

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
AGROINDUSTRIA**

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y FUNCIONALES DE
UN HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE PROTEÍNA DE CHOCHO A
ESCALA PILOTO Y SU APLICACIÓN COMO FERTILIZANTE**

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA AGROINDUSTRIAL**

CARLA LISETH SIMBAÑA CAMINO

katrinalis@hotmail.com

DIRECTOR: ING. OSWALDO ACUÑA

oswaldo.acuna@epn.edu.ec

Quito, Abril 2011

DERECHOS DE AUTOR

© Escuela Politécnica Nacional 2011

Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Carla Liseth Simbaña Camino, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Carla Liseth Simbaña Camino

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por la Srta. Carla Liseth Simbaña Camino, bajo mi supervisión.

Ing. Oswaldo Acuña
DIRECTOR DE PROYECTO

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser mi guía, por haberme dado la sabiduría y la fortaleza necesaria para salir siempre adelante pese a las dificultades, por colocarme en el mejor camino e iluminar cada paso de mi vida, por darme la salud y la esperanza para terminar este trabajo.

A mi valiente y hermosa madre Yermena que siempre ha estado a mi lado y cuyo apoyo, amor, comprensión no tiene límites. A mi padre Manuel, por demostrarme cada día con su sacrificio, esfuerzo y perseverancia las metas se llegan a cumplir. Gracias a mi hermano Omar por sus consejos, su guía y su cariño. Además de ser un amigo eres un ejemplo a seguir.

A mi abuelita Isabel quien supo inculcar en mí, que la fortaleza se encuentra en la unión familiar. Gracias “Ñañas y Ñaños”, Ivonne, Janneth, Walter, Patricio por su amor y su apoyo. A mis primos: Sofy, Andy, Stalin, Mishell Evelyn, Richard, Stefy, Kevin, Steeven nunca deben olvidar que siempre estaré con ustedes en cada paso que den en la vida. A mis tíos Lorenzo y Milton.

Al Ing. Oswaldo Acuña por brindarme su amistad, su dirección y apoyo incondicional en todo momento.

Al Dr. Patricio Castillo, por brindarme su tiempo y paciencia en la revisión de mi tesis.

A la Ing. Elena Villacrés por toda la cooperación brindada para la culminación de este proyecto.

A Sr. Héctor Ortiz, a Sr. Germán Romo, y Sr. Camilo Peñaloza por su asistencia, apoyo en este proyecto.

Gracias Carlita, Ale, Dany y Mony que han sido más que una familia para mi, con las cuales he compartido tantos momentos, y sé que puedo contar con ellas al igual que ellas conmigo, aunque la vida nos lleve por distintos caminos, siempre

estarán en mi corazón y se, que sin su apoyo y compañía estos años no hubiesen sido lo mismo. Especialmente a ti Carlita que en todo la vida universitaria más que una amiga has llegado a ser como una hermana, por todo lo vivido, lo aprendido y lo compartido, por algo siempre seremos “Carlitas”.

A mis amigos: Irene, Jorge Luis, Eddy, Andreita, Adry, por recordarme que la vida está hecha para vivirla a cada instante y disfrutarla a cada momento.

Y a todas aquellas personas que nunca perdieron la fe y me alentaron en la culminación de este proyecto.

DEDICATORIA

***A mi madre, mi padre y mi hermano pilares
fundamentales en mi vida, dignos ejemplo de
trabajo y constancia.***

El que persevera alcanza

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | PÁGINA |
|-----------------------------------------------------------|---------------|
| ÍNDICE DE CONTENIDOS | i |
| RESUMEN | xi |
| INTRODUCCIÓN | xii |
| | |
| 1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 1 |
| | |
| 1.1 Propiedades de los hidrolizados | 1 |
| 1.1.1 Aminoácidos | 1 |
| 1.1.2 Proteínas | 2 |
| 1.1.2.1 Estructura de las proteínas | 3 |
| 1.1.2.1.1 Estructura primaria | 3 |
| 1.1.2.1.2 Estructura secundaria | 4 |
| 1.1.2.1.3 Estructura terciaria | 5 |
| 1.1.2.1.4 Estructura cuaternaria | 5 |
| 1.1.2.2 Propiedades de las proteínas | 6 |
| 1.1.2.2.1 Interacción proteína – proteína | 6 |
| 1.1.2.2.2 Interacción proteína – polisacárido | 6 |
| 1.1.2.2.3 Interacción proteína – lípido | 6 |
| 1.1.2.2.4 Propiedades funcionales | 6 |
| 1.1.2.2.5 Capacidad emulsificante | 8 |
| 1.1.2.2.6 Estabilidad de emulsión | 9 |
| 1.1.2.2.7 Capacidad espumante | 10 |
| 1.1.2.3 Desnaturalización de las proteínas | 11 |
| 1.1.3 Hidrolizados | 12 |
| 1.1.3.1 Propiedades | 12 |
| 1.1.3.1.1 Grado de hidrólisis | 12 |
| 1.1.3.1.2 Tipo de hidrólisis | 13 |
| 1.1.3.2 Fuentes de obtención de proteínas | 15 |
| | |
| 1.2 Fertilizantes orgánicos | 17 |
| 1.2.1 Definición | 17 |
| 1.2.2 Propiedades de los fertilizantes | 17 |
| 1.2.2.1 Propiedades físicas | 17 |
| 1.2.2.2 Propiedades químicas | 18 |
| 1.2.2.3 Propiedades biológicas | 18 |
| 1.2.3 Tipos de fertilizantes orgánicos | 18 |
| 1.2.3.1 Bioactivador | 18 |
| 1.2.3.2 Bioestimulante | 18 |
| 1.2.3.3 Fertilizantes con aminoácidos | 19 |
| 1.2.3.4 Materia orgánica | 20 |
| 1.2.4 Papel de los aminoácidos en la planta | 20 |
| 1.2.4.1 Acción específica de los aminoácidos en la planta | 21 |
| 1.2.4.2 Métodos de aplicación | 22 |
| 1.2.4.3 Fertilización foliar | 23 |
| 1.2.4.4 Tipos de fertilización foliar | 24 |
| 1.2.5 Mecanismos de asimilación de la planta | 24 |

| | | |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.2.5.1 | Apertura de estomas | 25 |
| 1.2.5.2 | Efectos de la aplicación de aminoácidos sobre la planta | 26 |
| 1.2.6 | Aplicación de los aminoácidos en la horticultura | 27 |
| 1.2.6.1 | Beneficios | 27 |
| 1.2.6.2 | Desventajas | 28 |
| 2 | PARTE EXPERIMENTAL | 30 |
| 2.1 | Materiales | 30 |
| 2.1.1 | Materia prima | 30 |
| 2.1.2 | Equipos y accesorios | 30 |
| 2.1.2.1 | Materiales | 30 |
| 2.1.2.2 | Equipos | 31 |
| 2.1.2.3 | Accesorios | 31 |
| 2.2 | Elaboración de aislado e hidrolizado enzimático de proteína de chocho | 32 |
| 2.2.1 | Elaboración de aislado de proteína de chocho | 32 |
| 2.2.1.1 | Extracción básica | 32 |
| 2.2.1.2 | Precipitación acida | 32 |
| 2.2.2. | Elaboración de hidrolizado enzimático de proteína de chocho | 33 |
| 2.3 | Caracterización físico – química del hidrolizado de proteína de chocho | 34 |
| 2.3.1 | Caracterización física | 34 |
| 2.3.2 | Caracterización química | 34 |
| 2.3.2.1 | Composición de aminoácidos | 34 |
| 2.3.2.2 | Perfil de péptidos | 35 |
| 2.4 | Determinación de las propiedades funcionales del hidrolizado de la proteína de chocho | 35 |
| 2.4.1 | Solubilidad | 35 |
| 2.4.2 | Capacidad de absorción de agua y aceite | 35 |
| 2.4.3 | Capacidad emulsionante y estabilidad de la emulsión | 36 |
| 2.4.4 | Capacidad y estabilidad de espuma | 37 |
| 2.4.5 | Efecto iónico | 37 |
| 2.4.6 | Viscosidad | 38 |
| 2.5 | Estudio del crecimiento de brócoli en presencia del hidrolizado de proteína de chocho | 39 |
| 2.5.1 | Análisis estadístico | 40 |
| 2.5.2 | Análisis foliar | 40 |
| 2.6 | Estudio de los factores de costos | 41 |
| 3 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 42 |
| 3.1 | Obtención de aislado de proteína de chocho | 42 |

| | | |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2 | Obtención del hidrolizado enzimático de proteína de chocho | 43 |
| 3.2.1 | Caracterización física | 43 |
| 3.2.1.1 | Granulometría | 43 |
| 3.2.1.2 | Densidad | 43 |
| 3.2.2 | Caracterización química | 44 |
| 3.2.2.1 | Grado de hidrólisis | 44 |
| 3.2.2.2 | Análisis proximal | 44 |
| 3.2.2.3 | Perfil de aminoácidos | 45 |
| 3.2.2.4 | Perfil de péptidos | 47 |
| 3.2.3 | Determinación de las propiedades funcionales del hidrolizado de proteína de chocho | 47 |
| 3.2.3.1 | Solubilidad | 47 |
| 3.2.3.2 | Capacidad de absorción de agua | 48 |
| 3.2.3.3 | Absorción de aceite | 49 |
| 3.2.3.4 | Capacidad de formación emulsión | 50 |
| 3.2.3.5 | Estabilidad de emulsificación | 51 |
| 3.2.3.6 | Capacidad de formación y estabilidad de espuma | 53 |
| 3.2.3.7 | Efecto iónico | 54 |
| 3.2.3.8 | Viscosidad | 55 |
| 3.3 | Estudio del crecimiento de brócoli en presencia del hidrolizado de proteína de chocho | 58 |
| 3.3.1 | Aplicación del hidrolizado de proteína de chocho como fertilizante foliar | 58 |
| 3.3.2 | Análisis estadístico de la respuesta a la aplicación del hidrolizado de proteína de chocho | 59 |
| 3.3.2.1 | Altura de las plántulas | 60 |
| 3.3.2.2 | Diámetro de follaje | 60 |
| 3.3.3 | Análisis químico foliar en el material vegetal | 61 |
| 3.4 | Análisis de costos de la elaboración del hidrolizado enzimático de proteína de chocho | 65 |
| 3.4.1 | Inversión del proyecto | 67 |
| 3.4.2 | Capital de operaciones | 68 |
| 3.4.3 | Costo unitario del producto | 69 |
| 3.4.4 | Punto de equilibrio | 69 |
| 3.4.5 | Valor actual neto y tasa interna de retorno | 70 |
| 4 | CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 72 |
| 4.1 | Conclusiones | 72 |
| 4.2 | Recomendaciones | 73 |
| | BIBLIOGRAFÍA | 74 |
| | ANEXOS | 83 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | PÁGINA |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Tabla 1. | Producción de proteína por hectárea para diferentes fuentes de obtención de proteína vegetal | 15 |
| Tabla 2. | Composición química del chocho | 16 |
| Tabla 3. | Contenido de aminoácidos en 100 gramos | 16 |
| Tabla 4. | Métodos de aplicación del fertilizante foliar por su tamaño de partícula | 22 |
| Tabla 5. | Factores que afectan la eficiencia del fertilizante foliar | 23 |
| Tabla 6. | Técnicas analíticas aplicadas para la determinación del análisis proximal | 34 |
| Tabla 7. | Técnicas analíticas aplicadas para la determinación del análisis foliar | 40 |
| Tabla 8. | Análisis proximal del aislado de proteína de chocho | 42 |
| Tabla 9. | Análisis proximal del hidrolizado enzimático de proteína de chocho | 45 |
| Tabla 10. | Contenido de aminoácidos g/100 gramos de proteína de chocho | 46 |
| Tabla 11. | Análisis foliar con la aplicación del hidrolizado enzimático de la proteína de chocho | 59 |
| Tabla 12. | Análisis de varianza ADEVA para la variable altura | 60 |
| Tabla 13. | Análisis de la varianza ADEVA para la variable diámetro follaje | 60 |
| Tabla 14. | Prueba de tukey al 5 % para la variable diámetro foliar | 61 |
| Tabla 15. | Análisis foliar del brócoli con aplicación hidrolizado enzimático de la proteína de chocho | 62 |
| Tabla 16. | Ficha técnica del hidrolizado enzimático de la proteína de chocho | 65 |
| Tabla 17. | Resumen de la inversión total para la implementación del proyecto | 67 |
| Tabla 18. | Resumen de la inversión fija para la implementación del proyecto | 68 |
| Tabla 19. | Rubros considerados para determinar el capital de operación | 68 |
| Tabla 20. | Determinación del costo unitario del hidrolizado de proteína de chocho | 69 |

| | | |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabla 21. | Rubros considerados para determinar el punto de equilibrio | 70 |
| Tabla 22. | Rendimiento en peso de la obtención del hidrolizado de proteína de chocho. | 93 |
| Tabla 23. | Perfil granulométrico del hidrolizado de proteína de chocho | 93 |
| Tabla 24. | Análisis de varianza de la solubilidad del hidrolizado | 94 |
| Tabla 25. | Porcentaje de proteína soluble (N x 6,25) del hidrolizado de proteína de chocho en función del pH | 94 |
| Tabla 26. | Análisis de varianza del porcentaje de absorción de agua del hidrolizado en función del pH | 95 |
| Tabla 27. | Capacidad de absorción de agua del hidrolizado de chocho en función del pH | 95 |
| Tabla 28. | Análisis de varianza del efecto del pH sobre la capacidad de formación de emulsión | 96 |
| Tabla 29. | Efecto del pH sobre la capacidad de formación de la emulsión del hidrolizado proteico de chocho | 96 |
| Tabla 30. | Análisis de varianza del efecto de la concentración de la proteína sobre la capacidad de formación de la emulsión | 96 |
| Tabla 31. | Efecto de la concentración de la proteína sobre la capacidad de formación de la emulsión | 97 |
| Tabla 32. | Análisis de varianza de la estabilidad de emulsión del hidrolizado de proteína de chocho a diferentes pH | 97 |
| Tabla 33. | Estabilidad de emulsión del hidrolizado de proteína de chocho a diferentes pH | 97 |
| Tabla 34. | Análisis de varianza de la capacidad de formación de espuma | 98 |
| Tabla 35. | Capacidad de formación y estabilidad de espuma del hidrolizado de chocho en función del tiempo. | 98 |
| Tabla 36. | Análisis de varianza de la concentración de cloruro de sodio | 99 |
| Tabla 37. | Efecto del % NaCl sobre la capacidad de formación de la espuma del hidrolizado proteico de chocho | 99 |
| Tabla 38. | Análisis de varianza del efecto de la concentración sobre la viscosidad del hidrolizado de proteína de chocho | 100 |

| | | |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabla 39. | Efecto de la concentración sobre la viscosidad del hidrolizado de proteína de chocho | 100 |
| Tabla 40. | Análisis de varianza de la influencia de la temperatura sobre la viscosidad del hidrolizado de proteína de chocho | 100 |
| Tabla 41. | Influencia de la temperatura sobre la viscosidad del hidrolizado de proteína de chocho | 101 |
| Tabla 42. | Análisis de varianza para el efecto del pH sobre la viscosidad del hidrolizado de proteína de chocho | 101 |
| Tabla 43. | Efecto del pH sobre la viscosidad del hidrolizado de proteína de chocho | 101 |
| Tabla 44. | Datos experimentales obtenidos a las cuatro semanas de aplicación de la fertilización foliar en plántulas de brócoli. Dimensiones del brócoli por efecto de la fertilización foliar | 102 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | PÁGINA |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1. | Estructura de un aminoácido | 1 |
| Figura 2. | Los isómeros L y D de los aminoácidos | 2 |
| Figura 3. | Estructura primaria de las proteínas | 3 |
| Figura 4. | Hélice α y lámina β de la estructura secundaria de las proteínas | 4 |
| Figura 5. | Estructura terciaria de la proteína | 5 |
| Figura 6. | Estructura interna de la hoja | 25 |
| Figura 7. | Apertura de los estomas en la planta | 26 |
| Figura 8. | Perfil granulométrico del hidrolizado de proteína de chocho | 43 |
| Figura 9. | Grado de hidrólisis del hidrolizado de proteína de chocho | 44 |
| Figura 10. | Perfil de solubilidad del hidrolizado enzimático de proteína de chocho | 48 |
| Figura 11. | Capacidad de absorción de agua a diferentes rangos de pH del hidrolizado | 49 |
| Figura 12. | Efecto del pH sobre la capacidad de formación de la emulsión del hidrolizado proteico de chocho | 50 |
| Figura 13. | Efecto de la concentración de proteína sobre la capacidad de formación de la emulsión | 51 |
| Figura 14. | Efecto del pH sobre la estabilidad de la emulsión del hidrolizado proteico de chocho | 52 |
| Figura 15. | Efecto de la concentración sobre la estabilidad de la espuma del hidrolizado proteico de chocho | 54 |
| Figura 16. | Efecto del NaCl sobre la capacidad de formación de la espuma del hidrolizado proteico de chocho | 55 |
| Figura 17. | Influencia de la concentración en la viscosidad del hidrolizado de proteína de chocho | 56 |
| Figura 18. | Influencia de la temperatura en la viscosidad del hidrolizado proteico de chocho | 57 |

| | | |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 19. | Viscosidad del hidrolizado proteico de chocho a diferentes rangos de pH | 58 |
| Figura 20. | Variación del diámetro de las plántulas de brócoli en función del tiempo. | 61 |
| Figura 21. | Diagrama de flujo de la elaboración del hidrolizado de proteína de chocho | 63 |
| Figura 22. | Aislado proteico de chocho (a) extracción básica a pH 10,5; b) proceso de centrifugado, (c) aislado en pasta; (d) aislado liofilizado y molido | 106 |
| Figura 23. | Hidrolizado enzimático de chocho: (a) aplicación de la papaína con tiempo de 60 minutos; b) aplicación de la flavourzyme con un tiempo de 90 minutos | 107 |
| Figura 24. | Aplicación del fertilizante foliar: (a) Medición de plántulas de brócoli inicialmente, (b); Fertilización foliar del hidrolizado de chocho (c) Medición a la primera semana, (d) Medición a la cuarta semana de aplicación | 108 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | PÁGINA |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| ANEXO I Método para determinación de perfil de aminoácidos | 84 |
| ANEXO II Método para determinación de perfil de péptidos | 84 |
| ANEXO III Método de kjeldahl | 85 |
| ANEXO IV Métodos de determinación de minerales | 87 |
| ANEXO V Rendimiento en peso de la obtención del aislado e hidrolizado de proteína de chocho | 93 |
| ANEXO VI Datos experimentales del perfil granulométrico del hidrolizado de proteína de chocho | 93 |
| ANEXO VII Datos experimentales de la solubilidad del hidrolizado de proteína de chocho | 94 |
| ANEXO VIII Datos experimentales de la capacidad de absorción de agua del hidrolizado de chocho | 95 |
| ANEXO IX Datos experimentales de la capacidad de formación de la emulsión del hidrolizado proteico de chocho | 96 |
| ANEXO X Datos experimentales de la capacidad de formación y estabilidad de espuma del hidrolizado de chocho | 98 |
| ANEXO XI Datos experimentales del % NaCl sobre la capacidad de formación de la espuma del hidrolizado proteico de chocho. | 99 |
| ANEXO XII Datos experimentales de la influencia de la viscosidad sobre el hidrolizado de proteína de chocho | 100 |
| ANEXO XIII Datos experimentales obtenidos en las cuatro semanas de aplicación de la fertilización foliar en plántulas de brócoli. | 102 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| ANEXO XIV | |
| Detalle de los rubros considerados para la inversión | 103 |
| ANEXO XV | |
| Detalle del capital de operación | 104 |
| ANEXO XVI | |
| Detalle de los costos de producción y gastos de financiamiento | 105 |
| ANEXO XVII | |
| Proceso de obtención y elaboración del aislado proteico de chocho | 106 |
| ANEXO XVIII | |
| Proceso de elaboración del hidrolizado enzimático de chocho | 107 |
| ANEXO XIX | |
| Aplicación del hidrolizado de chocho en cultivo de brócoli | 108 |

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar un hidrolizado enzimático de proteína de chocho (*Lupinus mutabilis*) obtenido por vía enzimática. La hidrólisis fue catalizada por una mezcla secuencial de enzimas de grado comercial Papaína y Flavourzyme. El rendimiento en hidrolizado proteico alcanzado fue del 73,00 % con base en el aislado.

La hidrólisis proteolítica la cantidad de proteína es del 55,58 % a partir de una concentración 55,55 % del aislado. En la hidrólisis enzimática se eliminan los carbohidratos solubles y ácidos grasos. El grado de hidrólisis alcanzado es moderado (9,95 %) lo cual permite mejorar las propiedades funcionales de la proteína. Los resultados de los análisis de las propiedades funcionales: solubilidad, absorción de agua, absorción de aceite, viscosidad, son afectados por la presencia de carbohidratos, ácidos grasos y alcaloides, situación que resalta al comparar con harina de chocho desengrasada y desamargada.

Los resultados del análisis foliar indican que contiene 90,00 % de materia orgánica con un contenido total de nitrógeno del 8,90 %, fósforo (0,70 %), potasio (0,80 %). Además se destacan el contenido de microelementos como el calcio y magnesio, composición que posibilita su uso como fertilizante. Los resultados del ensayo experimental como fertilizante aplicado en plántulas de brócoli, revelan un incremento del 18,60 % del perímetro foliar. No existe diferencia significativa al 5 % en la altura del tallo, frente a un testigo, al cual se lo mantuvo con su fertilización regular sin adición del hidrolizado de proteína de chocho.

INTRODUCCIÓN

Los aminoácidos son algunos elementos básicos para la vida de todo ser vivo, ya que contienen C, H, O, S y N enlazados de forma que su unión forma estructuras básicas en la célula de un ser vivo, las proteínas (Carbo, 2009).

Los aminoácidos libres son sustancias nutritivas de fácil absorción y asimilación tanto por vía foliar como radicular, se transportan rápidamente a los órganos del vegetal, en los que existe una mayor demanda, debido a su actividad. Los aminoácidos tienen una importante actividad biocatalizadora de reacciones enzimáticas, activan la síntesis de fitohormonas, así como un importante papel como nutriente directo de fácil asimilación, que no es necesario metabolizar (Carbo, 2009).

Las transformaciones de aminoácidos en nuevos aminoácidos, así como otras reacciones bioquímicas son reguladas por hormonas y principalmente por las enzimas que juegan el papel de catalizadores biológicos. Los hidrolizados de proteína parece ser que afectan de algún modo positivo a estos mecanismos (Carbo, 2009).

Los aminoácidos libres y los hidrolizados de proteína no sólo constituyen un nutriente, sino que son un factor regulador del crecimiento debido a su rápida absorción y traslación de los aminoácidos por las partes aéreas de la planta, fácil metabolización, función alimenticia y poder catalizador y regulador del crecimiento. Actúan en los mecanismos enzimáticos fundamentales, mejora la polinización de los frutos, resistencia a estrés hídrico, heladas y sequías de las plantas, transportadores de los microelementos (Espasa, 2007).

Las propiedades físico-químicas de los fertilizantes determinan tanto su comportamiento en el suelo, como su manipulación y conservación de aquí la importancia de determinar sus propiedades: solubilidad, absorción de agua, viscosidad, granulometría, capacidad emulsionante y estabilidad de la emulsión, capacidad y estabilidad de espuma (Agrex, 2008; Torres, 2007).

Se han realizado varias experiencias comprobadas en cultivos de horticultura que el uso de fertilizantes foliares de hidrolizados de proteínas vegetales mejora el rendimiento de hasta un 14% en tomate de invernadero; el incremento de la producción en brócoli por el aumento de la pella principal, mayor vigor en rebrotes y en cuatro variedades de lechuga los ensayos demostraron que existe un aumento del rendimiento por el peso de la planta como por el mayor porcentaje de acogollado de esta. (Franco, 2007).

Frente a la necesidad de disminuir la dependencia de productos químicos en los distintos cultivos, se buscan alternativas fiables y sostenibles, como la elaboración de hidrolizados enzimáticos proteicos, que a la vez promuevan el desarrollo de la agricultura orgánica, al reducir significativamente los impactos medioambientales que tiene la agricultura con insumos agroquímicos (Agroin, 2007).

SIMBOLOGÍA

| | | |
|-------|---|----------------------|
| a_w | = | actividad de agua |
| HR | = | humedad relativa (%) |
| pI | = | punto isoeléctrico |

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. PROPIEDADES DE LOS HIDROLIZADOS

Los hidrolizados proteicos son productos resultantes de la ruptura de los enlaces peptídicos producidos por la hidrólisis de las proteínas. Las proteínas están formadas por numerosas combinaciones de aminoácidos. Los péptidos son el resultado de la unión de varios aminoácidos mediante enlaces denominados peptídicos (Clemente, 1997; Blanco, 2007). Las proteínas son sustancias orgánicas nitrogenadas de elevado peso molecular, y todas están constituidas por series definidas de aminoácidos. Los aminoácidos son por tanto las unidades básicas de las proteínas (Michetti, 2010).

1.1.1. AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos son compuestos que poseen un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) y un grupo amino ($-\text{NH}_2$), unidos al carbono α , como se puede apreciar en la Figura 1.

El radical R de un aminoácido corresponde a su cadena lateral, que es diferente para cada uno de los veinte aminoácidos que se obtienen de la hidrólisis de las proteínas (Blanco, 2007).

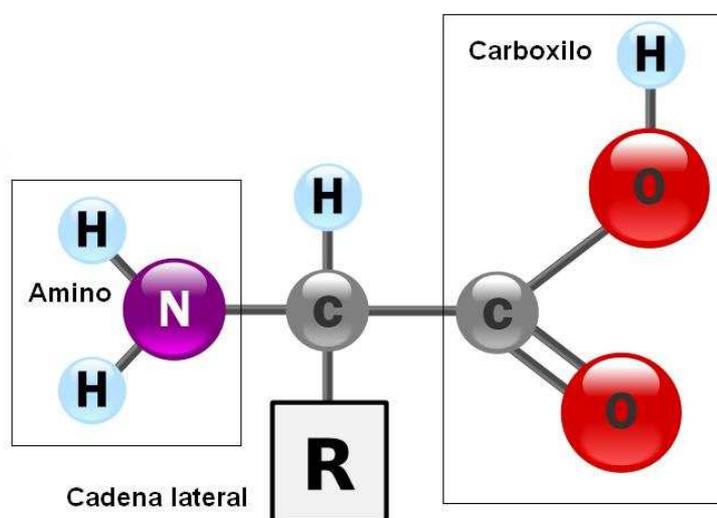


Figura 1. Estructura de un aminoácido
(Argenbio, 2007).

Los aminoácidos constituyen la base fundamental de toda molécula proteica. No puede realizarse proceso biológico alguno, sin que en alguna fase del mismo intervenga.

Los aminoácidos presentan varias propiedades, entre las cuales se destacan:

Isomería óptica: se denominan isómeros a compuestos con la misma fórmula molecular debido a que contienen iguales números y clases de átomos, pero unidos entre sí, de manera diferente. Los isómeros de este tipo poseen muchas propiedades químicas iguales y propiedades físicas idénticas, excepto su capacidad para desviar el plano de vibración de la luz polarizada en uno u otro sentido (Blanco, 2007).

Actividad óptica: se manifiesta por la acción de un haz de luz polarizada que atraviesa una solución de aminoácidos y se debe a la asimetría del carbono, con cuatro grupos diferentes conectados al átomo de carbono α , los α -aminoácidos son quirales, las dos formas especulares se llaman isómero L e isómero D, como se muestra en la Figura 2 (Berge, *et al.*, 2004; Blanco, 2007).

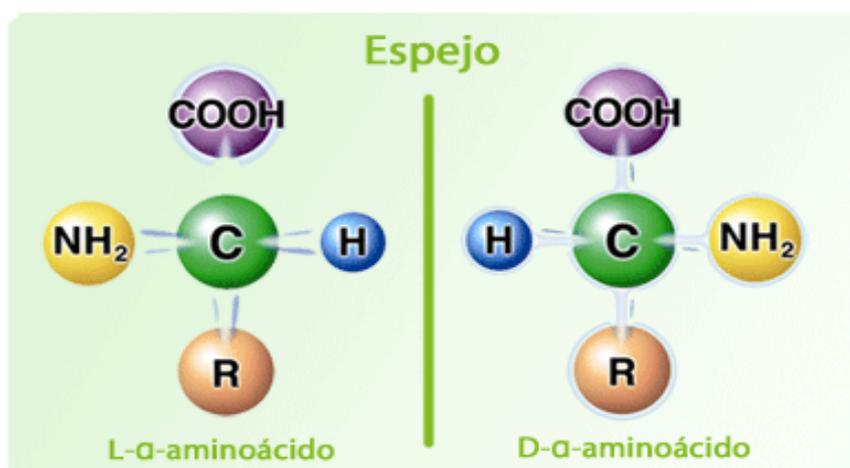


Figura 2. Los isómeros L y D de los aminoácidos.
(Bioiberica, 2010)

1.1.2. PROTEÍNAS

Las proteínas son moléculas complejas. Con la posibilidad de que los 20 aminoácidos puedan ser agrupados en orden aleatorio para conformar

polipéptidos de cientos de aminoácidos que tienen el extraordinario potencial de producir una gran cantidad de variantes en su conformación. Por lo tanto difieren en sus propiedades físico químicas así como en su polaridad, acidez basicidad, aromaticidad, volumen, flexibilidad conformacional, en su habilidad para realizar entrecruzamiento y para formar puentes de hidrógeno y reactividad química.

Estas múltiples características, muchas de las cuales están interrelacionadas, son las responsables de la gran variedad de funciones, estructuras y demás características de las proteínas, todas las proteínas son cadenas lineales compuestas de algunos de los veinte aminoácidos (Bioiberica, 2010).

1.1.2.1 Estructura de las proteínas

1.1.2.1.1 Estructura primaria

El primer nivel de organización de una proteína es su secuencia de aminoácidos esta secuencia es única y definida que componen la cadena polipeptídica y el orden de los aminoácidos se encuentran y depende del orden, la forma que adopten la función de cada proteína y su mecanismo de acción (Berge *et al.*, 2004; Badui, 2001). En la Figura 3, se muestra el esquema de la estructura primaria de la proteína

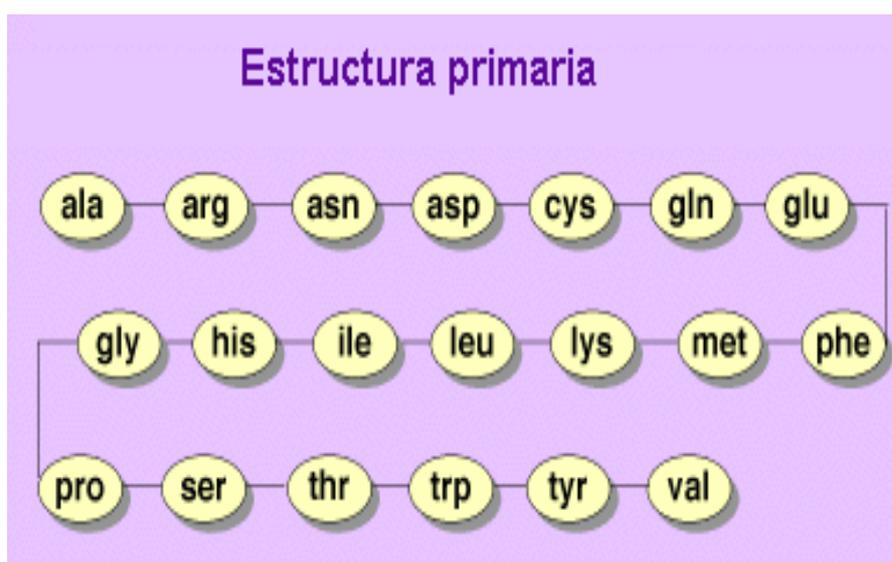


Figura 3. Estructura primaria de la proteína
(Villa *et al.*, 2010)

1.1.2.1.2 Estructura secundaria

Es la disposición de la secuencia de aminoácidos en el espacio. Los aminoácidos, a medida que se acoplan durante la síntesis de proteínas y gracias a la alta capacidad de giro de sus enlaces, adquieren una disposición espacial estable, la estructura secundaria.

Existen dos tipos principales de estructura secundaria: la hélice α y la conformación β .

La hélice α se forma al enrollarse helicoidalmente sobre su misma estructura primaria. En la conformación beta es una cadena polipeptídica, los aminoácidos no forman una hélice, sino una cadena en forma de zigzag, denominada disposición en lámina plegada (Berge *et al.*, 2004).

En la Figura 4, aparecen la estructura de la hélice α y de la conformación β .

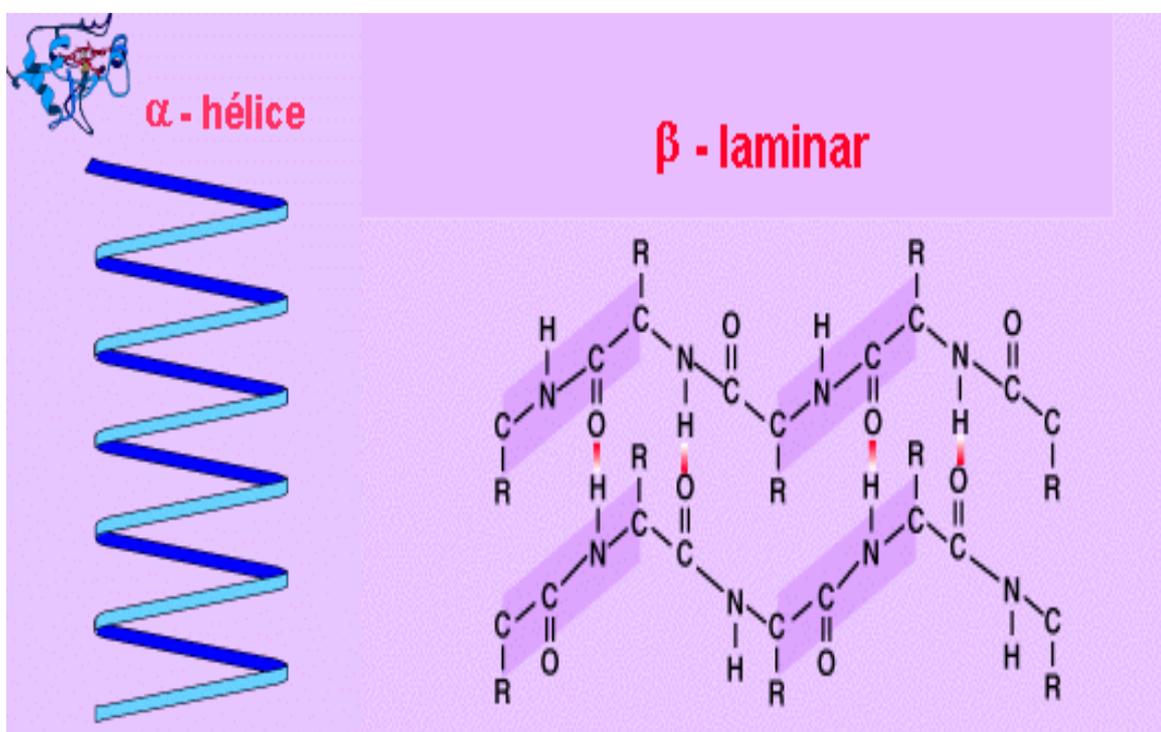


Figura 4. Hélice α y lámina β de la estructura secundaria de las proteínas (Villa *et al.*, 2010)

1.1.2.1.3 Estructura terciaria

Se refiere al modo en que la cadena polipeptídica se dobla sobre sí misma, para producir una estructura plegada y compacta, característica de las proteínas globulares como se puede apreciar en la Figura 5 (Badui, 2006).

La estructura primaria es la que determina cual será la estructura secundaria y por lo tanto la terciaria. Esta conformación globular facilita la solubilidad en el agua, debido a que los grupos hidrofílicos tienden a disponerse hacia el exterior de la molécula (Acuña, 2001; Blanco, 2007).

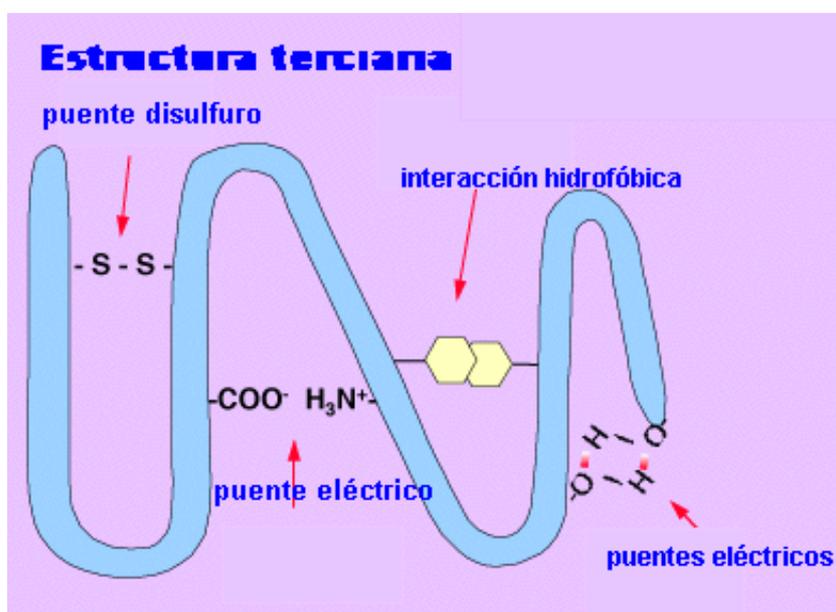


Figura 5. Estructura terciaria de la proteína
(Villa *et al.*, 2010)

1.1.2.1.4 Estructura cuaternaria

La estructura cuaternaria determina el ordenamiento espacial de las subunidades y la naturaleza de sus interacciones. Esta estructura no, necesariamente, se encuentra en todos los polipéptidos y se refiere a la asociación de dos o más cadenas. Las interacciones, que estabilizan las cadenas polipeptídicas plegadas en las proteínas con múltiples subunidades, son de los mismos tipos que las que estabilizan la estructura terciaria: puentes salinos, puentes de hidrógeno, fuerzas

de Van der Waals e interacciones hidrófobas. Proporcionan la energía para estabilizar la estructura de múltiples subunidades a través de las interacciones entre estas (Berge *et al.*, 2004; Badui, 2006).

1.1.2.2 PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS

1.1.2.2.1 Interacción proteína – proteína

Las principales fuerzas que contribuyen a estas interacciones son las uniones hidrófobas orientadas en forma ordenada, que hacen que se produzcan grandes complejos de proteína (Metrione y Watson, 1999).

1.1.2.2.2 Interacción proteína – polisacárido

Las proteínas – carbohidratos tienen características coloidales, pueden formar grandes agregados con estructuras tridimensionales muy firmes, cuya estabilidad es función de la fuerza iónica, del pH del sistema y de la relación proteína – carbohidrato. La mayoría de propiedades y características físicas de los alimentos dependen de ellas (Cheftel *et al.*, 1989).

1.1.2.2.3 Interacción proteína – lípido

Los lípidos pueden interaccionar de diferente manera con las proteínas, básicamente a través de puentes hidrófobos o iónicos, aunque también existen puentes salinos. Cada proteína tiene diferente capacidad emulsionante, que depende, en gran medida, del balance de aminoácidos hidrófobos / hidrófilos y del método que se emplea en su obtención (Anglemeir y Montgomery, 1982).

1.1.2.2.4 Propiedades funcionales

El agua es un componente esencial y modifica las propiedades fisicoquímicas de las proteínas. Las proteínas presentan la menor capacidad de hidratación en el punto isoeléctrico, en el que predominan las interacciones proteína – proteína. Por

encima y por debajo del mismo, se modifica la carga neta y pueden hincharse y unir más agua (Badui, 2006).

Las propiedades de las proteínas que dependen de las interacciones proteína – agua son:

a. Solubilidad: La solubilidad de la proteína es la manifestación termodinámica del equilibrio entre las interacciones proteína – proteína (Badui, 2006).

La principal ventaja de la solubilidad es una dispersión rápida y completa de las moléculas o partículas proteicas. Esto conduce a un sistema coloidal finamente disperso, con una estructura macroscópica homogénea y una textura suave. La solubilidad facilita la difusión de la proteína en las interfases aire – agua y aceite – agua, al mejorar la actividad superficial (Cheftel *et al.*, 1989).

b. Absorción de agua: La absorción de agua en las proteínas está definida como la humedad relativa de la proteína. Frecuentemente, se utilizan cuatro métodos para la determinación práctica de la absorción de agua y de la capacidad de retención de agua de los ingredientes proteicos (Cheftel *et al.*, 1989; Sathe *et al.*, 1982)

- *El método de la humedad relativa o sorción*, que mide la cantidad de agua adsorbida a una humedad relativa determinada.
- *El método de hinchado* utiliza el aparato de Baumann, que consiste en un tubo capilar graduado, el cual se acopla a un filtro de vidrio vitrificado, donde se coloca la muestra que absorbe el agua del tubo capilar.
- *El método por saturación de agua*, que mide la cantidad necesaria para conseguir un estado de saturación de la proteína en agua (retención máxima de agua determinada por centrifugación).

- *Los métodos por exceso de agua*, que consisten en exponer las muestras proteicas a un exceso de agua, para después filtrar o aplicar moderadamente una fuerza centrífuga o de compresión que separe el exceso de agua.
- c. **Viscosidad:** La viscosidad se define como la resistencia de una solución a fluir bajo una fuerza aplicada o un esfuerzo de cizalla. En una solución ideal, el esfuerzo de cizalla es directamente proporcional a la velocidad de corte. La fuerza por unidad de área, F/A es directamente proporcional al gradiente de velocidad entre las capas del líquido, dv/dr , expresada como:

$$\frac{F}{A} = \eta \frac{dv}{dr} \quad [1]$$

La constante de proporcionalidad η se conoce como el coeficiente de viscosidad.

Los fluidos que obedecen esta expresión se conocen como fluidos Newtonianos. La conducta del flujo de las soluciones se afecta, principalmente, por el tipo de soluto. El alto peso molecular de los polímeros solubles incrementa notablemente la viscosidad, aun en bajas concentraciones (Badui, 2006).

El coeficiente de viscosidad aumenta exponencialmente, con la concentración proteica a causa de las interacciones proteína – proteína. Las variaciones de pH, temperatura, fuerza iónica, así como la adición de iones Ca^{2+} , agentes oxidantes o reactivos que suponen la rotura de puentes de hidrógeno o disulfuro, pueden modificar profundamente la viscosidad de las dispersiones proteicas (Han y Khan, 1990).

1.1.2.2.5 Capacidad emulsificante

Para formar una emulsión se requiere aceite, agua, un emulsificante y energía, generalmente mecánica. Las proteínas como surfactantes son las preferidas para formular emulsiones alimenticias (aceite – agua), debido a que su superficie es activa y favorece la resistencia a la coalescencia (Badui, 2006).

La capacidad emulsificante (CE) es el volumen (mL) de aceite que puede ser emulsificado por gramo de proteína, se añade paulatinamente y se reporta el volumen que se agregó antes de que ocurra la inversión de la fase, caracterizada por una inversión de la emulsión de aceite en agua, hacia agua en aceite. Este método involucra la adición del aceite, a velocidad y temperatura constantes, sobre una solución acuosa de proteína, con agitación continua de un homogenizador.

El punto de inversión de la fase se reconoce por un cambio abrupto en la viscosidad o color; ó por un aumento en la resistencia eléctrica. (McClemens, 1999).

Las emulsiones estabilizadas por proteínas se ven afectadas, tanto por las propias características moleculares, como por factores intrínsecos, como el pH, la fuerza iónica, la temperatura, la presencia de surfactantes de bajo peso molecular, el tipo de proteína, así como los factores extrínsecos como el tipo de equipo a utilizar para formar la emulsión, la velocidad de incorporación de aceite y el grado de agitación. Esto dificulta la estandarización de los métodos y la comparación de resultados entre laboratorios (Badui, 2006).

1.1.2.2.6 Estabilidad de emulsión

Las emulsiones estabilizadas por proteínas a menudo son estables por días y no se observa separación de la crema o de alguna fase, si las emulsiones se encuentran almacenadas en condiciones ambientales.

Para evaluar la capacidad de la proteína como estabilizadora de emulsiones se somete la emulsión a diferentes condiciones drásticas, como altas temperaturas o a una fuerza centrífuga.

Si se utiliza la centrifugación, la estabilidad se expresa como la disminución del área interfacial de la emulsión o como el porcentaje de crema separada o, bien, por la cantidad de aceite coalescido (Dagorn–Scraviner *et al.*, 1987).

1.1.2.2.7 Capacidad espumante

Una espuma se produce cuando un gas es introducido en un líquido, ya sea por uno o varios orificios a través de vidrio que es destinado a eliminar los elementos volátiles (burbujear).

El volumen del gas, generalmente, es mucho más elevado que el de las partículas coloidales. Las espumas son menos estables que las emulsiones y que las películas que las forman, pues bajo la influencia de la gravedad el líquido comprendido entre las dos laminillas (Linden y Lorient, 1996).

Para la formación de espuma se utilizan diferentes sistemas:

- El burbujeo o la incorporación de aire por depresión permite obtener espumas con bajas concentraciones de surfactantes (0,1% para las proteínas).
- El batido necesita concentraciones de surfactantes más elevadas; se practica en un sistema discontinuo (batidor doméstico, batidor planetario industrial) o en sistema continuo industrial (esponjamiento bajo presión de gas, esponjador tipo cambiador de superficie rascada, etc.) (Linden y Lorient, 1996).

La estabilidad de la espuma depende:

- De la rigidez de la película interfacial: esta resulta mejorada en el caso de una espuma proteica, si la desnaturalización se acompaña de gelificación o si la concentración interfacial es elevada (caso de las proteínas al pH isoelectrico que son más compactas). La adición de polisacáridos permite formar complejos estabilizantes.
- De la viscosidad de la fase líquida: se mejora por la adición de polisacáridos o, en el caso de las proteínas, por un incremento de la concentración y un pH en el punto isoelectrico.

- De la presencia de partículas sólidas que estabilizan la película interfacial (Linden y Lorient, 1996).

1.1.2.3 Desnaturalización de las proteínas

Consiste en la pérdida de la estructura terciaria, por romperse los puentes que forman dicha estructura. Todas las proteínas desnaturalizadas tienen la misma conformación, muy abierta y con una interacción máxima con el disolvente, por lo que una proteína soluble en agua, cuando se desnaturaliza, se hace insoluble en agua y precipita. La desnaturalización de la proteína se produce por cambios de temperatura o variaciones de pH (Blanco, 2007).

- Cambios de temperatura. La aplicación de calor es uno de los agentes desnaturalizantes que se utilizan con mayor frecuencia, debido a que facilita la digestión de las proteínas y desnaturaliza los inhibidores de proteasas que se hallan en las leguminosas. La aplicación de calor afecta la estabilidad de las interacciones no-covalentes de la estructura tridimensional de las proteínas, pues se eleva la entalpía de la molécula y se rompe el delicado balance de los enlaces, que mantienen el equilibrio. Un factor más, que se involucra en la termodesnaturalización, es el contenido de aminoácidos y tipo de aminoácidos predominantes en las proteínas. Las proteínas con altos contenidos de aminoácidos hidrofóbicos como Val, Leu, Ile y Phe resultan, generalmente, más estables (Zhun y Damodaran, 1994).

Un segundo mecanismo indirecto, causante de la desnaturalización por frío, es el resultado de la congelación de los tejidos. La formación de hielo causa un aumento en la concentración del sistema líquido alrededor de las zonas de hielo puro. En esta zona líquida se concentran todos los solutos, que rodean normalmente a la proteína, incluyen sales y posibles inhibidores o inactivadores de las proteínas (Huang *et al.*, 2002).

- Variaciones de pH. El cambio en el pH del ambiente natural o fisiológico de las proteínas puede acarrear modificaciones importantes en su conformación,

debido a cambios en la ionización de las cadenas laterales cargadas, porque se afecta el número de los puentes salinos que estabilizan la estructura nativa. Una desnaturalización alcalina implica la neutralización de la carga positiva de las cadenas laterales de Lys, His y Arg. Una desnaturalización ácida implica la protonación de las cargas de Asp, Glu. Ambos aminoácidos impiden la formación de una interacción electrostática.

En la industria, para la obtención de aislados proteicos vegetales se aplica con mayor frecuencia, el tratamiento alcalino. Se utiliza para elevar la concentración de proteína y requiere de una solubilización alcalina a valores de pH cercanos a 10 (Badui 2006; López, 2003).

1.1.3. HIDROLIZADOS

La esencia de la hidrólisis proteica es la rotura del enlace péptido y, en consecuencia, la generación de péptidos de menor tamaño o, incluso, de aminoácidos libres.

Los α -L-aminoácidos se obtienen por hidrólisis enzimática de proteínas de origen vegetal. La hidrólisis, significa la ruptura de las proteínas en las unidades que las forman, es decir, los aminoácidos (Blanco, 2007).

1.1.3.1 Propiedades

Las propiedades fundamentales de un hidrolizado son el grado de hidrólisis y el tipo de hidrólisis, que van a determinar, en gran medida, las restantes características del mismo.

1.1.3.1.1 Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis es el porcentaje de enlaces peptídicos rotos, en relación con el contenido total de enlaces de la proteína original. El grado de hidrólisis final se determina por la concentración del sustrato, la relación enzima/sustrato, el

tiempo de incubación y las condiciones físico-químicas como el pH y la temperatura (Teichgräber *et al.*, 1993; Poutanen, 1997).

Los hidrolizados proteicos vegetales se pueden agrupar en tres grandes grupos:

- a) Hidrolizados con bajo grado de hidrólisis: entre el 1 y el 10 %, producen un incremento de la solubilidad, necesaria para la mejora de las propiedades funcionales (Tschimirov *et al.*, 1983, Ponnampalam *et al.*, 1987, Soral-Smietana *et al.*, 1998). Un factor que también va a influir en la funcionalidad de los hidrolizados es la exposición de los residuos hidrófobos de la proteína, que estaban inmersos en el interior de la proteína (Panyam *et al.*, 1996).
- b) Hidrolizados con grado de hidrólisis variable, generalmente, de valor alto, se usan como flavorizantes. Los hidrolizados obtenidos mediante la hidrólisis ácida de proteínas vegetales, con HCl, durante 4 a 24 horas y a temperaturas entre 100 °C y 125 °C se usan como flavorizantes. A sí, el grado de hidrólisis va a depender del tiempo, temperatura y concentración de ácido usada (Manley *et al.*, 1981).
- c) Hidrolizados extensivos con grado de hidrólisis superior al 10 %, para su uso en alimentación especializada. En este se encuentran los hidrolizados que buscan explotar o mejorar las características nutricionales de las proteínas de origen.

1.1.3.1.2 Tipos de hidrólisis

La hidrólisis consiste en descomponer íntegramente las proteínas en sus aminoácidos constitutivos. Existen tres formas de hidrólisis:

- a) **Hidrólisis ácida:** La hidrólisis ácida logra la degradación de las proteínas, en menor tiempo. En la hidrólisis ácida se fracciona la proteína, se rompen las cadenas polipeptídicas en desorden, en este proceso se genera una gran

cantidad de sales y cloruros dañinos para las plantas y además, el grado de hidrólisis que se obtiene es muy bajo (Química Bloemedal, 2010).

Los datos analíticos (nitrógeno total o nitrógeno amídico y análisis de aminoácidos) de estos hidrolizados muestran un contenido elevado en nitrógeno amínico en comparación con los digestos enzimáticos. Presenta un alto contenido de sales (30 – 40 %). Debido a las condiciones severas, se produce una total destrucción del triptófano, pérdida severa de cistina y pérdidas menores de serina y treonina, así como la conversión en sus formas ácidas de la asparagina y glutamina (Bridson, 1998; Bridson y Brecker, 1970).

- b) Hidrólisis alcalina:** La hidrólisis alcalina es un proceso que utiliza NaOH o $Ba(OH)_2$. Los aminoácidos arginina y cisteína se destruyen pero a la vez con gran facilidad, forma racematos. Al hidrolizar las proteínas con un álcali concentrado se obtiene una mezcla racémica de aminoácidos (conversiones en enantiómeros D y L). El sabor proporcionado por los aminoácidos depende de su configuración, es así como se tiene que los D–aminoácidos proporcionan un sabor específico, ligeramente amargo; los L–aminoácidos proporcionan sabores dulces y las mezclas racémicas no poseen sabor (Kirk y Othmer, 1963).
- c) Hidrólisis enzimática:** La hidrólisis enzimática es un proceso por el cual, se someten proteínas a la acción de enzimas específicas, capaces de reconocer el enlace peptídico y separar los aminoácidos sin destruirlos. Se obtienen aminoácidos 100 % levógiros (L– α –aminoácidos).

La hidrólisis enzimática no produce destrucción de principios de acción fitohormonal que acompañan a los aminoácidos y que pueden ser destruidos por otros tipos de hidrólisis, como sucede en las hidrólisis ácidas y alcalinas (Química Bioemedal, 2010).

Las características del hidrolizado que se obtenga vendrán determinadas evidentemente, por el uso que se le quiera dar a este. Así, el grado y tipo de

hidrólisis va a determinar el resto de las propiedades del hidrolizados, las aplicaciones del hidrolizado va a depender de estos factores (Vioque *et al.*, 2001).

1.1.3.2 Fuentes de obtención de proteínas

Existen fuentes de obtención de proteínas convencionales y no convencionales.

- No convencionales: semillas de oleaginosas, concentrados de proteína de pescados, concentrados de proteínas de hojas, algas, proteína unicelular.
- Convencionales: son proteínas de origen animal, fundamentalmente leche, carne, productos de pesca y huevos; y de origen vegetal que se obtienen a partir de cereales y leguminosas, como el chocho (*Lupinus mutabilis*) (Acuña, 2001).

En la Tabla 1, se muestra la cantidad de proteína en Kg, que se puede obtener por una ha de chocho. El chocho, tanto por su alta producción por hectárea como por el alto contenido de proteínas, aparece como un proveedor de proteínas.

Tabla 1. Producción de proteína por hectárea para diferentes fuentes de obtención de proteína vegetal

| Producto | Producción (kg/ha) | Contenido de proteínas (%) | Proteínas (kg/ha-año) |
|-----------------|--------------------|----------------------------|-----------------------|
| Lenteja | 600,00 | 24,00 | 144,00 |
| Arroz pulido | 2800,00 | 6,40 | 116,00 |
| Poroto común | 1 300,00 | 20,60 | 268,00 |
| Trigo | 3 000,00 | 9,30 | 279,00 |
| Arveja de grano | 1 400,00 | 22,00 | 308,00 |
| Quinoa | 2 000,00 | 18,00 | 360,00 |
| Maíz | 3 500,00 | 10,60 | 371,00 |
| Poroto de soya | 1 800,00 | 38,00 | 685,00 |
| Chocho | 4 000,00 | 44,00 | 1 760,00 |

Fuente: Junge, 1975

La composición química de la semilla de chocho se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición química del chocho

| Componente | Porcentaje |
|-------------------|-------------------|
| Humedad | 10,00 – 12,00 |
| Carbohidratos | 25,00 – 27,00 |
| Proteína | 35,00 – 45,00 |
| Grasas | 12,00 – 14,00 |
| Fibra | 10,00 – 12,00 |
| Cenizas | 2,50 – 3,00 |

Fuente: Acuña, 2001

La proteína de chocho tiene un alto valor biológico que depende de la variedad, calidad y cantidad de los aminoácidos esenciales que es capaz de aportar un determinado tipo de proteína al organismo como se puede observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Contenido de aminoácidos en 100 gramos

| Aminoácidos | g de aminoácidos / 100 g |
|--------------------|---------------------------------|
| Treonina | 3,00 |
| Valina | 3,90 |
| Metionina | 0,50 |
| Leucina | 14,20 |
| Fenilalanina | 3,90 |
| Histidina | 2,50 |
| Lisina | 4,90 |
| Arginina | 9,90 |
| Triptófano | 0,80 |

Fuente: Acuña, 2001

El perfil de aminoácidos del chocho, es importante, porque da información sobre la calidad de la proteína de chocho. Se reflejó una notable concentración de valina

(3,90), leucina (14,20), isoleucina (41,13), treonina (3,00), lisina (4,90), metionina (0,50) y fenilalanina (3,90).

1.2. FERTILIZANTES ORGÁNICOS

1.2.1. DEFINICIÓN

Los fertilizantes orgánicos se obtienen por transformación de estiércol animal, de restos de cosecha, de residuos orgánicos o, en general, de una fuente orgánica y natural. El fertilizante debe contener, al menos, un cinco por ciento de uno o más de los tres nutrientes primarios (N, P₂O₅, K₂O) (FAO, 2002).

1.2.2. PROPIEDADES DE LOS FERTILIZANTES

Los abonos orgánicos tienen propiedades, que ejercen efectos sobre el suelo, aumentan la fertilidad. Las propiedades de los fertilizantes actúan en el suelo.

Existen tres tipos de propiedades físicas, químicas y biológicas (Cervantes, 2007).

1.2.2.1 Propiedades físicas

- El fertilizante o abono orgánico, por su color oscuro, absorben más las radiaciones solares, por lo que el suelo adquieren más temperatura y se pueden absorber con mayor facilidad los nutrientes.
- Aumentan la retención de agua en el suelo, por lo que se absorbe más el agua cuando llueve o se riega, y retienen durante mucho tiempo, el agua en el suelo durante el verano.
- Optimizan la permeabilidad del suelo, ya que influyen en el drenaje y aireación del suelo.
- Mejoran la estructura y textura del suelo, hacen más ligeros a los suelos arcillosos y más compactos a los arenosos.

- Disminuyen la erosión del suelo, tanto de agua y viento (Cervantes, 2007).

1.2.2.2 Propiedades químicas

- Las aplicaciones de abono aumentan el poder tampón del suelo, y en consecuencia reducen las oscilaciones de pH de éste.
- Los abonos orgánicos aumentan también la capacidad de intercambio catiónico del suelo, con lo que se incrementa la fertilidad (Cervantes, 2007).

1.2.2.3 Propiedades biológicas

- Los abonos orgánicos favorecen la aireación y oxigenación del suelo, por lo que hay mayor actividad radicular y mayor actividad de los microorganismos.
- El fertilizante orgánico constituye una fuente de energía para los microorganismos, por lo que se multiplican rápidamente (Cervantes, 2007).

1.2.3 TIPOS DE FERTILIZANTES ORGÁNICOS

La variedad de fertilizantes orgánicos es amplia. Entre ellos se tienen:

1.2.3.1 Bioactivador

El extracto de algas es un producto compuesto de carbohidratos promotores del crecimiento vegetal, aminoácidos y extracto de alga 100 % solubles. Este producto favorece la recuperación de los cultivos frente a situaciones de estrés, incrementan el crecimiento vegetativo, la floración, la fecundación, el cuajado y el rendimiento de los frutos (Franco, 2004).

1.2.3.2 Bioestimulante

Un bioestimulante, por su contenido y aporte de auxinas de origen natural, vitaminas, citoquininas, microelementos y otras sustancias, El bioestimulante favorecen el desarrollo y crecimiento de toda la planta. Es de fácil asimilación por

las plantas a través de hojas o raíces, al aplicar tanto foliar como radicularmente, debido al contenido en distintos agentes de extremada asimilación por todos los órganos de la planta (Cervantes, 2007).

1.2.3.3 Fertilizante con aminoácidos

La proteína de origen vegetal, principalmente por su menor costo de producción con respecto a la proteína de origen animal. El hidrolizado a partir de proteína vegetal es un excelente sustituto de la proteína animal y a la vez se utiliza en la industria cenicera, fertilizante etc. (Acuña, 2001).

Los fertilizantes, que tienen un alto contenido de aminoácidos libre, actúan como activadores del desarrollo vegetativo, mejoran el calibre y coloración de los frutos, etc. El aporte de aminoácidos libres facilita que la planta ahorre energía en sintetizarlos, a la vez que facilita la producción de proteínas, enzimas, hormonas, etc., compuestos importantes para todos los procesos vitales de los vegetales. Al aplicar el fertilizante a través de la superficie de las hojas, los nutrientes deben afrontar diversas barreras estructurales a diferencia de los pesticidas, que están principalmente basados en aceite y que no presentan dificultades para penetrar en este tejido. Los fertilizantes que están basados en sales (cationes/aniones) pueden presentar problemas para penetrar las células interiores del tejido de la planta (Urbano, 2001).

Comercialmente, estos productos fertilizantes suelen presentarse en forma de soluciones con un alto contenido de aminoácidos libres, para ser utilizados mediante la pulverización por su absorción por vía foliar o incorporadas al agua de riego para la absorción radicular (Urbano, 2001).

Es conveniente que las soluciones de fertilizantes sean ricas en aminoácidos esenciales libres; como glicina, alanina, prolina, ácido glutámico, metionina. El efecto de la aplicación del fertilizante depende de la especie y variedad vegetal, edad, estado nutritivo de la planta, tanto en macro como microelementos, condiciones climáticas, estado sanitario de la planta, etc. Por estas razones es de

especial interés, en cada caso, caracterizar el momento más adecuado de aplicación a los distintos cultivos y la dosis óptima (Urbano, 2001).

1.2.3.4 Materia orgánica

Los típicos abonos orgánicos poseen gran cantidad de materia orgánica, por lo que favorecen la fertilidad del suelo, incrementan la actividad microbiana de este y facilitan el transporte de nutrientes a la planta, a través de las raíces.

Las sustancias húmicas incrementan el contenido y distribución de los azúcares en los vegetales, por lo que elevan la calidad de los frutos y flores, incrementan la resistencia al marchitamiento. El aporte de los elementos nutritivos es fundamental para el desarrollo fisiológico normal de la planta, ya que carencias en los mismos, puede provocar deficiencias.

- Humus de lombriz: materia orgánica descompuesta por lombrices.
- Lodos de depuradora: elevado contenido en materia orgánica, pero es difícil controlar si contienen alguna sustancia perjudicial, como los metales pesados y está prohibido usarlos para alimentos humanos solo pueden usar en bosques.
- Cenizas: Si proceden de madera, huesos de frutas u otro origen completamente orgánico, contienen mucho potasio y carecen de metales pesados y otros contaminantes. Sin embargo, tienen un pH muy alto y es mejor aplicarlos en pequeñas dosis o tratarlos previamente (Mendoza, 2000).

1.2.4 PAPEL DE LOS AMINOÁCIDOS EN LA PLANTA

Los requerimientos de los aminoácidos, por parte del vegetal, se extienden durante todo su ciclo. Estos desempeñan una importante función nutritiva en la germinación (el embrión consume aminoácidos procedentes de proteínas almacenadas en el endoespermo), así como en la síntesis de proteínas (enzimas,

proteínas asociadas a las membranas celulares, etc.) y en la formación de fitohormonas (Mendoza, *et al.*, 2004).

Las plantas sintetizan los aminoácidos a través de reacciones enzimáticas, por medio de procesos de aminación y transaminación, los cuales requieren un gran gasto energético por parte de la planta. En el ciclo del nitrógeno existe un requerimiento de aminoácidos; se plantea la posibilidad de suministrar aminoácidos a la planta, para que se ahorre el trabajo de sintetizarlos y, de esta forma, obtener una mejor y más rápida respuesta en la planta (Michetti, 2010).

Los fertilizantes, con aminoácidos de bajo peso molecular, son sustancias nutritivas de fácil absorción y asimilación tanto por vía foliar como radical. Se transportan a los órganos del vegetal, como brotes, flores y frutos, en los que existe una mayor demanda debido a su actividad (Franco *et al.*, 1989), con los que la planta sintetiza sus propias proteínas, al disminuir una serie de procesos metabólicos consumidores de energía que serían necesarios para la elaboración de los aminoácidos, a partir del nitrógeno amoniacal o nítrico (Franco, 2004).

1.2.4.1 Acción específica de los aminoácidos en la planta

Alanina

- En la planta potencia la síntesis de clorofila
- El potencial de actividad osmótica de la planta se incrementa (Mendoza *et al.*, 2004).

Glicina

- Primer aminoácido en la ruta biosintética de la clorofila
- Aminoácido de acción quelante
- Metabolito fundamental en la formación de tejido foliar (Mendoza *et al.*, 2004).

Lisina

- La síntesis de clorofila se fortalece

- La lisina da lugar a las poliaminas, estas intervienen en procesos fisiológicos fundamentales desde la germinación y senescencia floral, hasta la maduración del fruto (Mendoza *et al.*, 2004).

Arginina

- La arginina contribuyente a la síntesis de clorofila
- Al igual que la lisina es precursor de las poliaminas
- El crecimiento de las raíces se estimula (Mendoza *et al.*, 2004).

Metionina

- La metionina es un precursor de nuevos aminoácidos
- Los procesos metabólicos en las hojas jóvenes se estimulan
- Beneficia la asimilación de nitratos por la planta (Mendoza *et al.*, 2004).

Prolina e Hidroxiprolina:

- La prolina juega un papel esencial en el equilibrio hídrico de la planta
- La actividad fotosintética se mantiene en situaciones adversas
- Las paredes celulares de la planta se fortalecen y aumentan la resistencia a las heladas
- La germinación del polen se incrementa sobre todo a bajas temperaturas (Mendoza *et al.*, 2004).

1.2.4.2 Métodos de aplicación

El método de aplicación del fertilizante por vía foliar depende del tamaño de partícula, como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4 Métodos de aplicación del fertilizante foliar por su tamaño de partícula

| Método | Diámetro de la partícula |
|---------------|-------------------------------------------|
| Dispersión | Granulado |
| Espolvoración | 0,050 mm (partícula) |
| Pulverización | > 0,015 mm (gota) |
| Atomización | 0,050 – 0,015 mm (gota) |
| Fumigación | Tamaños moleculares (partículas gaseosas) |

Fuente: Cabalceta, 2009

Con alta temperatura y baja humedad relativa (HR), hay mayor evaporación de la solución, y esto en la planta provoca una concentración de sales que puede llegar a niveles tóxicos y causar daños por quema de follaje.

Condiciones óptimas de aplicación se encuentran en las horas de la mañana antes de las 9 o en horas de la tarde a partir de las 5, en un rango de temperatura de 18 °C – 25 °C y HR mayor al 70 %. En la Tabla 5, se encuentran los factores que afectan la eficiencia de la aplicación del fertilizante foliar (Cabalceta, 2009).

Tabla 5. Factores que afectan la eficiencia del fertilizante foliar

| Planta | Ambiente | Solución |
|--------------------|--------------------|-----------------------|
| Tipo de cutícula | Temperatura | Concentración |
| Edad de la hoja | Luz | Dosis |
| # de estomas | Fotoperiodo | Técnica de aplicación |
| Estado nutricional | Estrés nutricional | Higroscopicidad |
| Variedad | | pH |

Fuente: Cabalceta, 2009

1.2.4.3 Fertilización foliar

Es la aplicación de nutrientes a través del tejido foliar, donde se concentra la mayor actividad fisiológica de la planta (Cabalceta, 2009).

El uso de los aminoácidos en fertilización foliar es relativamente reciente. Se inició a partir del desarrollo de la tecnología para la fabricación de aminoácidos libres, mediante diferentes procedimientos en los que se destacan la hidrólisis ácida y la hidrólisis enzimática (Molina, 2003).

Cuando se realiza la hidrólisis enzimática y controlada de proteínas, se obtiene un equilibrio entre aminoácidos en forma libre y péptidos que confieren al hidrolizado una importante propiedad catalizadora de ciertas reacciones enzimáticas, activan la síntesis de fitohormonas, así como un significativo papel como nutriente directo (Química Bloemedal, 2010).

1.2.4.4 Tipos de fertilización foliar

- **Correctiva:** El fertilizante suministra elementos para superar deficiencias evidentes, en un momento determinado y con efecto de corta duración, cuando las causas que la provocan no son corregidas (Cabalceta, 2009).
- **Preventiva:** Se conoce que determinado nutrientes es deficiente en el suelo y que a través del mismo su aplicación no es efectiva. Ej. Zn en los cultivos de cítricos y café (Cabalceta, 2009).
- **Sustitutiva:** Para reemplazar las exigencias del cultivo vía foliar. Ej. En el cultivo de piña se presenta alta absorción, cuando existe una limitación con macronutrientes (Cabalceta, 2009).
- **Complementaria:** Se aplica una fracción de abono al suelo (macronutrientes) y otra al follaje (micronutrientes) (Cabalceta, 2009).
- **Complementaria en estado reproductivo:** Cultivos anuales, en la floración y llenado de semillas y frutos, la fuerza metabólica ocasionada reduce la actividad radicular lo suficiente para limitar la absorción de iones. Ej. En Chile, en los cultivos de papa y melón (Cabalceta, 2009).
- **Estimulante:** Los fertilizantes de N-P-K se aplican en baja dosis, en adecuada proporción, fisiológicamente equilibrada. Inducen un efecto estimulador sobre la absorción radicular. Se los recomienda en plantaciones de alta productividad, buena nutrición, sin deficiencias en el cultivo. Generalmente se utiliza en periodos de estrés hídrico (Cabalceta, 2009).

1.2.5 MECANISMOS DE ASIMILACIÓN DE LA PLANTA

La nutrición foliar ha probado ser la forma más rápida para curar las deficiencias de nutrientes y acelerar el rendimiento de las plantas en determinadas etapas fisiológicas.

En la Figura 6, se encuentra la estructura interna de una hoja que está basada en diversas capas, celulares y no celulares. Las capas proporcionan protección contra la desecación, la radiación UV y con respecto a ciertos tipos de agentes físicos, químicos y microbiológicos.

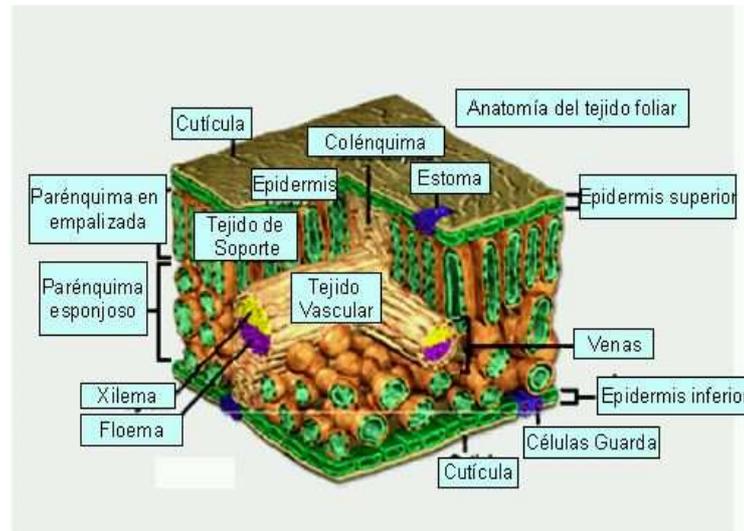


Figura 6. Estructura interna de la hoja
(Ronen, 2010)

Las capas están caracterizadas por la carga eléctrica negativa que influye en la forma y en la tasa de penetración de los iones. Algunas capas son hidrofóbicas y por lo tanto rechazan el rocío que está basado en agua.

La penetración/absorción puede ser realizada a través de los elementos que existen en el tejido. La penetración principal se realiza directamente a través de la cutícula y se realiza en forma pasiva. La penetración tiene lugar también a través de los estomas, que tienen su apertura controlada para realizar un intercambio de gases y el proceso de transpiración. Los estomas difieren entre cada especie vegetal, en su distribución, ocurrencia, tamaño y forma (Mendoza *et al.*, 2004).

1.2.5.1 Apertura de estomas

Los estomas están regulados por factores externos (luz, humedad, temperatura, etc.) e internos (concentración de aminoácidos, ácido abscísico, etc.) y el cierre de los estomas, provoca la ralentización metabólica y consecuentemente la

disminución del crecimiento. A través de los entornos, que se encuentran en el haz y envés de las hojas, las plantas toman, vía foliar, los macronutrientes y gases, como se observa en la Figura 7 (Agrares, 2008).

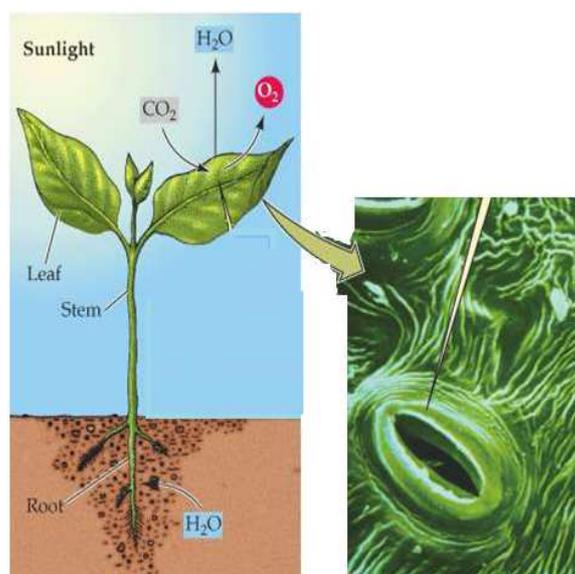


Figura 7. Apertura de los estomas en la planta
(Ronen, 2010)

1.2.5.2 Efectos de la aplicación de aminoácidos sobre la planta

Los efectos, sobre la planta, que pueden producirse al aplicar fertilizantes con aminoácidos son de tres tipos (Urbano, 2001):

- *Efecto trófico:* los aminoácidos al ser metabolizado rápidamente origina sustancias biológicamente útiles. Y a la vez los aminoácidos vigorizan y estimulan la vegetación, por lo que resultan de gran interés en los periodos críticos del cultivo o en casos de altas exigencias. La aplicación del fertilizante, en el momento oportuno, mejora el efecto útil de los restos de abonos minerales.
- *Efecto hormonal:* Al ingresar los aminoácidos a la planta estimulan en la formación de clorofila, de ácido indolacético (IAA) y a la vez en la producción de vitaminas y la síntesis de numerosos sistemas enzimáticos. La acción combinada de los efectos trófico y hormonal, suelen traducirse en estímulos

sobre la floración, cuajado de los frutos, adelanto en la maduración y mejora del tamaño, coloración, riqueza en azúcar y vitaminas de los frutos.

- *Reguladores del metabolismo de los microelementos:* los aminoácidos forman quelatos con los microelementos (hierro, cobre, cinc y manganeso, especialmente). Favorecen su transporte y penetración a través de las células vegetales.

1.2.6 APLICACIÓN DE FERTILIZANTES CON AMINOÁCIDOS EN LA HORTICULTURA

La planta únicamente puede utilizar los α -L-aminoácidos libres, por tanto, los aminoácidos procedentes de la hidrólisis enzimática de proteínas de origen vegetal constituyen un fertilizante equilibrado para las plantas, al contener todos los α -L-aminoácidos necesarios y en las proporciones adecuadas. Las proteínas de origen vegetal, tomadas en conjunto, son más pequeñas que las de origen animal (Tecsol, 2003).

1.2.6.1 Beneficios

La síntesis de aminoácidos es costosa para las plantas, en relación con el requerimiento energético que se necesita. Este gasto de energía es especialmente importante en momentos de estrés, en los cuales la fisiología de la planta no es óptima, los excesos de calor, frío y enfermedades. En estos casos, se ha demostrado que las plantas necesitan incrementar el contenido total de α -L-aminoácidos libres, para soportar dicha situación.

Además los α -L-aminoácidos están relacionados con los mecanismos de regulación del crecimiento y desarrollo vegetal, lo que indica el importante papel que tiene la aplicación como fertilizante (Tecsol, 2003).

Las plantas pueden absorber los α -L-aminoácidos, tanto por vía radicular, como por vía foliar; por vía radicular la savia los reparte por toda la planta. La vía foliar es la más utilizada, ya que pueden aplicarse con otros insumos como abonos

foliares, fungicidas, insecticidas y herbicidas, que ingresan por las hojas y las paredes de la planta. (Tecsol, 2003).

1.2.6.2 Desventajas

- La mayoría de los fertilizantes con aminoácidos que provienen de hidrólisis ácida o de proteína de origen animal; sin embargo, en muchos casos la hidrólisis no se realizaba totalmente y se lograba obtener una cantidad mínima de aminoácidos libres, por tanto eran poco efectivos.
- Los fertilizantes a partir de la hidrólisis ácida contenían grandes cantidades de cloruros o de sulfatos principalmente de amonio, que pueden llegar incluso al 20 % de cloruro amónico p/p, ya que una vez terminada la hidrólisis de la proteína, el ácido sobrante tiene que ser neutralizado. El cloruro, en exceso, genera toxicidad en los suelos y en determinadas condiciones, puede producir quemaduras en hojas y frutos.
- Los aminoácidos procedentes de proteína animal se obtienen de desechos de mataderos, que están prohibidos en los países desarrollados, por el riesgo potencial de transmisión de enfermedades virales. (Tecsol, 2003).

A pesar de que la nutrición foliar se describe como un método de aplicación que podría sortear una serie de problemas, que se encuentran en las aplicaciones edáficas, tiene las siguientes limitaciones (Mendoza, *et al.*, 2004):

- Tasas de penetración bajas, particularmente en hojas con cutículas gruesas y cerosas.
- Se seca en superficies hidrofóbicas.
- Se lava con la lluvia.
- Rápido secado de las soluciones de rociado lo cual no permite la penetración de los solutos.
- Tasas limitadas de traslado de los nutrientes minerales.
- Pérdida de rociado en sitios no seleccionados como objetivos.

- Cantidades limitadas de macronutrientes pueden ser suministrados en un rociado foliar.
- Limitada superficie efectiva disponible de la hoja (plantas de semilla o dañadas).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MATERIALES

2.1.1 MATERIA PRIMA

- Harina de chocho (*Lupinus mutabilis*) procedente de semillas adquiridas en el mercado Mayorista de la ciudad de Quito.
- Aislado de proteína de chocho, obtenido según el apartado 2.2.1
- Hidrolizado proteico de chocho, obtenido según el apartado 2.2.2

2.1.2 EQUIPOS Y ACCESORIOS

2.1.2.1 Materiales y reactivos

- Ácido tricloroacético, Sigma, (10 %)
- Ácido clorhídrico, Merck, 1 N, 6 N
- Balones de vidrio Kimax de 500 y 1 000 mL
- Barras agitadoras magnéticas
- Buffer fosfato, 0,05 M y 0,1 M a pH 7,0; Sigma
- Bureta graduada de 25 mL Kimax
- Embudos Kimax
- Enzimas: papaína, Fluka, y flavourzyme®, Novo industries
- Erlenmeyers de vidrio Kimax
- Espátulas plásticas
- Hidróxido de sodio, Rie del-de-Haën, 1 N, 6 N
- Papel parafilm
- Papeles absorbentes
- Pipetas graduadas Kimax
- Pipetas volumétricas Kimax de 10 mL
- Piscetas de plástico de 500 mL
- Vasos de precipitación de vidrio Kimax de 50 y 100 mL

2.1.2.2 Equipos

- Agitador mecánico de hélice Fisher Scientific,
- Balanza electrónica Mettler de 2 kg de capacidad, PE 3600, Nueva Zelanda
- Barras agitadoras magnéticas,
- Bomba de mochila, Solo, 435, Alemania
- Centrífuga Damon / IEC HT, Estados Unidos
- Centrífuga Damon / IEC Division, Estados Unidos
- Centrífuga Westfalia tipo LWA 205, Alemania
- Congeladora, Ecasa H400, hasta -18 °C, Brasil
- Equipo de digestión y destilación micro Kjeldahl, Selecta, 05-01510, España
- HPLC, Shimadzu, LC-10A, Japón
- Licuadora, Osterizer Super deluxe, Estados Unidos
- Liofilizador Freezer Dryer, Stokes, 90-2001-8, Estados Unidos
- Molino, Alpine, 160 UPZ, Estados Unidos
- Placa agitadora regulable, Sangent – Welch, 4817, Estados Unidos
- pH metro, consort C 383, Bélgica
- Reóstato, Voltbox, UCIM, Estados Unidos
- Tamizador Portable Sieve Shaker Model RX- 24, Estados Unidos
- Viscosímetro rotacional Brookfield Engineering RVDV-II+, Estados Unidos

2.1.2.3 Accesorios

- Tamices, Standard Testing Sieve Nos. 20, 40, 50, 80, 100 y 140, Estados Unidos

2.2 ELABORACIÓN DE AISLADO E HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE PROTEÍNA DE CHOCHO

2.2.1 ELABORACIÓN DE AISLADO DE PROTEÍNA DE CHOCHO

La obtención se realizó a escala piloto. Se usaron 1,5 Kg de harina integral por batch, que contiene toda la grasa, cáscara y alcaloides, a partir de los siguientes procesos:

2.2.1.1 Extracción básica

Se realizó una suspensión harina-agua, con una relación sólido/líquido 1:11 (p / v), se homogenizó la suspensión y se utilizó para el efecto una cuba de acero inoxidable de 20 L, en el que se instaló un agitador mecánico. Se homogenizó por 10 min, se ajustó el pH a 10,50 con NaOH 6 N. Se agitó la mezcla durante 30 min, al término de los cuales se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min, en una centrífuga Westfalia. El sobrenadante fue almacenado y el precipitado fue sometido a una segunda extracción, se suspendió nuevamente con agua a una relación sólido: líquido 1:5 (p / v), se agitó y se centrifugó a las mismas condiciones de la primera extracción y se recolectó el sobrenadante.

2.2.1.2 Precipitación ácida

Los sobrenadantes de la primera y segunda extracción básica se unieron y se ajustó el pH de la solución a 4,50 (punto isoeléctrico de las principales proteínas de las leguminosas), con HCl 6 N. La proteína precipitada se centrifugó a 12 000 rpm en la centrífuga Westfalia. El aislado proteico obtenido fue neutralizado, secado por liofilización y almacenado en un recipiente hermético, hasta su uso.

En la Figura 22, del Anexo XVII, se muestran las fotografías del proceso de obtención del aislado.

2.2.2 ELABORACIÓN DE HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE PROTEÍNA DE CHOCHO

Para la obtención de hidrolizados a escala semi piloto se realizó la reacción proteolítica secuencial con endo y exo enzimas, aplicó las condiciones establecidas por Mosquera (1997).

La hidrólisis enzimática del aislado proteico se llevó a cabo en una marmita de doble fondo, con capacidad de 20 L, calentada con vapor. Se termostató a 50 °C y se instaló el agitador mecánico de hélice. Se disolvió el aislado en agua destilada a una relación 1:6,25 (p / v). Se llevó el pH a 7,00, con NaOH 6 N y la temperatura se mantuvo en 50 °C. Se incorporó la papaína, en una relación enzima/sustrato de 0,32 UA/g de sustrato (34,70 mg), el tiempo de reacción fue de 60 min. Regulado el pH, se incorporó la Flavourzyme®, en una relación enzima/sustrato de 43,41 mL de Flavourzyme que equivale a 178 UPAL/g de aislado (1 UPAL equivale a 1 g de Flavourzyme), el tiempo de reacción fue de 90 min. Se inactivó la acción enzimática a temperatura de ebullición durante 10 min. El hidrolizado fue congelado – liofilizado y almacenado en recipientes herméticos, como se puede apreciar en las fotografías de la Figura 23 en el Anexo XVIII.

La determinación del contenido de los grupos amino (–NH₂) en el hidrolizado enzimático se realizó mediante el método descrito por Kim *et al.*, (1990), al medir la proteína soluble de las muestras tratadas con ácido tricloroacético (TCA) al 10 %. Se tomaron alícuotas de 0,50 mL de proteína hidrolizada, que se mezcló con 0,50 mL de TCA, se agitó por 10 min y se centrifugó. La proteína soluble en el sobrenadante y la proteína total fueron determinadas espectrofotométricamente a 280 nm, sobre la cantidad de proteína total del hidrolizado. El grado de hidrólisis se calculó con la ecuación [2]:

$$\text{Grado de hidrólisis (\%)} = \frac{\text{Proteína soluble en TCA (10\%)}}{\text{Proteína total}} \times 100 \quad [2]$$

2.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICO – QUÍMICA DEL HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE CHOCHO

2.3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA

El perfil granulométrico se determinó en un set de tamices Nos. 20, 40, 50, 80, 100 y 140, que se instaló en un tamizador Portable con un tiempo de agitación de 10 min. Se utilizó el método INEN 1013 – 1983 – 4.

La densidad aparente del hidrolizado enzimático se determinó al pesar una muestra colocada en un volumen de 100 mL en una probeta graduada.

2.3.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

Se determinó el contenido de humedad, proteína total, extracto etéreo, fibra cruda, ceniza y azúcares totales en el hidrolizado proteico, con la aplicación los siguientes métodos:

Tabla 6. Técnicas analíticas aplicadas para la determinación del análisis proximal

| Análisis | Métodos |
|-----------------|-------------------------------|
| Proteína | Método de Kjeldahl |
| Extracto etéreo | Método 920.85, A.O.A.C., 2005 |
| Fibra | Método 962.09, A.O.A.C., 2005 |
| Cenizas | Método 942.05, A.O.A.C., 2005 |
| Humedad | Método 925,09, A.O.A.C., 2005 |
| Carbohidratos | Método 925,09 A.O.A.C., 2005 |

2.3.2.1 Composición de aminoácidos

El perfil de aminoácidos se determinó en el cromatógrafo de alta resolución (HPLC). El procedimiento seguido se muestra en el Anexo I.

2.3.2.2 Perfil de péptidos

La determinación se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS–PAGE, según el método descrito por Weber y Osborn (1969) y expuesto en el Anexo II.

2.4 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DEL HIDROLIZADO DE LA PROTEÍNA DE CHOCHO

2.4.1 SOLUBILIDAD

El perfil de solubilidad se determinó según el método 46–23 de la A.A.C.C. (1984). Se preparó una suspensión de hidrolizado al 2 % (p/v), en 25 mL de agua destilada, se ajustó el pH, a valores de 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 y 6,5 con NaOH 1 N ó HCl 1 N, según el caso. Se agitó durante 30 min. Se centrifugó a 4 000 rpm, durante 15 min. El contenido de proteína de los sobrenadantes se determinó por el método Kjeldahl, que se detalla en el Anexo III.

Se empleó un diseño completamente al azar donde los tratamientos son los diferentes niveles de pH y la variable la solubilidad. Si se determina que la influencia del pH es significativa se aplica la prueba de significación Tukey al 5 %. Los resultados se analizaron estadísticamente para lo cual se utilizó el programa Statgraphics Plus 4.0.

2.4.2 CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA Y ACEITE

Para la capacidad de absorción de agua se determinó por el método propuesto por Naezk (1985). Se preparó una suspensión de 2 g de muestra en 16 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 y 6,5 para agitarlo por 20 min en una centrifuga a 3 000 rpm, durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se invirtieron los tubos por 15 min y, posteriormente, se pesaron.

El porcentaje de la capacidad de absorción de agua fue calculada con la siguiente relación [3]:

$$\% AA = \frac{\text{Peso de tubo hidratado} - \text{Peso de muestra (bs.)}}{\text{Peso de muestra (bs.)}} \times 100 \quad [3]$$

Se empleó un diseño completamente al azar (DCA) donde los tratamientos son los diferentes niveles de pH y la variable el porcentaje de absorción de agua. Si se determina que existe diferencia significativa en los resultados se aplica la prueba de significación de Tukey al 5 %.

La absorción de aceite consistió en preparar seis suspensiones de 2 g de muestra de hidrolizado y 12 mL aceite vegetal comestible. Se agitaron en una plancha magnética por un tiempo de 20 min; al término de los cuales, se centrifugaron a 3 000 rpm, por 15 min. El porcentaje de aceite retenido se determinó a partir de la relación [4]:

$$\% AAc = \frac{\text{Peso del pellet hidratado} - \text{Peso de muestra (base seca)}}{\text{Peso de muestra (base seca)}} \times 100 \quad [4]$$

2.4.3 CAPACIDAD EMULSIONANTE Y ESTABILIDAD DE LA EMULSIÓN

Se empleó el procedimiento descrito por Chau *et al.*, 1997. Se evaluaron dispersiones de hidrolizado al 2 % (p / v), a valores de pH 2, 4, 6, 8 y 10. Se añadió aceite vegetal comestible, gota a gota hasta que se produjo la inversión de la fase de la solución y se homogenizó por 1 min adicional. Las suspensiones se colocaron en tubos graduados. Se centrifugaron a 1 200 rpm, por 5 min, y se determinó el volumen de emulsión.

El porcentaje de actividad emulsificante fue calculada con la relación [5]:

$$AE \% = \frac{\text{Volumen de capa emulsificada}}{\text{Volumen de toda la capa en el tubo}} \times 100 \quad [5]$$

Se empleó un diseño completamente al azar donde el factor es el pH y variable es la actividad emulsificante. Los tratamientos significativos se analizaron

estadísticamente, con una prueba de significación de Tukey al 5 %, para lo cual se utilizó el programa Statgraphics Plus 4.0.

La estabilidad de la emulsión (EE) fue determinada en función del pH a valores de 2, 4, 6, 8 y 10; en 100 mL de una suspensión de hidrolizado al 2 % (p/v). Se homogenizó en una licuadora a 2 000 rpm, por 2 min. Se adicionaron, gota a gota, 100 mL de aceite vegetal comestible y se homogenizó por 1 min adicional. Se calentó a 80 °C, por 30 min, al término del cual se enfrió a temperatura ambiente. Las muestras en tubos graduados se centrifugaron a 1 200 rpm, por 5 min.

La estabilidad emulsificante fue determinada con la relación [6]:

$$EE \% = \frac{\text{Volumen de capa emulsificante remanente}}{\text{Volumen de la emulsion original}} \times 100 \quad [6]$$

2.4.4 CAPACIDAD Y ESTABILIDAD DE ESPUMA

Se siguió el método sugerido por Chau *et al.*, 1977. Se determinaron los efectos de la concentración de hidrolizado al 2, 4, 6, 8 y 10 % (p/v), se llevó a pH 6 la solución. El efecto del pH se determinó a valores de 2, 4, 6, 8 y 10, se ajustó el pH con NaOH 1 N y HCl 1 N, según fue el caso, en suspensiones de proteína al 2 %. La mezcla se trasvasó en probetas de 250 mL y se dejó reposar por 30 s. Se hicieron las lecturas del incremento de volumen.

La estabilidad de espuma se evaluó a tiempos de 5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 min. Se estableció como la disminución de volumen de espuma y líquido drenado,

2.4.5 EFECTO IÓNICO

La fuerza iónica se procedió mediante la adición de cloruro de sodio, a diferentes concentraciones de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5 y 2,0 % (p/v), en suspensiones de proteína al 2,0 %, a pH 6,0.

Se prepararon suspensiones de hidrolizado para cada caso (50 mL), se homogenizaron en una licuadora a 2 000 rpm, durante 5 min. El contenido final se trasvasó a una probeta graduada y se midió el volumen de espuma, después de 30 s. El resultado se expresó como el incremento de volumen en porcentaje, y se calculó mediante la siguiente relación [7]:

$$IV \% = \frac{V_f - V_o}{V_o} \times 100 \quad [7]$$

Donde: IV = Incremento de volumen
 Vf = Volumen después del batido (mL)
 Vo = Volumen antes del batido (mL)

Se empleó un diseño completamente al azar (DCA), donde los tratamientos son los diferentes niveles de concentraciones de NaCl y variable el porcentaje del incremento del volumen. Los tratamientos significativos se analizaron estadísticamente, con una prueba de significación de Tukey al 5 %, para lo cual se utilizó el programa Statgraphics Plus 4.0.

2.4.6 VISCOSIDAD

La viscosidad se determinó mediante el método INEN 1013–1983–4, se utilizó un viscosímetro de Brookfield, con el eje small adapter. Se prepararon suspensiones de al 8, 10, 12, 16, 18 y 20 % (p / v). Además se determinó el efecto de la temperatura en la viscosidad a 20, 30, 40 y 50 °C y del pH a valores de 2, 4, 6, 8 y 10.

Se empleó un diseño completamente al azar donde los tratamientos son los diferentes niveles de pH, concentración y temperatura en cada caso respectivamente y la variable es la viscosidad. Si se determina que la influencia del pH, concentración y temperatura son significativos se aplica la prueba de significancia Tukey al 5 %. Los tratamientos significativos se analizaron estadísticamente, en el programa Statgraphics Plus 4.0.

2.5 ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE BRÓCOLI EN PRESENCIA DEL HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE CHOCHO

El hidrolizado, obtenido por reacción enzimática secuencial se aplicó en plántulas de brócoli (*Brassica oleracea*), a los 14 días de germinación, bajo condiciones de invernadero (70 % HR y 25 °C), en la empresa Pilvic sa.

El diseño experimental consiste en un diseño de bloques completamente al azar, en arreglo factorial (a x b) con 16 repeticiones.

El factor a: los tratamientos a aplicarse fueron:

- a1: El primer grupo de plántulas de brócoli fue el testigo (T), recibieron la fertilización regular consistente en 50 g de la fórmula 10 N – 21 P –10 K por m² y a los 20 días 40 g de nitrato de amonio y 5 g de nitrato de calcio
- a2: El segundo grupo de plántulas recibió la fertilización con hidrolizado de proteína de chocho (H), cada semana se aplicó hidrolizado de proteína de chocho a una concentración de 2 g/L.

El factor b: Tiempo de aplicación

- b1: primera semana (14 días de cultivo)
- b2: segunda semana (21 días de cultivo)
- b3: tercera semana (28 días de cultivo)
- b4: cuarta semana (35 días de cultivo)

Los parámetros fueron la medición de la altura y perímetro del follaje, en cada semana de aplicación, las mismas que fueron tomadas desde el suelo hasta el final de la hoja primaria. Para su aplicación por vía foliar, se utilizó una bomba de mochila con capacidad de 10 L.

En la Figura 24 del Anexo XIX, se muestran las fotografías de la aplicación del hidrolizado de chocho en plántulas de brócoli.

2.5.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño de bloques completamente al azar, donde los datos de altura de plántula y perímetro foliar fueron ingresados para realizar el análisis de varianza (ADEVA) de dos factores (a x b) donde a (tratamientos) y b (semanas), con 16 repeticiones. Además, se realizó una prueba de significancia de Tukey con un nivel de significancia ($\alpha= 5\%$), con la ayuda del programa estadístico Statgraphics Plus 4.0.

2.5.2 ANÁLISIS FOLIAR

El material vegetal son las plántulas de brócoli formado por hojas a los 35 días de cultivo, se recolectan de forma manual luego de eliminar el efecto borde de la parte experimental. El análisis foliar se realizó en el grupo testigo y en el grupo con hidrolizado de proteína de chocho. En la Tabla 7, se presenta las técnicas empleadas para la determinación del análisis foliar. La descripción de los métodos se encuentra en el Anexo IV.

Tabla 7. Técnicas analíticas aplicadas para la determinación del análisis foliar

| Análisis | Métodos |
|------------------|------------------------------------|
| Materia orgánica | Método 967.05, A.O.A.C., 2005 |
| Cenizas | Método 942.05, A.O.A.C., 2005 |
| Nitrógeno | Método de Kjeldahl, A.O.A.C., 2005 |
| Fosforo | Método 957.02, A.O.A.C., 2005 |
| Potasio | Método 958.02, A.O.A.C., 2005 |
| Calcio | Método 965.09, A.O.A.C., 2005 |
| Magnesio | Método 965.09, A.O.A.C., 2005 |
| Hierro | Método 965.09, A.O.A.C., 2005 |
| Manganeso | Método 965.09, A.O.A.C., 2005 |
| Cobre | Método 965.09, A.O.A.C., 2005 |
| Zinc | Método 965.09, A.O.A.C., 2005 |

2.6 ESTUDIO DE LOS FACTORES DE COSTOS

Para analizar el costo de producción del hidrolizado de proteína de chocho frente al precio de venta del fertilizante químico se consideraron los costos de los: materiales directos, materiales indirectos, mano de obra, involucrados en la producción del hidrolizado de proteína de chocho.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 OBTENCIÓN DE AISLADO DE PROTEÍNA DE CHOCHO

El contenido de proteína de la harina integral de chocho fue del 46,59 % y del aislado de 55,52 %. El rendimiento en peso es del 52,73 %, en la Tabla 22 del Anexo V se presentan los datos correspondientes.

En la Tabla 8, se presenta el análisis proximal del aislado de proteína de chocho. Se obtuvo un contenido de proteína fue del 55,52 %, de extracto etéreo del 14,28 %, El contenido de carbohidratos fue del 18,22 % valor que revela el alto contenido debido a que se trabaja a partir de harina cruda o entera de chocho. El valor de proteína se incrementa en el 19,16 %.

Tabla 8. Análisis proximal del aislado de proteína de chocho

| Determinación | Contenido en 100 g de aislado* |
|-------------------|--------------------------------|
| Humedad | 3,83 ± 0,23 |
| Proteína (Nx6.25) | 55,52 ± 0,30 |
| Extracto Etéreo | 14,28 ± 0,08 |
| Cenizas | 4,70 ± 0,07 |
| Fibra Cruda | 3,45 ± 0,18 |
| Carbohidratos | 18,22 ± 0,16 |

$\bar{X} \pm \sigma$; n = 2

* Base seca

La elaboración de aislado de proteína de chocho a partir de harina integral contribuyó a mantener el contenido de fibra en un 3,45 %, debido a que el procesamiento se realizó del grano entero de chocho.

El contenido de cenizas se incrementa a 4,70 %, debido al ajuste del pH que se realiza en la elaboración de aislado proteico posiblemente provoco la formación de sales.

3.2 OBTENCIÓN DEL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE PROTEÍNA DE CHOCHO

3.2.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA

3.2.1.1 Granulometría

Mediante el análisis de granulometría del hidrolizado de la proteína de chocho se determinó que existe un 76,87 % de partículas con un diámetro menor a 300 μm y por lo tanto son una harina fina, debido a que harinas con partículas menores a 212 μm (Sandoval *et al.*, 2005). Mientras el valor del 23,13 % tiene una granulometría mayor a 300 μm . Los datos del perfil granulométrico se presentan en la Tabla 23 del Anexo VI y se visualiza en la Figura 8.

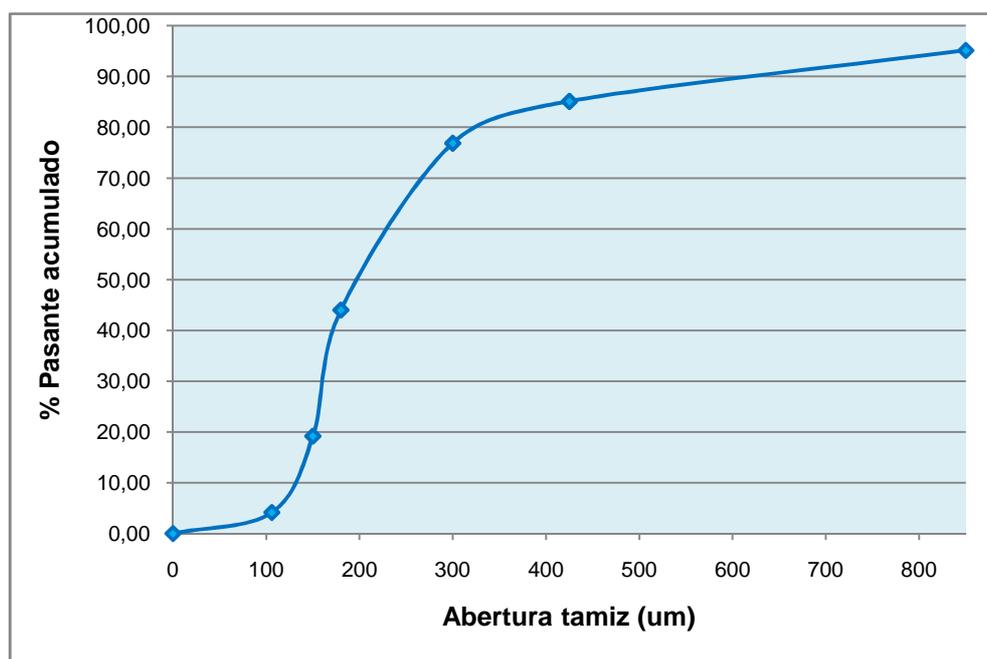


Figura 8. Perfil granulométrico del hidrolizado de proteína de chocho

3.2.1.2 Densidad

El hidrolizado enzimático de proteína de chocho es un polvo muy fino que tiene una densidad aparente de $0,27 \text{ g/cm}^3$ que se encuentran dentro de los valores

desde 0,11 g/cm³ hasta 0,75 g/cm³, parámetros establecidos para un fertilizante con aminoácidos (Castellanos, 1998).

3.2.2 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

3.2.2.1 Grado de hidrólisis

El hidrolizado enzimático de proteína de chocho alcanzó un grado de hidrólisis (GH) del orden del 8,00 % al aplicar la papaína a los 60 min y Flavourzyme a los 90 min obtuvo un grado de 9,95 %, valor que indica que el hidrolizado posee propiedades funcionales apropiadas de la proteína original (Krause *et al.*, 1995; Vioque *et al.*, 2008). En la Figura 9, se puede observar el porcentaje de hidrólisis alcanzado

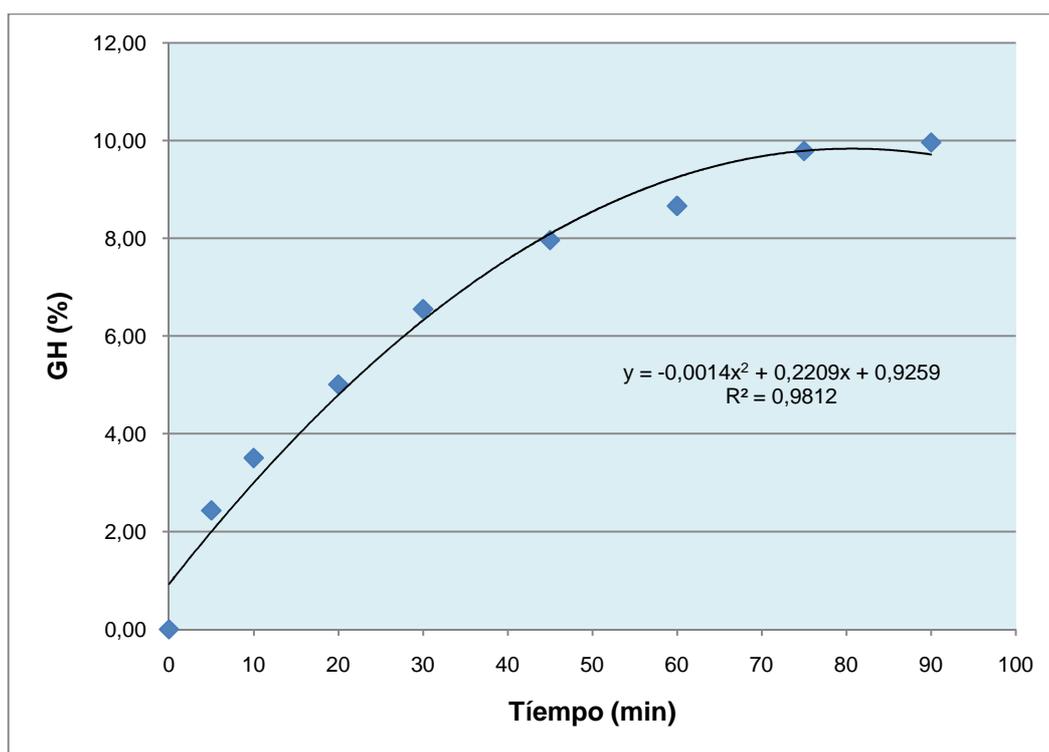


Figura 9. Grado de hidrólisis del hidrolizado de proteína de chocho

3.2.2.2 Análisis proximal

En la Tabla 9, se presentan los resultados del análisis proximal del hidrolizado enzimático de proteína de chocho, con un contenido proteico del 55,58 %. A partir

de estos resultados se puede concluir que el proceso hidrolítico no afectó al contenido de proteína total del hidrolizado, el porcentaje de extracto etéreo se disminuyó, que pudo ser a la influencia que tuvo la temperatura a la que se realizó la hidrolisis.

El contenido alto de cenizas (9,51 %) puede deberse a las sales formadas en las etapas de regulación de pH y neutralización, que se efectuaron para la obtención del aislado y del hidrolizado. El contenido de cenizas se incrementa en un 50,57% respecto al aislado, debido a la formación de sales cloruros.

Tabla 9. Análisis proximal del hidrolizado enzimático de proteína de chocho

| Determinación | Contenido en 100 g de hidrolizado* |
|----------------------|-------------------------------------------|
| Humedad | 2,84 ± 0,13 |
| Proteína (N x 6,25) | 55,58 ± 0,06 |
| Extracto etéreo | 14,00 ± 0,11 |
| Cenizas | 9,51 ± 0,13 |
| Fibra cruda | 2,32 ± 0,08 |
| Carbohidratos | 15,75 ± 0,04 |

$\bar{X} \pm \sigma$; n = 2

* Base seca

El porcentaje de fibra cruda se reduce del 3,45 % en el aislado al 2,32 % en el hidrolizado esto se debe a los diferentes procesos que se realizaron hasta llegar a obtener el hidrolizado.

3.2.2.3 Perfil de aminoácidos

En la Tabla 10, se presenta el perfil de aminoácidos del hidrolizado enzimático secuencial a partir de la harina integral. Se observó que los contenidos registrados en el hidrolizado enzimático de harina integral son menores respecto al hidrolizado de referencia (Villacrés, 2001), debido a la interacción proteína –

grasa que existe en el hidrolizado al utilizar harina integral con un contenido de grasa.

Tabla 10. Contenido de aminoácidos g / 100 gramos de proteína de chocho

| Aminoácido | Contenido en el hidrolizado enzimático en harina integral (g/16 N) | Contenido en el hidrolizado enzimático en harina desengrasada y desamargada (g/16 N)* |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Acido aspartico | 6,25 | 12,00 |
| Treonina | 2,04 | 3,90 |
| Serina | 3,28 | 5,80 |
| Acido glutámico | 15,50 | 23,40 |
| Prolina | 2,17 | 3,90 |
| Glicina | 2,64 | 4,20 |
| Alanina | 2,07 | 3,30 |
| Cisteina | 0,77 | 1,00 |
| Valina | 2,37 | 3,20 |
| Metionina | 0,25 | 0,50 |
| Isoleucina | 2,78 | 5,10 |
| Leucina | 4,03 | 8,50 |
| Tirosina | 2,34 | 4,30 |
| Fenilalanina | 2,47 | 3,30 |
| Histidina | 1,77 | 2,80 |
| Lisina | 3,56 | 5,30 |
| Arginina | 1,91 | 11,00 |
| Triptófano | 0,41 | 0,70 |

* **Fuente:** Villacrés, 2001.

La incorporación de un hidrolizado enzimático obtenido a partir de harina integral de chocho, representa un aporte de ácido glutámico en el orden del 15,50 %, lo que además favorece la síntesis de aminoácidos por qué, el ácido glutámico produce una larga serie de aminoácidos en los que interviene, en el proceso biosintético., incrementa indirectamente la capacidad de la planta para la

absorción amoniacal. De esta manera los mecanismos desintoxicadores de la planta, frente a dicha forma tóxica de nitrógeno (Michetti, 2001).

3.2.2.4 Perfil de péptidos

En la determinación electroforética de los pesos moleculares del hidrolizado de proteína de chocho se evidenció la presencia de bandas correspondientes a proteínas con pesos moleculares que varían entre 14 y 250 Da. Es un material con bajo peso molecular, lo que contribuye a penetrar en forma más rápida que aquellos con alto peso molecular (Haile, 1965; Kannan, 1969).

3.2.3 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DEL HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE CHOCHO

3.2.3.1 Solubilidad

Esta propiedad funcional se ve influenciada por la acción catalítica secuencial de las enzimas, que permiten disminuir el tamaño molecular de las proteínas y exponer los grupos amino y carboxilo ionizables, lo que posibilita la unión de moléculas de agua a la estructura proteica (Kester y Richardson, 1984; Chobert *et al.*, 1989; Turgeon, 1992).

En la Figura 10, se presentan los valores de solubilidad para el hidrolizado de proteína de chocho en el intervalo de pH de 3,00 a 7,00. El análisis de varianza ADEVA resultó altamente significativo para los 7 tratamientos en la variable solubilidad, como se indica en la Tabla 24 del Anexo VII. Según la prueba de Tukey ($\alpha = 5\%$) se determinó que la mayor solubilidad cuando se tiene pH 7^a. Los datos experimentales se presentan en la Tabla 25 del Anexo VII,

El valor más bajo de solubilidad fue del 62,18 % en el pH cercano al punto isoeléctrico de la proteína de chocho a pH 5^f, lo que determina su capacidad para disolverse en agua, muy útil en la preparación de un fertilizante (Agrex, 2008).

La solubilidad está relacionado con el balance de elementos hidrofóbicos e hidrofílicos debido a que poseen más residuos de aminoácidos polares y a su vez incrementan la hidrofobicidad (Sathivel *et al.*, 2005).

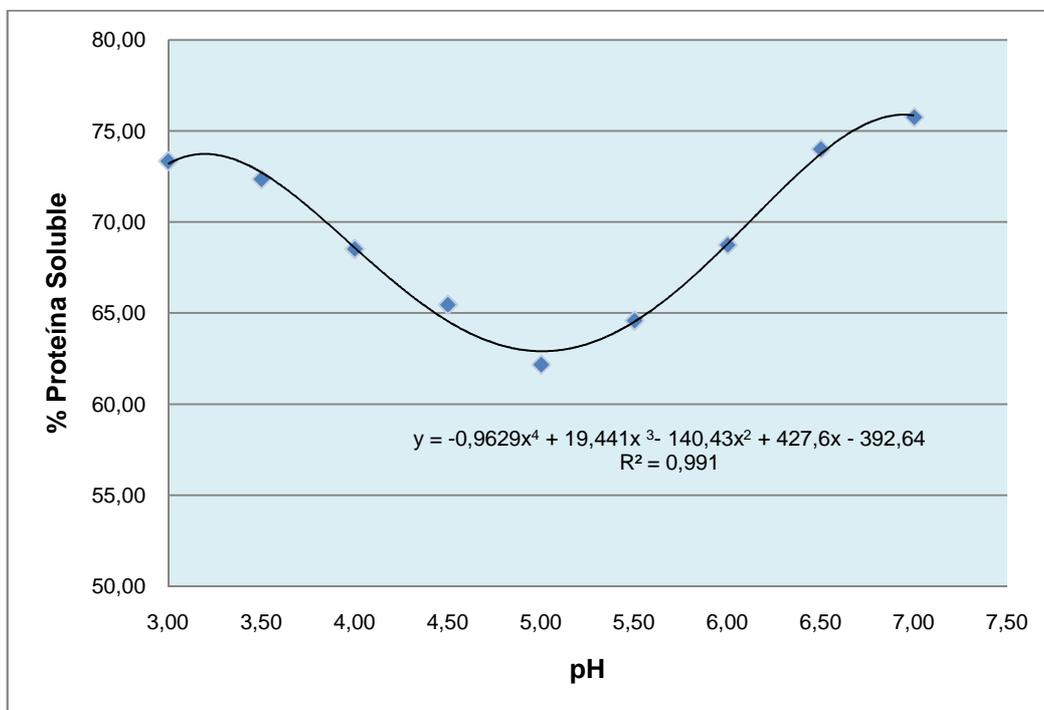


Figura 10. Perfil de solubilidad del hidrolizado enzimático de proteína de chocho

3.2.3.2 Capacidad de absorción de agua

Las variaciones de pH al modificar la ionización y carga neta de la molécula proteica, alteran las fuerzas atractivas y repulsivas entre proteínas y la capacidad de estas últimas para asociarse con el agua.

El ADEVA muestra diferencia significativa en el porcentaje de absorción de agua del hidrolizado a los pHs analizados, como se muestra en la Tabla 26 del Anexo VIII. Según la prueba de Tukey se determinó que los mayores porcentajes de absorción de agua se presenta a los siguientes pHs: 5^a, 5,5^b, como se indica en la Tabla 27 del Anexo VIII.

En la Figura 11, se presenta los valores de absorción de agua registrados en el hidrolizado. Se observa que la absorción máxima de agua (50,60 %), se tiene a

un pH 5 debido a que existe un equilibrio de cargas en los pHs cercanos al punto isoeléctrico. En el punto isoeléctrico, las interacciones proteína – proteína son máximas, las proteínas asociadas y replegadas sobre ellas mismas manifiestan el máximo de hidratación e hinchamiento. A pH 7,00 se presenta un valor de 0,78 g de agua/ g de proteína, el cual es 46 % menor que la capacidad de absorción a pH 3,50 debido a la interacción proteína – lípidos (14,50 %), donde se exponen más a los sitios polares para una interacción con el agua y los lípidos presentes en el hidrolizado (Wilmont y Wijeratne, 2005; Cheftel *et al.*, 1989).

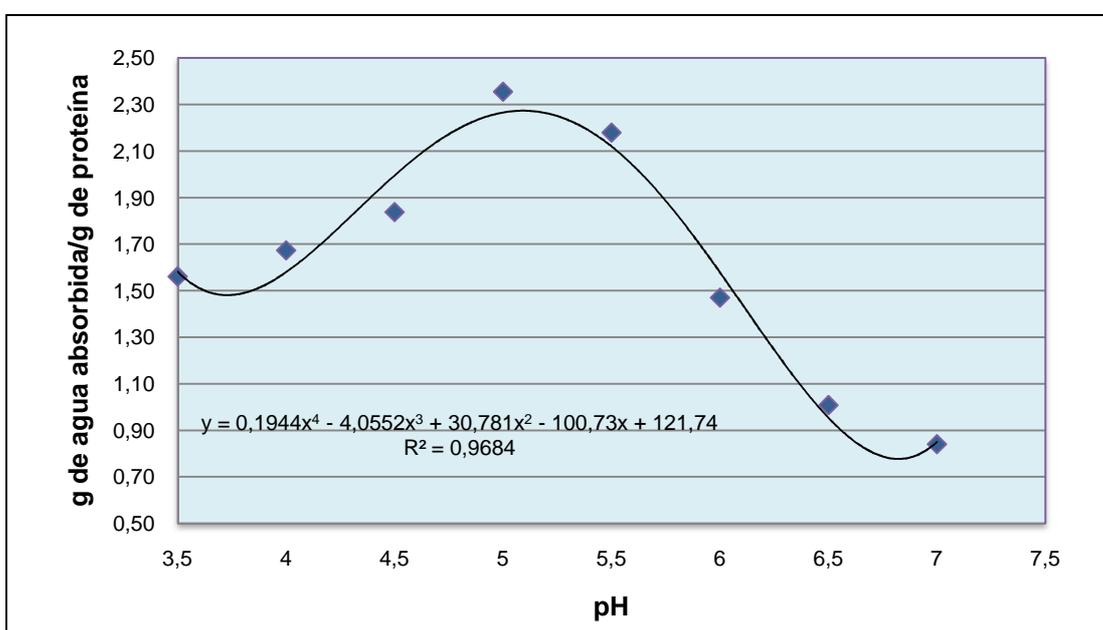


Figura 11. Capacidad de absorción de agua a diferentes rangos de pH del hidrolizado

La máxima absorción de agua que presenta el hidrolizado a pH 5,00 es de 2,35 g de agua absorbida / g de proteína, mientras que a pH 7,00 es de 0,83 g de agua absorbida / g de proteína, esto puede provocar que una parte de las partículas se disuelvan a pH 7,00 porque existe una mayor solubilidad del fertilizante (Torres, 2007).

3.2.3.3 Absorción de aceite

El hidrolizado proteico presentó una capacidad máxima al alcanzar el equilibrio de 1,72 g aceite absorbido / g proteína, a los 20 min de exposición. La baja

capacidad de absorción de aceite del hidrolizado, respecto al valor reportado por Villacrés (2001), puede deberse a los cambios en la conformación, provocados por la hidrólisis, que incrementan la exposición de grupos polares, que potencian mayores características hidrofílicas, antes que las lipofílicas.

3.2.3.4 Capacidad de formación emulsión

El ADEVA muestra diferencia significativa en el porcentaje de estabilidad de espuma del hidrolizado a los pHs analizados, como se muestra en la Tabla 28 del Anexo IX. Según la prueba de Tukey se determinó que el mayor porcentaje de formación de emulsión se presentó a los siguientes pHs: 10^a, 8^a, 6^a como se indica en la Tabla 29 del Anexo IX.

En la Figura 12, se presenta el efecto del pH sobre la estabilidad de la emulsión del hidrolizado expresados en mL de aceite separado por gramo de proteína, se obtiene un valor máximo de 49,40 % de estabilidad de emulsión a pH 6,00, a partir de este se mantienen relativamente constantes, debido a la facultad de reducir las tensiones interfaciales entre componentes hidrofóbicos e hidrofílicos.

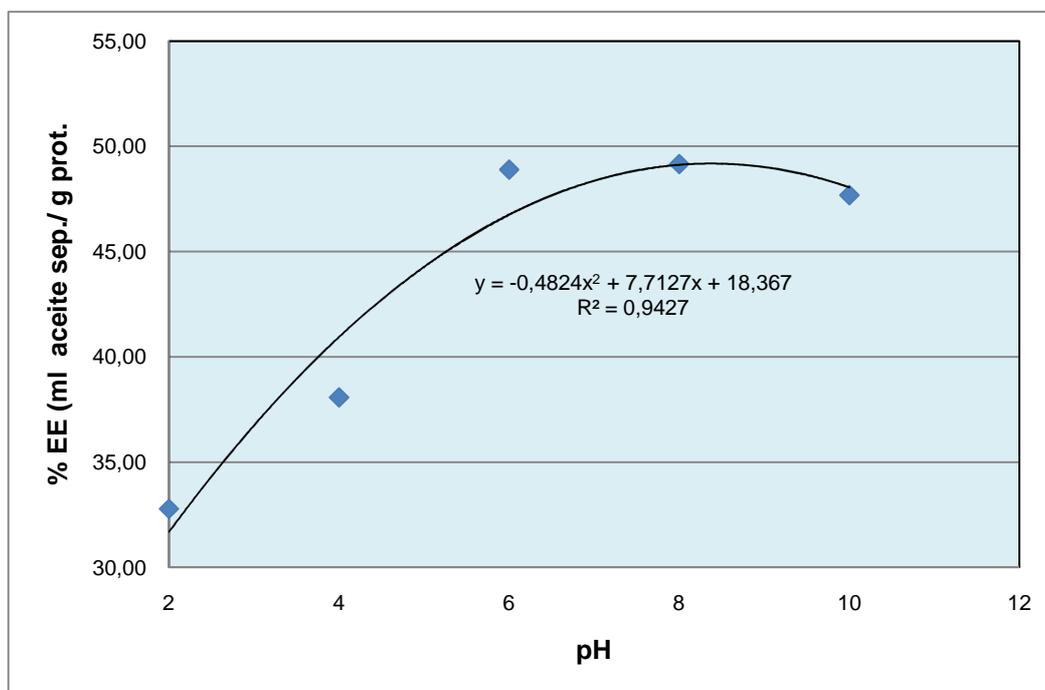


Figura 12. Efecto del pH sobre la capacidad de formación de la emulsión del hidrolizado

3.2.3.5 Estabilidad de emulsificación

Influencia de la concentración del hidrolizado de proteína de chocho

Los datos experimentales obtenidos se analizaron estadísticamente ADEVA muestra que existe diferencia significativa en el efecto de la concentración de proteína sobre la capacidad de formación de la emulsión como se indica en la Tabla 30 del Anexo IX. Con la prueba de Tukey ($\alpha = 5\%$) se determinó que existió una mayor capacidad de estabilidad de emulsión a un porcentaje de concentración (p/v): 10^a % como se indica en la Tabla 31 del Anexo IX.

La región hidrofóbica (lipofílica) de la molécula se asocia con la fase aceitosa mientras que la región hidrofílica permanece asociada con la fase acuosa incrementándose exponencialmente al aumentar la concentración del hidrolizado de proteína de chocho. El aumento de las propiedades emulsificantes podría deberse al aumento de grupos amino libres, como lo explican Zakaria y McFeeters (1978) al modificar las proteína con una mezcla secuencial de enzimas como se puede observar en la Figura 13.

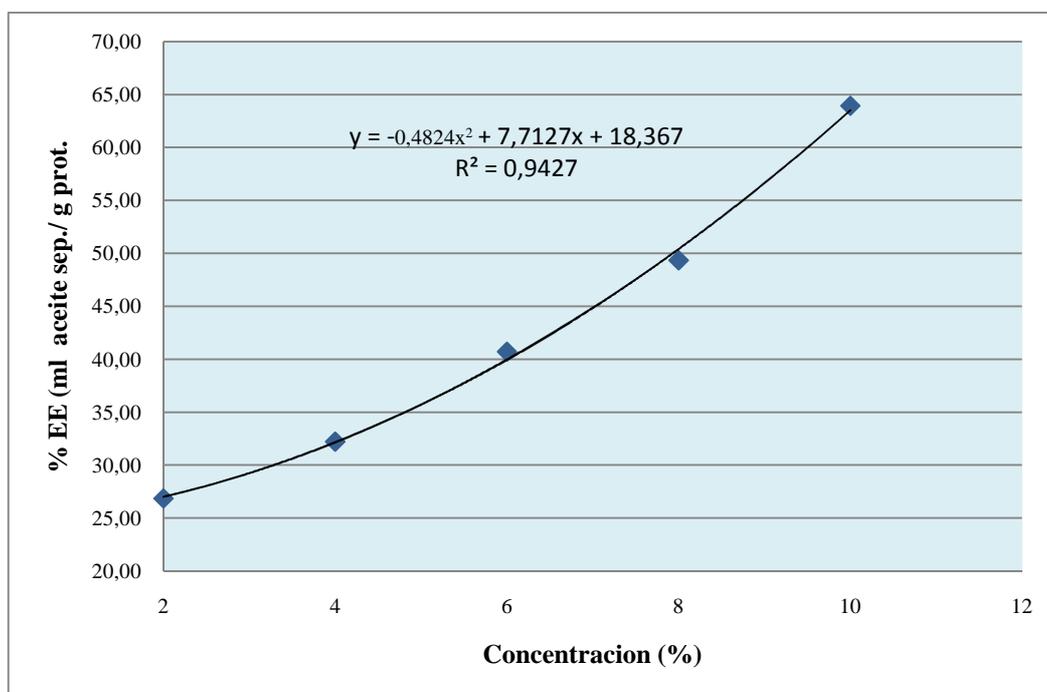


Figura 13. Efecto de la concentración de proteína sobre la capacidad de formación de la emulsión

Influencia del pH

El ADEVA muestra diferencia significativa en el porcentaje de estabilidad de emulsión del hidrolizado a los pHs analizados como se muestra en la Tabla 32 del Anexo IX. Según la prueba de Tukey se determinó que el mayor porcentaje de formación de emulsión se presentó a los siguientes pHs: 4^a, 6^b como se indica en la Tabla 33 del Anexo IX.

Esta propiedad está ligada a la solubilidad de la proteína con el agua. En la Figura 14, se presenta la estabilidad de la emulsión. A una concentración 2 % y pH 2.00 se tiene un valor de 43,52 % el cual es el valor más bajo. Al respecto Linden y Lorient, (1996) indican que a pH ácidos no favorecen la estabilidad de la emulsión. A pH 4, se observó la mayor estabilidad debido a la presencia de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. La cohesividad de la película de proteína tiende a ser máxima cerca del punto isoeléctrico. Las películas cohesivas tienden a ser más estables. La repulsión de cargas de las partículas de la emulsión es mínima cercanos al punto Isoeléctrico, resulto una disminución en la estabilidad a partir de este pH (Kinsella, 1978).

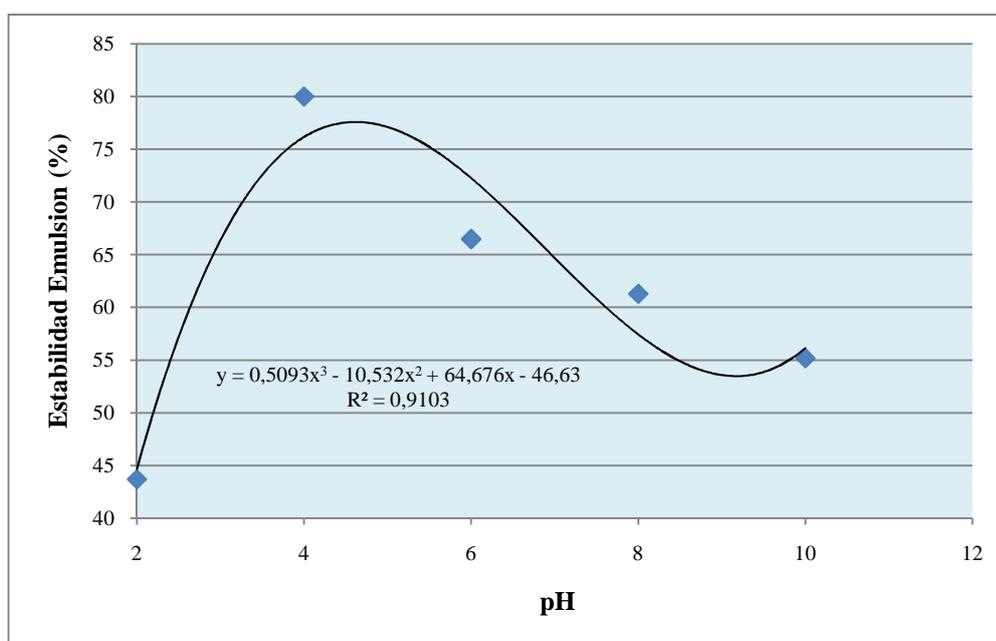


Figura 14. Efecto del pH sobre la estabilidad de la emulsión del hidrolizado proteico de chocho

3.2.3.6 Capacidad de formación y estabilidad de espuma

El análisis de varianza ADEVA muestra que existió diferencia significativa en la capacidad de formación de espuma del hidrolizado a los diferentes niveles de concentraciones. como se indica en la Tabla 34 del Anexo X. Con la prueba de Tukey ($\alpha = 5 \%$), se determinó que existió una mayor capacidad de formación de espuma a las siguientes concentraciones (p/v): 10^a, 8^a, 6^b, como se indica en la Tabla 35 del Anexo X.

En las espumas formadas se determinó que las más estables fueron a concentraciones de hidrolizado de proteína de chocho del 8 y 10 %, estas permanecen estables hasta un tiempo superior a los 120 min, pero a este mismo tiempo todas las espumas formadas a partir de hidrolizado colapsan totalmente, debido a que los péptidos no disminuyen la tensión interfacial aire – agua de las películas formadas por la proteína adsorbida. La estabilidad es mínima porque las películas de la interface son finas.

El máximo incremento en el volumen de espuma fue del 31,20 %, se obtuvo cuando la concentración de proteína fue del 10 % (p/v), lo cual posiblemente, originó favorable estabilidad. Para una estabilidad satisfactoria de la espuma, exige características de la proteína algo diferentes de las requeridas para la formación de espuma (Cheftel *et al*, 1989).

La evolución del incremento de volumen de la espuma en función de la concentración del hidrolizado se indica en la Figura 15. Y a la vez el decremento que presenta el porcentaje de espuma en función del tiempo

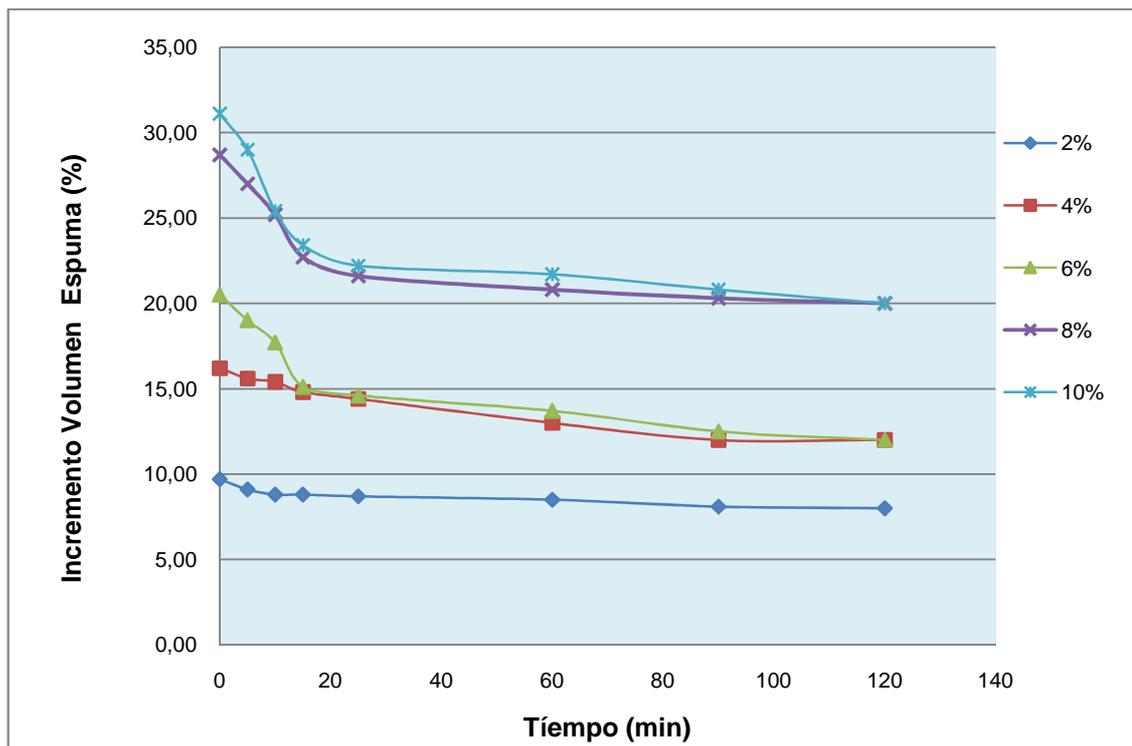


Figura 15. Efecto de la concentración sobre la estabilidad de la espuma del hidrolizado proteico de chocho

3.2.3.7 Efecto iónico

Los datos experimentales obtenidos se analizaron estadísticamente ADEVA muestra que existió diferencia significativa en el efecto de la concentración del NaCl sobre la capacidad de formación de hidrolizado de proteína de choco. como se indica en la Tabla 36 del Anexo XI. La prueba de Tukey ($\alpha = 5\%$) determinó que existe una mayor capacidad de formación de espuma con una concentración de NaCl del 0,8^a (p/v), como se indica en la Tabla 37 del Anexo XI.

En la Figura 16, se observa un incremento en la fuerza iónica causada por la adición de cloruro de sodio, el cual tuvo un efecto positivo sobre la capacidad espumante, hasta la concentración del 0,60 %, niveles mayores a este valor afectaron negativamente esta propiedad funcional. Sánchez y Burgos, (1997) sugieren que la solubilidad y el desdoblamiento de la proteína aumentan simultáneamente en presencia de sal. Los iones Na^+ y Cl^- anulan las atracciones electrostáticas, impiden la agregación y precipitación entre las especies proteicas

y favorecen la formación de espumas, hasta una concentración de cloruro de sodio al 0,80 %, esto se debe a que los iones Na^+ forman uniones entre los grupos carboxílicos de la proteína, al proporcionar mayor resistencia y elasticidad en las películas de proteína adsorbida (Cheftel *et al*, 1989).

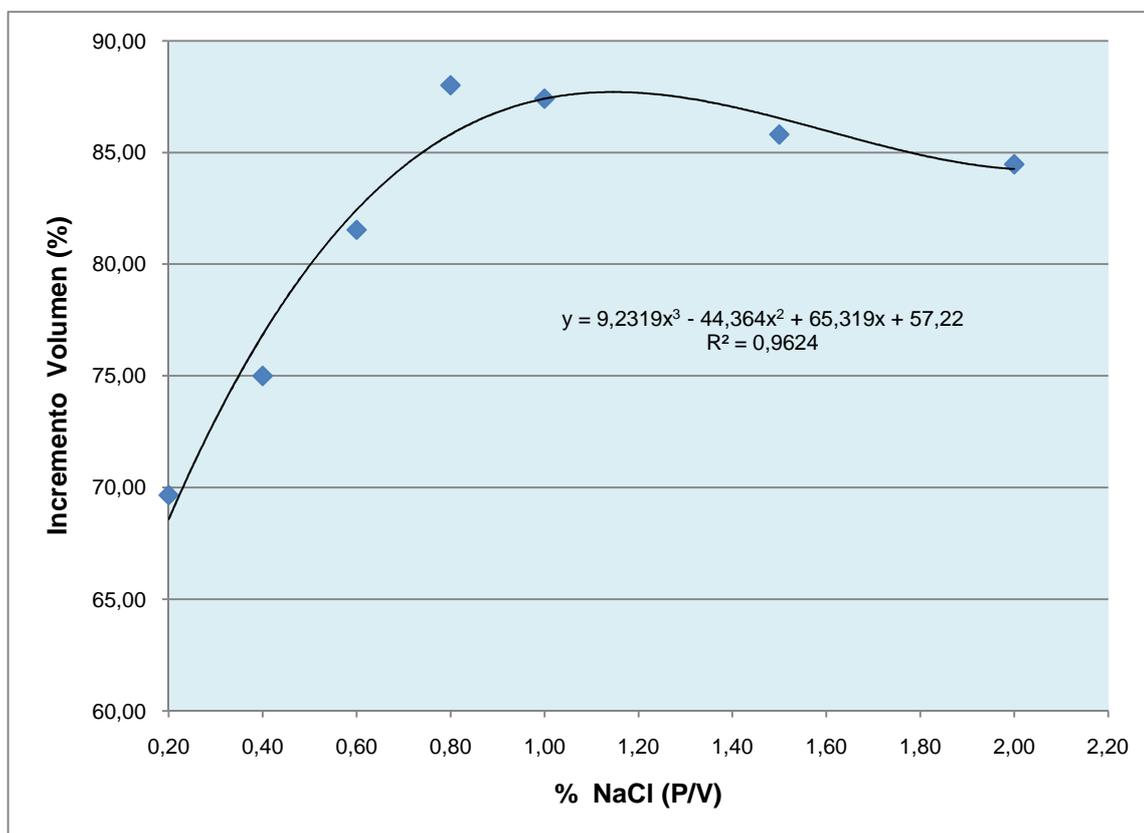


Figura 16. Efecto del NaCl sobre la capacidad de formación de la espuma del hidrolizado proteico de chocho.

3.2.3.8 Viscosidad

Influencia de la concentración

Los datos experimentales obtenidos se analizaron estadísticamente ADEVA muestra que existió diferencia significativa en la influencia de la concentración de hidrolizado de proteína de chocho sobre la viscosidad, como se indica en la Tabla 38 del Anexo XII. Con la prueba de Tukey ($\alpha = 5\%$), se determinó que existió mayor viscosidad a los siguientes porcentajes de concentración: 20^a, 18^b, como se indica en la Tabla 39 del Anexo XII.

En la Figura 17, se muestra la tendencia exponencial de la viscosidad en función de la concentración del hidrolizado, esta propiedad se debe a que el desdoblamiento de las moléculas proteicas por efecto de la hidrólisis, aumenta la exposición de los grupos reactivos, en especial de los grupos hidrófobos de las proteínas globulares (Nakai, 1983). Además la masa molecular elevada a causa de las interacciones proteína – proteína y un fuerte porcentaje de aminoácidos hidrófobos favorecen la formación de redes compactas, incrementan el coeficiente de viscosidad de las dispersiones proteicas. Según Harper y Hall (1976) indican que hay un incremento en la viscosidad, con el aumento de sólidos como grasa y carbohidratos

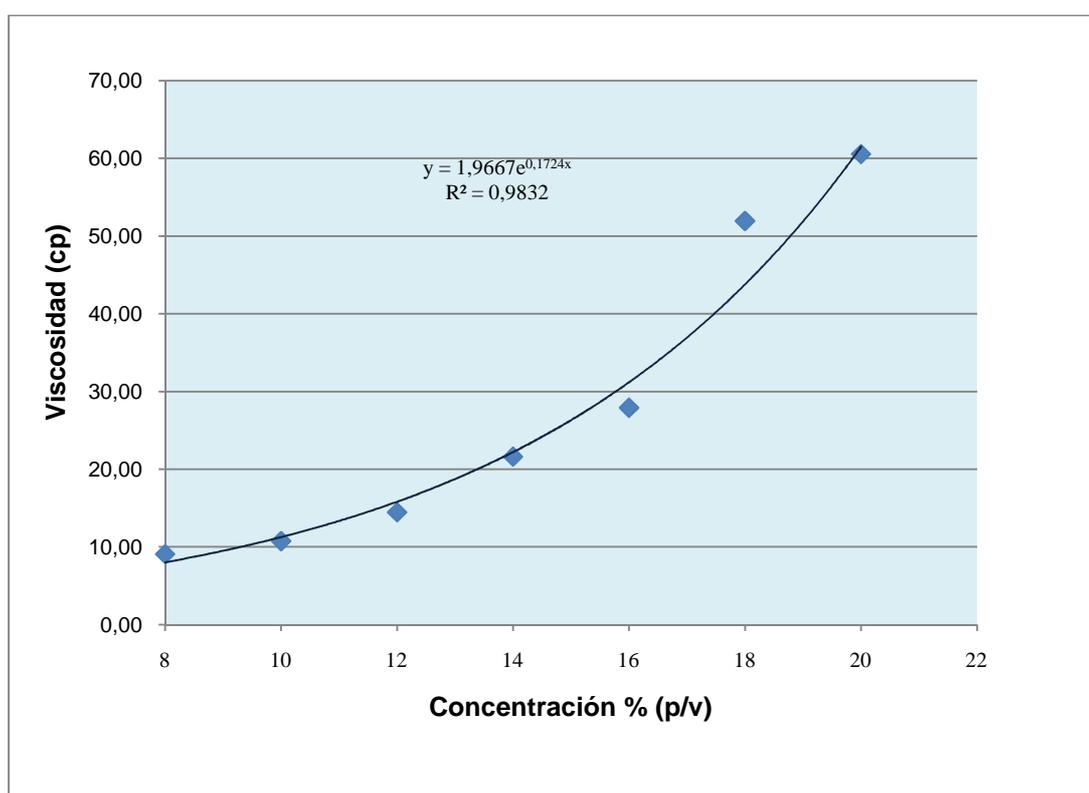


Figura 17. Influencia de la concentración en la viscosidad del hidrolizado de proteína de chocho

Influencia de la temperatura

El análisis de varianza ADEVA muestra que existió diferencia significativa en la influencia de la temperatura sobre la viscosidad del hidrolizado de proteína de

chocho, como se indica en la Tabla 40 del Anexo XII. Con la prueba de Tukey ($\alpha = 5\%$) se determinó que existió mayor viscosidad a las temperaturas: 50^{a} °C y 40^{b} °C, como se indica en la Tabla 41 del Anexo XII.

Se puede observar en la Figura 18, que los valores de la viscosidad del hidrolizado es inversamente proporcional al incremento de la temperatura a diferentes temperaturas, los valores determinados decrecen la viscosidad del 60,41 % a 50 °C con respecto a los 20 °C. Los valores bajos de viscosidad se deben a que las proteínas son sensibles a la temperatura y a una desnaturalización irreversible (Stading *et al.*, 1990).

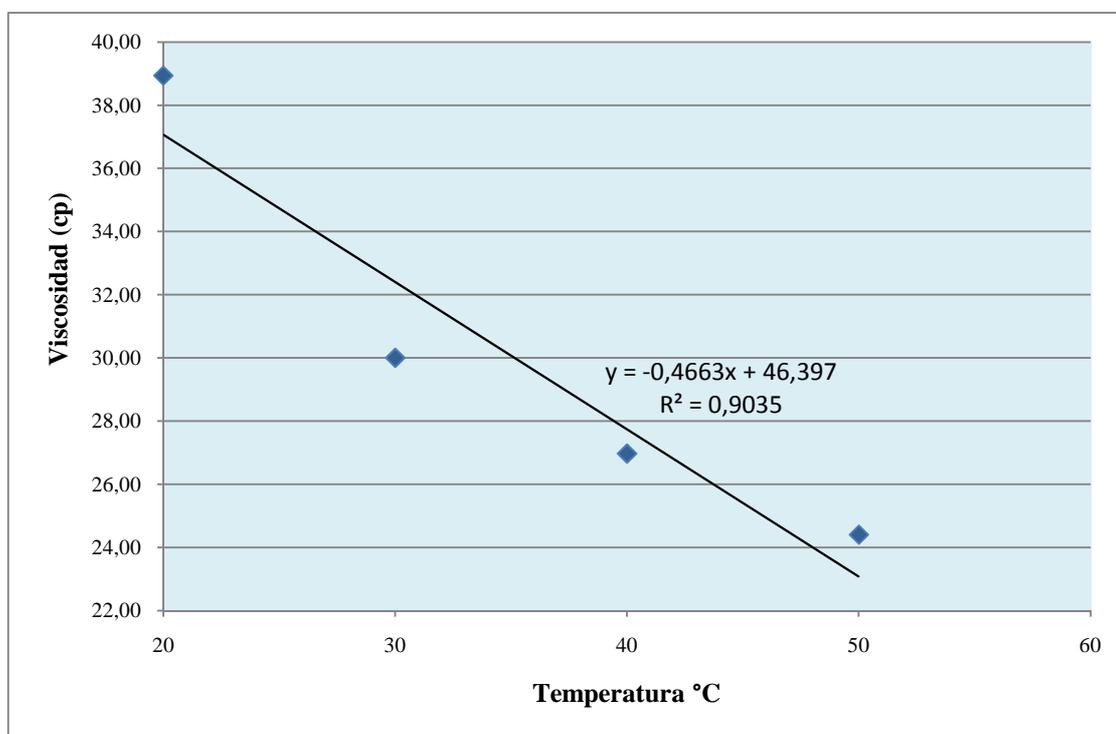


Figura 18. Influencia de la temperatura en la viscosidad del hidrolizado proteico de chocho

Influencia del pH

El ADEVA mostró diferencia significativa en la viscosidad a los pHs analizados como se muestra en la Tabla 42 del Anexo XII. Con la prueba de Tukey se determinó que la mayor viscosidad se presenta a los siguientes pHs: 10^{a} y 2^{b} como se indica en la Tabla 43 del Anexo XII.

En la Figura 19, se presenta la influencia del pH en la viscosidad del hidrolizado de chocho encontrándose el valor de 5,25 cp a pH 4,00 debido a la ausencia de fuerzas repulsivas, lo que conducen a la formación de un gel menos expandido, con baja capacidad hidratante y por lo tanto menos consistente (Kim *et al*, 1990).

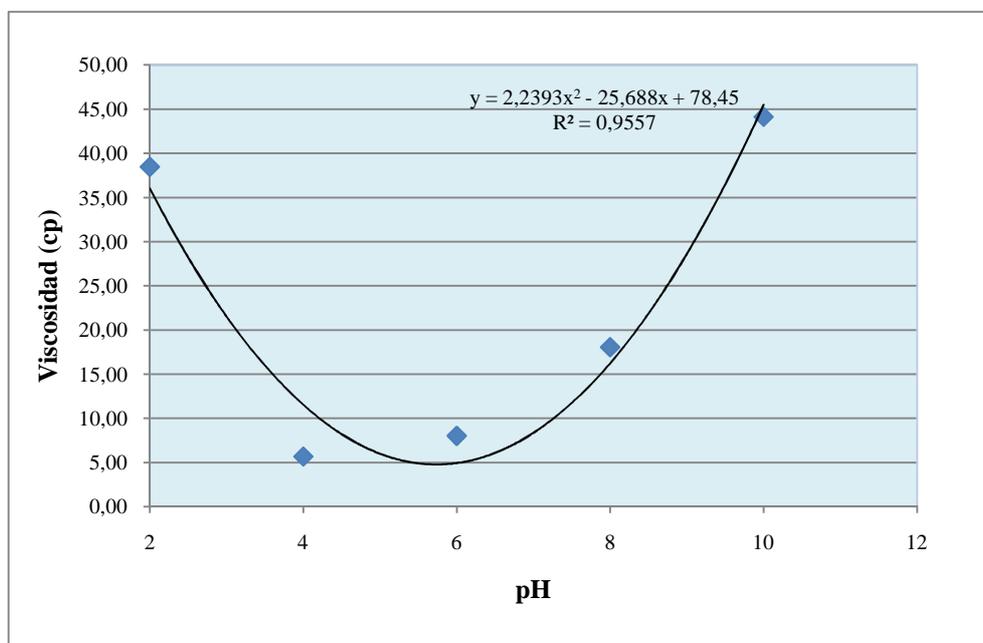


Figura 19. Viscosidad del hidrolizado proteico de chocho a diferentes rangos de pH.

A valores inferiores y mayores de un pH 5,74, la viscosidad se incrementó debido a la concentración de ácidos grasos y carbohidratos presentes en el hidrolizado.

3.3 ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE BRÓCOLI EN PRESENCIA DEL HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE CHOCHO

3.3.1 APLICACIÓN DEL HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE CHOCHO COMO FERTILIZANTE FOLIAR

Los resultados del análisis químico foliar al aplicar hidrolizado enzimático se indican en la Tabla 11. Se destaca el material orgánico (M.O.) con un 90,49 % y el contenido de nitrógeno total es 8,88 %. Estos valores indican el fraccionamiento

de la proteína en aminoácidos y péptidos y que contienen además de nitrógeno, carbono, ácidos grasos.

Es un fertilizante nutricionalmente completo contiene N, P, K y hasta Ca con un valor del 0,33 % y magnesio 0,07 %.

Tabla 11. Análisis foliar con la aplicación del hidrolizado enzimático de la proteína de chocho

| Parámetro | Concentración |
|------------------|----------------------|
| Cenizas (%) | 0,10 |
| M.O. (%) | 90,49 |
| N.T. (%) | 8,88 |
| P (%) | 0,69 |
| K (%) | 0,80 |
| Ca (%) | 0,33 |
| Mg (%) | 0,07 |
| Fe (ppm) | 135,00 |
| Mn (ppm) | 20,50 |
| Cu (ppm) | < 50,00 |
| Zn (ppm) | 48,50 |

Los nutrientes son fácilmente absorbidos por los tejidos de las hojas porque se encuentran en forma de L-aminoácidos para que sean absorbidos directamente y no como en los fertilizantes inorgánicos donde el nitrógeno tiene que ser transformado primero en una forma asimilable por las plantas.

3.3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA RESPUESTA A LA APLICACIÓN DEL HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE CHOCHO

Los datos experimentales obtenidos a las 4 semanas de duración del ensayo se indican en la Tabla 44 del Anexo XIII

3.3.2.1 Altura de las plántulas

La altura promedio de las plántulas de brócoli en el tiempo de aplicación varía de 1,60 a 7,90 cm. El análisis de varianza ADEVA indicó que no existen diferencias significativas para la variable altura entre el testigo y el tratamiento con hidrolizado de chocho, como se observa en la Tabla 12.

Tabla 12. Análisis de varianza ADEVA para la variable altura

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Diferencia de cuadrados | Relación F | Valor P |
|----------------------|-------------------|--------------------|-------------------------|------------|---------|
| Tiempo de aplicación | 764,11 | 3 | 254,70 | 1096,20 | 0 |
| Tratamiento | 0,01 | 1 | 0,01 | 0,07 | 0,80 |
| Repeticiones | 4,64 | 15 | 0,31 | 1,33 | 0,20 |
| Residual | 25,10 | 108 | 0,23 | | |
| Total corregido | 793,86 | 127 | | | |

3.3.2.2 Diámetro del follaje

El análisis ADEVA indica que existió existen diferencias significativas en el diámetro foliar de las plántulas de brócoli para las semanas bajo tratamiento como se observa en la Tabla 13.

Donde el valor p es 0,00 existió significancia entre el tratamiento testigo con fertilización regular y el tratamiento al que se le adicionó hidrolizado de proteína de chocho a la fertilización regular.

Tabla 13. Análisis de la varianza ADEVA para la variable diámetro de follaje

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Diferencia de cuadrados | Relación F | Valor P |
|----------------------|-------------------|--------------------|-------------------------|------------|---------|
| Tiempo de aplicación | 122,42 | 3 | 40,80 | 233,52 | 0 |
| Tratamiento | 1,83 | 1 | 1,83 | 10,47 | 0,00 |
| Repeticiones | 10,08 | 15 | 0,67 | 3,84 | 0 |
| Residual | 18,87 | 108 | 0,17 | | |
| Total corregido | 153,20 | 127 | | | |

Si los tratamientos son significativos aplicó la prueba de Tukey al 5 % indicó que el tratamiento con hidrolizado de chocho provocó un aumento en el diámetro de 3,16^a cm planta frente al testigo 2,92^b cm, como se observa en la Tabla 14.

Tabla 14. Prueba de tukey al 5 % para la variable diámetro foliar

| Tratamiento | Media | Grupos Homogéneos |
|-------------|-------|-------------------|
| 1 | 3,16 | A |
| 2 | 2,92 | B |

Letras diferentes por columna indican diferencia significativa (Tukey 5%)

En la Figura 20, se indica los resultados estadísticos del incremento del diámetro foliar de las plántulas de brócoli desde 1,70^d cm hasta 4,30^a cm.

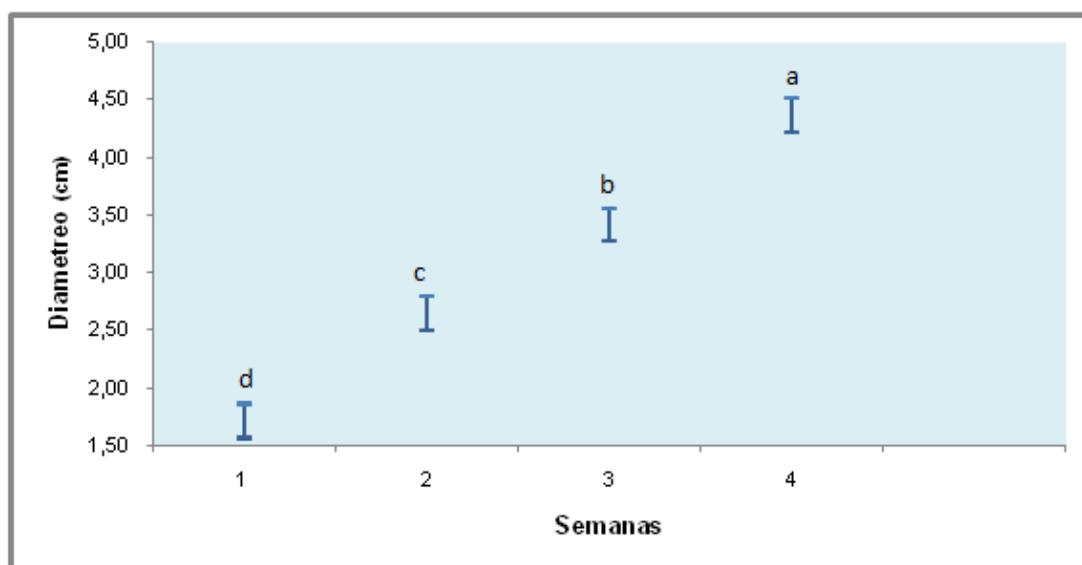


Figura 20. Variación del diámetro de las plántulas de brócoli en función del tiempo.

3.3.3 ANÁLISIS QUÍMICO FOLIAR EN EL MATERIAL VEGETAL

Los resultados del análisis químico foliar en las hojas de plántulas de brócoli se indican en la Tabla 15, en los cuales se encontró identificados los macro y micro nutrientes. Los valores coinciden con el comportamiento expuesto por Alarcón (2000), que menciona que la adición de aminoácidos mejora la absorción de

microelementos por la planta debido a su acción complejante y dan como resultado de una mejor traslocación de fertilizantes y productos fitosanitarios.

Al adicionar aminoácidos se obtuvo una mayor producción de raíces dentro del cono de las charolas, lo que da como resultado una mejor calidad de planta.

Tabla 15. Análisis foliar del brócoli con aplicación del hidrolizado enzimático de la proteína de chocho

| | Con fertilización regular* | Con Hidrolizado de chocho |
|-------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Cenizas (%) | 0,11 | 0,14 |
| M.O. (%) | 88,97 | 86,49 |
| N.T. (%) | 1,99 | 2,03 |
| P (%) | 0,32 | 0,39 |
| K (%) | 2,00 | 2,25 |
| Ca (%) | 0,81 | 0,88 |
| Mg (%) | 0,31 | 0,34 |
| Fe (ppm) | 584,70 | 734,50 |
| Mn (ppm) | 96,22 | 141,45 |
| Cu (ppm) | 5,50 | 27,47 |
| Zn (ppm) | 165,43 | 231,01 |

Fuente: * Pilvicsa, 2010

El análisis foliar del brócoli tratado con hidrolizado y el testigo determinó que:

Nitrógeno: en el presente estudio, la concentración total de nitrógeno en el tejido foliar del grupo testigo presentó porcentaje un porcentaje similar al grupo de control 2,03 y 2,00 %. Y el contenido nutricional en el brócoli es variable y depende de las condiciones ambientales en las que se desarrolla la planta, la edad de la misma y manejo del cultivo

Fósforo: la concentración de fósforo en el tejido foliar fue del 0,32 % al inicio del ensayo y aumentó a un valor del 0,39 %; el rango de concentración del nutriente varía entre 0,45 y 0,80 % Castellanos (1998); por lo tanto el contenido de P fue menor a los requerimientos. El P es un constituyente de ácidos nucleicos, fosfolípidos, fosfoproteínas, dinucleótidos y adenosina trifosfato. De ahí que es requerido para diferentes procesos, incluye el almacenamiento y transferencia de energía, la fotosíntesis, la regulación de enzimas y el transporte de carbohidratos (Hu y Schmidhalter, 2005).

Potasio: la concentración de potasio del grupo testigo fue del 2,00 %; mientras que en el grupo H incrementó al 2,05 %. La concentración ideal de K^+ en el tejido foliar se ubica en el rango de 3,50 – 6,00 % (Castellanos, 1998). De acuerdo a los presentes resultados, se presentaría una deficiencia marcada en la concentración de este elemento en el tejido foliar. El potasio es un elemento esencial para la síntesis de proteínas, enzimas glicolíticas y fotosíntesis, un potencial osmótico durante la expansión celular y turgor; también es un competidor de Na^+ bajo condiciones salinas (Marschner, 2002).

Calcio: en brócoli, la concentración de calcio en tejido foliar fue del 0,81 % en el grupo T y un valor del 0,88 % en el grupo H e indicó que existió un incremento del 8,00 entre grupos. Los valores registrados están ligeramente por debajo del rango de suficiencia (1,90 – 6,00 %) determinado por Marambio (2004). El Ca^{2+} desempeña un papel esencial en la integridad estructural y funcional de las membranas de las plantas, estabilidad de la pared celular, regulación de transporte de iones y permeabilidad de membranas, control del intercambio iónico, así como la actividad enzimática de la pared celular (Rengel, 1992; Marschner, 2002).

Magnesio: la concentración de magnesio en tejido foliar de brócoli en el testigo es del 0,31 %; mientras que del hidrolizado presentó un valor del 0,34 %; Estos presentes valores se ubicaron dentro de los rangos óptimos de suficiencia (0,25 – 0,50 %) (Castellanos, 1998).

Hierro: la concentración de hierro en el tejido foliar del grupo H aumentó en un 25,62 %, con respecto al testigo, desde 584,70 ppm hasta 734,50 ppm. Los requerimientos óptimos de Fe por la plántula son de 300 ppm – 700 ppm, que proporcionan una alta afinidad de Fe para formar complejos con varios ligandos (Kyrkby E. y Römheld V., 2007; Castellanos, 1998).

Manganeso: el rango óptimo de concentración de Mn fue de un valor de 40 ppm hasta 200 ppm, los valores se encontraron dentro de los rangos requeridos por la plántula de brócoli. Mientras entre grupos existió un incremento del 47,11% con respecto al testigo (Castellanos, 1998).

Además, el Mn desempeña un importante papel en los procesos de redox, tales como en el transporte de electrones en la fotosíntesis este incremento permite que exista un incremento en la capacidad fotosintética de la planta (Kyrkby E. y Römheld V., 2007).

Cobre: la concentración de cobre en el brócoli se incrementó de 5,50 ppm a 27,47 ppm con la aplicación del hidrolizado de proteína de chocho a partir de aislado. El Cu cumplen con los requerimientos de la planta se encontró entre un rango óptimo desde 8 ppm hasta 30 ppm. El Cu desempeña un papel fundamental en procesos tales como la fotosíntesis, respiración, desintoxicación de radicales superóxido y lignificación (Kirkby, E. y Römheld, V. 2007; Castellanos, 1998).

Zinc: la concentración de Zn en el tejido foliar del grupo H se incrementó en un 39,63 % con respecto al grupo testigo, desde 165,43 ppm hasta 231,01 ppm. Los requerimientos de Zn por la planta se encuentran en un rango de 150 – 250 ppm (Castellanos, 1998).

El Cu, Fe, Zn y Mn son nutrientes de movimiento limitado dentro de la planta y se distribuyen principalmente en forma de acrópeta dentro de la hoja sin una translocación considerable. Por lo tanto los micronutrientes permanecen en la

hoja y generan un aumento en el diámetro foliar de brócoli cuando se aplica el hidrolizado de proteína de chocho (Melgar, 2005)

3.4 ANÁLISIS DE COSTOS DE LA ELABORACIÓN DEL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE PROTEÍNA DE CHOCHO

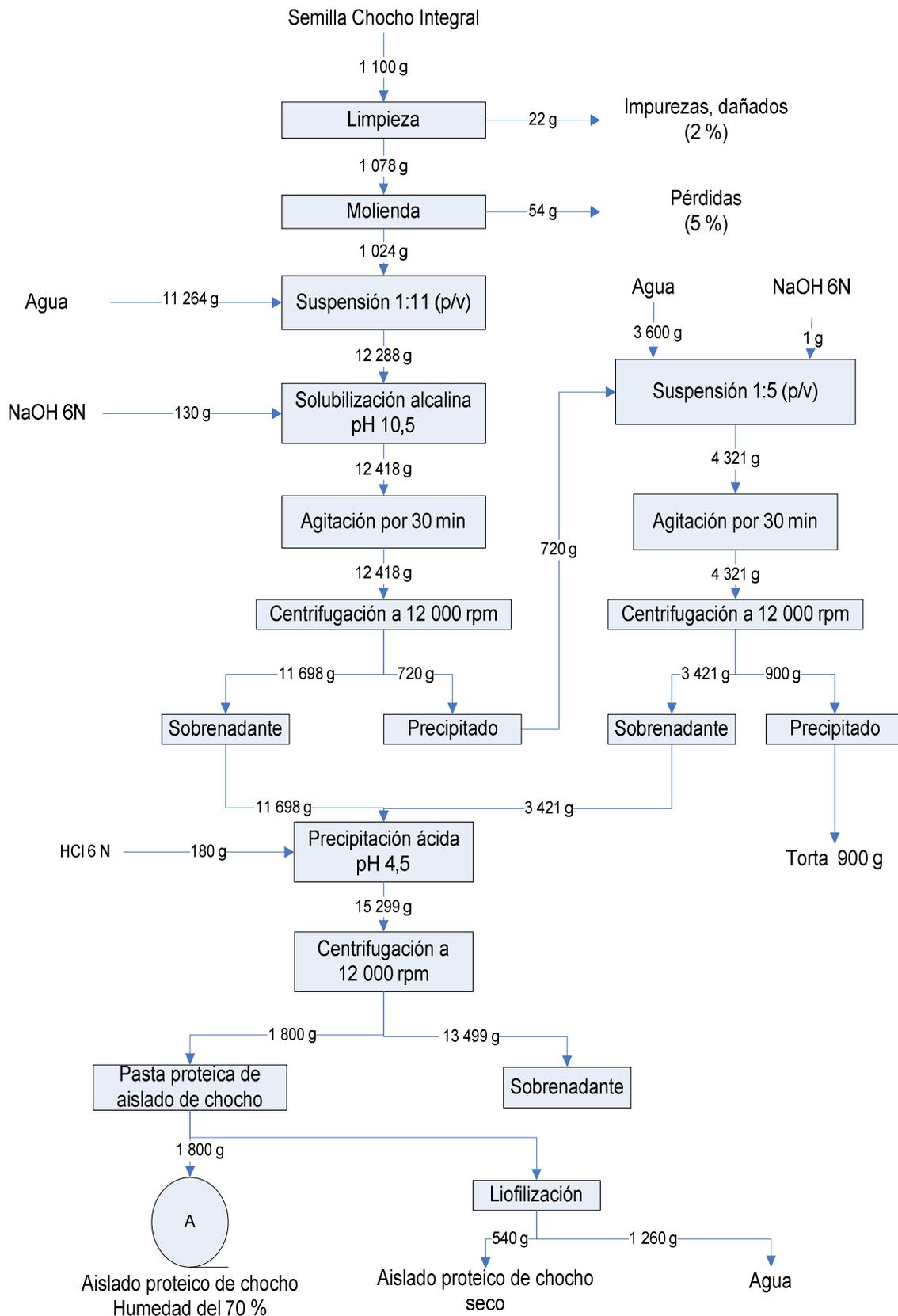
Determinación de los costos de producción a escala de pequeña industria de hidrolizado de proteína vegetal, a partir de la especie *Lupinus mutabilis*. La planta procesadora se ubicará en la provincia de Cotopaxi, en el cantón Latacunga, por la cercanía a los principales productores de chocho. La zona cuenta con la disponibilidad de los servicios básicos. Uno de los principales sectores agrícolas que demandan fertilizantes con hidrolizados es la horticultura y floricultura.

La demanda actual de fertilizantes orgánicos es del 149 561 Ton/año (BCE, 2009), se estima cubrir el 1 % aproximadamente, del mercado. La producción aproximada de chocho en el Ecuador es de 1 934 Ton/año (MAGAP, 2008), cantidad que cubrirá satisfactoriamente los requerimientos necesarios en la planta de 1 000 Ton/año. En la Tabla 16, se presenta la ficha técnica del hidrolizado enzimático de proteína de chocho.

Tabla 16. Ficha técnica del hidrolizado enzimático de la proteína de chocho

| Propiedad | Especificación |
|----------------------|----------------------------|
| Estado físico | Líquido no viscoso |
| Color | Blanco–crema |
| pH | 7,00 |
| Densidad | 0,27 g/cm ³ |
| Solubilidad | Totalmente soluble en agua |

En la Figura 21, se presenta el diagrama de flujo de la obtención del hidrolizado de proteína de chocho, a partir del cual se determinaron los requerimientos de materia prima e insumos.



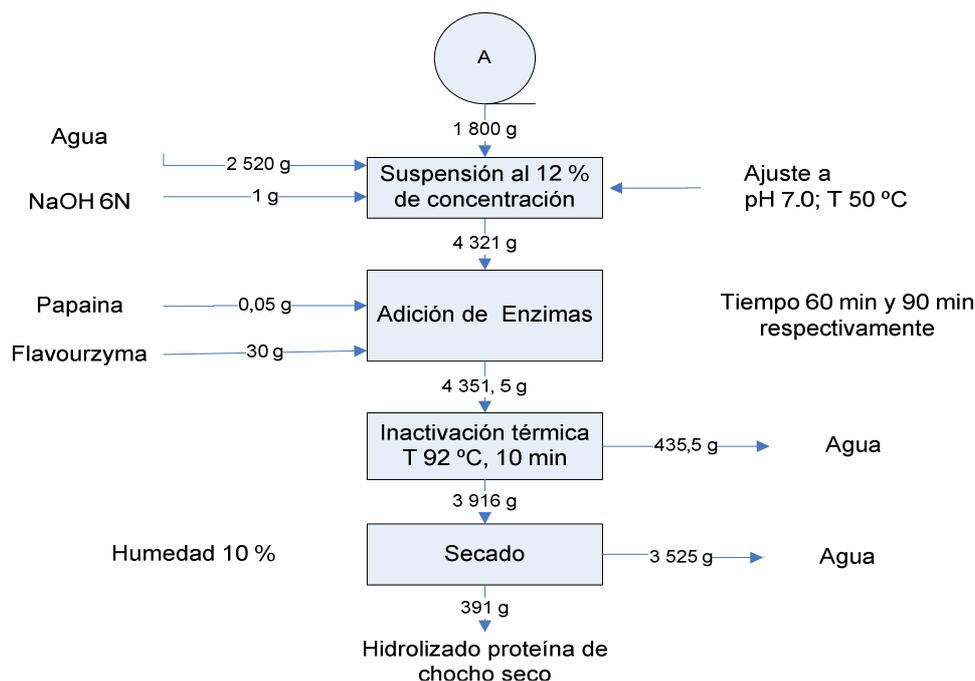


Figura 21. Diagrama de flujo de la elaboración del hidrolizado de proteína de chocho

3.4.1 INVERSIÓN DEL PROYECTO

La inversión necesaria para el proyecto fue de 294 213 USD. La inversión fija, que consiste en los recursos tangibles e intangibles, tuvo un valor fue de 147 045 USD, que corresponde al 49,08 % de la inversión total. El capital de operación, que corresponde a aquellos recursos que permiten que la planta pueda iniciar las actividades, fue de 147 168 USD, correspondiente al 50,02 % de la inversión total, como se observa en la Tabla 17.

Tabla 17. Resumen de la inversión total para la implementación del proyecto

| Concepto | Valor (Dólares) | % |
|------------------------|-------------------|---------------|
| Inversión fija | 147 045,00 | 49,08 |
| Capital de operaciones | 147 168,00 | 50,02 |
| INVERSIÓN TOTAL | 294 213,00 | 100,00 |
| Capital propio | 152 991,00 | 52,00 |
| Financiamiento | 141 222,00 | 48,00 |

En la Tabla 18, se observa el detalle de la inversión fija. Complementariamente, en el Anexo XIV, se puede observar un despliegue más detallado de los rubros que comprenden a la inversión fija.

Tabla 18. Resumen de la inversión fija para la implementación del proyecto

| Concepto | Valor (Dólares) | % |
|-------------------------------|------------------------|----------|
| Terrenos | 20 000,00 | 14,00 |
| Adecuaciones y construcciones | 80 750,00 | 55,00 |
| Maquinaria y equipo | 44 915,00 | 31,00 |
| Otros activos | 1 380,00 | 1,00 |
| <u>TOTAL</u> | 147 045,00 | 100,00 |

3.4.2 CAPITAL DE OPERACIONES

El capital de operación fue de 105 397 USD, como se observa en la Tabla 19; mientras que en el Anexo XV se exhibe un detalle de los parámetros considerados.

Tabla 19. Rubros considerados para determinar el capital de operación

| DENOMINACIÓN | Tiempo (meses) | Monto (USD) |
|---------------------------------|-----------------------|--------------------|
| Materiales Directos | 3 | 127 862,00 |
| Mano de Obra Directa | 3 | 4 602,00 |
| Carga Fabril* | 3 | 10 260,00 |
| Gastos de administración* | 2 | 2 767,00 |
| Gastos de venta | 2 | 1 324,00 |
| Reserva de productos terminados | 2 | 320,00 |
| Cuentas por cobrar | 2 | 33,00 |
| <u>TOTAL</u> | | 147 168,00 |

* Sin depreciación ni amortización

3.4.3 COSTO UNITARIO DEL PRODUCTO

El costo unitario de producción del hidrolizado de proteína de chocho es de 5,03 dólares / Kg, como se indica en la Tabla 20.

Tabla 20. Determinación del costo unitario del hidrolizado de proteína de chocho

| DENOMINACIÓN | Monto (USD) | % |
|--------------------------------------|--------------------|----------|
| Costo de producción | 1 692 953,00 | 96,23 |
| Costos de ventas | 15 887,00 | 0,90 |
| Gastos de administración y generales | 33 334,00 | 1,89 |
| Gastos de financiamiento | 17 111,00 | 0,97 |
| <u>TOTAL</u> | 1 759 285,00 | 100,00 |
| Unidades producidas (kg) | 350 000,00 | |
| Costo unitario del producto (USD/Kg) | 5,03 | |

3.4.4 PUNTO DE EQUILIBRIO

En la Tabla 21, se indican los rubros considerados para determinar el punto de equilibrio. El punto de equilibrio alcanzado es del 20,36 %. En este punto la empresa no genera ni pérdida ni ganancias.

Si la planta trabaja sobre el 20,36 % de la capacidad instalada es donde se obtendrán ganancias.

El detalle de los costos de producción y gastos de financiamiento se presentan en el Anexo XVI. Donde el rubro que más influye en este gasto fue el gasto en materia prima.

Tabla 21. Rubros considerados para determinar el punto de equilibrio

| Descripción | Costos Fijos (dólares) | Costos variables (dólares) |
|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| <u>Materiales Directos</u> | | 1 534 340,00 |
| <u>Mano de Obra Directa</u> | | 27 611,00 |
| <u>Carga Fabril</u> | | - |
| Mano de Obra Indirecta | | 11 785,00 |
| Materiales indirectos | 54 250,00 | - |
| Depreciación | 7 878,00 | . |
| Suministros | 50 750,00 | .- |
| Reparaciones y mantenimiento | 1 257,00 | .- |
| Seguros | 2 513,00 | - |
| Imprevistos | 2 569,00 | - |
| Gastos de ventas | 15 887,00 | - |
| Gastos administración, generales | 33 334,00 | - |
| Gastos financieros | 17 111,00 | - |
| <u>TOTAL</u> | 185 548,00 | 1 573 736,00 |
| Punto de Equilibrio (%) | 20,36 | |

3.4.5 VALOR ACTUAL NETO Y TASA INTERNA DE RETORNO

| | |
|------------------|-----------|
| VAN (USD) | 69 978,58 |
| TIR (%) | 16,94 |

EL VAN toma en cuenta el valor del dinero en el tiempo al medir los flujos de ingresos y egresos que tendrá el proyecto para determinar, si luego de descontar la inversión inicial quedaría alguna ganancia. Si el resultado es positivo el proyecto es viable. El VAN es de 69 978,58 por lo tanto el proyecto es viable.

La tasa interna de retorno (TIR) se considera las variaciones en los gastos de operarios, administración y ventas para el periodo de 10 años. El TIR es del 16,94 % superior a la tasa de interés del 15 %, este valor es atractivo para los inversionistas debido a que este tiene la opción en el mercado de capitales de

invertir su dinero. Al generar 3 puntos más que la tasa del mercado de inversiones actuales.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- La conversión de harina integral a aislado es del 52,00 %, valor interesante dentro del ámbito de las leguminosas; mientras que en el hidrolizado es del 73,00 %, con base en el aislado.
- La solubilidad del hidrolizado es del 62,18 %, valores cercanos al punto isoeléctrico que permitió la penetración y asimilación de los aminoácidos en la planta al disminuir los procesos metabólicos.
- El contenido grasa del 8,30 % y la viscosidad 38,93 cp permite que el hidrolizado al ser aplicado, forme una lámina que ayudará a la absorción de los aminoácidos de forma más lenta y se eviten pérdidas de los nutrientes.
- En la producción de plántula de brócoli se evidenció el aumento del diámetro foliar de 2,92 cm con la fertilización regular a 3,16 cm al adicionar el hidrolizado de proteína de chocho.
- La concentración de microelementos se incrementó aproximadamente en un 30,00 % en el contenido foliar, y estimularon positivamente el crecimiento de la planta.
- La aplicación exógena del fertilizante permitió incrementar el contenido de Mn en un 47,00 %, y al ser el Mn un precursor de la fotosíntesis ayudará a la planta en momentos de estrés.
- Al realizar el análisis de costos de la obtención de hidrolizados se encontró que por cada producto vendido a \$ 7,00 se alcanza el punto de equilibrio al operar el 16,94 % de la capacidad de la planta.

4.2 RECOMENDACIONES

- Suministrar a la planta directamente los aminoácidos por vía foliar para que ella no realice el trabajo de sintetizarlos, con el consiguiente ahorro energético y el crecimiento de planta obtienen a la vez, una respuesta más rápida.
- Realizar un estudio del uso del hidrolizado de proteína de chocho como agente quelante.
- Determinar nuevos procesos de sustitución al proceso de centrifugación, para disminuir los costos de fabricación del hidrolizado de proteína de chocho.
- Investigar nuevas fuentes de proteínas de origen vegetal y la respuesta del brócoli en las fases iniciales y finales del cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña, P., 2001, “Estudio de prefactibilidad técnico económico para la obtención de hidrolizado de proteína vegetal a partir de lupino”, Proyecto de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniero Civil mención Agroindustrial, Universidad de la Frontera, Chile, pp.10 – 14.
2. Agrares, I., 2008, “Aminoácidos Agrares 7”, www.agrares.com/.../aminoacidos.../aminoacidos.../Aminoacidos%20agrares%207%20hidrolisis%20enzimatica.pdf, (Enero, 2011)
3. Agrex, F., 2008, “Coadyuvante no-iónico multifuncional”, <http://www.agroenzymas.com.mx/esp/descargas/coadyuvantes.pdf>, (Enero, 2010).
4. Agronomía e Investigación, S.L. (Agroin), 2007, “Aminoácidos y Péptidos”, <http://www.terralia.com/index.php?revista=60&articulo=394>, (Marzo, 2011).
5. Alarcón, A., 2000, “Tecnología para cultivos de alto rendimiento”, Novedades Agrícolas S.A. Torres Pacheco, Murcia, España, pp. 175 – 186.
6. Anglemeir, A. y Montgomery, M., 1982, “Aminoácidos, péptidos y proteínas”, en De la Torre M., “Introducción a la ciencia de los alimentos”, Editorial Reverté S.A., Barcelona, España, pp. 240 – 398.
7. A.O.A.C., 2005, Association of Official Analytical Chemist, Methods of analysis, 18va edición, Editorial AOAC International, Estados Unidos, pp. 159 – 169.
8. Argenbio, 2007, “Composición de las células”, <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=167>, (Diciembre, 2010).
9. Badui, S., 2006, “Química de los Alimentos”, 4ta edición, Editorial Pearson Education, México, México, pp. 203 – 210.

10. Belitz, H. y Grosch, W., 1992, "Química de los Alimentos", 2da edición, Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, pp. 11 – 12.
11. Berge, J., Tymoczko, J. y Stryer L., 2004, "Bioquímica", Editorial Reverté S.A., Barcelona, España, pp. 43, 79, 91.
12. BCE, 2009, "Comercio Exterior", http://www.portal.bce.fin.ec/vto_bueno/seguridad/ComercioExteriorEst.jsp, (Enero, 2010).
13. Bioiberica, 2010, "El estrés y los aminoácidos", http://www.bioiberica.com/veg_fisio_estres2.asp, (Diciembre, 2010)
14. Blanco, A., 2007, "Química Biológica", 8va edición, Editorial El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, pp. 22 – 26.
15. Bridson, E. y Brecker, A., 1970, "Design and formulation of microbial culture media", Editorial Academic Press, Oxford, USA, pp. 229 – 295.
16. Bridson, E., 1998, "The development, Manufacture and control of Microbiological Cultura Media", 8va edición, Editorial Oxoid Ltd., Basingtoke, p.12
17. Cabalceta, G., 2009, "Conceptos Básicos sobre Fertilización Foliar", <http://www.agro.ucr.ac.cr/af0138/20-Fertilizacion>, (Septiembre, 2010).
18. Carbo, C., 2009, "Aminoácidos en la planta", <http://www.ccarbo.com/descargar/fichas%20tecnicas/Bio%20Plant%20%20AminoAlpha.pdf>, (Junio,2010)
19. Castellanos, J., 1998, "El seguimiento de la nutrición del cultivo de brócoli en los sistemas de fertirrigación", <http://www.ppi-far.org>, (Agosto, 2010).

20. Cervantes, M., 2007, "Abonos orgánicos", http://www.suelovivo.cl/Documentos/abonos_orgánicos.pdf, (Octubre, 2010)
21. Cheftel, J., Cuq, J. y Lorient, D., 1989, "Proteínas Alimentarias: Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas", Editorial Acibia, S.A., Zaragoza, España., pp. 51, 61, 339.
22. Chober, J., Bertrand – Harb, C., Delgalarrando, M. y Nicolas, M., 1989, "Solubility and emulsifying properties of beta-casein and whey proteins modified enzymatically by trypsin", J. Food Biochem. 13 (1), 335.
23. Clemente, A., 1997, "Hidrolizados de proteína de Garbanzo", Instituto de la Grasa, Sevilla, España, pp.141 – 148, 155 – 183
24. Dagorn-Scraviner, C., Gueguen, J. y Lefebvre, J., 1987, "Emulsifying properties of proteins; evaluation of a turbidimetric technique", J. Agric. Food. Chem. 26 (3), 716.
25. División de Investigación y Desarrollo – Industrias Tecsol, 2003, "Aminoácidos Tecsol", Bogotá, Colombia, <http://www.tecsol@007mundo.com>, (Enero, 2010).
26. Espasa, R., 2007, "La fertilización foliar con aminoácidos", http://www.mapa.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Hort/Hort_1983_12_33_35.pdf (Agosto, 2009)
27. FAO, 2002, "Los Fertilizantes y su uso", 4ta edición, Editorial FAO, Roma, pp. 33 – 40.
28. Franco, J., 2004, "Aminoácidos", [http://www.uvade mesa.cl/index2.htm #](http://www.uvade mesa.cl/index2.htm#), (Abril, 2010).

29. Franco, J., 2007, "Utilización de hidrolizados proteicos en horticultura", *Horticultura Revista de Industria Distribución y Socio economía Hortícola*, 52 (1), 60.
30. Franco, J., Hernández, D. y Hernández, J., 1989, "Respuesta de la lechuga tipo Iceberg al tratamiento con aminoácidos vía radicular", *Agrícola Vergel*, 86 (1), 85.
31. Harper, W. y Hall, C., 1976, "Dairy Technology and Engineering", Westport, Connecticut. AVI Pub. Co. Inc. pp. 447 – 449.
32. Hu, Y. y Schmidhalter, U., 2005, "Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants", *J. Plant Nutr. Soil Sci*, 168 (1), 541.
33. Huang, T., Nicodemus, J., Zarka, D., Thomashow, M., Winiewski, M. y Duman, G., 2002, "Expression of an insect (*Dendroides canadensis*) antifreeze protein in *Arabidopsis thaliana* results in a decrease in plant freezing temperature", *Plant Mol. Biol*, 50 (3), 333.
34. Junge, I., 1975, "Lupino y quinoa", *Lab. Bio – ingeniería*, 18 (1), 15.
35. Kester, J. y Richardson, T., 1984, "Modification of whey proteins to improve functionality", *J. Dairy Sci*, 67 (1), 2757
36. Kim, S., Peter, S. y Rhee, K., 1990, "Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate", *J. Agric. Food Chem*, 8 (1), 651.
37. Kirk R. y Othmer D., 1963, "Enciclopedia de Tecnología Química", 10ma Edición. Vol 2, Boradd New York, pp. 264.
38. Kirkby, E. y Römheld, V., 2007, "Micronutrients in plant physiology: functions, uptake and mobility", *Proceedings 543*, The International Fertilizer Society, P. O. Box, York, YO32 5YS, United Kingdom, pp. 23 – 26

39. Krause, J. y Schwenke, K., 1995, "Changes in interfacial properties of legumin from faba beans (*Vicia faba* L.) by tryptic hydrolysis", *Nahrung*, 39 (1), 396.
40. Lechevalier, V., Croguennee, T., Pezennee, S., Guérin–Dubiard, C., Pasco, M. y Nau, E., 2003, "Ovalbumin, ovotransferrin, lysozyme: three model proteins for structural modifications at the air–water interface", *J. Agric: Food Chem*, 51 (21), 6354.
41. Lewis, W., 1993, "Propiedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesado", Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España, pp. 106 – 110.
42. Linden, G. y Lorient, D., 1996, "Bioquímica Agroindustrial", 1era edición, Editorial Acribia S.A., Zaragoza España, pp. 50 – 63.
43. Lopez, G., Flores, I., Galvez, A., Quimarasco, M. y Farres, A., 2003, "Development of a liquid nutritional suplement usin a Seasamun indicum L. protein insólate *Lebensmittel–Wissenschaft and Techonologie, Lebensm Wiss*", *Technol.* 36 (67), 3003.
44. MAGAP, 2008, "Estimación de la superficie cosechada, producción y rendimiento agrícola del Ecuador", Dirección Geográfica y Agropecuaria, Quito, Ecuador, pp. 11
45. Mahmoud, M., 1994, "Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products", *Food Tech*, 48 (1), 89.
46. Marambio, C., 2004, Curvas de acumulación de materia seca y nutrientes en cultivares de repollo de Bruselas. Tesis de Doctorado. Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Chile, Santiago, pp. 88 – 92.
47. Marschner, H., 2002, "Mineral nutrition of higher plants", Academic Press, London, pp 889 – 901.

48. McClemens, D., 1999, "Food emulsions: principles, practice and techniques", Washington: CRC Press.
49. Mendoza, H., Ljubetic, D. y Soza J., 2004, "Aminoácidos", <http://www.uvademesa.cl/ARCHIVOS%20PDF/AminoacidosHMDJJASAbril04.pdf>, (Marzo, 2011).
50. Melgar, R., 2005, "Aplicación Foliar de Micronutrientes", <http://www.fertilizando.com/articulos/Aplicacion%20Foliar%20de%20Micronutrientes.asp>, (Marzo, 2011)
51. Metrione, R. y Watson, M., 1999, "Estructura de las proteínas". AISR Education Services. <http://silly6.math.tau.ac.il>, (Agosto, 2010).
52. Michetti, P., 2007, "Nutrición Vegetal", <http://www.econatur.net/media/File/aminoacidos.pdf>, (Abril, 2010).
53. Molina, E., 2003, "Quelatos como fertilizantes", en editores Soto, G. y Melendez, G., "Taller de Abonos Orgánicos", CATIE, Sabanilla, Costa Rica, pp. 6 – 8.
54. Molina, E., 2008, "Fertilización foliar de cultivos", www.aminogrowinternacional.com, (Marzo, 2010).
55. Mosquera, E., 1997, "Obtención de hidrolizado enzimático de proteína de chocho (*lupinus mutabilis*) a escala semi-piloto. Determinación de las propiedades químicas y funcionales", Proyecto de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniera Química, EPN, Quito, Ecuador, pp. 41 – 43.
56. Murray, R., Mayes, P., Granner, D. y Rodwel V., 1997, "Bioquímica de Harper", 14va edición, Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V., México Df., pp. 60 – 61.

57. Nakai, S., Ho, L. y Tung, M., 1980, "Solubilization of Rapeseed, Soy and Sunflower Protein Isolates by Surfactant and Proteinase Treatments. J.", *Inst. Canadian Sci. and Technol. Food*, **13** (1), 15.
58. Navarro, G., Navarro S., 2003, "Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal", 2da edición, Editorial Mundi Prensa Libros S. A., España, pp. 16 – 20.
59. Pilvicsa, 2010, "Fertilización de plántulas de brócoli en invernadero", http://www.pilvicsa.com/Sitio/index.php?option=com_contact&Itemid=3, (Agosto, 2010)
60. Química Bioemedal, 2010, "Los aminoácidos en la planta", www.biobloemen.com.ar, (Julio, 2010)
61. Rengel, Z., 1992, "The role of calcium in salt toxicity", *Plant Cell Environ*, **15** (1), 625.
62. Restrepo, J., 1998, "Elementos básicos de sobre la agricultura orgánica en Centroamérica", CEDECO – OIT, San José, Costa Rica, p. 73.
63. Rodríguez, P., Aleaga, T., Schoeneberger, H. y Gross, R., 1981, "Establecimiento de las condiciones óptimas a nivel de laboratorio y de planta piloto para la preparación de un aislado proteico de *Lupinus mutabilis*," *Revista del Instituto de Nutrición*, **31** (4), 783.
64. Ronen, E., 2010, "Fertilización Foliar. Otra exitosa forma de nutrir a las plantas", <http://www.fertilizando.com/articulos/Fertilizacion%20Foliar%20-%20Otra%20forma%20exitosa.asp>, (Febrero, 2010).
65. Sánchez, A. y Burgos, J., 1997, "Gelation of Sunflower Globulin Hydrolysates: Rheological and Calorimetric Studies. Food Macromolecules and Colloids", Editorial Royal Society Chemistry, London, pp. 426 – 430.

66. Sandoval, E., Quintero A. y Ayala, A., 2005, "Reología y textura de masas: Aplicaciones en trigo y maíz", Ingeniería e Investigación, 25 (1), 72.
67. Sathe, K., Deshpande, S. y Salunkhe, K., 1982, "Functional Properties of Lupin Seed (*Lupinus mutabilis*) Proteins and Protein Concentrates", J. of Food Sci, 47 (1), 491.
68. Shimadzu Corporation, 1993, Amino Acid Analysis System, Instruction manual, Kyoto, Japan.
69. Schönherr, J. y Hüber, R., 1977, "Plant cuticles are polyelectrolytes with isoelectric points around three", Plant Physiology, 59 (1) 145.
70. Stading, M., Hermansson, A., 1990, "Viscoelastic behaviour of β – lactoglobulin gel structures", Food Hydrocolloids, 4 (1), 121.
71. Tecsol, 2003, "Aminoácidos Tecsol", Bogotá, Colombia, http://www.tecsol@007_mundo.com, (Mayo, 2010).
72. Torres, M., 2007, "Calidad de los fertilizantes: ¿Cuáles son las principales propiedades y atributos que determinan su valor agronómico?", <http://www.ipni.net/ppiweb/ltams.nsf/87cb8a98bf72572b8525693e0053ea70/6ff53e5c6acdf926032572e20045b9f3>, (Abril, 2010).
73. Turgeon, S., 1992, "Emulsifying property of whey peptide fractions as a function of pH and ionic strength", J. Food Sci, 57 (1) 601.
74. Urbano, P., 2001, "Tratado de Fitotécnica General", 2da edición, Editorial Mundi–Prensa, Bilbao, España, pp. 509 – 510.
75. Villa, J., Córdova, A., Gonzales, J., Garrido, G. y Villegas, J., 2010, "Nutrición del deportista", <http://www.mundoatletismo.com/Site/medicina/01d67c95230be9702.html>, (Agosto, 2010).

76. Villacrés, E., 2001, "Obtención de hidrolizado enzimático de alta funcionalidad a partir del chocho (*Lupinus mutabilis sweet*)" Tesis de Maestría, E P N, Quito, Ecuador, pp. 158 – 161
77. Von Baer, D., Reimerdes, E. y Feldheim, W., 1979, "Methoden zur Bestimmung der Chinolizidin-Alkaloid In: *Lupinus mutabilis*" I. Schnellmethoden. Z. Lebensm, Unters, Forsch, 169 (1), 27.
78. Weber, K. y Osborn, M., 1969, "The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis", J. Biol. Chem, 244 (1), 4406.
79. Wilchek, M. y Miron, T., 2003, "Oriented versus random protein immobilization", Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 55, (1), 67.
80. Zakaria, F. y McFeeters. R., 1978. "Improvement of the emulsification properties of soy protein by limited pepsin hydrolysis", Food Sci. and Tech. 11 (1), 42.
81. Zhun, H. y Damodaran, S., 1994, "Heat-induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties", J. Agric. Food Chem., 41 (1), 846.

ANEXOS

ANEXO I

MÉTODO PARA DETERMINACIÓN DE PERFIL DE AMINOÁCIDOS

El perfil de aminoácidos se determinó en un cromatógrafo de alta resolución (HPLC). Las muestras se hidrolizaron con HCl 6 N por 22 h a 110 °C. El ácido fue evaporado en rotavapor BUCHI, RE 111 y el residuo seco fue disuelto con buffer citrato a pH 2,20 e inyectados en el HPLC. El reactivo OPA (orto-phtaldehído) en presencia de un grupo tiol (SH), reacciona con los grupos amino primario (-NH₂), originan compuestos altamente fluorescente, el cual es detectado selectivamente por un detector de fluorescencia. RF-10. La longitud de onda de excitación fue de 350 nm y la de emisión de 450 nm (Manual Shimadzu, 1993).

ANEXO II

MÉTODO PARA DETERMINACIÓN DE PERFIL DE PÉPTIDOS

Este método fue descrito por Weber y Osborn, (1969), Se utilizaron marcadores de 10 proteínas purificadas con pesos moleculares entre 14 y 250 kDa. La separación se realizó con buffer 3.00 M Tris-HCl a un pH 8,30. Se preparó cada muestra a una concentración de proteína de 3 mg/ml. Los pesos moleculares de las muestras se calcularon mediante comparación de su movilidad electroforética con la de los marcadores de pesos moleculares. Los pesos moleculares se calcularon mediante la siguiente curva de calibración determinada en base a las proteínas estándar.

$$y = 2,268 - 0,271x$$

Donde:

y = logaritmo decimal (log) del peso molecular

x = movilidad relativa de las proteínas

ANEXO III

MÉTODO DE KJELDAHL

Digestión

- Se preparó la suspensión a partir de 2 mL de hidrolizado junto al catalizador que consistió en 0,77 de sulfato de sodio; 0,028 de sulfato cúprico y 4×10^{-3} de dióxido de selenio en los balones de digestión.
- Se colocaron 10 mL de ácido sulfúrico concentrado en cada uno de los balones.
- Los balones se pusieron en la hornilla de digestión.
- Se encendió la cocineta a 6 °C, y se abrieron las llaves de agua.
- Se giraron los balones cada 5 min.
- Se dejaron enfriar los tubos.

Destilación

- Se añadieron 20 mL de agua destilada en los tubos de digestión para lavarlos y se traspasaron a los tubos de destilación
- Se pusieron en los erlenmeyers 20 mL de ácido bórico al 2 %, y se colocaron en los tubos de destilación 15 mL de NaOH, despacio y por las paredes.

- Se colocaron los tubos en el destilador, se abrieron las llaves de agua y se prendió el equipo a 10 °C, y se dejaron que hierva por 20 min.
- Se dejaron enfriar los tubos y se apagó el equipo.

Titulación

- Se traspasaron las mezclas
- Se colocaron 3 gotas de rojo de metilo
- Se titularon con H₂SO₄,
- El gasto de ácido sulfúrico se tomo como dato para cálculo de la proteína mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(T - B) \times N \times 14,01}{W \times 10}$$

Donde:

T= ml de ácido gastado

B= ml de ácido gastado en el balón blanco

N= Normalidad del ácido

W= Peso inicial de la muestra

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ N} \times 6,25$$

ANEXO IV

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE MINERALES

Determinación de ceniza

La ceniza de la muestra se sometieron a una digestión ácida para luego se diluyeron a un volumen determinado. Posteriormente se realizaron los análisis de macro y micro – elementos por absorción atómica y en el caso de fósforo por colorimetría.

Equipo y material

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica, Shimadzu AA-680
- Espectrofotómetro, Spectronic 20D
- Tubos (celda), Spectronic 20D
- Balanza analítica de 500 g, BOECO Placa agitadora
- Dilutor automático
- Plancha calentadora, Thermolyne
- Agitador de tubos Mix II, Thermolyne
- Balones aforados, Pipetas volumétricas, Pipetas graduadas, Kimax
- Papel filtro cuantitativo, Whatman 541
- Embudos, Kimax
- Tubos de ensayo, Kimax

Reactivos

- Acido clorhídrico: HCl 37 %.
- Acido nítrico: HNO₃ 65 %.
- Solución de referencia de 1 000 ppm de: calcio, magnesio, potasio, cobre, manganeso, zinc, hierro, cobre.
- Solución estándar de calcio 10 ppm, de magnesio 1 ppm.
- Solución de lantano 1 %: Se pesaron 17,65 g de cloruro de lantano, se

disolvieron con 400 mL de agua y se aforaron a 1000 mL.

- Solución estándar de fósforo 1 000 ppm.
- Solución estándar de fósforo 10 ppm de fósforo.
- Solución de molibdeno-vanadato: Se pesaron 25 gramos de molibdato de amonio en 400 mL de agua bidestilada, 1,25 g de vanadato de amonio en 30 mL de agua destilada caliente y enfriar. Se añadieron 250 mL de ácido nítrico al 65 % con agitación lenta. Se mezclaron la solución de molibdato con el vanadato y se aforaron a un litro, envasar en frasco ámbar.
- Solución de litio al 1 %: Se pesaron 62,34 g de cloruro de litio y se disolvieron con 400 mL de agua bidestilada y se aforaron a 1000 mL.
- Solución estándar de potasio 4 ppm, de hierro 10 ppm.

Procedimiento

- Se colocaron los crisoles que contienen las cenizas en la capilla o sorbona, se adicionaron 10 mL de agua destilada y 5 mL de ácido clorhídrico concentrado, se digirieron hasta que el volumen se reduzca a la tercera parte a temperatura baja.
- Se retiraron los crisoles de la plancha y se enfriaron, se filtraron en papel filtro cuantitativo y se recibe el filtrado en un balón de 100 mL. Se aforan con agua bidestilada.

DETERMINACIÓN DE CALCIO Y MAGNESIO

- Se tomaron 0,5 mL del filtrado, se añadieron 4 mL de agua bidestilada, 0,5 mL de la solución de lantano al 1 % y se agitaron.
- De esta solución se toman 0,5 mL, se añaden 4 mL de agua bidestilada, 0,5 mL de la solución de lantano y se agitaron.

- Se prepararon la curva estándar de Ca y Mg de 5 y 0,5 ppm: Se colocaron en tubos de ensayo la solución estándar de calcio y magnesio 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL, se adicionaron agua bidestilada hasta 9 mL y añadir 1 mL de la solución de lantano al 1 %.
- Se leyeron en el espectrofotómetro de absorción atómica de llama, se tomaron en cuenta primero los estándares luego las muestras.

$$Ca (\%) = \frac{LRxFd}{Pm}$$

Donde:

LR = Lectura de Regresión

Fd = Factor de dilución

Pm = Peso de la muestra (g) Se prepara la curva estándar de fósforo de 0 a 5 ppm: se colocaron la solución estándar de fósforo 10 ppm en tubos de ensayo 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL.

DETERMINACIÓN DE FÓSFORO

- Se tomaron 0,5 mL del filtrado en un tubo de ensayo, se añadieron 4 mL de agua bidestilada y 0,5 mL de la solución molibdeno -vanadato y se agitaron.
- Cuando se requiera hacer más diluciones se tomaron 4,5 mL de agua con 0,5 mL de muestra y en la dilución a leerse se pondrá 0,5 mL de muestra 0,5 de la solución de molibdeno - vanadato y 4 mL de agua bidestilada, Se adicionaron agua bidestilada hasta 9 mL y luego 1 mL de la solución de molibdeno – vanadato.
- Se pasaron a los tubos calibrados del espectrofotómetro y se leyeron, se tomaron en cuenta primero los estándares luego las muestras.

- Se midieron a una longitud de ondas de 400 nm.

$$P (\%) = \frac{C \times Fd}{Pm}$$

Donde:

C = Concentración (ppm)

Fd = Factor de dilución

Pm = Peso de la muestra (g)

DETERMINACIÓN DE POTASIO

- Se tomaron 0,5 mL del filtrado en un tubo de ensayo, se añadieron 4 mL de agua bidestilada y 0,5 mL de la solución de litio al 1 % y se agitaron.
- Se tomaron 0,5 mL, se añadieron 4 mL de agua bidestilada y 0,5 mL de la solución de litio al 1 % y se agitaron.
- Se prepara la curva estándar de potasio de 1 y 2 ppm: Se colocar en tubos de ensayo la solución estándar de K 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL, y adicionar agua bidestilada hasta 9 mL y adicionar 1 mL de la solución de litio al 1 %.
- Se leyeron en el espectrofotómetro de absorción atómica de llama, se tomaron en cuenta primero los estándares luego las muestras.

$$K (\%) = \frac{C \times Fa}{Pm}$$

Donde:

C = Concentración (ppm)

Fd = Factor de dilución

Pm = Peso de la muestra (g)

DETERMINACIÓN DE HIERRO

- Se prepararon la curva estándar de hierro de 0 a 5 ppm: se colocaron en tubos de ensayo la solución estándar de hierro 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL, se adiciona agua bidestilada hasta 9 mL y se adiciona 1 mL de la solución de lantano al 1 %.
- Se tomaron 5 mL de la muestra y se leyeron en el espectrofotómetro de absorción atómica

$$\text{Fe (\%)} = \frac{C \times Fd}{Pm}$$

Donde:

C = Concentración (ppm)

Fd = Factor de dilución

Pm = Peso de la muestra (g)

DETERMINACIÓN DE COBRE, MANGANESO Y CINC

- Se toman 10 mL de la solución madre, se agitan y se leyeron
- Se prepararon las curvas estándares de cobre, manganeso y zinc de 5 y 0.5 ppm:
- Se colocaron en tubos de ensayo las soluciones estándares de calcio y manganeso 0, 1, 2, 3, 4, 5 mL, y se adicionaron agua bidestilada hasta 9 mL y adicionar 1 mL de la solución de lantano al 1.
- Se leyeron en el espectrofotómetro de absorción atómica de llama, primero los estándares luego las muestras.

$$\text{Cu (ppm)} = \frac{LR \times Fd}{Pm}$$

Donde:

LR = Lectura de Regresión

Fd = Factor de dilución

Pm = Peso de la muestra

ANEXO V

Tabla 22. Rendimiento en peso de la obtención del hidrolizado de proteína de chocho.

| Material | Peso (g) | Proteína (%) | Proteína (g) | Rendimiento en peso (%) |
|-----------------|-----------------|---------------------|---------------------|--------------------------------|
| Harina | 1024,00 | 46,59 | 477,08 | - |
| Aislado | 540,00 | 55,52 | 299,80 | 52,73 |
| Hidrolizado | 391,00 | 55,58 | 217,32 | 72,40 |

$\bar{X} \pm \sigma ; n = 3$

ANEXO VI

Tabla 23. Perfil granulométrico del hidrolizado de proteína de chocho

| Malla ASTM No. | Abertura Tamiz (um) | Peso retenido (g) | % Retenido | % Retenido Acumulado | % Pasante Acumulado |
|-----------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 20 | 850 | 4,85 | 4,85 | 4,85 | 95,15 |
| 40 | 425 | 10,04 | 10,04 | 14,89 | 85,11 |
| 50 | 300 | 8,23 | 8,23 | 23,13 | 76,87 |
| 80 | 180 | 32,84 | 32,85 | 55,98 | 44,02 |
| 100 | 150 | 24,83 | 24,84 | 80,81 | 19,19 |
| 140 | 106 | 15,03 | 15,03 | 95,85 | 4,15 |
| Pasante | 0 | 4,15 | 4,15 | 100,00 | 0,00 |

$\bar{X} \pm \sigma ; n = 2$

ANEXO VII

Tabla 24. Análisis de varianza de la solubilidad del hidrolizado

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Valores cuadráticos medios | Relación F | Valor P |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------------------|------------|---------|
| Tratamientos | 564,93 | 8 | 70,62 | 183,07 | 0,0000 |
| Error | 6,94 | 18 | 0,39 | | |
| Total | 571,87 | 26 | | | |

Tabla 25. Porcentaje de proteína soluble (N x 6,25) del hidrolizado de proteína de chocho en función del pH

| pH | % N | % Proteína Soluble | Grupo Homogéneo |
|------|--------------|--------------------|-----------------|
| 7,00 | 12,12 ± 0,44 | 75,75 | A |
| 6,50 | 11,84 ± 0,44 | 74,00 | B |
| 3,00 | 11,73 ± 0,22 | 73,31 | BC |
| 3,50 | 11,58 ± 0,11 | 72,38 | C |
| 4,00 | 10,96 ± 0,22 | 68,52 | D |
| 4,50 | 10,47 ± 0,66 | 65,50 | E |
| 5,50 | 10,33 ± 0,22 | 64,56 | E |
| 5,00 | 9,95 ± 0,44 | 62,18 | F |

$\bar{X} \pm \sigma$; n=2

Letras diferentes por columna indican diferencia significativa (Tukey 5%)

ANEXO VIII

Tabla 26. Análisis de varianza del porcentaje de absorción de agua del hidrolizado en función del pH

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Valores cuadráticos medios | Relación F | Valor P |
|----------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------------|-------------------|----------------|
| Tratamientos | 5,85 | 7 | 0,83 | 51,17 | 0,0000 |
| Error | 0,26 | 16 | 0,02 | | |
| Total | 6,11 | 23 | | | |

Tabla 27. Capacidad de absorción de agua del hidrolizado de chocho en función del pH

| pH | % AA | Grupo Homogéneo |
|-----------|-------------|------------------------|
| 5,00 | 2,35 ± 0,25 | A |
| 5,50 | 2,18 ± 0,15 | AB |
| 4,50 | 1,84 ± 0,08 | BC |
| 4,00 | 1,67 ± 0,09 | B |
| 3,50 | 1,56 ± 0,01 | B |
| 6,00 | 1,47 ± 0,08 | C |
| 6,50 | 1,01 ± 0,13 | D |
| 7,00 | 0,84 ± 0,04 | D |

$\bar{X} \pm \sigma$; n=3

Letras diferentes por columna indican diferencia significativa (Tukey 5%)

ANEXO IX

Tabla 28. Análisis de varianza del efecto del pH sobre la capacidad de formación de emulsión

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Valores cuadráticos medios | Relación F | Valor P |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------------------|------------|---------|
| Tratamientos | 673,83 | 4 | 168,46 | 381,81 | 0,0000 |
| Error | 4,41 | 10 | 0,44 | | |
| Total | 678,24 | 14 | | | |

Tabla 29. Efecto del pH sobre la capacidad de formación de la emulsión del hidrolizado proteico de chocho

| pH | % EE | Grupo homogéneo |
|----|--------------|-----------------|
| 8 | 49,15 ± 0,29 | A |
| 6 | 48,89 ± 0,55 | A |
| 10 | 47,68 ± 0,79 | A |
| 4 | 38,07 ± 0,80 | B |
| 2 | 32,78 ± 0,56 | C |

$\bar{X} \pm \sigma$; n = 3

Letras diferentes por columna indican diferencia significativa (Tukey 5%)

Tabla 30. Análisis de varianza del efecto de la concentración de la proteína sobre la capacidad de formación de la emulsión

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Valores cuadráticos medios | Relación F | Valor P |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------------------|------------|---------|
| Tratamientos | 2641,38 | 4 | 660,34 | 933,33 | 0,0000 |
| Error | 7,08 | 10 | 0,71 | | |
| Total | 2648,46 | 14 | | | |

Tabla 31. Efecto de la concentración de la proteína sobre la capacidad de formación de la emulsión

| [p/v] | % AE | Grupo Homogéneo |
|-------|--------------|-----------------|
| 10 | 63,92 ± 0,68 | A |
| 8 | 49,33 ± 0,87 | B |
| 6 | 40,71 ± 0,86 | C |
| 4 | 32,22 ± 0,83 | D |
| 2 | 26,85 ± 0,85 | E |

$\bar{X} \pm \sigma ; n = 3$

Letras diferentes por columna indican diferencia significativa (Tukey 5%)

Tabla 32. Análisis de varianza de la estabilidad de emulsión del hidrolizado de proteína de chocho a diferentes pH

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Valores cuadráticos medios | Relación F | Valor P |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------------------|------------|---------|
| Tratamientos | 2189,79 | 4 | 547,45 | 1291,51 | 0,0000 |
| Error | 4,24 | 10 | 0,42 | | |
| Total | 2194,03 | 14 | | | |

Tabla 33. Estabilidad de emulsión del hidrolizado de proteína de chocho a diferentes pH

| pH | % EE | Grupo homogéneo |
|----|--------------|-----------------|
| 4 | 80,00 ± 0,56 | A |
| 6 | 66,48 ± 0,85 | B |
| 8 | 61,30 ± 0,32 | C |
| 10 | 55,19 ± 0,64 | D |
| 2 | 43,70 ± 0,64 | E |

$\bar{X} \pm \sigma ; n = 3$

Letras diferentes por columna indican diferencia significativa (Tukey 5%)

ANEXO X

Tabla 34. Análisis de varianza de la capacidad de formación de espuma**Factor:** Concentración**Variable:** Capacidad de formación de espuma

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Valores cuadráticos medios | Relación F | Valor P |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------------------|------------|---------|
| Tratamientos | 946,12 | 4 | 236,53 | 1095,04 | 0,0000 |
| Error | 2,16 | 10 | 0,22 | | |
| Total | 948,28 | 14 | | | |

Tabla 35. Capacidad de formación y estabilidad de espuma del hidrolizado de chocho en función del tiempo.

| % P/V | Minutos | | | | | | | | Grupo homogéneo |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|
| | 0 | 5 | 10 | 15 | 25 | 60 | 90 | 120 | |
| 10 | 31,20 ± 0,20 | 29,27 ± 0,61 | 26,40 ± 1,83 | 23,53 ± 0,64 | 22,47 ± 0,50 | 21,80 ± 0,35 | 20,60 ± 0,40 | 20,00 ± 0,00 | A |
| 8 | 29,00 ± 0,60 | 27,33 ± 0,70 | 25,67 ± 1,01 | 23,07 ± 0,64 | 22,07 ± 0,83 | 21,07 ± 0,50 | 20,20 ± 0,35 | 20,00 ± 0,00 | A |
| 6 | 20,33 ± 0,58 | 18,60 ± 0,80 | 17,47 ± 0,99 | 15,47 ± 0,64 | 14,80 ± 0,35 | 13,40 ± 0,72 | 12,40 ± 0,53 | 12,00 ± 0,00 | B |
| 4 | 16,47 ± 0,50 | 15,87 ± 0,50 | 15,60 ± 0,40 | 15,07 ± 0,50 | 14,53 ± 0,23 | 13,27 ± 0,46 | 12,13 ± 0,23 | 12,00 ± 0,00 | C |
| 2 | 9,73 ± 0,31 | 9,20 ± 0,35 | 8,93 ± 0,31 | 8,80 ± 0,20 | 8,67 ± 0,31 | 8,40 ± 0,20 | 8,07 ± 0,12 | 8,00 ± 0,00 | D |

 $\bar{X} \pm \sigma$; n = 3

Letras diferentes por columna indican diferencia significativa (Tukey 5%)

ANEXO XI

Tabla 36. Análisis de varianza de la concentración de cloruro de sodio

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Valores cuadráticos medios | Relación F | Valor P |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------------------|------------|---------|
| Tratamientos | 859,09 | 6 | 143,18 | 94,20 | 0,0000 |
| Error | 21,28 | 14 | 1,52 | | |
| Total | 880,37 | 20 | | | |

Tabla 37. Efecto del % NaCl sobre la capacidad de formación de la espuma del hidrolizado proteico de chocho.

| % NaCl (P/V) | Incremento del Volumen (%) | Grupo Homogéneo |
|--------------|----------------------------|-----------------|
| 0,80 | 88,00 ± 2,00 | A |
| 1,00 | 87,40 ± 0,53 | AB |
| 1,50 | 85,80 ± 0,72 | AB |
| 2,00 | 84,47 ± 0,50 | BC |
| 0,60 | 81,53 ± 1,50 | C |
| 0,40 | 75,00 ± 1,00 | D |
| 0,20 | 69,67 ± 1,53 | E |

$\bar{X} \pm \sigma$; n=3

Letras diferentes por columna indican diferencia significativa (Tukey 5%0)

ANEXO XII

Tabla 38. Análisis de varianza del efecto de la concentración sobre la viscosidad del hidrolizado de proteína de chocho

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Valores cuadráticos medios | Relación F | Valor P |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------------------|------------|---------|
| Tratamientos | 7518,99 | 6 | 1253,16 | 2682,62 | 0,0000 |
| Error | 6,54 | 14 | 0,47 | | |
| Total | 7525,53 | 20 | | | |

Tabla 39. Efecto de la concentración sobre la viscosidad del hidrolizado de proteína de chocho

| Concentración % P/V | Viscosidad cp | Grupo homogéneo |
|---------------------|---------------|-----------------|
| 20 | 60,53 ± 0,45 | A |
| 18 | 51,93 ± 0,51 | B |
| 16 | 27,90 ± 0,17 | C |
| 14 | 21,60 ± 0,36 | D |
| 12 | 14,43 ± 0,60 | E |
| 10 | 10,73 ± 0,25 | F |
| 8 | 9,07 ± 0,40 | F |

$\bar{X} \pm \sigma$; n = 3

Letras diferentes por columna indican diferencia significativa (Tukey 5%)

Tabla 40. Análisis de varianza de la influencia de la temperatura sobre la viscosidad del hidrolizado de proteína de chocho

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Valores cuadráticos medios | Relación F | Valor P |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------------------|------------|---------|
| Tratamientos | 354,31 | 3 | 118,10 | 521,04 | 0,0000 |
| Error | 1,81 | 8 | 0,23 | | |
| Total | 356,12 | 11 | | | |

Tabla 41. Influencia de la temperatura sobre la viscosidad del hidrolizado de proteína de chocho

| Temperatura °C | Viscosidad cp | Grupo homogéneo |
|----------------|---------------|-----------------|
| 20 | 38,93 ± 0,40 | A |
| 30 | 30,00 ± 0,50 | B |
| 40 | 26,97 ± 0,25 | C |
| 50 | 24,40 ± 0,36 | D |

$\bar{X} \pm \sigma$; n = 3

Letras diferentes por columna indican diferencia significativa (Tukey 5%)

Tabla 42. Análisis de varianza para el efecto del pH sobre la viscosidad del hidrolizado de proteína de chocho

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Valores cuadráticos medios | Relación F | Valor P |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------------------|------------|---------|
| Tratamientos | 3711,64 | 4 | 927,91 | 2530,66 | 0,0000 |
| Error | 3,67 | 10 | 0,37 | | |
| Total | 3715,31 | 14 | | | |

Tabla 43. Efecto del pH sobre la viscosidad del hidrolizado de proteína de chocho

| pH | Viscosidad cp | Grupo homogéneo |
|----|---------------|-----------------|
| 10 | 44,10 ± 0,36 | A |
| 2 | 38,45 ± 0,94 | B |
| 8 | 18,03 ± 0,25 | C |
| 6 | 8,00 ± 0,50 | D |
| 4 | 5,67 ± 0,38 | E |

$\bar{X} \pm \sigma$; n = 3

Letras diferentes por columna indican diferencia significativa (Tukey 5%)

ANEXO XIII

Tabla 44. Datos experimentales obtenidos a las cuatro semanas de aplicación de la fertilización foliar en plántulas de brócoli. Dimensiones del brócoli por efecto de la fertilización foliar

| N | PRIMERA SEMANA | | | | SEGUNDA SEMANA | | | | TERCERA SEMANA | | | | CUARTA SEMANA | | | |
|----------|----------------|-----------|-----------|-----------|----------------|-----------|-----------|-----------|----------------|-----------|-----------|-----------|---------------|-----------|-----------|-----------|
| | Hidrolizado | | Testigo | | Hidrolizado | | Testigo | | Hidrolizado | | Testigo | | Hidrolizado | | Testigo | |
| | A (cm) | D (cm) | A (cm) | D (cm) | A (cm) | D (cm) | A (cm) | D (cm) | A (cm) | D (cm) | A (cm) | D (cm) | A (cm) | D (cm) | A (cm) | D (cm) |
| 1 | 1,20 | 2,00 | 2,70 | 3,00 | 2,90 | 2,60 | 2,00 | 2,60 | 5,60 | 4,50 | 5,50 | 3,50 | 7,10 | 5,50 | 8,50 | 5,40 |
| 2 | 1,50 | 1,90 | 3,00 | 3,00 | 3,10 | 2,80 | 2,20 | 2,80 | 5,10 | 4,30 | 5,00 | 3,90 | 7,40 | 5,30 | 9,00 | 4,40 |
| 3 | 2,20 | 1,70 | 3,90 | 2,70 | 3,00 | 2,50 | 1,90 | 2,50 | 5,40 | 3,20 | 6,00 | 2,40 | 7,10 | 4,20 | 7,50 | 4,00 |
| 4 | 1,50 | 1,80 | 3,00 | 2,80 | 3,00 | 2,40 | 1,90 | 2,40 | 5,40 | 3,40 | 3,40 | 2,60 | 7,50 | 4,40 | 8,00 | 4,60 |
| 5 | 1,70 | 2,20 | 2,60 | 3,20 | 2,90 | 2,60 | 1,90 | 2,60 | 6,00 | 3,90 | 5,20 | 3,10 | 7,60 | 4,90 | 9,40 | 5,40 |
| 6 | 1,30 | 2,00 | 2,50 | 3,00 | 2,50 | 2,60 | 1,50 | 2,60 | 6,00 | 4,00 | 5,40 | 3,60 | 8,00 | 5,00 | 8,60 | 4,60 |
| 7 | 1,30 | 1,70 | 2,70 | 2,70 | 3,50 | 2,60 | 2,50 | 2,60 | 6,50 | 2,90 | 5,20 | 3,10 | 8,50 | 3,90 | 7,20 | 4,10 |
| 8 | 1,30 | 2,00 | 2,80 | 3,00 | 3,00 | 2,30 | 2,00 | 2,30 | 6,10 | 3,20 | 6,00 | 3,40 | 8,10 | 4,20 | 8,00 | 4,40 |
| 9 | 1,50 | 1,50 | 3,00 | 2,40 | 2,50 | 2,40 | 1,50 | 2,40 | 5,60 | 4,00 | 6,00 | 3,40 | 8,60 | 5,00 | 8,00 | 4,40 |
| 10 | 1,60 | 1,70 | 3,30 | 2,60 | 2,70 | 2,40 | 1,70 | 2,40 | 6,40 | 2,80 | 5,90 | 4,60 | 8,40 | 3,80 | 7,90 | 4,00 |
| 11 | 1,30 | 2,00 | 2,60 | 3,00 | 2,20 | 2,70 | 1,20 | 2,70 | 5,90 | 2,70 | 5,80 | 3,20 | 7,90 | 3,70 | 7,70 | 3,90 |
| 12 | 1,50 | 1,80 | 3,00 | 2,90 | 2,40 | 2,60 | 1,40 | 2,60 | 5,80 | 3,70 | 6,10 | 4,20 | 7,80 | 4,70 | 8,50 | 4,10 |
| 13 | 1,60 | 2,00 | 3,00 | 3,10 | 3,00 | 2,20 | 2,00 | 2,20 | 5,00 | 4,00 | 5,60 | 3,10 | 7,10 | 5,00 | 7,80 | 4,10 |
| 14 | 1,80 | 1,50 | 3,00 | 2,60 | 2,20 | 2,00 | 1,20 | 2,00 | 6,00 | 4,00 | 6,50 | 4,00 | 7,80 | 5,00 | 8,50 | 4,00 |
| 15 | 1,90 | 2,00 | 2,90 | 3,10 | 2,60 | 2,40 | 1,60 | 2,40 | 5,60 | 2,20 | 5,60 | 3,40 | 7,70 | 3,20 | 7,70 | 3,40 |
| 16 | 1,50 | 1,90 | 3,00 | 2,90 | 1,90 | 1,70 | 1,10 | 1,70 | 5,30 | 2,40 | 5,00 | 2,80 | 7,10 | 3,40 | 7,00 | 3,80 |
| X | 1,54 | 1,86 | 2,94 | 2,88 | 2,71 | 2,43 | 1,73 | 2,43 | 5,73 | 3,45 | 5,51 | 3,39 | 7,73 | 4,45 | 8,08 | 4,29 |

ANEXO XIV

DETALLE DE LOS RUBROS CONSIDERADOS PARA LA INVERSIÓN

| CONSTRUCCIONES | Cantidad (m²) | Valor Unitario (dólares) | Valor Total (dólares) |
|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| Terreno | 500 | 40 | 20 000,00 |
| Fabrica | 250 | 200 | 50 000,00 |
| Vestidores y Baños | 15 | 180 | 2 700,00 |
| Oficina | 35 | 180 | 6 300,00 |
| Bodega | 50 | 180 | 9 000,00 |
| Cerramiento | 810 | 150 | 12 000,00 |
| Guardianía | 5 | 150 | 750,00 |
| <u>TOTAL</u> | | | 80 750,00 |
| | | | |
| <u>EQUIPOS Y MAQUINARIA</u> | Cantidad | Valor Unitario (dólares) | Valor Total (dólares) |
| Equipo de Producción | | | |
| Limpiadora de granos | 1 | 3 000 | 3 000,00 |
| Cuba | 1 | 3 000 | 3 000,00 |
| Centrifuga | 1 | 20 000 | 30 000,00 |
| Estanque | 2 | 1 800 | 3 600,00 |
| Envasadora | 1 | 12 000 | 12 000,00 |
| pH metro | 1 | 700 | 700,00 |
| Total de equipo de producción | | | 42 300,00 |
| Equipo auxiliar | | | 500,00 |
| Gastos de instalación y montaje | | | 2 115,00 |
| <u>TOTAL</u> | | | 44 915,00 |
| Equipos y muebles de oficina | | | |
| Computadoras | 1 | 900 | 900,00 |
| Escritorios | 1 | 300 | 300,00 |
| Sillas | 2 | 20 | 40,00 |
| Teléfono | 1 | 20 | 20,00 |
| Sillones | 1 | 120 | 120,00 |
| <u>TOTAL</u> | | | 1 380,00 |
| <u>TOTAL INVERSIÓN FIJA</u> | | | 147 045,00 |

ANEXO XV

DETALLE DEL CAPITAL DE OPERACIÓN

| Materiales directos | | | |
|----------------------------------------|-----------------------|---------------------------------|------------------------------|
| DENOMINACIÓN | Cantidad (Ton) | Valor (dólares) | Valor Total (dólares) |
| Semilla de chocho | 1 000,00 | 1 500,00 | 1 500 000,00 |
| Acido Clorhídrico | 1 400,00 | 8,10 | 11 340,00 |
| Sosa Caustica | 1 050,00 | 20,00 | 21 000,00 |
| Kit enzimas | | 2 000,00 | 2 000,00 |
| <u>TOTAL</u> | | | 1 534 340,00 |
| Mano de obra directa | | | |
| DENOMINACIÓN | N° | Sueldo Mensual (dólares) | Total Anual (dólares) |
| Calificados | 1 | 600,00 | 7 200,00 |
| Semi-calificados | 2 | 400,00 | 9 600,00 |
| No calificados | 1 | 240,00 | 2 880,00 |
| <u>SUMAN</u> | | | 19 680,00 |
| Cargas sociales (40,3 %) | | | 7 931,00 |
| <u>TOTAL</u> | | | 27 611,00 |
| <u>Carga fabril</u> | | | 131 002,00 |
| <u>Gastos de administración</u> | | | |
| PERSONAL | N° | Sueldo Mensual (dólares) | Total Anual (dólares) |
| Gerente | 1 | 1 500,00 | 18 000,00 |
| Secretaria | 1 | 400,00 | 4 800,00 |
| <u>SUMAN</u> | | | 22 800,00 |
| Cargas sociales (33,2 %) | | | 7 570,00 |
| <u>SUMAN</u> | | | 30 370,00 |
| Gastos de oficina | | | 124,00 |
| Gastos de constitución | | | 2 000,00 |
| <u>TOTAL</u> | | | 33 334,00 |
| <u>Gasto ventas</u> | | | |
| GASTOS DE PERSONAL | N° | Sueldo Mensual (dólares) | Total Anual (dólares) |
| Vendedor | 1 | 800,00 | 9 600,00 |
| <u>SUMAN</u> | | | 9 600,00 |
| Cargas sociales (33,2 %) | | | 3 187,00 |
| <u>SUMAN</u> | | | 12 787,00 |
| <u>GASTOS DE PROMOCIÓN</u> | | | |
| Publicidad | | | 1 000,00 |
| Teléfonos | | | 360,00 |
| Suministros | | | 540,00 |
| Movilización | | | 1200,00 |
| <u>TOTAL</u> | | | 15 887,00 |

ANEXO XVI

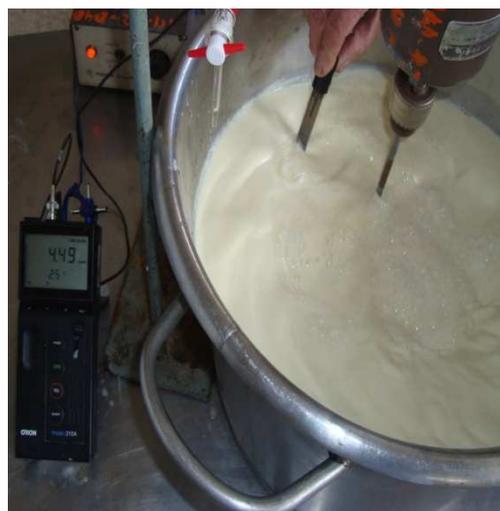
DETALLE DE LOS COSTOS DE PRODUCCIÓN Y GASTOS DE FINANCIAMIENTO

| Descripción | Dólares | % |
|-------------------------------|---------------------|---------------|
| Materiales directos | 1 534 340,00 | 90,63 |
| Mano de obra directa | 27 611,00 | 1,63 |
| Carga fabril | | |
| a) Mano de obra indirecta | 11 785,00 | 0,70 |
| b) Materiales indirectos | 54 250,00 | 3,30 |
| c) Depreciación | 7 878,00 | 0,47 |
| e) Suministros | 50 750,00 | 3,00 |
| d) Reparación y mantenimiento | 1 257,00 | 0,07 |
| f) Seguros | 2 513,00 | 0,15 |
| g) Imprevistos | 2 569,00 | 0,15 |
| <u>TOTAL</u> | 1 692 952,00 | 100,00 |

ANEXO XVII

**PROCESO DE OBTENCIÓN Y ELABORACIÓN DEL AISLADO
PROTEICO DE CHOCHO**

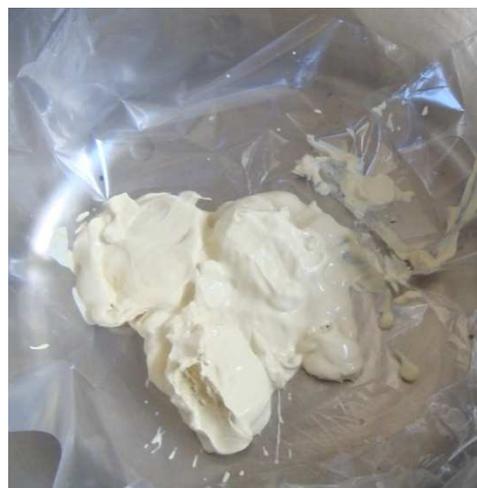
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 22. Aislado proteico de chocho (a) extracción básica a pH 10,50; (b) precipitación a pH 4,50; (c) centrifugación; (d) recolección de aislado en pasta

ANEXO XVIII

PROCESO DE ELABORACIÓN DEL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE CHOCHO



(a)



(b)

Figura 23. Hidrolizado enzimático de chocho: (a) aplicación de la papaína con tiempo de 60 minutos; b) aplicación de la flavourzyme con un tiempo de 90 minutos

ANEXO XIX

APLICACIÓN DEL HIDROLIZADO DE CHOCHO EN CULTIVO
DE BRÓCOLI

(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 24. Aplicación del fertilizante foliar: (a) Medición de plántulas de brócoli inicialmente, (b); Fertilización foliar del hidrolizado de chocho (c) Medición a la primera semana, (d) Medición a la cuarta semana de aplicación.