

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS
DE APURÍMAC**

FACULTAD DE INGENIERÍA

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**



**DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ÓPTIMOS DE
EXTRACCIÓN ALCALINA PARA LA OBTENCIÓN DE
AISLADO PROTEICO A PARTIR DE
TARWI (*Lupinus mutabilis*)**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL

WILSON URRUTIA GUTIÉRREZ

Abancay, Diciembre del 2010

P E R U



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURIMAC	
CÓDIGO	MFN. 17
T IAG U 2010	BIBLIOTECA CENTRAL
FECHA DE INGRESO:	28 MAR 2012
Nº DE INGRESO:	00229

**DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ÓPTIMOS DE
EXTRACCIÓN ALCALINA PARA LA OBTENCIÓN DE
AISLADO PROTEICO A PARTIR DE
TARWI (*Lupinus mutabilis*)**

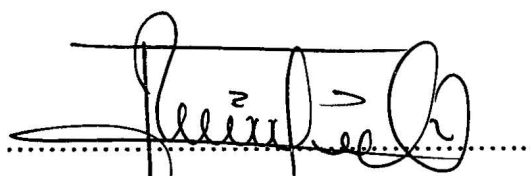


**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS-
DE APURÍMAC**

FACULTAD DE INGENIERÍA

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**

Jurado calificador integrado por:



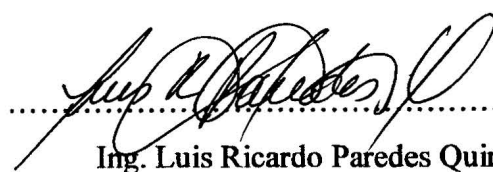
Ing. David Fernando Palomino Quispe
Presidente



Ing. Alfredo Fernández Ayma
Jurado



Ing. Rogelio Sillo Sillo
Jurado



Ing. Luis Ricardo Paredes Quiroz
Asesor

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a toda mi familia, en especial a mi querida madre Visitación Gutiérrez Andía y mis queridos hermanos Germán, Pascual, Charles, Zunilda, Freddy y Javier, quienes me brindaron apoyo incondicional durante toda mi formación profesional.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios por darme oportunidades en la vida, a la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac (UNAMBA) por brindarme los medios necesarios para llevar a cabo esta investigación.

A todos los jefes y encargados de laboratorio de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la UNAMBA, por haberme brindado las facilidades y los medios necesarios para los experimentos y análisis requeridos durante la investigación.

Expreso mi sinceros agradecimientos al Ing. Luis Ricardo Paredes Quiroz, asesor de esta investigación, de igual modo al Ing. Fernando Palomino Quispe, Ing. Alfredo Fernández Ayma y al Ing. Rogelio Sillo Sillo, miembros del jurado calificador, por sus valiosas observaciones y aportes.

Agradezco a la Doctora Dagnith Liz Bejarano Luján por su constante apoyo y orientación en el desarrollo de esta investigación, rescato su identificación con quienes hacen investigación.

A la Doctora Mabel Ventura Chuquiere, por brindarme detalles y pautas muy valiosos para la investigación, que a pesar de la distancia fueron imprescindibles para encaminar la ejecución del proyecto.



ÍNDICE DEL CONTENIDO

Sección	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. ASPECTOS AGROBOTANICOS DEL TARWI	5
2.1.1. Descripción botánica	5
2.1.2. Composición química y valor nutricional	8
2.1.3. Aminoácidos	9
2.1.4. Ácidos grasos	12
2.1.5. Alcaloides del tarwi	14
2.1.5.1. Métodos de deslupinizado	17
2.2. AISLADO DE PROTEÍNA	20
2.2.1. Las proteínas	20
A. Definición	20
B. Estructura de las proteínas	22
C. Clasificación de las proteínas	24
D. Propiedades funcionales	27
2.2.2. Importancia del lupino en la producción de proteínas	28
2.2.3. Aislamiento de proteínas	29
2.2.3.1. Métodos de obtención de aislado proteico	32
2.2.4. Parámetros de obtención de aislado proteico	41
A. PH de solubilización	42
B. Temperatura	43
C. Relación harina: solvente	45
D. Efecto de la polaridad	46
E. Fuerza iónica	47
2.2.5. Aplicaciones de aislados proteicos	49



III. PARTE EXPERIMENTAL	52
3.1. Tiempo y espacio	52
3.2. Materia prima	52
3.3. Materiales y reactivos	53
3.4. Métodos de análisis	55
3.5. Deslupinización y obtención de harina	57
3.6. Optimización de la extracción alcalina	60
3.6.1. Screening	60
3.6.2. Escalamiento	62
3.6.3. Optimización final	62
3.7. Obtención del aislado proteico	65
3.8. Análisis proximal del aislado proteico	67
3.9. Caracterización funcional del aislado	67
3.10. Análisis estadístico	69
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	70
4.1. Análisis proximal del tarwi	70
4.2. Análisis proximal de la harina de tarwi	71
4.3. Optimización en la extracción alcalina	72
4.3.1. Screening	72
4.3.2. Escalamiento	78
4.3.3. Optimización de los parámetros de extracción alcalina	78
4.4. Análisis proximal del aislado	86
4.5. Propiedades funcionales del aislado proteico	89
4.6. Rendimiento	91
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	93
5.1. CONCLUSIONES	93
5.2. RECOMENDACIONES	94
VI. BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXOS Y APÉNDICES	103



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Clasificación taxonómica del tarwi	6
2	Composición química del tarwi, soya y frijol	8
3	Cómputo de aminoácidos de <i>Lupinus mutabilis</i> (variedad semidulce) y <i>Lupinus albus</i> (variedad astra)	10
4	Evaluación biológica de la calidad de la proteína de tarwi (<i>Lupinus mutabilis</i>)	11
5	Efecto complementario de la proteína del tarwi con diferentes proteínas vegetales	12
6	Composición de ácidos grasos del aceite de <i>L. mutabilis</i> amargo y semidulce y del <i>L. albus</i> , biovar astra	13
7	Nombres de los principales alcaloides del lupino, formulación química y fuente de origen.	15
8	Contenido de alcaloides en lupinos dulces y amargos (%)	15
9	Dosis Mínima Letal (DML) para los alcaloides de lupino multolupa sin tratar	16
10	Evaluación de los métodos de desamargado del tarwi	18
11	Pérdida de alcaloides y nutrientes durante el deslupinizado por varios métodos	19
12	Papeles funcionales de las proteínas alimentarias en los sistemas alimenticios	27
13	Producción de proteínas por hectárea	29
14	Rendimiento y pureza de aislados de soya obtenidos por diferentes métodos	37



15	Composición proximal de los granos de tarwi	70
16	Análisis proximal de la harina deslupinizado y semi-desgrasada de tarwi	71
17	Efecto del pH de extracción (PE) en la solubilidad proteica	73
18	ANOVA del pH de extracción (PE)	73
19	Influencia de la relación harina: solvente (CH) en la solubilidad	75
20	ANOVA de la relación harina: solvente (CH)	75
21	Efecto de temperatura de extracción (TE) en la solubilidad proteica	76
22	ANOVA de la temperatura de extracción (TE)	77
23	Niveles que fueron evaluados en la optimización mediante superficie de respuestas	78
24	Plan de experimentos generado para la optimización y el resultado de cada corrida	79
25	ANOVA de proteínas en el aislado para un nivel de confianza del 95%.	80
26	Valores óptimos de los factores evaluados	85
27	Análisis proximal del aislado proteico de tarwi	87
28	Capacidad de formación y estabilidad de espuma	89
29	Propiedades funcionales del aislado proteico comparado con otros asilados proteicos, expresados en %.	90



Figura	Descripción	Página
1	Partes de semilla de lupino	7
2	Estructuras de las proteínas y aminoácido	26
3	Propiedades funcionales de las proteínas	28
4	Proceso de obtención de aislado de soja	35
5	Microscopia electrónica de aislados de soja	38
6	Influencia del pH en la extracción de proteínas en el nuez de marañón	42
7	Influencia de la temperatura en la extracción de proteínas en el nuez de marañón	44
8	Influencia de la relación harina: solvente en el porcentaje de solubilización proteica de nuez de marañón	46
9	Influencia del pH en la precipitación isoelectrica para la recuperación del aislado proteico de nuez de marañón	48
10	Usos de los concentrados y aislados proteicos	51
11	Diagrama de flujo de deslupinizado del tarwi	58
12	Diagrama de flujo para la obtención de aislado proteico	66
13	Composición del tarwi	70
14	Análisis proximal de la harina de tarwi	72
15	Curva de solubilidad, efecto del pH (Evaluadas a 50 °C, harina: Solvente=1:20, tiempo de agitación=30 min.)	73
16	Curva de solubilidad, efecto de la relación harina: solvente (Evaluadas a 50 °C, pH=9, tiempo de agitación=30 min.)	75

17	Curva de solubilidad, efecto de la temperatura (Evaluadas a pH=9, harina: Solvente=1:30, tiempo de agitación=30 min.)	76
18	Gráfica de efectos principales	80
19	Superficie de respuesta tridimensional, CH vs PE	81
20	Superficie de respuesta, vista superior, CH vs PE	81
21	Superficie de respuesta tridimensional TE vs PE	82
22	Superficie de respuesta, vista superior TE vs PE	82
23	Superficie de respuesta tridimensional TE vs CH	83
24	Superficie de respuesta, vista superior TE vs CH	83
25	Diagrama de Pareto de las variables estudiadas	84
26	Análisis proximal del aislado proteico	87
27	Capacidad y estabilidad de espuma del aislado	89

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se han optimizado los parámetros de extracción proteica en medio alcalino, usando como materia prima la harina deslupinizada y parcialmente desgrasada de tarwi (*Lupinus mutabilis*), aprovechando así el alto contenido proteico de la leguminosa. Para este fin se ha usado la metodología de Superficie de Respuestas (SR), bajo el Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) para la optimización.

En la primera etapa de la optimización (Screening) se han determinado que son tres los factores más influyentes, el pH (PE), la relación harina: solvente (CH) y la temperatura de extracción (TE), posteriormente en la etapa de Escalamiento se observó que el efecto curvatura encontrada en la etapa de Screening es muy significativa por lo que se pasó directamente a la siguiente etapa. En la etapa de optimización se han encontrado las regiones óptimas para cada factor, siendo éstas del PE de 8,5 a 10,5; CH abarca de 1:23 y 1:33, mientras la temperatura de extracción (TE) de 36 a 48 °C. Sin embargo se han encontrado los valores óptimos para cada factor (PE=9,3; CH=1:28; TE=43 °C) con los cuales se ha obtenido un aislado proteico rico en proteínas.

El análisis proximal de la materia prima indica que sobresale el contenido de proteínas y lípidos 43,31 y 16,83%, mientras que en la harina deslupinizada y semi-desgrasada los resultados fueron 49,87 y 3,23% respectivamente. El aislado obtenido en base a sus parámetros óptimos mostró el siguiente análisis proximal de humedad, grasa, proteína, ceniza, fibra y carbohidratos de 4,87; 0,61; 92,83; 1,48; 0,39 y 1,12% respectivamente, siendo evidente el alto contenido de proteínas. Las propiedades funcionales básicas del aislado obtenido, tales como la capacidad de absorción de agua, capacidad de absorción de aceite y la capacidad espumante fueron 98, 160 y 78% respectivamente. En cuanto al rendimiento se ha obtenido valores relativamente bajos (35%), debidos posiblemente a las condiciones de extracción y recuperación proteica. La conclusión a la que se ha llegado es que la optimización de los parámetros de extracción alcalina, permite la obtención de un aislado con más de 92% de proteínas y buenas cualidades funcionales.

ABSTRACT

In this research work have been optimized the parameters of protein extraction in alkaline medium, using flour as raw material and partially defatted deslupinizada tarwi (*Lupinus mutabilis*), taking advantage of the high protein content of the legume. To this end we have used the Response Surface Methodology (SR) under the Central Composite Rotatable Design (DCCR) for optimization.

In the first stage of optimization (Screening) have determined that three factors are more influential, the pH (PE), the ratio flour: solvent (CH) and the extraction temperature (TE), later in the process of scaling was observed that the curvature effect found in the screening stage is very significant as it went straight to the next stage. In the optimization stage has been found optimal regions for each factor, these being the PE of 8.5 to 10.5, CH runs from 1:23 and 1:33, while the extraction temperature (TE) of 36 to 48 ° C. But you have found the optimal values for each factor (PE = 9.3, CH = 1:28; TE = 43 ° C) with which we have obtained a protein isolate rich in protein.

Proximate analysis of raw materials indicates that excels in protein and fat 43.31 and 16.83%, while in the flour and semi-defatted deslupinizada the results were 49.87 and 3.23% respectively. The isolate obtained based on optimal parameters showed the following proximate analysis of moisture, fat, protein, ash, fiber and carbohydrates of 4.87, 0.61, 92.83, 1.48, 0.39 and 1.12 % respectively, evidencing the high protein content. The basic functional properties of the isolate obtained, such as water absorption capacity, oil absorption capacity and foaming capacity were 98, 160 and 78% respectively. In terms of performance has been obtained relatively low values (35%), possibly due to the conditions of extraction and protein recovery. The conclusion reached is that the optimization of alkaline extraction parameters, allows obtaining an isolate with more than 92% protein and good functional qualities.

I. INTRODUCCIÓN

El tarwi (*Lupinus mutabilis*), es una leguminosa utilizada como alimentos desde los tiempos incaicos, se caracteriza por contener altos porcentajes de proteína y grasa, fijar nitrógeno atmosférico en el suelo, tener sabor amargo debido al contenido de alcaloides y ser adaptable a diversidades climáticas con mínimas exigencias del suelo.

Sin embargo el uso del tarwi como alimento está en decadencia, desconociéndose las potencialidades y posibilidades tecnológicas que ofrece esta leguminosa. Esto pese a que en la actualidad existen muchos problemas de desnutrición y malnutrición, deficiencia proteica en los alimentos, elevado crecimiento demográfico, la escasez y alto costo de las fuentes proteicas de origen animal. Esta problemática demanda producir fuentes proteicas de origen vegetal que sean económicas y accesibles, una alternativa es la producción de aislado proteico a partir de tarwi, para lo cual se requiere conocer los parámetros.

El objetivo principal de esta investigación fue determinar los niveles óptimos de los parámetros de extracción alcalina que permita obtener aislados proteicos ricos en proteína, para ello se ha especificado el estudio en determinar los niveles de los factores en la que la solubilidad proteica es mayor, evaluando los efectos individuales y las interacciones; ubicar las regiones óptimas para cada factor que permita solubilizar y recuperar la mayoría de las proteínas; finalmente realizar el análisis químico proximal y evaluar las propiedades funcionales del aislado obtenido bajo los parámetros óptimos.

La metodología consistió en la extracción alcalina de la harina semi-desgrasada y deslupinizada de tarwi, el cual fue sometida a agitación bajo una

temperatura, pH y relación harina: solvente controlados (por cada factor se ha evaluado 5 niveles mediante diseño completo al azar), se seleccionó dos niveles (puntos en la que la solubilidad proteica fueron mayores) por cada factor para la optimización mediante el Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) aplicando superficie de respuesta y obtener los puntos óptimos, la producción final del aislado se realizó en base a los parámetros óptimos, el cual fue sometida a análisis proximal y evaluación de sus propiedades funcionales.

El logro de ésta optimización permite la producción de aislados proteicos ricos en proteína, incluyéndose en el mercado un producto con alto valor proteico que ayuda a suprimir la desnutrición y la malnutrición en el campo social. En el campo tecnológico, los aislados se usan para aclarar el color, mejorar la textura de carne deshuesada de aves, para unir piezas intactas de músculos, proporcionar textura a las salchichas, mejoran la funcionalidad de pates y la textura de los productos de panadería, pastas e incluso en tecnología de quesos, así mismo es un insumo potencial para la formulación de alimentos.

Los antecedentes indican que es posible obtener aislados proteicos a partir de leguminosas y cereales, el método más usado es la solubilización alcalina y precipitación isoelectrica, usándose la extracción alcalina a pH comprendido entre 8 y 12, temperaturas entre 25 y 50 °C y tiempo de agitación entre 20 y 60 minutos. Los resultados en cuanto al contenido proteico en porcentaje varía entre 85 a 95% y una digestibilidad de 80 a 90%, esto dependiendo de la materia prima y las condiciones del proceso.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ASPECTOS AGROBOTÁNICOS DEL TARWI

El tarwi (*Lupinus mutabilis*) es una leguminosa almidonosa, sus granos se utiliza en la alimentación humana, conocido como chocho en el norte de Perú y Ecuador, tarwi en el centro del Perú y tauri en el sur del Perú y Bolivia (chuchus en Cochabamba, Bolivia). Esta especie es pariente de los lupinos o altramuces originarios del viejo mundo que aún hoy son cultivados en Europa mediterránea, especialmente en España e Italia, pero que tienen un número cromosómico diferente. El grano de tarwi es rico en proteínas y grasas, su contenido proteico es incluso superior al de la soya y su contenido en grasas y demás componentes es similar (Morón, 2005).

El cultivo del tarwi en la sierra se localiza entre los 2800 a 3900 msnm. Correspondiendo aproximadamente el 20 % del área sembrada en la sierra norte entre los departamentos de Cajamarca, La libertad y Amazonas; el 41 % de la sierra central entre los departamentos de Ancash, Huánuco, y un mínimo porcentaje en Junín y el 39 % en la sierra sur, en los departamentos de Cusco, Puno y Apurímac (Palacios *et al.*, 2004).

2.1.1. Descripción botánica

Las hojas tienen forma alargada, generalmente compuesta por ocho folíolos que varían entre ovalados a lanceolados. Se diferencia de otras especies de *Lupinus* en que las hojas tienen menos vellosidades. Referente las semillas de tarwi, están incluidas en número variable en una vaina de 5 a 12 cm y varían de forma (redonda, ovalada a casi cuadrangular), miden entre 0,5 a 1,5 cm.

Un kilogramo tiene 3500 a 5000 semillas, dependiendo del tamaño y el peso de las semillas. La variación en tamaño depende tanto de las condiciones de crecimiento como del ecotipo o variedad. La semilla está recubierta por un tegumento endurecido (Ver figura 01) que puede constituir hasta el 10% del peso total (Palacios *et al.*, 2004). Los niveles de floración y partes de la semilla del tarwi se muestran en la figura 01.

Cuadro 01: Clasificación taxonómica del tarwi

Nombre Común	Tarwi, Chocho, tauri
Nombre Científico	<i>Lupinus Mutabilis</i>
División	Espermatofitos
Clase	Dicotiledóneas
Orden	Rosales
Familia	Papilionoideas
Género	Lupinus
Especie	Lupinus Mutábilis

Fuente: Palacios *et al.*, (2004).

Por otro lado, se ha demostrado que el tarwi es una leguminosa que fija nitrógeno atmosférico en cantidades apreciables de 100 kg/ha aproximadamente, restituyendo la fertilidad del suelo cultivada (Mujica y Sven, 2006). Usado también como abono verde, contribuyendo a mejorar la estructura del suelo e incrementando los contenidos de materia orgánica, nitrógeno y fósforo que hacen del suelo cultivado rico en nutrientes (Acuña, 2001).

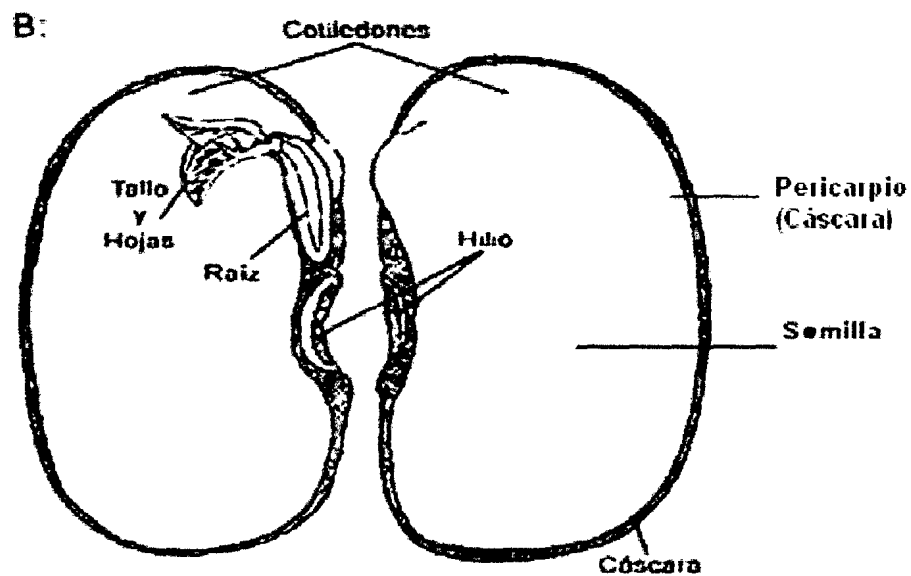
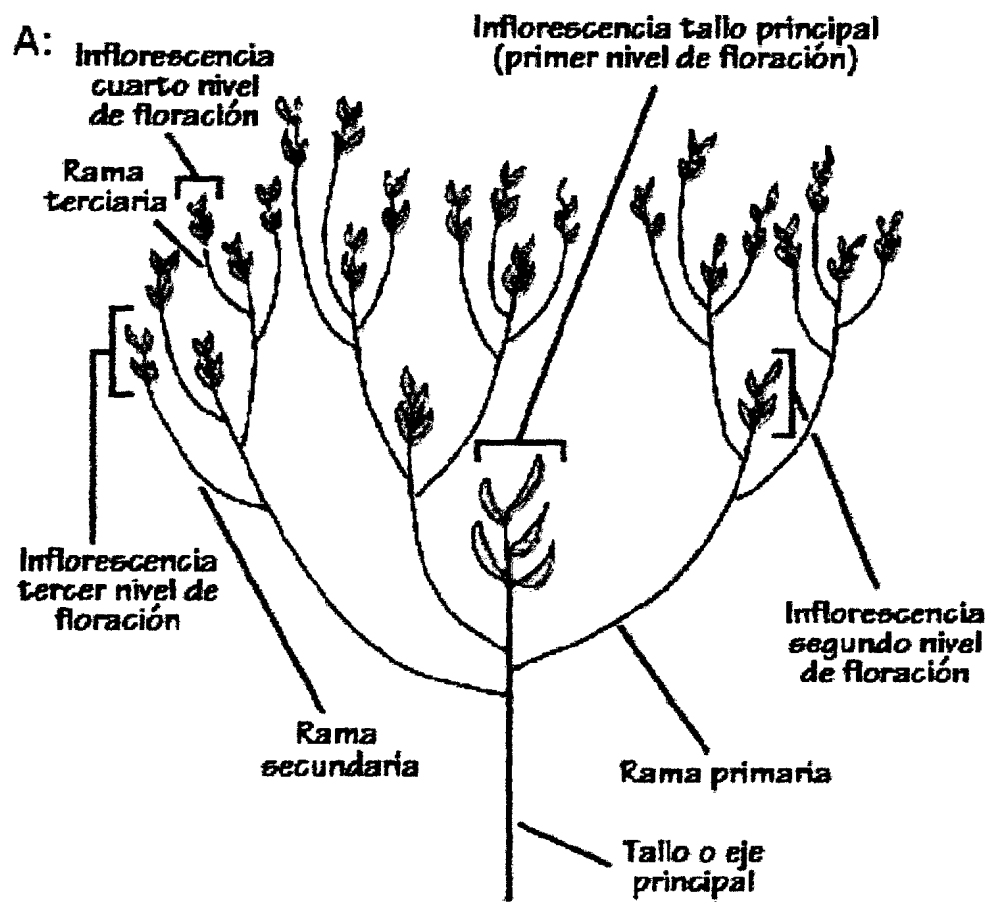


Figura 1: A) Niveles de ramificación y floración del lupino blanco. B) Partes de la semilla de lupino (Palacios *et al.*, 2004).

Los rendimientos del tarwi alcanzan 3200-4800 kg/ha, cuando el cultivo es conducido en forma adecuada y se le proporciona todos sus requerimientos en forma oportuna. También tiene potencial producción de alcaloides para uso como biocidas o repelentes de las principales plagas que afectan los cultivos de la zona andina (Acuña, 2001).

2.1.2. Composición química y valor nutricional

El grano de tarwi (*Lupinus mutabilis*) es rico en proteínas y grasas, razón por la cual debería ser utilizado en la alimentación humana con mayor frecuencia, su contenido proteico es superior al de la soya por lo que son excepcionalmente nutritivas. Las proteínas y aceites constituyen más de la mitad de su peso, estudios realizados en más de 300 diferentes genotipos muestran que la proteína varía de 41- 51% y el aceite de 14-24% (Gross *et al.*, 1988). Existe una correlación positiva entre proteínas y alcaloides, mientras que es negativa entre proteína y aceite, significa que cuantas más proteínas tenga, mayor será la cantidad de alcaloide, esto no ocurre con la grasa (Mujica y Sven, 2006).

Cuadro 02: Composición química del tarwi, soya y frijol (g/100g)

Componentes (%)	Tarwi	Tarwi**			Soya	Frijol
		Semilla	Cotiledón (88,97%)	Tegumento (11,03%)		
Proteína	44,3	44,87	49,22	9,39	33,4	22
Grasa	16,5	13,91	15,38	2,20	16,4	1,6
Carbohidrato	28,2	27,12	27,08	27,5	35,5	60,8
Fibra	7,1	8,58	2,42	58,35	5,7	4,3
Ceniza	3,3	5,52	5,89	2,55	5,5	3,6
Humedad	7,7	9,63	9,67	10,79	9,2	12

Fuente:

Mujica y Sven, (2006); Morón, (2005).

** Ortega *et al.*, (2009).

Sin embargo algunos estudios determinaron que el contenido de proteínas es aun más elevado que los valores mencionado en anteriores citas, obteniéndose hasta 47,7 % de proteína en el análisis químico proximal, y también la evaluación de la digestibilidad se aproxima a la de la caseína siempre y cuando se haya aplicado un proceso de desamargado y un tratamiento tecnológico adecuado que no implique pérdida de nutrientes (Schoeneberger y Gross, 1983).

Ortega *et al.*, (2009), encontraron que las semillas de lupino contienen 7,35% de nitrógeno total, 55,95% de carbono y 9,83% de hidrógeno. Con base en el contenido de cenizas (5,52%) se estima que el contenido de oxígeno equivale a 21,35%. La fracción fibrosa de la semilla está contenida principalmente en el tegumento, representando el 11,03 % de la semilla y tiene un alto contenido de fibra y carbohidratos, es especialmente rico en celulosa y hemicelulosa, por lo que es una alternativa para la alimentación de bovinos.

2.1.3. Aminoácidos

Los aminoácidos son sustancias orgánicas que poseen al menos una función amínica $-NH_2$ (básico) y una función ácida. La función acida en los aminoácidos naturales está siempre constituida por una función carboxílica $-COOH$ (Badui, 1990). En caso del tarwi la presencia de aminoácidos es de suma importancia, puesto que afecta sus propiedades funcionales e influye en la calidad proteica, dichos valores se muestran en el cuadro 03. Todas las proteínas están básicamente constituidas por aminoácidos, comprendiendo entre los 20 aminoácidos, sin embargo, algunas proteínas pueden carecer de uno o varios aminoácidos. Las diferencias estructurales y funcionales de los miles de proteínas se deben a su composición aminoacídica de las mismas. Uno de los principales

factores que afectan a las propiedades físico-químicas, como la estructura, la solubilidad, fijación de grasa, etc., de proteínas y péptidos es la hidrofobia de sus aminoácidos constitutivos (Fennema, 2000).

Cuadro 03: Cómputo de aminoácidos de *Lupinus mutabilis* (variedad semidulce) y *Lupinus albus* (variedad Astra) (mg de aminoácidos/g de proteína).

Aminoácidos	Patrón de aminoácidos * (mg/g proteínas)	Composición de aminoácidos		Cómputo de aminoácidos (**)	
		<i>Lupinus mutabilis</i>	<i>Lupinus albus</i>	<i>Lupinus mutabilis</i>	<i>Lupinus albus</i>
Isoleucina	28	40	41	—	—
Leucina	66	70	64	—	97
Lisina	58	57	45	98	78
Metionina+cistina	25	23	25	92	—
Fenilalanina+tirosina	63	75	93	—	—
Treonina	34	37	33	—	97
Triptófano	11	9	11	82	—
Valina	35	38	37	—	—
Histidina	19	—	—	—	—

(*) FAO/OMS, (1985).

(**) Se indican sólo los aminoácidos limitantes, cómputo en %

Fuente: Morón, (2005); Tapia *et al.*, (2006).

Un hecho interesante es que en cada variedad el primer limitante es diferente: En *Lupinus mutabilis* el limitante es triptófano (cómputo 82%), mientras que en *Lupinus albus* es la lisina (cómputo 78%). Es necesario resaltar el elevado aporte de aminoácidos azufrados de la semilla de tarwi, en comparación a otras leguminosas de Sudamérica (Morón, 2005). En caso de la proteínas aisladas de soya los aminoácidos azufrados son generalmente los aminoácidos limitantes (De Luna, 2008).

La presencia de las concentraciones de los aminoácidos azufrados (metionina+cisteína) es una característica de ésta leguminosa. Estudios realizados

demuestran que al suplir 2% de metionina al tarwi se incrementa la Relación de Eficiencia de Proteína (PER), la Utilización Proteica Neta (UPN) y el Valor Biológico (VB) en ratas y en niños (Ayala, 2006). Sin embargo las proteínas de los cereales y de las leguminosas suelen ser deficientes en al menos uno de los aminoácidos esenciales, los cereales tiene baja proporción de lisina pero buena proporción de metionina, en caso de la leguminosas ocurre lo contrario demandando la mezcla de cereales y leguminosas para incrementar la calidad proteica del producto (Linden y Lorient, 1994).

Cuadro 04: Evaluación biológica de la calidad proteica de tarwi (*Lupinus mutabilis*) expresado en %.

Producto	Ratas			Niños
	PER	UPN	VB	VB
Tarwi	49,6	51,1	51,9	61,3
Tarwi + 0,2% Metionina	87,2	84,6	89,6	84,8
Caseína	100	100	100	100

PER: Relación de eficiencia de proteína

UPN: Utilización proteica neta

VB: Valor biológico

Fuente: Ayala, (2006).

Al mezclar el tarwi con cereales se logra una excelente complementación de aminoácidos, puesto que cada materia prima confiere distinta composición y proporción aminoacídica, por lo que la relación de eficiencia proteica se altera significativamente, se destaca en particular el efecto complementario de la quinua (Moron, 2005). Este aspecto se aprovecha para mezclar este grupo de alimentos, de modo que se obtiene resultados favorables para la alimentación humana en todos los grupos etarios.

Cuadro 05: Efecto complementario de la proteína del tarwi con diferentes proteínas vegetales.

Fuente proteica	PER (% caseína)
Tarwi crudo	37,1
Tarwi autoclavado	48,2
Tarwi-quinua (33:66)	95,2
Tarwi-avena (50:50)	86,4
Tarwi-maíz (50:50)	84,8
Tarwi-arroz (50:50)	83,2
Tarwi-trigo (33:66)	81,2
Tarwi-cebada (50:50)	80
Tarwi-quinua-maíz (33:33:33)	96,8
Tarwi-maíz-avena (33:33:33)	89,2
Caseína	100

Fuente: Tapia *et al.*, (2006).

2.1.4. Ácidos grasos

En cuanto a los contenidos de ácidos grasos del tarwi, el cuadro 06 muestra la composición de ácidos grasos en el aceite de los *Lupinus*, se destaca la presencia de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido alfa linolénico (18:3, Omega 3), ácido linoléico (18:2, Omega 6) y el oleico (18:1, Omega 9) en cantidades significativas (Ayala, 2006). La interpretación por ejemplo del término (18:3, Omega 3) se basa en su química, en este caso se presenta el ácido alfa linolénico de 18 carbonos y 3 dobles enlaces, en la que el primer doble enlace está en el carbono 3, por ello el nombre de omega 3. Los omegas 3 y 6 no son producidas en el organismo, por lo que se consideran esenciales que se debe ingerir en los alimentos (Valenzuela y Nieto, 2003).

Cuadro 06: Composición de ácidos grasos del aceite de *L. mutabilis* amargo y semidulce y del *L. albus*, biovar astra (g/100 g).

Ácidos grasos	<i>L. mutabilis</i>		<i>L. albus</i>
	amargo	semi-dulce	Biovar astra
Mirístico	0,6	0,3	0,2
Palmítico	13,4	9,8	7,2
Palmitoleico	0,2	0,4	0,4
Esteárico	5,7	7,8	2,1
Oleico	40,4	53,9	57,3
Linoleico	37,1	25,9	21,3
Linolénico	2,9	2,6	8,2
Araquídico	0,2	0,6	1,3
Behénico	0,2	0,5	1,0
Erúcido	--	--	0,9
Poliinsaturados/Saturados	2,0	1,5	2,5

Fuente: Mujica y Sven, (2006); Ayala, (2006).

El mayor porcentaje de ácidos grasos presentes en el lupino corresponde a los monoinsaturados, siendo el ácido oleico el más importante. Los valores de este ácido graso varían de acuerdo a la especie, encontrándose en *L. albus* un 49%, en *L. angustifolius* un 33,5% y en *L. luteus* un 20,3%. En relación a la composición de ácidos grasos poliinsaturados, la semilla de lupino contiene cantidades apreciables de ácido linoléico, entre un 17,2% en *L. albus* y un 47,3% en *L. luteus*. Además existen niveles importantes del ácido linolénico, siendo más abundantes en *L. albus* (9,5%), las otras especies presentan porcentajes menores, aunque bastante superiores a otras leguminosas (Masson y Mella, 1985; Citado por Borquez, 2008).

2.1.5. Alcaloides del tarwi

El contenido de alcaloide del tarwi (*Lupinus mutabilis*), representa uno de los problemas para la obtención y rendimiento de concentrados y aislados proteicos, por ello es necesario realizar una buena elección del método de desamargado para minimizar las pérdidas de proteínas y demás componentes.

El grano de tarwi crudo es amargo (alto contenido de lupinina, lupanidina, esparteína y otros), por lo tanto es inconsumible, no es apetecido por aves, rumiantes ni insectos; por ello para consumir los granos de tarwi, el primer paso es el desamargado (Mujica y Sven, 2006).

Es natural la presencia de alcaloides en el tarwi, son tóxicos y dan un sabor amargo a la semilla, es la razón por la que se ha priorizado el desarrollo de un proceso de desamargado en muchas investigaciones. Un análisis bastante completo de alcaloides de tarwi ha sido realizado por Hatzold (1981), Citado por Tapia *et al.*, (2006), el cual muestra gran variedad de alcaloides presentes según la variedad estudiado de lupino, destacándose la presencia de lipinina como el alcaloide más común.

El contenido de alcaloides en el tarwi varía de 0,02 a 4,45% y en el follaje de 0,1 a 0,4%; los alcaloides reportados son los quinolizidinicos tales como: lupina, esparteína, 13- hidroxilupanina, 4-hidroxilupanina, isolupanina entre otros. Entre todos los indicados, los que se representan en mayor proporción son las lupininas (27-74%), estos alcaloides quinolizidinicos amargos en la semilla del tarwi son sustancias antinutritivas, que hasta el momento han sido mayor obstáculo para su utilización en la alimentación humana y animal, se reporta que

las variedades mejoradas denominadas dulces tienen un contenido de alcaloides menor al 1,16% (Mori *et al.*, 2008).

Cuadro 07: Nombres de los principales alcaloides del lupino, formulación química y fuente de origen.

Nombre	Formula química	Fuentes
Anagirina	$C_{15}H_{20}N_2O$	<i>Baptisia sp.</i> , <i>Cytisus sp.</i> , <i>Sophora sp.</i> y <i>Lupinus sp.</i>
Citisina	$C_{15}H_{14}N_2O$	<i>Baptisia sp.</i> , <i>Cytisus sp.</i> , <i>Sophora sp.</i> , <i>Lupinus sp.</i>
Lupanina	$C_{15}H_{24}N_2O$	<i>Cytisus sp.</i> , <i>Lupinus sp.</i> , <i>Posalyria sp.</i>
Lupinina	$C_{10}H_{19}NO$	<i>Anabasis sp.</i> , <i>Lupinus sp.</i>
Esparteina	$C_{15}H_{16}NO$	<i>Ammothamus sp.</i> , <i>Baptisia sp.</i> , <i>Cytisus sp.</i> , <i>Lupinus sp.</i> , <i>Retama sp.</i>

Fuente: Fundación Chile, (1978) Citado por Acuña, (2001).

Mediante el mejoramiento genético se han obtenido lupinos denominados dulces, que corresponden a aquellos en que el contenido de alcaloides es menor a 0,05%; los tipos amargos presentan de 1 a 4% de alcaloides. Los alcaloides como grupo son tóxicos, pero individualmente se les ha encontrado aplicaciones en el campo de la veterinaria y en la preparación de insecticidas para uso doméstico y agrícola. Caracteriza fundamentalmente al grupo de los *alcaloides del lupino* el anillo estructural denominado quinolizidina (Acuña, 2001).

Cuadro 08: Contenido de alcaloides en lupinos dulces y amargos (%).

Especie	Tipo	Mínimo	Máximo	Promedio
<i>Lupinus Luteus</i>	Amargo	0,350	1,550	0,896
	Dulce	0,000	0,090	0,045
<i>Lupinus Albus</i>	Amargo	0,350	3,250	1,668
	Dulce	0,001	0,061	0,030
<i>Lupinus Angostifolius</i>	Amargo	0,250	2,050	1,150
	Dulce	0,001	0,100	0,055

Fuente: Laboratorio de Bioingeniería-Universidad de Concepción. Citado por (Acuña, 2001).

Además de los alcaloides existen en muchas leguminosas otros componentes tóxicos o llamados principios antinutritivos, como los inhibidores de proteasas y el ácido prúsico (HCN). Sin embargo, no se han encontrado presentes en cantidades significativas en el tarwi, o son eliminados en el proceso de desamargado. Se considera que un contenido de 0,02% de alcaloides remanentes después del desamargado es el límite que se puede aceptar como seguro para el consumo humano sin ningún riesgo. Por otro lado el sentido del gusto humano puede identificar una concentración de 0,1% de sabor amargo en la semilla, lo que evita el consumo y protege de una posible intoxicación. Las cantidades que quedan después del desamargado son eliminadas por heces y orina. En diferentes ensayos se ha probado que aún después de un consumo prolongado por 4 semanas, no se observaron efectos nocivos en animales de experimentación (Tapia *et al.*, 2006).

Cuadro 09: Dosis mínima letal (DML) para los alcaloides de lupino multolupa sin tratar, 0,07% de alcaloides.

Grupo	Peso corporal (kg)	DML (mg de alcaloides)	Lupino diario (kg)
Adulto	60	18	750
Niño	24	7,2	300
Niña	12	3,6	150

Fuente: Hebbel, (1952). Citado por Acuña, (2001).

Las plantas sintetizan metabolitos secundarios que usan como defensa contra el ataque de plagas y animales, los alcaloides cumplen esa función protectora, por otro lado es posible su utilización con fines más específicos, tales como un agente conservador o inhibidor. La acción antifúngica del extracto de *lupinus mexicanus* (Variedad muy similar a *lupinus mutabilis*) está comprobado,

puesto que es capaz de inhibir significativamente el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos *Sclerotium rolfii*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* (Zamora, 2007).

2.1.5.1. Métodos de deslupinización

Existen varios métodos de deslupinizado, cada uno difiere en cuanto a sus resultados en base al contenido de alcaloide residual, para el control del proceso de desamargado, se presta sobre todo el método de determinación de los alcaloides totales por titulación o por fotometría. Si se requiere la separación de los alcaloides, se recomienda la cromatografía, en ocasiones se utiliza ácido tricloroacético al 5 % para el análisis (Zamora, 2007). Los principales métodos aplicados para el desamargado del tarwi son:

A. Deslupinizado tradicional

Comprende una extracción con agua, haciéndolo hervir durante una hora aproximadamente, colocándolo luego en bolsas de tela permeable y dejándolo en agua corriente (río) por hasta 10 días. Con este método se pierde un 45% de la materia seca de las semillas lo que incluye un alto porcentaje de proteína, hidratos de carbono y aceite (Tapia *et al.*, 2005). Por otro lado difiere significativamente con los métodos propuestos por otros investigadores, quienes afirman llegar a un mejor deslupinizado realizando una selección del grano por tamaño, remojar el grano durante un día en agua, cocer el grano en agua durante una hora, colocar en un recipiente apropiado (costalillo o canasta) y poner en agua corriente durante 4-5 días. Para estimar manualmente el contenido de alcaloide se acostumbra probar el grano, si ya no es percibido el sabor amargo, es posible suponer que ya está listo para ser consumido (Mujica y Sven, 2006).

B. Extracción por medio de alcohol

Se utiliza metanol, etanol e isopropanol a escala de laboratorio para el deslupinizado. Y a nivel de planta piloto se utiliza las mezclas etanol-agua (1:3). De los métodos empleados para este fin, se puede concluir que el método tradicional de desamargado con agua es el más eficiente en cuanto a eliminación de alcaloides y el único que se acerca al límite de 0,02%. El problema de la contaminación del agua puede ser solucionado en parte, desamargando en pozas y utilizando el concentrado de alcaloides para baños sanitarios del ganado y elaboración de piojicidas.

Cuadro 10: Evaluación de los métodos para el desamargado del tarwi

Aspectos	Agua	Etanol-agua
Grado de dificultad tecnológica	Bajo	Mediano
Recuperación de sustancias solubles	Muy complicado	Algo complicado
Gastos de inversión	Bajos	Medianos
Contaminación	Alta	Baja
Aplicación	Escala reducida	Gran escala
	Consumo humano	Consumo humano
Contenido de alcaloides en producto procesado	0,02%	0,27%

Fuente: (Bacigalupo y Tapia. 2005).

Para la deslupinización es requisito la hidratación, la cual se inicia de 3 a 4 horas después del remojo y se tiene la máxima absorción de agua a las 21 horas incrementándose en 240% el peso inicial de la semilla, Posteriormente se procede a la cocción en olla de presión (Bacigalupo y Tapia, 2005). Se ha probado el tiempo de cocción, el uso de aditivos como sal, ceniza de horno y cal, para acelerar el proceso de desamargado, se ha evaluado además la pérdida de nutrientes en cada uno de los procesos. Experimentalmente se comprobó que con

dos períodos de cocción de 40 minutos cada uno y con un cambio de agua se reduce notablemente el porcentaje de alcaloides.

En el método llamado “Proceso Cusco”, la semilla remojada se somete a un proceso de cocción en olla de presión con agua. La pérdida de nutrientes en este proceso aún se puede disminuir, sin embargo ya es 50% menor que en el proceso tradicional; siendo la pérdida de proteínas 16,8%. La cocción puede efectuarse también en hornos sencillos, usando los tallos y ramas de las plantas secas de tarwi como combustible (Bacigalupo y Tapia. 2005).

Cuadro 11: Pérdidas de alcaloides y nutrientes en los diferentes procesos con uso de coadyuvantes del “Proceso Cusco”, expresados en porcentajes en base seca.

Proceso	Hidratación	Cocción 1	Cocción 2	Lavado
Testigo(Solo agua)				
Materia seca	3,56	10,97	18,17	22,97
Proteína	1,54	9,14	13,82	16,78
Aceite	1,01	1,84	4,96	11,83
Alcaloides	13,71	66,14	83,16	99,89
Con sal				
Materia seca	3,56	12,71	18,75	23,24
Proteína	1,54	8,89	12,82	17,86
Aceite	1,01	2,5	4,57	9,78
Alcaloides	13,71	66,37	84,44	99,94
Con ceniza				
Materia seca	3,56	12,14	19,38	24,25
Proteína	1,54	10,25	14,59	18,91
Aceite	1,01	3,17	3,9	11,31
Alcaloides	13,71	60,85	80,96	99,81
Con cal				
Materia seca	3,56	13,83	22,27	28,64
Proteína	1,54	13,91	20,12	24,73
Aceite	1,01	4,53	7,26	11,7
Alcaloides	13,71	72,63	80,36	99,75

Fuente: Bacigalupo y Tapia. (2005).

Evidentemente en el cuadro anterior se aprecia que el proceso de desamargado en la que hay menor pérdida de proteína hasta la operación de lavado, es el proceso sin uso de coadyuvantes como la sal, ceniza y cal. Además de ello se logra menor contenido de alcaloide residual.

Por otro lado, Mori *et al.*, (2008), desarrollaron otro método de desamargado mediante la extracción sólido- líquido utilizando agua a diversos pH (4,5 y 7,5, siendo adecuado un pH de 4,5) como solvente en proporciones mayores a 1:35 empleando tiempos de remojo mayor de 24 horas. Así mismo, el tarwi desamargado obtenido presenta un análisis proximal expresado en base seca de: humedad 12,02 %; cenizas 2,78 %; materia grasa 27,35 %; proteínas 58,48 %; fibra 5,13 %; carbohidratos 10,71 %, alcaloides 0,037%. Con este método se reduce significativamente las pérdidas de proteína (44,38% inicialmente y 27,35 luego del deslupinizado), sin embargo en cuanto a costos del proceso es relativamente alto según a la cantidad de lupino a procesar.

2.2. AISLADO DE PROTEÍNA

2.2.1. Las proteínas

A. Definición

Las proteínas son biomoléculas formadas básicamente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Pueden además contener azufre y en algunos tipos de proteínas, fósforo, hierro, magnesio y cobre entre otros elementos. Están formados por aminoácidos unidos mediante puentes peptídicos. A nivel elemental, las proteínas están compuestas por 50-55% de carbono, 6-7% de hidrogeno, 20-23% de oxigeno, 12-19% de nitrógeno y 0,2-3% de azufre, la síntesis de las proteínas tiene lugar en los ribosomas. (Fennema, 2000).

Las proteínas son moléculas complejas (agregaciones de los aminoácidos). Con la posibilidad de que los 20 aminoácidos diferentes puedan ser agrupados en cualquier orden para conformar polipéptidos de cientos de aminoácidos, que tienen el extraordinario potencial de producir una gran cantidad de variantes en su conformación. Los 20 aminoácidos difieren considerablemente en sus propiedades fisicoquímicas así como en su polaridad, acidez, basicidad, aromaticidad, volumen, flexibilidad conformacional, en su habilidad para realizar entrecruzamientos para formar puentes de hidrógeno y reactividad química. Estas múltiples características, muchas de las cuales están interrelacionadas, son las responsables de la gran variedad de funciones, estructuras y demás características de las proteínas (Acuña, 2001).

Los aminoácidos son las unidades básicas que forman las proteínas. Su denominación responde a la composición química general que presentan, en la que un grupo amino (-NH₂) y otro carboxilo o ácido (-COOH) se unen a un carbono. Las otras dos valencias de ese carbono quedan saturadas con un átomo de hidrógeno (-H) y con un grupo químico variable al que generalmente se denomina radical (-R), el cual está disponible para que pueda unirse otro elementos o grupo químico (Badui, 1990).

La desnaturalización proteica es la pérdida de la estructura terciaria, por romperse los puentes que forman dicha estructura. Todas las proteínas desnaturalizadas tienen la misma conformación, muy abierta y con una interacción máxima con el disolvente, por lo que una proteína soluble en agua cuando se desnaturaliza se hace insoluble en agua y precipita (Fennema, 2000).

La desnaturalización se puede producir por cambios de temperatura, (huevo cocido o frito), variaciones del pH, etc. En algunos casos, si las condiciones se restablecen, una proteína desnaturalizada puede volver a su anterior plegamiento o conformación, proceso que se denomina renaturalización (Luque, 2009).

B. Estructura de las proteínas

Todas las proteínas poseen una misma estructura química central, que consiste en una cadena lineal de aminoácidos. Lo que hace distinta a una proteína de otra es la secuencia de aminoácidos de que está hecha, a tal secuencia se conoce como estructura primaria de la proteína. La estructura primaria de una proteína es determinante en la función que cumplirá después, así las proteínas estructurales (como aquellas que forman los tendones y cartílagos) poseen mayor cantidad de aminoácidos rígidos y que establecen enlaces químicos fuertes unos con otros para dar dureza a la estructura que forman.

La estructura de las proteínas, al igual que sus propiedades funcionales están en base a su composición aminoacídica, puesto que cada tipo de aminoácido que esté componiendo la estructura proteica, cumplen funciones específicas (Luque, 2009). La secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica determina el tipo de interacciones electrónicas que se producirán (tanto entre la misma proteína y su entorno) y el grado de libertad de adoptar diferentes conformaciones estables a una temperatura fisiológica (Fennema, 2000). Los péptidos son un tipo de moléculas formadas por la unión de varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos, el cual es el enlace covalente entre el grupo amino ($-NH_2$) de un aminoácido y el grupo carboxilo ($-COOH$) de otro aminoácido en la

que se produce una amida y una molécula de agua, resultando una sustancia llamado dipéptido (Murray, 2005).

B.1. Estructura primaria

La estructura primaria es una secuencia de aminoácidos de la proteína. Nos indica qué aminoácidos componen la cadena polipeptídica y el orden en que dichos aminoácidos se encuentran. La función de una proteína depende de su secuencia y de la forma que ésta adopte, (Ver figura 2).

B.2. Estructura secundaria

La estructura secundaria es la disposición de la secuencia de aminoácidos en el espacio. Los aminoácidos, a medida que van siendo enlazados durante la síntesis de proteínas y gracias a la capacidad de giro de sus enlaces, adquieren una disposición espacial estable, permitiendo que exista dos tipos de estructuras secundarias (α -hélice y la β -laminar) los cuales resultan de la unión de cadenas de aminoácidos mediante puentes de hidrogeno, generando una estructura tridimensional (Murray, 2005; Vieira, 2003).

B.3. Estructura terciaria

La estructura terciaria informa sobre la disposición de la estructura secundaria de un polipéptido al plegarse sobre sí misma originando una conformación globular, la estructura terciaria es la estructura plegada y completa en tres dimensiones de cadena polipeptídica (Murray, 2005). En definitiva, es la estructura primaria la que determina cuál será la secundaria y por tanto la terciaria. Esta conformación globular facilita la solubilidad en agua de las proteínas (Fennema, 2000).

B.4. Estructura cuaternaria

Esta estructura resulta de la unión, mediante enlaces débiles (no covalentes) de varias cadenas polipeptídicas con estructura terciaria, para formar un complejo proteico. Cada una de estas cadenas polipeptídicas recibe el nombre de protómero (Luque, 2009). La figura 02 muestra todas las estructuras de las proteínas.

C. Clasificación de las proteínas

Las proteínas se pueden clasificar atendiendo a diversos criterios, su composición química, su estructura y sensibilidad, su solubilidad, etc. Sin embargo una clasificación que engloba todos los aspectos es como sigue:

C.1. Holoproteínas o proteínas simples

Son proteínas formadas únicamente por aminoácidos, por lo que cuando se hidrolizan proporcionan únicamente aminoácidos.

Globulares: Se caracterizan por doblar sus cadenas en una forma esférica apretada o compacta dejando grupos hidrófobos hacia adentro de la proteína y grupos hidrófilos hacia afuera, lo que hace que sean solubles en disolventes polares como el agua. La mayoría de las enzimas, anticuerpos, algunas hormonas y proteínas de transporte, son proteínas globulares (Luque, 2009).

Fibrosas: Las proteínas fibrosas presentan cadenas polipeptídicas largas y una estructura secundaria atípica, son insolubles en agua y en disoluciones acuosas. Se encuentran en las estructuras rígidas de los animales, ejemplo de este tipo de proteínas son los colágenos, queratinas y elastinas (Murray, 2005).

C.2. Heteroproteínas o proteínas conjugadas

Las heteroproteínas están formadas por una fracción proteínica y por un grupo no proteínico, que se denomina grupo prostético.

Glucoproteínas: Son moléculas formadas por una fracción glucídica (del 5 al 40%) y una fracción proteica unidas por enlaces covalentes. Las principales son las glucoproteínas de la sangre y de las membranas celulares (Vieira, 2003).

Lipoproteínas: Son complejos macromoleculares esféricos formados por un núcleo que contiene lípidos apolares y una capa externa polar formada por fosfolípidos, colesterol libre y proteínas. Su función principal es transportar triglicéridos, colesterol y otros lípidos entre los tejidos a través de la sangre. Se clasifican según su densidad (relación de masa y volumen) en lipoproteínas de alta, mediana y baja densidad (Luque, 2009).

Nucleoproteínas: Son proteínas estructuralmente asociadas con un ácido nucleico (que puede ser ARN o ADN). Su característica fundamental es que forman complejos estables con los ácidos nucleicos, a diferencia de otras proteínas que sólo se unen a éstos de manera transitoria, como las que intervienen en la regulación, síntesis y degradación del ADN (Vieira, 2003).

Cromoproteínas: Las cromoproteínas poseen como grupo prostético una sustancia coloreada, por lo que reciben también el nombre de pigmentos. Según la naturaleza del grupo prostético, pueden ser pigmentos como la hemoglobina encargada de transportar el oxígeno en la sangre o como la hemocianina, un pigmento respiratorio que contiene cobre y aparece en crustáceos y moluscos (Luque, 2009).

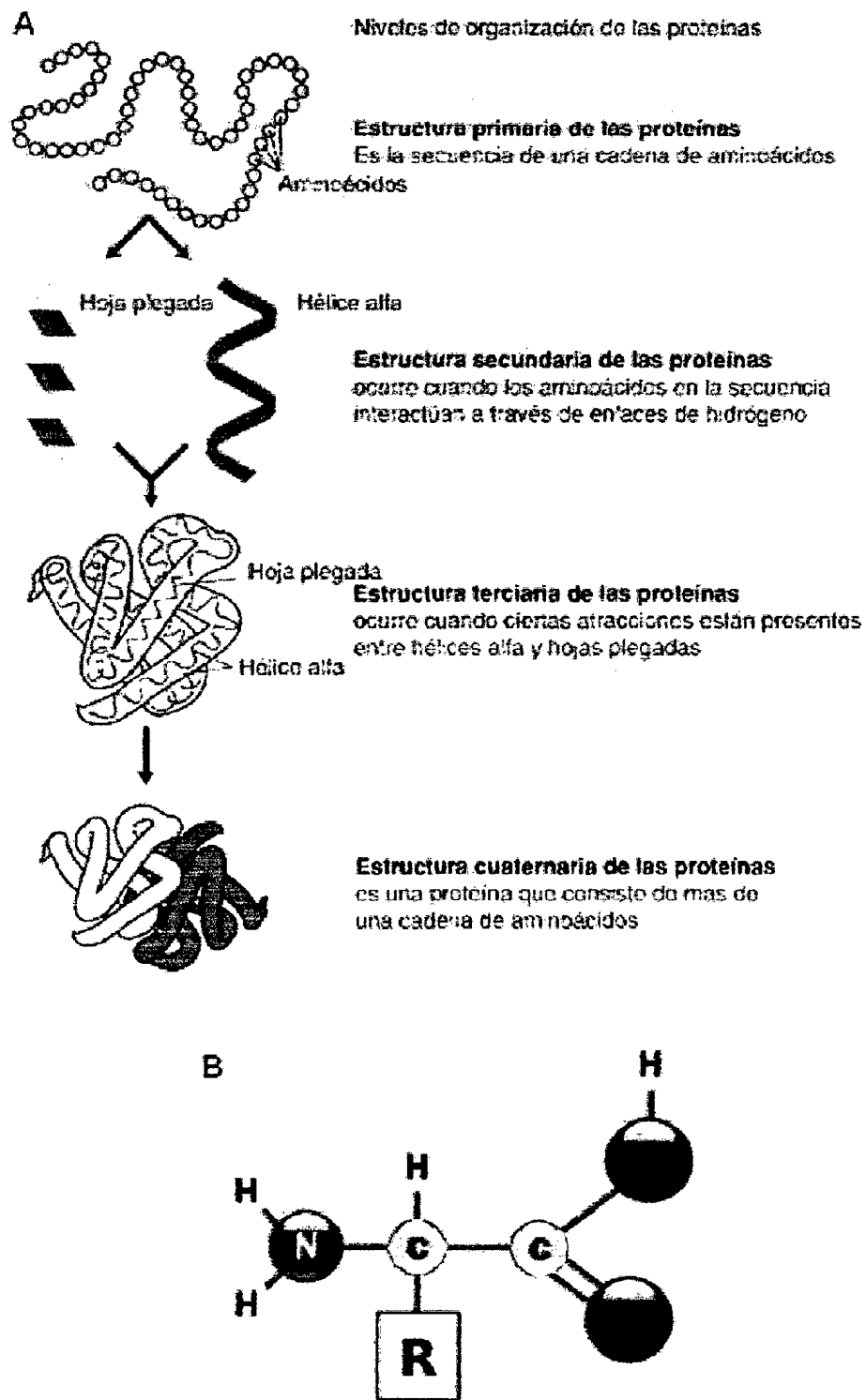


Figura 2: A) Estructuras de las proteínas, B) Estructura de un aminoácido Acuña, (2001); Luque, (2009).

D. Funcionalidad de las proteínas en alimentos

Las propiedades funcionales de las proteínas influyen enormemente en las cualidades sensoriales de los productos en las cuales se utilizan, en caso de los productos horneados influye en las propiedades viscoelásticas, propiedades texturales y succulentas en caso de carnes. De igual modo son muchas las propiedades que se pueden mejorar con uso de las proteínas, en especial los aislados proteicos (Fennema, 2000). En el cuadro siguiente se resume las propiedades funcionales que ejercen las proteínas en los sistemas alimenticios.

Cuadro 12: Papeles funcionales de las proteínas alimentarias en los alimentos

Funciones	Mecanismo	Alimento	Tipo de proteína
Solubilidad	hidrofilia	bebidas	proteínas de suero lácteo (lactoalbúminas)
Viscosidad	fijación de agua, tamaño y forma hidrodinámica	Sopas, caldos, aderezos para ensalada, postres	Gelatina (Hidrocoloides)
Fijación de agua	puentes de hidrogeno, hidratación iónica	salchichas, bizcochos y pan	proteínas del musculo (mioglobina), proteínas del huevo (albúminas)
Gelificación	agrupamiento e inmovilización del agua, formación de una red tridimensional	carnes, quesos, bizcochos y geles	proteínas musculares, del huevo y proteínas lácteas
Elasticidad	interacciones hidrofóbicas, puentes disulfuro	carnes, productos horneados	proteínas musculares y de cereales
Emulsión	adsorción y formación de película en la interfase	salchichas, sopas, bizcochos y aderezos	proteínas del musculo, leche y huevos
Formación de espumas	adsorción en la interfase y formación de película	batidos ornamentales, helados, bizcochos y postres	proteínas lácticas y del huevo
Fijación de grasa y sabores	interacciones hidrofóbicas, atrapamiento	productos horneados pobres en grasa, buñuelos	proteínas lácteas, del huevo y de los cereales

Fuente: Fennema, (2000).

La solubilidad de una proteína está influenciada por los siguientes factores: Su composición en aminoácidos (una proteína rica en aminoácidos polares es en general más soluble que una rica en aminoácidos hidrofóbicos); Su estructura tridimensional (las proteínas fibrosas son en general menos solubles que las globulares) y el entorno de la propia proteína. Los principales factores ambientales que influyen en la solubilidad de una proteína son los siguientes: la temperatura; la constante dieléctrica del medio, el pH del mismo, y la fuerza iónica (Fennema, 2000).

La representación esquemática de las propiedades funcionales de las proteínas se muestra en la siguiente gráfica:

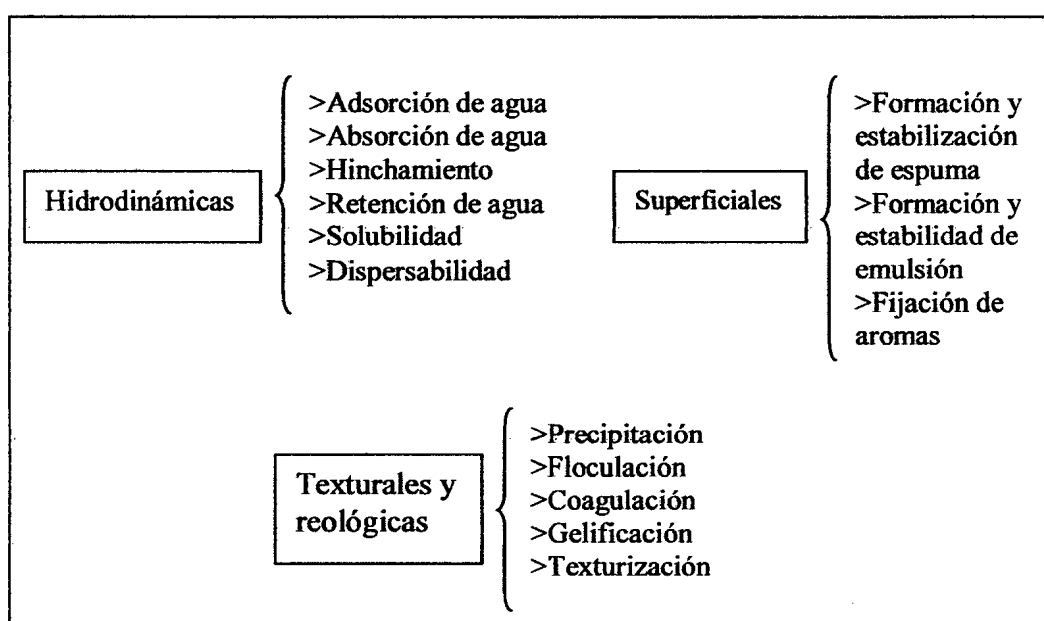


Figura 03: Propiedades funcionales de las proteínas

2.2.2. Importancia del lupino en la producción de proteínas vegetales

El lupino, tanto por su alta producción por hectárea, como por el alto contenido de proteínas, aparece como uno de los mejores proveedores de proteínas. En el cuadro 13 se muestra la producción obtenida en un terreno de

buena calidad, para diferentes alternativas y los kilos de proteínas por ha-año. Este cuadro demuestra la gran cantidad de kilos de proteína que se puede obtener de una hectárea de *lupino Albus* Acuña, (2001).

Cuadro 13: Producción de proteínas por hectárea

Producto	Producción (kg/ha)	Contenido de proteínas (%)	Proteínas (kg/ha-año)
Carne de vacuno	333 (a)	18,7	20,5
Arroz pulido	2800 (c)	6,4	116
Leche de vaca	4380 (b)	3,2	140
Lenteja	600	24	144
Poroto común	1300	20,6	268
Trigo	3000	9,3	279
Arveja de grano	1400	22	308
Quinua	2000	18	360
Maíz	3500	10,6	371
Poroto de soya	1800	38	685
Lupino Multolupa	4000	44	1760

(a) Se considera que por cada novillo de 500 kg listo para la matanza se necesitan tres unidades de vacuno (UV) para llegar a dicha edad; y cada ha de terreno resiste 2 UV. Rendimiento en canal 55% y carne limpia comestible 60% del anterior.

(b) 2 UV por cada vaca en leche y 2 UV por ha. 12 litros de leche por vaca y por día.

(c) 65% de extracción.

Fuente: Junge, (1975), Citado por Acuña, (2001).

2.2.3. AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS

Se ha empleado aislados proteicos desde hace muchos años, sin embargo en los últimos años se está desarrollando el uso de fuentes alternativas de proteína de origen vegetal, tales como girasol, colza, garbanzo, lupinus, etc. Dichos aislado son usados como insumo en la elaboración de muchos productos en la industria de alimentos y la farmacéutica (Villanueva *et al.*, 2001).

Se considera concentrado proteico aquel cuyo contenido de proteínas es mayor al 70%, dicho producto es obtenido por medios físicos y químicos con la

finalidad de reducir los otros componentes e incrementar la cantidad de proteína, con la consiguiente eliminación de los compuesto no proteicos de modo que se incrementa el nivel porcentual de las proteínas (Rivera, 2006).

Por otro lado Badui, (1990), menciona que el aislado es un producto obtenido de la soya que contiene más de 90% de proteínas en base seca, y el concentrado es el producto derivado de la soya con un contenido de más de 70% de proteínas en base seca. Ambas se obtienen a partir de harina de soya desgrasada, a la que se le elimina parte de sus carbohidratos por medio de una extracción acuosa.

Las proteínas son solubles en agua cuando adoptan una conformación globular. La solubilidad es debida a los radicales (-R) libres de los aminoácidos que, al ionizarse, establecen enlaces débiles (puentes de hidrógeno) con las moléculas de agua. Así, cuando una proteína se solubiliza queda recubierta de una capa de moléculas de agua (capa de solvatación) que impide que se pueda unir a otras proteínas lo cual provocaría su precipitación (insolubilización). Esta propiedad es la que hace posible la hidratación de los tejidos de los seres vivos.

Las proteínas representan uno de los componentes principales de los alimentos, tanto desde un punto de vista funcional como nutricional. Por ejemplo, determinan las propiedades físicas y organolépticas de muchos alimentos. Así, la consistencia y textura de la carne, queso o pan, dependen en gran medida de la naturaleza de las proteínas que los constituyen. Pero también, en alimentos elaborados con presencia menor de proteínas, pueden jugar un papel muy importante, influyendo en características funcionales, como la formación de emulsiones, geles, espumas y la absorción de agua o aceite. Además las proteínas

también constituyen un aporte nutricional importante, representando una fuente de energía, nitrógeno y aminoácidos esenciales (Vioque y Millán 2006, Citado por Silva 2006).

Las proteínas son macronutrientes esenciales para la nutrición humana y animal que habitualmente forman parte de los propios alimentos en su forma natural. Además de su papel básico en la nutrición, las proteínas poseen propiedades fisicoquímicas que otorgan unas propiedades funcionales muy específicas al ser adicionadas a ciertos alimentos. Por esta razón el desarrollo tecnológico de la industria alimentaria ha recurrido en forma habitual a la utilización de productos proteicos con fines funcionales-tecnológicos, encaminados a dotar de propiedades fisicoquímicas y organolépticas a los alimentos donde son incorporadas (Silva, 2006).

Cortez *et al.*, (2005), Estudiaron la metodología de extracción de aislado proteico a partir de alfalfa (*Medicago sativa*), concluyendo que en la mayor parte de los métodos se obtiene un % de recuperación de proteína de 40% o más. Se observa un incremento en la recuperación de proteína por arriba del 90% en los concentrados obtenido a partir del jugo de alfalfa y por la aplicación de tratamiento térmico y ajuste de pH. Esto se puede relacionar con el tratamiento combinado de ambos métodos provocando una mayor precipitación proteica. En los métodos en que se obtuvo una recuperación entre 90% y 50%, se pueden mejorar aplicando una segunda o tercera extracción.

Por otro lado, es posible obtener aislado proteico a partir de harinas desgrasadas con solvente, en este caso de harina de soya desengrasada con éter de petróleo en un equipo Soxhlet. La extracción de las proteínas se realiza con una

solución de NaCl 1M (1:10 p/v), ajustando el pH a 7, el cual se somete a agitación por 1 hora. Inmediatamente después se somete a una centrifugación (5000 rpm/30 min). Esta extracción se realiza tres veces, con la única diferencia que en la tercera extracción la relación muestra solución extractora es de 1:5. Se juntan los sobrenadantes colectados, se mide el volumen y se diluye a 50%, ajustando el pH a 4,5 con HCl 0,1N. Se deja en reposo por 12 horas a 4°C y se centrifuga a 5000 rpm/30 min. El precipitado es colectado y liofilizado para determinar las proteínas por el método de Kjeldahl (Chavarria *et al.*, 2005).

Santos *et al.*, (1997) fraccionaron las proteínas de dos especies de leguminosas del género lupinus (*L. mutabilis* y *L. albus*), reportando que las proteínas más abundantes de estas leguminosas son las glubulinas (43% y 31,7% para las dos especies respectivamente) seguidas de las albuminas (8,7% y 16,9%).

2.2.3.1. Métodos de obtención de aislado proteico

A. Procedimientos de separación basados en diferencia de solubilidad

Las proteínas en disolución muestran cambios significativos de su solubilidad en función del pH, fuerza iónica, propiedades dieléctricas del disolvente y la temperatura. Estas variables que son reflejo del hecho de que las proteínas son electrolitos de peso molecular muy grande, pueden utilizarse para separar mezclas de proteínas, ya que cada proteína posee una composición en aminoácidos característica que determina su comportamiento como electrolito y propiedades.

A.1. Obtención de aislados a pH alcalino y precipitación isoelectrica

Este método consiste en el uso de una base para solubilizar las proteínas, comúnmente se utiliza hidróxido de sodio NaOH para la extracción alcalina, posteriormente se procede a la precipitación isoelectrica (Solubilidad mínima de las proteínas a pH alrededor de 4,5). Generalmente el procedimiento consiste en mezclar harina con agua destilada en relación de 1:10, ajustando el pH con NaOH 0,1N a 9,0. La extracción se realiza agitando la suspensión por 45 minutos a temperatura ambiente. Para separar la proteína extraída del residuo, el extracto se centrifuga a 10 000 rpm. La precipitación de las proteínas aisladas se realiza ajustando el pH con HCl 0,1N. El aislado proteico precipitado se recupera por centrifugación a 10 000 rpm (30 min, 4°C) posteriormente se procede a lavar preferentemente dos veces con agua destilada (Ramírez, *et al.*, 2007).

La solubilidad de la mayor parte de las proteínas globulares se halla profundamente influida por el pH del sistema. Por ejemplo la solubilidad de la b-lactoglobulina, una proteína de la leche se encuentra entre 5,2 y 5,3, independientemente de la concentración del cloruro sódico presente. A cada lado de este valor critico del pH, la solubilidad experimenta un incremento muy agudo. La mayoría de las proteínas globulares muestran un mínimo solubilidad, aunque ello depende del pH y del tipo de proteína (Nelson y Cox, 2001).

Se ha diseñado un proceso de obtención de aislados proteicos a partir de harina de colza desengrasada mediante extracciones sucesivas. El método incluye la extracción básica de las proteínas solubles seguido de una precipitación acida en el punto isoelectrico. El precipitado es lavado con agua (pH 4,5), etanol y acetona, obteniéndose un aislado proteico con un 86% de proteína y reduciéndose

el contenido de azúcares solubles en más de un 90% respecto a la harina desengrasada. El aislado proteico final tiene una riqueza en proteínas del 86%, una digestibilidad *in vitro* del 91,6% y unos valores de absorción de agua y aceite que proporcionan un producto deseable para su uso en alimentación, pudiendo utilizarse como materia prima para la obtención de hidrolizados proteicos (Gonçalves *et al.*, 1997).

Partículas pequeñas de harina de soja con elevado índice de solubilidad de nitrógeno (NSI) es el material de inicio y se contacta con un medio alcalino a pH < 9 para prevenir la hidrólisis de la proteína. El proceso de aislado es efectivo por las características solubles de la proteína de soja. Cuando la proteína ha sido disuelta, el barro es centrifugado para separar o “aislar” la proteína de los carbohidratos. El licor, conteniendo la fracción proteica, es luego acidificado hasta un pH cercano al punto isoelectrico de 4,3 con ácido clorhídrico, sulfúrico, fosfórico o acético, que ocasiona que la proteína precipite. La cuajada ácida es centrifugada para separarla del suero, lavada (a pH 4,3) y nuevamente centrifugada. La forma más común de aislado, el proteinato de sodio, se forma por neutralización de la cuajada con hidróxido de sodio seguido por secado spray (Genta y Alvarez, 2006). La Figura siguiente explica el proceso mencionado.

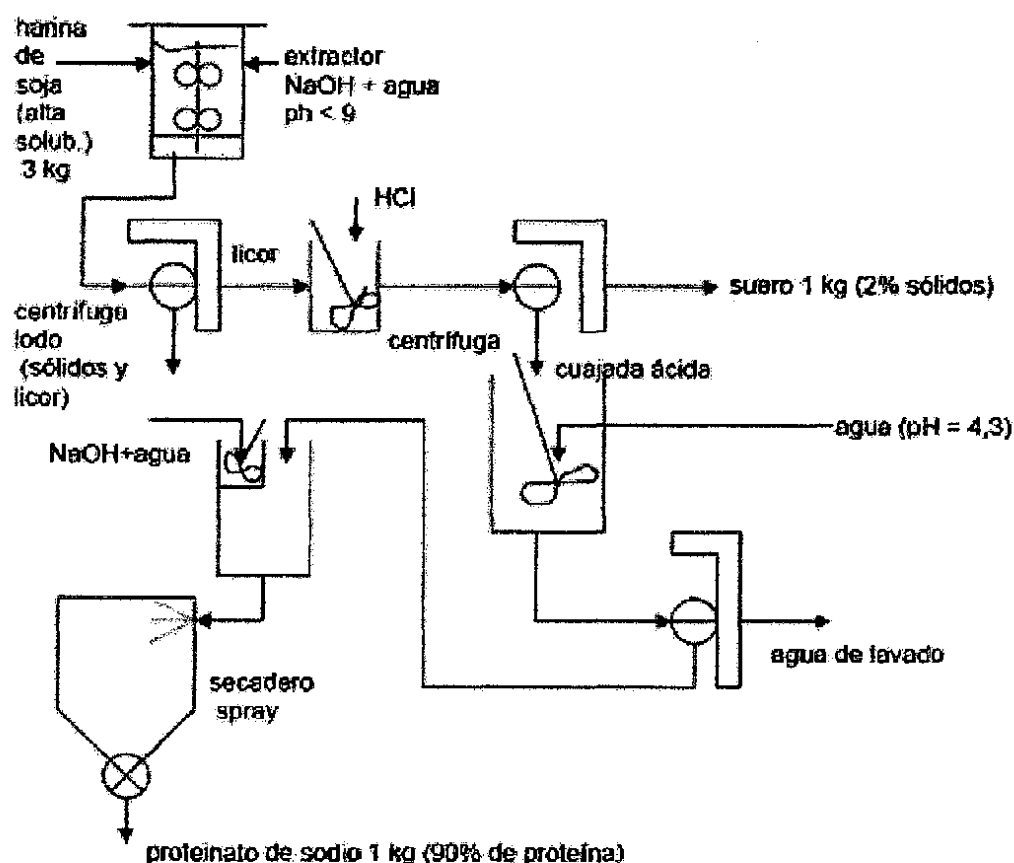


Figura 04: Proceso de obtención de aislado de soja, Genta y Álvarez, (2006).

A.2. Solubilización y precipitación por salado de las proteínas

Las sales neutras ejercen efectos pronunciados sobre la solubilidad de las proteínas globulares. A baja concentración, las sales incrementan la solubilidad de muchas proteínas, fenómeno que recibe el nombre de solubilización por salado. Las sales de iones divalentes tales como el MgCl_2 y el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, son mucho más eficaces en la solubilización de las proteínas que las sales de iones monovalentes tales como el NaCl , el KCl y el NH_4Cl . Las capacidades de las sales neutras para influir en la solubilidad de las proteínas está en función de su fuerza iónica que constituye una medida tanto de la concentración como del número de las cargas eléctricas existentes en los cationes y aniones aportados por

la sal. El efecto de la solubilidad por salado esta causado por cambios de tendencia a la ionización de los grupos -R dissociables de la proteína.

Por otra parte a medida que aumenta la fuerza iónica, la solubilidad de una proteína comienza a disminuir, a una fuerza iónica suficientemente elevada, una proteína puede ser casi completamente precipitada de su disolución, efecto llamado insolubilización por salado. La base fisicoquímica de la insolubilización por salado es muy compleja; uno de los factores que concurren en ella es que la concentración elevada de la sal puede eliminar el agua de hidratación de las moléculas de proteína reduciendo la solubilidad (Nelson y Cox, 2001).

A.3. Fraccionamiento con disolventes

La adición de disolventes orgánicos neutros miscibles con el agua, particularmente etanol y acetona, disminuye la solubilidad de la mayoría de las proteínas globulares en el agua, de tal manera que precipitan de su disolución. El estudio cuantitativo de éste efecto muestra que la solubilidad de la proteína a un pH y fuerza iónica determinados está en función de las constantes dieléctricas del medio. Puesto que el etanol posee una constante dieléctrica menor que la del agua, su adición a una disolución acuosa de proteína incrementa la fuerza de atracción entre las cargas opuestas, disminuyendo de este modo el grado de ionización de los grupos -R de la proteína. Como resultado las moléculas de proteína tienden a agregarse y precipitan. Las mezclas de proteínas pueden separarse basándose en las diferencias cuantitativas de su solubilidad en mezclas frías de etanol-agua y de acetona-agua. Una desventaja de este método es que al poder estos solventes desnaturalizar a las proteínas a temperaturas superiores, las temperaturas de trabajo deben mantenerse bajas (Nelson y Cox, 2001).

A.4. Extracción con cloruro de sodio y precipitación por micelización

En este método se utiliza una sal para la solubilización proteica, utilizando solución de NaCl 0,8M a pH 7, en una proporción harina: solvente de 1:10. Después de la extracción, la suspensión se centrifuga a 10000 rpm durante 30 min. Para lograr la micelización de las proteínas el extracto proteínico se diluye con agua destilada fría (4°C) y posteriormente se precipita a pH 4,5, luego se procede a lavar dos veces con agua destilada (Robles y Mora, 2007).

Cuadro 14: Rendimiento y pureza de aislados de soya obtenidos por diferentes métodos.

Método	Método Estándar (a)		Micelización (b)	
	R	P	R	P
Desgrasado con hexano	58,32	90,09	35,09	95,90
Desgrasado con etanol 95%	70,83	91,32	31,20	87,69

R: Rendimiento (% de recuperación de proteína)

P: Pureza (% de proteína en base seca)

a: Extracción a pH 9,0 y precipitación a pH 4,5

b: Extracción con NaCl 0,8 M, dilución y precipitación a pH 4,5

Los aislados obtenidos por los diferentes procesos de desgrasado y extracción de proteína muestran perfiles electroforéticos semejantes (Figura 05). Existe una marcada disminución en la fracción de proteína con peso molecular aproximado de 95 kD en los aislados obtenidos tanto por el método estándar como por micelización a partir de harina desgrasada con etanol al 95%. La mejor combinación de procesos en cuanto a rendimiento y pureza fue la del aislado obtenido por método estándar a partir de harina desgrasada con etanol al 95%, además el método de micelización da rendimientos bajos con cualquiera de los dos métodos de desgrasado (Robles y Mora, 2007).

Las siguientes imágenes muestran las estructuras obtenidas de microscopía electrónica de barrido del aislado proteico de soya obtenido por dos métodos de aislamiento.

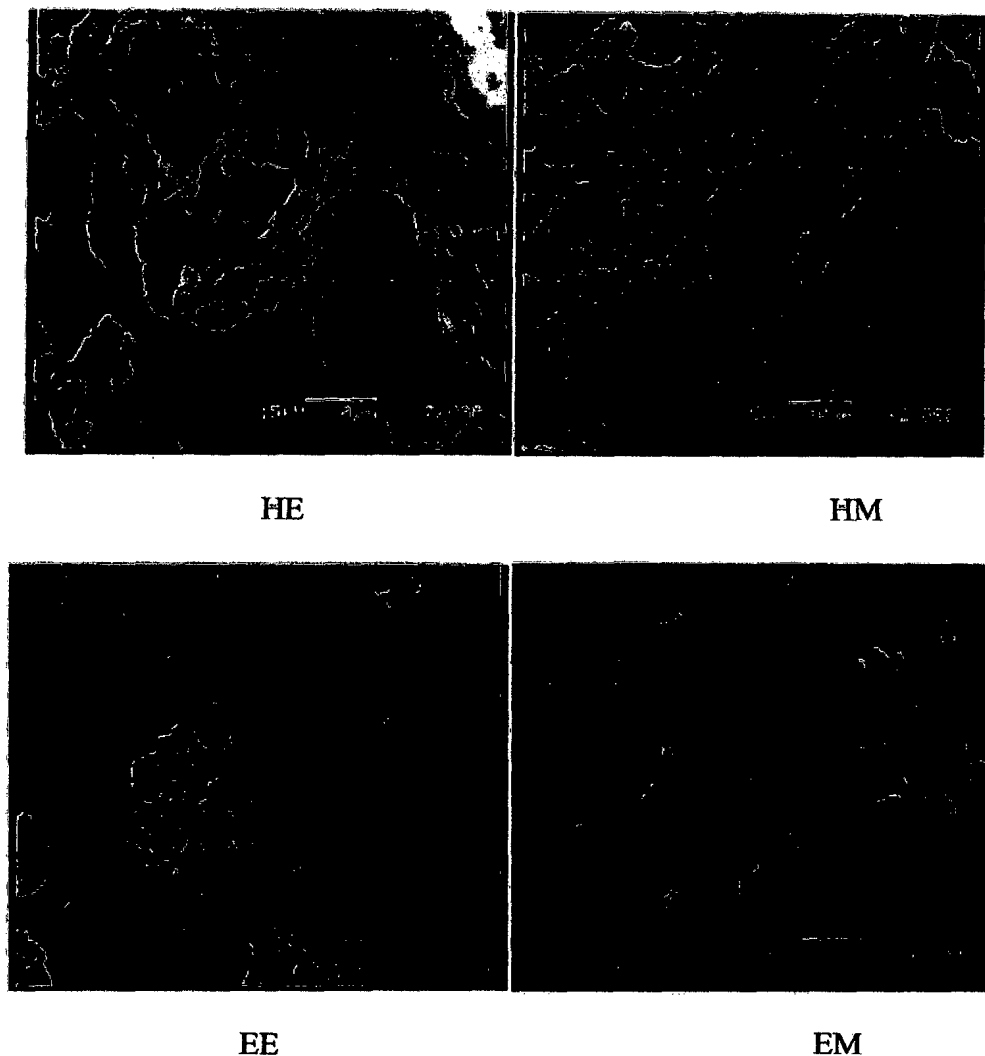


Figura 05: Microscopía electrónica de barrido de aislados de soya obtenidos por diferentes métodos (Extracción alcalina y precipitación isoelectrica, extracción por salado y micelización).

HE: Harina desgrasada con hexano y proteína extraída a pH 9,0

HM: Harina desgrasada con hexano y proteína extraída con NaCl 0,8M

EE: Harina desgrasada con etanol y proteína extraída a pH 9,0

EM: Harina desgrasada con etanol y proteína extraída con NaCl 0,8M

Fuente: (Robles y Mora, 2007).

B. Extracción de compuestos no proteicos mediante el uso de agua ajustada al punto isoelectrico de las proteínas

Este método, patentado por Sair (1959), Citado por Vioque *et al.*, (2001), permite la eliminación de la mayor parte de los compuestos antinutricionales, parte de las sales y de los compuestos nitrogenados no proteicos, aunque también son solubilizadas una fracción de las proteínas, principalmente albúminas. El método consiste en sucesivas extracciones con agua y centrifugaciones para separar la materia insoluble del sobrenadante en el que van disueltos los compuestos que se quieren eliminar. La extracción acuosa a pH controlado es poco desnaturizante para las proteínas, lo cual permite mantener las propiedades funcionales del producto, aunque algunos compuestos responsables de olores y sabores desagradables no son eliminados completamente.

C. Extracción de compuestos no proteicos con agua tras tratamiento térmico

Previo a la extracción con agua de los compuestos no proteicos, se efectúa una insolubilización de las proteínas tratando la harina desengrasada con vapor de agua a presión atmosférica. El vapor además va a permitir el arrastre de componentes volátiles responsables de olores y sabores desagradables como son los ácidos grasos de cadena corta y sus derivados oxidados. Sin embargo, se produce una intensa disminución de las propiedades interfaciales acuoso-oleosas y agua-aire, y también de la solubilidad. El calor prolongado también puede dar lugar al desarrollo de colores oscuros y sabores amargos como resultado de reacciones de Maillard. Las técnicas de extracción son idénticas a las usadas anteriormente (Vioque *et al.*, 2001).

D. Extracción de compuestos no proteicos mediante soluciones hidroalcohólicas

El hexano usado en el desengrasado ni el agua son eficaces en la eliminación de ciertos compuestos que pueden ser responsables de malos olores y sabores del producto. Entre estos dos disolventes de polaridades tan dispares se encuentran las mezclas hidroalcohólicas, que permiten una adecuada extracción de compuestos tales como lípidos polares y sus productos de oxidación. Además, las proteínas son generalmente poco solubles en mezclas agua- alcohol sobre todo si el alcohol representa más del 40% v/v (en volumen), en este sentido, la utilización de mezclas hidroalcohólicas conlleva una disminución de la solubilidad de las proteínas respecto a la utilización del agua e incluso del alcohol puro (Vioque *et al.*, 2001).

El etanol es generalmente el alcohol de elección en la preparación de concentrados mediante mezclas hidroalcohólicas. La técnica consiste en extraer a contracorriente la harina con mezclas de etanol al 50-70% v/v y secar posteriormente el producto. El extracto puede ser destilado, para recuperar el alcohol que podría ser reutilizado disminuyendo así los costes. El alcohol es más difícil de recuperar por destilación y el secado del concentrado se hace más complicado. Por el contrario, con porcentajes muy elevados de etanol la extracción de azúcares es insuficiente. La principal diferencia entre estos métodos radica en la marcada insolubilización de las proteínas que se produce en estos dos últimos procesos. Los menores contenidos en oligosacáridos se consiguen con la extracción isoelectrica, mientras que los porcentajes más bajos en lípidos se obtienen extrayendo con mezclas hidroalcohólicas.

Sin embargo, las mejoras más recientes en la preparación de concentrados proteicos son las que conciernen a la mejora de sus características organolépticas mediante el procedimiento del triple disolvente, consistente en extraer la harina con hexano, hexano-etanol y etanol-agua (Vioque *et al.*, 2001).

2.2.4. PARÁMETROS DE OBTENCIÓN DE AISLADO PROTEICO

Para cada proceso, existen parámetros que influyen en los resultados del proceso, el entendimiento y la buena manipulación de dichos parámetros garantizan la idoneidad de los resultados. En este caso, existen varios parámetros que gobierna la obtención de los aislados proteicos, sin embargo solo algunas de ellas son muy influyentes en los resultados, siendo éstas el pH de extracción, relación harina: solvente y temperatura de extracción. Sin embargo también influye el tiempo de agitación, número de extracciones entre otros factores.

Los parámetros adecuados de obtención de aislado proteico de colza (*Brassica napus*), son pH 12, temperatura de 40 °C y proporción de harina y solvente de 1:20 Pedroche *et al.*, (2004). El aislado muestra tener más de 95% de proteínas posterior a su insolubilización a pH 4,3 y operaciones de obtención. Por otro lado, es posible la obtención de aislado proteico a partir de amaranto, lográndose obtener un producto de hasta 85,5% de proteínas (Avanza *et al.*, 2000). La obtención de aislado proteico a partir de cacahuate (*Arachis hypogaea*) variedad amayuca se realiza en condiciones similares, con ello se obtiene un concentrado con 83,66 % (N x 5,46) de proteínas, 23,17% de proteínas solubles y un índice de solubilidad de 27,69% (Duque *et al.*, 2001).

La digestibilidad para aislados proteicos de tarwi es de 88,5%, el cual es superior en comparación a la digestibilidad de la harina (76,4%). Este resultado

puede explicarse, debido a que el proceso al que se sometió la semilla permite desnaturalizar macromoléculas de proteínas, por otro lado, podría deberse a la disminución de algunos factores no nutricionales que pudieron estar presentes (Jiménez y Dávila, 2006). Sin embargo Del Refugio, (1997), extrajo un concentrado proteico de garbanzo con una digestibilidad in vitro de 82,62%.

A. PH de solubilización

Las proteínas generalmente tiene carga neta negativa, por lo que cuando se incrementa el pH, los iones OH^- son incorporados al sistema haciendo que la carga neta sea aun más negativa, este fenómeno ocasiona que las moléculas de las proteínas se repelen y se solubilizan, paralelamente las moléculas de agua son incorporados mediante puentes de hidrogeno incrementado la solubilidad.

La solubilidad de las proteínas de nuez de marañón (*Anacardium occidentale L*) por ejemplo, puede ser incrementada por aumento del pH por encima de 7,0; no obstante por encima de pH 11, la solubilidad de las proteínas no es significativamente afectada. se observa que la solubilidad de las proteínas de marañón aumenta cuando se incrementa el pH, alcanzando un máximo a pH 11 correspondiente a 91,66% (Ventura *et al.*, 2005).

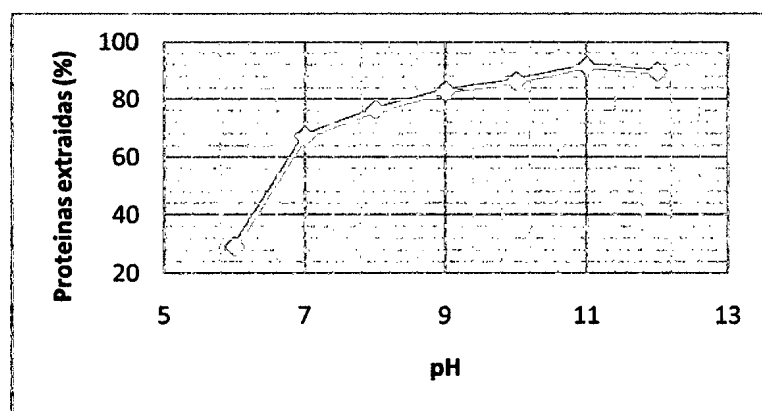


Figura 06: Influencia del pH en la extracción de proteínas en el nuez de marañón Ventura *et al.*, (2005).

Los tratamientos alcalinos altos ($\text{pH} > 9$) afectan negativamente a los aminoácidos azufrados y a otros esenciales tales como lisina generando lisino-alanina además de causar desnaturalización e hidrólisis de las proteínas, incremento de la reacción de Maillard con el oscurecimiento de las proteínas e incremento de la extracción de componentes no proteicos, los cuales coprecipitan con las proteínas, bajando así la calidad del aislado proteico. Por estas razones técnicas se opta por trabajar en un rango de pH 8,0 – 8,9 que permite obtener una cantidad apreciable de proteína (Callisaya y Alvarado, 2009). Sin embargo estos valores varían significativamente según la materia prima.

Los iones H^+ y OH^- del agua provocan efectos parecidos, pero además de afectar a la envoltura acuosa de las proteínas también afectan a la carga eléctrica de los grupos ácidos y básicos de las cadenas laterales de los aminoácidos. Esta alteración de la carga superficial de las proteínas elimina las interacciones electrostáticas que estabilizan la estructura terciaria y provoca su precipitación. La solubilidad de una proteína es mínima en su punto isoeléctrico, ya que su carga neta es cero y desaparece cualquier fuerza de repulsión electrostática que pudiera dificultar la formación de agregados (Nelson y Cox, 2001).

B. Temperatura

En caso de la temperatura, Meyer (1966) citado por Ventura *et al.*, (2005), refiere que la solubilidad de las proteínas aumenta cuando la temperatura se eleva de 0 a 50°C. Por encima de 50°C el movimiento de las moléculas es suficiente para romper los enlaces implicados en la estabilización de las estructuras secundarias y terciarias.

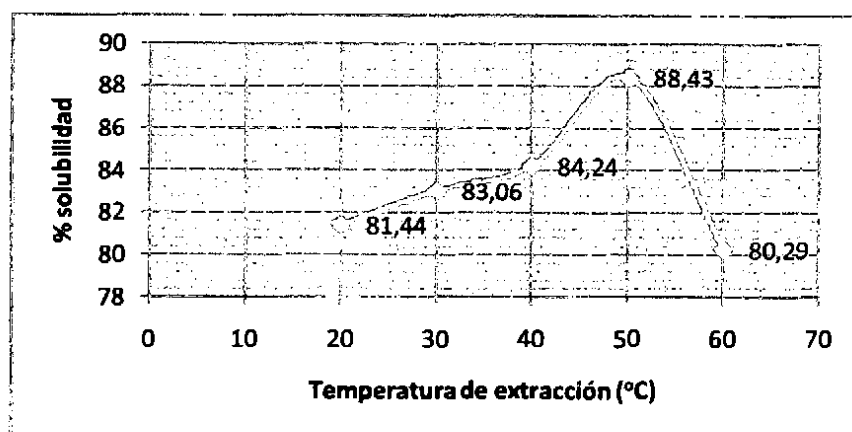


Figura 07: Influencia de la temperatura en la extracción de proteínas en el nuez de marañón.

Fuente: Ventura *et al.*, 2005.

Las proteínas entran en disolución, cuando se calientan por encima de una determinada temperatura crítica, manifiestan importantes cambios estructurales y cuando posteriormente se enfrían producen un gel viscoso y blando y coágulos opacos o geles viscoelásticos claros, dependiendo del tipo de proteína y aminoácidos que lo conforman, de la velocidad de calentamiento y de las condiciones del medio acuoso, especialmente del pH y de la presencia de iones Ca^{++} (Rodríguez *et al.*, 2002)

Cheftel *et al.*, (1989), menciona que la desnaturalización va seguida, frecuentemente de una agregación y la solubilización de la proteína desnaturalizada llega a ser inferior a la de la proteína natural. En caso de nuez de marañón (*Anacardium occidentale L*), se puede apreciar que la máxima extracción de proteínas de nuez de marañón (84,22%) es a 50°C, y el mayor volumen recuperado se manifiesta a 40°C. Este resultado difiere del reportado por Sathe (1994) citado por Ventura *et al.*, (2005), quien con harina desengrasada de la nuez de marañón obtuvo una mayor extracción de proteínas a 25°C. Esto

posiblemente se deba al contenido grasa que pudieran formar emulsiones con las proteínas presentes, por lo que el calentamiento origina la desnaturalización de las proteínas con la consiguiente ruptura de la emulsión, facilitando por tanto la extracción de estas proteínas.

Las etapas iniciales de la coagulación por el calor de una disolución acuosa de proteína son: (a) la disociación reversible de la estructura cuaternaria en sub-unidades y (b) la desnaturalización irreversible de las estructuras secundarias y terciarias (Rodríguez *et al.*, 2002).

Cuando la temperatura es elevada aumenta la energía cinética de las moléculas con lo que se desorganiza la envoltura acuosa de las proteínas, y se desnaturalizan. Asimismo, un aumento de la temperatura destruye las interacciones débiles y desorganiza la estructura de la proteína, de forma que el interior hidrofóbico interacciona con el medio acuoso y se produce la agregación y precipitación de la proteína desnaturalizada (Nelson y Cox, 2001).

C. Relación harina: solvente

La cantidad de harina a solubilizar en el sistema harina y solvente, influye significativamente en la composición y cantidad porcentual de la proteína recuperada en la precipitación isoeléctrica, sin embargo el solvente (solución extraente que es ajustada a pH de extracción) debe ser adecuada para que no se sature los componentes solubilizados, lo que indica que es de vital importancia determinar la relación apropiada para que sea adecuado entre la cantidad de disolvente y la cantidad de proteínas a solubilizar.

Las relaciones harina: solvente para la extracción de proteínas de nuez de marañón (*Anacardium occidentale L*) se muestran a continuación, los resultados muestran que es significativo las proporciones a considerar, por lo que niveles próximos a 1:15 resultan siendo adecuadas (Ventura *et al.*, 2005). Sin embargo en las relaciones usadas en la harina de soya es de 1:10 con la que se obtiene aislados con alta concentración proteica (Ramírez, *et al.*, 2007).

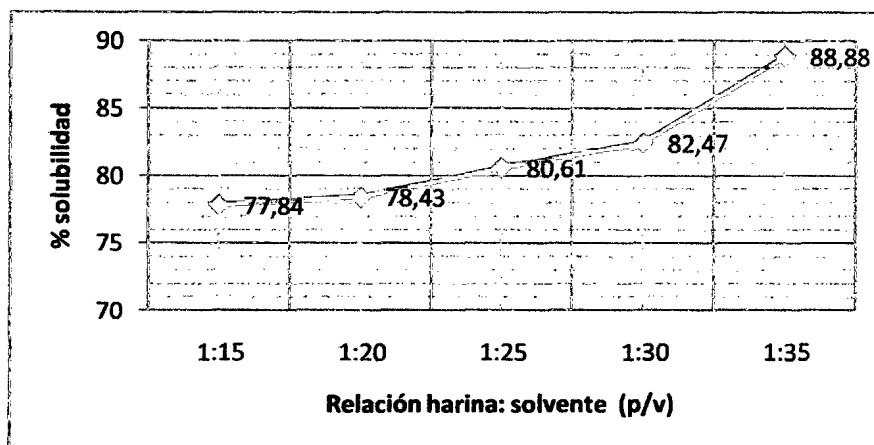


Figura 08: Influencia de la relación harina: solvente en el porcentaje de proteínas extraídas en nuez de marañón.

Fuente: Ventura *et al.*, (2005).

D. Efecto de la polaridad del disolvente

La polaridad (hidrofobicidad frente a un soluto) del disolvente disminuye cuando se le añaden sustancias menos polares que el agua como el etanol o la acetona. Con ello disminuye el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la molécula proteica, provocando la agregación y precipitación. Los disolventes orgánicos interaccionan con el interior hidrofóbico de las proteínas y desorganizan la estructura terciaria, provocando su desnaturalización y precipitación. La acción de los detergentes es similar a la de los disolventes orgánicos (Nelson y Cox, 2001).

E. Fuerza iónica

Un aumento de la fuerza iónica del medio (por adición de sulfato amónico, urea o hidrocloreuro de guanidinio, por ejemplo) también provoca una disminución en el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de la proteína, ya que estos solutos compiten por el agua y rompen los puentes de hidrógeno o las interacciones electrostáticas, de forma que las moléculas proteicas se agregan y precipitan. En muchos casos, la precipitación provocada por el aumento de la fuerza iónica es reversible. Mediante una simple diálisis se puede eliminar el exceso de soluto y recuperar tanto la estructura como la función original. A veces es una disminución en la fuerza iónica la que provoca la precipitación. Así, las proteínas que se disuelven en medios salinos pueden desnaturalizarse al dializarlas frente a agua destilada, y se renaturalizan cuando se restaura la fuerza iónica original (Nelson y Cox, 2001).

F. Recuperación de las proteínas por precipitación

En cuanto a la recuperación de la proteína solubilizada mediante la precipitación isoeléctrica, indica que el pH influye significativamente en la recuperación de las proteínas. Estadísticamente se indica que el pH de mínima solubilidad proteica es 4,5, no existiendo diferencias significativas a pH 4,7 que correspondería al punto isoeléctrico aparente de la mayoría de las proteínas. Al respecto, Sathe (1994) citado por Ventura *et al.*, (2005) determinó que el pH de mínima solubilidad de las proteínas de nuez de marañón es 5, sin embargo este valor varía de acuerdo a tipo de producto.

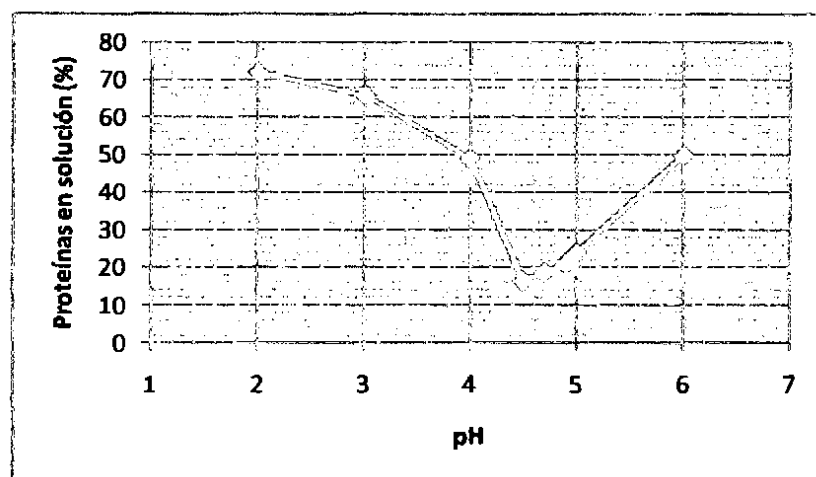


Figura 09: Influencia del pH en la precipitación isoelectrica para la recuperación del aislado proteico de nuez de marañón.

Fuente: Ventura *et al.*, (2005).

Fennema (2000), indica que el mínimo de solubilidad en las proximidades del punto isoelectrico se debe fundamentalmente a la ausencia de repulsión electrostática entre las proteínas, lo que promueve la agregación y precipitación vía interacciones hidrofóbicas. La acidificación del extracto proteico al pI (Punto isoelectrico) aparente precipita la mayor fracción proteica, pudiéndose perder en el líquido sobrenadante algunas proteínas tipo albúmina ricas en azufre que son solubles en el punto isoelectrico (Ventura *et al.*, 2005).

Por otro lado, en caso del arroz, se determina que efectivamente la solubilización de la proteína se debe llevar a cabo en un pH alcalino, siendo el pH en este caso de 12, y la recuperación de la proteína por precipitación acida es a pH 6. Esto puede deberse a las diferencias en la composición de la materia prima del que se extrae el aislado proteico (Pincirolí *et al.*, 2006). Del mismo modo, Cornejo, *et al.*, (2001) obtuvieron un aislado proteico a partir de ajonjolí (*Sesamum indicum*), obteniendo un 80% de proteína en el concentrado proteico,

el cual fue recuperada a un pH de 6. Sin embargo se demuestra que mediante procesos que implica tratamientos enzimáticos, se obtiene aislados proteicos provenientes de salvado de arroz de hasta 92% de proteínas (Wang *et al.*, 1999).

En caso de la soya, el aislado de proteína se produce con la extracción alcalina de la harina, a un rango de pH de 8 a 9. Los polisacáridos insolubles en agua y proteínas residuales son separados por tamizado, filtración o centrifugación. El extracto acuoso se acidifica a pH 4,5 con una disolución ácida, lo cual provoca la precipitación de las proteínas en su punto isoelectrico. Este “cuajo” de proteínas se filtra o se centrifuga, se lava con agua en abundancia y se seca por aspersión para obtener la forma isoelectrica de la proteína, que es insoluble en agua y prácticamente no tiene propiedades funcionales. Es más común redissolver el “cuajo”, neutralizando a un pH de 7,0; para obtener una disolución concentrada de proteinatos de sodio. Posteriormente, esta disolución es secada por aspersión, para producir una forma proteica fácilmente dispersable en agua (Liu, 1999, Miller *et al.*, 2001), Citado por (Munive, 2009).

2.2.5. Aplicaciones de aislados proteicos

Las proteínas de origen vegetal, principalmente por su menor costo de producción comparado con la proteína de origen animal, constituye, en forma de hidrolizado un excelente sustituto de esta última, como saborizantes de sopas, salsas, caldos, etc. Es preciso destacar que entre la composición de los extractos acuosos de carne y de los hidrolizados de proteína vegetal hay una gran similitud. La carne tiene una cierta cantidad de aminoácidos libres, de bajo peso molecular, todos ellos solubles en agua, similares a los formados por hidrólisis ácida de proteínas vegetales (Acuña, 2001)

Actualmente los aislados proteicos más extendidos son los de soja, ya que ofrecen ventajas económicas, nutricionales y funcionales manteniendo las cualidades sensoriales deseables necesarias para la aceptación por el consumidor. La mayoría de las aplicaciones tienen lugar en alimentos tradicionales que ya tienen establecidos una serie de parámetros de utilización y calidad. Para tener éxito en estos productos, los aislados deben mantener esta calidad, esto quiere decir igual o similar color, sabor, aroma, textura y composición química y nutricional, estos requerimientos exigidos por el consumidor determinan el grado de sustitución proteica.

La mejora de la nutrición es la razón primera para el uso de los aislados en carnes magras, fórmulas infantiles, bebidas nutritivas para adultos y suplementos proteicos. Así, en productos de carne magra proporcionan beneficios a personas con un alto nivel de colesterol y triglicéridos en sangre, ya que, además de disminuir el contenido en grasas del producto, las proteínas vegetales tienen efectos beneficiosos en la reducción de los niveles de colesterol (Sautier *et al.*, 1986 citado por Vioque *et al.*, 2001). Las fórmulas infantiles basadas en los aislados se elaboran para proporcionar una nutrición completa y las calorías especificadas a los niños alérgicos o que no pueden tomar leche de vaca, así como al resto de los niños. Las principales ventajas en las bebidas nutritivas para adultos son la flexibilidad de formulación y los efectos hipolipidémicos. Pero en cualquier caso, igual que con los alimentos tradicionales, los beneficios nutritivos tienen que ir acompañados con una calidad funcional adecuada para que sean aceptados por el consumidor.

La disponibilidad en grandes cantidades de fuentes proteicas vegetales como la harina desengrasada de oleaginosas, junto con la tendencia a reducir la ingesta de proteínas animales, hace que en los últimos años se esté produciendo un gran desarrollo en los procesos de extracción y mejora de estas proteínas vegetales para su uso en alimentación humana (Vioque *et al.*, 2001). En este sentido, en los próximos años se va a producir un incremento en la disponibilidad de nuevas fuentes proteicas vegetales y en la transformación de estas para su aplicación con fines alimenticios muy concretos conformes a las demandas del mercado en alimentación especializada (infantil o tratamiento clínico), del mismo modo es factible su uso en la tecnología de lácticos, cárnicos y panadería con la finalidad de proporcionar o mejorar las cualidades funcionales y también reducir los costos (Mondor *et al.*, 2004).

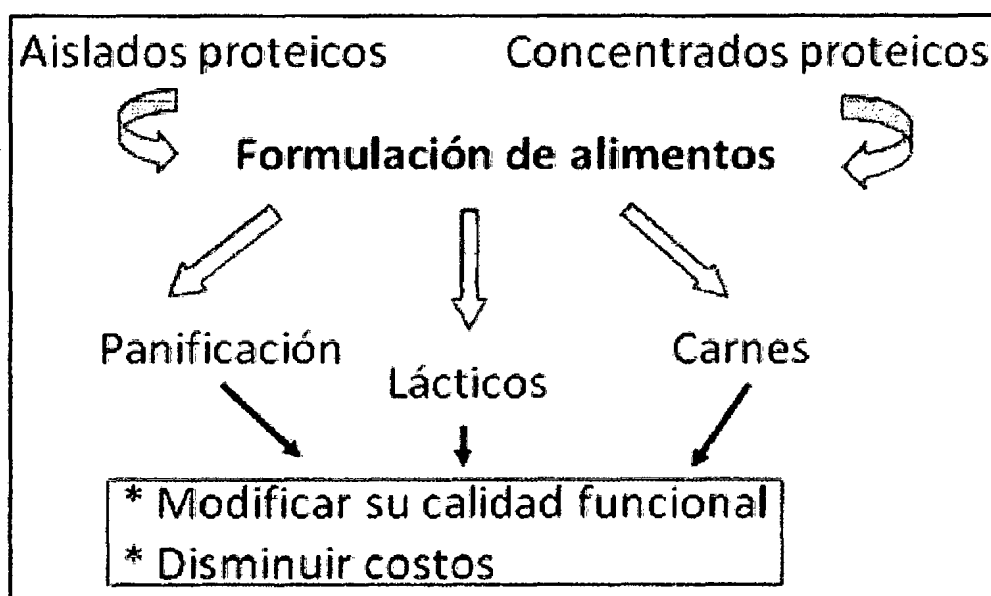


Figura 10: Usos de los concentrados y aislados proteicos

Fuente: (Mondor *et al.*, 2004).

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. TIEMPO Y ESPACIO

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Química, Operaciones unitarias y Microbiología de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, realizadas entre los meses de marzo y octubre del 2010. Por otro lado se han realizado análisis proximales de la harina de tarwi, soluciones muestreadas de la extracción alcalina y el aislado proteico final en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Químicas, Físicas y Matemáticas de la Universidad Nacional San Antonio Abad de Cusco.

3.2. MATERIA PRIMA

Las muestras de tarwi (*Lupinus mutabilis*), utilizadas para la investigación fueron recolectadas del centro poblado de Chaupiorcco del distrito de Santa María de Chicmo de la provincia de Andahuaylas, las cuales fueron obtenidas bajo el criterio de muestreo al azar de cultivos realizados en la fecha cronológica de siembra (octubre, noviembre), permitiendo que la muestra sea homogéneo en cuanto a sus características fisicoquímicas. La variedad muestreada es el lupino blanco (Tarwi blanco) por tener bajo contenido en alcaloide, tal como afirma Acuña, (2001).

3.3. MATERIALES Y REACTIVOS

3.3.1. Materiales y utensilios

- Termómetro con rango de medición -10 °C hasta 150 °C
- Vasos precipitados de 50; 100; 250 y 1000 mL
- Placas petri
- Pipetas graduadas de 2 y 5 y 10 ml
- Probetas volumétricas de 10; 50 y 100 mL
- Matraces Erlenmeyer de 150; 250 y 500 mL
- Fiolas de 50; 250 y 500 ml.
- Matraces de Kitasato de 1000 mL
- Baguetas, pinzas
- Crisoles de calcinación
- Desecador de muestras
- Balones de Kjeldahl de 100 mL
- Embudos de vidrio de vástago largo
- Embudo Buchner
- Tubos de ensayo de 5 y 10 mL
- Pendones cónicos de 15 mL (tubos para centrifuga)
- Recipientes de almacenamiento (tinas)
- Ollas de acero inoxidable
- Jarra de 2 litros

3.3.2. Reactivos

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) p.a
- Sulfato cúprico pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) p.a
- Sulfato de potasio (K_2SO_4) p.a

- Hidróxido de sodio (NaOH) p.a
- Indicador fenoftaleina (C₂OH₁₄O₄) p.a
- Indicador rojo de metilo
- Solución de Ácido sulfúrico 0,1 N
- Solución Acido clorhídrico 0,1 N
- Solución Hidróxido de sodio 0,1 N
- Etanol
- Agua destilada

3.3.3. Equipos

- Kjeldahl, marca: Velp Scientifica, modelo: UDK126D
- Mufla, marca: Barnstead Thermolyne, modelo: FB1410M, rango de temperatura de 0 – 1100 °C
- Estufa, marca: Memmert, modelo: 200-800, rango de 30 –250 °C
- Balanza analítica, marca Ohaus, con sensibilidad de 0,0001 g.
- Potenciómetro, marca: SCHOTT, modelo: Postfach 2480.D
- Bureta semiautomática
- Bomba de filtración al vacio
- Balanza eléctrica capacidad de 200 g
- Baño maría marca PRECISDIG
- Centrifuga, marca LW SCIENTIFIC

3.3.4. Maquinarias

- Molino de martillo, Dynamic; capacidad: 500 kg/h; velocidad: 3700 rpm; potencia: 8,5 hp

3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

La determinación de los componentes de la materia prima, se realizaron en base a las normas AOAC 1998 16th edition 4th revisión (Asociación de análisis químico), en algunos casos se han realizado algunas modificaciones según lo requerido. En las cuales se mencionan los procedimientos a seguir según el componente a ser determinado. Para más detalles véase el Apéndice I (métodos de análisis).

A. Determinación de humedad

Método de la AOAC. 925.10, basada en la pérdida de peso que sufre la muestra por calentamiento hasta obtener peso constante.

La fórmula para el cálculo es:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{(M - m)100}{M}$$

En la que:

M = Peso inicial en gramos de la muestra.

m = Peso en gramos del producto seco.

B. Determinación de Grasa

Método de la AOAC. 945.16, Extracción de la grasa con un solvente orgánico (Éter de petróleo) en un equipo Soxhlet.

$$\%G = \frac{100 * (P_1 - P_2)}{P}$$

En la que:

P₁ = Peso en gramos del matraz con el extracto etéreo.

P₂ = Peso en gramos del matraz vacío.

P = Peso en gramos de la muestra empleada.

C. Determinación de proteínas

La metodología empleada fue el método indirecto, El cual consiste en la destrucción orgánica por acción del ácido sulfúrico, obteniéndose como resultado sulfato de amonio, el cual después es destilado a amoníaco. Los cálculos se realizan en base a un patrón (muestra en blanco) y se cuantifica la diferencia gastada de titulante en la muestra (Referencia método AOAC. 960.52- Micro-Kjeldahl). La fórmula utilizada fue:

$$\%P = \frac{(Gb - G). N. 0,014. f. 100}{m}$$

Donde: Gb: Gasto en la muestra en blanco

G: Gasto en la muestra analizada

f: Factor de conversión (6,25)

N: Normalidad del hidróxido de titulación

D. Determinación de ceniza

Método de la AOAC 923.03, incineración de la muestra a 600 °C para quemar todo el material orgánico, al material inorgánico no destruido se le llama ceniza.

$$\%C = \frac{100 * (P_1 - P_2)}{P}$$

En la que:

P = Peso en g de la cápsula con la muestra.

P₁ = Peso en g de la cápsula con las cenizas.

P₂ = Peso en g de la cápsula vacía.

E. Determinación de fibra

Se aplicó el método de la AOAC. 962.09, consistente en la determinación del remanente luego de la eliminación de los carbohidratos solubles por hidrólisis a

compuestos más simples (azúcares) mediante la acción de los ácidos y álcalis débiles en caliente.

$$\%F = \frac{100 * (P_1 - P_2)}{P}$$

Siendo:

P= Peso inicial de la muestra.

P₁ = Peso del crisol conteniendo la muestra desecada.

P₂ = Peso del crisol conteniendo la muestra calcinada.

F. Determinación de Carbohidratos

La determinación de carbohidratos (C) fue obtenida por diferencia entre los demás componentes mediante la siguiente fórmula:

$C = 100 - (\text{Proteína} + \text{Grasa} + \text{Ceniza} + \text{Fibra} + \text{Agua})$, todos los componentes expresados en %. Sin embargo cabe recomendar el uso de métodos analíticos para su cuantificación.

3.5. DESLUPINIZACIÓN Y OBTENCIÓN DE HARINA

3.5.1. Deslupinización

Uno de los principales problemas que afronta el consumo del tarwi es la presencia de alcaloides que le da ese sabor amargo. Los alcaloides pueden ser tóxicos cuando es ingerido en exceso, por ello es de vital importancia realizar un desamargado para eliminar éstos componentes (Tapia *et al.*, 2006).

La eliminación de estas sustancias es de vital importancia, pues caso contrario el producto que se pretende obtener tendría contenidos de alcaloide, el cual es considerado toxico a niveles altos para consumo humano. El método

empleado para esta operación fue los procedimientos de deslupinizado propuestos por Mujica y Sven, (2006). Consistente en la aplicación del método denominado “CUSCO MEJORADO” con modificaciones mínimas, con este método se logra las menores pérdidas de proteína. El diagrama de flujo comprende las siguientes operaciones:

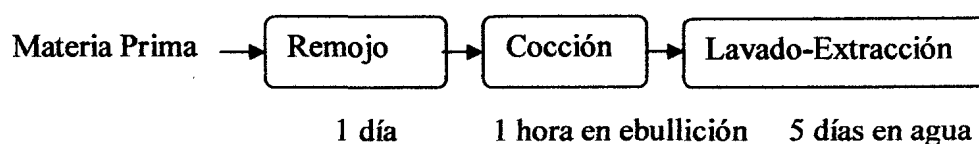


Figura 11: Diagrama de flujo de deslupinizado del tarwi.

3.5.1.1. Descripción del proceso de deslupinizado

Remojo: El tarwi muestreado, se procedió a remojar en agua por un periodo de 1 día, con la finalidad de ablandar la estructura del grano y facilitar la transferencia de calor en la cocción.

Cocción: En esta parte los granos de tarwi fueron sometidos a ebullición, por un periodo de tiempo de 1 hora (60 minutos), tal como se recomienda. Esta operación permite la ruptura de las estructuras facilitando la difusión de los alcaloides por la desnaturalización parcial de las proteínas (rotura de las estructuras complejas de la proteína) a las que están unidas.

Lavado: Una vez ya coccionado los granos de tarwi se procedió a lavarlos en un tanque con sustituciones sucesivas de agua, esto fue realizado por un periodo de 5 días, esto en función al amargor.

3.5.2. Secado

Comprende la deshidratación del tarwi desamargado, para su posterior transformación en harina, la cual es la materia prima para la extracción de las

proteínas en medio alcalino. La deshidratación se realizó en un secador de bandejas hasta una humedad próximo al 10% que permita la obtención de harina.

3.5.3. Molienda

Posteriormente se procedió a la molienda, utilizando un molino de martillos, cuya finalidad es facilitar el proceso de extracción proteica y separación de componentes no proteicos, por tanto incrementar el contenido de proteínas. La harina obtenida ingresó posteriormente a la etapa de desgrasado.

3.5.4. Desgrasado

Para la extracción alcalina es necesario que el producto a solubilizar tenga bajo contenido de grasas, motivo por el cual esta etapa comprende el desgrasado. La operación inició inmediatamente una vez desamargado, secado y realizado la molienda, la harina se disolvió con una solución de etanol al 95% en una relación de harina: solución de 1:3 con tres extracciones consecutivos durante 5 horas cada una, finalmente la harina semi-desgrasada se volvió a moler según sea necesario. Aun que es recomendable utilizar una prensa para extraer el aceite del tarwi inmediatamente después del desamargado, con la finalidad de reducir costos y posibles alteraciones químicas.

3.5.5. Análisis proximal de la harina de tarwi

El análisis proximal, se ha realizado según los métodos de la AOAC, tal como se ha realizado en el análisis proximal de la materia prima (Ver el punto de métodos de análisis 3.4).

3.6. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ALCALINA

La optimización consta de tres etapas, las cuales comprende el **Screening** (eliminación de las variables poco significativas), **escalamiento** (consistente en el acercamiento hacia la región óptima) y finalmente la **optimización final** (obtención de la región óptima y los puntos óptimos), (Ayala y Pardo, 1995).

Una de las técnicas más eficientes para la optimización de procesos es la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), la cual tiene como objetivo principal determinar las condiciones de operación óptima para un sistema, o determinar la región del espacio de los factores en la que se satisfacen las condiciones de operación (Dreyer, Coello y Montiel, 2000). Para este fin se siguió los procedimientos de optimización.

3.6.1. SCREENING

El criterio de optimización usado fue maximizar el porcentaje de proteínas en la etapa de extracción alcalina. En esta etapa se identificaron las variables que son significativas en la solubilidad proteica y el tenor proteico del aislado proteico, para luego seleccionar dos niveles por cada factor y someter a optimización mediante superficie de respuestas (Diseño compuesto central).

Se ha priorizado el estudio de los efectos individuales de los factores estudiados bajo el diseño completo al azar, se evaluó varios niveles por cada factor con las que se busca comprender su comportamiento para posteriormente evaluar las interacciones mediante un diseño factorial. El método aplicado fue tal como propone Guerreiro (1986), Citado por Ventura *et al.*, (2005). Dichas operaciones se muestran en el diagrama de flujo de la figura 12. La determinación

la proteína solubilizada en base a los parámetros evaluados, se ha realizado en base a la metodología de la AOAC. 960.52, Micro- Kjeldahl.

pH de extracción (PE): Debido a que la solubilización de proteínas es superior a pH alcalino (Linden y Lorient, 1996), se ajustó el pH de la solución según lo recomendado por Guerrero (1989) a valores de 3, 5, 7, 9 y 11 con HCl 0,1N y NaOH 0,1N según lo requerido. Se mantuvieron constantes la relación harina: solvente (1:20); temperatura 50 °C (Cheftel *et al.*, 1989), para ello se ha empleado un equipo de baño maría y se agitó continuamente la solución durante 30 minutos, según lo recomendado por Mustakas y Sohns (1976), quienes señalan que en este intervalo de tiempo el nitrógeno extraído aumenta constantemente. Luego la solución se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min, el nitrógeno solubilizado fue determinado por el método micro-Kjeldahl, tomando alícuotas de 2 mL del sobrenadante (por triplicado). Se elaboró una curva con los datos obtenidos, relacionando la cantidad de nitrógeno extraído, expresado como % de solubilidad en función del pH. El pH que permitió la mayor solubilidad de proteínas se usó para el proceso de optimización, sin embargo el uso de altos pHs pueden afectar las propiedades funcionales de las proteínas, incluso la estructura misma imposibilitando la renaturalización proteica (Linden y Lorient, 1996).

Relación harina y solvente (CH): Se trabajó con el pH definido en la sección anterior (pH=9), temperatura de 50°C y un tiempo de extracción de 30 min. Las relaciones harina: solvente analizadas fueron: 1:15, 1:20, 1:25, 1:30 y 1:35 según lo recomendado por Guerrero (1989); Ventura *et al.*, (2005).

Temperatura de extracción (TE): Para determinar el efecto de la temperatura sobre la cantidad de proteína extraída, se trabajó según lo

recomendado por Guerrero (1989); Ventura *et al.*, (2005), con temperaturas de 20, 30, 40, 50 y 60 °C, manteniéndose constante el pH de la solución del primer ensayo (pH=9), la relación harina: solvente (determinada en el ensayo anterior, CH=1:30) y el tiempo de extracción (30 minutos).

Todas las soluciones fueron centrifugadas a 4000 rpm por 20 min. El nitrógeno solubilizado fue determinado por el método micro-Kjeldahl, tomándose alícuotas de 2 mL del sobrenadante (por triplicado), expresándose como % de solubilidad (Ventura *et al.*, 2005). Los dos niveles de los factores que permitieron la mayor solubilidad fueron seleccionadas para el diseño factorial (2^k) de la primera etapa de optimización.

3.6.2. ESCALAMIENTO

Mediante la determinación de la significancia de la curvatura en la etapa de Screening se evaluó si se requiere realizar la etapa de escalamiento, que consiste en escalar sucesivamente hacia la región óptima (mediante pendientes ascendentes), hasta llegar a ubicar el rango de niveles que encierra dicha región (Ayala y Pardo, 1995).

3.6.3. OPTIMIZACIÓN FINAL

El arreglo del experimento bajo el **diseño compuesto central rotatable**, fue generado en STATISTICA V 8.0 tomando dos niveles (inferior y superior) por cada factor seleccionado en la etapa de Screening. Este tipo de experimento para optimización empieza con un diseño factorial estándar con dos niveles y se agrega dos corridas adicionales para cada factor. Las corridas adicionales, llamadas puntos estrella, son localizadas en distancias pequeñas iguales por debajo y encima del punto central, esto permite la estimación de la curvatura con

respecto a tal factor. Mientras cada factor se empieza variándose, los otros factores son fijados en sus valores centrales (Ayala y pardo, 1995). Dicho arreglo fue aleatorizado con la finalidad de reducir el efecto de variables ocultas como tendencias sobre el tiempo entre otros y garantizar la validez estadística de los resultados, considerando una probabilidad de error tipo I de 0,05 (Muñoz, Camargo y Gallego, 2008). El diseño tiene las características de ser rotatable ya que la varianza de la respuesta predicha en cualquier punto depende solo de la distancia del punto al centro del diseño y no de la dirección, teniendo la misma precisión de estimación en todas las direcciones (Fernández y Piñeiro, 2002).

El arreglo de experimentos generados por el programa, representa la secuencia de experimentos a ejecutar bajo los valores mostrados. El número de corridas se ha calculado con la siguiente fórmula:

$$N = 2^k + 2k + n_0$$

Donde: k es numero de factores, n_0 número de puntos centrales y N es el número de corridas.

Un diseño compuesto central consta de puntos factoriales 2^k completo o fraccional, en el que los niveles están en forma codificada (± 1) o en forma natural (tomando el nivel inferior y superior del factor); n_0 (≥ 1) puntos centrales (que son necesarios para hallar la variancia del error experimental) y los puntos axiales, dos puntos axiales en los ejes correspondientes a cada uno de los factores, situados a una distancia $\alpha = \pm(2^k)^{1/4}$ del centro del diseño, el cual es importante para asegurar la rotabilidad de diseño y mostrar la superficie de respuestas (Fernández y Piñeiro, 2002; Montgomery, 2005).

La optimización por el diseño compuesto central permite la obtención de un modelo matemático empírico que explica el fenómeno, dicho modelo depende de los valores estadísticos que demuestren la linealidad o la curvatura.

Un modelo de primer orden (Lineal) sin interacciones o productos cruzados:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon$$

El modelo lineal de primer orden con interacciones:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{j=2}^k \sum_{i=1}^{j-1} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Y el modelo cuadrático o de segundo orden:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{j=2}^k \sum_{i=1}^{j-1} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \varepsilon$$

Donde ε representa el ruido o error observado en la respuesta. Esta ecuación explica en gran medida el fenómeno que ocurre, se incorpora un parámetro de curvatura y interacciones entre las variables, por lo que la predicción es más cercano al dato real (Muñoz, Camargo y Gallego, 2008).

En la mayoría de los casos la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes se desconoce. Por ello, el primer paso en la MSR consiste en determinar una aproximación apropiada a la relación funcional real entre la respuesta y el conjunto de variables independientes, guiando al experimentador rápida y eficientemente a la cercanía del punto óptimo; hasta finalmente localizarlo (Montgomery, 2005).

La ventaja de este diseño es la evaluación de los efectos individuales y los efectos combinados en la variable de respuesta, las replicas en los puntos

centrales de diseño permite evitar la linealidad, puesto que en los diseños factoriales no se cumple tal linealidad perfecta y los modelos no se ajustan adecuadamente (Blanes *et al.*, 2006; Milde *et al.*, 2009).

En todas las etapas de optimización, se ha utilizado el método Micro-Kjeldahl para la determinación de la proteína solubilizada. Para expresarlo en relación al contenido proteico total y la cantidad porcentual de proteína solubilizada se ha utilizado la siguiente fórmula (Ferreyra *et al.*, 2007).

$$\text{Solubilidad} = \frac{\text{Prot. sobrenadante (g)}}{\text{Prot. total (g)}} 100$$

3.7. OBTENCIÓN DEL AISLADO PROTEICO

El aislado fue obtenido por el método estándar consistente en la solubilización alcalina (bajo los parámetros óptimos de extracción alcalina) y precipitación isoelectrica mediante el ajuste de pH hasta el punto isoelectrico (pH= 4,5 en el cual la solubilidad proteica es mínima). En el punto isoelectrico la carga eléctrica neta de las proteínas es cero haciendo que la solubilidad proteica sea minimizada y genere la precipitación (Linden y Lorient, 1996).

El procedimiento general para la obtención del aislado proteico se muestra diagrama de flujo de la figura 12.

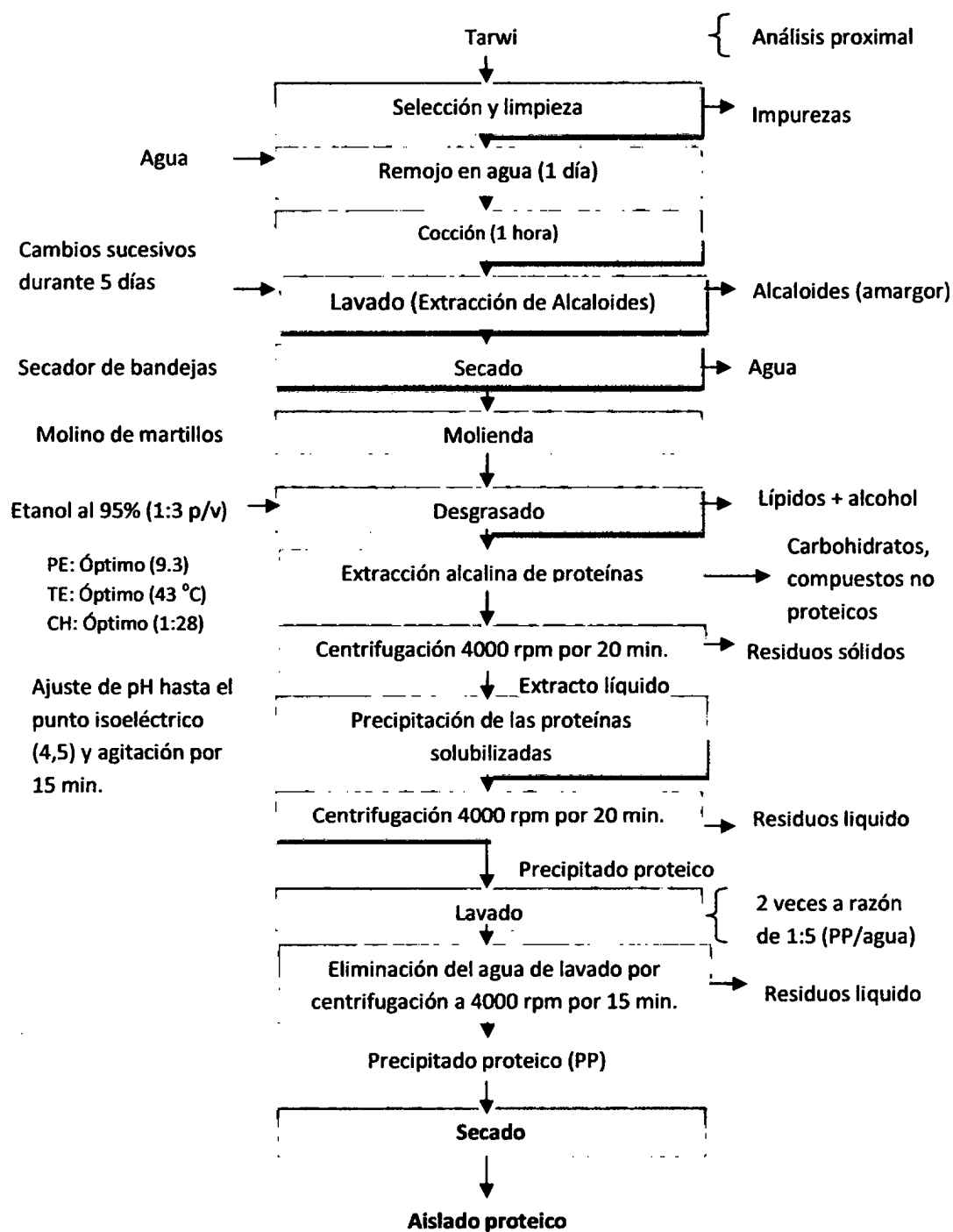


Figura 12: Diagrama de flujo general para la obtención de aislado proteico

Adaptado de: Ventura *et al.*, (2005).

*Es preciso aclarar que se recomienda el desgrasado por prensado para evitar posibles alteraciones químicas durante el desgrasado con etanol.

3.8. ANÁLISIS PROXIMAL DEL AISLADO

Teniendo los parámetros óptimos de extracción alcalina, se ha obtenido un aislado proteico de tarwi en base a los puntos óptimos encontrados en la optimización y siguiendo el diagrama de flujo de la figura 12, el insumo obtenido se ha sometido al análisis proximal, siendo importante la determinación del contenido de proteínas y demás componentes del aislado proteico. Los métodos usados se han explicado en el punto 3.4.

3.9. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL AISLADO

Se realizaron los análisis funcionales del aislado obtenido bajo los parámetros óptimos establecidos mediante superficie de respuesta, dichas propiedades son muy importantes para el uso en la tecnología de alimentos (Fennema, 2000). Las propiedades funcionales están relacionadas a la composición de los aminoácidos y a su secuencia (estructura primaria) como también a la configuración espacial de la molécula proteica y a las fuerzas intermoleculares (estructuras secundarias y terciarias) los cuales cumplen funciones especiales para el comportamiento bioquímico (Murray, 2005).

3.9.1. Absorción de agua

Método de centrifugación de Janicki y Walczac (1954) citado por Feming *et al.*, (1974). El método consistió en preparar una dispersión al 10% (en base seca) en agua y centrifugando a 2500 rpm por 15 min. Se midió el volumen de agua suelta, entonces la retención de agua fue computada como agua absorbida (ml de agua absorbida/gr. de proteína).

$$\text{Absorción de agua (\%)} = \frac{\text{Peso agua Absorbida (g)}}{\text{Peso muestra seca (g)}} \times 100$$

3.9.2. Absorción de grasa

Método descrito por Lin y Humbert (1974). Se adiciona 0,5 gr. de muestra a 3 mL de aceite (de preferencia aceite de maíz, en este caso se usó aceite vegetal comercial), es decir en relación de 1:6 p/v en un tubo de centrifuga graduada. El contenido fue removido por 1 minuto con un alambre delgado para dispersar la muestra en el aceite, después de un período de reposo de 30 min., el tubo se lo centrifugó a 3200 rpm por 25 min. La absorción de aceite se expresó en porcentaje como la cantidad de aceite absorbido/100 gr de muestra.

$$\text{Absorcion de aceite (\%)} = \frac{\text{Peso aceite Absorvida (g)}}{\text{Peso muestra seca (g)}} \times 100$$

3.9.3. Capacidad de formación y estabilidad de espuma

El método fue desarrollado por Lin y Humbert (1974), la cual consiste en pesar 6 g de muestra con humedad de 14% y ponerlo a un recipiente con 200 mL de agua destilada, en seguida de procedió a batirlo con una batidora durante 6 minutos, se tomaron datos antes y después del batido. El porcentaje del volumen debido al batido fue calculado por la formula que se muestra. Luego de medir el volumen total del batido, se tomó nota del volumen de la espuma del recipiente para estudios de estabilidad de espuma a 1, 10, 20, 60 y 90 minutos.

$$\text{Incremento Vol. (\%)} = \frac{\text{VDB} - \text{VAB}}{\text{VAB}} \times 100$$

Donde: VDB: Volumen después del batido
VAB: Volumen antes del batido.

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se evaluó estadísticamente los resultados obtenidos usando la media aritmética y la desviación estándar. Asimismo, se efectuó análisis de varianza, con un nivel de confianza del 95% para determinar si existen diferencias significativas entre los distintos factores. Para concluir si existen diferencias significativas entre los niveles de los factores mencionados anteriormente y determinar cuál de estos niveles es el que nos brinda los mejores resultados, se usó la Prueba de Duncan de Comparación de Promedios.

En la etapa de escalamiento y optimización, los resultados obtenidos de pH, temperaturas y relaciones harina: solvente estudiados, fueron analizados con el programa Statística V. 8.0 y MS- Excel, al igual que para el ANOVA del diseño de superficie de respuesta en la etapa de optimización.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. ANÁLISIS PROXIMAL DEL TARWI

El análisis proximal del tarwi fue realizado utilizando el grano molido sin deslupinizar ni desgrasar, se aprecia claramente su alto contenido de proteínas y grasas, del mismo modo destaca el elevado contenido de los carbohidratos.

Cuadro 15: Composición proximal de los granos de tarwi

Componentes	%*
Humedad	8,46±0,21
Lípidos	16,83±0,17
Proteínas	43,31±0,33
Ceniza	3,30±0,07
Fibra	6,93±0,05
Carbohidratos	21,17±0,10

* Media ±Desviación estándar; n=3

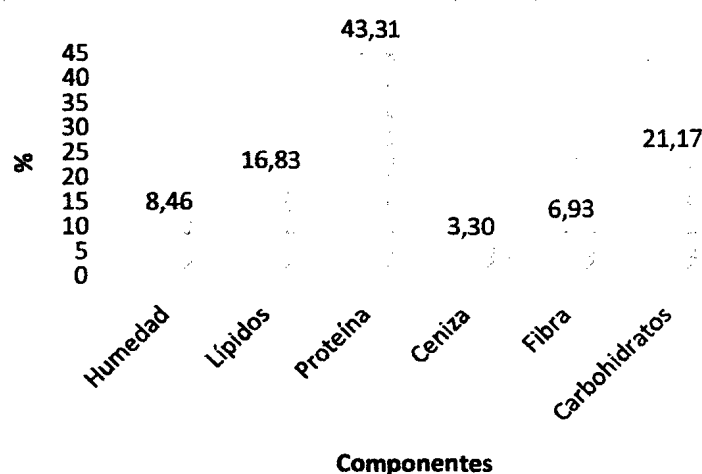


Figura 13: Gráfica del análisis proximal del tarwi

Según los datos mostrados, el contenido proteico y lípidos del tarwi es de 43,31 y 16,83% respectivamente, así mismo Babaoúlu, (2000), encontró valores similares en la composición del tarwi, siendo el contenido de proteínas de 45% y de 16% en grasas, esto es superior en comparación de la soya que contiene 36%

de proteína y 18% de grasas. Por otro lado, Ortega *et al.*, (2009), realizaron el análisis proximal para todos los componentes, siendo los componentes determinados la humedad, grasa y proteínas, resultando 9,63; 13,91 y 44,86% respectivamente. Sin embargo en cuanto al contenido de grasa, los resultados difieren significativamente con los datos obtenidos en la investigación posiblemente debido a las condiciones climáticas y manejo agronómico que se haya proporcionado al cultivo.

4.2. ANÁLISIS PROXIMAL DE LA HARINA DE TARWI

La harina obtenida por molienda, fue primeramente deslupinizado, descascarado y desgrasada. Dicha harina fue muestreada para los análisis proximales respectivos, siendo los resultados como sigue:

Cuadro 16: Análisis proximal de la harina deslupinizado y semi-desgrasada de tarwi

Componentes (BH)	% (HTDD)*	% (HTTDD) ^a
Humedad	10,25±0,03	11,5
Lípidos	3,23±0,04	2,8
Proteína	49,87±0,26	48,3
Ceniza	4,53±0,1	5,5
Fibra	4,22±0,04	4,3
Carbohidratos	27,90±0,14	26,6

* Media ± Desviación estándar; n=3

BH: Análisis en base húmeda

HTDD: Harina de tarwi deslupinizado y semi-desgrasada

HTTDD: Harina de torta de tarwi deslupinizado y semi-desgrasada (Rodríguez, 1981).



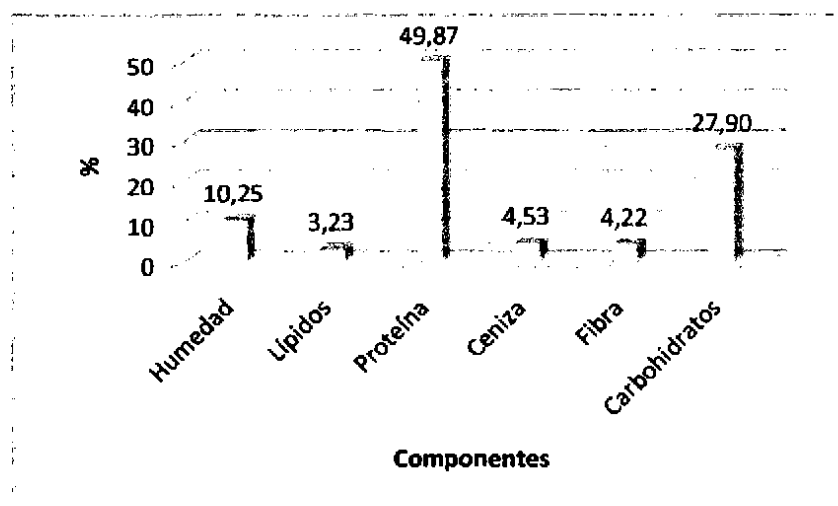


Figura 14: Grafica del análisis proximal de la harina de tarwi

La harina deslupinizada y semi- desgrasada contiene aproximadamente el 50% de proteínas y bajo contenido en lípidos, estos datos no difieren significativamente de los reportados por otros investigadores. El tarwi tiene un alto contenido de proteínas que comprende de 35 a 50%, mientras en la harina desgrasada y sin alcaloides el contenido de proteínas es muy elevado, 47-64% (León y Rosell, 2007). Por otro lado (Rodríguez, 1981) encontró para harina de tarwi parcialmente desgrasada una humedad, grasa y proteína de 11,5; 2,8; 48,3 respectivamente. Sin embargo en esta investigación se han encontrado valores muy similares, no habiendo diferencia significativa, la humedad resultó 10,25%, los lípidos y proteína fueron 3,23 y 49,87% respectivamente.

4.3. OPTIMIZACIÓN EN LA EXTRACCIÓN ALCALINA

4.3.1. SCREENING

A. Solubilidad proteica en función al pH de extracción (PE)

La solubilidad proteica está fuertemente influenciada por el pH, puesto que el incremento controlado de pH provoca la solubilidad proteica hasta cierto valor, por el contrario los bajos pH reducen la solubilidad proteica en la solución

(Linden y Lorient, 1994). En este caso se ha mantenido constante la temperatura, relación de harina: solvente y el tiempo. La finalidad es evaluar la influencia de un solo factor en la solubilidad proteica, en este caso el efecto del pH.

Cuadro 17: Efecto del pH de extracción (PE) en la solubilidad proteica

pH de extracción	% de solubilidad*
3	22,84 ^b ±0,08
5	20,11 ^a ±0,15
7	72,41 ^c ±0,21
9	84,87 ^d ±0,05
11	91,41 ^e ±0,42

* Media ± Desviación estándar; n=3

**Letras diferentes indican diferencias significativas

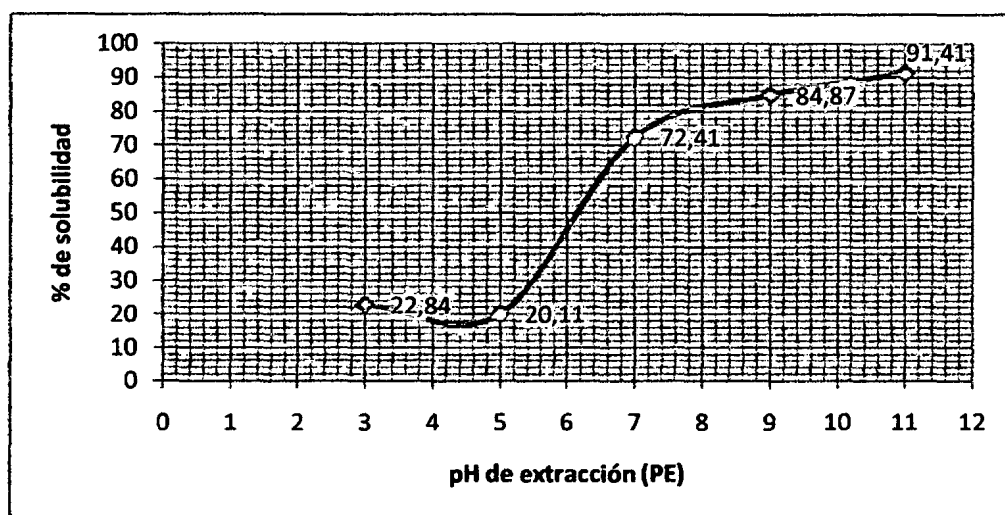


Figura 15: Curva de solubilidad de las proteínas de tarwi (Evaluadas a 50 °C, harina: Solvente=1:20, tiempo de agitación=30 min.).

Cuadro 18: ANOVA del pH de extracción (PE)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	14151,1	4	3537,78	69714,47	0,0000
Intra grupos	0,507	10	0,0507		
Total (Corr.)	14151,6	14			

GL: Grados de libertad

Aparentemente se incrementa la solubilidad en función al pH, sin embargo cuanto mayor sea la alcalinidad, las propiedades funcionales inician a perderse, por otro lado la recuperación de las proteínas solubilizadas decrece (Rodríguez, 1981). El valor de pH adecuado para obtener aislado proteico esta en rango de 8-11, los cuales fueron evaluados mediante diseño compuesto central para optimizar por superficie de respuestas (Milde *et al.*, 2009).

En la obtención de concentrado de colza, un pH de 12 ajustada con NaOH fue considerada como adecuado para la solubilización proteica, siendo evidente la máxima solubilidad a este valor (Gonçalves *et al.*, 1997). Sin embargo Bejarano (2008), evaluó las propiedades funcionales del aislado obtenido de (*Amaranthus sp*), para el cual utilizó la extracción alcalina a pH 9,0 para evitar posibles alteración en los aminoácidos debido a condiciones extremas de alcalinidad. Así mismo, para la obtención de aislado proteico de (*Lupinus mutabilis sweet*), Jayasena *et al.*, (2010), evaluaron los parámetros de extracción alcalina, identificando que la máxima solubilidad de proteínas ocurre a pH alrededor de 9. Estos valores no difieren significativamente con los obtenidos en esta investigación, a excepción del pH utilizado para colza debido a la naturaleza de las materias primas.

B. Efecto de la relación harina: solvente (CH) en la solubilidad

La cantidad de harina añadida a la solución es muy influyente, el cual incluso depende del porcentaje y tipo de proteínas de la harina. En este estudio se ha puesto constante el pH evaluado en el ensayo anterior (pH=9), de igual modo la temperatura y el tiempo (Ventura *et al.*, 2005).

Cuadro 19: Influencia de la relación harina: solvente (CH) en la solubilidad

Relación harina: solvente (CH)	% solubilidad*
1:15	77,84 ^a ±0,09
1:20	78,43 ^b ±0,15
1:25	80,61 ^c ±0,21
1:30	82,47 ^d ±0,05
1:35	88,88 ^e ±0,42

* Media ±Desviación estándar; n=3

**Letras diferentes indican diferencias significativas

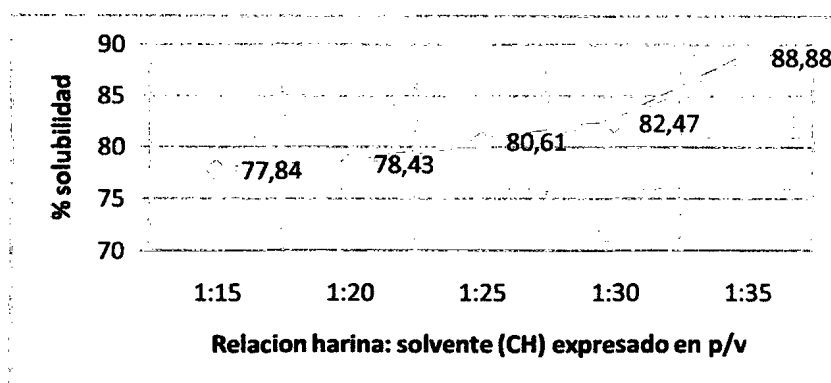


Figura 16: Curva de solubilidad de las proteínas de tarwi (Evaluadas a 50 °C, pH=9, tiempo de agitación=30 min.).

Cuadro 20: ANOVA de la relación harina: solvente (CH)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	236,79	4	59,198	826,33	0,0000
Intra grupos	0,716	10	0,071		
Total (Corr.)	237,51	14			

Se aprecia que a una relación de 1:35 la solubilidad proteica se acrecienta, sin embargo cabe señalar que los efectos combinados de los factores podrían cambiar esta tendencia. Ventura *et al.* (2005), determinaron que se logra buena solubilidad proteica a relaciones harina: solvente de 1:15 que permite la máxima extracción de proteínas a partir de nuez de marañón. Sin embargo para la obtención de aislado proteico de tarwi (*Lupinus mutabilis sweet*), Jayasena *et al.*, (2010), determinaron que la relación de harina: solvente 1:10 es lo adecuado, este valor difiere de datos obtenidos por Pedroche *et al.*, (2004), quienes concluyeron

que la relación 1:20 permite la máxima solubilidad proteica en colza (*Brassica napus*). Los valores mostrados tienen diferencias significativas con la relación de harina: solvente encontrado en esta investigación, esto es debido a que las materias primas y por tanto la composición y contenido proteico difiere.

C. Influencia de la temperatura (TE) en la solubilidad proteica

La temperatura influye enormemente en la solubilidad proteica, puesto que a temperaturas superiores a 25 °C se incrementa la solubilidad, sin embargo temperaturas superiores a 50 °C podrían ser perjudiciales para las proteínas, ocasionando la pérdida de sus propiedades y su capacidad de renaturalización, esto dependiendo de la estructura y composición aminoacídica de la proteína.

Cuadro 21: Efecto de temperatura de extracción (TE) en la solubilidad proteica

Temperatura de extracción (TE), °C	%*
20	81,44 ^b ±0,22
30	83,06 ^c ±0,19
40	84,24 ^d ±0,28
50	88,43 ^e ±0,40
60	80,29 ^a ±0,52

* Media ±Desviación estándar; n=3

**Letras diferentes indican diferencias significativas

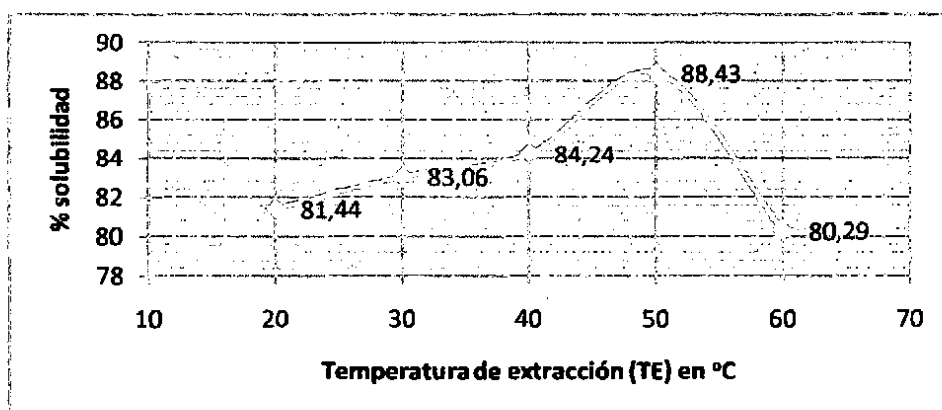


Figura 17: Curva de solubilidad de las proteínas de tarwi (Evaluadas a pH=9, harina: Solvente=1:30, tiempo de agitación=30 min.).

Cuadro 22: ANOVA de la temperatura de extracción (TE)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	118,682	4	29,67	248,36	0,0000
Intra grupos	1,194	10	0,119		
Total (Corr.)	119,876	14			

Gl: Grados de libertad

Según la gráfica anterior, la solubilidad proteica se incrementa a valores alrededor de 50 °C, sin embargo es de suma importancia la conservación de las propiedades funcionales, los cuales suelen perderse a valores superiores a los 50°C debido a la desnaturalización de algunas proteínas (Fennema, 2000). Por tal motivo, se evaluó las temperaturas óptimas que permitieron la mayor solubilidad, dichos valores fueron 30 y 50 °C, es decir que el valor óptimo debe hallarse en este rango de temperaturas. Sin embargo Bejarano (2008), realizó la extracción alcalina a 50 °C no reportando efectos negativos en la proteína extraída, así mismo Iranian (1981), utilizó NaOH al 0,2% para solubilizar las proteínas de Castor Bean (*Ricinus communis*), a 45 °C en la que la solubilidad proteica fue la máxima. No obstante Lqari *et al.*, (2001) recomienda realizar la extracción alcalina a 50°C. Los valores de temperatura en la que la solubilidad proteica es mayor, coincide con los reportados por los investigadores, siempre que se tenga en cuenta la naturaleza y tipo de materia prima.

Los resultados mostrados anteriormente son de los efectos individuales realizados bajo el diseño completo al azar con la finalidad de evaluar la curva de solubilidad proteica, sin embargo el análisis de efectos individuales e interacciones bajo el diseño factorial 2^k ($k=3$) se muestra en el ANEXO 2, del mismo modo se muestra las superficies y el modelo correspondiente a la etapa de Screening.

4.3.2. ESCALAMIENTO

Debido a que el análisis de varianza en la etapa del Screening comprobó un efecto curvatura muy significativo y el modelo de primer orden se ajustó adecuadamente a los datos experimentales, la necesidad de profundizar el análisis de esta etapa no fue requerido, por otro lado fue posible localizar el rango de niveles para cada factor en la que la solubilidad proteica es mayor. Las regiones cercanas a las óptimas (que encierra las regiones y puntos óptimos), según los análisis en la etapa anterior fueron para pH de 8 a 11, temperatura de 30 a 50°C y relación de harina: solvente de 1:20 hasta 1:35, sin embargo estos rangos fueron ajustados y optimizados en la siguiente etapa de la optimización.

4.3.3. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS

Según los estudios realizados en los ensayos anteriores, cada factor incide de manera distinta en la solubilidad proteica, sin embargo los efectos de la interacción de los factores tiene influencia muy significativa en la cantidad de proteína recuperada. Se tomó los 3 factores significativos determinados en la etapa de Screening y 2 niveles de cada uno.

Cuadro 23: Valores que fueron evaluados en la optimización mediante superficie de respuestas, bajo un diseño compuesto central rotatable.

Factores	Variables naturales			Variables codificadas		
	inferior (-1)	central (0)	superior (+1)	inferior	central	superior
pH (PE)	8	9,5	11	-1	0	+1
Harina: Solvente (CH)	1:20	1:27,5	1:35	-1	0	+1
Temperatura (TE)	30	40	50	-1	0	+1

El número de corridas se calculó con la siguiente fórmula, en la que $k=3$ y $n_0=3$.

$$N = 2^k + 2k + n_0$$

Resumiendo: 8 experimentos principales, 6 puntos axiales y 2 puntos centrales. Con los cuales el número de corridas resulta 16. De igual modo se convirtió las variables codificadas a las variables naturales mediante la fórmula mostrada en la metodología. El cuadro siguiente muestra el plan de experimentación a seguir para lograr la optimización.

Cuadro 24: Plan de experimentos para la optimización y el resultado de cada corrida en base al contenido proteico del aislado.

N°	Variables codificadas			% Proteínas
	PE (x)	CH (y)	TE (z)	
1	-1	-1	-1	87,76
2	+1	-1	-1	89,95
3	-1	+1	-1	89,18
4	+1	+1	-1	88,45
5	-1	-1	+1	91,53
6	+1	-1	+1	90,34
7	-1	+1	+1	91,21
8	+1	+1	+1	90,93
9	-1,682	0	0	85,83
10	1,682	0	0	85,06
11	0	-1,682	0	84,15
12	0	1,682	0	85,48
13	0	0	-1,682	83,18
14	0	0	1,682	84,82
15	0	0	0	92,61
16	0	0	0	91,75

Donde:

PE: pH de extracción alcalina; CH: Relación harina: solvente (p/v); TE: Temperatura de extracción alcalina (°C)

El análisis de la varianza expresa la variabilidad en la respuesta para cada uno de los efectos por comparación del cuadrado de la media y el error experimental estimado. Los resultados del ANOVA, mostraron que los efectos de los factores por individual y con interacción, no tienen mucha significancia ($p < 0,05$), por lo que el modelo obtenido explica el fenómeno adecuadamente.

Cuadro 25: ANOVA de proteínas para un nivel de confianza del 95%.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:PE	0,125	1	0,125	0,010	0,935
B:CH	0,431	1	0,431	0,020	0,880
C:TE	9,563	1	9,563	0,550	0,486
AA	10,666	1	10,666	0,610	0,463
AB	0,505	1	0,505	0,030	0,870
AC	1,073	1	1,073	0,060	0,812
BB	15,554	1	15,554	0,890	0,381
BC	0,015	1	0,015	0,000	0,977
CC	23,241	1	23,241	1,340	0,292
Error total	104,344	6	17,391		
Total (corr.)	144,347	15			

GL: Grados de libertad

El siguiente paso consiste en la determinación de la región y puntos óptimos, para el cual se han establecido gráficas optimizadas mediante superficie de respuestas del diseño compuesto central, posteriormente se han localizado los puntos óptimos para cada factor, bajo un criterio de maximización del contenido proteico.

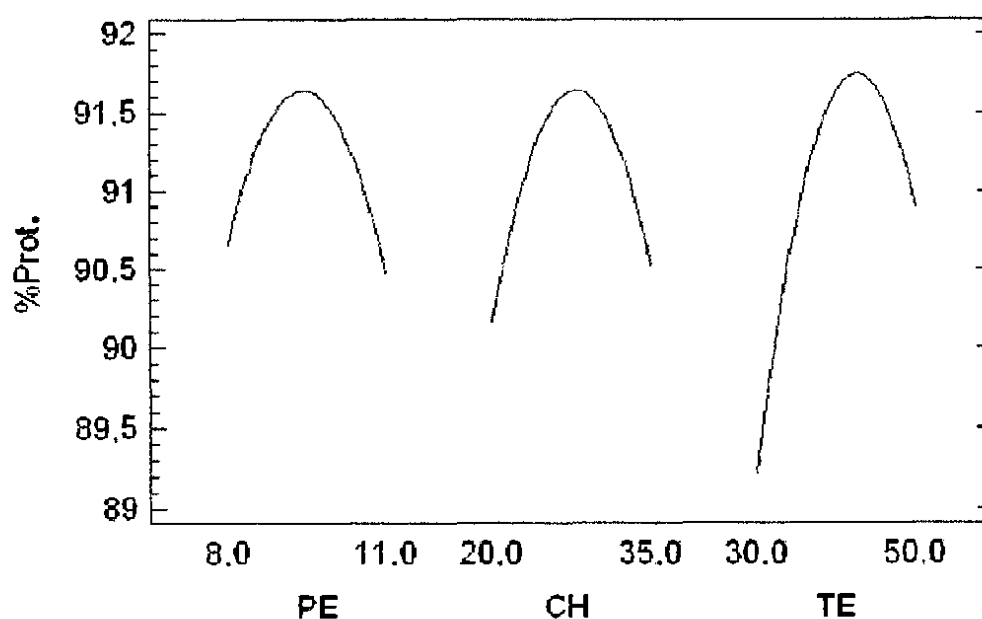


Figura 18: Gráfica de efectos principales

Superficie de respuesta para % de proteínas en función al PE y CH evaluados a 40 °C.

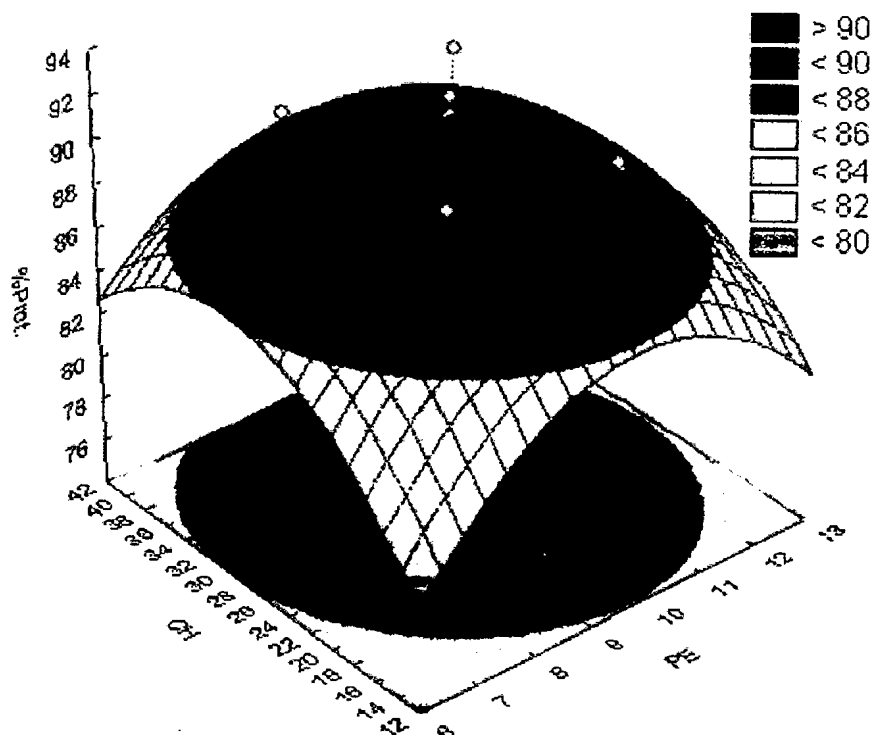


Figura 19: Superficie de respuesta tridimensional, PE y CH

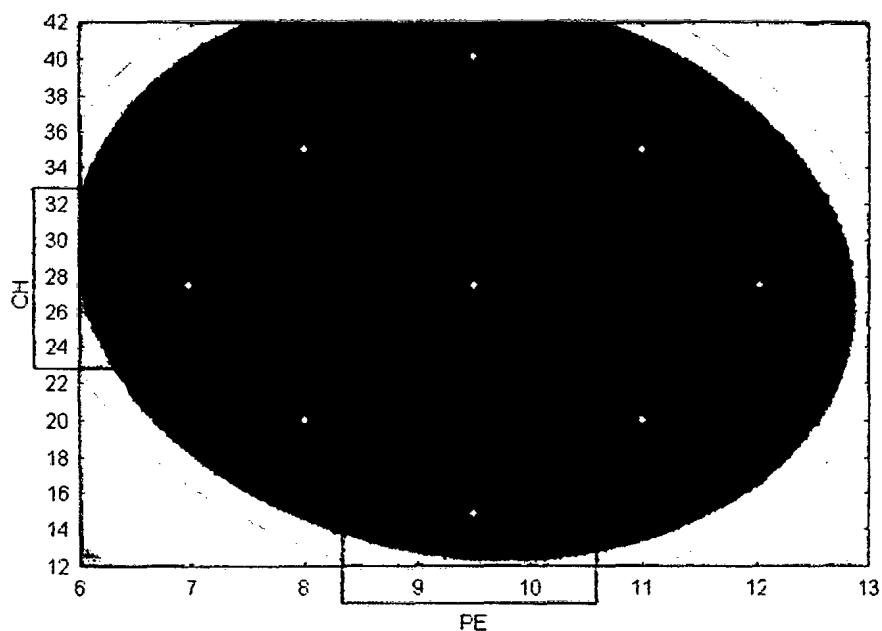


Figura 20: Superficie de respuesta, vista superior, PE y CH

Modelo matemático (Cuando Z=40):

$$\%Prot = -12,028 + 10,588X - 0,476X^2 + 1,479Y - 0,023Y^2 - 0,0223XY - 0,0244ZX + 0,00058ZY + 37,33$$

Superficie de respuesta para % de proteínas en función al PE y TE evaluados a CH=27,5

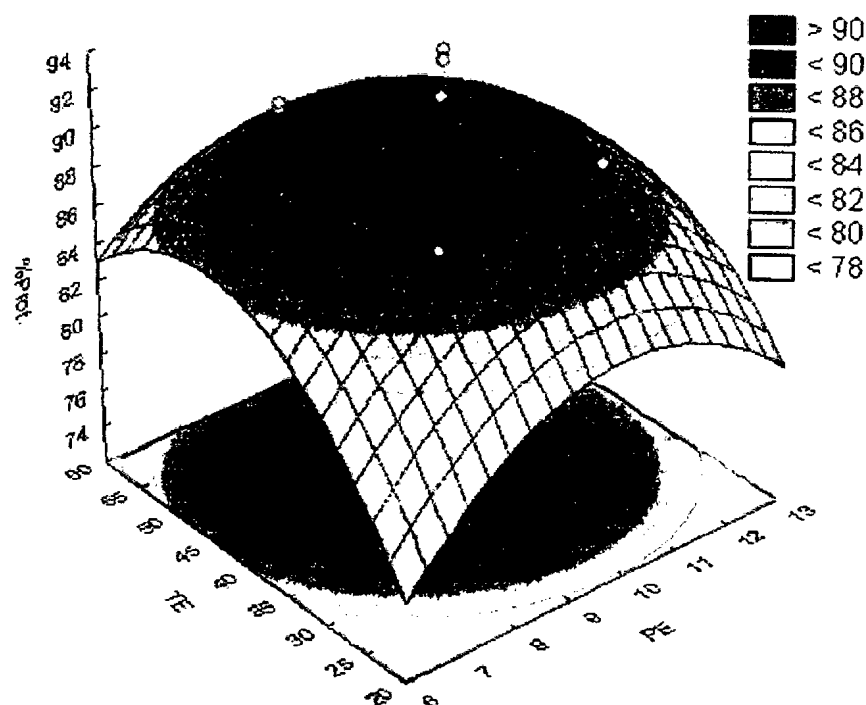


Figura 21: Superficie de respuesta tridimensional TE vs PE

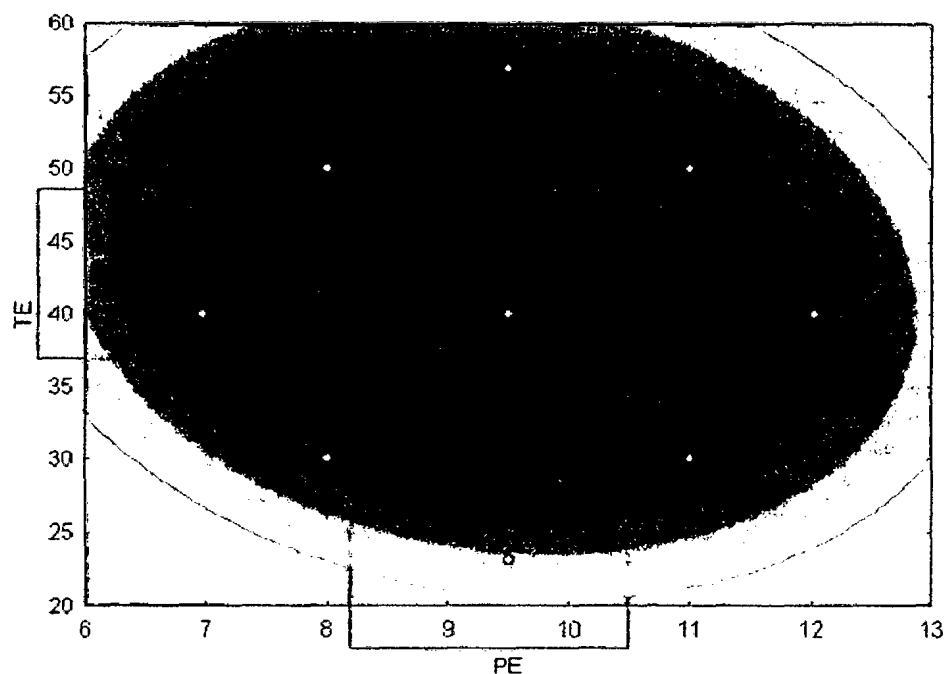


Figura 22: Superficie de respuesta, vista superior TE vs PE

Modelo matemático (Cuando Y=27,5):

$$\%Prot = -12,028 + 10,58X - 0,477X^2 + 1,567Z - 0,0158Z^2 - 0,0223XY - 0,024XZ + 0,00058YZ + 23,26$$

Superficie de respuesta para % de proteínas en función TE y CH evaluados a PE=9,5

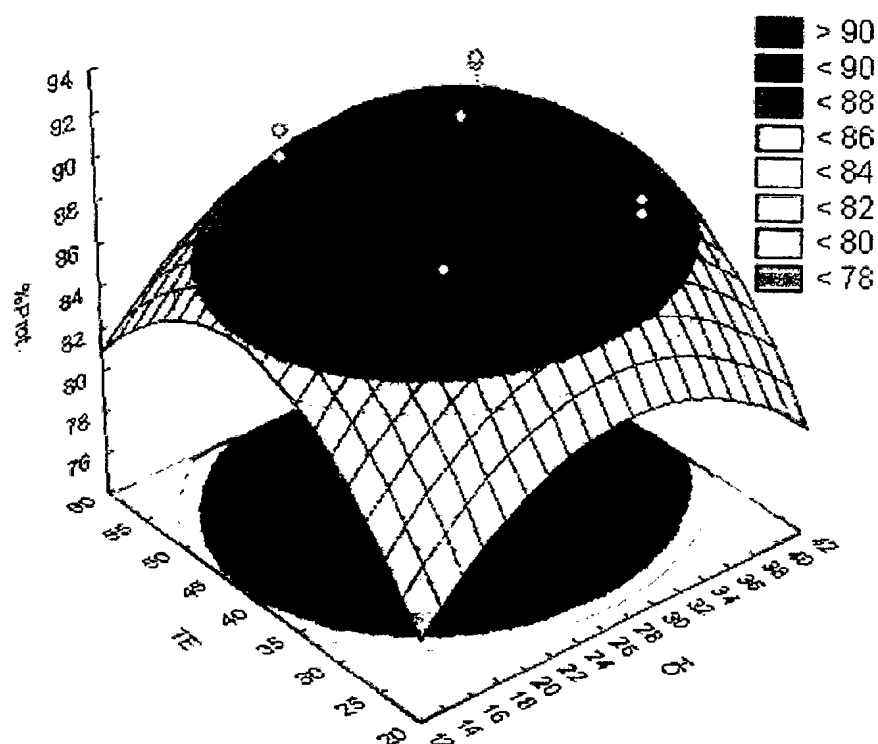


Figura 23: Superficie de respuesta tridimensional TE vs CH

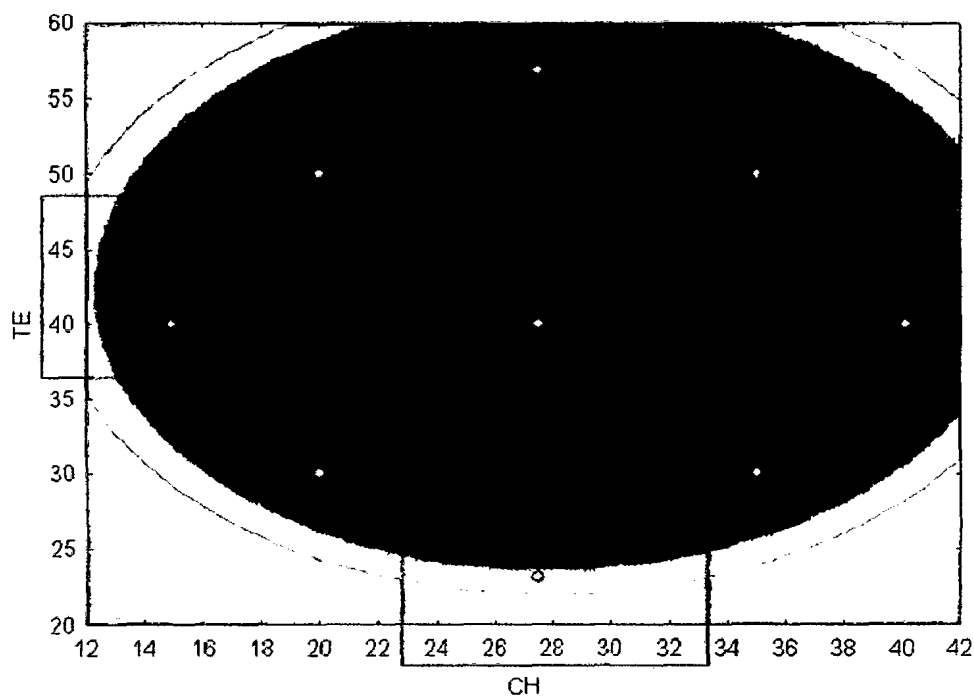


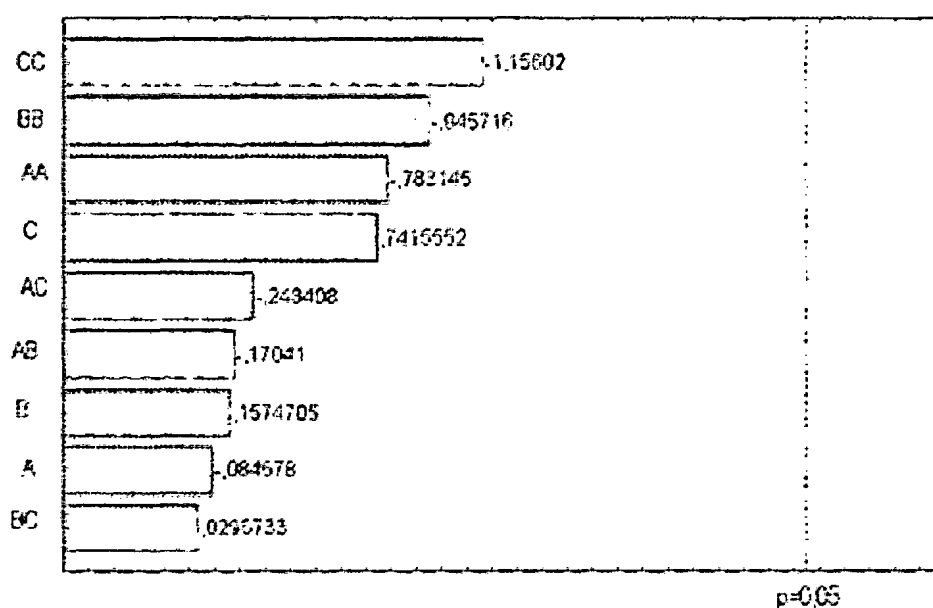
Figura 24: Superficie de respuesta, vista superior TE vs CH

Modelo matemático (Cuando X=9,5):

$$\%Prot = -12,028 + 1,479Y - 0,023Y^2 + 1,567Z - 0,0158Z^2 - 0,0223XY - 0,024XZ + 0,00058YZ + 57,55$$

Evidentemente se aprecia en las figuras anteriores que es factible optimizar los parámetros de extracción alcalina, para cada caso se muestra que existe una región optima de los factores evaluados (ver las vistas superiores, para identificar), dicha región optima abarca para PE desde 8,5 hasta 9,5 y CH abarca desde 23 a 33 es decir 1:23 y 1:33. De igual modo para la temperatura de extracción (TE) desde 35 hasta 48 °C, estos valores son correspondientes a la región optima por cada factor. Sin embargo se ha obtenido el punto óptimo para dichos factores (etapa de la Optimización final), los cuales se muestran en el cuadro 26, también se muestran las regiones y rango de valores evaluados.

Diagrama de Pareto, estimación del efecto estandarizado



A=PE, B=CH y C=TE; la leyenda se muestra en el cuadro 24.

Figura 25: Diagrama de Pareto de las variables estudiadas

Los valores al lado de la barra indican el coeficiente de contraste y el orden decreciente de importancia de los diferentes factores estudiados, la línea punteada indica el valor crítico de significancia. Este tipo de análisis permite estudiar la influencia de las variables sobre la respuesta (% de proteína) y las

interacciones entre ellas. Se puede observar que en los efectos individuales, la temperatura de extracción (TE) es el que más ha influido en la composición proteica, sin embargo ninguno de los efectos individuales o combinadas sobrepasan el valor critico.

Cuadro 26: Valores óptimos de los factores evaluados

Factor	Rango óptimo		Valor optimo
	Nivel inferior	Nivel superior	
PE: pH de extracción	8,5	10,5	9,34
CH: Cantidad de harina, expresado en relación harina: solvente	23	33	28,12
TE: Temperatura de extracción °C	30	48	42,78

Según se observa, hay un rango por cada factor como los máximos y mínimos valores que pueden ser evaluadas para la obtención del aislado proteico de tarwi, sin embargo existen valores óptimos para cada factor (PE=9,3; CH=1:28; TE=43 °C), en los cuales el porcentaje de proteínas del aislado fue mayor. También se muestran los valores máximos y mínimos evaluados en la extracción, así como los mínimos y máximos óptimos para cada factor. Sin embargo Ventura *et al.* (2005), determinaron que realizando la extracción alcalina a partir de nuez de marañón según los parámetros adecuados (pH=9, harina: Solvente=1:15, temperatura=50 °C y 30 minutos de agitación) se obtiene un aislado con 85-91% de proteína. Del mismo modo, para la obtención de aislado proteico de (*Lupinus mutabilis sweet*), Jayasena *et al.*, (2010), determinaron los parámetros de extracción, siendo estas pH 9, relación de harina: solvente 1:10, temperatura de 20 C una agitación de 60 minutos y precipitación isoelectrica a 4,5; los cuales difieren significativamente con los niveles encontrados en esta investigación.

Morales *et al.*, (2005), identificó y optimizó mediante el mismo diseño los factores más influyentes en la extracción alcalina de proteínas de hígado de bovino, concluyendo que son influyentes la relación materia prima: solvente 1:11, pH de 9,9; temperatura de 30,9 y tiempo 53 min. El aislado proteico así obtenido presenta un contenido de 78,42% de proteína; 11,63% de grasa, los cuales son inferiores a los obtenidos en esta investigación. Estos valores difieren significativamente de los resultados obtenidos en esta investigación, la causa principal probablemente sea la naturaleza de las proteínas, puesto que las fuentes de procedencia son muy distintas, siendo más factible alcanzar buenos rendimientos en proteínas de origen vegetal.

4.4. ANÁLISIS PROXIMAL DEL AISLADO

Se ha obtenido un aislado proteico en base a los parámetros evaluados, analizados y optimizados en los ensayos anteriores, dichos valores considerados como óptimos fueron (PE=9,3; CH=1:28, TE=43 °C), con los cuales se hizo la extracción alcalina para luego obtener el aislado proteico mediante la insolubilización por precipitación isoelectrica a pH=4,5, para tal ajuste se usó el HCl 0,1N y NaOH 0,1N.

El aislado obtenido del tarwi, fue sometida a análisis proximal, condición necesaria para cuantificar la cantidad de proteína recuperada y la efectividad del proceso, los resultados se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 27: Análisis proximal del aislado proteico de tarwi

Componentes	%*
Humedad	4,87±0,09
Lípidos	0,62±0,04
Proteína	92,83±0,18
Ceniza	1,48±0,04
Fibra	0,39±0,02
Carbohidratos	1,12±0,03

* Media ± Desviación estándar, n=3.

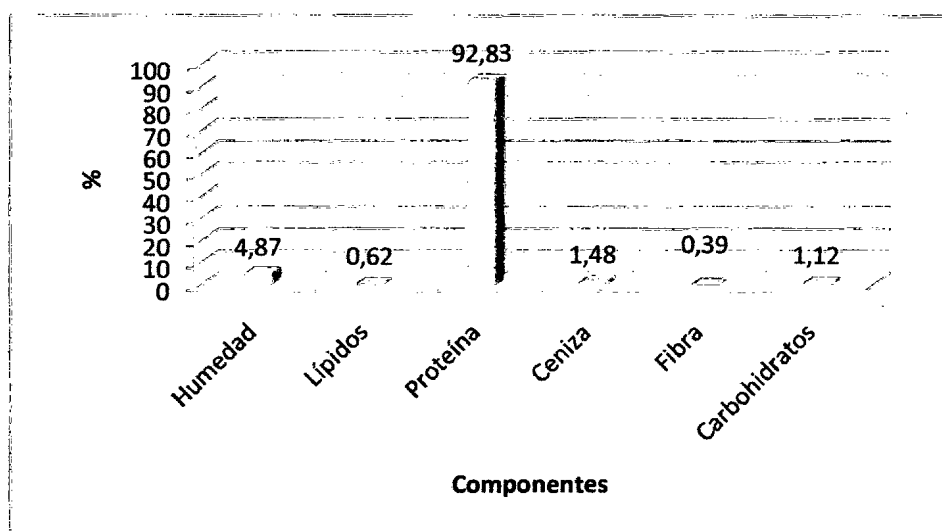


Figura 26: Gráfica del análisis proximal del aislado proteico

El análisis muestra que el contenido de proteínas es alto, lo que indica que el proceso de obtención con los parámetros optimizados tuvo repercusión positiva en la riqueza proteica, el efecto de los factores individualmente y interacciones son las adecuadas para que las proteínas del tarwi sean solubilizadas, permitiendo a la vez que dicha proteína solubilizada sea recuperada mediante la precipitación isoelectrica con buenas cualidades.

Según la norma del CODEX para productos proteínicos de soya, es considerado aislado proteico cuando el porcentaje de proteínas en base seca es superior al 90%, no obstante en esta investigación se ha encontrado que el contenido de proteínas es de 92,8% que cumple con la especificación. Sin

embargo el análisis proximal del aislado proteico obtenido a partir de harina desengrasada de girasol, mediante extracción alcalina y precipitación isoelectrica fue de 97%, el cual ha sido incrementada desde 31,2% de proteínas (Villanueva, *et al.*, 1999), dato similar fue encontrado por Pedroche *et al.*, (2004), quienes determinaron que el contenido de proteínas fue de 95% obtenido en condiciones similares y bajo el mismo método. Así mismo Rodríguez, (1981) evaluó los parámetros de extracción para lupino blanco, obteniendo similares resultados de los parámetros y 92% de proteínas en el aislado proteico. Los resultados en cuando al análisis proximal en especial en el contenido de proteínas no hay mucha diferencia significativa con los datos reportados.

El aislado proteico de soja es un insumo ampliamente utilizado en la industria de los alimentos, el análisis proximal del concentrado indica que es posible obtener un aislado con 84,6% de proteína (Chavarria *et al.*, 2005). Por otro lado (Munive, 2009) obtuvo valores mayores para el aislado proteico de soja analizados en base húmeda, siendo 91,1% para la proteína; 0,7% de grasa; 0,15% de fibra cruda; 3,8% para ceniza; 3,5% para carbohidratos y una humedad de 5%. Estos valores difieren significativamente en los resultados obtenidos para el aislado de tarwi, en especial en el contenido de grasa debido a que en este caso se ha realizado un desgrasado parcial de la harina de tarwi, el cual no se realiza en caso de la soja. Así mismo, Lqari *et al.*, (2001) usaron los siguientes parámetros pH=12; 50°C y relación de 1:10) en la extracción alcalina para la obtención de aislado proteico de (*Lupinus angustifolius*), encontraron que el contenido de proteínas es 93,7% por lo que los niveles de los factores usados fueron considerados como óptimos, los cuales difieren con los resultados hallados para el tarwi dado su naturaleza y contenido proteico de la materia prima distinta.

4.5. PROPIEDADES FUNCIONALES DEL AISLADO PROTEICO

El aislado proteico obtenido, tuvo propiedades funcionales distintas de los demás aislados. El motivo de esta variación se debe a la naturaleza de la materia prima y al tratamiento de extracción alcalina, en caso de tarwi es necesario realizar un deslupinizado, con la consiguiente pérdida de proteínas y algunas propiedades funciones debido al tratamiento térmico en dicho proceso.

Cuadro 28: Capacidad de formación y estabilidad de espuma

Tiempo (minutos)	Volumen espuma (mL)
1	156
10	140
20	95
60	80
90	75

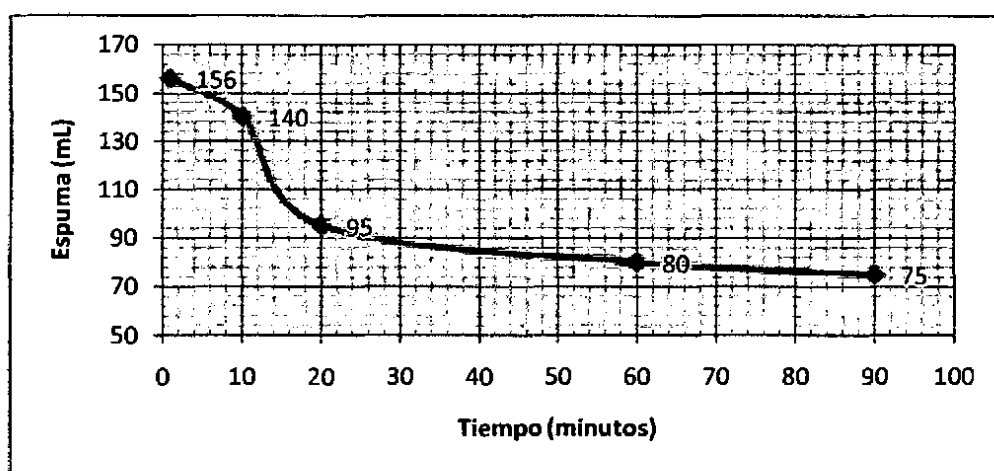


Figura 27: Capacidad y estabilidad de espuma

Se observa que el volumen disminuye de 156 a 78 mL al cabo de 90 minutos en un 51,9%. Sin embargo la capacidad espumante calculado con la formula (ver metodología) resultó siendo 78%, el cual es relativamente bajo con respecto a los valores reportados por otros aislados proteicos.

En el cuadro siguiente se resumen todas las propiedades evaluadas en esta investigación, los datos están expresados en porcentajes.

Cuadro 29: Propiedades funcionales del aislado proteico, expresados en %

PROPIEDADES	APT (%)
Capacidad de absorción de agua	98
Capacidad de absorción de grasa	160
Capacidad espumante	78
Estabilidad de espuma*	75

* Volumen (mL) determinado después de 1 hora y 30 minutos

APT: Aislado proteico de tarwi

Las características estructurales de estas proteínas influyen sobre sus propiedades funcionales, tanto que si han sido sometidas a tratamientos térmico o mecánicos bruscos, pierden todas las funcioanlidades. Del cuadro anterior se destaca la capacidad de absorción de agua y grasa, en caso la capacidad de hidratación (0,98 g agua/g aislado) se percibe que es menor en comparación a la capacidad con la grasa (1,6g grasa/ g aislado). Por otro lado la estabilidad de espuma del aislado de tarwi es superior del valor obtenido para el aislado de soya (58) a pesar de la evaluación a las mismas condiciones y rangos de tiempo Rodríguez, (1981).

Las propiedades funcionales de las proteínas pueden diferir en funcional a los tratamientos sometidos durante la extracción alcalina, del mismo modo de los tipos de proteína que lo conforma. El aislado proteico de coco muestra tener una capacidad de absorción de agua del 284% (2,84 g/g aislado) y la capacidad de absorción de grasa es de 1,6 g/g aislado Viena *et al.*, (1993). Del mismo modo Pacheco (1984), encontró que la capacidad de absorción de agua y grasa para aislado proteico de palma es de 2,5 y 1,75 g/ g aislado, estos datos difieren de los

valores encontrados por Hazra y Laskar, (2005), quienes obtuvieron 1,7 y 3,23 g/g aislado para la capacidad de absorción de agua y grasa respectivamente en el aislado proteico de (*Elaeis guineensis J.*). En cambio la capacidad de absorción de agua y grasa para el aislado proteico de (*Cajanus cajan*) fue de 1,38 y 0,807 g/g aislado Oshodi y Ekperigin, (1989). Todos los valores reportados difieren significativamente de los obtenidos en esta investigación, la posible causa se debe a la composición proteica de las materias primas y de su naturaleza, por otro lado cuando se realiza el secado del aislado en estufa, las propiedades funcionales se minimizan en comparación de aislados obtenido por atomización o liofilización.

Las propiedades funcionales del aislado proteico proveniente de biomasa de *Kluyveromyces marxianus*, obtenido por extracción alcalina y precipitación isoeléctrica, resulta 4,2 g agua/g proteína para la capacidad de absorción de agua y 1,79 g grasa/g proteína para la capacidad de absorción de grasa, los cuales difieren de los obtenidos para el aislado proteico de tarwi debidos a la naturaleza de las fuente proteicas. Estas características son consideradas para la incorporación de los concentrados proteicos en la tecnología de alimentos (Cori *et al.* 2006).

4.6. RENDIMIENTO

En el proceso de extracción y precipitación isoeléctrica se generan perdidas mínimas, también en el proceso de deslupinizado se pierde una fracción proteica (en especial en la operación del tratamiento térmico y lavado), al igual que su capacidad de renaturalización por lo que no es posible su recuperación mediante la precipitación isoeléctrica. En esta investigación, el rendimiento fue de 35%, lo cual es ligeramente bajo en comparación al aislado obtenido a partir

de soya, sin embargo la riqueza proteica es alta en caso del aislado de tarwi. Cabe aclarar que el rendimiento se ha calculado en base a la harina deslupinizada y semi- desgrasada de tarwi que ingresa a la extracción alcalina y la cantidad de aislado proteico obtenido al final del proceso.

Rodriguez, (1981), encontró los rendimientos en la obtención de aislado proteico de lupino, siendo ésta de 31% a nivel laboratorio y de 28,4% a nivel planta piloto, estos valores son inferiores a los datos obtenidos en ésta investigación, el cual evidencia que optimizar los parámetros incrementa significativamente los rendimientos. Es posible alcanzar mayores rendimientos, sin embargo se ha utilizado equipos de baja capacidad en la que las pérdidas fueron significativos, esto podría mejorarse utilizando equipos adecuados y de mayor capacidad evitando de esta manera el número de extracciones.

En caso del aislado obtenido de nueces de marañón, del total de proteínas extraídas a pH alcalino (9,0); el 83,63 % de la proteína fue precipitada a pH 4,5. Se logró la recuperación del 55,35 % de las proteínas iniciales en el aislado proteico obtenido por secado en estufa al vacío y el 56,43% en el secado por atomizado (Ventura *et al.*, 2005). No obstante, Wang *et al.* (1999) obtuvieron un rendimiento de 74,6% y 92% de proteínas en la obtención de aislado proteico a partir de salvado de arroz, sin embargo se precisa que se han utilizado tratamientos enzimáticos durante el procesos para incrementar el rendimiento desde 34% hasta 74,6%. Evidentemente estos valores de rendimiento son mayores al rendimiento hallado en esta investigación, sin embargo es este caso se ha utilizado el método estándar para la obtención del aislado, del mismo modo las diferencias de debe al tipo y contenido proteico de las materias primas.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

1. La optimización de los factores de extracción alcalina permitió la obtención de un aislado proteico con alto tenor de proteína (superior al 92%) y buenas cualidades funcionales.
2. Los factores pH de extracción (PE), relación harina: solvente (CH) y temperatura de extracción (TE), influyeron significativamente en la cantidad de proteína solubilizada y recuperada ($p < 0,05$).
3. Existen regiones optimas para los factores (PE desde 8,5 hasta 9,5; CH abarca 1:23 y 1:33 y TE desde 36 hasta 48 °C), en los cuales fue posible obtener un aislado proteico con buen tenor proteico. Sin embargo fue posible optimizar estos niveles mediante un diseño compuesto central, obteniéndose valores óptimos para cada factor (PE 9,3; CH 1:28 y TE de 43 °C).
4. La obtención de un aislado proteico bajo los parámetros óptimos influyó significativamente en la composición proximal, en las propiedades funcionales y el rendimiento.

5.2. RECOMENDACIONES

1. Completar la investigación de las propiedades funcionales (hidrodinámicas, texturales y superficiales) del aislado obtenido.
2. Realizar investigaciones a nivel estructural, para la cualificación de aminoácidos y componentes antinutritivos, así mismo hacer estudios de digestibilidad, valor biológico, PER, etc.
3. Para tener mejores rendimiento en la obtención del aislado proteico, se recomienda realizar investigaciones para optimizar métodos de deslupinzado que permita la conservación de la totalidad de proteínas.
4. Buscar métodos de extracción alcalina que no implique el desgrasado, puesto que el tarwi tiene ácidos grasos poliinsaturados (Omegas 3, 6 y 9) que son muy benéficos.
5. Para su uso en la tecnología de alimentos, se recomienda hacer estudios de los efectos de la extracción alcalina en la texturizarían del aislado para la obtención de carne vegetal, así como su uso en la industria cárnica, lácteos y panadería.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña Goycolea P. Alejandro. 2001. Estudio de prefactibilidad técnico económico para la obtención de hidrolizado de proteína vegetal a partir de lupino. Departamento de Ingeniería Química- Universidad de la Frontera. Chile.
2. AOAC. 1998. Official Methods of Analysis 16th. Edition. Association of Analytical Chemistry, Arlington, Washington D.C.
3. Avanza M. V., Puppo, M. C. y Añón, M. C. 2004. Propiedades reológicas de geles de proteínas de amaranto. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) UNLP-CONICRT. La Plata.
4. Ayala Mina Jorge y Pardo Mercado Richard. 1995. Optimización por diseños experimentales. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONCYTEC. Lima- Perú.
5. Ayala Guido. 2006. Aporte de los cultivos andinos a la nutrición humana. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima- Perú.
6. Babaoğlu Mehmet. 2000. Protoplast Isolation in Lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet): Determination of Optimum Explant Sources and Isolation Conditions. Department of Field Crops. Faculty of Agriculture. Selcuk University Campus. Konya- Turkey.
7. Bacigalupo. Antonio y Tapia E. Mario. 2005. Agroindustria del tarwi. FAO. Santiago- Chile.
8. Badui D. Salvador. 1990. Química de alimentos. Editorial Alhambra Mexicana, segunda edición. México.
9. Bejarano Luján Dagnith L. 2008. Obtenção de concentrados protéicos de amaranto (*Amaranthus sp*) por diferentes processos e avaliação de seus efeitos em algumas propriedades. Universidade Estadual de Campinas. Brasil.
10. Blanes Patricia, Garro Oscar A, Giménez María C. y Hunzicker Gabriel A. 2006. Aplicación de un diseño compuesto central para la determinación de especies orgánicas e inorgánicas de arsénico en agua por HPLC-HG-AAS. Facultad de Agroindustrias .U.N.N.E. Chaco. Argentina.

11. Borquez R. Aliro. 2008. Evaluación nutricional del lupino blanco (*Lupinus albus*) como fuente alternativa de proteínas en dietas comerciales para salmónidos en Chile. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Chile.
12. Callisaya Carlos y Alvarado K. Antonio. 2009. Aislados proteínicos de granos altoandinos chenopodiaceas; quinua "*chenopodium quinoa*" cañahua "*chenopodium pallidicaule*" por precipitación isoelectrica. Instituto de Investigaciones Químicas. Universidad Mayor de San Andrés.
13. Chavarria Eduardo. 2005. Estudio de las Propiedades Anticancerígenas de un Aislado de Soya Germinada. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México.
14. De Luna Jimenez, Alfonso. 2006. Valor nutritivo de la proteína de soya. Investigación y ciencia. Aguascalientes- México.
15. Cheftel, J.C. J. L. Lorient, D .1985. Proteines Alimentaire. Tec & Doc Lavoisier. París.
16. Cori de Mendoza Marta E., Rivas Nilo, Dorta Blas, Pacheco de Delahaye Emperatriz y Bertsch Antonio. 2006. Obtención y caracterización de dos concentrados proteicos a partir de biomasa de *Kluyveromyces marxianus* var. *Marxianus* cultivada en suero lácteo desproteinizado. Universidad Central de Venezuela. Maracay- Venezuela.
17. Cornejo Carlos, Flores Idalia, Amanda Gálvez, Maricarmen Quirasco y Amelia Farrés. 2001. Determinación de las propiedades funcionales de un aislado proteico de semilla de ajonjolí (*Sesamum indicum*). Facultad de Química Universitaria Coyoacán- México.
18. Cortes Sánchez A. y Gallardo Navarro Y. 2005. Obtención de Concentrados Proteicos a Partir de Alfalfa (*Medicago sativa*). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México.
19. Del Refugio Natalio. 1997. Obtención de un concentrado de garbanzo. Chapingo- México.

20. Dreyer Armando, Coello Nereida y Montiel Edie. 2000. utilización de la metodología de superficie de respuesta de la optimización de un medio de cultivo para la producción de l-lisina por *Corynebacterium glutamicum*. Instituto de Biología Experimental. Caracas- Venezuela.
21. Duque R. L., Dávila O. G, Vidal M. P., Velázquez R. A.D., Sánchez P. M.E. y Calderón D.G. 2001. Propiedades funcionales de aislado proteico obtenido por micelización de semillas de cacahuete (*Arachis hypogae*) variedad amayuca. Facultad de Química Universitaria Coyoacán. México.
22. Feming S.E. 1974. Viscosity and Water Absortion Characteristics of Slurries on Sunflower and Soybean Flours Concentrates and Isolates. J. Food Sc. Article 39.
23. Fennema Owen. 2000. Química de los alimentos. Segunda Edición. Zaragoza-España.
24. Fernadez M. Carmen D. y Piñeiro B. Montserrat. 2002. Superficies de respuesta métodos y diseños. México.
25. Ferreyra J. C., Kuskoskil E. M., Bordignon M. T. y Barrera A. D. Propiedades emulsificantes y espumantes de las proteínas de harina de cacahuete (*Arachis hypogaea Lineau*). Universidade Federal de Santa Catarina. Campinas- Brasil.
26. Genta María Luisa y Alvarez Nilda, 2006. El complejo soya. Revistas Científicas CET.
27. Gonçalves N., J. Vioque, A. Clemente, R. Sánchez-Vioque, J. Bautista y F. Millán. 1997. Obtención y caracterización de aislados proteicos de colza. Departamento de Fisiología y Tecnología de Productos Vegetales. Instituto de la Grasa, C.S.I.C. Sevilla, España.
28. Gross R., E. Von Baer y F. Koch. 1988. Chemical composition of a new variety of the Andean Lupin (*Lupinus mutabilis* CV Inti), with low alkalid content. journal of food composition and analysis.
29. Guerrero, D. 1989. Obtención de un aislado proteico a partir de germen de quinua (*Chenopodium quinoa willd*) desgrasado. Tesis para optar el grado académico de Ingeniero en Industrias Alimentarias. UNALM. Perú.

30. Hazra K. M. y Laskar S. 2005. Functional properties of protein concentrates from mimosops *elengil Seed*. Department of Chemistry- University of Burdwan Burdwan. West Bengal- India
31. Iranian J. 1981. Isolated protein from castor bean, peanut, soy bean and safflower meals. Journal of food composition and analysis.
32. Jayasena V., H.J. Chih and S.M. Nasar-Abbas. 2010. Functional Properties of Sweet Lupin Protein Isolated and Tested at Various pH Levels. Food Science and Technology- School of Public Health.Curtin University of Technology. Perth- Australia
33. Jiménez Martínez C. Dávila Ortiz Gloria. 2006. Elaboración de un producto tipo botana a base de harina de trigo fortificada con aislado proteico de *Lupinus mutabilis.*, alfa editores técnicos- Chile.
34. León A. Edel y Rosell M. Cristina. 2007. De tales harinas, tales panes. Primera edición. Hugo Báez Editor. Argentina.
35. Lin M. J., Humbert, E. S., & Sosulski, F. W. 1974. Certain functional properties of sunflower meal products. Journal of Food Science.
36. Linden Guy y Lorient Denis. 1994. Bioquímica Agroindustrial. Editorial Acribia. Zaragoza- España.
37. Lqari H., J. Vioque, J. Pedroche, F. Millán. 2001. *Lupinus angustifolius* protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. Instituto de la Grasa. Sevilla- Spain.
38. Luque Guillen M. Victoria. 2009. Estructura y propiedades de las proteínas. Centro de investigaciones. Universidad de Valencia. España
39. Milde B. Laura, Carolina Valle Urbina, Alexis Rybak, Carlos Oliveira, Karina G. González. 2009. Metodología de superficie de respuesta para optimizar panificado libre de gluten con grasa, huevo y leche. Revista ciencia y tecnologia N° 11. España.



40. Mondor M., Ippersiel D., Lamarche F. y Boye J. 2004. Production of soy protein concentrates using a combination of electroacidification and ultrafiltration. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Canada.
41. MONTGOMERY, D. 2005. Diseño y análisis de experimentos. Segunda edición. Limusa Wyley.
42. Morales S. Eduardo, Peñafiel Carlos E., Salva R. Bettit y Salinas F. Jesús 2005. Optimización de los parámetros fisicoquímicos para la extracción alcalina de proteínas de hígado de bovino, aplicando el método de superficie de respuesta. Departamento de Tecnología de Alimentos y Productos Agropecuarios- UNALM. Lima- Perú.
43. Mori Nuñez Carlos Luis, Paz Zegarra Raúl y otros. 2008. Eliminación de alcaloides en el tarwi (*Lupinus mutabilis*) mediante lavado con agua a diferentes pH. Universidad Católica de Santa María. Arequipa- Perú.
44. Morón Cecilio. 2005. Importancia de los cultivos andinos en la seguridad alimentaria y nutrición. Cultivos Andinos-FAO.
45. Mujica Angel y Sven E. Jacobsen. 2006. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. Universidad Nacional del Altiplano. Puno- Perú.
46. Munive Ledesma Pablo. 2009. Elaboración de un suplemento alimenticio en polvo para consumo humano a partir de una mezcla de hidrolizado de soya y almidón de maíz. escuela politécnica nacional. Quito- Ecuador.
47. Muñoz S. Julian, Camargo T. Diego y Gallego S. Darío. 2008. Aplicación de la metodología de superficie de respuesta en un proceso de absorción del CO₂ de un biogás en una solución alcalina. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
48. Murray K. Robert, Granner K. Daryl, Meyes A. Peter y Rodwell W. Victor. 2005. Bioquímica de Harper. Edición especial N° 14. Editorial Acribia. Zaragoza- España.
49. Mustakas G. C. y Sohns V. E. 1976. Soy processes, equipment, capital, and processing costs. En U.S Farmer Cooperative Service Edible Soy Protein. Operational Aspects of Producing and Marketing. Research Report 33.

50. Nelson L. David y Cox M. Michael. 2001. Principios de bioquímica. Legninger. Cuarta edición. España.
51. Ortega E. David, Aida Rodríguez, Arturo David, y Ángel Zamora-Burbano. 2009. Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. Universidad del Valle. Cali-Colombia
52. Oshodi A. A. y Ekperigin M. M. 1989. Functional properties of pigeon pea (*Cajanus cajan*) flour. School of Pure and Applied Sciences. Federal University of Technology. Akure- Nigeria.
53. Pacheco de Delahaye Emperatriz, Mariela Sánchez A., Rosa Girlando, Eliezer Sánchez. 1984. Obtención de aislados proteínicos de girasol por hidrólisis con bromelina y papaina, composición química y propiedades funcionales. Revista Agronomía tropical N° 44. Venezuela.
54. Palacios V. Abraham, Demetrio S. Mauricio, Espinoza C. Lissi, Herrera M. Milagros y Huamancaja C. Carlos. 2004. Obtención de alcohol a partir de la malta de *Lupinus mutabilis* (tarwi). Universidad Nacional del Centro del Perú. Junin- Perú.
55. Pedroche Justo, María M. Yust, Cristina Megías, Hassane Lqari. 2004. Utilisation of rapeseed protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. Instituto de la Grasa. Sevilla- España.
56. Pincirolí M., N. Bezus, R. Maiale, S. Vidal, A. Añón. 2006. Caracterización de aislados proteicos de arroz de variedades de alto y normal contenido de proteína. UNLP. La Plata- Argentina.
57. Robles R. Maria del Carmen y Mora Escobedo Rosalva. 2007. Influencia del Método de Obtención en las Características Fisicoquímicas, y Estructurales de Aislados de soya. Departamento de Graduados en Alimentos. Sto. Tomás-México.
58. Rivera Figueroa M. Monica. 2006. Obtención, caracterización estructural y determinación de las propiedades funcionales de un aislado proteico de Quinoa orgánica (*Chenopodium quinoa*). Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Universidad de Chile. Chile.

59. Rodríguez N. M. Rosario, Cecilio C. Sánchez y Juan M. Rodríguez. 2002. Efecto de la temperatura sobre películas de un aislado proteico del suero bovino (WPI) adsorbidas sobre la interfase aceite-agua. Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Química. Universidad de Sevilla- España.
60. Rodríguez Pacheco B. T. Mercedes. 1981. Obtención de aislado proteico a partir de lupino (*Lupinus mutabilis*). Departamento de tecnología de alimentos y productos agropecuarios- UNALM. Lima- Perú.
61. Schoeneberger H., R. Gross, H.D. Cremer and L Elmadfa 1983. The protein quality of lupins (*Lupinus mutabilis*) alone and in combination with other protein sources. Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Giessen.
62. Silva M. Jorge. 2006. Obtención, caracterización y relación estructura - funcionalidad de un aislado proteico de quinua (*chenopodium quinoa*) orgánica proveniente de la VI región de Chile. Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química-Universidad de Chile. Chile.
63. Tapia E. Mario, Cecilio Morón, Guido Ayala y Ana María Fries. 2006. Valor nutritivo y patrones de consumo. Cultivos Andinos- FAO.
64. Valenzuela B. Alfonso y Nieto K. Susana. 2003. Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importancia en el desarrollo del sistema nervioso y visual. Revista Chilena de pediatría V.74- Chile.
65. Ventura Chuquiere Mabel, Elías P. Carlos y Salvá R. Bettit. 2005. Obtención de aislado proteico a partir de nuez de marañón. Departamento de Tecnología de Alimentos y Productos Agropecuarios- UNALM. Lima- Perú.
66. Vieira Ricardo. 2003. Fundamentos de bioquímica. Edición electrónica. Belém- Pará.
67. Viena L. A., O. M. Mendieta T. Y L. Briceño B. 1993. Estudio de las propiedades funcionales de aislado proteínico de torta de coco. Universidad Nacional San Martín. San Martín- Perú.
68. Villanueva Alvaro, Javier Vioque, Raúl S., Alfonso Clemente, Juan Bautista and Francisco Millán. 1999. Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo-proteases. Instituto de la Grasa. Sevilla- Spain.

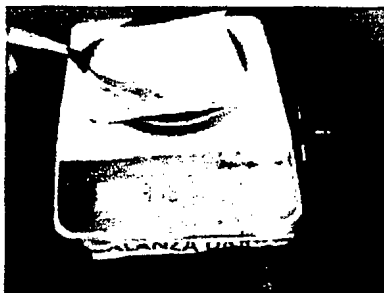
69. Villanueva Alvaro, Javier Vioque, Raúl S., Alfonso Clemente, Juan Bautista and Francisco Millán. 2001. Caracterización bioquímica de hidrolizados enzimáticos a partir de aislado proteico de *Lupinus mutabilis*. Instituto de la Grasa. Sevilla-Spain.
70. Vioque Javier, Javier Vioque, Raúl Sánchez, Alfonso Clemente, Juan Bautista and Francisco Millán 2001. Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados protéicos. Instituto de la Grasa. Sevilla- Spain.
71. Wang M., N. S. Hettiarachchy, W. Burks and T. Siebenmorgen. 1999. Preparation and Functional Properties of Rice Bran Protein Isolate. Department of Food Science- University of Arkansas. J. Agric. Food Chem. Arkansas.
72. Zamora N. Francisco, García L. Pedro, Ruiz L. Mario y Salcedo P. Eduardo. 2007. Composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus* (fabaceae) y evaluación antifúngica y alelopática del extracto alcaloideo. Departamento de Madera Celulosa y Papel. Universidad de Guadalajara. México.

ANEXOS Y APÉNDICES

ANEXOS

ANEXO 1

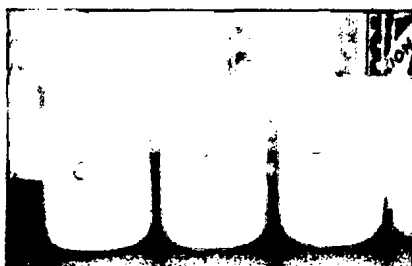
FOTOGRAFÍAS REFERENTES A LA INVESTIGACIÓN



Pesado de harina



Muestras de harina



Solubilización



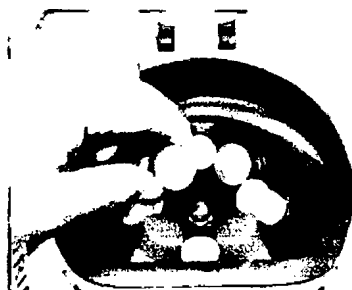
Ajuste de pH



Calentamiento



Sobrenadante



Centrifugación



Aislado proteico

*Después del centrifugado, aun se han realizado otras operaciones hasta obtener el aislado.

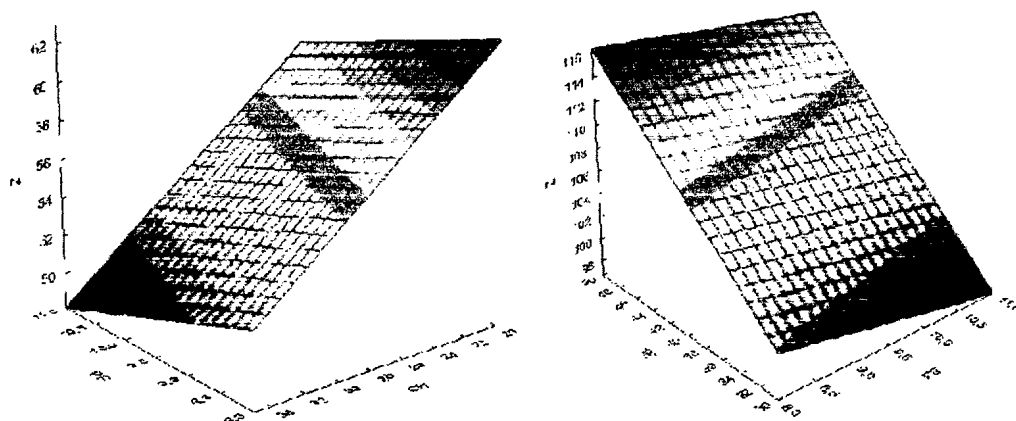
ANEXO 2

Análisis de varianza y curvatura en la etapa de SCREENING

Fuente de variación	SC	GL	CM	Fo	Ft (18,51)
PE	14,44	1	14,445	78,125	*
CH	4,104	1	4,104	22,196	*
TE	4,914	1	4,914	26,577	*
PE*CH	12,77	1	12,776	69,1	ns
PE*TE	14,87	1	14,878	80,468	*
CH*TE	0,241	1	0,241	1,3062	ns
PE*CH*TE	1,044	1	1,044	5,6464	ns
Curvatura	27,97	1	27,972	151,28	**
Error	0,36	2	0,185		
Total	80,74	10			

N	Y (% prot.)	Yest.	Y-Yest.
1	86,46	86,647	-0,187
2	89,75	89,215	0,535
3	87,93	87,743	0,187
4	84,72	85,255	-0,535
5	91,13	90,943	0,187
6	87,52	88,055	-0,535
7	91,85	92,039	-0,189
8	84,63	84,095	0,535

$$Y=87,99-1,344PE-0,716CH+0,784TE-1,264(PE)(CH)-1,364(PE)(TE)$$



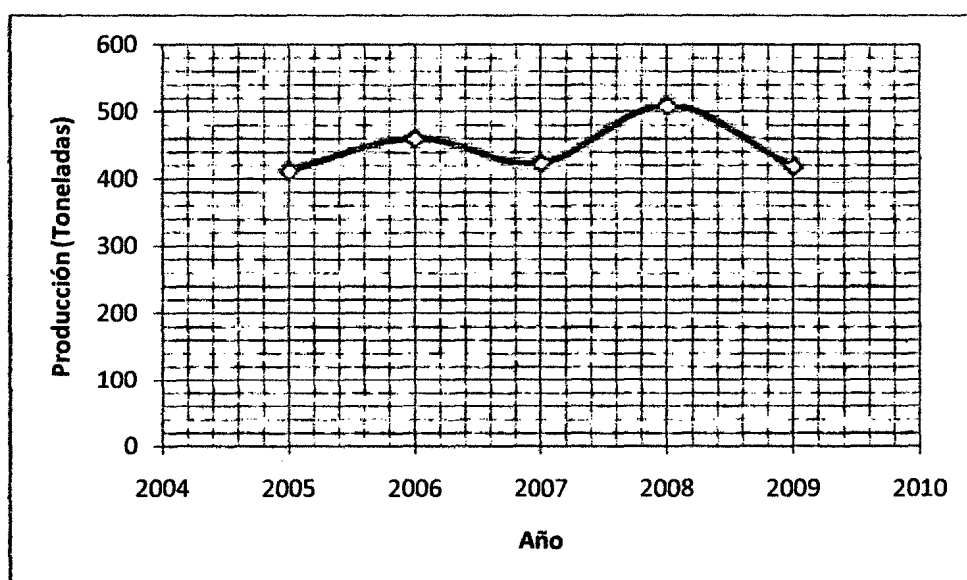
Gráficas de superficie del diseño factorial (Screening), 2^k ($k=3$; PE; CH y TE)

ANEXO 3

Producción de tarwi en la provincia de Andahuaylas

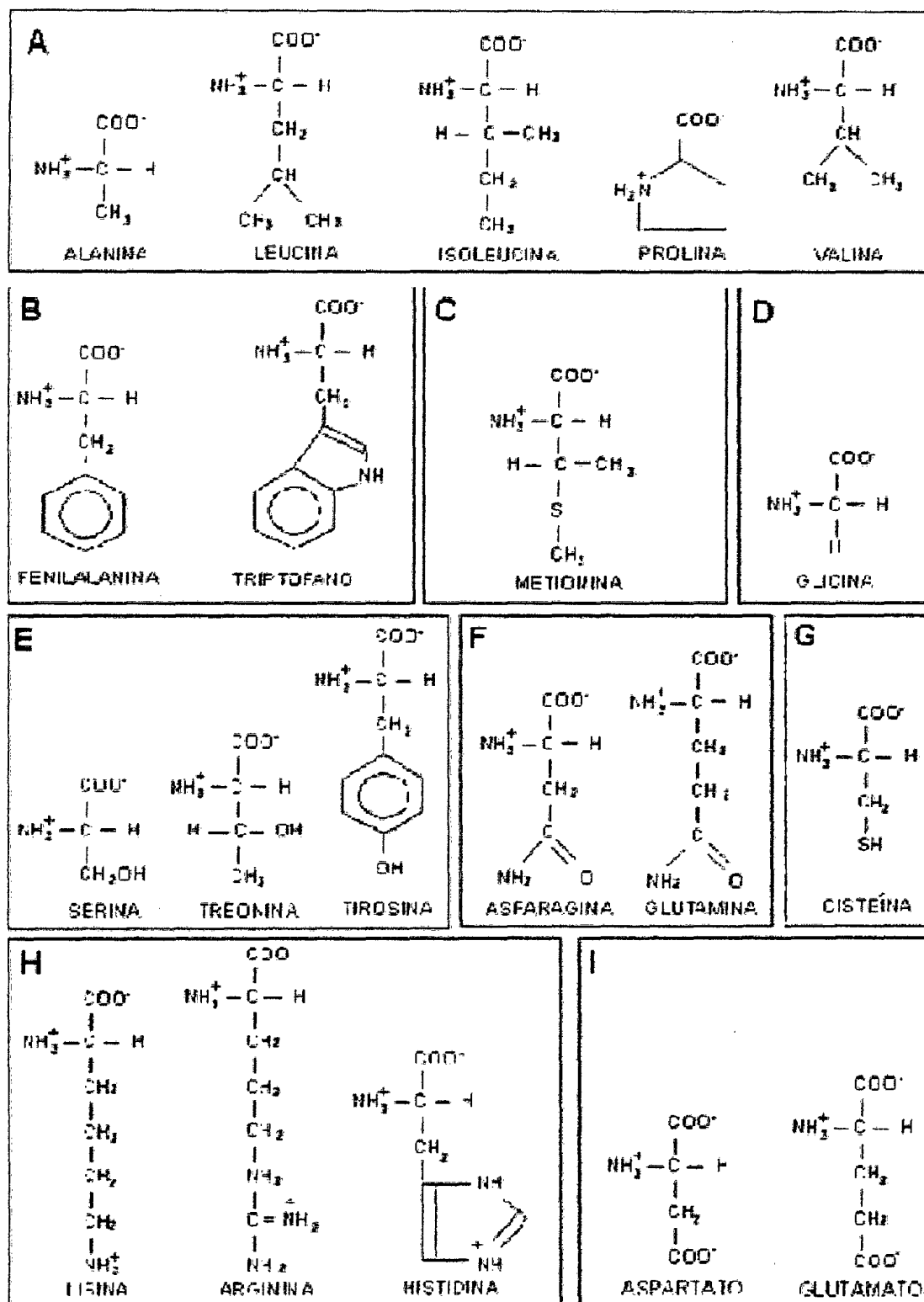
Producción de tarwi					
Año	2005	2006	2007	2008	2009
Producción (Toneladas)	412	460	423	509	418
Rendimiento medio (Toneladas/ha)	3,2	2,8	3,1	3	2,9

Fuente: Ministerio de Agricultura- Andahuaylas, 2010.



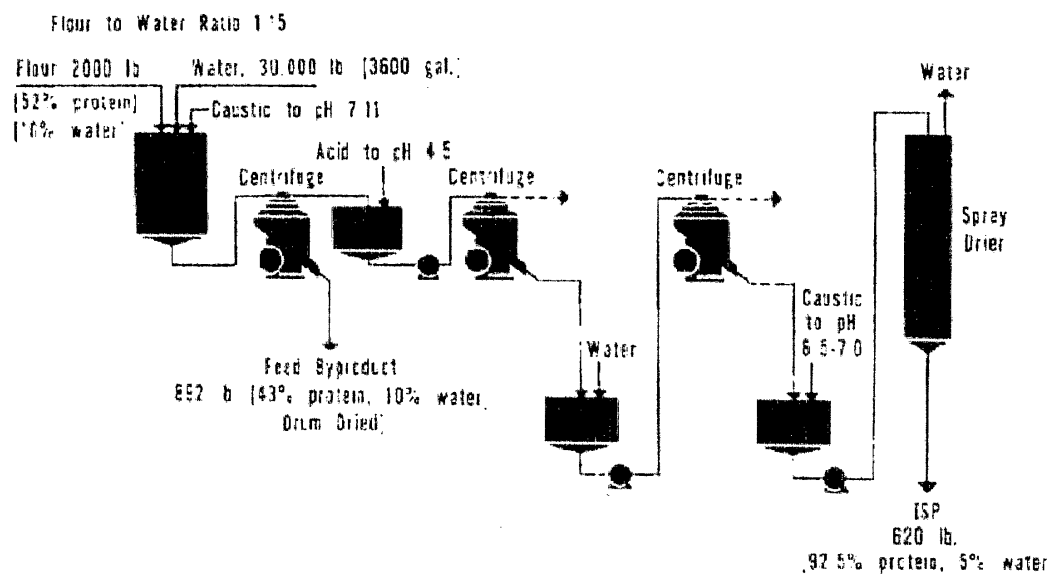
ANEXO 4

Los aminoácidos esenciales



Fuente: Vieira, (2003).

ANEXO 5
Flowsheet for isolated soy protein production (ISP)



Fuente: Mustakas y Sohns, 1976.

ANEXO 6

Composición química de los principales productos de lupino en comparación con la harina de pescado y la harina de soja (todos los valores se expresan en g/kg de MS a menos que este especificado de otra forma).

Nutriente	H. pescado chileno	Harina de soja	H. lupino amarillo ¹	H. lupino blanco ²	H. lupino dulce ³	H. lupino dulce ³	C. proteico de lupino**	P. aislado de lupino
Matéria seca (MS)	917	909	903	922	935	911	942	926
Proteína cruda	770	518	547	455	415	251	690	610
Proteína digestible	672	477	465	402	354	n.d.	679	770
Grasa cruda	66	47	87	137	53	65	93	125
Cenizas	142	69	44	36	33	30	31	30
Fibra	22	8	6	5	4	3	5	5
Materia orgánica	853	937	966	964	967	970	939	970
Energía bruta (MJ/kg MS)	21,3	19,6	20,9	21,3	20,4	20	22,2	22,6
Energía digestible (MJ/kg MS)	21,1	14,1	13,4	14,3	10,8	n.d.	18,7	20,6
Lisina	57	34	23	20	18	16	25	25
Treonina	24	23	16	16	14	14	23	23
Metionina	21	8	4	3	3	3	5	4
Iso-leucina	32	25	16	13	13	15	27	23
Leucina	56	42	35	31	29	27	51	51
Valina	39	27	17	18	16	15	23	24
Fenilalanina	30	28	18	17	16	15	28	23
Istidina	31	16	14	11	12	10	15	18
Arginina	43	40	47	52	44	45	73	81

1: L. Luteus; 2: L. Albus; 3: L. Angustifolius; ** extraído por solventes; *descascarada; n.d.: no determinado; C: concentrado; P: proteína (Glencross, 2004; Citado por Borquez, 2008).

ANEXO 7

ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS

1. Omega 3 (Ácido alfa- linolénico)

Nombre común	Nombre del lípido	Nombre químico
Ácido alfa-linolénico (ALA)	18:3 (n-3)	octadeca-9,12,15-trienoico
Ácido estearidónico	18:4 (n-3)	octadeca-6,9,12,15-tetraenoico
Ácido eicosatetraenoico	20:4 (n-3)	eicosa-8,11,14,17-tetraenoico
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	20:5 (n-3)	eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoico
Ácido docosapentaenoico	22:5 (n-3)	docosa-7,10,13,16,19-pentaenoico
Ácido docosahexanoico (DHA)	22:6 (n-3)	docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico

2. Omega 6 (Acido linoléico)

Nombre común	Nomenclatura	Nombre químico
Ácido linoleico	18:2 (n-6)	Ácido 9,12-octadecadienoico
Ácido γ-linolénico	18:3 (n-6)	Ácido 6,9,12-octadecatrienoico
Ácido eicosadienoico	20:2 (n-6)	Ácido 11,14-eicosadienoico
Ácido dihomo-gamma-linolénico	20:3 (n-6)	Ácido 8,11,14-eicosatrienoico
Ácido araquidónico	20:4 (n-6)	Ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico
Ácido docosadienoico	22:2 (n-6)	Ácido 13,16-docosadienoico
Ácido adrenico	22:4 (n-6)	Ácido 7,10,13,16-docosatetraenoico
Ácido docosapentaenoico	22:5 (n-6)	Ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico
Ácido caléndico	18:3 (n-6)	Ácido 8E,10E,12Z-octadecatrienoico

3. Omega 9 (Ácido oleico)

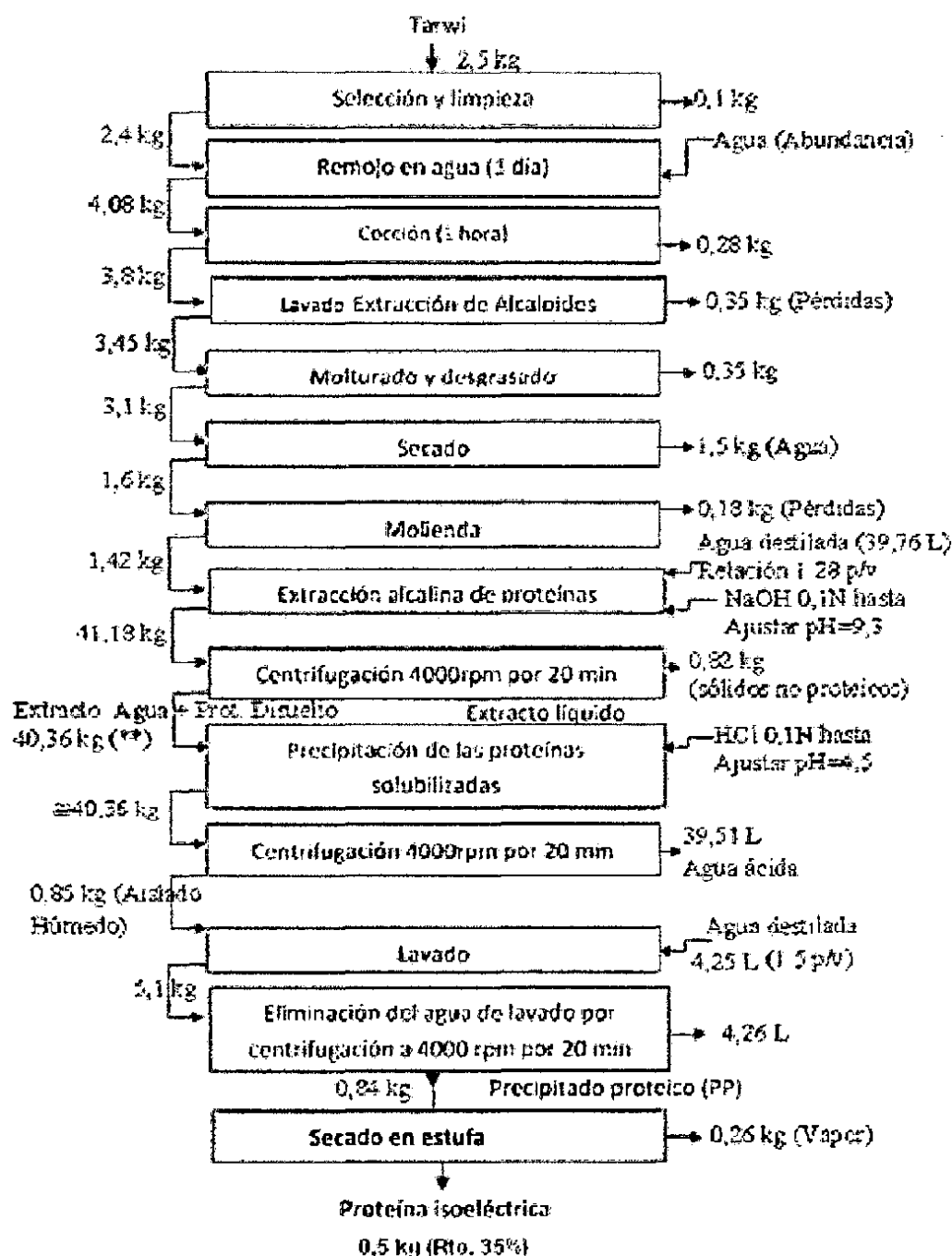
Nombre común	Nomenclatura	Nombre químico
Ácido oleico	18:1 (n-9)	9-ácido octadecenoico
Ácido eicosenoico	20:1 (n-9)	11-ácido eicosenoico
Ácido eicosatrienoico	20:3 (n-9)	5,8,11-ácido eicosatrienoico
Ácido erúico	22:1 (n-9)	13-ácido docosenoico
Ácido nervónico	24:1 (n-9)	15-ácido tetracosenoico

Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_graso_poliinsaturado

ANEXO 8

Balance de masa del proceso

La siguiente gráfica muestra el diagrama de flujo con valores del balance de masa, los cuales se han realizado en base de rendimientos, análisis proximales y pesadas. Los valores pueden variar dependiendo de la materia prima y del proceso.



** La harina tiene más de 45% de proteína, los cuales están solubilizados en la solución alcalina

ANEXO 9
Fórmulas del ANOVA para diseño compuesto central

F de V	g. l.	SC
Términos Lineales	k	$\sum_{i=1}^k b_i (iy)^i$
X_i	1	k
Términos Cuadráticos	k	$b_0 (0y)^i + \sum_{i=1}^k b_{ii} (iiy)^i - \left(\sum_{u=1}^N y_u \right)^2 / N$
X_{ii}	1	$b_0 (0y)^i + b_{ii} (iiy)^i - \left(\sum_{u=1}^N y_u \right)^2 / N$
Términos Cruzados	$\frac{k(k-1)}{2}$	$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k b_{ij} (ijy)^i$ $i < j$
$X_i X_j$	1	$b_{ij} (ijy)^i$ $i < j$
Falta de Ajuste	$N - n_0 \frac{k(k+3)}{2}$	SC Total - SC regresión - SC Error
Error (T. C.)	$n_0 - 1$	$\sum_{u=1}^n y_{0u}^2 - \left(\sum_{u=1}^n y_{0u} \right)^2 / n_0$
Total	$N - 1$	$\sum_{u=1}^N y_u^2 - \left(\sum_{u=1}^N y_u \right)^2 / N$

Búsqueda del punto óptimo a partir de la ecuación:

$$Y = A_0 + A_1 X_1 + A_2 X_2 + A_{11} X_1^2 + A_{22} X_2^2 + A_{12} X_1 X_2$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_1} = A_1 + 2A_{11} X_1 + A_{12} X_2 = 0$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_2} = A_2 + 2A_{22} X_2 + A_{12} X_1 = 0$$

desarrollando la matriz se obtiene el punto óptimo

$$X_1 = \begin{vmatrix} A_1 & A_{12} \\ A_2 & 2A_{22} \end{vmatrix} \begin{vmatrix} 2A_{11} & A_1 \\ A_{12} & A_2 \end{vmatrix}$$

$$X_2 = \begin{vmatrix} 2A_{11} & A_1 \\ A_{12} & A_2 \end{vmatrix} \begin{vmatrix} 2A_{11} & A_1 \\ A_{12} & A_2 \end{vmatrix}$$

ANEXO 10

Plan de experimentación y resultados detallados

PE	CH				TE (°C)	Proteínas solubilizadas (%)				
	Relación 1:x	Muestra (g)	Agua (ml)	Total (g)		Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Promedio	Desv. Estandar
11	35	2,2	77,8	80,0	30	88,25	88,13	88,97	88,5	0,454
9,5	14,89	5,0	75,0	80,0	40	84,02	83,93	84,51	84,2	0,312
11	35	2,2	77,8	80,0	50	90,93	90,61	91,25	90,9	0,320
8	35	2,2	77,8	80,0	50	91,28	90,96	91,39	91,2	0,223
8	20	3,8	76,2	80,0	50	92,07	91,11	91,41	91,5	0,491
9,5	27,5	2,8	77,2	80,0	40	92,74	92,14	92,96	92,6	0,424
6,98	27,5	2,8	77,2	80,0	40	85,66	85,97	85,86	85,8	0,157
9,5	27,5	2,8	77,2	80,0	56,82	84,84	84,49	85,13	84,8	0,320
9,5	27,5	2,8	77,2	80,0	23,18	82,67	83,73	83,15	83,2	0,531
9,5	40,11	2,0	80,2	82,2	40	85,05	85,45	85,94	85,5	0,446
8	35	2,2	77,8	80,0	30	89,09	89,58	88,87	89,2	0,363
12,02	27,5	2,8	77,2	80,0	40	84,92	85,10	85,17	85,1	0,129
11	20	3,8	76,2	80,0	30	90,13	89,78	89,94	90,0	0,175
11	20	3,8	76,2	80,0	50	90,57	89,96	90,49	90,3	0,332
8	20	3,8	76,2	80,0	30	87,48	88,12	87,69	87,8	0,326
9,5	27,5	2,8	77,2	80,0	40	91,48	91,94	91,83	91,8	0,240

El ajuste de pH se realiza con HCl 0,1N y NaOH 0,1N una vez hecha la dilución

APÉNDICES

APÉNDICE 1

MÉTODOS DE ANÁLISIS

(Referencia: AOAC, 1998)

1.1. HUMEDAD

32.1.03

AOAC Official Method 925.10 Solids (Total) and Moisture in Flour Air Oven Method Final Action

[Results closely approximate those obtained by 925.09B (*see* 32.1.02)].

In cooled and weighed dish (provided with cover). 925.09A(a) (*see* 32.1.02). previously heated to $130 \pm 3^\circ$, accurately weigh ca 2 g well-mixed sample. Uncover sample, and dry dish, cover, and contents 1 h in oven provided with opening for ventilation and maintained at $130 \pm 3^\circ$. (1 h drying period begins when oven temperature is actually 130° .) Cover dish while still in oven, transfer to desiccator, and weigh soon after reaching room temperature. Report flour residue as total solids and loss in weight as moisture (indirect method).

References: JAOAC 8, 665(1925); 9, 40(1926).

1.2. GRASA

27.4.04

AOAC Official Method 945.16 Oil in Cereal Adjuncts

Petroleum Ether Extraction Method

Final Action

A. Reagent

Petroleum ether:—AOC S. Initial boiling temperature, 35–38°; dry-flask end point, 52–60°; ≥95% distilling at ≤54°, and ≤60% distilling at ≤40°; specific gravity at 60°F, 0.630–0.660; appearance, colorless; evaporation residue, ≤0.0011 g/100 mL; doctor test, sweet; Cu strip corrosion test, noncorrosive; only trace of unsaturated compounds permitted; residue in distilling flask, neutral to methyl orange; blotter strip odor test, odorless within 12 min; aromatic compounds, no nitrobenzene odor; saponification value, <1.0 mg KOH/100 mL.

Make distillation test according to ASTM method D216-54 and make blank determination by evaporating 250 mL with ca 0.25 g stearin or other hard fat (previously brought to constant weight by heating) and drying as in actual determination. Blank must be ≤3 mg.

B. Determination

(Caution: See Appendix B, safety notes on distillation, flammable solvents, and petroleum ether.)

Accurately weigh 5–10 g sample ground as in 935.30D (see 27.3.07). Without previous drying, extract in Soxhlet or other suitable extractor with petroleum ether for ≤6 h. Filter extract through small, hardened paper into weighed vessel, washing paper finally with small portion of hot fresh solvent. Distil or evaporate solvent at temperature ≤100° and dry vessel containing residue in air oven 1 h at 100–105°. Report as % oil to second decimal place.

1.3. PROTEINAS

12.1.07

AOAC Official Method 960.52★ Microchemical Determination of Nitrogen

Micro-Kjeldahl Method

First Action 1960

Final Action 1961

Surplus 1994

AOAC-AACC Method

(Not applicable to material containing N–N or N–O linkages.)

A. Reagents

- (a) *Sulfuric acid*.—Specific gravity 1.84. N-free.
- (b) *Mercuric oxide*.—N-free.
- (c) *Potassium sulfate*.—N-free.
- (d) *Sodium hydroxide-sodium thiosulfate solution*.—Dissolve 60 g NaOH and 5 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in H_2O and dilute to 100 mL or add 25 mL 25% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ to 100 mL 50% NaOH solution.
- (e) *Boric acid solution*.—Saturated solution.
- (f) *Indicator solution*.—(1) *Methyl red-methylene blue*.—Mix 2 parts 0.2% alcoholic methyl red solution with 1 part 0.2% alcoholic methylene blue solution; or (2) *Methyl red-bromocresol green solution*.—Mix 1 part 0.2% alcoholic methyl red solution with 5 parts 0.2% alcoholic bromocresol green solution.
- (g) *Hydrochloric acid*.—0.02N. Prepare as in 936.15A (see A.1.06) and standardize as in 936.15E–G (see A.1.06)

B. Apparatus

- (a) *Digestion rack*.—With either gas or electric heaters which will supply enough heat to 30 mL flask to cause 15 mL H_2O at 25° to come to rolling boil in ≥ 2 but < 3 min.
- (b) *Distillation apparatus*.—One-piece or Parnas-Wagner distillation apparatus recommended by Committee on Microchemical Apparatus. ACS.
- (c) *Digestion flasks*.—Use 30 mL regular Kjeldahl or Soltys-type flasks [Reference: Anal. Chem. 23, 523(1951)]. For small samples, 10 mL Kjeldahl flasks may be used.

C. Determination

Weigh sample requiring 3–10 mL 0.01 or 0.02N HCl and transfer to 30 mL digestion flask. If sample weight is <10 mg, use microchemical balance (maximum weight 100 mg dry organic matter). Use charging tube for dry solids, porcelain boat for sticky solids or nonvolatile liquids, and capillary or capsule for volatile liquids. Add 1.9 ± 0.1 g K_2SO_4 , 40 ± 10 mg HgO , and 2.0 ± 0.1 mL H_2SO_4 . If sample weight is >15 mg, add additional 0.1 mL H_2SO_4 for each 10 mg dry organic matter >15 mg. Make certain that acid has specific gravity ≥ 1.84 if sample contains nitriles. (10 mL flasks and $\frac{1}{2}$ quantities of reagents may be used for samples <7 mg.) Add boiling chips which pass No. 10 sieve. If boiling time for digestion rack heaters is 2–2.5 min, digest 1 h after all H_2O is distilled and acid comes to true boil; if boiling time is 2.5–3 min, digest 1.5 h. (Digest 0.5 h if sample is known to contain no refractory ring N.)

Cool, add minimum volume of H_2O to dissolve solids, cool, and place thin film of Vaseline on rim of flask. Transfer digest and boiling chips to distillation apparatus and rinse flask 5 or 6 times with 1–2 mL portions H_2O . Place 125 mL Phillips beaker or Erlenmeyer containing 5 mL saturated H_3BO_3 solution and 2–4 drops indicator under condenser with tip extending below surface of solution. Add 8–10 mL NaOH- $Na_2S_2O_3$ solution to still, collect ca 15 mL distillate, and dilute to ca 50 mL. (Use 2.5 mL H_3BO_3 and 1–2 drops indicator, and dilute to ca 25 mL if 0.01N HCl is to be used.) Titrate to end point. Make blank determination and calculate.

$$\%N = [(mL\ HCl - mL\ blank) \times normality \times 14.007 \times 100] / mg\ sample$$

References: JAOAC 32, 561(1949); 33, 179(1950); 43, 689(1960).

CAS-7727-37-9 (nitrogen)

1.4. FIBRA

4.6.01

AOAC Official Method 962.09
Fiber (Crude) in Animal Feed and Pet Food
Ceramic Fiber Filter Method
First Action 1962
Final Action 1971
Revised First Action 1982
AOCS-AOAC Method

A. Principle

Crude fiber is loss on ignition of dried residue remaining after digestion of sample with 1.25% H_2SO_4 and 1.25% NaOH solutions under specific conditions. Method is applicable to grains, meals, flours, feeds, fiber-bearing material, and pet foods from which fat can be extracted to leave workable residue.

B. Reagents

(a) *Sulfuric acid solution*.— $0.255 \pm 0.005\text{N}$. 1.25 g H_2SO_4 /100 mL. Concentration must be checked by titration.

(b) *Sodium hydroxide solution*.— $0.313 \pm 0.005\text{N}$. 1.25 g NaOH /100 mL, free, or nearly so, from Na_2CO_3 . Concentration must be checked by titration.

(c) *Prepared ceramic fiber*.—Place 60 g ceramic fiber (Cerafiber, 8 lb/cu ft, E.J. Bartell Co., 700 Powell Ave. S.W., Renton, WA 98055) in blender, add 800 mL H_2O , and blend 1 min at low speed.

Determine blank by treating ca 2 g (dry weight) of prepared ceramic fiber with acid and alkali as in determination. Correct crude fiber results for any blank, which should be negligible (ca 2 mg).

(d) *Alcohol*.—95% or reagent alcohol, methanol, or isopropanol.

(e) *Antifoam*.—Dow Corning Corp. Antifoam A compound diluted 1 ÷ 4 with mineral spirits or petroleum ether, or H_2O -diluted Antifoam B Emulsion (1 ÷ 4). Do not use Antifoam Spray.

(f) *Bumping chips or granules*.—Broken Alundum crucibles or equivalent granules (RR Alundum 90 mesh, Norton Co., 1 New Bond St. Worcester, MA 01606) are satisfactory.

C. Apparatus

(a) *Digestion apparatus*.—With condenser to fit 600 mL beaker, and hot plate adjustable to temperature that will bring 200 mL H_2O at 25° to rolling boil in 15 ± 2 min. (Available from Labconco Corp., 8811 Prospect Ave. Kansas City, MO 64132.)

(b) *Ashing dishes*.—Silica, Vitreosil 70 $\times$ 16 mm; or porcelain, Coors Ceramics Co., 600 9th St. Golden, CO 80401, No. 60230, or equivalent.

(c) *Desiccator*.—With efficient desiccant such as 4–8 mesh Drierite (CaCl_2 is not satisfactory).

(d) *Filtering device*.—With No. 200 type 304 or 316 stainless steel screen (W.S. Tyler Inc., 8570 Tyler Blvd., Mentor, OH 44060), easily washed free of digested residue. Either Oklahoma State filter screen (see Figure 962.09A; available from Labconco Corp.) or modified California plastic Büchner (see Figure 962.09B; consists of 2 piece polypropylene plastic funnel manufactured by Nalge Co., 75 Panorama Creek Dr. PO Box 20365, Rochester, NY 14602, Cat. No. 4280-0700, 70 mm [without No. 200 screen], or equivalent [also available from Labconco Corp.], Seal screen to filtering surface of funnel, using small-tip soldering iron).

(e) *Suction filter*.—To accommodate filtering devices. Attach suction flask to trap in line with aspirator or other source of vacuum with valve to break vacuum.

(f) *Liquid preheater*.—For preheating H_2O , 1.25% H_2SO_4 , and 1.25% NaOH solutions to bp of H_2O . Convenient system, shown in Figure 962.09C, consists of sheet Cu tank with 3 coils of $\frac{3}{8}$ " (10 mm) od Cu tubing, 12.5' (3.8 m) long. Solder inlets and outlets where tubing passes through tank walls. Connect to reflux condenser and fill with H_2O . Keep H_2O boiling with two 750 watt thermostatically controlled hot plates. Use Tygon for inlet leads to reservoirs of H_2O , acid, and alkali; use gum rubber tubing for outlets. Capacity of preheater is adequate for 60 analyses in 8 h.

D. Preparation of Sample

Reduce sample (riffle is suitable) to 100 g and place portion in sealed container for H₂O determination. Immediately determine H₂O. Grind remainder to uniform fineness. (Weber mill with screen 0.033–0.040" [No. 18 or 20], Micro mill [Hosokawa Micron Powder Systems, Inc., 10 Chatham Rd, Summit, NJ 07901] with screen 1/25–1/16" [No. 18–No. 12], and Wiley mill with 1 mm [No. 18] screen give comparable fineness.) Since most materials lose moisture during grinding, determine H₂O on ground sample at same time sample is taken for crude fiber determination.

E. Determination

Extract 2 g ground material with ether or petroleum ether (initial boiling temperature, 35–38°; dry-flask end point, 52–60°; ≥95% distilling <54°, and ≤60% distilling <40°; specific gravity at 60°F, 0.630–0.660; evaporation residue ≤0.002% by weight). If fat is <1%, extraction may be omitted. Transfer to 600 mL beaker, avoiding fiber contamination from paper or brush. Add ca 1.5–2.0 g dry weight of prepared ceramic fiber, 200 mL boiling 1.25% H₂SO₄, and 1 drop diluted antifoam. (Excess antifoam may give high results; use only if necessary to control foaming.) Bumping chips or granules may also be added. If extremely fine materials are being analyzed and filters are to be pre-coated with a filter mat, prepare two beakers of ceramic fiber mixture for each sample as follows: Add 1.5 g dry weight of prepared ceramic fiber to each 100 mL beaker, then add 60–75 mL 0.255*N* sulfuric acid to each beaker and allow to soak until precoat step. Place beaker on digestion apparatus with preadjusted hot plate and boil exactly 30 min, rotating beaker periodically to keep solids from adhering to sides. Remove beaker, and filter as in (a) or (b).

(a) *Using Oklahoma filter screen.*—(1) (Extremely fine materials only.) Skip to step (2) if no filter precoating is necessary. Precoat the filter screen as follows: Attach Oklahoma filter screen to vacuum flask. Turn on suction. Mix well the 60–75 mL 0.255*N* sulfuric acid and 1.5 g ceramic fiber mixture previously prepared. Insert the screen into beaker keeping face of screen just under the surface of liquid until all liquid is removed. Without breaking suction, proceed to step (2).

(2) Turn on suction and insert screen (precoated with ceramic fiber if extremely fine materials are being analyzed) into beaker, keeping face of screen just under surface of liquid until all liquid is removed. Without breaking suction or raising filter, add 50–75 mL boiling H₂O. (Work rapidly to keep mat from becoming dry.) Remove filter from beaker and

drain all H_2O from line by raising above trap level. Return mat and residue to beaker by breaking suction and blowing back. Add 200 mL boiling 1.25% NaOH and boil exactly 30 min. Remove beaker.

(3) (Extremely fine materials only.) Skip to step (4) if no filter precoating is necessary. Precoat the filter screen using the second beaker of ceramic mixture as described in E(a)(1).

(4) Filter as in E(a)(2). Without breaking suction, wash with 25 mL boiling 1.25% H_2SO_4 and three 50 mL portions boiling H_2O . Drain free of excess H_2O by raising filter. Lower filter into beaker and wash with 25 mL alcohol. Drain line, break suction, and remove mat by blowing back through filter screen into ashing dish. Proceed as in E(c).

(b) *Using California Büchner.*—(1) (Extremely fine materials only.) Skip to step (2) if no filter precoating is necessary. Precoat the filter screen as follows: Attach California Büchner to vacuum flask. Funnel must be level. Do not turn on vacuum. (Note: California Büchner may be held level above vacuum flask if vacuum cannot be turned off. Mix well the 60–75 mL 0.255N sulfuric acid and 1.5 g

ceramic fiber mixture previously prepared. Pour ceramic fiber/acid slurry into California Büchner. Allow to settle 5–10 s. Turn on minimum vacuum, just sufficient to form ceramic fiber “pad.”

(2) Filter contents of beaker through Büchner (precoated with ceramic fiber if extremely fine materials are being analyzed), rinse beaker with 50–75 mL boiling H_2O , and wash through Büchner. Repeat with three 50 mL portions H_2O , and suck dry. Remove mat and residue by snapping bottom of Büchner against white top while covering stem with thumb or forefinger and replace in beaker. Add 200 mL boiling 1.25% NaOH and boil exactly 30 min. Remove beaker.

(3) (Extremely fine materials only.) Skip to step (4) if no filter precoating is necessary. Precoat the filter screen using the second beaker of ceramic mixture as described in E(b)(1).

(4) Filter as in E(b)(2). Wash with 25 mL boiling 1.25% H_2SO_4 , three 50 mL portions H_2O , and 25 mL alcohol. Remove mat and residue; transfer to ashing dish.

(c) *Treatment of residue.*—Dry mat and residue 2 h at $130 \pm 2^\circ$. Cool in desiccator and weigh. Ignite 30 min at $600 \pm 15^\circ$. Cool in desiccator and reweigh.

$$\begin{aligned} \text{\% Crude fiber in ground sample} &= C \\ &= (\text{Loss in weight on ignition} - \text{loss in weight} \\ &\quad \text{of ceramic fiber blank}) \times 100 / \text{weight sample} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{\% Crude fiber on desired moisture basis} &= C \\ &\quad \times (100 - \text{\% moisture desired}) / \\ &\quad (100 - \text{\% moisture in ground sample}) \end{aligned}$$

Report results to 0.1%.

References: JAOAC 42, 222(1959); 43, 335(1960); 44, 567(1961); 45, 578(1962); 65, 265(1982).

Revised: March 1998

1.5. CENIZA

32.1.05

AOAC Official Method 923.03 Ash of Flour Direct Method Final Action

Weigh 3–5 g well-mixed sample into shallow, relatively broad ashing dish that has been ignited, cooled in desiccator, and weighed soon after reaching room temperature. Ignite in furnace at ca 550° (dull red) until light gray ash results, or to constant weight. Cool in desiccator and weigh soon after reaching room temperature. Reignited CaO is satisfactory drying agent for desiccator.

Reference: JAOAC 7, 132(1923).

Fuente: AOAC, (1998).

APÉNDICE 2

Propiedades termicas del tarwi, harina de tarwi y asilado de tarwi

T ^a (°C)	Tarwi (<i>Lupinus mutabilis</i>)				Harina de tarwi deslupinizada y semi-desgrasada				Aislado proteico de tarwi (92% de proteína)			
	ρ (kg/m ³)	k (W/m ² C)	C _p (kJ/kg°C)	ϕ (m ² /s)	ρ (kg/m ³)	k (W/m ² C)	C _p (kJ/kg°C)	ϕ (m ² /s)	ρ (kg/m ³)	k (W/m ² C)	C _p (kJ/kg°C)	ϕ (m ² /s)
10	1261,175	0,243	2,05699	8,97E-08	1395,6487	0,2578	2,0075	8,82E-08	1294,76620	0,21725	2,13214	7,82E-08
18	1257,847	0,256	2,06739	9,27E-08	1392,3093	0,2681	2,0172	9,17E-08	1290,94350	0,22651	2,14136	8,17E-08
26	1254,453	0,268	2,07744	9,56E-08	1388,8713	0,2780	2,0267	9,5E-08	1287,08070	0,23541	2,15044	8,5E-08
34	1250,995	0,280	2,08716	9,82E-08	1385,3353	0,2874	2,0360	9,81E-08	1283,17810	0,24394	2,15937	8,81E-08
42	1247,471	0,291	2,09654	1,007E-07	1381,7017	0,2965	2,0450	1,01E-07	1279,23600	0,25211	2,16816	9,11E-08
50	1243,883	0,302	2,10558	1,03E-07	1377,9708	0,3051	2,0537	1,036E-07	1275,25460	0,25990	2,17680	9,38E-08
58	1240,231	0,313	2,11428	1,052E-07	1374,1425	0,3133	2,0621	1,06E-07	1271,23400	0,26733	2,18531	9,63E-08
62	1238,381	0,319	2,11850	1,062E-07	1372,1917	0,3172	2,0663	1,072E-07	1269,20900	0,27090	2,18950	9,75E-08
70	1234,631	0,329	2,12670	1,081E-07	1368,2166	0,3247	2,0743	1,093E-07	1265,12960	0,27778	2,19779	9,98E-08
74	1232,732	0,334	2,13067	1,089E-07	1366,1922	0,3284	2,0783	1,102E-07	1263,07500	0,28108	2,20188	1,008E-07
78	1230,817	0,339	2,13456	1,097E-07	1364,1429	0,3319	2,0821	1,111E-07	1261,01060	0,28428	2,20594	1,019E-07
82	1228,885	0,344	2,13836	1,105E-07	1362,0689	0,3353	2,0859	1,12E-07	1258,93620	0,28740	2,20995	1,028E-07
86	1226,937	0,348	2,14208	1,112E-07	1359,9698	0,3385	2,0897	1,128E-07	1256,85190	0,29042	2,21394	1,037E-07
90	1224,972	0,353	2,14571	1,119E-07	1357,8455	0,3417	2,0933	1,136E-07	1254,75740	0,29336	2,21788	1,046E-07
94	1222,990	0,358	2,14926	1,126E-07	1355,6959	0,3448	2,0969	1,143E-07	1252,65290	0,29620	2,22179	1,054E-07
98	1220,991	0,362	2,15272	1,132E-07	1353,5207	0,3478	2,1005	1,149E-07	1250,53820	0,29895	2,22567	1,062E-07
100	1219,986	0,364	2,15442	1,135E-07	1352,4235	0,3492	2,1022	1,152E-07	1249,47700	0,30029	2,22759	1,065E-07

Fuente: Datos generados por un programa informático (OptiCad2012, V. 5.6) en base a las ecuaciones de Choi y Okos (1986).