., & Morita, Y. "Studies of γ globulin of rice embryo". Part II. Separation of three components of γ globulin by ion exchange chromatography. 1970. Agricultural Biology and Chemistry, 34:53.
65. S. Tang, N.S. Hettiarachchy, S. Eswaranandam and P. Crandall. "*Protein Extraction from Heat-stabilized Defatted Rice Bran: II. The Role of Amylase, Celluclast, and Viscozyme*". Journal of Food Science. 2006. Vol. 68, No. 2, pág: 471–475.
66. Shih, F. "An update on the processing the high protein rice products". En: Nahrung/Food. 2003. Vol. 47. No.6. Disponible en:

67. Shih, F. F. and Daigle, K. W. 2000. Preparation and characterization of rice protein isolates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*; 77, 8:885-889.
68. Silva R., María E. y Vidal B., Silvia M. *"Influencia del Método de Estabilización en el Grado de Deterioro del Salvado de Arroz Ecuatoriano Bajo Dos Condiciones de Almacenamiento, Cosecha Invierno"*. Guayaquil-Ecuador. 2012. p: 1 – 71. Tesis. Ing. De Alimentos. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción.
69. Sogi, D. S., Garg, S. K., & Bawa, A. S. *"Functional properties of seed meals and protein concentrates from tomato processing waste"*. *Journal of Food Science*. 2002. Vol. 67. pág: 2997–3001.
70. Somruetai Locharoenrat and Pinthip Rumpagaporn. *"Preparation of alkali-extractable hemicelulose from defatted rice bran"*. 1090. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok.
71. Tang, S., Hettiarachchy, N. S., Crandall, P., Eswaranandam, S. *"Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran: II. The role of amylase, celluclast, and viscozyme"*. *Journal of Food Science*. March 2003. [Abstract]. Vol. 68. No. 2. p: 471-475.
72. Tang, S.; Hettiarachchy, N. S.; Horax, R. and Eswaranandam, S. *"Physicochemical properties and functionality of rice bran protein"*

- hydrolyzate prepared from heat-stabilized defatted rice bran with the aid of enzymes*". 2003. Journal of Food Science. Vol. 68. N° 1. pág: 152-157.
73. UNAD. Clasificación general de enzimas. Disponible en: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/211616/Modulo_exe/Exe%20del%20modulo/clasificacin_general_de_las_enzimas.html
74. Vanessa R Pestana, Rui C Zambiasi, Carla R B Mendonça, Mariângela H Bruscatto, y Guillermo Ramis-Ramos. *"Influencia del procesado industrial sobre las características químico-físicas y contenido en lípidos y antioxidantes del salvado de arroz"*. Grasas y Aceites. Abril-Junio 2009. Vol. 60. No 2. p: 184-193.
75. Vargas Edgar Mauricio, Marisol Aguirre; coautores Rubén Danilo Bourdon, et al. *"El Salvado de arroz: procesos de estabilización y usos potenciales en la industria colombiana. Bogotá, 2011"*. Trabajo de investigación. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería, ANDI. Cámara Induarroz.
76. Wang, M., Hettiarachchy, N. S., Qi, M., Burks, W., & Siebenmorgen, T. *"Preparation and functional properties of rice bran protein isolate"*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999. Vol. 47. No. 2. p: 411-416.

77. Xu, X. *"Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions"*. A review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2000. Vol.102. No. 4. p: 287-303.
78. YU Ming-wei, ZHANG Ming-wei, SUN Yuan-ming, ZHANG Yan, WEI Zhen-cheng, ZHANG Rui-fen, TANG Xiao-jun, CHI Jian-wei. *"Study on Optimal Hydrolysis Process for Preparing Rice Bran Short Peptides with Two Enzymes"*. 2009. *Scientia Agricultura Sinica*. Vol. 42. No 5. p:1744-1750.
79. Zhang, H.-J., Zhang, H. , Wang, L., Guo, X.-N. *"Preparation and functional properties of rice bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran"*. *Food Research International*. July 2012. Vol. 47. Issue 2. p: 359-363. ISSN: 09639969.
80. Zhou, Z.; Robards, K.; Helliwell, S. and Blanchard, C. *"Composition and functional properties of rice"*. 2000. *International Journal of Food Science and Technology*; 37:849-868.