



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

**TEMA:**

---

**“HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO CON PROTEASAS DE TRACTO DE TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) PARA REDUCIR LA CONTAMINACIÓN ORGÁNICA DEL AGUA MEDIANTE LA POSIBLE APLICACIÓN COMO FERTILIZANTE ORGÁNICO”.**

---

Trabajo de Investigación. Modalidad: Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI). Presentado como Requisito Previo a la Obtención del Título de Ingeniero Bioquímico otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

**Autor:** Oscar Gonzalo Salazar Santana

**Tutora:** Ing. Mg. Cecilia Carpio

AMBATO – ECUADOR

2014

## APROBACIÓN DE LA TUTORA

Ing. Mg. Cecilia Carpio

Siendo la Tutora del Trabajo de Investigación bajo el tema: "HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO CON PROTEASAS DE TRACTO DE TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) PARA REDUCIR LA CONTAMINACIÓN ORGÁNICA DEL AGUA MEDIANTE LA POSIBLE APLICACIÓN COMO FERTILIZANTE ORGÁNICO", realizado por el egresado Oscar Gonzalo Salazar Santana; tengo a bien afirmar que el estudio es idóneo y reúne los requisitos de un trabajo de investigación de Ingeniería Bioquímica; y el señor egresado posee los méritos académicos suficientes para ser sometido a la evaluación del Jurado Examinador que sea designado por el H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Ambato, Febrero del 2014.

.....  
Ing. Mg. Cecilia Carpio

TUTORA

## AUTORÍA

El presente trabajo de investigación: “HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO CON PROTEASAS DE TRACTO DE TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) PARA REDUCIR LA CONTAMINACIÓN ORGÁNICA DEL AGUA MEDIANTE LA POSIBLE APLICACIÓN COMO FERTILIZANTE ORGÁNICO”, es absolutamente original, auténtico y personal, en tal virtud, el contenido y efectos académicos que se desprendan del mismo son de exclusiva responsabilidad del autor.

Ambato, Febrero del 2014.

.....

Oscar Gonzalo Salazar Santana

CI: 180372277-4

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Los miembros del Tribunal de Grado aprueban el presente Trabajo de Graduación de acuerdo a las disposiciones emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, Febrero del 2014.

Para constancia firman:

.....

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

.....

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

## **DEDICATORIA**

A mis padres, por el cariño, paciencia y apoyo incondicional para guiar mi camino, por luchar todos los días para ser el mejor ejemplo de dedicación.

A Sandy por ser la mejor hermana y amiga que me apoyó y me contagió todos los días de perseverancia, humildad y dedicación.

A mis abuelitos por guiarme y apoyarme en mi formación tanto personal como profesional y por acompañarme en todos los momentos especiales de mi vida.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a la Universidad Técnica de Ambato, en especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, por brindar una educación de calidad y promover la preparación profesional y humanitaria.

A los docentes de la FCIAL, por impartir sus conocimientos y contribuir con la formación de profesionales competitivos.

A la Ing. Ana Alfaro por orientarme a realizar esta investigación, a la Ing. Cecilia Carpio, Tutora del Trabajo de Investigación, por compartir sus valiosos conocimientos, experiencias, tiempo y amistad.

A mis familiares, por el apoyo de una u otra forma para la realización de este trabajo.

A mis amigos, por brindarme su amistad incondicional y por acompañarme en los buenos y malos momentos.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

### CAPÍTULO I

#### EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1	Tema de investigación .....	15
1.2	Planteamiento del problema.....	15
1.2.1	Contextualización .....	15
1.2.2	Análisis crítico.....	17
1.2.3	Prognosis .....	18
1.2.4	Preguntas directrices .....	18
1.2.5	Delimitación del problema.....	18
1.3	Justificación .....	19
1.4	Objetivos.....	19
1.4.1	Objetivo general .....	19
1.4.2	Objetivos específicos.....	19

### CAPÍTULO II

#### MARCO TEÓRICO

2.1	Antecedentes investigativos .....	20
2.1.1	Enzimas en remediación ambiental .....	20
2.1.2	Estudios del lacto suero.....	20
2.1.3	Utilización de hidrolizados proteicos en horticultura .....	21
2.2	Fundamentación filosófica .....	22
2.3	Fundamentación legal .....	23
2.4	Fundamentación teórica .....	24
2.4.1	Enzimas .....	24
2.4.2	Clasificación general de las Enzimas.....	25
2.4.3	Clasificación de las enzimas proteolíticas .....	26
2.4.4	Contaminación orgánica por lacto suero.....	27
2.4.5	Aminoácidos en las plantas .....	28

2.5	Categorías fundamentales .....	29
2.6	Hipótesis .....	29
2.7	Señalamiento de variables de la hipótesis.....	30

**CAPÍTULO III  
METODOLOGÍA**

3.1	Enfoque.....	31
3.2	Modalidad básica de la investigación .....	31
3.3	Nivel o tipo de investigación .....	31
3.4	Población y Muestra.....	32
3.4.1	Diseño experimental.....	32
3.5	Operacionalización de las variables .....	35
3.6	Recolección de información .....	37
3.7	Procesamiento y análisis de información.....	43

**CAPÍTULO IV  
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

4.1	Cuantificación de proteínas por el método de Lowry .....	44
4.2	Determinación de la actividad enzimática.....	45
4.3	Hidrólisis enzimática en el lacto suero.....	45
4.4	Empleo del suero hidrolizado en plantas de rábano .....	47
4.5	Verificación de hipótesis.....	47

**CAPÍTULO V  
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

5.1	Conclusiones.....	48
5.2	Recomendaciones .....	49



## CAPÍTULO VI PROPUESTA

6.1	Datos informativos.....	50
6.2	Antecedentes de la propuesta.....	51
6.3	Justificación.....	52
6.4	Objetivos .....	52
6.4.1	Objetivo General .....	52
6.4.2	Objetivos específicos.....	52
6.5	Análisis de factibilidad .....	53
6.6	Fundamentación .....	53
6.7	Metodología .....	54
6.7.1	Siembra de papas .....	54
6.7.2	Obtención de la solución de proteasas del estómago de la trucha arcoíris.....	54
6.7.3	Hidrólisis del suero lácteo.....	54
6.7.4	Aplicación del suero lácteo en sembríos de papas. ....	55
6.8	Administración.....	55
6.9	Previsión de la evaluación.....	56
	Bibliografía.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
	Anexos.....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N1: Límites máximos permisibles de oxígeno disuelto en agua dulce y marina.....	24
Tabla N2: Clasificación general de las enzimas.....	25
Tabla N3: Factores para el diseño experimental.....	33
Tabla N4: Combinación de tratamientos.....	34
Tabla N5: Operacionalización de las variables independientes.....	35
Tabla N6: Operacionalización de la variable dependiente.....	36
Tabla N7: Contenido de proteínas, actividad catalítica y actividad específica de las proteasas extraídas del tracto digestivo de truchas .....	44
Tabla N8: Administración de la propuesta.....	55
Tabla N9: Previsión de la evaluación.....	56

## ÍNDICE DE ANEXOS

### ANEXO A. RESPUESTAS EXPERIMENTALES

#### CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS

Tabla A1: Pesos de las regiones digestivas de 4 truchas.....	61
Tabla A2: Datos para la cuantificación del contenido de proteínas de estómagos e intestinos de trucha .....	61
Tabla A3: Datos de absorbancia de la curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA).....	61

Tabla A4: Concentración de proteínas obtenidas de las regiones del tracto de las truchas con muestra húmeda .....62

Gráfico A1. Curva de calibración de Albúmina Sérica Bovina (BSA), para cuantificación de proteína.....62

## **TRATAMIENTOS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN EL SUERO LÁCTEO**

Tabla A5: Datos de absorbancia de los diferentes tratamientos para determinar la cantidad de producto formado durante la hidrólisis del suero lácteo .....63

Tabla A6: Datos de absorbancia y pesos de alícuotas de la solución madre de tirosina y de las soluciones diluidas para obtener la curva de calibración de tirosina .....64

Tabla A7: Datos de absorbancia y factor de dilución para el cálculo de la actividad catalítica de proteasas de trucha en la hidrólisis de hemoglobina parcialmente desnaturalizada .....65

Tabla A8: Producto formado por la actividad hidrolítica de las proteasas en los diferentes tratamientos, expresada en concentración milimolar de tirosina .....65

Gráfico A2: Curva de calibración de Tirosina para determinar la actividad enzimática.....64

Gráfico A3: Cinética de hidrólisis del suero con proteasas ácidas, a 18°C.....66

Gráfico A4: Cinética de hidrólisis del suero con proteasas ácidas, a 38°C.....66

Gráfico A5: Cinética de hidrólisis del suero con proteasas alcalinas a, 18°C.....66

Gráfico A6: Cinética de hidrólisis del suero con proteasas alcalinas a, 38°C.....67

## **PORCENTAJE DE HIDRÓLISIS**

Tabla A9: Actividad proteásica de los diferentes tratamientos expresada como porcentaje de hidrólisis de los enlaces peptídicos.....68

Gráfico A7: Porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados.....	68
--	----

### **APLICACIÓN DEL MEJOR TRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS DEL SUERO LÁCTEO**

Tabla A10: Datos de los pesos de las plantas de rábanos.....	69
--	----

Gráfico A8: Datos de los pesos de las plantas de rábanos.....	69
---	----

### **ANEXO B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Tabla B1: Análisis de varianza realizada con los diferentes tratamientos para la hidrólisis de suero lácteo.....	71
--	----

Tabla B2: Separación de medias de absorbancias para hidrólisis correspondientes a la interacción AxB.....	71
---	----

Tabla B3: Separación de medias de la interacción AxC para las absorbancias de la hidrólisis de suero lácteo.....	72
--	----

Tabla B4: Separación de medias de la interacción BxC para las absorbancias obtenidas para la hidrólisis de suero lácteo.....	72
--	----

Tabla B5: Separación de medias de la interacción AxBxC para las absorbancias obtenidas para la hidrólisis de suero lácteo.....	73
--	----

### **ANEXO C. FOTOGRAFÍAS**

**“HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO CON  
PROTEASAS DE TRACTO DE TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*)  
PARA REDUCIR LA CONTAMINACIÓN ORGÁNICA DEL AGUA MEDIANTE LA  
POSIBLE APLICACIÓN COMO FERTILIZANTE ORGÁNICO”.**

Salazar, Oscar y Carpio, Cecilia  
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.  
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS  
e-mail: oscarins8@gmail.com  
AMBATO -ECUADOR

**RESUMEN**

Se aplicó un método sencillo para la extracción de proteasas a partir del tracto de truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*); el método incluyó maceración en buffer acetato de sodio (pH 4) para las de los estómagos y en buffer carbonato de sodio (pH 9) para las obtenidas de los intestinos, seguido por centrifugación y recuperación del sobrenadante; el volumen de extracto obtenido de los estómagos fue de 50 ml, y el de los intestinos fue de 40 ml. Las proteínas en solución extraídas se almacenaron en congelación hasta su utilización para la hidrólisis de suero lácteo. Se cuantificó el contenido proteico de los extractos por el método de Lowry, el cual fue de  $1,213 \pm 0,04$  mg/ml para los estómagos y  $1,446 \pm 0,02$  mg/ml para los intestinos expresados como BSA y se determinó también la actividad proteásica por el método de Anson utilizando hemoglobina como sustrato. Los valores de actividad fueron de  $4,70 \text{ E-}04$  y  $6,92 \text{ E-}05$  (milimoles de tirosina desprendidas por la hidrólisis) para las enzimas extraídas utilizando los estómagos y los intestinos, respectivamente.

Los extractos fueron aplicados para la hidrólisis de suero lácteo empleando un diseño experimental axbxc. Los factores estudiados fueron el origen de las proteasas (a), la temperatura de hidrólisis (b) y el tiempo de reacción (c), y la

variable de respuesta las absorbancias medidas a 600 nm. Los resultados demostraron que la combinación de los factores influyen significativamente en la actividad proteolítica de los extractos sobre el suero lácteo, analizados a un nivel de confianza del 95%. Mediante la prueba Tukey, se determinó que el mejor tratamiento para la hidrólisis del suero lácteo es la combinación a0b0c3, que relaciona el nivel bajo del factor a origen de las proteasas a0 (proteasas ácidas), el nivel bajo del factor b temperatura de reacción b0 (18 °C) y el nivel alto del factor c tiempo de reacción c3 (4 horas).

Se demostró que la aplicación foliar y radicular de la solución de suero hidrolizado (al 10% en agua) en plantas de rábano retiene la humedad de la tierra, de esta manera controla de mejor manera la hidratación de las plantas, y aporta con nutrientes que pueden ser asimilados por las plantas (péptidos y aminoácidos), produciendo un aumento de tamaño del follaje y del rábano, lo cual muestra que el suero lácteo hidrolizado puede ser empleado como fertilizante orgánico.

**Palabras clave:** truchas, suero lácteo, hidrólisis, rábanos, fertilizante.

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 1.1 Tema de investigación

“Hidrólisis enzimática de proteínas de suero lácteo con proteasas de tracto de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) para reducir la contaminación orgánica del agua mediante la posible aplicación como fertilizante orgánico”.

### 1.2 Planteamiento del problema

#### 1.2.1 Contextualización

##### **Macro:**

Se calcula que en Europa se producen 75 millones de toneladas anuales de lacto suero, 27 en América del Norte y 8 en otras áreas del mundo, lo que suma un total de 110 millones de toneladas, las cuales en algunos casos, son tratadas para ser reutilizadas en la fabricación de nuevos productos, mientras que el resto es desechada a los ríos, es ésta una de las razones para que la polución de los recursos hídricos sea tan considerable.

Según Engler (2003), la producción mundial mencionada, si se considera que la concentración de proteínas en el suero de queso, es aproximadamente de 5 gramos por litro, equivaldría a 660000 toneladas anuales de este concentrado, lo cual implica un elevado índice de contaminación de los recursos hídricos por materia orgánica a nivel mundial.

##### **Meso:**

De acuerdo con el último levantamiento de información del Ministerio de Agricultura y Ganadería correspondiente al 2005, se producen en el Ecuador 2500 millones de litros de leche anuales. Gran parte de esta cantidad de leche es

utilizada para la producción de quesos, por consiguiente se genera miles de litros de lacto suero que son vertidos directa o indirectamente a los ríos, causando grandes problemas de contaminación.

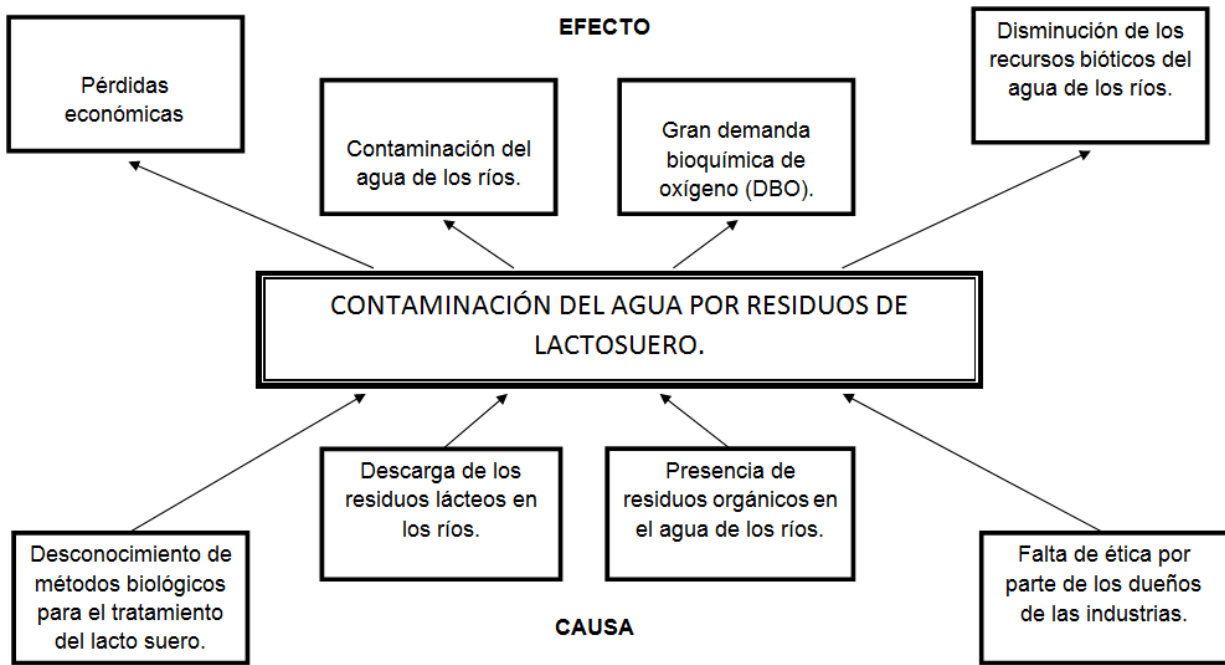
**Micro:**

Según datos estadísticos del Sistema de Información Agropecuaria (Siagro) del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGAP) , se establece que en Tungurahua se producen 265 mil litros de leche diarios los cuales son destinados en gran porcentaje para la producción de lácteos; estos procesos dejan como subproducto al suero, que contiene concentraciones relativamente altas de proteína, las cuales al ser desechadas en los ríos generan una gran demanda biológica de oxígeno, que trae como consecuencia la disminución de la parte biótica del agua.



## 1.2.2 Análisis crítico

Gráfica 1: Árbol de problemas



Elaborado por: Oscar Salazar

- **Relación causa-efecto**

Una vez realizado el análisis crítico se identificó varias causas y efectos para la realización de este estudio. Entre las causas principales están el desconocimiento de métodos biológicos para el tratamiento del lacto suero, el vertido de las aguas generadas en este proceso en los ríos y sus principales efectos en la contaminación del agua por parte de los residuos orgánicos, los cuales generan una gran cantidad de demanda bioquímica de oxígeno (DBO), que produce una pérdida considerable de los recursos bióticos del agua. Para atenuar estos efectos y reducir la contaminación del agua por parte del suero lácteo, el cual posee una gran cantidad de materia orgánica, se trabajará con proteasas solubles para hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas del suero para su posible utilización como fertilizante orgánico de cultivos.

### 1.2.3 Prognosis

En el caso de no utilizar proteasas con el fin hidrolizar los enlaces peptídicos del lacto suero, para su posible aplicación como fertilizante orgánico y reducir los contaminantes orgánicos vertidos a las fuentes de agua, los productores de quesería deberían buscar un método químico alternativo para tratar este tipo de residuos, lo cual no sería la mejor solución debido a que al trabajar con químicos se altera el equilibrio de la naturaleza. Por esta razón es necesario tratar estos residuos biológicamente.

### 1.2.4 Preguntas directrices

- ¿Existen proteasas en el tracto de las truchas?
- ¿Se puede hidrolizar considerablemente las proteínas presentes en el suero lácteo con proteasas ácidas o alcalinas?
- ¿Se puede emplear el suero lácteo hidrolizado como fertilizante orgánico?

### 1.2.5 Delimitación del problema

- **Campo:** Ingeniería Bioquímica
- **Área:** Ingeniería de las Enzimas
- **Temporal:** julio 2012 - febrero 2014  
Tiempo de investigación, elaboración y ejecución 2012 - 2014
- **Espacial:** Provincia Tungurahua  
Cantón Ambato  
Parroquia Huachi Chico  
Referencia Ubicación: Universidad Técnica de Ambato,  
Avenida los Chasquis y Río Cutuchi.

### **1.3 Justificación**

Debido a la legislación vigente que prohíbe el vertido de efluentes de alta carga orgánica sin tratamiento previo a los cursos de agua, en el pasado parte del suero se suministraba a los animales de granjas en remplazo del agua, y parte se arrojaba sobre el campo; esta práctica a la larga ocasionó problemas digestivos en el ganado, así como también la formación de charcos que causaron mal olor y presencia de insectos. Debido a estas situaciones es necesario implementar metodologías de tratamiento del suero que sean amigables con el medio ambiente.

Los procesos catalizados por enzimas en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan una serie de ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos, por la gran actividad catalítica que presentan, y por su alta actividad a temperatura ambiente y presión atmosférica normal.

### **1.4 Objetivos**

#### **1.4.1 Objetivo general**

- Hidrolizar enzimáticamente las proteínas de suero lácteo con proteasas de tracto de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) para reducir la contaminación orgánica del agua mediante la posible aplicación del suero lácteo hidrolizado como fertilizante orgánico.

#### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Extraer y cuantificar proteasas de estómagos e intestinos de truchas para comparar la actividad enzimática de las proteasas ácidas y alcalinas.
- Determinar el porcentaje de hidrólisis de las proteínas presentes en el suero lácteo.
- Establecer si el suero lácteo hidrolizado puede ser empleado como fertilizante orgánico.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes investigativos

##### 2.1.1 Enzimas en remediación ambiental

La tecnología enzimática entendida como la utilización por el hombre de la capacidad biocatalítica de las enzimas, es tan antigua como el propio ser humano (Penzol, 1992).

Existen trabajos enfocados en la remediación ambiental que aprovechan la actividad enzimática. Plaza *et al.* (2001) estudió enzimas como un método alternativo para la remediación ambiental, con algunas cepas de bacterias generadoras de enzimas de tipo ureasa, las cuales fueron utilizadas en el tratamiento de efluentes industriales contaminados con urea provenientes de un complejo petroquímico.

El tratamiento de efluentes industriales altamente contaminantes requiere de nuevas alternativas tendientes a la disminución de costos para incrementar la factibilidad de ser adoptadas por el respectivo sector industrial. Según Alcarraz *et al.* (2008), la bioconversión enzimática de los residuos lignocelulósicos constituye una alternativa promisorio para la descontaminación de este tipo de efluentes a favor del ecosistema, al trabajar con hongos, que son los principales organismos que participan en el reciclado del carbono a partir de la lignina.

##### 2.1.2 Estudios del lacto suero

Se han realizado varios estudios al suero residual de los procesos lácteos, con el objeto de determinar las características, físicas y químicas, para su aplicación como materia prima para la elaboración de alimentos. Con tal propósito, se determina el pH, la densidad y acidez, el contenido de materia grasa, materia seca, proteína bruta, la concentración de lactosa, calcio y fósforo, de los sueros de

queso obtenidos como subproductos del proceso de elaboración (Miranda *et al.*, 2007).

Un estudio realizado por Alvarado (2010) estuvo enfocado en aprovechar algunas de las propiedades funcionales de las proteínas del suero, tales como, formación de espuma, retención de agua libre y espesante. Debido a una continua actividad de investigación, se está logrando incrementar el número de aplicaciones funcionales (como fuente de péptidos con actividad biológica: hipotensivos, antioxidantes, antitrombóticos e inmunomoduladores, entre otros) y nutricionales (como fuente de energía, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales) del suero lácteo, promoviendo así su empleo como ingrediente y como alimento funcional.

### **2.1.3 Utilización de hidrolizados proteicos en horticultura**

Franco (1989), reporta que se han realizado experiencias de aplicación de hidrolizados proteicos en fertilización en las que se combina el aporte de aminoácidos con micronutrientes, para formar quelatos, y aprovechar, al mismo tiempo, la propiedad de los aminoácidos de favorecer la permeabilidad de la membrana celular, obteniéndose una mayor eficacia en la fertilización. De esta forma, se obtiene un aumento en el rendimiento en el cultivo de tomate de invernadero de hasta un 14% mediante la aplicación foliar de micronutrientes junto a aminoácidos obtenidos vía hidrólisis enzimática.

De igual modo, se han estudiado los efectos de la aplicación foliar de un producto obtenido por hidrólisis ácida en condiciones controladas sobre el cultivo de brócoli, variedad *Chararde F1*, alcanzándose un incremento de producción por aumento de peso de la pella principal y, sobre todo, por un mayor vigor en los rebrotes (Nusimovich *et al.* 1989).

Los aminoácidos libres y péptidos de muy bajo peso molecular son sustancias nutritivas de fácil absorción y asimilación, tanto por vía foliar como radicular que se

transportan a los órganos del vegetal como brotes, flores y frutos, en los cuales existe una mayor demanda debido a su actividad (Franco *et al.*, 1989).

Mediante la hidrólisis controlada de proteínas, se obtiene un equilibrio entre la cantidad de aminoácidos en forma libre y péptidos (moléculas formadas por varios aminoácidos) que otorga al hidrolizado una importante propiedad biocatalizadora de ciertas reacciones enzimáticas activando la síntesis de fitohormonas, así como un significativo papel como nutriente directo (Franco *et al.*, 1989).

El fortalecimiento de las paredes celulares, debido a aminoácidos como prolina e hidroxiprolina, confiere al vegetal mayor resistencia a las heladas, al soportar mejor sus células la presión ejercida por los cristales de hielo que se forman en el citoplasma, además, un aporte de aminoácidos puede posibilitar a la planta el seguir sintetizando proteínas cuando la actividad fotosintética queda relentizada por las bajas temperaturas (Franco *et al.*, 1989).

En cultivos afectados por accidentes climatológicos (heladas, pedrisco, sequía, etc.) la superficie foliar resulta mermada y sus tejidos parcial o totalmente dañados, la aplicación de aminoácidos puede ser un método apropiado de reactivar al vegetal por suponer un suministro de nutrientes directos que no es necesario metabolizar, evitando por esto un consumo de energía que la planta no está en condiciones de aportar. En este sentido, el tratamiento con un hidrolizado proteico sobre las plantas de patata posteriormente a una helada ha demostrado ser un procedimiento positivo de recuperación rápida de la planta, obteniéndose un sustancial incremento en la producción para recolección temprana (Franco *et al.*, 1989).

## **2.2 Fundamentación filosófica**

La investigación se ubica en el paradigma crítico (crítica a la racionalidad instrumental y técnica preconizada por el positivismo y exigiendo la necesidad de una racionalidad substantiva que incluya los juicios, los valores y los intereses de

la humanidad) - propositivo (hace énfasis en los datos empíricos, cuantitativos, como base del conocimiento científico).

Crítico porque revisa una realidad, la de la emisión de los efluentes líquidos orgánicos de los procesos lácteos, y propositivo por cuanto busca plantear una alternativa de solución a la contaminación de los recursos hídricos y a la conservación de la riqueza biótica de los ríos.

### **2.3 Fundamentación legal**

- Se fundamenta en la Constitución de la República del Ecuador: Capítulo 5 referente a los derechos colectivos, sección segunda, del medio ambiente que señala:

Art. 86.- El Estado protegerá el derecho de la población a vivir en un medio ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice un desarrollo sustentable. Velará para que este derecho no sea afectado y garantizará la preservación de la naturaleza.

Se declaran de interés público y se regularán conforme a la ley:

1. La preservación del medio ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país.
  2. La prevención de la contaminación ambiental, la recuperación de los espacios naturales degradados, el manejo sustentable de los recursos naturales y los requisitos que para estos fines deberán cumplir las actividades públicas y privadas.
- En el libro VI de TULAS con respecto a los criterios de calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario.

**TABLA 1:** Límites máximos permisibles de oxígeno disuelto en agua dulce y marina.

Parámetros	Expresados Como	Unidad	Límite máximo permisible		
			Agua fría dulce	Agua cálida dulce	Agua marina
Oxígeno Disuelto	O.D	mg/l	no menor al 80% y no menor a 6 mg/l	No menor al 60% y no menor a 5mg/l	No menor al 60% y no menor a 5mg/l

Elaborado por: Oscar Salazar

Todas las leyes y ordenanzas establecidas por los gobiernos seccionales, sobre los Recursos Naturales principalmente el recurso hídrico.

- Ley de Gestión Ambiental. R.O. No 245. Julio 30 de 1999 establece principios y directrices de políticas ambientales; determina las obligaciones, responsabilidades, niveles de participación de los sectores públicos y privados en la gestión ambiental y señala los límites permisibles, controles y sanciones en esta materia.
- Reglamento para la prevención y control de la contaminación ambiental, en lo relativo al recurso agua. R.O. No. 204, Julio 1989. Regula las actividades y fuentes que produzcan contaminación del agua, en aplicación de la ley para la prevención y control de la contaminación ambiental y el código de la salud.
- Reglamento para la prevención y control de la contaminación ambiental en lo referente al recurso suelo. R.O. No. 989, Julio 30 de 1992. Determina las medidas de control sobre las actividades que constituyan fuentes de deterioro y contaminación del suelo.

## 2.4 Fundamentación teórica

### 2.4.1 Enzimas

Las enzimas son catalizadores biológicos de naturaleza proteica altamente específicos. Se recuperan al final de la reacción igual como estaba al principio (no se consumen en la reacción) de tal manera que una pequeña cantidad de enzima puede catalizar una gran cantidad de sustrato (Cordero *et al.*, 2006).



## 2.4.2 Clasificación general de las Enzimas

La base de la clasificación y nomenclatura está en el tipo de reacción química que catalizan. De acuerdo con la clasificación internacional, las enzimas se agrupan en seis clases principales (Cordero *et al.*, 2006).

**TABLA 2:** Clasificación general de las enzimas

<b>Clase</b>	<b>Tipo de reacción que catalizan</b>
<b>Oxidorreductasas</b>	Las oxidorreductasas catalizan reacciones de oxidación – reducción. Facilitan la transferencia de electrones de una molécula a otra.
<b>Transferasas</b>	Las transferasas catalizan reacciones en las que hay una transferencia de grupos de una molécula a otra, entre estos grupos están, amino, carboxilo, carbonilo, metilo, fosforilo y acilo. Los nombres comunes suelen incluir el prefijo trans, por ejemplo transmetilasas, transaminasas.
<b>Hidrolasas</b>	Las hidrolasas catalizan reacciones en las que se produce la rotura de enlaces por adición del agua. Entre las hidrolasas están estererasas, fosfatasas, peptidasas, etc. A este tipo pertenecen las enzimas digestivas.
<b>Liasas</b>	Las liasas catalizan reacciones en las que se eliminan grupos para formar un doble enlace o se añaden a un doble enlace, entre las liasas están, las descarboxilasas, hidratasas, deshidratasas, desaminasas y sintasas.
<b>Isomerasas</b>	Se trata de un grupo heterogéneo de enzimas. Las isomerasas catalizan varios tipos de reordenamientos intramoleculares; catalizan reacciones en las cuales un isómero se transforma en otro, es decir, reacciones de isomerización.
<b>Ligasas</b>	Las ligasas catalizan la formación de un enlace entre dos moléculas de sustrato. La energía para estas reacciones la aporta siempre la hidrólisis del ATP. Los nombres de muchas ligasas incluyen el término sintetasa. Otras ligasas se denominan carboxilasas.

Elaborado por: Oscar Salazar

### 2.4.3 Clasificación de las enzimas proteolíticas

Las proteasas son enzimas hidrolíticas, clasificadas como **EC 3.4**. Estas enzimas degradan las proteínas mediante la hidrólisis de los enlaces peptídicos, como resultado de su actividad producen cadenas más cortas (péptidos) o aminoácidos libres, éstas son utilizadas en varios tipos de industria, como la cervecera, la de fabricación de detergentes, tratamiento de cuero, elaboración de quesos y en ablandamiento de carnes (Fernández, 2008).

En 1960, Hartley sugirió que era conveniente dividir a las enzimas proteolíticas o proteasas, con base en su mecanismo de acción, en 4 grupos: a) Serina-proteasas; b) Aspártico-proteasas c) Cisteína-proteasas y d) Metallo-proteasas (Whitaker, 2000).

Las enzimas ácidas como la pepsina pertenecen al grupo de las serina-proteasas, este grupo de proteasas se caracterizan por tener un residuo de serina muy reactivo en su sitio activo. Todas ellas son endoproteasas y además del residuo serina, también intervienen un residuo de histidina y un residuo de ácido aspártico en el proceso catalítico, formando la llamada tríada catalítica, característica de esta familia de enzimas (Whitaker, 2000).

Del sistema digestivo de animales marinos se han aislado tres enzimas serina-proteasas: tripsina, quimotripsina y elastasa. Estas enzimas tienen estructuras similares y comparten esencialmente la misma secuencia de aminoácidos alrededor de la tríada catalítica formada por la histidina 57, serina 195 y aspártico 102. Todas las proteasas pertenecientes a esta subclase tienen en común los primeros 3 dígitos del código asignado por la CE: 3.4.21, e individualmente les corresponden los siguientes códigos: tripsina 3.4.21.4, quimotripsina 3.4.21.1 y elastasa 3.4.21.11 (Whitaker, 2000).

Aunque todas las serina-proteasas presentan el mismo mecanismo de acción catalítica, su especificidad por el sustrato es muy diferente. La quimotripsina tiene especificidad para hidrolizar el enlace peptídico por el lado carboxilo de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano. La tripsina muestra su

especificidad para romper el enlace peptídico por el lado del grupo carboxilo de los aminoácidos con cadenas laterales voluminosas y con carga positiva, como lisina y arginina. La elastasa rompe específicamente el enlace peptídico por el lado carboxilo de aminoácidos pequeños e hidrofóbicos como alanina y valina (Whitaker, 2000).

#### **2.4.4 Contaminación orgánica por lacto suero**

La industria láctea genera cantidades significativas de residuos líquidos, mayormente leche diluida, leche separada, crema y suero, incluyendo grasas, aceites, sólidos suspendidos y nitrógeno. La descarga de estos residuos sin tratamiento previo se convierte en un foco contaminante. Los lavados contienen residuos alcalinos y químicos utilizados para remover la leche y los productos lácteos; así como materiales total o parcialmente caramelizados de los tanques, tambores, latas mantequeras, tinas, tuberías, bombas, salidas calientes y piso. (Valencia y Ramírez, 2009).

Los vertidos procedentes de restos de leche, lacto suero (contiene el 50% de nutrientes del producto inicial) y salmueras aumentan considerablemente la carga contaminante del vertido final.

El suero de leche es altamente contaminante, con una DBO que varía entre 30000 a 50000 mg/l, además de la cantidad de ácido láctico presente en él, alteran significativamente los procesos biológicos que se llevan a cabo en las plantas de tratamiento aumentando los costos. Para el tratamiento de suero lácteo, preferentemente se aplican tratamientos biológicos antes de ser vertido a los suelos y ríos, es por ello que se plantean procesos convencionales y no convencionales. Los procesos convencionales depuran las aguas residuales y no el suero en sí. Mientras que los procesos no convencionales aíslan en una primera etapa las corrientes residuales sin mezclarlas con corrientes indeseables, su objetivo es utilizar el residuo industrial para obtener diversos productos de fermentación. El uso de levaduras y bacterias lácticas es común en estos procesos de producción, con la ventaja de que se disminuye la cantidad de

contaminantes facilitando la eliminación final de efluentes industriales. (Valencia *et al.*, 2009).

#### **2.4.5 Aminoácidos en las plantas**

Los aminoácidos son compuestos fundamentales para la vida de todo ser vivo, ya que contienen C, H, O, S y N, que se enlazan para formar estructuras básicas en la célula de un ser vivo.

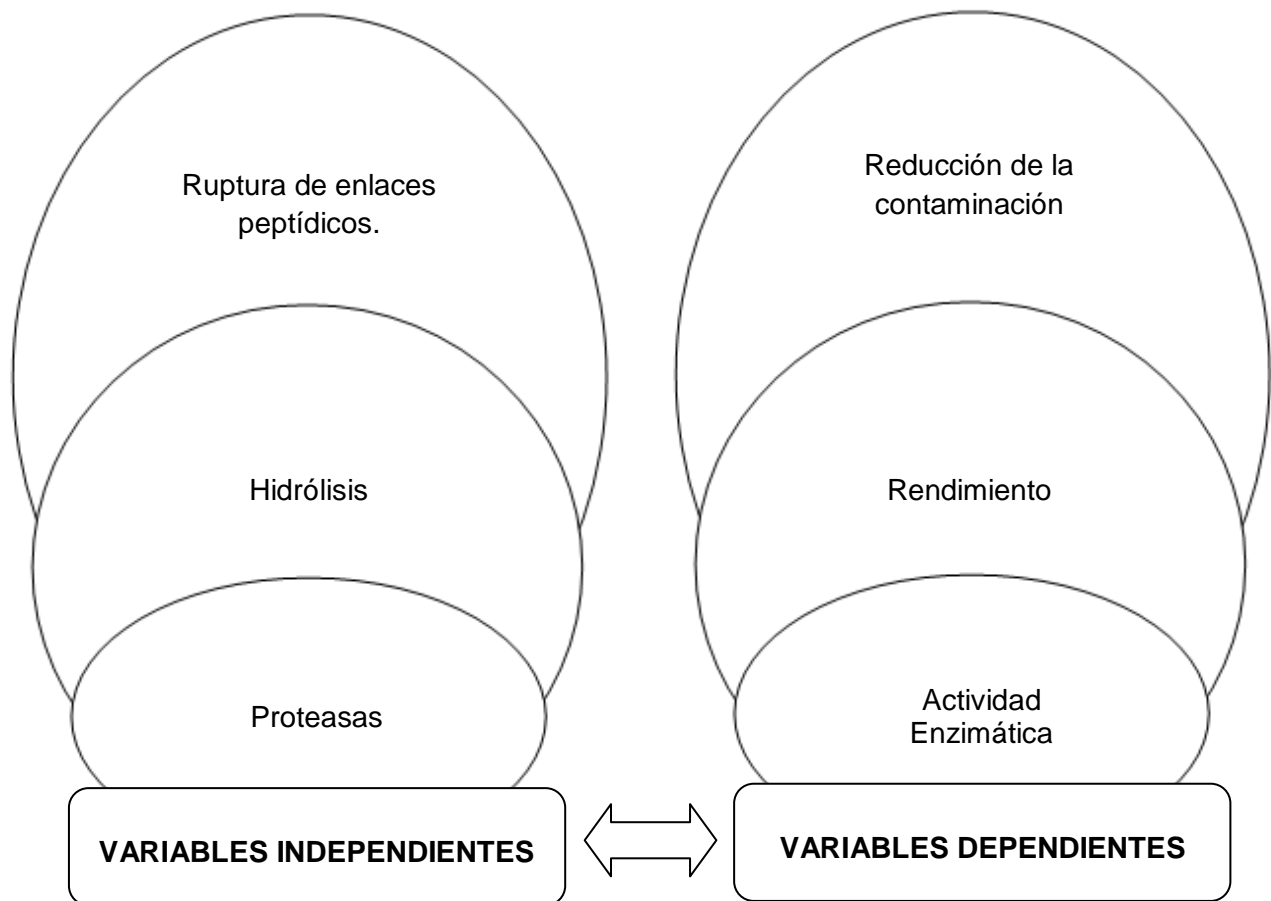
Los aminoácidos libres son sustancias nutritivas de fácil absorción y asimilación, tanto por vía foliar como radicular, transportándose rápidamente a los órganos del vegetal en los que existe una mayor demanda debido a su actividad. Los aminoácidos tienen una importante actividad biocatalizadora de reacciones enzimáticas, activando la síntesis de fitohormonas, así como un importante papel como nutriente directo de fácil asimilación que no es necesario metabolizar (Acuña y Simbaña, 2008).

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 (Acuña y Simbaña, 2008).

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, poder catalizador y regulador del crecimiento actuando en los mecanismos enzimáticos fundamentales.
- Mejora la polinización de los frutos.
- Resistencia a estrés hídrico, heladas y sequías de las plantas.

## 2.5 Categorías fundamentales



## 2.6 Hipótesis

**Ho:** La utilización de proteasas en solución no hidroliza las proteínas presentes en el suero lácteo.

**Hi:** La utilización de proteasas en solución hidroliza las proteínas presentes en el suero lácteo.

## **2.7 Señalamiento de variables de la hipótesis**

### **Variables independientes:**

- Naturaleza de la enzima
- Temperatura de hidrólisis
- Tiempo de hidrólisis

### **Variable dependiente:**

- Grado de hidrólisis del suero lácteo

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### **3.1 Enfoque**

El enfoque de la presente investigación se basa tanto en el paradigma cualitativo como en el paradigma cuantitativo porque se determina experimentalmente la relación que existe entre las características de las proteasas obtenidas del tracto de las truchas arcoíris, con el grado de hidrólisis del suero lácteo.

#### **3.2 Modalidad básica de la investigación**

Modalidad de aplicación: dado que el máximo objetivo es reducir la contaminación por proteínas presentes en el suero lácteo.

Investigación experimental: el objetivo se centra en controlar el fenómeno a estudiar. Se emplea el razonamiento hipotético-deductivo utilizando un diseño experimental apropiado como estrategia de control y, sobre todo, como una metodología cuantitativa para obtener el mejor rendimiento de hidrólisis.

Modalidad bibliográfica: mediante una revisión bibliográfica del tema se puede conocer el estado actual de los métodos empleados para hidrolizar biológicamente las grandes cadenas proteínicas, ya que este problema deriva en la contaminación ambiental, por los efluentes de las queserías, todo esto mediante la búsqueda, recopilación, organización, valoración crítica de información bibliográfica lo cual permite una visión panorámica del problema.

#### **3.3 Nivel o tipo de investigación**

El desarrollo de esta investigación se basa en un nivel descriptivo, ya que en este trabajo se describe, analiza e interpreta sistemáticamente un conjunto de hechos

relacionados con las variables, para obtener el mejor grado de hidrólisis del suero lácteo.

A través del método descriptivo se identifica y conoce la naturaleza de una situación en la medida que ella existe durante el tiempo de estudio. Su propósito básico es, describir cómo se presenta y qué existe con respecto a las variables o condiciones en una situación.

La investigación descriptiva se centra en controlar el fenómeno o problema a estudiar y emplear el razonamiento hipotético-deductivo, utilizando un diseño experimental apropiado como estrategia de control y metodología cuantitativa para analizar los datos, estos estudios describen la frecuencia y las características más importantes del problema.

### 3.4 Población y Muestra

#### 3.4.1 Diseño experimental

Para el estudio se utilizó un diseño AxBxC con 2 réplicas de cada tratamiento.

#### Modelo Matemático

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + R_l + \epsilon_{ijkl}$$

#### Dónde:

$\mu$  = efecto global

$A_i$  = efecto del i-ésimo nivel del factor A

$B_j$  = efecto del j-ésimo nivel del factor B

$C_k$  = efecto del k-ésimo nivel del factor C



$(AB)_{ij}$  = efecto de la interacción entre los factores A y B

$(AC)_{ik}$  = efecto de la interacción entre los factores A y C

$(BC)_{jk}$  = efecto de la interacción entre los factores B y C

$(ABC)_{ijk}$  = efecto de la interacción entre los factores A, B y C

RI = efecto de la replicación del experimento

$\epsilon_{ijkl}$  = residuo o error experimental

**TABLA 3: Factores para el diseño experimental**

Factor A = Origen de las enzimas	
<b>a<sub>0</sub></b>	Enzimas Ácidas pH 4 (estómagos)
<b>a<sub>1</sub></b>	Enzimas Alcalinas pH 9 (intestinos)
Factor B = Temperatura para la hidrólisis	
<b>b<sub>0</sub></b>	18°C
<b>b<sub>1</sub></b>	38°C
Factor C = Tiempo de hidrólisis	
<b>c<sub>0</sub></b>	1 Hora
<b>c<sub>1</sub></b>	2 Horas
<b>c<sub>2</sub></b>	3 Horas
<b>c<sub>3</sub></b>	4 Horas

Elaborado por: Oscar Salazar

**TABLA 4: Combinación de tratamientos**

<b>Combinación</b>	<b>Origen de las enzimas</b>	<b>Temperatura para la hidrólisis</b>	<b>Tiempo para la hidrólisis</b>
$a_0b_0C_0$	Intestinos	18°C	1 Hora
$a_0b_0C_1$	Intestinos	18°C	2 Horas
$a_0b_0C_2$	Intestinos	18°C	3 Horas
$a_0b_0C_3$	Intestinos	18°C	4 Horas
$a_0b_1C_0$	Intestinos	38°C	1 Hora
$a_0b_1C_1$	Intestinos	38°C	2 Horas
$a_0b_1C_2$	Intestinos	38°C	3 Horas
$a_0b_1C_3$	Intestinos	38°C	4 Horas
$a_1b_0C_0$	Estómago	18°C	1 Hora
$a_1b_0C_1$	Estómago	18°C	2 Horas
$a_1b_0C_2$	Estómago	18°C	3 Horas
$a_1b_0C_3$	Estómago	18°C	4 Horas
$a_1b_1C_0$	Estómago	38°C	1 Hora
$a_1b_1C_1$	Estómago	38°C	2 Horas
$a_1b_1C_2$	Estómago	38°C	3 Horas
$a_1b_1C_3$	Estómago	38°C	4 Horas

Elaborado por: Oscar Salazar

### 3.5 Operacionalización de las variables

**TABLA 5: Operacionalización de las variables independientes: naturaleza de la enzima, temperatura de hidrólisis, tiempo de hidrólisis.**

OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES INDEPENDIENTES					
DESCRIPCIÓN	CONCEPTUALIZACIÓN	CATEGORIZACIÓN	INDICADORES	ITEMS BÁSICOS	TÉCNICAS E INSTRUMENTALES
Naturaleza de la enzima.	Obtener enzimas de dos tejidos diferentes.	Cuantificar el contenido de proteínas solubles con actividad proteásica.	Análisis espectrofotométrico de la actividad hidrolítica de la enzima sobre el suero lácteo	¿Considera que existe diferencia en el rendimiento de hidrólisis si se utiliza enzimas ácidas y alcalinas?	Técnicas experimentales Bibliografía.
Temperatura de Hidrólisis.	Trabajar con dos temperaturas diferentes.	Determinar a qué temperatura se obtiene mejor grado de hidrólisis.	Análisis espectrofotométrico de la actividad hidrolítica de la enzima en el suero lácteo.	¿A qué temperatura se obtiene mayor hidrólisis?	Técnicas experimentales Bibliografía.
Tiempo de Hidrólisis	Trabajar a cuatro tiempos diferentes.	Establecer el tiempo óptimo en el que se obtiene el mejor grado de hidrólisis.	Análisis espectrofotométrico de la actividad hidrolítica de la enzima en el suero lácteo.	¿Cuál es el tiempo óptimo para la hidrólisis?	Técnicas experimentales Bibliografía.

**TABLA 6: Operacionalización de las variable dependiente: porcentaje de hidrólisis**

OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE DEPENDIENTE					
DESCRIPCIÓN	CONCEPTUALIZACIÓN	CATEGORIZACIÓN	INDICADORES	ITEMS BÁSICOS	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS
Porcentaje de hidrólisis	Medir el grado de hidrólisis alcanzado con las enzimas ácidas y alcalinas.	Método colorimétrico	Hidrólisis del suero lácteo.	¿Son suficientes los indicadores a utilizar?	Análisis espectrofotométrico de hidrólisis de proteínas.

### **3.6 Recolección de información**

Metodológicamente para la construcción de la información se opera en dos fases: plan para la recolección de información y plan para el procesamiento de la información (Herrera, 2002).

#### **Obtención de proteasas**

Se adquirió truchas arco iris en el Centro recreacional de pesca deportiva “El Chaparral” del cantón Salcedo de la provincia de Cotopaxi, las que fueron seleccionadas por tamaño, para facilitar el transporte.

Se extrajo el tracto digestivo completo en baño de hielo realizando una incisión en toda la parte inferior de la trucha, se separó las dos regiones digestivas estómago e intestinos. El criterio de separar las distintas regiones digestivas se basó en comprobar si estas diferencias reflejarán cambios en las características de las proteasas que actúan en cada parte del aparato digestivo.

Los extractos enzimáticos se obtuvieron tras homogeneizar las porciones digestivas triturando en un mortero el estómago con buffer de acetato de sodio pH 4 en una proporción 1 a 2 peso/volumen, y los intestinos en buffer carbonato de sodio de pH 9 con la misma relación peso volumen (1 a 2). Los homogeneizados fueron centrifugados a 3000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se almacenó a temperatura de refrigeración hasta su posterior uso (Moyano *et al.*, 1996).

#### **Cuantificación de proteínas por el método de Lowry**

El método de Lowry es una técnica colorimétrica de valoración cuantitativa de las proteínas que combina la reacción de Biuret con la reducción del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu por los residuos de tirosina y triptófano de las proteínas (Chang, 2003). A la muestra se añade el reactivo de Lowry que forma un complejo coloreado con las proteínas, cuya intensidad de color es proporcional a la

concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer. Para la aplicación del método requerimos las siguientes soluciones:

- Solución Standard de seroalbumina bovina (BSA) de 1 mg/ml.
- Muestra problema, de concentración desconocida.
- Reactivo de Lowry, compuesto por tres soluciones que se mezclarán en el momento de su utilización, la solución A: Carbonato sódico al 2% en NaOH 0,1 M, la solución B: Sulfato cúprico al 1%, y la solución C: Tartrato sódico-potásico al 2%. En el momento de su uso se mezcló 50 ml de A con 0,5 ml de B y 0,5 ml de C.
- Reactivo de fenoles de Folin-Ciocalteu. Este reactivo viene preparado comercialmente y se debe mantener en refrigeración. Para su uso se diluyó inmediatamente antes de la adición en relación de 1:2 (33%) en agua destilada.

### **Curva de calibración de albúmina sérica bovina (BSA)**

Para preparar la curva de calibración se tomó 0,2-0,4-0,6-0,8 y 1 ml de la solución madre de albúmina sérica bovina (1 mg/ml), y se completó el volumen de cada una hasta 1 ml con agua destilada, se agregó 5 ml de reactivo de Lowry en cada tubo, se agitó y se dejó en reposo por 15 minutos, para agregar 0,5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua al 33%, se agitó y se dejó reposar 30 minutos, se procedió leer las absorbancias de cada tubo en un espectrofotómetro HACH DR 2800, a una longitud de onda de 500 nm, los datos de absorbancias se reportan en la Tabla A3 y la curva de calibración en el Gráfico A1.

La pendiente de la recta será el factor que relaciona a la absorbancia obtenida a 500 nm con la concentración de proteínas en la muestra.

## **Cuantificación de las proteínas de la muestra**

Para medir las absorbancias en las muestras se tomó 0,2 y 0,4 ml de la solución del estómago y de los intestinos, respectivamente, se completó el volumen de cada una hasta 1 ml con agua destilada, se agregó 5 ml de reactivo de Lowry en cada tubo, se agitó enérgicamente y se dejó en reposo por 15 minutos, para agregar 0,5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu al 33% diluido en agua, se agitó enérgicamente, se dejó reposar 30 minutos y se procedió a realizar las lecturas de absorbancia cada tubo en un espectrofotómetro HACH DR 2800 a una longitud de onda de 500 nm, los datos de absorbancias se reportan en la Tabla A2 y la concentración de proteínas obtenida mediante la ecuación de la curva de calibración se reporta en la Tabla A4.

## **Determinación de la actividad enzimática**

Cuando se requiere determinar la actividad proteolítica de una enzima, uno de los ensayos más empleados es el método de Anson (1938), utilizando hemoglobina desnaturalizada como sustrato.

Para la cuantificación de la actividad de las proteasas del estómago, se hidrolizó 2,5 ml de hemoglobina (2,0% p/v, pH 1,6) desnaturalizada con HCl 0,3 N con 0,5 ml de la solución de la proteasa del estómago extraída a pH 4, y para la cuantificación de las proteasas de los intestinos extraídas a pH 9, el sustrato fue hemoglobina al 2,2% desnaturalizada con urea en medio alcalino, ambas reacciones se realizaron a 25°C, durante 10 min. La hemoglobina que no se hidrolizó se precipitó con 5 ml de ácido tricloroacético (TCA al 8%). Para eliminar cualquier residuo sólido, se centrifugó el sobrenadante, a 10000 rpm por 15 minutos, se tomó una alícuota de 1,5 ml del sobrenadante clarificado, se agregó 5 ml de hidróxido de sodio 0,5 N, se agitó enérgicamente y se añadió 1,5 ml de reactivo fenólico al 33%, el cual produce una coloración azul con tirosina, triptófano y en menor grado con cistina, cisteína e histidina. La absorbancia se midió a 600 nm en un espectrofotómetro HACH DR 2800 (Guadix *et al.*, 2000); los

valores de las absorbancias así como de la actividad de las proteasas se presenta en la Tabla A7.

Para la proteasa del estómago, 1 unidad de actividad ( $UE_{\text{Estómagos}}$ ) se definió como la cantidad de enzima que permite la formación de hemoglobina digerida no precipitable por ácido tricloroacético con la misma absorbancia que 1 miliequivalente de tirosina por minuto en 5 ml de la mezcla estándar de digestión a pH 1,6 y 25°C.

Para las proteasas de los intestinos,  $1UE_{\text{Intestinos}}$  equivale a la cantidad de enzima que permite la formación de hemoglobina digerida no precipitable por ácido tricloroacético con la misma absorbancia que 1 miliequivalente de tirosina por minuto en 5 ml de la mezcla estándar de digestión, medida a pH 7,5 y 25°C a partir de hemoglobina parcialmente desnaturalizada con urea en medio alcalino.

La expresión matemática para el cálculo de la actividad para los dos tipos de enzimas es la siguiente:

$$\text{Activ.} \frac{UE}{ml} = \frac{[Tyr]mM}{t(\text{min})} \times \frac{V_{\text{Reacción}}(l)}{V_{\text{enz}}(ml)} \times F_d$$

Donde: [Tyr] = a las milimoles de Tyr/l obtenidas a partir de la curva estándar  
t = 10 min  
 $V_{\text{Reacción}}=3 \text{ ml} = 3 \times 10^{-3}L$   
 $V_{\text{enz}} = 0,5 \text{ ml}$   
Fd = factor de dilución que en este caso es 1 porque no hubo dilución de los productos de la reacción

### Curva de calibración con tirosina

Para obtener la curva de calibración de tirosina se preparó una solución madre diluyendo 16,19 mg de tirosina en 500 ml de HCl 0,2 N, de esta solución (madre) se obtuvo cinco diluciones tomando 1, 2, 3, 4 y 5 ml de la solución madre para



completar 5 ml con HCl 0,2 N, a fin de trabajar con concentraciones más reales se pesó tanto las alícuotas de la solución madre como la solución completa (Sol madre + HCl 0,2 N).

De cada dilución se tomó una alícuota de 1,5 ml para suspenderla en 5 ml de NaOH 0,5 N, agregarle 1,5 ml de Folin-Ciocalteu y medir las absorbancias en un espectrofotómetro HACH DR 2800 a una longitud de 600 nm, los datos de las absorbancias obtenidas en cada dilución se muestran en la Tabla A6 y la curva de calibración de tirosina se presenta en el Gráfico A2 con la ecuación de la recta que relaciona las absorbancias obtenidas a 600 nm con la concentración mM de tirosina.

La solución madre (stock) de tirosina presentó una absorbancia de 0,521 la misma que al realizar los cálculos se obtuvo una concentración de 0,179 mM de tirosina.

### **Tratamientos de hidrólisis enzimática en el suero lácteo**

El suero empleado para la hidrólisis fue obtenido de la empresa de productos lácteos “Kazú” del cantón Ambato de la provincia de Tungurahua.

Para elaborar las curvas de hidrólisis del suero lácteo producidas por la actividad de las proteasas presentes en el tracto de las truchas, se colocó en un erlenmeyer 36 ml de suero lácteo con 4 ml de la solución de proteasas del estómago, se agitó e inmediatamente se tomó una alícuota de 3 ml de la solución, la cual constituye el blanco, a continuación se colocó este matraz en un agitador NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC a una temperatura de 18°C y a una velocidad de agitación de 150 rpm y se comenzó a registrar el tiempo de reacción.

A la primera hora de hidrólisis se tomó una alícuota de 3 ml la cual constituye el tratamiento a0b0c0, a las 2 horas se extrajo otra alícuota de 3 ml que corresponde al tratamiento a0b0c1, a las 3 horas se tomó la siguiente alícuota de 3 ml la cual representa al tratamiento a0b0c2, y finalmente a las 4 horas se extrajo la otra alícuota de 3 ml que corresponde al tratamiento a0b0c3. El mismo procedimiento

se siguió para extraer las muestras de las combinaciones de todos los factores; a cada alícuota (3 ml) se agregó 5 ml de ácido tricloroacético al 8% diluido en agua para precipitar las proteínas que no fueron hidrolizadas, se centrifugó la mezcla a 10000 rpm por 15 minutos en una centrifuga PLC SERIES, se tomó una alícuota de 1,5 ml del sobrenadante y se procedió como se describe para los estándares de tirosina. Se midió la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro HACH DR 2800 y los datos de absorbancia obtenidos en cada tratamiento se reportan en la Tabla A5.

La cantidad de producto formado por la actividad hidrolítica de las proteasas del estómago y del intestino de la trucha se determinó a partir de las absorbancias de cada tratamiento, calculando la concentración de tirosina liberada de las proteínas presentes en el suero lácteo. Los valores calculados se presentan en la Tabla A8.

### **Determinación del porcentaje de hidrólisis**

En la hidrólisis enzimática de proteínas hasta péptidos o aminoácidos, por acción de enzimas proteolíticas, la composición final y, por tanto, el uso de los hidrolizados dependerá principalmente de la fuente proteica, del tipo de proteasa usada, de las condiciones de hidrólisis y del grado de hidrólisis alcanzado en la reacción.

### **Hidrólisis total del suero lácteo**

En una ampolla de vidrio se colocó 1,5 ml de ácido clorhídrico (8 M) con 0,5 ml del suero que va a ser tratado, se lo llevó a la estufa a 110°C por 48 horas, con el objeto de romper todos los enlaces peptídicos de las proteínas (Guardix *et al.*, 2000).

Pasado el tiempo mencionado se enfrió la muestra, se neutralizó con 3,1 ml de hidróxido de sodio (8 M), se la centrifugó por 15 minutos a 10000 rpm en una centrifuga PLC SERIES, se tomó 1 ml del sobrenadante y se diluyó con 3 ml de agua, de esta dilución (1/4) se tomó 1,5 ml, se agregó 5 ml de hidróxido de sodio (0,5 M) y 1,5 ml de Reactivo fenólico (33%) para obtener un color azul cuya

intensidad se determinó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro HACH DR 2800 a 600 nm.

### **Preparación del blanco**

En un tubo de ensayo se colocó 1,5 ml de ácido clorhídrico (8 M) con 0,5 ml del suero que va a ser tratado, se neutralizó con 3,1 ml de hidróxido de sodio (8 M), se lo centrifugó por 15 minutos a 10000 rpm en una centrifuga PLC SERIES, se tomó 1 ml del sobrenadante se diluyó con 3 ml de agua, de esta dilución 1/4 se tomó 1,5 ml, se le agregó 5 ml de hidróxido de sodio (0,5 M) y 1,5 ml de Reactivo fenólico (33%) para medir la absorbancia en un espectrofotómetro HACH 2800 a 600 nm.

### **Empleo del suero hidrolizado en plantas de rábano**

Se sembró rábanos en dos cajas, tres semillas en cada hoyo ubicados a un radio de 10 cm, con el mismo tipo de tierra, a una caja se la aplicó foliar, y radicularmente el suero lácteo hidrolizado diluido al 10% en agua potable, en la otra caja se le aplicó foliar y radicularmente agua potable, ésta sirvió como testigo.

Para la aplicación del suero hidrolizado se regó las plantas cada semana iniciando el proceso a la semana de haber sido sembrados.

### **3.7 Procesamiento y análisis de información**

El procesamiento y análisis estadístico de datos se realizó en los paquetes informáticos: Excel 2010 y STATGRAPHICS. Se aplicó el análisis de varianza ANOVA y pruebas de comparación múltiple para la elección del mejor tratamiento, con un intervalo de confianza del 95 %.

## CAPÍTULO IV

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La materia prima para la extracción de las proteasas fueron los estómagos y los intestinos de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). El peso de los estómagos (25,72 g) de la muestra formada por cuatro truchas, fue superior en un 25,6% al de los intestinos (20,47 g), como se observa en la tabla A1 (Anexos).

#### 4.1 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Dos factores importantes de determinar para una caracterización preliminar de enzimas son el contenido de proteínas y la actividad enzimática, debido a que las enzimas son catalizadores proteicos. En la Tabla 7 se resumen los valores de estas dos propiedades, calculados a partir de los datos y gráficos que constan en el Anexo A, Tablas A2-A5 y Gráficos A1 y A2. Se incluye también la actividad específica de las proteasas de trucha.

**TABLA 7:** Contenido de proteínas, actividad catalítica y actividad específica de las proteasas extraídas del tracto digestivo de truchas.

Fuente	Concentración proteica (mg de BSA/ml)	Actividad catalítica (UE/ml)	Activ. Específica* (UE/mg proteína)
Estómagos	1,213±0,04	4,70E-04	3,87E-04
Intestinos	1,446±0,02	6,92E-05	4,79E-05

Elaborado por: Oscar Salazar

\*Relación entre la actividad catalítica y el contenido de proteína de las enzimas

La Tabla A4 muestra los contenidos proteicos de las dos secciones de las truchas, expresados como albúmina de suero bovino (BSA), calculados a partir de la curva de calibración de BSA (Gráfico A1).

Los resultados revelan que existe una concentración de proteínas expresadas como BSA equivalente a 1,213±0,04 mg/ml en los estómagos de las truchas frente a una concentración de 1,446±0,02 mg/ml para las proteasas de los intestinos, en

ambos casos las concentraciones fueron calculadas en muestra húmeda, estos datos muestran que la concentración de proteínas en los intestinos es mayor en un 8,77%.

#### **4.2 Determinación de la actividad enzimática**

Por medio del método normalizado de Anson se determinó la actividad proteolítica de las enzimas presentes en el tracto de las truchas, empleando hemoglobina como sustrato. La actividad catalítica de las enzimas del estómago fue de  $4,70E-04$   $UE_{est}/ml$  de extracto ( $mM$  de tirosina/ $min$ - $ml$ ), en tanto que las de los intestinos tuvieron una actividad de  $6,92E-05$   $UE_{int}/ml$ . Sin embargo, no es factible establecer una comparación exacta entre los valores de actividad ya que las condiciones de hidrólisis ( $pH$  del medio de reacción y preparación del sustrato) empleadas para los dos tipos de proteasas son distintas.

#### **4.3 Hidrólisis enzimática de proteínas en el suero lácteo**

Para la evaluación de la hidrólisis de las proteínas en el suero lácteo se midió las absorbancias de cada tratamiento por triplicado (Tabla A5). Las curvas de cinética enzimática en los 16 tratamientos se presentan en los gráficos A3, A4, A5, y A6, en éstos se observa el avance de la hidrólisis del suero lácteo provocado por las proteasas del tracto digestivo de la trucha expresado como variación de la absorbancia a 600 nm debido a la presencia de fragmentos de proteína no precipitables con TCA. Al analizar estas gráficas se nota que las proteasas ácidas a una temperatura de  $18^{\circ}C$  (gráfico A-3), producen la máxima conversión a las 4 horas de reacción. Las proteasas ácidas a  $38^{\circ}C$  (gráfico A4), presentan mayor actividad enzimática, 50% más alta que a  $18^{\circ}C$  en la primera hora de proceso luego de la cual disminuye significativamente. A  $38^{\circ}C$  se obtiene la misma conversión máxima luego de 4 horas pero el incremento en la cantidad de producto formado luego de la primera hora es tan solo del 9% frente al 66% de aumento cuando la temperatura es de  $18^{\circ}C$ .

El proceso de hidrólisis de las proteínas del suero lácteo catalizado por las proteasas alcalinas, muestra que al cabo de 4 h de proceso no ha alcanzado la máxima conversión a ninguna de las dos temperaturas (Gráficos A5 y A6). A 18°C (Gráfico A5), se ha conseguido apenas un tercio del máximo logrado con las proteasas ácidas y a 38°C (Gráfico A6), la conversión equivale tan solo al 43,6% del valor final con proteasas ácidas.

En la Tabla B1 se reportan los resultados del análisis de varianza para los valores de hidrólisis del suero lácteo, utilizando el 95 % de nivel de confianza se demuestra que existe diferencia significativa al aplicar los niveles del factor a (Origen de las enzimas), b (Temperatura de Reacción) y c (Tiempo de Reacción), al igual que el efecto combinado de los factores sobre la actividad hidrolítica del suero lácteo.

La prueba de comparación múltiple (Tukey) de la Tabla B2 con respecto a la interacción origen-temperatura con un 95 % de nivel de confianza, indica que el tratamiento a0b1 (ácidas-38°C) presenta mayor actividad hidrolítica con un promedio de absorbancia de 0,2787 en tanto que con el tratamiento a1b0 (alcalinas-18°C) la conversión es la menor de la obtenida con todos los demás tratamientos con 0,0740 de absorbancia.

La Tabla B3 de la prueba de comparación múltiple (Tukey) para la interacción origen-tiempo con un 95 % de nivel de confianza, indica que el tratamiento a0c3 (ácidas-4 horas) presenta mayor actividad hidrolítica con un promedio de absorbancia de 0,2918.

La Tabla B4 de la prueba de comparación múltiple (Tukey) para la interacción temperatura-tiempo con un 95 % de nivel de confianza, indica que el tratamiento b1c3 (38°C-4 horas) presenta mayor actividad hidrolítica con un promedio de absorbancia de 0,2097.

Finalmente en la Tabla B5 se pueden observar los resultados de las interacciones de los tres factores con todos sus niveles. El tratamiento a0b0c3 (ácidas-18°C -4 horas) presenta el mayor promedio de hidrólisis del suero lácteo, con una absorbancia de 0,2927 lo cual determina que es el mejor tratamiento para realizar la hidrólisis del suero lácteo.

Los resultados promedios luego del respectivo análisis estadístico, indican que el tratamiento con mayor concentración de tirosina es el a0b0c3 (ácidas 18°C - 4 horas) el cual generó 0,090 mM de tirosina, y produjo un porcentaje de hidrólisis de enlaces peptídicos de 9,3% (Tabla A9).

#### **4.4 Empleo del suero hidrolizado en plantas de rábano**

Para el empleo del suero lácteo hidrolizado se realizó una dilución al 10% en agua potable, el modo de empleo fue cada semana iniciando una semana después de haber sido sembrados, la aplicación fue vía foliar (hojas), y radicular (raíces).

En las plantas de rábanos se registró que el empleo del hidrolizado controló de mejor manera la humedad de la tierra como se puede notar al comparar las fotografías C16, C17, así también se observó que el hidrolizado del suero aportó nutrientes (péptidos y aminoácidos) que fueron asimilados por las plantas, prueba de ésto es el aumento en el tamaño del follaje y de los rábanos como se observa en las fotografías C18 y C19, a consecuencia de ésto el peso promedio de cada planta aumentó en un 22,53%.

#### **4.5 Verificación de hipótesis**

Después de analizar los resultados de conversión obtenidos gracias a la actividad proteolítica de los extractos enzimáticos del estómago y los intestinos, determinada por la concentración milimolar de tirosina en la fracción no precipitada con TCA y el porcentaje de hidrólisis, se aceptó la hipótesis alternativa que menciona “La utilización de proteasas en solución hidroliza las proteínas presentes en el suero lácteo”.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

- A nivel de laboratorio se comprobó la hidrólisis enzimática de proteínas presentes en el suero lácteo con proteasas en solución obtenidas del tracto de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Se observó mediante la aplicación del hidrolizado proteínico en plantas de rábanos, el efecto que produce al ser empleado como fertilizante orgánico, sugiriendo otro destino para el suero residual que de otro modo sería desechado convirtiéndose en un contaminante orgánico en diferentes fuentes hídricas.
- Se aplicó un método sencillo para extracción de proteasas partiendo del tracto de truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), este procedimiento incluye maceración en buffer acetato de sodio (pH 4) para las de los estómagos y en buffer carbonato de sodio (pH 9) para las obtenidas de los intestinos, seguido por centrifugación, recuperación del sobrenadante para obtener las proteínas en solución. Se determinó que existe mayor concentración de proteínas en el extracto de los intestinos con  $1,446 \pm 0,02$  mg/ml que en el de los estómagos cuya concentración es de  $1,213 \pm 0,04$  mg/ml, ambas concentraciones expresadas como mg/ml de BSA. Se determinó también la actividad proteásica por el método de Anson utilizando hemoglobina parcialmente desnaturizada como sustrato. Los valores de actividad fueron de  $4,70E-04$  y  $6,92E-05$  UE (milimoles de tirosinas desprendidas por la hidrólisis/min-ml de extracto) para las enzimas extraídas utilizando los estómagos y los intestinos, respectivamente.
- Los factores de interacción origen de las proteasas, temperatura y tiempo de reacción influyen significativamente en la actividad proteolítica de las proteasas sobre el suero lácteo, analizados al 95 % del nivel de confianza,



por ello se realizó la prueba Tukey y se determinó que la mejor combinación de los niveles de cada factor y por ende el mejor tratamiento para la hidrólisis del suero lácteo es el a0b0c3, que combina el nivel bajo del factor A origen de las proteasas a0 (proteasas ácidas), el nivel bajo del factor B temperatura de reacción b0 (18°C) y el nivel alto del factor C Tiempo de reacción c3 (4 horas).

El porcentaje de máximo de enlaces peptídicos hidrolizados a partir de las proteínas presentes en el suero lácteo se obtuvo con el tratamiento a0b0c3 (proteasas ácidas 18°C 4 horas) y fue del 9,3%

- Se demostró que la aplicación foliar y radicular de la solución al 10% de suero hidrolizado en plantas de rábano retiene la humedad de la tierra, de esta manera controla de mejor manera la hidratación de las plantas, además los péptidos y aminoácidos resultantes de la hidrólisis de las proteínas del suero lácteo pueden ser asimilados por las plantas, prueba de esto es el aumento del tamaño del follaje y del rábano, lo cual muestra que el suero lácteo hidrolizado mejoró la calidad nutricional del sustrato de las plantas.

## **5.2 Recomendaciones**

- Trabajar en condiciones físicas específicas para reducir el error que puede ser causado por las mismas, y respetar los tiempos de reacción.
- Al preparar soluciones madre o stock trabajar mediante pesaje de las soluciones para disminuir las fuentes de error y manejar las soluciones con concentraciones más reales.
- Realizar una caracterización del suero hidrolizado, para emplearlo en futuras investigaciones.

## CAPÍTULO VI

### PROPUESTA

#### 6.1 Datos informativos

**Título:** “Aplicación de suero lácteo hidrolizado como fertilizante orgánico en cultivos de papas (*Solanum tuberosum*), para estudiar el efecto ante las heladas”.

**Institución Ejecutora:** Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Carrera de Ingeniería Bioquímica

**Beneficiarios:** Sector de la investigación científica, ONG’S (Organizaciones no Gubernamentales), pequeños y medianos agricultores.

**Director del Proyecto:** Ing. Mg. Cecilia Carpio

**Personal Operativo:** Egdo. Oscar Salazar

**Ubicación:** Ambato – Ecuador

**Tiempo estimado de duración:** 10 meses

**Fecha de inicio:** marzo 2014.

**Costo:** \$ 2000

## 6.2 Antecedentes de la propuesta

Según Franco (1989) se ha realizado experiencias de aplicación de hidrolizados proteicos en fertilización en las que se combina el aporte de aminoácidos con micronutrientes, para formar quelatos, y aprovechar, al mismo tiempo, la propiedad de los aminoácidos de favorecer la permeabilidad de la membrana celular, obteniéndose una mayor eficacia en la fertilización. De esta forma, obtiene un aumento en el rendimiento en el cultivo de tomate de invernadero de hasta un 14% mediante la aplicación foliar de micronutrientes junto a aminoácidos obtenidos vía hidrólisis enzimática.

De igual modo, se han estudiado los efectos de la aplicación foliar de un producto obtenido por hidrólisis ácida en condiciones controladas sobre el cultivo de brócoli, variedad Chararde F1, alcanzándose un incremento de producción por aumento de peso de la pella principal y, sobre todo, por un mayor vigor en los rebrotes (Nusimovich *et al.*, 1989).

En cultivos afectados por accidentes climatológicos (heladas, pedrisco, sequía, etc.) la superficie foliar resulta mermada y sus tejidos parcial o totalmente dañados, la aplicación de aminoácidos puede ser un método apropiado de reactivar al vegetal por suponer un suministro de nutrientes directos que no es necesario metabolizar, evitando por esto un consumo de energía que la planta no está en condiciones de aportar. En este sentido, el tratamiento con un hidrolizado proteico sobre las plantas de patata posteriormente a una helada ha demostrado ser un procedimiento positivo de recuperación rápida de la planta, obteniéndose un sustancial incremento en la producción para recolección temprana (Franco *et al.*, 1989).

### **6.3 Justificación**

El estudio “Hidrólisis enzimática de proteínas de suero lácteo con proteasas de tracto de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) para reducir la contaminación orgánica del agua mediante la posible aplicación como fertilizante orgánico”, pudo determinar a priori que el empleo del suero hidrolizado como fertilizante puede dar resultados positivos en el engrosamiento de las verduras y en el tamaño del follaje, razón por la cual puede darle a las plantas características resistentes a accidentes climatológicos (heladas), Además con este estudio se podría dar una solución a los cultivos afectados por los factores adversos que suelen presentarse en la región andina.

### **6.4 Objetivos**

#### **6.4.1 Objetivo General**

- Aplicar suero lácteo hidrolizado como fertilizante orgánico en cultivos de papas (*Solanum tuberosum*), para estudiar el efecto ante las heladas.

#### **6.4.2 Objetivos específicos**

- Comprobar si la aplicación del suero hidrolizado en el sembrío de papas ofrece características resistentes a las heladas.
- Determinar si la aplicación del suero hidrolizado mejora el rendimiento en el cultivo de papas.
- Fijar el mejor tratamiento para la aplicación del suero hidrolizado en el cultivo de papas.

## **6.5 Análisis de factibilidad**

La viabilidad de la propuesta “Aplicación de suero lácteo hidrolizado como fertilizante orgánico en cultivos de papas (*Solanum tuberosum*), para estudiar el efecto ante las heladas”. Posee un carácter tecnológico, debido a que con el estudio del mismo se puede implementar nuevas técnicas para brindar resistencia a los sembríos de papas contra los accidentes climatológicos, además es de carácter sociológico puesto que contribuye a los pequeños y medianos agricultores a reducir las pérdidas económicas por motivos de daños en el follaje de sus sembríos por parte de las heladas.

## **6.6 Fundamentación**

Los aminoácidos libres y péptidos de muy bajo peso molecular son sustancias nutritivas de fácil absorción y asimilación tanto por vía foliar como radicular que se transportan a los órganos del vegetal como brotes, flores y frutos, en los cuales existe una mayor demanda debido a su actividad.

Cuando se realiza la hidrólisis controlada de proteínas, se obtiene un equilibrio entre la cantidad de aminoácidos en forma libre y péptidos (moléculas formadas por varios aminoácidos) que otorga al hidrolizado una importante propiedad biocatalizadora de ciertas reacciones enzimáticas activando la síntesis de fitohormonas, así como un significativo papel como nutriente directo (Franco *et al.*, 1989).

El fortalecimiento de las paredes celulares, debido a aminoácidos como prolina e hidroxiprolina, confiere al vegetal mayor resistencia a las heladas, al soportar mejor sus células la presión ejercida por los cristales de hielo que se forman en el citoplasma, además, un aporte de aminoácidos puede posibilitar a la planta el seguir sintetizando proteínas cuando la actividad fotosintética queda relentizada por las bajas temperaturas. (Franco *et al.*, 1989).

## **6.7 Metodología**

### **6.7.1 Siembra de papas**

El espacio entre plantas influirá en la producción de dos maneras. Si la distancia es muy corta, se presentara una fuerte competición interplanta disminuyendo la producción por planta; mientras que, si los espacios son grandes, la producción por unidad de superficie será menor, aunque la producción por planta sea mayor.

Las parcelas serán de tres surcos centrales, en los cuales se etiquetaran las planta representativa por tratamiento y repetición, para evaluar la altura de la planta (ALT), diámetro del dosel (DD), número de hojas (NH), número de tubérculos (NTUB), peso de tubérculos (PTUB) y peso de hoja dañada por helada (PHDH), así como también, se registraran los pesos de materia seca en hoja y tallo. Las evaluaciones de materia seca en hoja y tallo se realizaran cada 15 días y el resto de las variables se medirán cada 8 días, excepto el rendimiento (número y peso de tubérculos) que se registrará al momento de la cosecha. El daño al follaje se cuantificara tres días después de helada (Leyva y Martinez, 2001).

### **6.7.2 Obtención de la solución de proteasas del estómago de la trucha arcoíris.**

Las truchas serán sacrificadas en baño de hielo e inmediatamente disecadas en la parte inferior de la trucha, con el objeto de extraer su estómago. El extracto enzimático se preparan tras lavar el estómago con abundante agua y homogenizar triturando en un mortero el estómago con buffer de acetato de sodio pH 4 en una proporción 1 a 2 peso/volumen, ésta solución se centrifuga a 3000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se almacena a temperatura de congelación hasta su posterior uso (Moyano *et al.*, 1996).

### **6.7.3 Hidrólisis del suero lácteo**

Para hidrolizar el sustrato (suero lácteo), en un reactor con temperatura y agitación controladas se mezcla una proporción de nueve partes de suero por una parte de

solución de proteasa, esta mezcla enzima sustrato se le somete a agitación controlada (150 rpm), por cuatro horas a una temperatura de 18 °C.

#### 6.7.4 Aplicación del suero lácteo en sembríos de papas.

Para la aplicación del suero se determinara por medio de un diseño experimental la mejor dosificación para la aplicación del mismo.

### 6.8 Administración

Tabla 8: Administración de la propuesta

Indicadores a mejorar	Situación actual	Resultados esperados	Actividades	Responsables
Planteamiento de una metodología para reducir los daños causados por las heladas en sembríos de papas.	Falta de información sobre técnicas para el empleo de fertilizantes orgánicos, y empleo de suero lácteo hidrolizado.	La aplicación del suero hidrolizado en el sembrío de papas ofrece características resistentes a las heladas.  Determinar que la aplicación del suero hidrolizado mejora el rendimiento en el cultivo de papas.	Siembra adecuada de papas.  Obtención de solución de proteasas.  Hidrólisis de suero lácteo.  Aplicación de suero hidrolizado en sembríos de papas.	Investigadores: Egdo. Oscar Salazar Ing. Mg. Cecilia Carpio

Elaborado por: Oscar Salazar

## 6.9 Previsión de la evaluación

Tabla 9: Previsión de la evaluación

<b>Preguntas Básicas</b>	<b>Explicación</b>
¿Quiénes solicitan evaluar?	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sector de la investigación científica</li><li>• Pequeños y medianos agricultores.</li></ul>
¿Por qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none"><li>• Proporciona información de nuevas tecnologías, para la obtención y aplicación de fertilizantes orgánicos.</li></ul>
¿Para qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none"><li>• Para dar soluciones viables y sustentables a problemas comunes en la agricultura.</li></ul>
¿Qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none"><li>• Resistencia a las heladas</li><li>• El rendimiento de producción.</li></ul>
¿Quién evalúa?	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tutor</li><li>• Calificadores</li></ul>
¿Cuándo evaluar?	<ul style="list-style-type: none"><li>• Después de la helada</li><li>• Después de la cosecha</li></ul>
¿Cómo evaluar?	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tabulando datos obtenidos</li></ul>
¿Con qué evaluar?	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mediante programas de análisis estadísticos</li></ul>



## Bibliografía

Acuña, O.; Simbaña, C. 2008. Estudio de las propiedades físicas y funcionales de un hidrolizado enzimático de proteína de chocho a escala piloto y su aplicación como fertilizante. *Revista Politécnica*. 2008. Vol 1. páginas 78-96, 81.

Alvarado, Carlos.; Guerra Marisa. 2010. Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales venezolanos de nutrición*. Vol 23 no 1. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S079807522010000100007](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S079807522010000100007). Consultado: 5 de julio del 2012.

Alcarraz, M.; Flores, A.; Godoy, J. 2008. Producción de celulasas por inmovilización celular para el tratamiento de efluentes industriales lignocelulósicos. Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/publicaciones/geologia/v13\\_n26/pdf2/a15v13n26.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/publicaciones/geologia/v13_n26/pdf2/a15v13n26.pdf). Consultado: 5 de julio del 2012.

Arroyo, M. 1998. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Artículos Pharmaceutica*. 39. 23-39. Disponible en: <http://tuinventas.com/attachments/article/1582/arroyo.pdf>. Consultado: 2 de Agosto del 2012.

Benítez, R.; Ibarz, A.; Pagan, J. 2008. Hidrolizados de proteína, procesos y aplicaciones. *Revista Scielo. Acta bioquímica clínica latinoamericana*. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S032529572008000200008](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S032529572008000200008). Consultado: 23 de mayo del 2012.

Bernal, C.; López, B.; Mesa, M. 2007. Inmovilización de lactasa en sílica con porosidad controlada. *Scientia et Technica*. No. 36 Universidad Tecnológica de Pereira. Disponible en: <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/4939>. Consultado: 23 de octubre del 2012.

Biblioteca digital de la Universidad de Chile. Clasificación de las Enzimas. Disponible en: [http://mazingher.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_quimicas\\_y\\_farmaceuticas/sc\\_hmdth02/parte03/01.html](http://mazingher.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/sc_hmdth02/parte03/01.html). Consultado: 15 de septiembre del 2012.

Carrera, J. 2003. Producción y aplicación de Enzimas Industriales. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad del Cauca. Popayán. Disponible en:

<http://scienti.colciencias.gov.co:8084/publindex/docs/articulos/1692-3561/1/1.pdf>. Consultado: 6 de Agosto del 2012.

Constitución de la República del Ecuador. 2008. Ecuador. Disponible en: [http://www.ambiente.gob.ec/sites/default/files/archivos/normativa/constitucion\\_de\\_bolsillo.pdf](http://www.ambiente.gob.ec/sites/default/files/archivos/normativa/constitucion_de_bolsillo.pdf) . Consultado: 28 de marzo del 2012.

Cordero, P.; Verdugo, L.; 2006. Apuntes de Bioquímica Humana. Disponible en: [http://books.google.com.ec/books?id=NSK3IRRoaboC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.ec/books?id=NSK3IRRoaboC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false). Consultado 15 de septiembre del 2012.

Chang. Food Analysis. 3ra ed. USA. Suzanne Nielsen. 2003.

Engler, V. 2003. Reciclando los desechos de la leche. Disponible en: [http://www.fcen.uba.ar/prensa/noticias/2003/noticias\\_12ago\\_2003.html](http://www.fcen.uba.ar/prensa/noticias/2003/noticias_12ago_2003.html). Consultado: 2 de agosto del 2012.

Fernández, P. 2008. Enzimas utilizadas en la industria alimentaria. Disponible en: <http://www.rincondelasciencias.com/enzimas%20en%20industria%20alimentaria.pdf>. Consultado 20 de marzo del 2012.

Franco, J. 1989. Utilización de hidrolizados proteicos en horticultura. Revista Horticultura. Disponible en: [http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_Hort%2FHort\\_1989\\_52\\_60\\_64.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Hort%2FHort_1989_52_60_64.pdf). Consultado: 15 de mayo del 2013.

García, G.; Quintero, M. 1998. Biotecnología Alimentaria. México. Limusa Ediciones.

Guardix, A.; Guardix, E. M.; Páez-Dueñas, M. P.; González-Tello, P.; Camacho, F. 2000. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Artículos Pharmaceutica*. 41:1; 79-89. Disponible en: <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/25136/1/21597224.pdf>. Consultado: 16 de Julio del 2013.

Leyva, L.; Martínez, S. 2001. Detección, caracterización y aspectos ecológicos de fitoplasmas asociados a enfermedades de la papa. In: Memorias del XXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Resumen F-85. Querétaro, Qro., México.

MAG, Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca del Ecuador. 1998. Disponible en: <http://www.sica.gov.ec>. Consultado: 27 de julio 2012.

Miranda, M. 2007. Madura la Industria del Queso. Disponible en: <http://www.hoy.com.ec/noticias-ecuador/madura-la-industria-del-queso-267511-267511.html>. Consultado: 27 de julio 2012.

Moyano, F.; Diaz, F.; Alarcon, M. 1996. *Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream. Fish Physiology and Biochemistry* 15: 121-130

Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes recurso agua. Libro XI. Anexo I. Disponible en: [http://www.efficacitas.com/efficacitas\\_es/assets/Anexo%201.pdf](http://www.efficacitas.com/efficacitas_es/assets/Anexo%201.pdf). Consultado: 23 de septiembre del 2012.

Nusimovich, A.; Gomis, P.; Avila, Ll.; Escaich, J. 1989. Revista Horticultura. Disponible en: [http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_Hort/Hort\\_1989\\_52\\_completa.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Hort/Hort_1989_52_completa.pdf). Consultado: 27 de julio 2012.

Penzol, O. 1992. Inmovilización de proteínas industriales que actúan sobre substratos macromoleculares. Hidrólisis de caseína por derivados de renina. Tesina de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia.

Playne, M.; Bennett, L.; Smithers, G. 2003. Functional dairy foods and ingredients. *Australian Journal of Dairy*. Vol 1.

Plaza, G. 2001. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*. Argentina. páginas. 163-167.

Solís J.; Durán C. 1992. Reactores enzimáticos en el proceso de residuos agroindustriales. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Universidad Veracruzana. Disponible en: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/5167/1/19921213P85.pdf>. Consultado: 23 de octubre del 2012.

Valencia, E.; Ramírez, M. 2009. La industria de la leche y la contaminación del agua. *Revista Elementos* No. 73 Vol. 16. Disponible en: <http://www.elementos.buap.mx/num73/htm/27.htm>. Consultado: 8 septiembre 2012.

Whitaker, J. 1994. Principles of enzymology for the food sciences. 2nd. ed. New York. Marcel Dekker.

**ANEXO A**  
**RESPUESTAS**  
**EXPERIMENTALES**

## CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

**Tabla A1.** Pesos de las regiones digestivas de 4 truchas.

Región	Estómagos	Intestinos
<b>Pesos (gr)</b>	25,72	20,47

Elaborado por: Oscar Salazar

**Tabla A2.** Datos para la cuantificación del contenido de proteínas de estómagos e intestinos de trucha.

Tubo	A	B
<b>Muestra problema (ml)</b>	0,200	0,300
<b>Agua destilada (ml)</b>	0,800	0,700
<b>Factor de dilución</b>	5,000	3,333
<b>Lowry (ml)</b>	5,000	5,000
<b>Folin (ml)</b>	0,500	0,500
<b>Absorbancia estómago (500 nm)</b>	0,244	0,401
<b>Absorbancia intestinos (500 nm)</b>	0,301	0,475

Elaborado por: Oscar Salazar

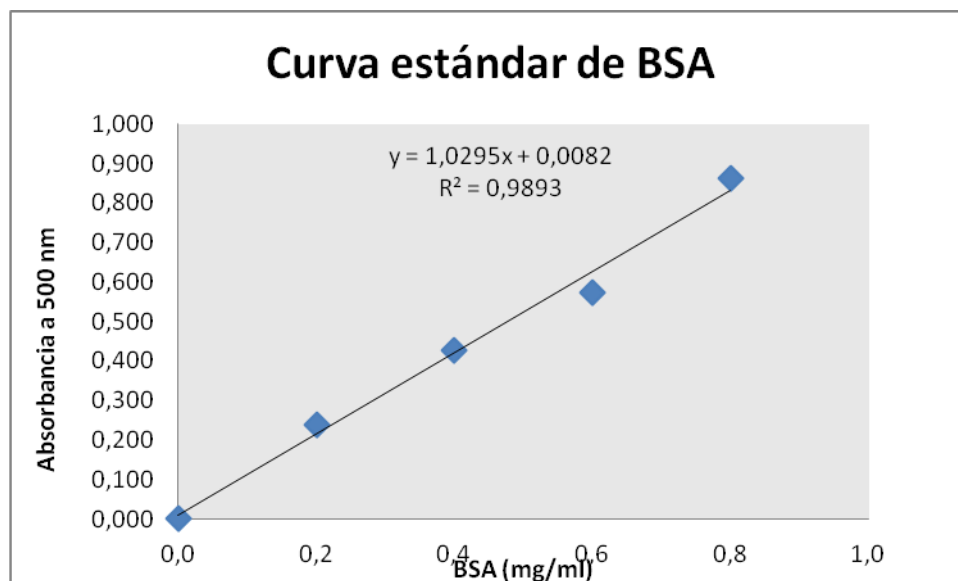
**Tabla A3.** Datos de absorbancia de la curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA).

Tubos	0	1	2	3	4	5
<b>Albumina (ml)*</b>	0,000	0,200	0,400	0,600	0,800	1,000
<b>Agua (ml)</b>	1,000	0,800	0,600	0,400	0,200	0,000
<b>Lowry (ml)</b>	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000
<b>Folin (ml)</b>	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
<b>Absorbancia (500 nm)</b>	0,000	0,239	0,426	0,572	0,863	1,172

\*La solución madre o stock de BSA utilizada contiene 1 mg/ml.

Elaborado por: Oscar Salazar

**Gráfico A1.** Curva de calibración de Albúmina Sérica Bovina (BSA), para cuantificación de proteína.



Elaborado por: Oscar Salazar

**Tabla A4.** Concentración de proteínas obtenidas de las regiones del tracto de las truchas con muestra húmeda.

Concentración de proteínas expresada como BSA (mg/ml)	
Estómagos	Intestinos
1,181	1,430
1,245	1,461
<b>1,213±0,04</b>	<b>1,446±0,02</b>

Elaborado por: Oscar Salazar

## TRATAMIENTOS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN EL SUERO LÁCTEO

**Tabla A5.** Datos de absorbancia (600 nm) de los diferentes tratamientos para determinar la cantidad de producto formado durante la hidrólisis del suero lácteo.

<b>Tratamientos</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>
<b>a0b0c0</b>	0,171	0,178	0,180
<b>a0b0c1</b>	0,194	0,197	0,198
<b>a0b0c2</b>	0,227	0,230	0,229
<b>a0b0c3</b>	0,290	0,294	0,294
<b>a0b1c0</b>	0,266	0,267	0,268
<b>a0b1c1</b>	0,274	0,274	0,277
<b>a0b1c2</b>	0,281	0,283	0,284
<b>a0b1c3</b>	0,292	0,290	0,291
<b>a1b0c0</b>	0,055	0,058	0,059
<b>a1b0c1</b>	0,060	0,062	0,062
<b>a1b0c2</b>	0,077	0,079	0,080
<b>a1b0c3</b>	0,099	0,098	0,099
<b>a1b1c0</b>	0,035	0,037	0,035
<b>a1b1c1</b>	0,072	0,075	0,075
<b>a1b1c2</b>	0,085	0,085	0,086
<b>a1b1c3</b>	0,128	0,128	0,124

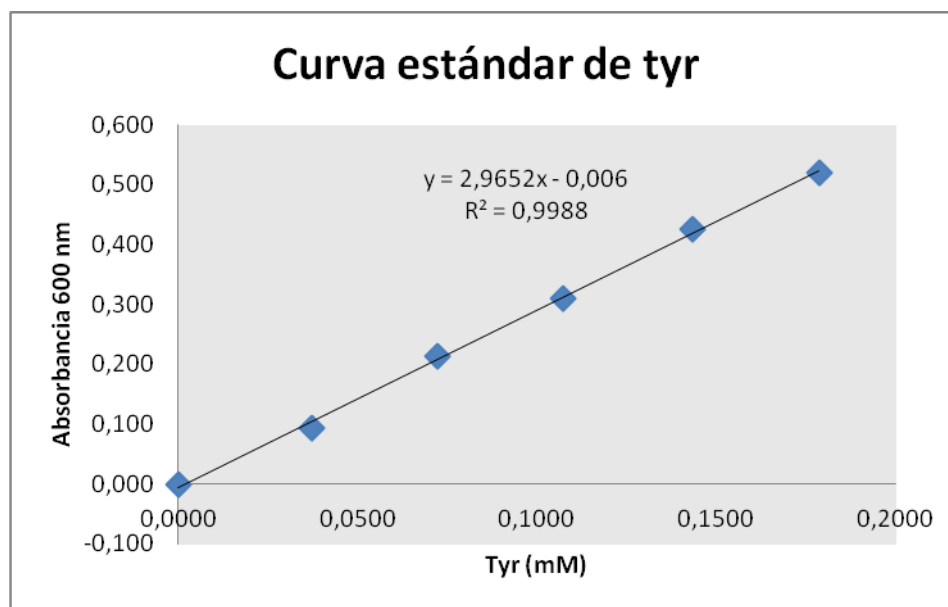
Elaborado por: Oscar Salazar

**Tabla A6.** Datos de absorbancia y pesos de alícuotas de la solución madre de tirosina y de las soluciones diluidas para obtener la curva de calibración de tirosina.

Diluciones	Peso solución de tirosina	Peso solución de tirosina con HCl	Absorbancia (600 nm)
0	0,0000	5,0168	0,000
1/5	1,0606	5,0701	0,094
2/5	2,0416	5,0370	0,213
3/5	3,0166	5,0195	0,309
4/5	4,0298	5,0199	0,426
5/5	5,0190	5,0190	0,521

Elaborado por: Oscar Salazar

**Gráfico A2.** Curva de calibración de Tirosina para determinar la actividad enzimática.



Elaborado por: Oscar Salazar



**Tabla A7.** Datos de absorbancia y factor de dilución para el cálculo de la actividad catalítica de proteasas de trucha en la hidrólisis de hemoglobina parcialmente desnaturalizada.

	<b>Absorb.</b> <b>λ 600nm</b>	<b>Factor</b> <b>Dilución</b>	<b>[Tyr]</b> <b>mM</b>	<b>Actividad</b> <b>Catalítica</b>
<b>intestinos</b>	0,3360	1	0,115	6,92E-05
<b>estómagos</b>	0,2260	10	0,078	4,70E-04

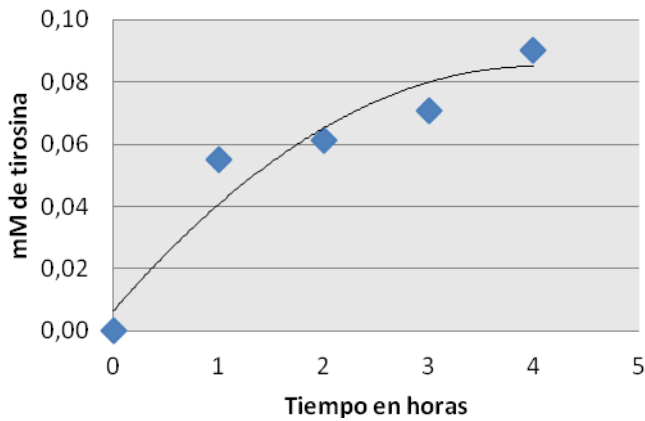
Elaborado por: Oscar Salazar

**Tabla A8.** Producto formado por la actividad hidrolítica de las proteasas en los diferentes tratamientos, expresada en concentración milimolar de tirosina.

<b>Tratamientos</b>	<b>[C1]</b>	<b>[C2]</b>	<b>[C3]</b>	<b>Promedio±DS</b>
<b>a0b0c0</b>	0,060	0,062	0,063	0,061±0,002
<b>a0b0c1</b>	0,067	0,068	0,069	0,068±0,001
<b>a0b0c2</b>	0,079	0,080	0,079	0,079±0,001
<b>a0b0c3</b>	0,100	0,101	0,101	0,101±0,001
<b>a0b1c0</b>	0,092	0,092	0,092	0,092±0,000
<b>a0b1c1</b>	0,094	0,094	0,095	0,095±0,001
<b>a0b1c2</b>	0,097	0,097	0,098	0,097±0,001
<b>a0b1c3</b>	0,100	0,100	0,100	0,100±0,000
<b>a1b0c0</b>	0,021	0,022	0,022	0,021±0,001
<b>a1b0c1</b>	0,022	0,023	0,023	0,023±0,000
<b>a1b0c2</b>	0,028	0,029	0,029	0,029±0,001
<b>a1b0c3</b>	0,035	0,035	0,035	0,035±0,000
<b>a1b1c0</b>	0,014	0,015	0,014	0,014±0,000
<b>a1b1c1</b>	0,026	0,027	0,027	0,027±0,001
<b>a1b1c2</b>	0,031	0,031	0,031	0,031±0,000
<b>a1b1c3</b>	0,045	0,045	0,044	0,045±0,001

Elaborado por: Oscar Salazar

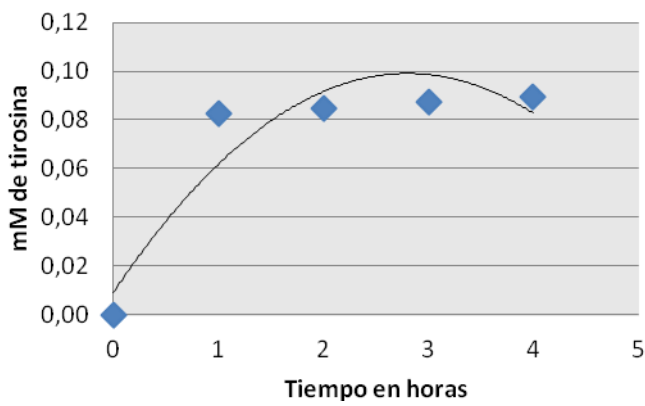
**Gráfico A3.** Cinética de hidrólisis del suero con proteasas ácidas, a 18°C.



Tiempo	mM de tirosina
0	0,000
1	0,061
2	0,068
3	0,079
4	0,101

Elaborado por: Oscar Salazar

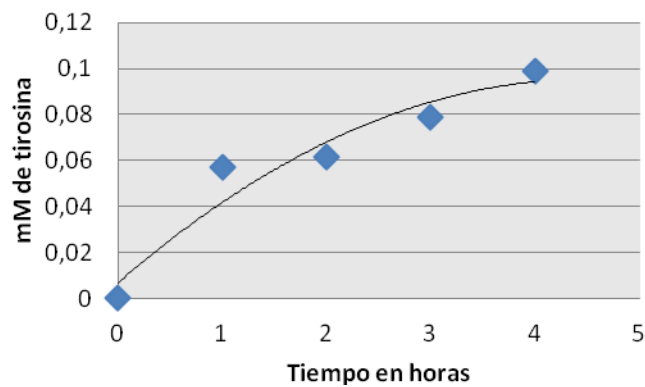
**Gráfico A4.** Cinética de hidrólisis del suero con proteasas ácidas, a 38°C.



Tiempo	mM de tirosina
0	0,000
1	0,092
2	0,095
3	0,097
4	0,100

Elaborado por: Oscar Salazar

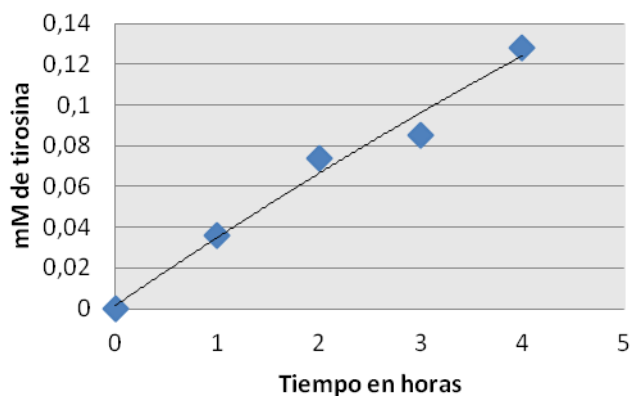
**Gráfico A5.** Cinética de hidrólisis del suero con proteasas alcalinas a, 18°C.



Tiempo	mM de tirosina
0	0,000
1	0,021
2	0,023
3	0,029
4	0,033

Elaborado por: Oscar Salazar

**Gráfico A6.** Cinética de hidrólisis del suero con proteasas alcalinas a, 38°C.



Tiempo	mM de tirosina
0	0,000
1	0,014
2	0,027
3	0,031
4	0,045

Elaborado por: Oscar Salazar

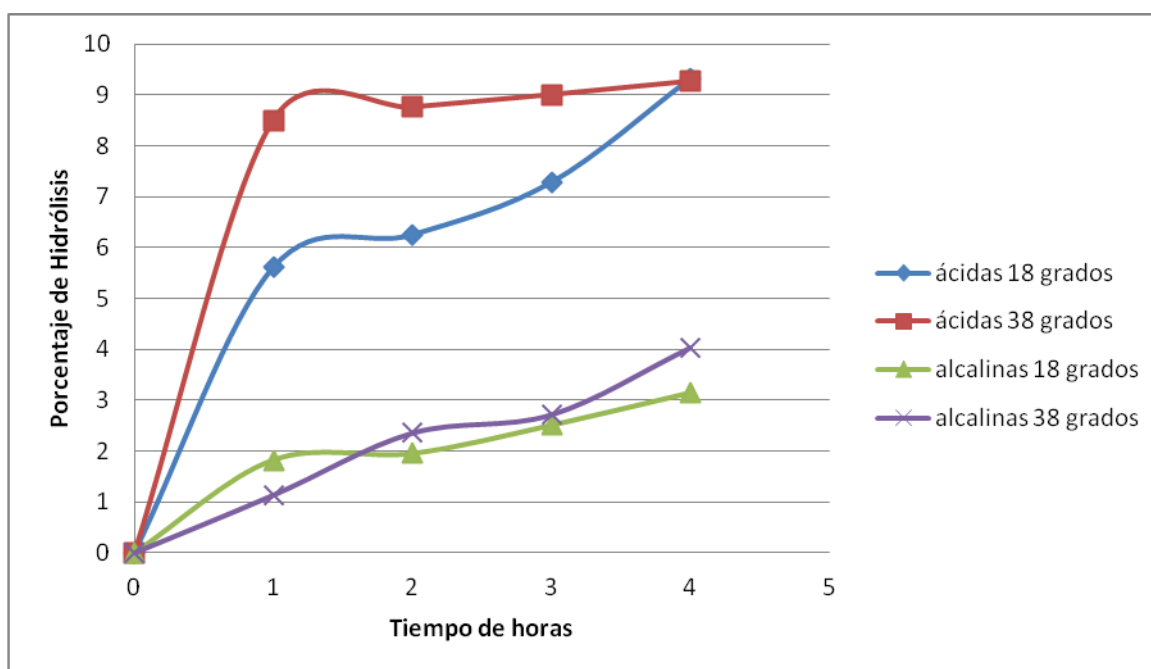
## PORCENTAJE DE HIDRÓLISIS

**Tabla A9.** Actividad proteásica de los diferentes tratamientos expresada como porcentaje de hidrólisis de los enlaces peptídicos.

Tratamiento	Combinación	Descripción	Porcentaje de hidrólisis.
1	a0b0c0	ácidas-18°C -1 hora	5,6
2	a0b0c1	ácidas-18°C -2 horas	6,3
3	a0b0c2	ácidas-18°C -3 horas	7,3
4	a0b0c3	ácidas-18°C -4 horas	9,3
5	a0b1c0	ácidas-38°C -1 hora	8,5
6	a0b1c1	ácidas-38°C -2 horas	8,8
7	a0b1c2	ácidas-38°C -3 horas	9,0
8	a0b1c3	ácidas-38°C -4 horas	9,3
9	a1b0c0	alcalinas-18°C -1 hora	1,8
10	a1b0c1	alcalinas-18°C -2 horas	2,0
11	a1b0c2	alcalinas-18°C -3 horas	2,5
12	a1b0c3	alcalinas-18°C -4 horas	3,1
13	a1b1c0	alcalinas-38°C -1 hora	1,1
14	a1b1c1	alcalinas-38°C -2 horas	2,4
15	a1b1c2	alcalinas-38°C -3 horas	2,7
16	a1b1c3	alcalinas-38°C -4 horas	4,0

Elaborado por: Oscar Salazar

**Gráfico A7.** Porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados.



Elaborado por: Oscar Salazar

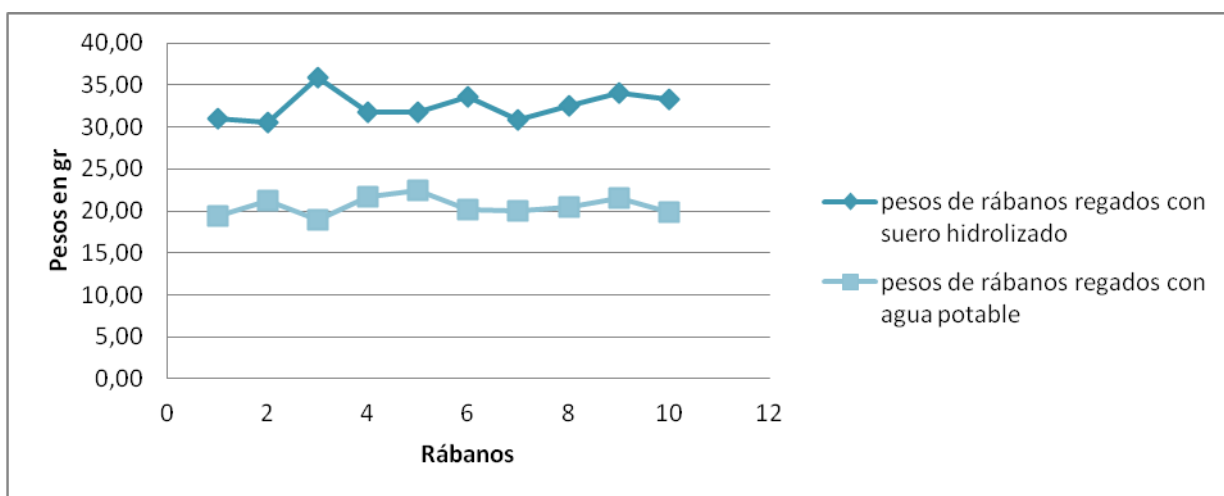
## APLICACIÓN DEL MEJOR TRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS DEL SUERO LÁCTEO

**Tabla A10.** Datos de los pesos de las plantas de rábanos.

Pesos de Plantas de Rábanos	
Con hidrolizado	Sin hidrolizado
31,00	19,43
30,56	21,22
35,91	19,00
31,81	21,72
31,77	22,41
33,58	20,15
30,91	19,95
32,54	20,45
34,00	21,53
33,35	19,85

Elaborado por: Oscar Salazar

**Gráfico A8.** Datos de los pesos de las plantas de rábanos.



# **ANEXO B**

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

**Tabla B1.** Análisis de varianza realizada con los diferentes tratamientos para la hidrólisis de suero lácteo.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Ft</b>
<b>réplicas</b>	2	5,3375E-05	2,6688E-05	14,1391	3,3158
<b>A</b>	1	0,3624	3,6244E-01	192022,5276	4,1709
<b>B</b>	1	0,0116	1,1625E-02	6159,0397	4,1709
<b>C</b>	3	0,0308	1,0261E-02	5436,1847	2,9223
<b>AB</b>	1	0,0071	7,0810E-03	3751,5342	4,1709
<b>AC</b>	3	0,0002	5,6076E-05	29,7093	2,9223
<b>BC</b>	3	0,0016	5,1674E-04	273,7712	2,9223
<b>ABC</b>	3	0,0081	2,6889E-03	1424,5879	2,9223
<b>Error</b>	30	0,0001	1,8875E-06		
<b>Total</b>	47	0,4218			

Elaborado por: Oscar Salazar

**Tabla B2.** Separación de medias de absorbancias para hidrólisis correspondientes a la interacción AxB.

<b>Tratamientos</b>	<b>Descripción*</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Rango</b>
<b>Interacción</b>			
<b>a0b1</b>	ácidas-38°C	0,2787	a
<b>a0b0</b>	ácidas-18°C	0,2235	b
<b>a1b1</b>	alcalinas-38°C	0,0808	c
<b>a1b0</b>	alcalinas-18°C	0,0740	d

\*A: tipo de proteasa utilizada y B: temperatura de hidrólisis

Elaborado por: Oscar Salazar

**Tabla B3.** Separación de medias de la interacción AxC para las absorbancias de la hidrólisis de suero lácteo.

Tratamientos	Descripción*	Absorbancia	Rango
<b>Interacción</b>			
<b>a0c3</b>	ácidas-4 horas	0,2918	a
<b>a0c2</b>	ácidas-3 horas	0,2557	b
<b>a0c1</b>	ácidas-2 horas	0,2757	c
<b>a0c0</b>	ácidas-1 hora	0,2217	d
<b>a1c3</b>	alcalinas-4 horas	0,1135	e
<b>a1c2</b>	alcalinas-3 horas	0,0820	f
<b>a1c1</b>	alcalinas-2 horas	0,0677	g
<b>a1c0</b>	alcalinas-1 hora	0,0465	h

\*A: tipo de proteasa utilizada y C: tiempo de hidrólisis

Elaborado por: Oscar Salazar

**Tabla B4.** Separación de medias de la interacción BxC para las absorbancias obtenidas para la hidrólisis de suero lácteo.

Tratamientos	Descripción*	Absorbancia	Rango
<b>Interacción</b>			
<b>b1c3</b>	38°C-4 horas	0,2097	a
<b>b0c3</b>	18°C -4 horas	0,1957	b
<b>b1c2</b>	38°C -3 horas	0,1840	c
<b>b1c1</b>	38°C -2 horas	0,1745	d
<b>b0c2</b>	18°C -3 horas	0,1537	e
<b>b1c0</b>	38°C -1 hora	0,1513	e
<b>b0c1</b>	18°C -2 horas	0,1288	f
<b>b0c0</b>	18°C -1 hora	0,1168	g

\*B: temperatura y C: tiempo de hidrólisis

Elaborado por: Oscar Salazar



**Tabla B5.** Separación de medias de la interacción AxBxC para las absorbancias obtenidas para la hidrólisis de suero lácteo.

<b>Tratamientos</b>	<b>Descripción*</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Rango</b>
<b>Interacción</b>			
<b>a0b0c3</b>	ácidas-18°C-4 horas	0,2927	a
<b>a0b1c3</b>	ácidas-38°C-4 horas	0,2910	b
<b>a0b1c2</b>	ácidas-38°C-3 horas	0,2827	c
<b>a0b1c1</b>	ácidas-38°C-2 horas	0,2750	d
<b>a0b1c0</b>	ácidas-38°C-1 hora	0,2670	e
<b>a0b0c2</b>	ácidas-18°C-3 horas	0,2287	f
<b>a0b0c1</b>	ácidas-18°C-2 horas	0,1963	g
<b>a0b0c0</b>	ácidas-18°C-1 hora	0,1763	h
<b>a1b1c3</b>	alcalinas-38°C-4 horas	0,1267	i
<b>a1b0c3</b>	alcalinas-18°C-4 horas	0,0987	j
<b>a1b1c2</b>	alcalinas-38°C-3 horas	0,0853	k
<b>a1b0c2</b>	alcalinas-18°C-3 horas	0,0787	l
<b>a1b1c1</b>	alcalinas-38°C-2 horas	0,0740	m
<b>a1b0c1</b>	alcalinas-18°C-2 horas	0,0613	n
<b>a1b0c0</b>	alcalinas-18°C-1 hora	0,0573	o
<b>a1b1c0</b>	alcalinas-38°C-1 hora	0,0357	p

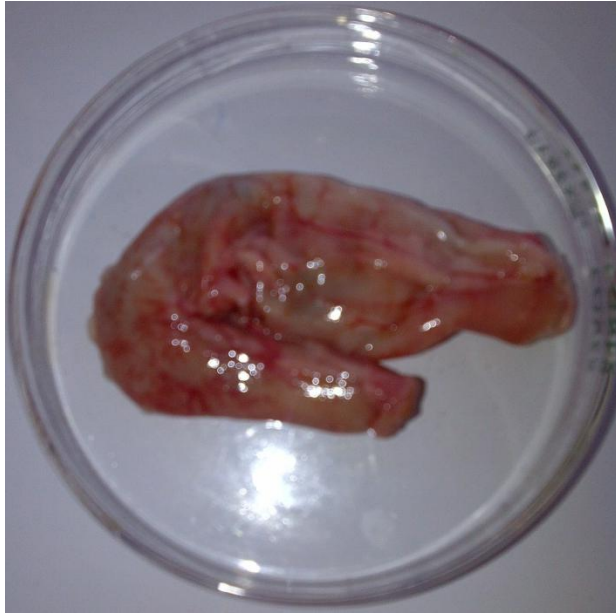
\*A: tipo de proteasa, B: Temperatura de hidrólisis y C: tiempo de hidrólisis

Elaborado por: Oscar Salazar

# **ANEXO C**

# **FOTOGRAFÍAS**

## MATERIA PRIMA PARA LA OBTENCIÓN DE LAS PROTEASAS



**Fotografía C1.** Estómago de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).



**Fotografía C2.** Intestinos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

## SOLUCIÓN DE PROTEASAS DEL TRACTO DE TRUCHAS ARCOÍRIS



**Fotografía C3.** Solución de proteasas obtenidas del estómago de la trucha arcoíris, en buffer acetato de sodio de pH 4.



**Fotografía C4.** Solución de proteasas obtenidas del intestino de truchas arcoíris, en buffer carbonato de sodio de pH 9.

## CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

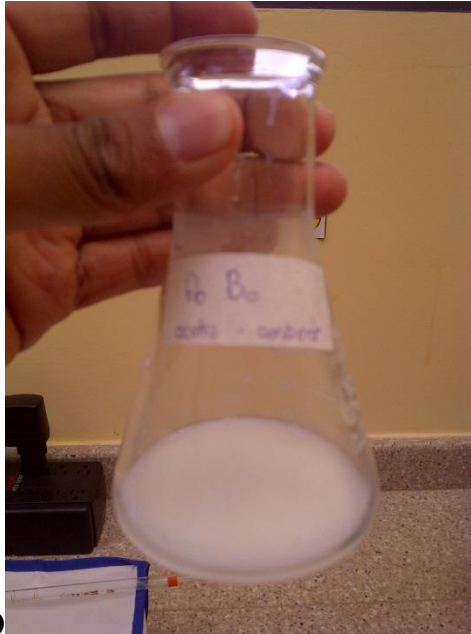


**Fotografía C5.** Solución de proteasas del estómago reaccionando con Lowry y Folin-Ciocalteu, previo a la lectura de Absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro.



**Fotografía C6.** Solución de proteasas del intestino reaccionando con Lowry y Folin-Ciocalteu, etapa previa a la lectura de Absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro.

## ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LAS PROTEASAS SOBRE SUERO



LÁCTEO

Fotografía C7. Solución de proteasas del estómago con el suero lácteo.



Fotografía C8. Solución de proteasas del intestino con el suero lácteo.

## TRATAMIENTOS DE HIDRÓLISIS DE SUERO LÁCTEO

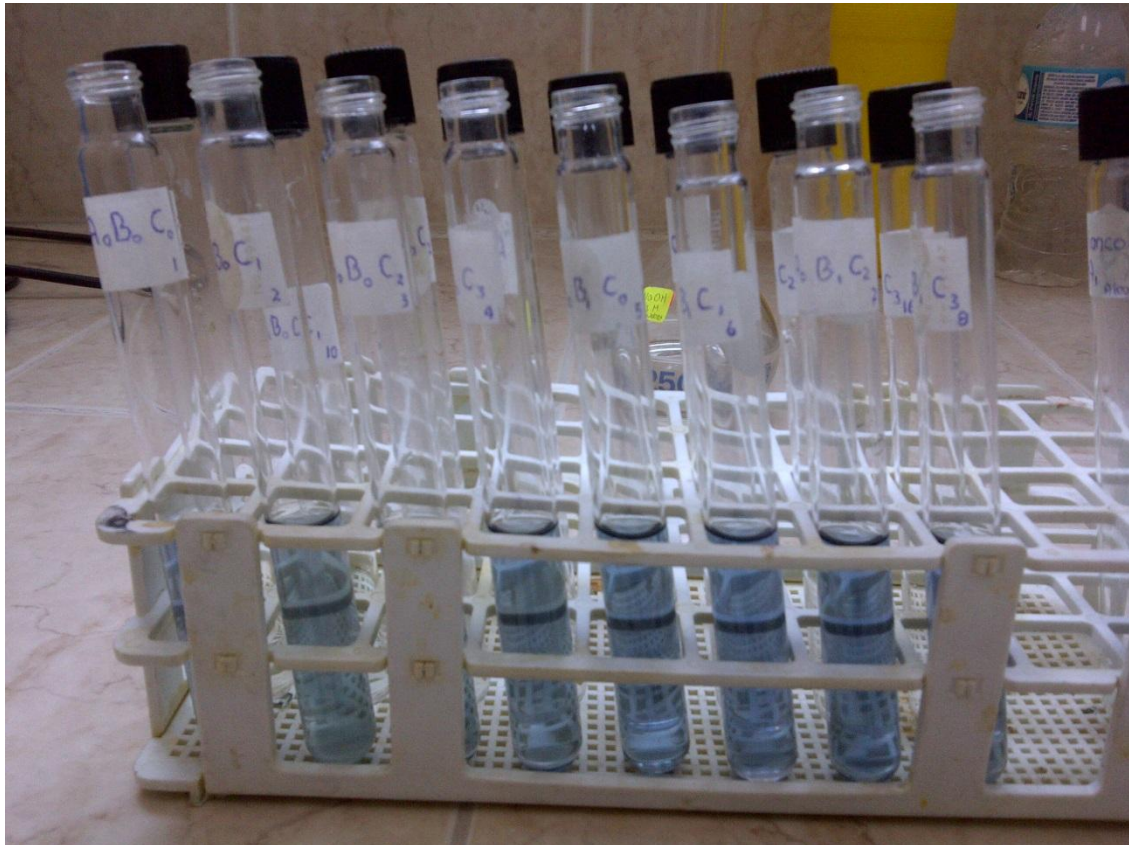


**Fotografía C9.** Soluciones de proteasas con sustrato (suero lácteo) colocadas en el agitador NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC (provisto de regulación de temperatura y agitación) listas para la incubación.



**Fotografía C10.** Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético.





**Fotografía C11.** Diferentes tratamientos reaccionando con Folin-Ciocalteu para proceder a la lectura de Absorbancia en el espectrofotómetro HACH DR 2800, a 600 nm.



## PORCENTAJE DE HIDRÓLISIS



**Fotografía C12.** Ampolla con suero lácteo en ácido clorhídrico (8 M).



**Fotografía C13.** Suero lácteo en ácido clorhídrico (8 M) después de haber sido sometido a hidrólisis exhaustiva a 110°C por 48 horas.

## APLICACIÓN DE SUERO HIDROLIZADO EN PLANTAS DE RÁBANO



**Fotografía C14.** Tarrina con semilla de rábano regada con agua bajo cubierta para controlar la hidratación.



**Fotografía C15.** Tarrina con semilla de rábano regada con solución de suero hidrolizado al 10% bajo cubierta para controlar la hidratación.



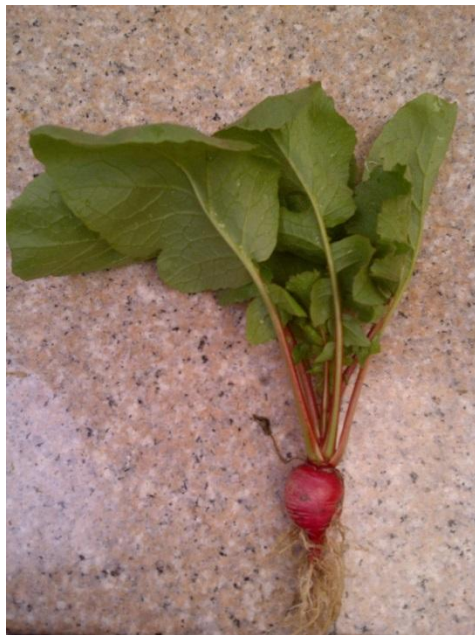
**Fotografía C16.** Tarrina con rábano a los 45 días, regada con agua bajo cubierta para controlar la hidratación.



**Fotografía C17.** Tarrina con rábano a los 45 días, regada con agua y solución de suero hidrolizado al 10% bajo cubierta para controlar la hidratación.



**Fotografía C18.** Rábano regado con agua bajo cubierta para controlar la hidratación.

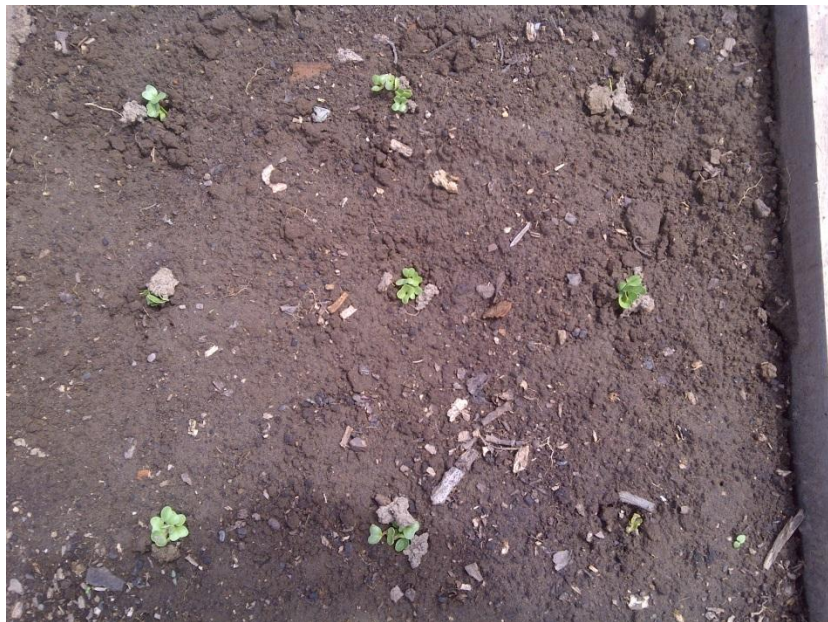


**Fotografía C19.** Rábano regado con agua y solución de suero hidrolizado al 10% bajo cubierta para controlar la hidratación.





**Fotografía C20.** Cama sembrada con rábanos a los 5 días, regada con agua.



**Fotografía C21.** Cama sembrada con rábanos a los 5 días, regada con agua y solución de suero hidrolizado al 10%.



**Fotografía C22.** Cama sembrada con rábanos a los 45 días, regada con agua.



**Fotografía C23.** Cama sembrada con rábanos a los 45 días, regada con agua y solución de suero hidrolizado al 10%.