



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



Tema: “Caracterización de concentrados proteicos, determinación de la actividad antioxidante y cuantificación de fenoles solubles totales de fréjol rojo moteado (*phaseolus vulgaris*)”

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previa a la obtención de título de Ingeniero en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

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

Autor: Roberto Carlos Morán Reascos

Tutor: PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

Ambato – Ecuador

Noviembre – 2017

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

CERTIFICA:

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


Ambato, 13 de Julio del 2017



PhD. Dayana Morales
C.I.: 1804135570
TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Roberto Carlos Morán Reascos, manifiesto que los resultados obtenidos en el proyecto de investigación, previamente a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas.



Roberto Carlos Morán Reascos

CI: 1725581175

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:



Presidente del tribunal



Dr. Milton Rubén Ramos Moya
C.I. 1801119635



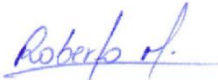
MSc. Cecilia Mercedes Carpio
C.I. 1704627650

Ambato, 10 de septiembre del 2017

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Trabajo de Titulación o parte de él, como un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo su reproducción parcial o total dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Roberto Carlos Morán Reascos
C.I.: 1725581175
AUTOR

DEDICATORIA

A mi Madre y a mi Padre

Y a Eva, por supuesto.

AGRADECIMIENTOS

A mi Madre y a mi Padre, por tanto, por todo, mis más viejos amigos.
A mis hermanos y hermanas, las personas más queribles que conozco.

Al Lic. Raúl Suárez y a la Sra. Ma. Eugenia Suárez por proporcionarme una maravillosa hospitalidad y una amistad que, aunque pasaren cientos de años, podré quizá corresponder, pero nunca pagar.

A Vanessa Navas, por su constante apoyo y aliento, y a otros amigos, que los cuento con los dedos de una mano, que me recuerdan lo bien que me llevo con la especie humana.

A Eva, por darlo todo sin condición, y por cosas que ocuparían miles de páginas más que esta investigación.

A mis tutores Ismael Carrillo y Dayana Morales, sin su paciencia y su cooperación mi tarea hubiese sido imposible.

A la Ing. Mónica Silva y al Laboratorio del proyecto de canje de deuda de la FCIAL cuya colaboración fue muy concreta e invaluable.

Desconfío de todos los sistemáticos y evito cruzarme con ellos. La voluntad de sistema denota falta de honradez.

Friedrich Nietzsche

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I.....	3
EL PROBLEMA	3
1.1 TEMA.....	3
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3 OBJETIVOS.....	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos	4
CAPÍTULO II	5
MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	5
2.2 HIPÓTESIS	6
2.2.1 Rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado	6
2.2.2 Determinación cuantitativa de proteína de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado.....	7
2.2.3 Electroforesis SDS – PAGE en presencia y ausencia del agente reductor	7
2.2.4 Fenoles totales en fréjol rojo moteado (Phaseolus vulgaris).....	7
2.2.5 Actividad antioxidante de los aislados proteicos de fréjol rojo moteado (Phaseolus vulgaris).....	8
2.3 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LAS HIPÓTESIS	8
2.3.1 Rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado	8
2.3.2 Determinación cuantitativa de proteína de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado.....	8
2.3.3 Electroforesis SDS – PAGE en presencia y ausencia del agente reductor	9
2.3.4 Actividad antioxidante de los aislados proteicos de fréjol rojo moteado (Phaseolus vulgaris).....	9
CAPÍTULO III.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1 MATERIALES.....	10
3.1.1 Materia prima	10
3.1.2 Reactivos	10
3.1.3 Equipos.....	11
3.1.4 Insumos y utensilios.....	12

3.2	MÉTODOS.....	13
3.2.1	Obtención de harina de fréjol rojo moteado (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	13
3.2.2	Análisis proximal	13
3.2.3	Concentrado de proteínas de fréjol rojo moteado (<i>Phaseolus vulgaris</i>) .14	
3.2.4	Rendimiento en la obtención de concentrados proteicos de fréjol rojo moteado	15
3.2.5	Caracterización del concentrado proteico de fréjol rojo moteado (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	15
3.2.5.1	Determinación cuantitativa de proteína de los concentrados mediante el método Dumas	15
3.2.5.2	Digestibilidad gastrointestinal in vitro de la proteína de fréjol rojo moteado (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	16
3.2.5.2.1	Digestión gástrica.....	16
3.2.5.2.2	Digestión duodenal.....	17
3.2.5.3	Electroforesis SDS - PAGE	17
3.2.5.4	RP - UHPLC (reverse phase – ultra high-performance liquid chromatography).....	18
3.2.5.5	Evaluación de la inhibición de peroxidación lipídica (TBARS) de concentrados proteicos de fréjol rojo moteado.	19
3.2.5.6	Determinación de compuestos fenólicos solubles totales en fréjol rojo moteado (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	20
3.2.6	Análisis Estadístico	20
CAPÍTULO IV.....		21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		21
4.1	Análisis y discusión de los resultados	21
4.1.1	Análisis proximal de fréjol rojo moteado (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	21
4.1.2	Rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado	22
4.1.3	Determinación cuantitativa de proteína de los concentrados mediante el método Dumas	23
4.1.4	Electroforesis.....	24
4.1.4.1	Electroforesis Native – PAGE	24
4.1.4.2	Electroforesis SDS – PAGE en presencia del agente reductor	25
4.1.4.3	Electroforesis SDS – PAGE en ausencia del agente reductor	26
4.1.5	Digestibilidad gastrointestinal in vitro de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	28
4.1.6	RP – UHPLC.....	30
4.1.7	Determinación de fenoles totales en fréjol rojo moteado (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	35

4.1.8	Actividad antioxidante de los aislados proteicos de fréjol rojo moteado (Phaseolus vulgaris).....	37
4.2	Verificación de la hipótesis	39
4.2.1	Rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado	39
4.2.2	Determinación cuantitativa de proteína de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado.....	39
4.2.3	Electroforesis SDS – PAGE en presencia y ausencia del agente reductor	39
4.2.4	Fenoles totales en fréjol rojo moteado (Phaseolus vulgaris).....	39
4.2.5	Actividad antioxidante de los aislados proteicos de fréjol rojo moteado (Phaseolus vulgaris).....	40
CAPÍTULO V		41
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		41
5.1	Conclusiones	41
5.2	Recomendaciones.....	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		43
ANEXOS		48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos de análisis proximal de harina de fréjol rojo moteado	13
Tabla 2. Métodos utilizados para cuantificación de humedad, cenizas y grasa	14
Tabla 3. Análisis proximal de harina de fréjol rojo moteado.....	21
Tabla 4. Contenido promedio de análisis realizados en harina de fréjol rojo moteado	21
Tabla 5. Contenido promedio de proteínas en concentrados de fréjol rojo moteado.	24
Tabla 6. Contenido de polifenoles totales en fréjol rojo	36
Tabla 7. Datos para el cálculo de contenido de humedad en harina de fréjol rojo ...	49
Tabla 8. Datos para el cálculo de contenido de ceniza en harina de fréjol rojo	49
Tabla 9. Datos del rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol rojo	50
Tabla 10. Datos obtenidos por el equipo Dumas Nitrogen Analyzer.....	50
Tabla 11. Datos obtenidos por el equipo Dumas, para la curva de calibración con EDTA	51
Tabla 12. Datos obtenidos para la curva de calibración con ácido gálico para la cuantificación de fenoles.....	52
Tabla 13. Absorbancias de las muestras a pH 3 para la determinación de la inhibición de peroxidación lipídica.	52
Tabla 14. Absorbancias de las muestras a pH 4 para la determinación de la inhibición de peroxidación lipídica.	53
Tabla 15. Absorbancias de las muestras a pH 5 para la determinación de la inhibición de peroxidación lipídica.	53
Tabla 16. Absorbancias de las muestras a pH 6 para la determinación de la inhibición de peroxidación lipídica.....	53
Tabla 17. Porcentajes de inhibición de peroxidación lipídica de los concentrados proteicos de fréjol rojo.	54
Tabla 18. Porcentajes de inhibición de peroxidación lipídica del BHT	55
Tabla 19. Análisis de varianza de una vía de los promedios del rendimiento de los concentrados proteicos.	56
Tabla 20. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los promedios de rendimiento de los concentrados proteicos.	56
Tabla 21. Promedios y desviación estándar de los rendimientos de los concentrados proteicos	56
Tabla 22. Análisis de varianza de una vía de los promedios del contenido proteico de los concentrados	57
Tabla 23. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los promedios del contenido proteico de los concentrados	57
Tabla 24. Promedios y desviación estándar del contenido proteico de los concentrados.....	57
Tabla 25. Análisis de varianza de una vía de los promedios del contenido de polifenoles de los sobrenadantes	58
Tabla 26. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los promedios del contenido de polifenoles de los sobrenadantes	58

Tabla 27. Promedios y desviación estándar del contenido de polifenoles de los sobrenadantes	58
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Promedios y desviación estándar de los rendimientos en base a la masa de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado, a los distintos pH de precipitación.....	22
Figura 2. Promedio y desviación estándar de los contenidos proteicos de los concentrados de harina de fréjol rojo moteado.	23
Figura 3. Electroforesis Native-PAGE de proteínas concentradas de fréjol rojo moteado, obtenidas mediante precipitación isoelectrica a diferentes pH.	25
Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE en ausencia del agente reductor 2-mercaptoetanol de proteínas aisladas de fréjol rojo obtenidas mediante precipitación isoelectrica a diferentes pH.	26
Figura 4. Electroforesis SDS-PAGE, en presencia del agente reductor 2-mercaptoetanol, de proteínas aisladas de fréjol rojo obtenidas mediante precipitación isoelectrica a diferentes pH.	27
Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2-mercaptoetanol del concentrado de proteínas de fréjol rojo hidrolizadas in vitro a pH 1,2.....	29
Figura 7. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2-mercaptoetanol del concentrado de proteínas de fréjol rojo hidrolizadas in vitro a pH 2,0.....	30
Figura 8. Cromatograma que muestra la separación peptídica del concentrado proteico de fréjol rojo moteado.	31
Figura 9. Cromatograma que muestra la separación peptídica de los hidrolizados gástricos del concentrado proteico de fréjol rojo moteado, obtenido a pH 1,2..	32
Figura 10. Cromatograma que muestra la separación peptídica de los hidrolizados gástricos del concentrado proteico de fréjol rojo moteado, obtenido a pH 2,0..	33
Figura 11. Cromatograma que muestra la separación peptídica de los hidrolizados gástricos del concentrado proteico de fréjol rojo moteado, obtenido a pH 3,2..	33
Figura 12. Cromatograma que muestra la separación peptídica de los hidrolizados duodenales del concentrado proteico de fréjol rojo moteado, obtenido a pH 1,2.	34
Figura 13. Cromatograma que muestra la separación peptídica de los hidrolizados duodenales del concentrado proteico de fréjol rojo moteado, obtenido a pH 2,0.	35
Figura 14. Cromatograma que muestra la separación peptídica de los hidrolizados duodenales del concentrado proteico de fréjol rojo moteado, obtenido a pH 3,2.	35
Figura 15. Reacción con Folin-Ciocalteu en los sobrenadantes separados de la precipitación isoelectrica de proteínas. pH de izquierda a derecha van desde el 3 al 7.....	37
Figura 16. Inhibición de peroxidación lipídica (TBARS) de concentrados proteicos obtenidos de fréjol rojo a concentraciones de 0,25; 0,5; 1,0 y 2,0 mg/mL. BHT antioxidante sintético (control). Los resultados fueron representados como media de tres replicas experimentales \pm SD (n= 3). ***Indica diferencias estadísticas P <0.05 comparada con el control positivo.....	38

Figura 17. Curva de calibración del equipo Dumas.....	51
Figura 18. Curva estándar de ácido gálico para cálculo de polifenoles.....	52
Figura 19. Precipitación isoelectrica de proteínas	59
Figura 20. Liofilización de los concentrados proteicos	59
Figura 21. Concentrados proteicos de fréjol rojo moteado liofilizados.....	60
Figura 22. Digestión de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado liofilizados.....	60
Figura 23. RP – UHPLC	61

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. DATOS OBTENIDOS	49
ANEXO B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
ANEXO C. FOTOGRAFÍAS	59

RESUMEN

En este estudio se obtuvieron concentrados proteicos a partir de harina de fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*) mediante precipitación isoeléctrica. La extracción fue realizada a pH 8,0 para la solubilización y a pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 y 7,0 para la precipitación. Se obtuvo mayor contenido proteico (69,1%) en pH 6,0 de precipitación. Mediante el método de electroforesis SDS-PAGE se determinó la presencia, con mayor concentración, de faseolinas y lectinas, con pesos moleculares de 50 y 30 kDa, respectivamente. Se realizó el ensayo de digestión gastrointestinal *in vitro* y se comprobó que las faseolinas son altamente resistentes a la hidrólisis. Mediante la técnica de RP-UHPLC se observó que existió mayor hidrólisis en el concentrado digerido a pH 1,2. La determinación del contenido de polifenoles totales se realizó en los sobrenadantes obtenidos en la precipitación isoeléctrica, a pH 7 de precipitación se obtuvo una concentración de 521,7 mg GAE/L. En el ensayo de evaluación de la inhibición de peroxidación lipídica (TBARS) se obtuvo un mayor porcentaje de inhibición con el concentrado proteico obtenido a pH 4,0 de precipitación, a una concentración de 2,0 mg/mL de aceite de oliva, con un valor de 96,78%, superior a la actividad del BHT.

Palabras clave: leguminosas, *Phaseolus vulgaris*, actividad antioxidante, concentrados proteicos, electroforesis.

ABSTRACT

In this study, protein concentrates were obtained from speckled red bean meal (*Phaseolus vulgaris*) by isoelectric precipitation. The extraction was performed at solubilization pH 8.0 and precipitation pH values 2.0; 3.0; 4.0; 5.0; 6.0; 7.0. Higher protein content was obtained (69.1%) at precipitation pH 6.0. By means of the SDS-PAGE electrophoresis method, the presence of phaseolins and lectins was determined with molecular weights of 50 and 30 kDa respectively. The *in vitro* digestion assay was performed. It was observed that the phaseolins are highly resistant to hydrolysis. By means of the RP-UHPLC technique was determined that the hydrolysis was higher in the concentrate digested at pH 1.2. Total polyphenol content was determined in the supernatants obtained in the isoelectric precipitation. At precipitation pH 7, a concentration of 521.7 mg GAE/L was obtained. In the evaluation of lipid peroxidation inhibition, a higher activity (96.78%) was attained with the protein concentrate produced at precipitation pH 4.0 using a concentration of 2 mg/mL olive oil, an activity higher than that of the antioxidant BHT.

Keywords: legumes, *Phaseolus vulgaris*, antioxidant activity, protein concentrates, electrophoresis.

INTRODUCCIÓN

El fréjol (*Phaseolus vulgaris*) originario de América, es conocido en los países hispanohablantes con diversos nombres, siendo judías, alubias, habichuelas, frijoles, fréjoles y porotos los más comunes. El fréjol rojo moteado es una planta perteneciente a la familia Fabaceae, con una altura de 45 a 50 cm, con una vaina de 11 a 13 cm, con 10 a 12 vainas por planta y 4 a 5 granos por vaina (**INIAP, 2012**).

El fréjol es una leguminosa de gran importancia mundial, siendo en muchos países, sobre todo en los países en vías de desarrollo, un alimento básico. La producción mundial de fréjol seco se estima en 23 millones de toneladas, concentrándose el 38% de la producción en Birmania, India y China (**MAGAP, 2013**).

En el Ecuador en el año 2013 se exportaron 12507 toneladas de fréjol (**MAGAP, 2013**), pero no se exportan productos procesados a partir de fréjol. Por esta razón, para aumentar el uso de esta leguminosa en la industria es importante estudiar sus propiedades e identificar sus posibles aplicaciones.

Los concentrados y aislados proteicos de fréjol rojo podrían ser utilizados en la elaboración de nuevos productos alimenticios, en sustitución de las proteínas tradicionales de leche o soya. Además, en la actualidad se considera al fréjol como un alimento funcional, reportándose en diversos estudios propiedades terapéuticas y beneficios para la salud (**Xu & Chang, 2008**).

El fréjol, además de su gran contenido proteico, posee compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes, especialmente los que tienen cáscara con colores intensos. Esto hace que además de proveer proteínas, carbohidratos y fibra, el fréjol rojo podría ayudar a prevenir enfermedades por sus compuestos bioactivos (**Madhujith1 et al., 2004**).

Poca información se encuentra disponible en literatura sobre concentrados proteicos, componentes fenólicos y actividad antioxidante en fréjol rojo moteado. Es importante conocer las proteínas que conforman una leguminosa ya que su calidad nutricional depende de los aminoácidos que componen la proteína y de la digestibilidad (**Camacho et al., 2010**). Además, el conocimiento de las propiedades y

características de una variedad específica puede ser aprovechado para la creación de nuevas variedades mejoradas. Por todo lo anteriormente mencionado el objetivo del presente estudio fue la caracterización de concentrados proteicos obtenidos de fréjol rojo moteado, además la determinación de su actividad antioxidante y contenido de polifenoles totales.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 TEMA

CARACTERIZACIÓN DE CONCENTRADOS PROTEICOS, DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES SOLUBLES TOTALES DE FRÉJOL ROJO MOTEADO (*Phaseolus vulgaris*).

1.2 JUSTIFICACIÓN

Dentro de las leguminosas, el fréjol es una especie importante en la dieta de la población mundial, especialmente en países en vías de desarrollo, ya que constituye una fuente importante de proteínas para poblaciones con escasez de proteína animal (**Mishra et al., 2017**).

El contenido de proteína en las leguminosas presenta un rango de 17 a 40%, en comparación con el contenido proteico de los cereales (7 a 13%) y las carnes (18 a 25%) (**Mallikarjunan et al., 2014**), por este motivo, en esta investigación se obtendrán concentrados proteicos de fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*) para su caracterización, contribuyendo así, al estudio de proteínas de origen vegetal, alimentos funcionales y compuestos bioactivos.

Además del contenido proteico, en la composición del fréjol rojo se encuentran presentes otros compuestos importantes, como los polifenoles, de los que se ha reportado poseer propiedades anticancerígenas y antioxidantes, razón por la cual se ha relacionado al consumo de fréjol rojo con la disminución del riesgo de padecer enfermedad cardíaca y cáncer de colon (**Marathe et al., 2016**).

En los últimos años existe una creciente preocupación por la salud, por lo que mantener una alimentación saludable se ha convertido en una prioridad para la sociedad. La disminución del riesgo de padecer enfermedades y mantener la buena salud, se han asociado a varios componentes proteicos de origen vegetal, principalmente de leguminosas, e incluso a varias proteínas y péptidos procedentes

de semillas de leguminosas se les ha llegado a considerar como alimentos nutraceuticos (Carbonaro *et al.*, 2015).

El estudio del contenido proteico de fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*) y su actividad antioxidante aportará información valiosa al área de estudio en auge de los alimentos funcionales, además ampliará la información científica de los alimentos que forman parte importante de la dieta de los ecuatorianos y población mundial en general, pudiendo ser guía para futuras investigaciones o desarrollo de aislados proteicos funcionales de origen vegetal con la finalidad de incrementar la utilización de las proteínas de fréjol rojo moteado en aplicaciones en la industria alimentaria.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Caracterizar las proteínas y determinar el contenido de polifenoles de fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*).

1.3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar las proteínas solubles de fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*) en un rango de pH de 3 a 7.
- Valorar la actividad antioxidante de la proteína de fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*) mediante el método TBARS.
- Determinar la presencia de fenoles totales presentes en el fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*).
- Determinar la cantidad de proteína presente en los concentrados de fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*) mediante el equipo Dumas

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Los concentrados y aislados de proteínas vegetales muestran ventajas económicas significativas frente a las proteínas lácteas y cárnicas, además de los beneficios que como alimentos funcionales presentan (**Jafari *et al.*, 2016**). Una excelente fuente de proteínas vegetales es el fréjol, que posee aminoácidos esenciales importantes para una buena salud (**Reyes-Bastidas *et al.*, 2010**).

La demanda de proteínas ha crecido rápidamente en los últimos años, los consumidores toman conciencia de los valores nutricionales y funcionales de los alimentos. Especialmente buscan el consumo de proteínas vegetales, por muchos factores importantes, tales como, su alta disponibilidad, su bajo costo de fabricación, debido a creencias y tendencias, como el vegetarianismo, y también por los beneficios que estas proteínas traen consigo (**Timilsena *et al.*, 2016**).

Por esta razón, se han desarrollado diversos métodos de extracción o aislamiento de proteínas vegetales, siendo el más utilizado el método de precipitación isoeléctrica, considerado el método convencional (**Castel *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2010; Boye *et al.*, 2010; Mondor *et al.*, 2009**), por su factibilidad, repetibilidad e incluso, en la mayoría de los casos por lograr los mejores resultados al obtener la mayor concentración de proteína como demuestran diversos estudios.

Una parte importante de la caracterización de las proteínas es la cuantificación proteica; aunque existen varios métodos de cuantificación, el método Kjeldahl ha sido siempre utilizado como referencia, por su repetibilidad y precisión en el análisis cuantitativo de nitrógeno, pero presenta las desventajas de que el análisis requiere de un tiempo considerablemente elevado y el empleo de reactivos peligrosos. Por esta razón, en el presente estudio la determinación del nitrógeno presente en el fréjol rojo moteado se llevó a cabo mediante la utilización del método de Dumas, que en varios

estudios ha demostrado ser tan preciso como el método de Kjeldahl y con un tiempo de análisis mucho menor (**Saint-Denis & Goupy, 2004; Etheridge *et al.*, 1998**).

La electroforesis SDS – PAGE (sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis) es una técnica ampliamente utilizada en laboratorios de investigación en el campo de los alimentos, ya que sirve, principalmente, para la separación de ácidos nucleicos y proteínas, se basa en la aplicación de corriente eléctrica sobre un gel de poliacrilamida en el que se encuentra depositada la muestra a analizar, razón por la cual, es un procedimiento crucial en la caracterización de proteínas vegetales. Esta técnica analítica permite identificar la presencia y ausencia de las proteínas en una muestra. Permite caracterizar las muestras mediante su peso molecular usando un estándar de referencia (**Chevalier, 2011**).

El método de Folin y Ciocalteu es un muy conocido en la industria de alimentos por ser utilizado para cuantificar los fenoles totales en vino, y se ha utilizado en diversas matrices alimentarias (aceites, leche obtenida de diferentes mamíferos, infusiones de té, tomate, jugo de manzana, etc.), porque proporciona resultados confiables (**Rover & Brown, 2013; Velázquez *et al.*, 2015; Shaghghi *et al.*, 2008**).

Para la determinación de la actividad antioxidante se usó el ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBA), que se ha aplicado ampliamente en la medición de la oxidación de los lípidos en los alimentos (**Guzmán-Chozas, Vicario & Guillén-Sans, 1997**). Es un método considerablemente sensible y fiable si se lo realiza en condiciones estandarizadas (**Kamal Eldin, 2010**), y se lo ha aplicado a diversos aceites de varias matrices alimentarias.

2.2 HIPÓTESIS

2.2.1 Rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado

Hipótesis nula

Ho: Las medias de los rendimientos de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado son iguales en todos los valores de pH de precipitación.

Hipótesis alternativa

Ha: Por lo menos una de las medias de los rendimientos de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado no es igual a las demás.

2.2.2 Determinación cuantitativa de proteína de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado

Hipótesis nula

Ho: El contenido proteico de los concentrados de fréjol rojo moteado es igual en todos los valores de pH de precipitación.

Hipótesis alternativa

Ha: Por lo menos una de las medias de los contenidos proteicos de fréjol rojo moteado no es igual a las demás.

2.2.3 Electroforesis SDS – PAGE en presencia y ausencia del agente reductor

Hipótesis nula

Ho: Las proteínas evaluadas en presencia del agente reductor no difieren de las proteínas evaluadas en ausencia del agente reductor.

Hipótesis alternativa

Ha: Las proteínas evaluadas en presencia del agente reductor difieren de las proteínas evaluadas en ausencia del agente reductor.

2.2.4 Fenoles totales en fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*)

Hipótesis nula

Ho: El contenido de fenoles totales de los sobrenadantes producto de la precipitación isoelectrica de fréjol rojo moteado es igual en todos los valores de pH de precipitación.

Hipótesis alternativa

Ha: Por lo menos una de las medias de los contenidos de fenoles totales de los sobrenadantes no es igual a las demás

2.2.5 Actividad antioxidante de los aislados proteicos de fréjol rojo moteado
(Phaseolus vulgaris)

Hipótesis nula

Ho: La concentración y el pH de los concentrados proteicos no influyen significativamente en la inhibición de la peroxidación lipídica.

Hipótesis alternativa

Ha: La concentración y el pH de los concentrados proteicos influyen significativamente en la inhibición de la peroxidación lipídica

2.3 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LAS HIPÓTESIS

2.3.1 Rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado

Variable independiente: pH de precipitación de los concentrados proteicos.

Variable dependiente: rendimiento de los concentrados proteicos

2.3.2 Determinación cuantitativa de proteína de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado

Variable independiente: pH de precipitación de los concentrados proteicos.

Variable dependiente: contenido proteico de los concentrados

2.3.3 Electroforesis SDS – PAGE en presencia y ausencia del agente reductor

Variable independiente: agente reductor

Variable dependiente: perfil proteínico de concentrados de fréjol rojo

2.3.4 Actividad antioxidante de los aislados proteicos de fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*)

Variable independiente: La concentración y el pH de los concentrados proteicos

Variable dependiente: inhibición de la peroxidación lipídica

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Materia prima

El fréjol rojo moteado utilizado fue adquirido en la ciudad de Ambato en el supermercado Megamaxi.

3.1.2 Reactivos

- 2-mercaptoetanol, Bio-Rad
- Aceite de oliva virgen
- Aceite mineral, Bio-Rad
- Ácido acético glacial 100 %, Merck
- Ácido clorhídrico fumante 37 %, Merck
- Ácido etilendiaminotetraacético, Velp
- Ácido gálico, Merck
- Ácido tiobarbitúrico, Applichem Panreac
- Acrilamida, Invitrogen Bio-Rad
- Albúmina de suero bovino, Thermo Scientific
- Azul de bromofenol, Bio-Rad
- Azul de Coomassie, Bio-Rad
- Bicarbonato de sodio
- Butil hidroxil tolueno (BHT), VULKANOX
- Carbonato de sodio, Merck
- Cloruro de sodio, Multiciencias
- Dodecil sulfato de sodio, Invitrogen
- Estándar de proteínas Tri Color, Bioland

- Folin-Ciocalteu, Biomedicals
- Glicerol, Invitrogen
- Glicina, Sigma
- Hidróxido de sodio, Merck
- Kit Pierce™ Microplate BCA Protein Assay, Thermo Fisher Scientific
- Kit para electroforesis bidimensional de Bio-Rad
- Metanol, Merck
- N, N'-Metilenbisacrilamida, Invitrogen
- Pancreatina de páncreas porcino, Emprove
- Pepsina gástrica porcina, Sigma
- Peróxido de hidrógeno, Scharlau
- Persulfato de amonio, Bio-Rad
- Sales biliares (Taurocolato y Glycodesoxicolato de sodio), Sigma
- Sulfato de cobre pentahidratado, H.V.O.
- Tartrato de sodio y potasio
- TEMED (N, N, N', N' tetrametiletilendiamina,), Bio-Rad
- Tris-HCl, Bio-Rad
- Tween, 20 Merck
- Yoduro de potasio, Merck

3.1.3 Equipos

- Analizador de nitrógeno Dumas NDA 701
- Balanza analítica Mettler Toledo
- Centrífuga Eppendorf 5702
- Equipo de electroforesis Bio-Rad Mini –PROTEAN® Tetra System
- Equipo RP – UHPLC Agilent Technologies 1260 Infinity Series
- Espectrofotómetro HACH DR-500
- Estufa VWR
- Incubadora VWR
- Liofilizador SP Scientific VirTis Bench Top Pro with Omnitronics

- Microcentrífuga Labnet C2400-B
- Microincubadora Esco ProvoCell
- Molino IKA M20
- pH-metro Mettler Toledo
- Plancha de agitación Isotemp (Fisher Scientific)
- Refrigerador, Mabe
- Ultra congelador, Panasonic MDF-U33V -86°
- Vórtex Mixer VWR

3.1.4 Insumos y utensilios

- Agua destilada
- Balones aforados de varios volúmenes
- Espátulas
- Frascos para muestras
- Frascos para reactivos
- Goteros
- Gradillas
- Guantes quirúrgicos
- Magnetos de agitación
- Marcadores
- Matraces (varios volúmenes)
- Micropipetas
- Micropipetas (varios volúmenes)
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Parafilm
- Probetas (100, 250, 500 y 1000 mL)
- Puntas de micropipeta
- Toallas absorbentes
- Tubos de centrifuga (50 mL)

- Tubos de ensayo
- Tubos Eppendorf (1,5 y 2,0 mL)
- Varillas de agitación
- Vasos de precipitación (250, 500, 1000 mL)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtención de harina de fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*)

Se molieron los granos secos de fréjol rojo moteado (1 kg) en un molino de impacto IKA de 20000 rpm para obtener la harina que se utilizó en los posteriores análisis.

3.2.2 Análisis proximal

El análisis proximal fue realizado en la estación experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicado en la ciudad de Quito y los métodos utilizados son citados en la tabla 1.

Tabla 1. Métodos de análisis proximal de harina de fréjol rojo moteado

Tipo de análisis	Unidad	Método
Humedad	%	MO-LSAIA-01.01
Cenizas	%	MO-LSAIA-01.02
Extracto etéreo o grasa	%	MO-LSAIA-01.03
Proteína o nitrógeno total	%	MO-LSAIA-01.04
Fibra cruda	%	MO-LSAIA-01.05
Elementos libres de nitrógeno	%	MO-LSAIA-01.06

Fuente: INIAP (2016)

Se realizaron además análisis de proteína, humedad, cenizas y grasa de la harina de fréjol en los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Los métodos utilizados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Métodos utilizados para cuantificación de humedad, cenizas y grasa

Tipo de análisis	Método
Humedad	PEO2-5.4-FQ. AOAC Ed 19, 2012 925.10
Cenizas	PEO1-5.4-FQ. AOAC Ed 19, 2012 923.03
Grasa	PE12-5.4-FQ. AOAC Ed 19, 2012 2013.06

Fuente: Laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

La proteína se analizó en el equipo Dumas Nitrogen Analyzer NDA 701 que se basa en el método Dumas, siguiendo el procedimiento establecido por el fabricante.

3.2.3 Concentrado de proteínas de fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*)

A partir de la harina de la molienda del fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*) se concentraron las proteínas mediante precipitación isoeléctrica, según el método de **Martínez y Añón, (1996)**, con ciertas modificaciones. Se disolvieron 10 g de harina en 100 mL de agua ultra pura, posteriormente se ajustó el pH 8.0 con NaOH 1 M, se mantuvo durante una hora en una plancha de agitación Isotemp (Fisher Scientific) a 800 rpm, esta solución se centrifugó durante 20 minutos a 4400 rpm. El sobrenadante obtenido después del centrifugado se ajustó a pH 3.0 con HCl 1 N, y se refrigeró por 72 horas, tiempo en el que ocurrió la precipitación del concentrado proteico, que a continuación fue congelado a -80 °C y liofilizado.

El procedimiento realizado después del centrifugado se repitió a pH 4, pH 5, pH 6 y pH 7, por triplicado.

3.2.4 Rendimiento en la obtención de concentrados proteicos de fréjol rojo moteado

El cálculo del rendimiento en la obtención de concentrados proteicos de harina de fréjol rojo moteado fue calculado en base a la masa del concentrado, mediante la aplicación de la fórmula:

$$\%R = \frac{W_f}{W_o} \times 100$$

Donde:

%R: Rendimiento de la concentración de proteína de fréjol rojo moteado.

W_f: masa en gramos del concentrado liofilizado.

W_o: masa inicial de la harina de fréjol rojo moteado.

Los promedios de los rendimientos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, permitiendo así comprobar si las diferencias entre las medias de los rendimientos obtenidos a diferentes pH de precipitación son estadísticamente significativas.

3.2.5 Caracterización del concentrado proteico de fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*)

3.2.5.1 Determinación cuantitativa de proteína de los concentrados mediante el método Dumas

Se realizó mediante el método Dumas, para ello primero fue necesario realizar una curva de calibración del equipo, siguiendo el procedimiento establecido por el fabricante para este fin. La curva de calibración se realizó varias veces hasta obtener

un coeficiente de determinación (r^2) de 0,999. Posteriormente se pesaron 50 mg de las muestras de concentrado proteico liofilizado y se analizaron en el equipo Dumas Nitrogen Analyzer NDA 701, configurado con las siguientes condiciones:

- Factor de oxígeno: 1,8 mL O₂/mg de muestra
- Tasa de flujo de oxígeno: 400 mL O₂/min
- Factor de proteína (fp) 5,70 (%N x fp = % prot.)

Este método consiste en la combustión a 1030 °C de una muestra de masa conocida, para obtener compuestos elementales, después de la combustión el agua es removida, primero, mediante una trampa física y después por una química. Entre estas dos trampas los analitos pasan por un horno de reducción y el nitrógeno es detectado mediante un detector de conductividad térmica. El porcentaje de proteína es calculado y presentado por el software del equipo.

3.2.5.2 Digestibilidad gastrointestinal *in vitro* de la proteína de fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*)

El proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* fue desarrollado y descrito previamente por **Jiménez-Saiz *et al* (2011)**.

3.2.5.2.1 Digestión gástrica

Esta digestión se realizó disolviendo los concentrados proteicos liofilizados en fluido gástrico simulado, cloruro de sodio (NaCl) 0,35 M, a tres diferentes pH (1,2 – 2,0 – 3,2) y con 50 μ L de pepsina porcina (2000 U/mL), se incubó a 37 °C durante 120 minutos a 500 rpm. Las muestras para determinar el grado de hidrólisis se tomaron a 60, 90 y 120 minutos. Para detener la hidrólisis se añadieron 200 μ L de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 1 M y se incubó por 5 minutos a 90 °C y a 500 rpm.

El grado de hidrólisis fue determinado mediante UHPLC y electroforesis SDS-PAGE.

3.2.5.2.2 Digestión duodenal

La digestión duodenal simulada se realizó con 1 mL de los productos de la digestión gástrica de los concentrados proteicos de *Phaseolus vulgaris*, al que se le añadió 1 mL de pancreatina de páncreas de cerdo (100 U/mL). Las soluciones resultantes se ajustaron a pH 7 y se incubaron a 37 °C por 3 horas a 500 rpm. La digestión se detuvo incrementando y manteniendo la temperatura a 90 °C durante 5 minutos a 500 rpm.

El grado de hidrólisis fue determinado mediante UHPLC.

3.2.5.3 Electroforesis SDS - PAGE

Los concentrados proteicos de *Phaseolus vulgaris* y sus hidrolizados fueron analizados mediante el uso de electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida, la cual se realizó en un equipo BioRad Mini – PROTEAN® Tetra System. Se prepararon soluciones de 10 mg/mL de los concentrados proteicos, a partir de las que se obtuvieron tres muestras. Las muestras fueron preparadas en el tampón para electroforesis en presencia y ausencia de un agente reductor (2-mercaptoetanol).

En presencia de agente reductor: Las muestras fueron preparadas con 200 µL de la solución original en un tubo Eppendorf de 1,5 mL, 4,8 mL de agua destilada, 1,2 mL de Tris-HCl con pH 6,8 y 0,5 M, 1 mL de glicerol puro, 2 mL de SDS al 10%, 0,6 mL de 2-mercaptoetanol, una punta de espátula de azul de bromofenol y se mantuvo durante 5 minutos a 90 °C y en agitación a 500 rpm.

En ausencia de agente reductor: Las muestras se prepararon colocando los ingredientes del procedimiento anterior con excepción de 2-mercaptoetanol, Las muestras fueron calentadas a 90°C durante 5 minutos con agitación constante a 500 rpm.

En la tercera muestra (native) se colocaron los mismos ingredientes que en la primera receta, a excepción de 2-mercaptoetanol y SDS, con la finalidad de mantener la proteína en su estado natural.

El gel de poliacrilamida, estuvo compuesto de dos geles, concentrador y separador. El primero con 4% de acrilamida, compuesto de: 2,2 mL de agua destilada, 0,42 mL de Tris-HCl 1,5 M con pH 6,8, 0,7 mL de acrilamida al 30%, 3,3 μ L de SDS al 10%, 6 μ L de TEMED y 20 μ L de PSA al 10%. El segundo gel, separador, con 12% de acrilamida, compuesto de: 1,425 mL de agua destilada, 3 mL de Tris-HCl 1 M con pH 8,8, 3 mL de acrilamida al 30%, 75 μ L de SDS al 10%, 9 μ L de TEMED y 30 μ L de PSA al 10%. Las soluciones antes descritas se gelificaron en la cuba del equipo de electroforesis vertical BioRad Mini – PROTEAN® Tetra System, colocando primero la solución del gel separador y después la solución del gel concentrador. Se colocaron en el gel 15 μ L de cada muestra de los concentrados, considerando que el gel dispone de una capacidad de 4 muestras más el estándar de pesos moleculares. La separación de las proteínas se efectuó a un voltaje de 200 V por 45 minutos.

El tampón añadido para la corrida (buffer running) de las muestras en presencia y ausencia del agente reductor se conformó de Tris-HCl (5 g/L), glicina (7,5 g/L) y SDS (0,5 g/L).

El tampón para la corrida de la tercera muestra (native) estuvo compuesto de Tris-HCl (1,5 g/L) y glicina (7,5 g/L)

Después de retirar los geles del equipo, para su correcta visualización, fueron sumergidos y mantenidos en una solución de azul de Coomassie (95% metanol, 5% azul de Coomassie) durante 12 horas con agitación constante para teñir las proteínas de las muestras, una vez cumplido este proceso, se retiró el exceso de azul de Coomassie con una solución de desteñido compuesta de 50 % de metanol, 5 % de ácido acético y 45 % de agua destilada.

3.2.5.4 RP - UHPLC (reverse phase – ultra high-performance liquid chromatography)

Para la técnica de RP-UHPLC se utilizaron 5 mg de muestra (concentrados e hidrolizados) disueltos en un mililitro de agua Mili-Q. Estas soluciones se centrifugaron a 13000 rpm durante un minuto para luego ser filtradas con membranas con poros de 0.45 μm .

Se emplearon dos fases: la fase A, constituida por agua Mili-Q y 0.27% de ácido trifluoroacético (TFA). La fase B, constituida de metanol y 0.27% de TFA.

El gradiente de análisis fue de 0% hasta 70% de B en una rampa de un lapso de 12 minutos con flujo de un mililitro por minuto y la columna utilizada fue EC C18 (Agilent Poroshell 120, 4.6 \times 50 mm, 2,7 μm de tamaño de partícula).

3.2.5.5 Evaluación de la inhibición de peroxidación lipídica (TBARS) de concentrados proteicos de fréjol rojo moteado.

Se determinó la actividad antioxidante de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado usando aceite de oliva previamente oxidado, mediante el método TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) basado en el protocolo de **Guzmán-Chozas et al. (1997)**.

Se diluyeron 200, 400, 1000 y 2000 μg de cada concentrado proteico en un mililitro de agua destilada. De las soluciones realizadas se tomaron 500 μL y se mezclaron con 500 μL de aceite de oliva previamente oxidado durante 5 días en una estufa a 68 $^{\circ}\text{C}$.

Las mezclas se incubaron con agitación constante a 500 rpm durante 8 h a 28 $^{\circ}\text{C}$, y en cada una se añadió 1 mL de TBA al 1 % preparado con 0,5g de TBA, 40 mL de ácido acético y 10 mL de agua destilada.

Además de las muestras, se preparó un control compuesto por 500 μL de aceite de oliva oxidado, 500 μL de agua destilada con BHT (2 mg/mL) y 1 mL de TBA al 1%.

Posteriormente las muestras se mantuvieron durante 60 minutos a 95 $^{\circ}\text{C}$ y se enfriaron a temperatura ambiente para finalmente realizar la lectura de las absorbancias de la emulsión a 532 nm de longitud de onda.

3.2.5.6 Determinación de compuestos fenólicos solubles totales en fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*)

Se determinaron mediante el método de **Folin y Ciocalteu (1927)**. Para esta determinación se utilizaron los sobrenadantes obtenidos en el proceso de concentrado de las proteínas de fréjol rojo moteado. Se tomaron 0,1 mL de cada sobrenadante y se les añadió un volumen igual de reactivo de Folin, inmediatamente se agitaron en un Vórtex Mixer VWR durante 3 minutos y se añadieron 2mL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7,5%. Esta mezcla se realizó en balones de aforo de 5 mL, que se completaron con agua ultrapura, para luego mantenerse en reposo por 60 minutos.

Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro calibrado para medir la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm. Se usó una curva de calibración realizada con concentraciones de 50, 100, 150 y 200 mg/L de ácido gálico.

3.2.6 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza de uno y dos factores (ANOVA) en el software científico estadístico GraphPad Prism en su versión 6.01 para Windows de GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA. Se determinaron diferencias significativas entre las medias con el test de comparación múltiple de Tukey a un nivel de significancia de 0,05.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis y discusión de los resultados

4.1.1 Análisis proximal de fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*)

Los resultados del análisis proximal realizados por el INIAP, de la harina de fréjol rojo moteado se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Análisis proximal de harina de fréjol rojo moteado

Tipo de análisis	Contenido (%)
Humedad	12,62 %
Cenizas	4,02 %
Extracto etéreo o grasa	1,35 %
Proteína o nitrógeno total	25,50 %
Fibra cruda	5,14 %
Elementos libres de nitrógeno	64,00 %

Fuente: INIAP (2016)

Los resultados obtenidos de los análisis realizados en los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Contenido promedio de análisis realizados en harina de fréjol rojo moteado

Tipo de análisis	Contenido (%)
Humedad	10,99 % ± 0,41
Cenizas	3,79 % ± 0,20
Grasa	6,9 % ± 0,6
Proteína	23,72 % ± 0,13

Fuente: Laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

El fréjol rojo es un alimento básico y una fuente importante de proteína para los países de América Latina, por ende, este estudio provee información significativa para la optimización del uso de la proteína de esta leguminosa en productos alimenticios. En la tabla 3 se muestra el contenido de proteína de la harina de fréjol rojo moteado de 25,5%, similar al obtenido en los análisis realizados en el laboratorio de alimentos funcionales mediante el método Dumas, en los que se obtuvo un promedio de 23,72%. Estos datos son semejantes a los obtenidos por **Barampama y Simard (1993)** que varían desde 17,75% hasta 24,31% en trece variedades analizadas de *Phaseolus vulgaris*, reportan además que las variaciones de contenido de proteína se deben a la localidad y la variedad.

4.1.2 Rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado

Los promedios de los rendimientos de los concentrados de harina de fréjol rojo se muestran en la figura 1 y los datos obtenidos (rendimientos, promedios y desviación estándar) se muestran en la tabla 9 de Anexos.

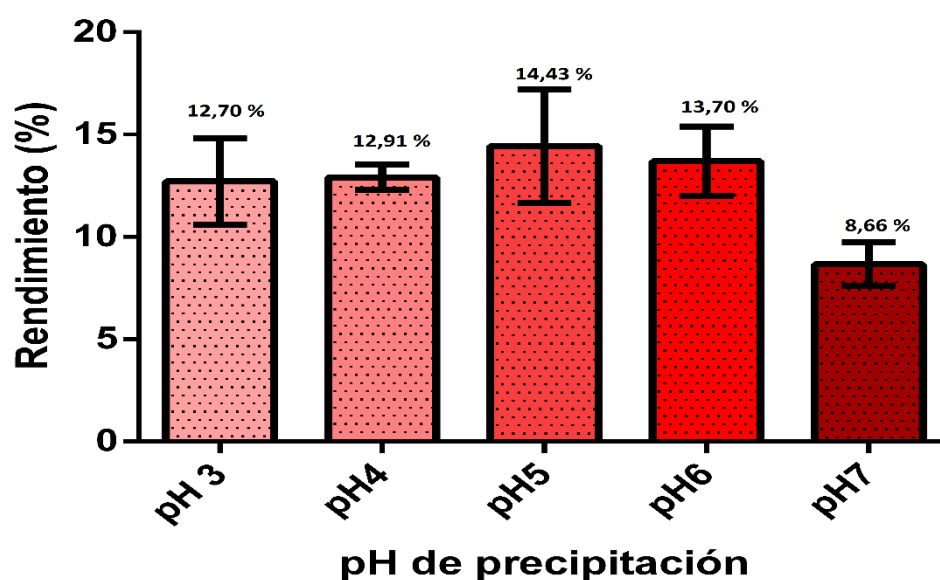


Figura 1. Promedios y desviación estándar de los rendimientos en base a la masa de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado, a los distintos pH de precipitación.

En la figura 1 se observa que se obtuvo un mayor rendimiento de concentrado con pH de precipitación 5,0 y 6,0 con 14,43 % y 13,70 %, respectivamente. Esto puede

deberse a que las proteínas mayormente presentes en las leguminosas son globulinas y albúminas y su punto isoeléctrico es de alrededor de pH 5,0 (Boye *et al.*, 2010). Sin embargo, Teniente-Martínez *et al.*, (2016) reportaron que el punto isoeléctrico varía según la calidad de los reactivos utilizados y la variedad de la leguminosa. El análisis de varianza de una vía (tabla 13 y 14 en Anexos) muestra que las diferencias entre las medias son estadísticamente significativas, esto quiere decir que el pH de precipitación de los concentrados proteicos sí influye en el rendimiento.

4.1.3 Determinación cuantitativa de proteína de los concentrados mediante el método Dumas

En la figura 2 se muestran los promedios de los porcentajes de contenido de proteínas de los concentrados. Los resultados fueron obtenidos mediante el método Dumas.

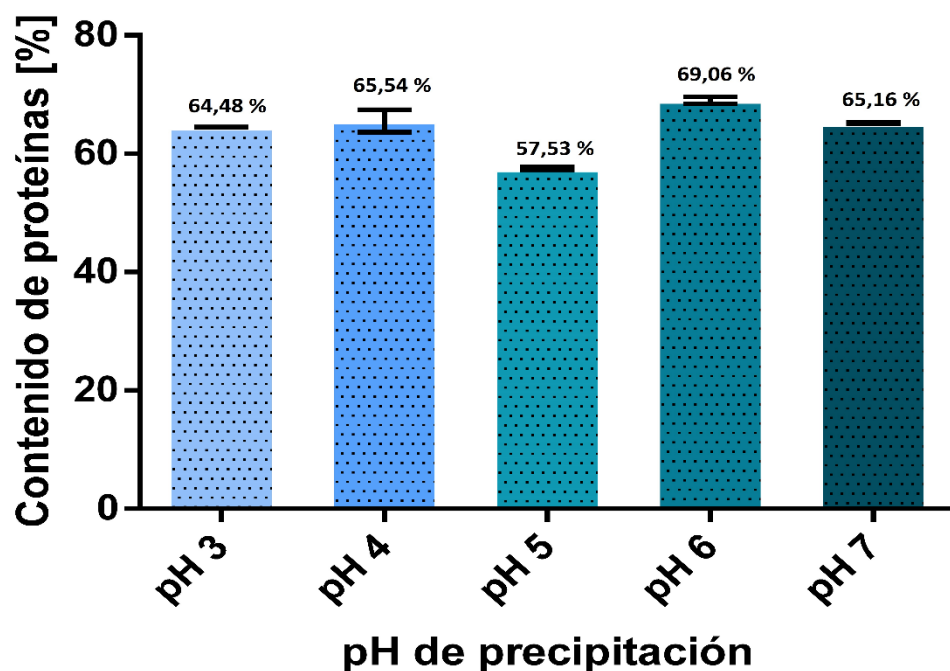


Figura 2. Promedio y desviación estándar de los contenidos proteicos de los concentrados de harina de fréjol rojo moteado.

El proceso de precipitación isoeléctrica de la harina concentró las proteínas casi 3 veces, se observa en la figura 2 los resultados obtenidos de los concentrados con

contenido de proteína que varió entre el 57,4% y el 69,1%, siendo el concentrado a pH 6,0 el que mayor contenido proteico presentó. Además, los datos fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía (tabla 16) y se determinó mediante el test de comparación múltiple de Tukey (tabla 17) que existen diferencias significativas entre los promedios (Tabla 5) a un nivel de significación de 0,05, es decir que el pH de precipitación de los concentrados influye significativamente sobre su contenido proteico.

Tabla 5. Contenido promedio de proteínas en concentrados de fréjol rojo moteado.

Muestra	R1 (%)	R2 (%)	Media (%)
Harina	23,810	23,620	23,715 ± 0,13
pH 3.0	64,484	64,466	64,475 ± 0,01
pH 4.0	64,188	66,889	65,539 ± 1,91
pH 5.0	57,381	57,684	57,533 ± 0,21
pH 6.0	68,631	69,48	69,056 ± 0,60
pH 7.0	65,268	65,054	65,161 ± 0,15

Fuente: Laboratorio del proyecto de canje de deuda FCIAL

Resultados similares fueron obtenidos en concentrados de diferentes especies de la familia Fabaceae (arveja, garbanzo y lenteja) en un estudio realizado por **Boye et al (2010)**, en el que el contenido proteico varió entre el 63.9 % y el 88.6 %.

4.1.4 Electroforesis

4.1.4.1 Electroforesis Native – PAGE

La electroforesis Native-PAGE (Figura 3) se realizó con la finalidad de separar las proteínas preparándolas en un buffer no desnaturizante ni reductor, que mantiene la estructura de las proteínas, para conocer su peso real.

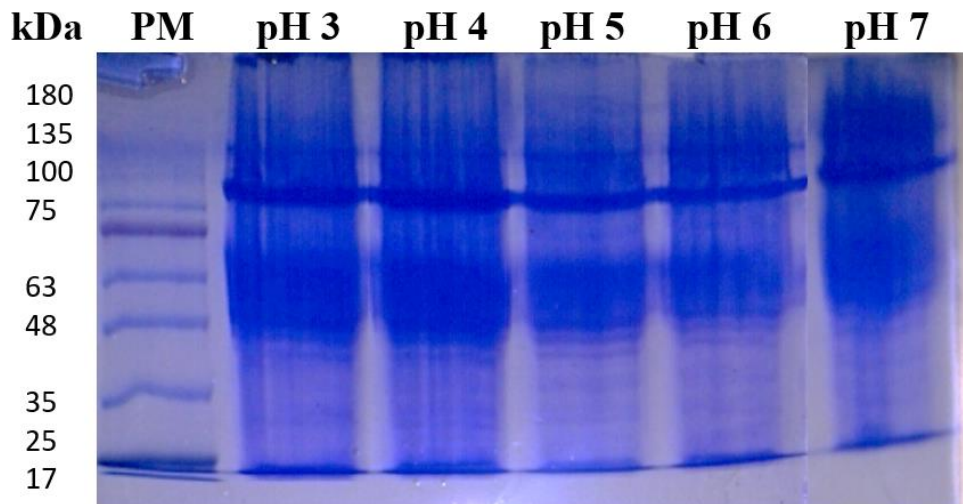


Figura 3. Electroforesis Native-PAGE de proteínas concentradas de fréjol rojo moteado, obtenidas mediante precipitación isoelectrica a diferentes pH.

En la figura 3 del gel Native-PAGE se observan fácilmente múltiples bandas porque las proteínas que se encuentran en formas polimerizadas han sido separadas. Las bandas que presentaron mayor intensidad en todos los pH de precipitación son las que se corresponden con los pesos moleculares de 50 y 100 kDa.

El perfil de todos los concentrados proteicos fue idéntico. Esto nos indica que en el rango de los pH 3,0 a 7,0 se lograron obtener el mismo tipo de proteínas con puntos isoelectricos distintos. Pueden ser isoformas moleculares.

Según **Boye *et al.* (2010)**, las proteínas que mayormente se encuentran en las leguminosas son las albúminas y las globulinas.

4.1.4.2 Electroforesis SDS – PAGE en ausencia del agente reductor

En la figura 5 se muestran los perfiles de proteínas en condiciones no reductoras de los concentrados proteicos de fréjol rojo.

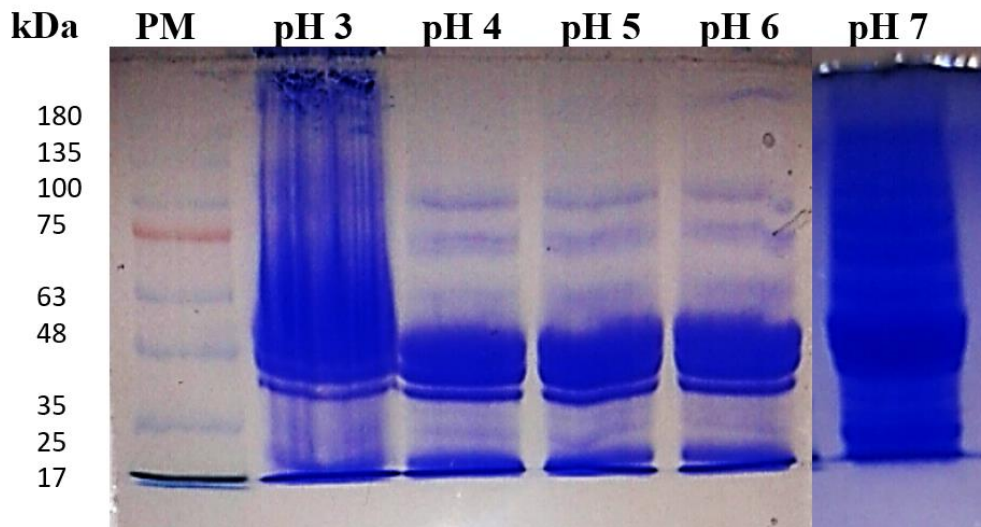


Figura 4. Electroforesis SDS-PAGE en ausencia del agente reductor 2-mercaptoetanol de proteínas aisladas de fréjol rojo obtenidas mediante precipitación isoeléctrica a diferentes pH.

Las bandas más visibles se encuentran en el rango de peso molecular de 35 y 48 kDa en todos los pH, además se pueden observar claramente, pero en menor proporción franjas en los pesos moleculares de 75 y 100 kDa en todas las muestras.

4.1.4.3 Electroforesis SDS – PAGE en presencia del agente reductor

Las distribuciones de los pesos moleculares de los concentrados proteicos se evaluaron también con SDS - PAGE bajo condiciones reductoras y se muestran en la figura 4.

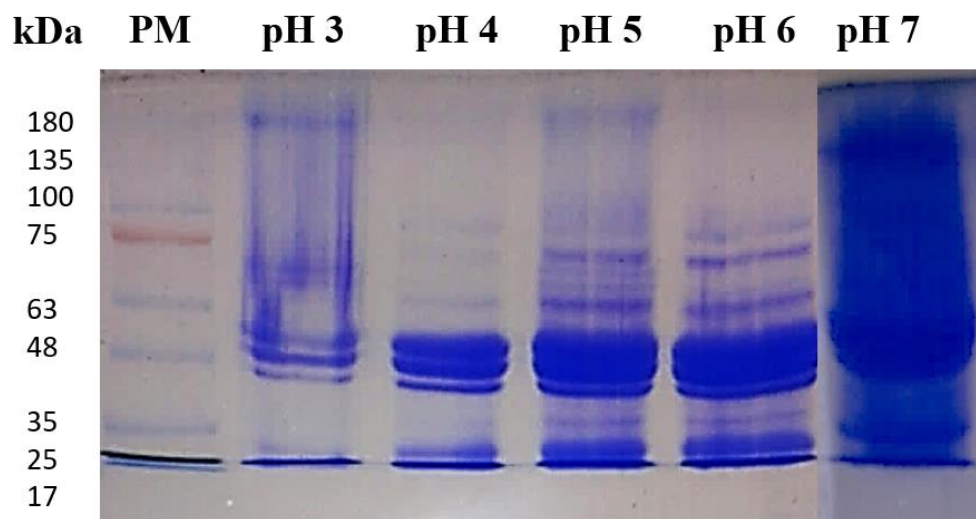


Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE, en presencia del agente reductor 2-mercaptoetanol, de proteínas aisladas de fréjol rojo obtenidas mediante precipitación isoeléctrica a diferentes pH.

Las bandas que se observan con mayor intensidad en todos los pH se encuentran en el peso molecular de 48 kDa, pero además se observan bandas claras en los pH 5,0 y 6,0 en los pesos moleculares de 63 y 75 kDa. Otras bandas son también visibles en todas las muestras, pero en menor proporción.

Las muestras con agente reductor no difieren mayormente de las muestras sin agente reductor, esto se debe a que las proteínas no están unidas en gran medida por puentes disulfuro. En ambos geles existe mayor concentración de proteína de peso molecular de alrededor de 50 kDa, estos resultados son similares a los obtenidos por **Camacho et al. (2010)** en un estudio realizado en tres variedades de *Phaseolus vulgaris*, en los que se observó que las proteínas predominantes son las de peso molecular de 50 kDa.

En base al estudio de **Camacho et al. (2010)** se puede deducir que las proteínas de peso molecular de 50 kDa observadas en las figuras 4 y 5 corresponden a la familia de las faseolinas y las proteínas que se encuentran en la banda de 30 kDa corresponden a las lectinas.

En un estudio realizado por **Blair et al. (2007)** en 180 accesiones cultivadas de fréjol se reporta que la faseolina representa más del 50% de la proteína en *Phaseolus*

vulgaris y que el tipo de faseolina encontrado con mayor concentración en el fréjol rojo moteado es la faseolina T.

De Toledo *et al.* (2013) realizaron un estudio en el que aislaron la faseolina de tres variedades de *Phaseolus vulgaris* y en el gel obtenido mediante electroforesis SDS-PAGE se observa que la faseolina se corresponde con el peso molecular de 50kDa.

4.1.5 Digestibilidad gástrica in vitro de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*)

La digestibilidad de proteínas evalúa el uso de una fuente de proteína, y puede verse afectada por diversos factores, siendo uno de ellos la presencia de compuestos fenólicos (**De Toledo *et al.*, 2013**).

En la figura 6 se presenta el gel de la digestión gástrica, en el que constan muestras tomadas a tiempos de 60, 90 y 120 minutos de iniciada la simulación de la digestión. La fracción mayormente visible es la de 48 kDa, se observa que no existe diferencia significativa entre los digeridos producidos a los distintos tiempos de digestión y además no presenta mucha diferencia con los concentrados sin digerir (Figuras 4 y 5), según **De Toledo *et al.* (2013)** esto puede deberse a que las faseolinas son altamente resistentes a la hidrólisis in vitro.

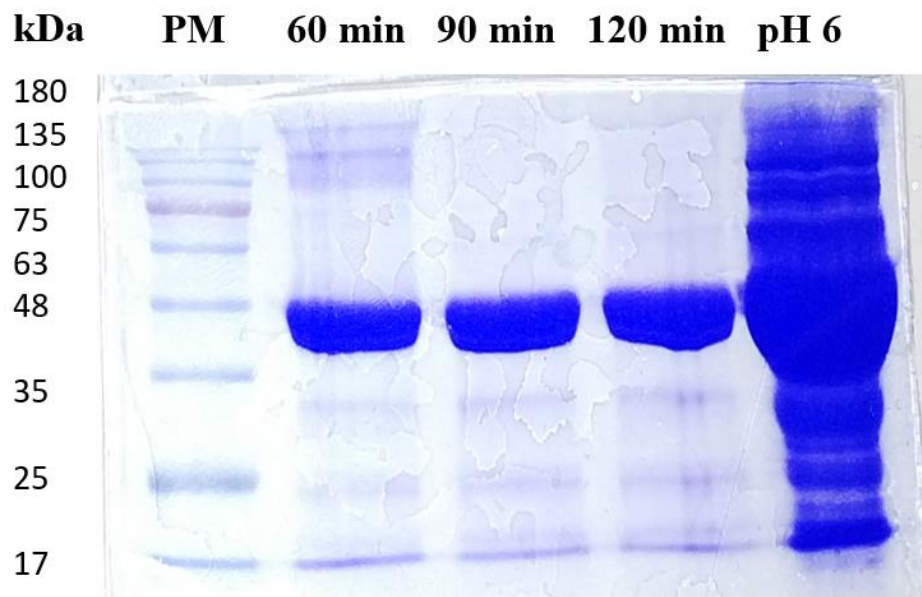


Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2-mercaptoetanol del concentrado de proteínas de fréjol rojo hidrolizadas in vitro a pH 1,2.

En la figura 6 se comparan los concentrados digeridos con el concentrado sin digerir, todos obtenidos del concentrado de pH 6,0 por ser el que mayor cantidad de proteína presentó. Las bandas de peso molecular de 50 kDa de los concentrados digeridos son levemente más delgadas que la franja del concentrado sin digerir, esto indica su baja digestibilidad. Lo mismo se puede observar en la figura 7 del gel obtenido con concentrados proteicos digeridos a pH 2,0, indicando que esta variación de pH no influye sobre la digestión. Sin embargo, las demás proteínas encontradas si se digieren, observable en las figuras 6 y 7. Las fracciones de peso molecular 35 kDa, correspondientes a las lectinas si presentan un decrecimiento de la banda después de la digestión, lo que indica su mayor facilidad de ser digeridas.

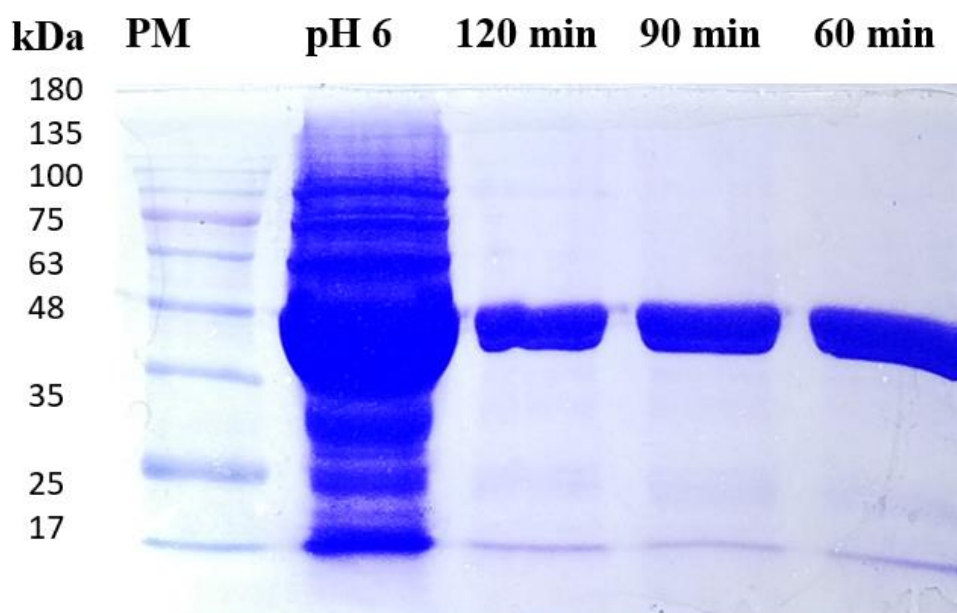


Figura 7. Electroforesis SDS-PAGE en presencia de 2-mercaptoetanol del concentrado de proteínas de fréjol rojo hidrolizadas in vitro a pH 2,0.

4.1.6 RP – UHPLC

La cromatografía líquida de alta eficacia de fase inversa separa los péptidos de los concentrados analizados según las diferencias de sus propiedades hidrofóbicas (Ajibola *et al.*, 2013). En la figura 8 se muestra el cromatograma obtenido mediante RP-UHPLC del concentrado proteico de pH 6, por ser la muestra que mayor contenido de proteína presentó. Todos los péptidos fueron eluidos en 12 minutos.

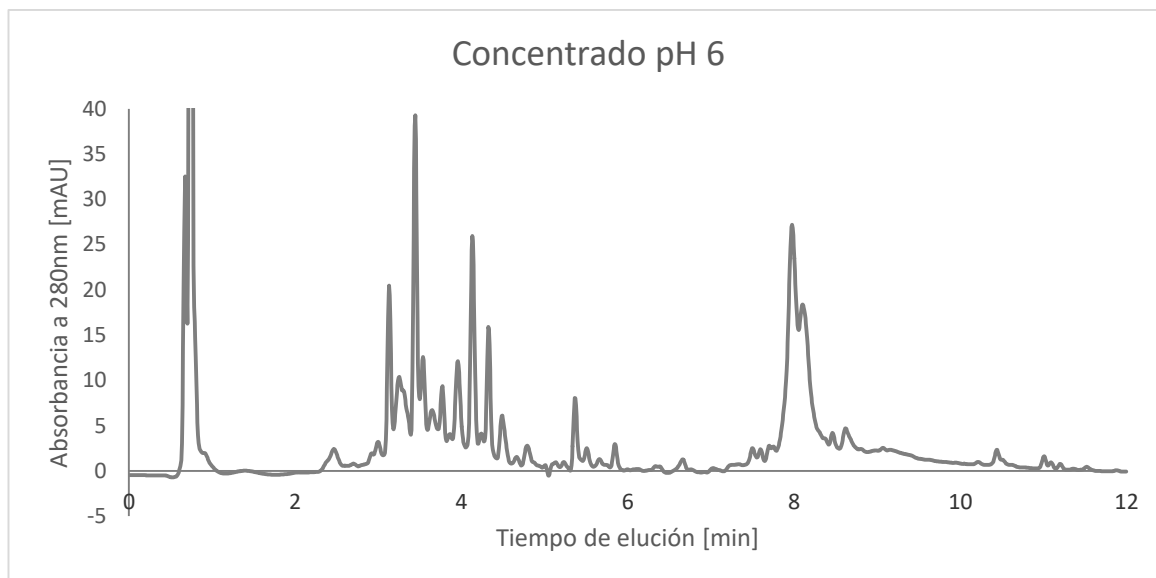


Figura 8. Cromatograma que muestra la separación peptídica del concentrado proteico de fréjol rojo moteado.

Las primeras fracciones (a partir del minuto dos) tienen el menor carácter hidrófobo en comparación de los siguientes picos, es decir que son más solubles y son eluidas con la fase A. La fracción retenida, que es detectada en el minuto 8 es muy hidrofóbica y ha sido eluida con la fase B. Realizando estudios más específicos, probablemente se encontraría que las primeras fracciones estarían compuestas de menor cantidad de aminoácidos hidrófobos. Resultados similares se describieron por **Ajibola et al. (2013)** en un estudio realizado en *Sphenostylis*, una leguminosa de la misma familia de *Phaseolus vulgaris*, en el que para obtener resultados más específicos separaron el cromatograma en fracciones mediante un colector automático de fracciones y determinaron la cantidad de proteína en cada fracción mediante el método modificado de Lowry (**Markwell et al., 1978**).

En las figuras 9, 10 y 11 se presentan los cromatogramas de los hidrolizados gástricos de concentrados de fréjol rojo moteado obtenidos a pH de 1,2; 2,0 y 3,2 respectivamente. Todos los péptidos fueron eluidos en 12 minutos. Los picos cromatográficos no se pudieron separar con mayor definición, según **Toapanta (2016)**, las proteínas vegetales son muy complejas para ser analizadas mediante RP – HPLC. El contenido de péptidos formados por aminoácidos hidrofóbicos presentó un incremento progresivo hasta el minuto 4,6 en la figura 9, hasta el minuto 4,7 en la

figura 10 y hasta el minuto 5,6 en la figura 11, a partir de estos tiempos en cada cromatograma la concentración de péptidos hidrofóbicos empezó a decrecer. Resultados similares fueron reportados por **Ajibola et al. (2013)**.

El perfil de los hidrolizados gástricos es totalmente distinto al compararlo con el perfil del concentrado a pH 6 sin hidrolizar. Existió mayor hidrólisis en el concentrado digerido a pH 1,2 (Figura 9).

En la figura 10 existió menos hidrólisis que a pH 1,2 pero existió concentración de péptidos en los tiempos de retención de 6,10 y 8,77 minutos solo en el pH de hidrólisis 2,0.

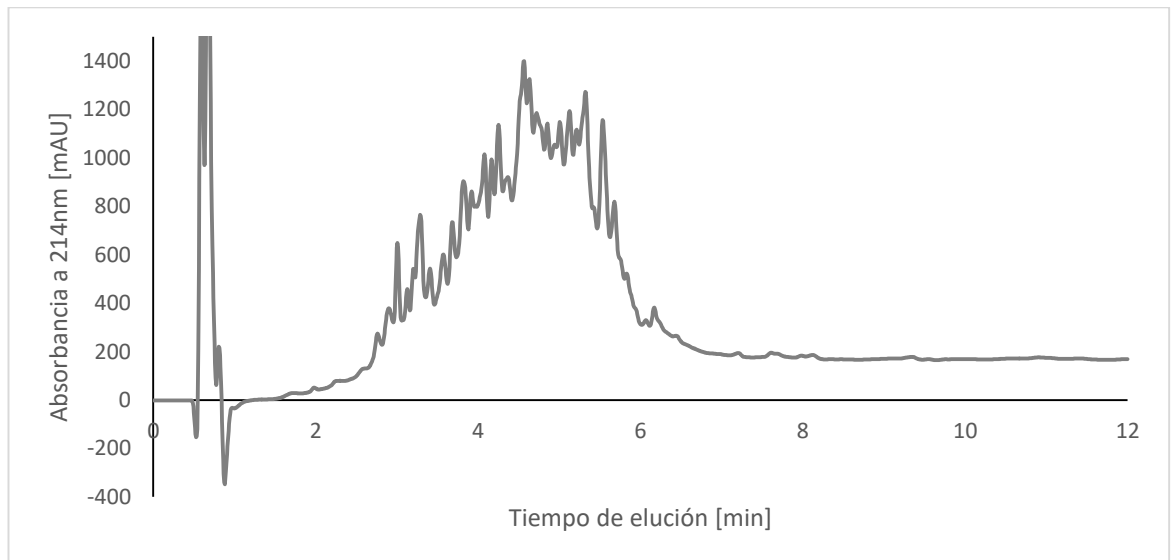


Figura 9. Cromatograma que muestra la separación peptídica de los hidrolizados gástricos del concentrado proteico de fréjol rojo moteado, obtenido a pH 1,2.

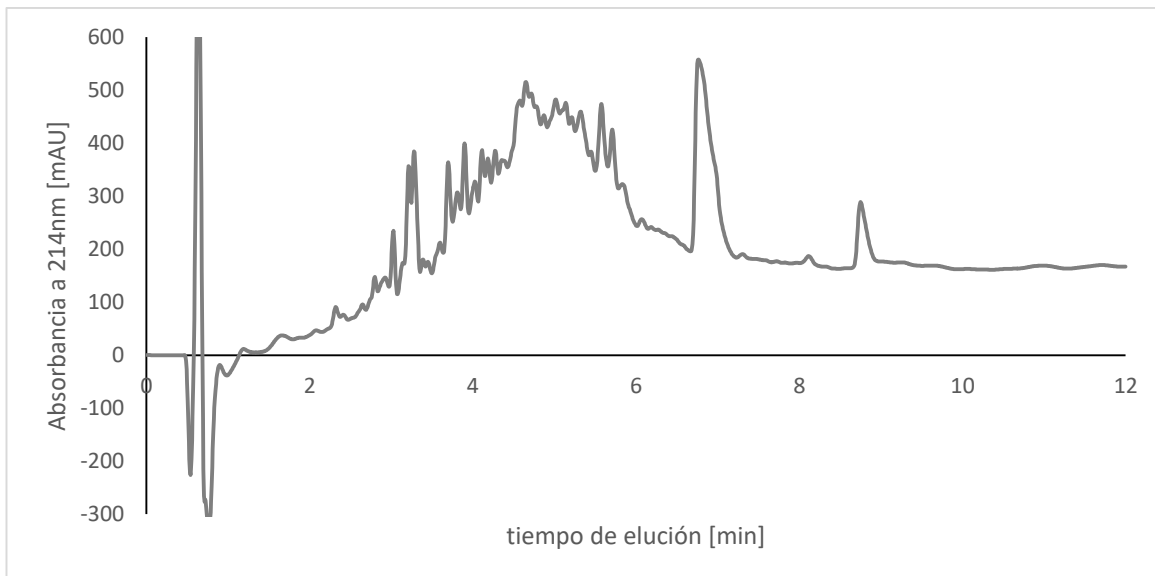


Figura 10. Cromatograma que muestra la separación peptídica de los hidrolizados gástricos del concentrado proteico de fréjol rojo moteado, obtenido a pH 2,0.

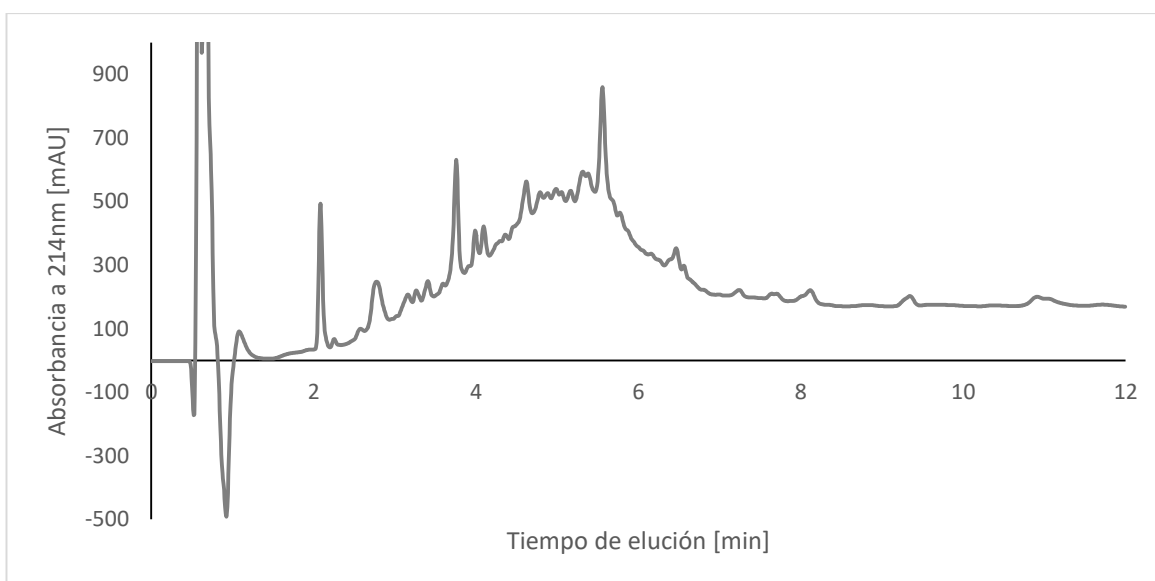


Figura 11. Cromatograma que muestra la separación peptídica de los hidrolizados gástricos del concentrado proteico de fréjol rojo moteado, obtenido a pH 3,2.

En las figuras 12, 13 y 14 se muestran los cromatogramas de los hidrolizados duodenales obtenidos a pH de 1,2; 2,0 y 3,2 respectivamente. Todos los péptidos fueron eluidos en 12 minutos. Al igual que en los cromatogramas de los hidrolizados gástricos, los picos cromatográficos no se pudieron separar con mayor definición.

El perfil de los hidrolizados duodenales es totalmente distinto al compararlo con el perfil del concentrado a pH 6 sin hidrolizar.

Existió concentración de péptidos en los hidrolizados duodenales de pH 1,2 y 3,2 en tiempos de retención de 7,12 y 8,7 minutos.

Los cromatogramas de los hidrolizados gástricos y duodenales (Figuras 9, 10, 11, 12, 13 y 14) presentaron más picos que el cromatograma del concentrado proteico (Figura 8), comprobando que presentaron mayor hidrólisis porque fueron previamente digeridos *in vitro*.

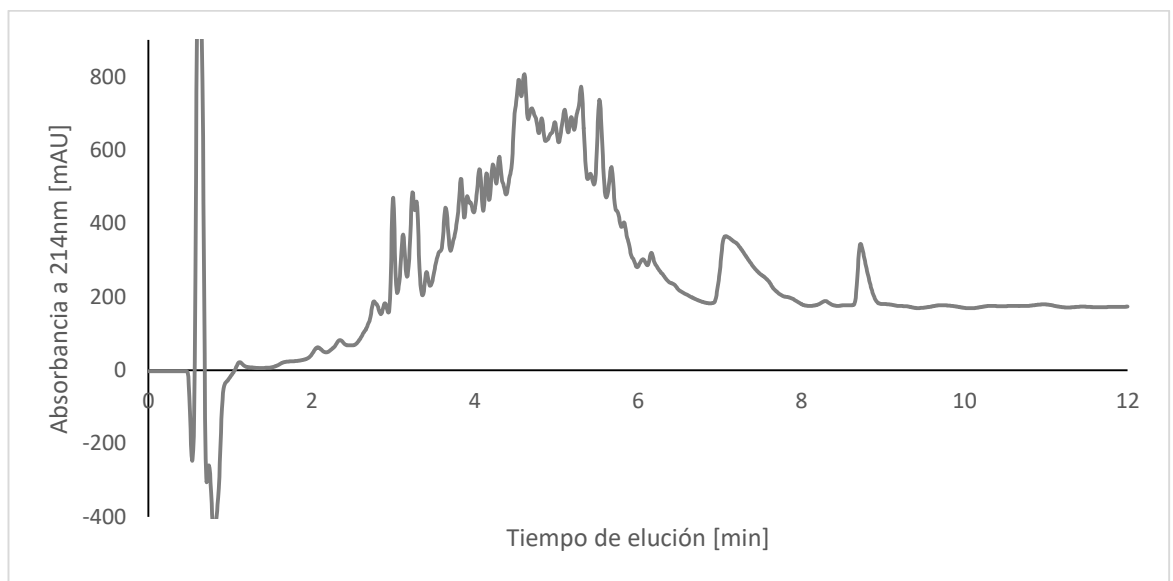


Figura 12. Cromatograma que muestra la separación peptídica de los hidrolizados duodenales del concentrado proteico de fréjol rojo moteado, obtenido a pH 1,2.

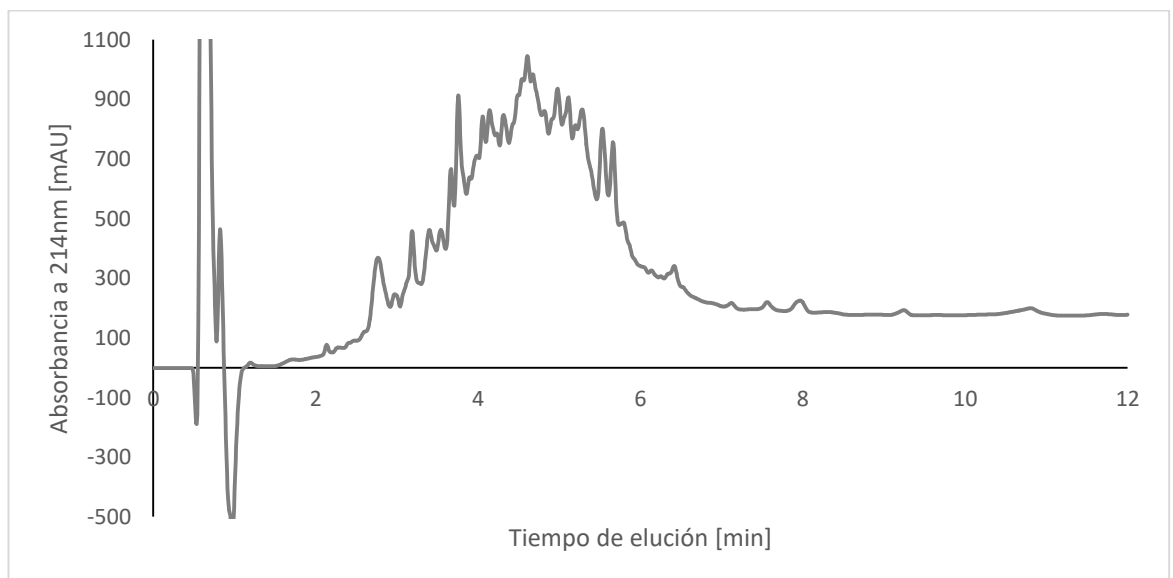


Figura 13. Cromatograma que muestra la separación peptídica de los hidrolizados duodenales del concentrado proteico de fréjol rojo moteado, obtenido a pH 2,0.

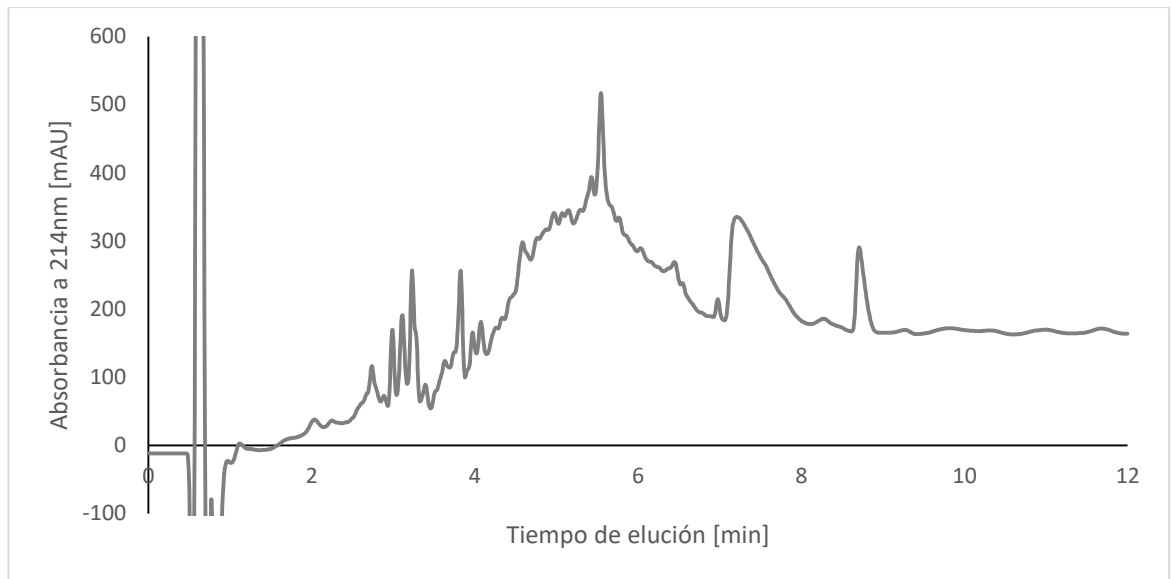


Figura 14. Cromatograma que muestra la separación peptídica de los hidrolizados duodenales del concentrado proteico de fréjol rojo moteado, obtenido a pH 3,2.

Estudios realizados en hidrolizados de *Sphenostylis* y *Phaseolus lunatus*, muestran contenidos elevados de aminoácidos esenciales tales como lisina, leucina, arginina y fenilalanina (Ajibola *et al.*, 2013; Seidu *et al.*, 2015), realizando una investigación más extensa, probablemente son los aminoácidos que se encontrarían en los cromatogramas presentados.

4.1.7 Determinación de fenoles totales en fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*)

Los polifenoles son una familia heterogénea de compuestos bioactivos ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se han documentado estudios de los efectos de los polifenoles en la prevención de enfermedades cardiovasculares, coronarias e hipertensión y los efectos parecen estar relacionados con la actividad antioxidante y anti-inflamatoria (Martini *et al.*, 2017).

En la tabla 6 se muestran las medias del contenido de polifenoles totales en fréjol rojo.

Tabla 6. Contenido de polifenoles totales en fréjol rojo

	FENOLES [R1]	FENOLES [R2]	FENOLES [R3]	PROMEDIO [mg GAE/L]	DS
pH7	521,4789	522,5958	520,9204	521,6651 ^c	0,8531
pH6	165,1711	159,5864	160,1448	161,6341 ^d	3,0758
pH5	204,8229	204,8229	204,8229	204,8229 ^c	0,0000
pH4	136,1304	135,0134	135,5719	135,5719 ^b	0,5585
pH3	245,5917	246,7086	246,1502	246,1502 ^a	0,5585

Fuente: Laboratorio del proyecto de canje de deuda de la FCIAL. (Letras diferentes indican que existen diferencias significativas).

Las unidades de los resultados obtenidos están expresadas en miligramos de equivalentes de ácido gálico por cada litro de muestra. El contenido de polifenoles en las muestras obtenidas de los sobrenadantes de la concentración de proteínas varía de 135,57 a 521, 66 mg GAE/L. El tratamiento que presentó mayor contenido de polifenoles fue el del sobrenadante a pH 7,0, este resultado es cercano comparado al valor de contenido total de polifenoles reportado en la base de datos ORAC, 637 mg GAE/100 g en muestras de fréjol rojo.

Madhujith *et al.* (2004) reportaron mayor cantidad de polifenoles para fréjol negro y cantidades menores para fréjoles blancos, y el contenido de polifenoles de fréjol rojo y café estuvo entre los valores reportados para fréjol blanco y negro.

El contenido de polifenoles varía de acuerdo al color de la cáscara debido a que en ella se encuentran la mayor cantidad de polifenoles, por ejemplo, para el fréjol negro se reporta en la base de datos Phenol explorer, una cantidad de polifenoles de 1390,75 mg GAE/100 g, mientras que para el fréjol blanco se reporta una cantidad de polifenoles de 137,75 mg GAE/100 g, indicando que al ser más colorida la cáscara del fréjol, mayor es su contenido de polifenoles.

El medio neutro fue el mejor para la extracción de los polifenoles, en la figura 15 se muestran las coloraciones de los sobrenadantes después de haberles añadido el reactivo de Folin. El color más intenso coincide con la muestra de mayor contenido de polifenoles, sin embargo, no existe tendencia alguna en relación con el pH de precipitación.

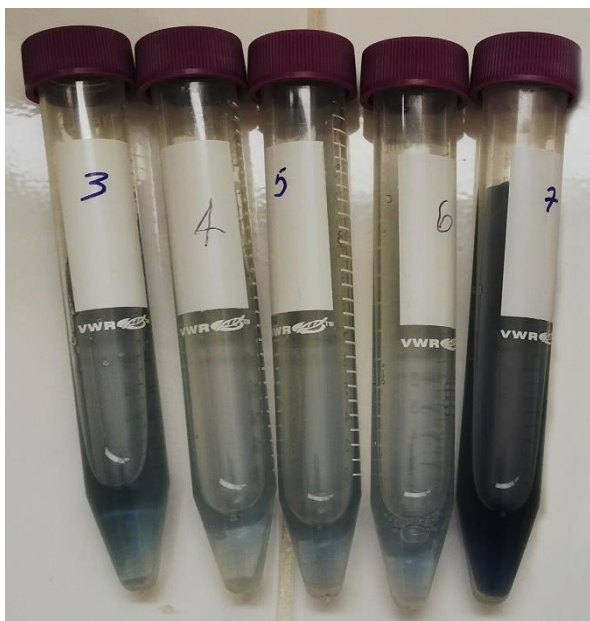


Figura 15. Reacción con Folin-Ciocalteu en los sobrenadantes separados de la precipitación isoeléctrica de proteínas. pH de izquierda a derecha van desde el 3 al 7.

4.1.8 Actividad antioxidante de los aislados proteicos de fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*)

El método TBARS se basa en la coloración rosa formada por la reacción de malonaldehído con TBA. El malonaldehído es uno de los productos formados durante la oxidación de lípidos, es decir que, mientras mayor sea la intensidad del color rosa existirá mayor oxidación lipídica.

En la figura 16 se muestra el porcentaje de inhibición lipídica ejercida por los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado, a diferentes concentraciones de cada pH de precipitación.

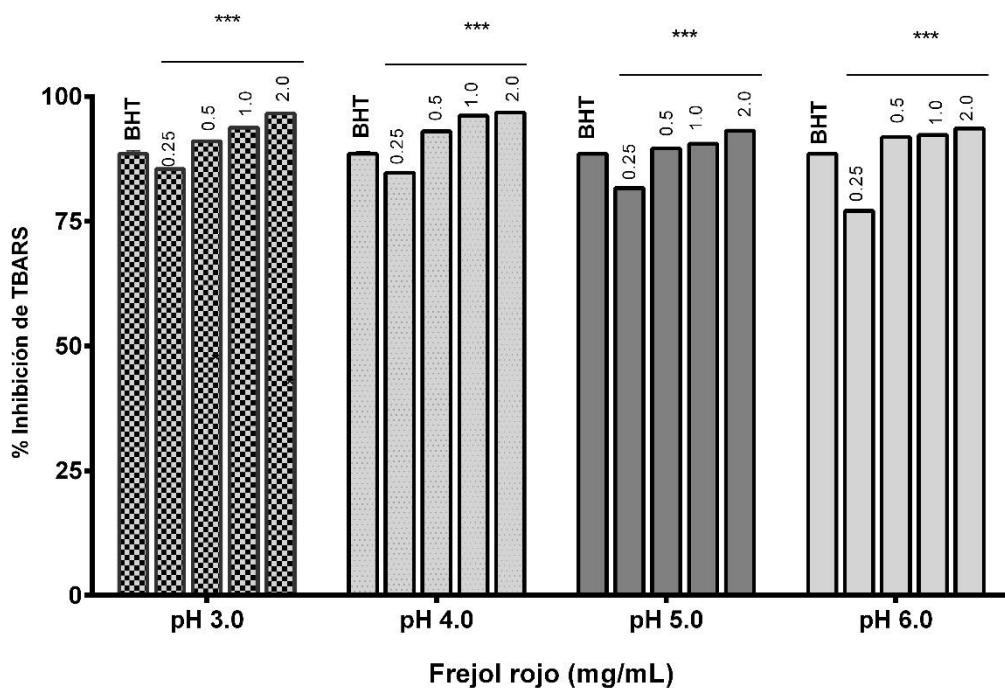


Figura 16. Inhibición de peroxidación lipídica (TBARS) de concentrados proteicos obtenidos de fréjol rojo a concentraciones de 0,25; 0,5; 1,0 y 2,0 mg/mL. BHT antioxidante sintético (control). Los resultados fueron representados como media de tres replicas experimentales \pm SD (n= 3). ***Indica diferencias estadísticas $P < 0.05$ comparada con el control positivo.

En todos los pH y concentraciones existieron diferencias significativas al compararlos con el BHT. Para todos los pH con concentraciones de 0,25 mg/mL la inhibición de peroxidación lipídica fue menor que con el BHT (tablas 17 y 18 de Anexos). Sin embargo, en las demás concentraciones (0,5; 1,0 y 2,0 mg/mL) la inhibición fue mayor que la actividad del control. La inhibición de peroxidación lipídica fue directamente proporcional con la concentración, en todos los pH. La concentración y pH que mayor actividad presentaron fue de 2 mg/mL a pH 4,0 con un valor de 96,78% (tablas 17 y 18 de Anexos).

El estudio realizado por **Madhujith et al. (2004)** también reportó que los fréjoles especialmente los de cáscara con color más intenso poseen una fuerte actividad antioxidante.

4.2 Verificación de la hipótesis

4.2.1 Rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado

El análisis de varianza de una vía mostró que las diferencias entre los promedios de los porcentajes de los rendimientos de concentrados proteicos de fréjol rojo son estadísticamente significativas, es decir, que el pH de precipitación de los concentrados proteicos influye significativamente en el rendimiento, rechazando la hipótesis nula.

4.2.2 Determinación cuantitativa de proteína de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado

De acuerdo al análisis de varianza de una vía, el contenido proteico de los concentrados de fréjol rojo moteado no es igual en todos los pH de precipitación, es decir que el pH de precipitación influye significativamente en el contenido proteico de los concentrados.

4.2.3 Electroforesis SDS – PAGE en presencia y ausencia del agente reductor

Al realizar una comparación visual entre el gel de electroforesis en presencia del agente reductor en comparación con el gel que carece del agente reductor (Figuras 4 y 5), se puede observar claramente que no difieren mayormente, es decir que la hipótesis nula es aceptada.

4.2.4 Fenoles totales en fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*)

El pH de precipitación influye significativamente en el contenido de fenoles totales de los sobrenadantes producto de la precipitación isoelectrica de fréjol rojo moteado.

4.2.5 Actividad antioxidante de los aislados proteicos de fréjol rojo moteado (*Phaseolus vulgaris*)

La concentración y el pH de los concentrados proteicos influyen significativamente en la inhibición de peroxidación lipídica.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El concentrado proteico de fréjol rojo obtenido por precipitación a pH 6,0 de precipitación presentó un contenido de proteínas del $69,1\% \pm 0,60$ y fue el valor más alto de todos los pH ensayados.
- En los ensayos de electroforesis SDS-PAGE con presencia y ausencia de agente reductor se obtuvo que las proteínas del fréjol rojo no están unidas en gran medida por puentes disulfuro.
- En la digestión de las proteínas de fréjol rojo se observó que las faseolinas no fueron hidrolizadas a ningún pH, pudiendo deberse a que las faseolinas son altamente resistentes a la hidrólisis *in vitro*. Las demás proteínas presentes en pequeñas concentraciones fueron totalmente digeridas a pH 2,0.
- El tratamiento que presentó mayor contenido de polifenoles fue el del sobrenadante a pH 7,0, con un contenido de 521,6651 mg GAE/L. Existieron diferencias significativas entre los contenidos de polifenoles a diferentes pH, indicando que el pH es un factor influyente en la extracción de polifenoles.
- Los concentrados obtenidos a pH de precipitación de 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 y 7,0 presentaron actividad antioxidante determinada mediante el método de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico.

5.2 Recomendaciones

- Ensayar otros métodos de concentración de las proteínas para comparar y obtener los mejores rendimientos, por ejemplo, con ultrafiltración.
- Realizar estudios de las propiedades funcionales de los concentrados proteicos, como solubilidad de las proteínas, capacidad de absorción de grasa, capacidad de retención de agua, propiedades emulsionantes, propiedades espumantes, etc.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajibola, C. F., Fashakin, J. B., Fagbemi, T. N. & Aluko, R. E. (2013). Renin and angiotensin converting enzyme inhibition with antioxidant properties of African yam bean protein hydrolysate and reverse-phase HPLC-separated peptide fractions. *Food Research International*, 52(2), 437-444. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.003>
- Barampama, Z. & Simard, R. (1993). Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) grown in Burundi. *Food Chemistry*, 47(2), 159 - 167. doi: 10.1016/0308-8146(93)90238-b
- Blair, M. W., Diaz, J. M., Hidalgo, R., Diaz, L. M. & Duque, M. C. (2007). Microsatellite characterization of Andean races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet*, 116(1), 29-43. doi:10.1007/s00122-007-0644-8
- Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E. & Rajamohamed, S. H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537-546. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.021>
- Camacho, M. K., Peinado, L. I., López, J. Á., Valdez, Á., Salinas, R. A., Moreno, C. G. & Medina, S. (2010). Caracterización proteómica de granos de frijol azufrado (*Phaseolus vulgaris*) cultivados en el estado de sinaloa. *Ra Ximhai*, 6(1), 23 - 36.
- Carbonaro, M., Maselli, P. & Nucara, A. (2015). Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Research International*, 76, Part 1, 19-30. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.007>
- Castel, V., Andrich, O., Netto, F. M., Santiago, L. G. & Carrara, C. R. (2012). Comparison between isoelectric precipitation and ultrafiltration processes to

- obtain Amaranth mantegazzianus protein concentrates at pilot plant scale. *Journal of Food Engineering*, 112(4), 288-295. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.05.010>
- Chevalier, F. (2011). Analytical Methods - Electrophoresis A2 - Fuquay, John W. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. San Diego: Academic Press. (pp. 185-192)
- De Toledo, N. M. V., Rocha, L. C., da Silva, A. G. & Canniatti Brazaca, S. G. (2013). Interaction and digestibility of phaseolin/polyphenol in the common bean. *Food Chemistry*, 138(2), 776-780. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.079>
- Etheridge, R. D., Pesti, G. M. & Foster, E. H. (1998). A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory. *Animal Feed Science and Technology*, 73(1-2), 21-28. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401\(98\)00136-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401(98)00136-9)
- Guzmán-Chozas, M., Vicario, I. M. & Guillén-Sans, R. (1997). Spectrophotometric Profiles of Off-Flavor Aldehydes by Using Their Reactions with 2-Thiobarbituric Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2452-2457. doi:10.1021/jf960965v
- Jafari, M., Rajabzadeh, A. R., Tabatabaei, S., Marsolais, F. & Legge, R. L. (2016). Physicochemical characterization of a navy bean (*Phaseolus vulgaris*) protein fraction produced using a solvent-free method. *Food Chemistry*, 208, 35-41. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.102>
- Jiménez-Saiz, R., Martos, G., Carrillo, W., López-Fandiño, R. & Molina, E. (2011). Susceptibility of lysozyme to in-vitro digestion and immunoreactivity of its digests. *Food Chemistry*, 127(4), 1719-1726. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.047>
- Kamal Eldin, A. (2010). 8 - Methods to determine the extent of lipid oxidation in foods A2 - Decker, Eric A *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications*. Philadelphia: Woodhead Publishing. (pp. 181-195).

- Madhujith, T., Naczki, M. & Shahidi, F. (2004). Antioxidant Activity of Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Lipids*, 11(3), 220 - 233. doi:10.1111/j.1745-4522.2004.01134.x
- Mallikarjunan, N., Marathe, S., Rajalakshmi, D., Mahesh, S., Jamdar, S. N. & Sharma, A. (2014). Effect of ionizing radiation on structural and functional attributes of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lectin. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 300-307. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.052
- Marathe, S. A., Deshpande, R., Khamesra, A., Ibrahim, G. & Jamdar, S. N. (2016). Effect of radiation processing on nutritional, functional, sensory and antioxidant properties of red kidney beans. *Radiation Physics and Chemistry*, 125, 1-8. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2016.03.002
- Markwell, M. A. K., Hass, S. M., Bieber, L. L. & Tolbert, N. E. (1978). A Modification of the Lowry Procedure to Simplify Protein Determination in Membrane and Lipoprotein Samples. *Analytical Biochemistry*, 87(1), 206 - 210. doi:10.1016/0003-2697(78)90586-9
- Martínez, E. N. & Añón, M. C. (1996). Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2523-2530. doi:10.1021/jf960169p
- Martini, D., Del Bo', C., Porrini, M., Ciappellano, S. & Riso, P. (2017). Role of polyphenols and polyphenol-rich foods in the modulation of PON1 activity and expression. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 48, 1-8. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.06.002
- Ministerio de Agricultura, G., Acuacultura y Pesca. (2013). Fréjol Tierno y Seco. Quito: MAGAP Retrieved from <http://sinagap.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap/cultivo/2013/fréjol.pdf>.
- Mishra, P. K., Tripathi, J., Gupta, S. & Variyar, P. S. (2017). Effect of cooking on aroma profile of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) and correlation with

sensory quality. *Food Chemistry*, 215, 401-409.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.149>

Mondor, M., Aksay, S., Drolet, H., Roufik, S., Farnworth, E. & Boye, J. I. (2009). Influence of processing on composition and antinutritional factors of chickpea protein concentrates produced by isoelectric precipitation and ultrafiltration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(3), 342-347.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2009.01.007>

Osborne, T. B. (1924). *The vegetable proteins*. London: Longmans, Green and Co.

Reyes-Bastidas, M., Reyes-Fernandez, E. Z., Lopez-Cervantes, J., Milan-Carrillo, J., Loarca-Pina, G. F. & Reyes-Moreno, C. (2010). Physicochemical, nutritional and antioxidant properties of tempeh flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Science and Technology International*, 16(5), 427-434.
doi:10.1177/1082013210367559

Rover, M. R. & Brown, R. C. (2013). Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104, 366-371. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaap.2013.06.011>

Saint-Denis, T. & Goupy, J. (2004). Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. *Analytica Chimica Acta*, 515(1), 191-198.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.090>

Seidu, K. T., Osundahunsi, O. F., Olaleye, M. T. & Oluwalana, I. B. (2015). Amino acid composition, mineral contents and protein solubility of some lima bean (*Phaseolus lunatus* L. Walp) seeds coat. *Food Research International*, 73, 130-134. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.034>

Shaghghi, M., Manzoori, J. L. & Jouyban, A. (2008). Determination of total phenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method. *Food Chemistry*, 108(2), 695-701.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.008>

- Teniente-Martínez, G., González, L., Cariño, R. & Bernardino, A. (2016). Caracterización de las proteínas del frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 1 – 6.
- Timilsena, Y. P., Adhikari, R., Barrow, C. J. & Adhikari, B. (2016). Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. *Food Chemistry*, 212, 648-656. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.017>
- Toapanta, M. (2016). Caracterización de aislados proteicos de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y su digestibilidad gástrica y duodenal (in vitro). Universidad Técnica de Ambato, Ambato.
- Velázquez, C., Villa, M., Álvarez, A., Chávez-Servín, J., García-Gasca, T., Ferriz, R., García, O., Rosado, J., López-Sabater, C., Castellote, A., Andrade, H. & De La Torre, K. (2015). Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin–Ciocalteu method. *Food Chemistry*, 176, 480-486. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.050>
- Xu, B. J. & Chang, S. K. (2008). Total phenolic content and antioxidant properties of eclipse black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by processing methods. *J Food Sci*, 73(2), H19-27. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00625.x
- Zhu, K.-X., Sun, X.-H., Chen, Z.-C., Peng, W., Qian, H.-F. & Zhou, H.-M. (2010). Comparison of functional properties and secondary structures of defatted wheat germ proteins separated by reverse micelles and alkaline extraction and isoelectric precipitation. *Food Chemistry*, 123(4), 1163-1169. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.081>

ANEXOS

ANEXO A. DATOS OBTENIDOS

Tabla 7. Datos para el cálculo de contenido de humedad en harina de fréjol rojo

MUESTRA	CP. VACÍA	CP+M	MUESTRA	CP+R	RESIDUO	HUMEDAD
R1	38,6470	39,6634	1,0164	39,5498	0,1136	11,18
R2	39,1132	40,1072	0,9940	39,9954	0,1118	11,25
R3	39,1788	40,2215	1,0427	40,1054	0,1161	11,13
R4	38,6179	39,6284	1,0105	39,5131	0,1153	11,41
R5	38,6430	39,6395	0,9965	39,5342	0,1053	10,57
R6	38,6138	39,5641	0,9503	39,4654	0,0987	10,39
Promedio						10,99
Desv. Est.						0,41

Fuente: Laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Tabla 8. Datos para el cálculo de contenido de ceniza en harina de fréjol rojo

MUESTRA	CRISOL. VACÍO	MUESTRA	CR+R	RESIDUO	CENIZAS
R1	39,5388	1,9995	39,6141	0,0753	3,77
R2	41,6505	2,0054	41,7323	0,0818	4,08
R3	34,7366	1,0255	34,7737	0,0371	3,62
R4	37,6578	1,0024	37,6949	0,0371	3,70
PROMEDIO					3,79
DESV. EST.					0,20

Fuente: Laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

Tabla 9. Datos del rendimiento de los concentrados proteicos de fréjol rojo

Réplicas	Peso harina [g]	Peso concentr. [g]	Rendimiento [%]	Promedio	Desv. Est.
pH 3,0:	1	10,0021	1,3461	12,70	2,1000
	2	10,0012	1,4321		
	3	10,0018	1,0329		
pH 4,0:	1	10,0030	1,2303	12,91	0,6150
	2	10,0053	1,2914		
	3	9,9999	1,3525		
pH 5,0:	1	10,0008	1,1447	14,43	2,7580
	2	10,0006	1,4960		
	3	10,0001	1,6887		
pH 6,0:	1	10,0015	1,1748	13,69	1,6930
	2	9,9998	1,4505		
	3	10,0014	1,4831		
pH 7,0:	1	10,0000	0,7726	8,66	1,0570
	2	10,0002	0,9807		
	3	10,0012	0,8438		

Fuente: Laboratorio de Alimentos Funcionales FCIAL

Tabla 10. Datos obtenidos por el equipo Dumas Nitrogen Analyzer

NDA Dumas Nitrogen Analyser

Laboratory information:
Name: BIO-PROPEPTI
Address:
Phone:
E-mail:
Notes:

S/N:
Software version: 3.15.0
Operator Name: Roberto Morán

Date [dd/mm/yy]	Time [hh:mm:ss]	Sample Name	Weight [mg]	O2 Flow Rate [ml/min]	O2 Factor [ml/mg]	Analysis Time [s]	Calibration Number	Proteins [%]	N Area [mVxs]	N [mg]	N [%]	Proteins [%]
16/06/16	18:08:03	FR pH 3	49,79	400,0	1,8	236,0	13	5,7	23377,6	5,6328	11,313	64,484
16/06/16	18:17:50	FR pH 4	54,15	400,0	1,8	254,0	13	5,7	21509,3	5,1478	9,507	64,188
16/06/16	18:28:01	FR pH 5	50,28	400,0	1,8	254,0	13	5,7	21177,6	5,0616	10,067	57,381
16/06/16	18:38:04	FR pH 6	49,76	400,0	1,8	241,8	13	5,7	24767,1	5,9913	12,04	68,631
16/06/16	18:52:56	FR2 pH 7	50,97	400,0	1,8	233,6	13	5,7	24165,2	5,8363	11,45	65,268
16/06/16	18:12:46	FR2 pH 3	49,96	400,0	1,8	230,2	13	5,7	23445,8	5,6504	11,31	64,466
16/06/16	18:22:50	FR2 pH 4	53,91	400,0	1,8	236,6	13	5,7	26076,0	6,3263	11,735	66,889
16/06/16	18:33:01	FR2 pH 5	51,44	400,0	1,8	230,6	13	5,7	21732,0	5,2057	10,12	57,684
16/06/16	18:42:52	FR2 pH 6	50,86	400,0	1,8	253,2	13	5,7	25579,1	6,1995	12,189	69,48
16/06/16	18:48:19	FR pH 7	50,68	400,0	1,8	231,2	13	5,7	23962,9	5,7841	11,413	65,054

Average	11,114	63,352
Standard deviation	0,903	5,151
RSD [%]	8,129	8,130

Working Calibration:
 $Y = 2,169345E-1 + X * 1,656455E-4 + X^2 * 4,484405E-9 + X^3 * -7,101828E-14$

Temperature [°C]:
 Combustion furnace: 1029,8
 Reduction furnace: 649,7

Flow rate [ml/min]:
 MFC1 carrier: 190,0
 MFC2 carrier: 220,0

Fuente: Laboratorio del proyecto de canje de deuda (FCIAL)

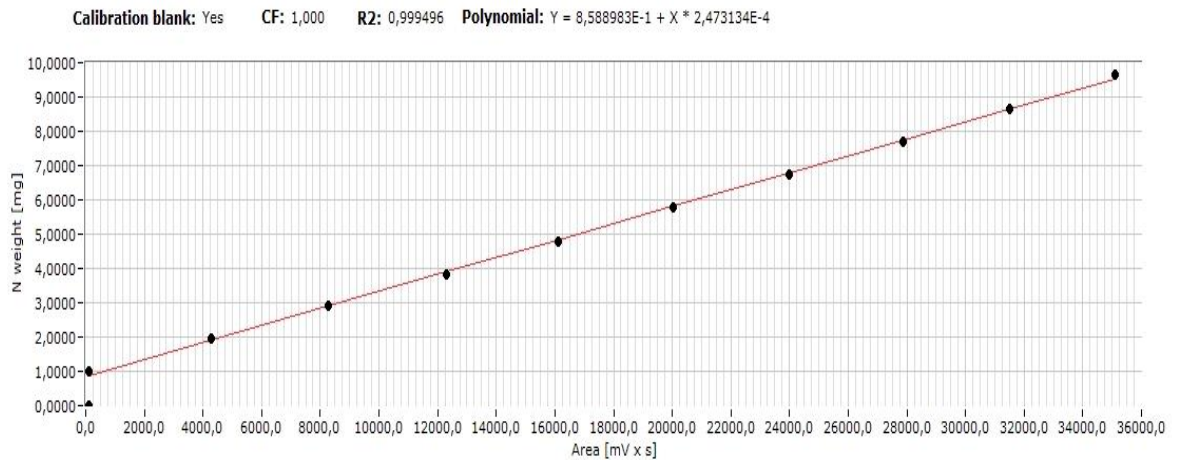
Tabla 11. Datos obtenidos por el equipo Dumas, para la curva de calibración con EDTA

Number	Standard	Standard Weigth [mg]	Area [mV x s]	N theoretical [mg]	N [mg]	N [%]	Blank [mV x s]	Residual error [mg]	Relative error [%]	Show
1	Calibration blank	0,000	108,5	0,0000	0,8857	ND	0,0	0,8857	ND	Yes
2	EDTA	10,270	110,6	0,9859	0,8862	8,629	0,0	-0,0997	-10,110	Yes
3	EDTA	20,210	4292,8	1,9402	1,9206	9,503	0,0	-0,0196	-1,010	Yes
4	EDTA	30,210	8286,8	2,9002	2,9083	9,627	0,0	0,0082	0,282	Yes
5	EDTA	39,840	12313,8	3,8246	3,9043	9,800	0,0	0,0796	2,082	Yes
6	EDTA	50,010	16115,2	4,8010	4,8444	9,687	0,0	0,0434	0,905	Yes
7	EDTA	60,300	20045,1	5,7888	5,8163	9,646	0,0	0,0275	0,475	Yes
8	EDTA	70,220	23993,6	6,7411	6,7928	9,674	0,0	0,0517	0,767	Yes
9	EDTA	80,370	27868,3	7,7155	7,7511	9,644	0,0	0,0356	0,461	Yes
10	EDTA	90,100	31488,3	8,6496	8,6464	9,596	0,0	-0,0032	-0,037	Yes
11	EDTA	100,640	35093,1	9,6614	9,5379	9,477	0,0	-0,1235	-1,279	Yes

Fuente: Laboratorio del proyecto de canje de deuda (FCIAL)

Figura 17. Curva de calibración del equipo Dumas

NDA Dumas Nitrogen Analyser - Calibration



Fuente: Laboratorio del proyecto de canje de deuda FCIAL

Tabla 12. Datos obtenidos para la curva de calibración con ácido gálico para la cuantificación de fenoles

W Estándar [g]	W total (g)	Ác. Gálico [mg/L]	W solución [g]	P. teórico [g]	Factor	Concentración real [mg/L]	Absorbancia 750 nm
0,0000						0,00	0,0000
0,0249	0,0981	50,76	5,1843	5,1690	0,997048782	50,61	0,0955
0,0491	0,0979	100,31	5,2094	5,1693	0,992302376	99,53	0,1865
0,0732	0,0967	151,40	5,1763	5,1645	0,997720379	151,05	0,2630
0,0975	0,0975	200,00	5,2700	5,1644	0,979962049	195,99	0,3565

Fuente: Laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

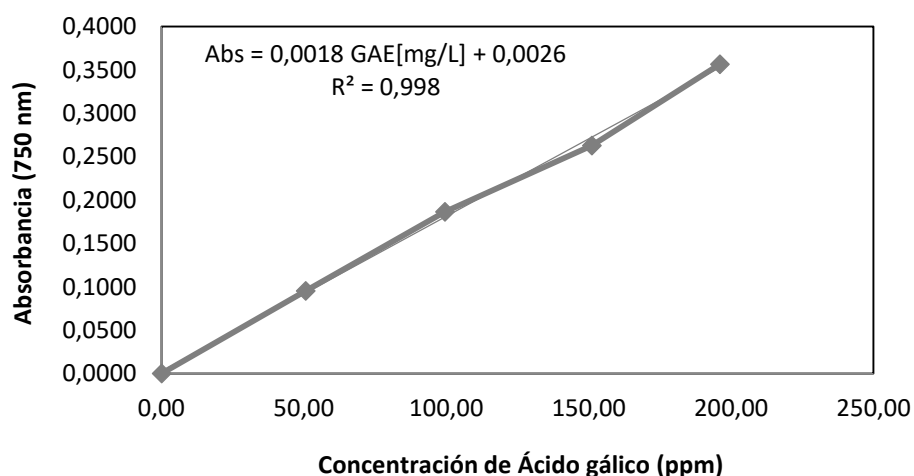


Figura 18. Curva estándar de ácido gálico para cálculo de polifenoles

Tabla 13. Absorbancias de las muestras a pH 3 para la determinación de la inhibición de peroxidación lipídica.

Concentración [mg/mL]	Absorbancia [532 nm]		
	R1	R2	R3
0,25	0,705	0,703	0,705
0,5	0,434	0,435	0,432
1,0	0,304	0,302	0,305
2,0	0,165	0,165	0,164

Fuente: Laboratorio del proyecto de canje de deuda FCIAL

Tabla 14. Absorbancias de las muestras a pH 4 para la determinación de la inhibición de peroxidación lipídica.

Concentración [mg/mL]	Absorbancia [532 nm]		
	R1	R2	R3
0,25	0,732	0,755	0,735
0,5	0,338	0,339	0,337
1,0	0,187	0,187	0,185
2,0	0,156	0,156	0,156

Fuente: Laboratorio del proyecto de canje de deuda FCIAL

Tabla 15. Absorbancias de las muestras a pH 5 para la determinación de la inhibición de peroxidación lipídica.

Concentración [mg/mL]	Absorbancia [532 nm]		
	R1	R2	R3
0,25	0,89	0,89	0,891
0,5	0,505	0,505	0,505
1,0	0,458	0,458	0,459
2,0	0,332	0,334	0,333

Fuente: Laboratorio del proyecto de canje de deuda FCIAL

Tabla 16. Absorbancias de las muestras a pH 6 para la determinación de la inhibición de peroxidación lipídica

Concentración [mg/mL]	Absorbancia [532 nm]		
	R1	R2	R3
0,25	1,112	1,112	1,112
0,5	0,396	0,396	0,395
1,0	0,374	0,373	0,374
2,0	0,311	0,312	0,311

Fuente: Laboratorio del proyecto de canje de deuda FCIAL

Tabla 17. Porcentajes de inhibición de peroxidación lipídica de los concentrados proteicos de fréjol rojo.

Concentración [mg/mL]	% Inhibición (pH 3)			Promedio	DE	VAR
	R1	R2	R3			
0,25	85,468	85,509	85,468	85,482	0,024	0,001
0,5	91,054	91,033	91,095	91,061	0,031	0,001
1,0	93,734	93,775	93,713	93,741	0,031	0,001
2,0	96,599	96,599	96,619	96,606	0,012	0,000
% Inhibición (pH 4)						
0,25	84,911	84,437	84,850	84,733	0,258	0,066
0,5	93,033	93,012	93,053	93,033	0,021	0,000
1,0	96,145	96,145	96,187	96,159	0,024	0,001
2,0	96,784	96,784	96,784	96,784	0,000	0,000
% Inhibición (pH 5)						
0,25	81,655	81,655	81,634	81,648	0,012	0,000
0,5	89,590	89,590	89,590	89,590	0,000	0,000
1,0	90,559	90,559	90,539	90,552	0,012	0,000
2,0	93,157	93,115	93,136	93,136	0,021	0,000
% Inhibición (pH 6)						
0,25	77,078	77,078	77,078	77,078	0,000	0,000
0,5	91,837	91,837	91,858	91,844	0,012	0,000
1,0	92,291	92,311	92,291	92,298	0,012	0,000
2,0	93,589	93,569	93,589	93,583	0,012	0,000

Fuente: Laboratorio del proyecto de canje de deuda FCIAL

Fórmula utilizada para el cálculo de la inhibición de la peroxidación lipídica:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{AbsC - AbsM}{AbsC * 100}$$

En donde:

AbsC: Absorbancia del control

AbsM: Absorbancia de la muestra

Tabla 18. Porcentajes de inhibición de peroxidación lipídica del BHT

Concentración [mg/mL]	R1 [%]	R2 [%]	R3 [%]	Promedio [%]	DE	VAR
0,25	80,583	81,428	81,407	81,139	0,482	0,232
0,5	82,026	82,211	82,500	82,245	0,239	0,057
1,0	82,953	83,242	83,716	83,304	0,385	0,148
2,0	85,221	85,385	85,489	85,365	0,135	0,018

ANEXO B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla 19. Análisis de varianza de una vía de los promedios del rendimiento de los concentrados proteicos.

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	60,38	4	15,09	F (4, 10) = 4,608	P = 0,0228
Residual (within columns)	32,76	10	3,276		
Total	93,14	14			

Tabla 20. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los promedios de rendimiento de los concentrados proteicos.

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
pH4 vs. pH 3	0,21	-4,654 to 5,074	No	ns	0,9999
pH5 vs. pH 3	1,73	-3,134 to 6,594	No	ns	0,7672
pH6 vs. pH 3	0,9933	-3,870 to 5,857	No	ns	0,9581
pH7 vs. pH 3	-4,043	-8,907 to 0,8203	No	ns	0,1173
pH5 vs. pH4	1,52	-3,344 to 6,384	No	ns	0,8369
pH6 vs. pH4	0,7833	-4,080 to 5,647	No	ns	0,982
pH7 vs. pH4	-4,253	-9,117 to 0,6103	No	ns	0,0945
pH6 vs. pH5	-0,7367	-5,600 to 4,127	No	ns	0,9857
pH7 vs. pH5	-5,773	-10,64 to -0,9097	Yes	*	0,0193
pH7 vs. pH6	-5,037	-9,900 to -0,1730	Yes	*	0,0417

Tabla 21. Promedios y desviación estándar de los rendimientos de los concentrados proteicos

Mean	12,7	12,91	14,43	13,7	8,66
Std. Deviation	2,1	0,615	2,758	1,693	1,057
Std. Error of Mean	1,212	0,3551	1,592	0,9777	0,6104

Tabla 22. Análisis de varianza de una vía de los promedios del contenido proteico de los concentrados

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	141,4	4	35,35	F (4, 5) = 43,36	P = 0,0005
Residual (within columns)	4,077	5	0,8154		
Total	145,5	9			

Tabla 23. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los promedios del contenido proteico de los concentrados

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
pH 4 vs. pH 3	1,063	-2,559 to 4,686	No	ns	0,7643
pH 5 vs. pH 3	-6,943	-10,56 to -3,320	Yes	**	0,0032
pH 6 vs. pH 3	4,580	0,9581 to 8,203	Yes	*	0,0198
pH 7 vs. pH 3	0,6860	-2,936 to 4,308	No	ns	0,9321
pH 5 vs. pH 4	-8,006	-11,63 to -4,384	Yes	**	0,0016
pH 6 vs. pH 4	3,517	-0,1054 to 7,139	No	ns	0,0558
pH 7 vs. pH 4	-0,3775	-4,000 to 3,245	No	ns	0,9916
pH 6 vs. pH 5	11,52	7,901 to 15,15	Yes	***	0,0003
pH 7 vs. pH 5	7,629	4,006 to 11,25	Yes	**	0,0021
pH 7 vs. pH 6	-3,895	-7,517 to -0,2721	Yes	*	0,0379

Tabla 24. Promedios y desviación estándar del contenido proteico de los concentrados

Mean	64,48	65,54	57,53	69,06	65,16
Std. Deviation	0,01273	1,910	0,2143	0,6003	0,1513
Std. Error of Mean	0,008999	1,350	0,1515	0,4245	0,1070

Tabla 25. Análisis de varianza de una vía de los promedios del contenido de polifenoles de los sobrenadantes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	290044	4	72511	F (4, 10) = 33532	P < 0,0001
Residual (within columns)	21,62	10	2,162		
Total	290065	14			

Tabla 26. Prueba de comparación múltiple de Tukey de los promedios del contenido de polifenoles de los sobrenadantes

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
pH 4 vs. pH 3	-110,6	-114,5 to -106,6	Yes	****	< 0,0001
pH 5 vs. pH 3	-41,33	-45,28 to -37,38	Yes	****	< 0,0001
pH 6 vs. pH 3	-84,52	-88,47 to -80,56	Yes	****	< 0,0001
pH 7 vs. pH 3	275,5	271,6 to 279,5	Yes	****	< 0,0001
pH 5 vs. pH 4	69,25	65,30 to 73,20	Yes	****	< 0,0001
pH 6 vs. pH 4	26,06	22,11 to 30,01	Yes	****	< 0,0001
pH 7 vs. pH 4	386,1	382,1 to 390,0	Yes	****	< 0,0001
pH 6 vs. pH 5	-43,19	-47,14 to -39,24	Yes	****	< 0,0001
pH 7 vs. pH 5	316,8	312,9 to 320,8	Yes	****	< 0,0001
pH 7 vs. pH 6	360,0	356,1 to 364,0	Yes	****	< 0,0001

Tabla 27. Promedios y desviación estándar del contenido de polifenoles de los sobrenadantes

Mean	246,2	135,6	204,8	161,6	521,7
Std. Deviation	0,5584	0,5585	0,0	3,076	0,8531
Std. Error of Mean	0,3224	0,3225	0,0	1,776	0,4925

ANEXO C. FOTOGRAFÍAS



Figura 19. Precipitación isoelectrica de proteínas



Figura 20. Liofilización de los concentrados proteicos



Figura 21. Concentrados proteicos de fréjol rojo moteado liofilizados



Figura 22. Digestión de los concentrados proteicos de fréjol rojo moteado liofilizados



Figura 23. RP – UHPLC