

# Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica



## “OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA, CARACTERIZACIÓN ELECTROFORÉTICA Y DIGESTIBILIDAD DEL AISLADO PROTEICO DEL RESIDUO AGROINDUSTRIAL DE *Plukenetia volubilis* (SACHA INCHI)”

Tesis para optar al Título Profesional de  
Ingeniero Biotecnólogo presentada por:

**Autor:**

**Keny Davi Alvarado Quiroz**

**Asesor:**

**Dr. Jaime Cárdenas García**

Arequipa – Perú

2014

## Agradecimientos

Al programa profesional de Ingeniería Biotecnológica de la Universidad Católica Santa María por la formación adquirida.

Al Dr. Fredy Zegarra Aragón docente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica Santa María por la asesoría y facilidades brindadas en el proyecto de investigación.

Al Dr. José Villanueva docente y director del programa profesional de Ingeniería Biotecnológica por el apoyo brindado durante la realización del proyecto de tesis.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica Santa María por la ayuda brindada en el desarrollo del presente trabajo.

A los encargados de los laboratorios del Bloque H de la Universidad Católica Santa María por su colaboración y la atención que me brindaron a lo largo del desarrollo de mi proyecto.

A Carla Palomino Durand por el apoyo brindado en la presentación del presente documento.

A mi familia por el apoyo brindado tanto en mi formación académica, como en el desarrollo de este trabajo.

*“Mucho mejor atreverse a hacer cosas grandes, a obtener triunfos gloriosos, aun cuando matizados con fracasos, que formar en las filas de aquellos pobres de espíritu que ni gozan mucho ni sufren mucho porque viven en el crepúsculo gris que no conoce la victoria ni la derrota.”*

*Theodore Roosevelt*



*Dedicada con mucho cariño a mis Padres y Abuelos, como un pequeño gesto de agradecimiento por enseñarme siempre a seguir y nunca darme por vencido, pero sobre todo por la Vida, Amor y Ejemplo que me han brindado y siguen brindando a lo largo de este camino.*

## Índice General

|                                       |              |
|---------------------------------------|--------------|
| <b>Abreviaturas .....</b>             | <b>V</b>     |
| <b>Resumen .....</b>                  | <b>VII</b>   |
| <b>Summary .....</b>                  | <b>IX</b>    |
| <b>Introducción .....</b>             | <b>- 1 -</b> |
| <b>Justificación .....</b>            | <b>- 3 -</b> |
| • Impacto Social.....                 | - 4 -        |
| • Impacto a la Salud Humana.....      | - 4 -        |
| • Impacto Ambiental.....              | - 4 -        |
| <b>Capítulo I</b>                     |              |
| <b>Objetivos .....</b>                | <b>- 5 -</b> |
| 1.1. Objetivo General .....           | - 5 -        |
| 1.2. Objetivos Específicos.....       | - 5 -        |
| <b>Capítulo II</b>                    |              |
| <b>Hipótesis .....</b>                | <b>- 6 -</b> |
| <b>Capítulo III</b>                   |              |
| <b>Marco Teórico .....</b>            | <b>- 7 -</b> |
| 3.1. Oleaginosas .....                | - 7 -        |
| 3.2. Sacha Inchi .....                | - 8 -        |
| 3.2.1. Clasificación taxonómica ..... | - 9 -        |
| 3.2.2. Constituyentes químicos: ..... | - 10 -       |

|   |        |
|---|--------|
| 3.2.2.1. Semilla .....  | - 10 - |
| 3.2.2.1.1. Proteínas .....  | - 10 - |
| 3.2.2.1.2. Aminoácidos.....   | - 11 - |
| 3.2.2.1.3. Minerales .....  | - 12 - |
| 3.2.2.1.4. Fibra.....   | - 12 - |
| 3.2.2.1.5. Grasas .....   | - 12 - |
| 3.2.3. <i>Constituyentes químicos de la torta o sub producto de Sacha Inchi:</i> ....   |        |
| .....   | - 13 - |
| 3.2.4. Uso Tradicional.....   | - 14 - |
| 3.3. Métodos de obtención de proteínas.....   | - 14 - |
| 3.3.1. Proteínas.....   | - 14 - |
| 3.3.2. Extracción y purificación de proteínas.....  | - 16 - |
| 3.3.2.1. Concentrados proteicos .....   | - 17 - |
| 3.3.2.1.1. Extracción de compuestos no proteicos mediante el uso de agua<br>ajustada al punto isoelectrico de las proteínas. .... | - 17 - |
| 3.3.2.1.2. Extracción de compuestos no proteicos con agua tras<br>tratamiento térmico. ....                                       | - 17 - |
| 3.3.2.1.3. Extracción de compuestos no proteicos mediante soluciones<br>hidroalcohólicas .....                                    | - 18 - |
| 3.3.2.2. Aislados proteicos .....   | - 19 - |
| 3.3.2.2.1. Extracción alcalina/precipitación isoelectrica .....   | - 19 - |
| 3.3.2.2.2. Extracción ácida .....   | - 20 - |
| 3.3.2.2.3. Extracción con sales (micelización) .....  | - 20 - |
| 3.3.2.2.4. Ultrafiltración .....  | - 20 - |
| 3.4. Absorción de agua y grasa .....  | - 21 - |
| 3.5. Aplicaciones de aislados proteicos.....  | - 22 - |

## Capítulo IV

### **Materiales y Métodos.....- 24 -**

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| 4.1. Materiales.....            | - 24 - |
| 4.1.1. Material biológico ..... | - 24 - |
| 4.1.2. Material de Vidrio.....  | - 24 - |

|          |   |        |
|----------|---|--------|
| 4.1.3.   | Reactivos .....   | - 25 - |
| 4.1.4.   | Equipos.....  | - 25 - |
| 4.1.5.   | Otros .....   | - 26 - |
| 4.2.     | Métodos.....  | - 26 - |
| 4.2.1.   | Obtención de harina .....   | - 26 - |
| 4.2.2.   | Desoleagenizado de la harina o torta.....   | - 27 - |
| 4.2.3.   | Determinación de parámetros óptimos de extracción de proteínas-   | 28 -   |
| 4.2.3.1. | pH.....   | - 28 - |
| 4.2.3.2. | Relación materia prima / solvente.....  | - 28 - |
| 4.2.3.3. | Temperatura .....   | - 29 - |
| 4.2.3.4. | Tiempo .....  | - 29 - |
| 4.2.3.5. | pH óptimo para la recuperación de las proteínas: Precipitación<br>ácida .....   | - 30 - |
| 4.2.4.   | Obtención del aislado proteico.....   | - 30 - |
| 4.2.4.1. | Extracción alcalina .....   | - 31 - |
| 4.2.4.2. | Centrifugación.....   | - 32 - |
| 4.2.4.3. | Precipitación de las proteínas solubilizadas.....   | - 32 - |
| 4.2.4.4. | Centrifugación.....   | - 32 - |
| 4.2.4.5. | Lavado.....   | - 32 - |
| 4.2.4.6. | Centrifugación.....   | - 32 - |
| 4.2.4.7. | Secado .....  | - 32 - |
| 4.2.5.   | Determinación del contenido de proteínas totales .....  | - 33 - |
| 4.2.6.   | Determinación composición química proximal de los aislados<br>proteicos obtenidos .....   | - 33 - |
| 4.2.7.   | Perfil de proteínas por solubilidad .....   | - 34 - |
| 4.2.8.   | Absorción de agua.....  | - 35 - |
| 4.2.9.   | Absorción de grasa.....   | - 35 - |
| 4.2.10.  | Análisis y caracterización de las proteínas que integran los aislados<br>proteicos mediante Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS – PAGE)- | 36 -   |
| 4.2.11.  | Determinación de la digestibilidad proteica <i>in vitro</i> .....   | - 37 - |
| 4.2.12.  | Costo de producción y rentabilidad del proceso .....  | - 38 - |
| 4.2.13.  | Análisis Estadístico .....  | - 39 - |

## Capítulo V

### Resultados y Discusión.....- 40 -

- 5.1. Composición químico proximal del residuo agroindustrial de Sacha Inchi ..  
.....- 40 -
- 5.2. Parámetros óptimos de extracción de las proteínas del residuo agroindustrial de Sacha Inchi. ....- 41 -
  - 5.2.1. Parámetro Óptimo de pH .....- 41 -
  - 5.2.2. Parámetro óptimo de la relación materia prima/solvente.....- 43 -
  - 5.2.3. Parámetro óptimo de temperatura .....- 44 -
  - 5.2.4. Parámetro óptimo de tiempo .....- 45 -
  - 5.2.5. Parámetro óptimo de recuperación de proteínas: precipitación ácida....  
.....- 47 -
- 5.3. Composición químico proximal de los aislados proteicos obtenidos ....- 48 -
- 5.4. Perfil de proteínas por solubilidad .....- 51 -
- 5.5. Capacidad de absorción de agua .....- 53 -
- 5.6. Capacidad de absorción de grasa .....- 54 -
- 5.7. Análisis y caracterización de las proteínas que integran los aislados proteicos mediante SDS-PAGE .....- 56 -
- 5.8. Digestibilidad *in vitro* del aislado proteico de Sacha Inchi.....- 58 -
- 5.9. Costo de producción del aislado proteico de Sacha Inchi.....- 59 -

## Capítulo VI

### Conclusiones .....- 62 -

### Recomendaciones .....- 63 -

### Bibliografía .....- 64 -

### Anexos .....- 69 -

- Anexo 1: Método Biuret para determinación de proteínas .....- 69 -

Anexo 2: NMX-F-068-S-1980. Alimentos. Determinación de proteínas. Foods. Determination of proteins. Normas Mexicanas. Dirección General De Normas.....  
.....- 71 -

Anexo 3 Alimentos Cocidos de Reconstitución Instantánea. Determinación de cenizas. Método gravimétrico NPT 209.265:2001 .....- 74 -

Anexo 4: NMX-F-428-1982. Alimentos. Determinación de Humedad (Método Rápido de la Termobalanza). Foods. Determination of Moisture (Thermobalance Rapid Method). Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.....- 75 -

Anexo 5: Alimentos Cocidos de Reconstitución Instantánea. Papilla. Enriquecido lácteo. Determinación de grasa. Método gravimétrico 209.263:2001 .....- 76 -

Anexo 6: Cereales y Menstras. Determinación de Fibra Cruda NPT 209.003.1980  
.....- 79 -

Anexo 7: Método de Laemli para Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS PAGE).....- 81 -

Anexo 8: Marcador de Peso molecular: SeeBlue.....- 86 -

Anexo 9: Electroforesis SDS PAGE del fraccionamiento de las proteínas de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis L.*).....- 87 -

## Índice de Tablas

|   |      |
|---|------|
| Tabla 1: Perfil de aminoácidos de la proteína de Sacha Inchi comparada con otras proteínas de semillas oleaginosas. ....                  | 11 - |
| Tabla 2: Composición química promedio de la semilla de Sacha Inchi .....  | 13 - |
| Tabla 3: Composición química de la torta de Sacha Inchi.....  | 13 - |
| Tabla 4: Análisis proximal del residuo agroindustrial de Sacha Inchi.....   | 40 - |
| Tabla 5: Efecto del pH en la extracción de proteínas de los residuos agroindustriales de Sacha Inchi .....                                | 42 - |
| Tabla 6: Influencia de la relación materia prima/solvente en la extracción de proteína de residuos agroindustriales de Sacha Inchi.....   | 43 - |
| Tabla 7: Efecto de la temperatura en la extracción de proteínas de los residuos agroindustriales de Sacha Inchi.....                      | 45 - |
| Tabla 8: Efecto del tiempo en la extracción de proteínas de los residuos agroindustriales de Sacha Inchi.....                             | 46 - |
| Tabla 9: Influencia del pH en la recuperación de las proteínas de los residuos agroindustriales de Sacha Inchi, se trabajó a 30 min ..... | 47 - |
| Tabla 10: Propiedades organolépticas del aislado proteico del residuo agroindustrial de Sacha Inchi .....                                 | 49 - |
| Tabla 11: Composición química proximal del aislado proteico de Sacha Inchi ....   | 50 - |
| Tabla 12: Fracciones proteicas en el residuo agroindustrial de Sacha Inchi y el aislado proteico de Sacha Inchi.....                      | 51 - |
| Tabla 13: Capacidad de absorción de agua del aislado proteico de Sacha Inchi y de los aislados de otros productos alimenticios .....      | 53 - |
| Tabla 14: Capacidad de absorción de grasas del aislado proteico de Sacha Inchi y de los aislados de otros productos alimenticios .....    | 55 - |

Tabla 15: Digestibilidad in vitro de la proteína del aislado obtenido de Sacha Inchi,  
comparada con la digestibilidad de Sacha Inchi .....- 58 -

Tabla 16: Costo de producción del aislado proteico de Sacha Inchi.....- 60 -

Tabla 17: Costo de producción de diferentes aislados proteicos .....- 61 -



## Índice de Ilustraciones

|  |        |
|--|--------|
| Figura 1: Semilla de Sacha Inchi .....   | - 9 -  |
| Figura 2: Estructura molecular de la albúmina .....  | - 10 - |
| Figura 3: Elaboración de aislados proteicos a partir de harinas o concentrados proteicos mediante precipitación isoelectrica y ultrafiltración. ....                 | - 21 - |
| Figura 4: Secado de la torta de Sacha Inchi .....  | - 27 - |
| Figura 5: Solubilización de la proteína de Sacha Inchi.....  | - 29 - |
| Figura 6: Flujo de operaciones para la obtención de aislado proteico de Sacha Inchi... ..  | - 31 - |
| Figura 7: Procedimiento para solubilización de proteínas .....   | - 35 - |
| Figura 8: Composición proximal de los residuos agroindustriales de Sacha Inchi en comparación con las datos establecidos por Pascual & Mejia (2000) .....            | - 41 - |
| Figura 9: Influencia del pH en la extracción de proteínas de Sacha Inchi.....  | - 42 - |
| Figura 10: Influencia de la relacion materia prima/ solvente en la extraccion de proteinas de Sacha Inchi.....   | - 44 - |
| Figura 11: Influencia de la temperatura en la extracción de proteína de Sacha Inchi ... ..   | - 45 - |
| Figura 12: Influencia del tiempo en la extracción de proteínas de Sacha Inchi.....   | - 46 - |
| Figura 13: Influencia del pH en la recuperación de proteínas de Sacha Inchi a 30 min. ....   | - 48 - |
| Figura 14: Proteína de Sacha Inchi obtenida.....   | - 49 - |
| Figura 15: Composición proximal del aislado proteico de Sacha Inchi en comparación con la composición proximal de los residuos agroindustriales de Sacha Inchi ..... | - 50 - |
| Figura 16: Fracciones proteicas en el aislado proteico de Sacha Inchi.....   | - 52 - |
| Figura 17: Comparación de la capacidad de absorción de agua del aislado proteico de Sacha Inchi con respecto a otros productos alimenticios.....                     | - 54 - |
| Figura 18: Comparación de la capacidad de absorción de grasas del aislado proteico de Sacha Inchi con respecto a otros productos alimenticios .....                  | - 55 - |

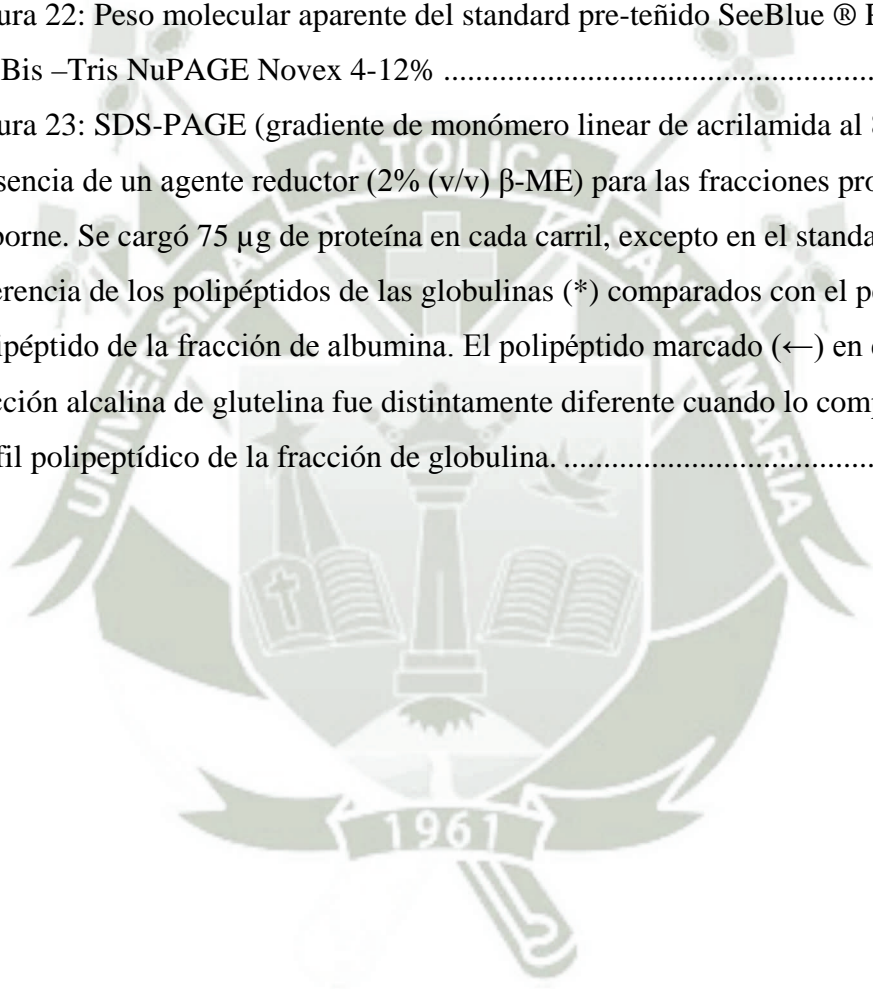
Figura 19: Electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10%. (A) Residuo agroindustrial de Sacha Inchi; (B) Harina desoleagenizada de Sacha Inchi; (C) Aislado proteico.\*Marcador de Peso molecular: SeeBlue® Plus2 (Anexo 8) ..... - 57 -

Figura 20: Proceso de producción del aislado proteico del residuo agroindustrial de Sacha Inchi ..... - 59 -

Figura 21: Distribución de los costos de producción del aislado proteico del residuo agroindustrial de Sacha Inchi ..... - 60 -

Figura 22: Peso molecular aparente del standard pre-teñido SeeBlue ® Plus2 en un gel Bis –Tris NuPAGE Novex 4-12% ..... - 86 -

Figura 23: SDS-PAGE (gradiente de monómero lineal de acrilamida al 8-25%) en presencia de un agente reductor (2% (v/v)  $\beta$ -ME) para las fracciones proteicas de Osborne. Se cargó 75  $\mu$ g de proteína en cada carril, excepto en el standard. Nótese la diferencia de los polipéptidos de las globulinas (\*) comparados con el perfil del polipéptido de la fracción de albumina. El polipéptido marcado ( $\leftarrow$ ) en el perfil de la fracción alcalina de glutelina fue distintamente diferente cuando lo comparan con el perfil polipeptídico de la fracción de globulina. .... - 87 -



## Abreviaturas

**μL:** Micro litros

**Ala:** Alanina

**Arg:** Arginina

**Asp:** Asparagina

**ClNa:** Cloruro de Sodio

**Cys:** Cisteína

**Da:** Dalton

**FAO:** Organización de Agricultura y  
Alimentos

**FDA:** Administración de Alimentos y  
Medicamentos.

**g:** gramos

**Glu:** Gluteína

**Gly:** Glicina

**Ha:** Hectárea

**HCl:** Ácido Clorhídrico

**His:** Histidina

**Ile:** Isoleucina

**Leu:** Leucina

**Lys:** Lisina

**m.s.n.m:** Metros sobre el nivel del  
mar.

**Met:** Metionina

**mg:** miligramos

**mL:** Mililitros

**MP/S:** Materia Prima/ Solvente

**N:** Normalidad

**NaOH:** Hidróxido de Sodio

**NMX:** Normas Mexicanas

**NTP:** Norma Técnica Peruana

**P. total%:** Porcentaje de Proteína  
Total

**P.A:** Para Análisis

**Pa:** Pascal

**Phe:** Fenilalanina

**pI:** Punto Isoeléctrico

**PM:** Peso Molecular

**Pro:** Prolina

**Q.P:** Químicamente Puro

**Tyr:** Tirosina

**RPM:** Revoluciones por Minuto

**UNU:** Universidad de las Naciones Unidas

**SDS – PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

**V:** Voltios

**v:** Volumen

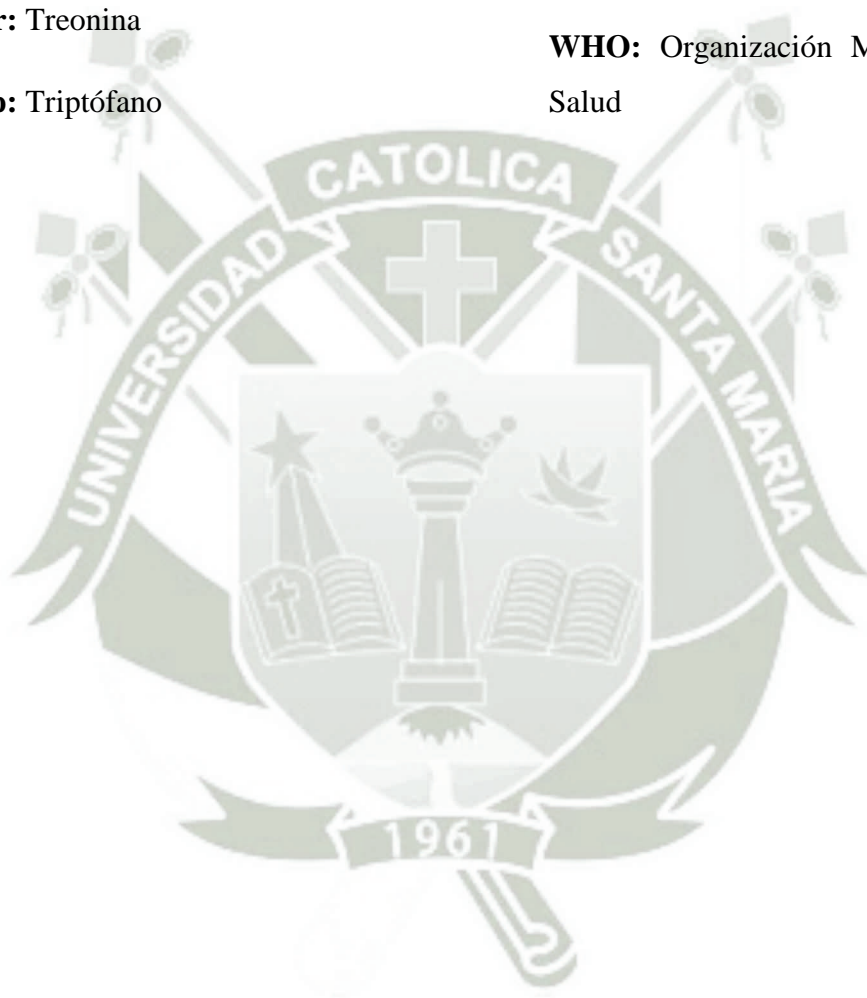
**Ser:** Serina

**Val:** Valina

**Thr:** Treonina

**WHO:** Organización Mundial de la Salud

**Trp:** Triptófano





## Resumen

El presente trabajo tuvo por objetivo la obtención de un aislado proteico de Sacha Inchi, a partir de harina desoleagenizada de Agroindustrias Oro Inka S.A.C. La harina desoleagenizada fue obtenida mediante extracción por prensa, siendo enriquecido el contenido proteico del Sacha Inchi de 24.2% a 40.7% en la harina.

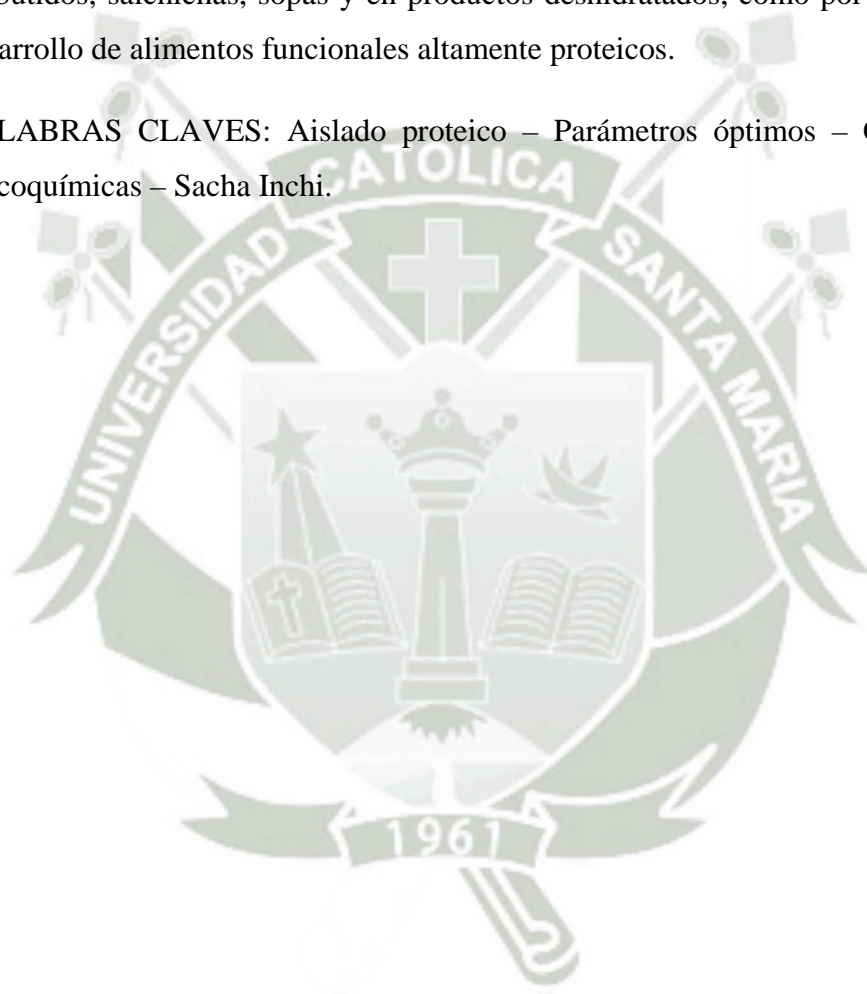
El aislado proteico de Sacha Inchi fue obtenido por extracción alcalina determinándose los siguientes parámetros óptimos: pH: 10, materia prima/solvente: 1/20; temperatura: 50°C y tiempo: 90 min y para la precipitación isoeléctrica se determinó el pH de 5.8. El precipitado proteico obtenido fue secado por liofilización a -30°C. El aislado proteico obtenido presentó una coloración beige claro, no presenta olor, ni sabor y con una textura muy fina. El análisis próxima nos presentó un porcentaje de proteínas de 94.2% (expresado en base seca), respectivamente, con una humedad del 3.3% valor bajo, lo que le confiere estabilidad en el tiempo.

Al realizar la caracterización de proteínas por solubilidad se determinó la presencia de cuatro tipos de proteínas: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas; este

resultado fue validado por la caracterización realizada utilizando SDS-Page. El aislado proteico obtenido mostró una absorción de agua máxima de 2.35 mL de agua/g de aislado proteico, mientras que en el caso de la absorción de aceite mostró una absorción máxima de 1.43 mL de agua/g de aislado proteico.

Por consiguiente se concluye que se puede hacer uso de los residuos agroindustriales de Sacha Inchi para la obtención de aislados proteicos los cuales podrían ser utilizados como suplemento de otros alimentos como bebidas para deportista, embutidos, salchichas, sopas y en productos deshidratados, como por ejemplo en el desarrollo de alimentos funcionales altamente proteicos.

**PALABRAS CLAVES:** Aislado proteico – Parámetros óptimos – Características fisicoquímicas – Sacha Inchi.





## Summary

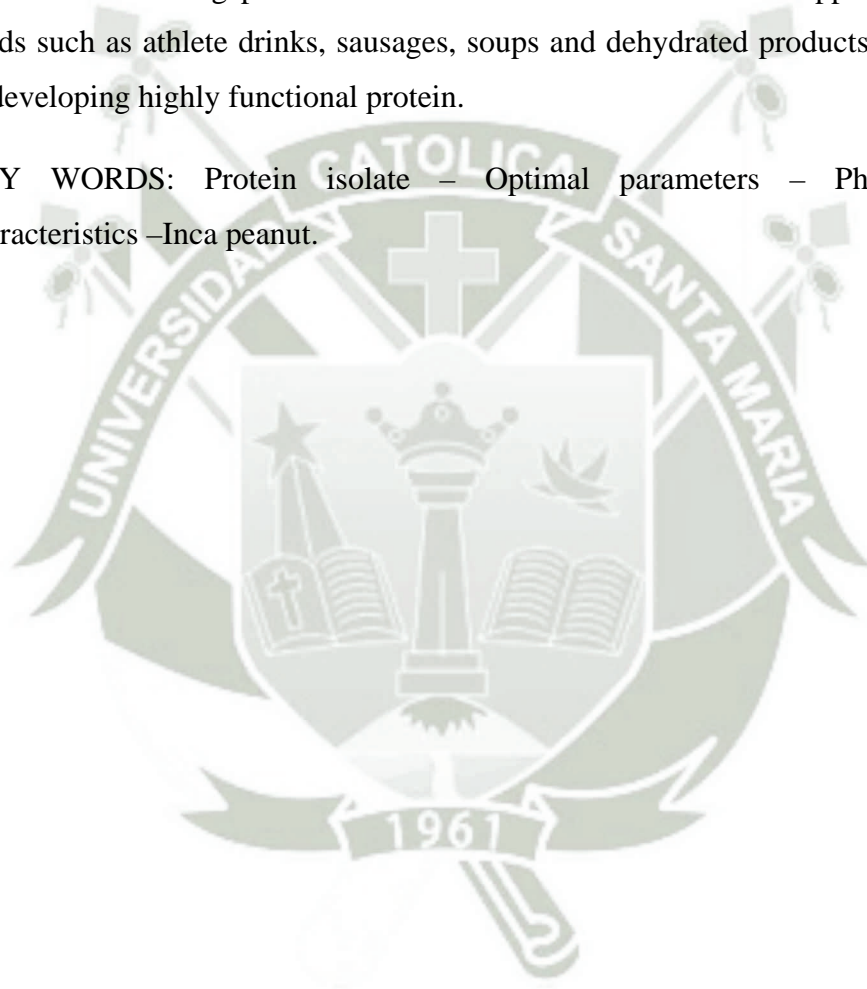
The target of the present study is to obtain an Inca Peanut protein isolate, from defatted flour from Inka Gold SAC Agribusiness. The defatted flour was obtained by extraction press, the enriched protein content of Inca Peanut being 24.2% to 40.7% in the flour.

The Inca Peanut protein isolate was obtain for the alkaline extraction, the parameters determined following optimum pH: 10, the raw material/solvent: 1/20, temperature: 50°C and time 90 minutes and precipitation was determined isoelectric pH 5.8. The protein precipitate obtained was dried by lyophilization at -30°C. The protein isolate obtain had a beige color, didn't have smell, didn't have flavor and present a fine texture. The obtained protein isolate proteins present a percentage of 94.2% (expressed on dry basis), respectively, with a moisture of 3.3% low value, which gives stability in time.

Once the characterization of proteins by solubility was done, we determined the presence of four types of proteins: albumins, globulins, glutelins and prolamins, this result was validated by the characterization performed using SDS-Page. The isolated protein obtained showed a maximum water absorption of 2.35 mL of water/g protein isolate, in the case of the oil absorption showed an absorption maximum of 1.43 mL of water/g protein isolate.

Therefore, it is concluded that we can make use of agro-industrial waste of Inca Peanut for obtaining protein isolates which can be used as a supplement to other foods such as athlete drinks, sausages, soups and dehydrated products, such as food in developing highly functional protein.

KEY WORDS: Protein isolate – Optimal parameters – Physicochemical characteristics –Inca peanut.



## Introducción

El rápido crecimiento demográfico de la población mundial determina la necesidad de encontrar nuevas proteínas, que complementen a las ya existentes, para satisfacer la demanda de este nutriente; en especial en países en vías de desarrollo, donde la desnutrición energética proteica constituye el principal problema nutricional. Esta conduce a un deterioro de la salud y a la disminución de la actividad física e intelectual, lo que implica un daño en el orden económico, político y social, mayor riesgo de enfermedades y grandes costos e inversiones por parte del sistema de salud. La malnutrición se relaciona con 54% de las muertes en la infancia (1).

En este sentido se ha dirigido el interés hacia el aprovechamiento de las proteínas vegetales, procedentes tanto de fuentes convencionales como de no convencionales en la alimentación humana, con la finalidad de incorporarlas en la elaboración de productos alimenticios.

Varios estudios se han realizado sobre la obtención de aislados proteicos de fuentes vegetales, lo cual ha conducido a un incremento sin precedentes en la producción y uso de esos materiales como ingredientes y en la fortificación de alimentos. Aunque la soya (*Glycine max*) ha sido la materia prima más utilizada al respecto, oleaginosas como el girasol (*Helianthus annuus*), la colza (*Brassica napus*), la nuez de marañón (*Anacardium occidentale*) y algunas plantas peruanas como la kiwicha (*Amaranthus caudatus*) y la quinua (*Chenopodium quinoa*), también se han empleado con ese propósito en muchas preparaciones alimenticias.

Las leguminosas y oleaginosas constituyen una fuente importante de proteínas. Las más comunes, son las semillas de soya (*Glycine max*), canola (*Brassica napus*), algodón, girasol (*Helianthus annuus*) y cacahuate (*Arachis hypogaea*), estas representan el 69%, 12.4%, 6.9%, 5.3% y 2.8% respectivamente de la producción mundial de proteínas vegetales. (2)

En el Perú uno de los rublos más importantes para el desarrollo económico es la gran demanda de nuestros productos agrícolas y agroindustriales, uno de los productos que presentan mayor auge es la *Plukenetia volubilis*, comúnmente llamada Sacha Inchi, una oleaginosa que por su gran contenido de grasas (51.4%), es utilizado en la producción de aceites con un alto contenido de Omega 3 y Omega 6. Uno de los residuos que genera este proceso es una torta o harina desoleagenizada la cual posee un alto contenido proteico (40.7%), dicho residuo agroindustrial actualmente no es aprovechado adecuadamente.

Actualmente esta harina desoleagenizada es utilizada como un subproducto de bajo valor agregado que es usado fundamentalmente para la alimentación del ganado. Sin embargo, los contenidos en proteínas de estos subproductos hacen interesantes el desarrollo de procesos de extracción de las mismas, para su utilización en otras aplicaciones, como en alimentación humana, incrementándose de esta manera el valor agregado de este subproducto (3).

Tomando como base el valor nutricional de las semillas de Sacha Inchi, se considera importante estudiar sus proteínas determinando cuales son los parámetros más óptimos para su aislamiento, y conociendo sus características fisicoquímicas, a fin de lograr la obtención de un aislado proteico de dichos residuos. La necesidad de este tipo de información motiva la realización del presente trabajo de investigación, cuyo propósito fundamental es aportar datos que permitan definir el potencial uso de las proteínas de los residuos agroindustriales de la extracción de aceite de Sacha Inchi como materia prima en la industria alimenticia.

## Justificación

En el Perú se produce una gran cantidad de residuos agroindustriales ricos en proteínas, la presencia de compuestos indeseables o antinutricionales junto con la proteína de dicho subproductos, hacen que este tipo de residuos no se aprovechen de forma adecuada. Estos residuos representan una de las reservas con mayor potencial de aplicación para la industria alimentaria, industria de las fermentaciones (como fuente de nitrógeno, producción de piensos compuestos, etc.). Para ello es preciso desarrollar procesos adecuados que potencien la calidad de las proteínas constituyentes.

El Sacha Inchi es una fuente importante de grasa vegetal en el mundo. En el Perú la producción de Sacha Inchi ha ido aumentando en los últimos años, alcanzando las 1225 Ha cultivadas en el 2008, las cuales solo se cultivan en la región amazónica. (4)

La finalidad principal del cultivo de Sacha Inchi es la obtención de aceite. Como subproducto de la extracción de aceite se obtiene un residuo que, generalmente, recibe el nombre de torta. Este residuo desoleagenizado tiene un contenido proteico de 59% en base seca. (5)

Así pues, La industria aceitera genera una gran cantidad de desechos agroindustriales, los cuales podrían convertirse en subproductos de gran importancia, teniendo en cuenta que la harina o torta de Sacha Inchi presenta un alto contenido proteico y además estas proteínas contienen todos los aminoácidos esenciales, lo cual los hace interesante para su utilización en la elaboración de aislados proteicos.

El estudio sobre la elaboración de aislados proteicos se justifica por:

- **Impacto Social.**

La obtención de aislados proteicos nos ofrecerá un producto que contribuye a la lucha contra la desnutrición, además que contribuir con la investigación de los cultivos subutilizados.

- **Impacto a la Salud Humana.**

Los aislados proteicos tienen un efecto positivo en la salud humana, además que colaboraran a la reducción de los niveles de desnutrición proteica.

- **Impacto Ambiental.**

La generación de aislados proteicos aseguran la utilización de los desechos o subproductos de la torta producida por la extracción de aceite del Sacha Inchi.

# Capítulo I

## Objetivos

### 1.1. Objetivo General

Obtener, caracterizar fisicoquímica y electroforéticamente y determinar la digestibilidad proteica del aislado proteico de los residuos agroindustriales *Plukenetia volubilis* (Sacha Inchi).

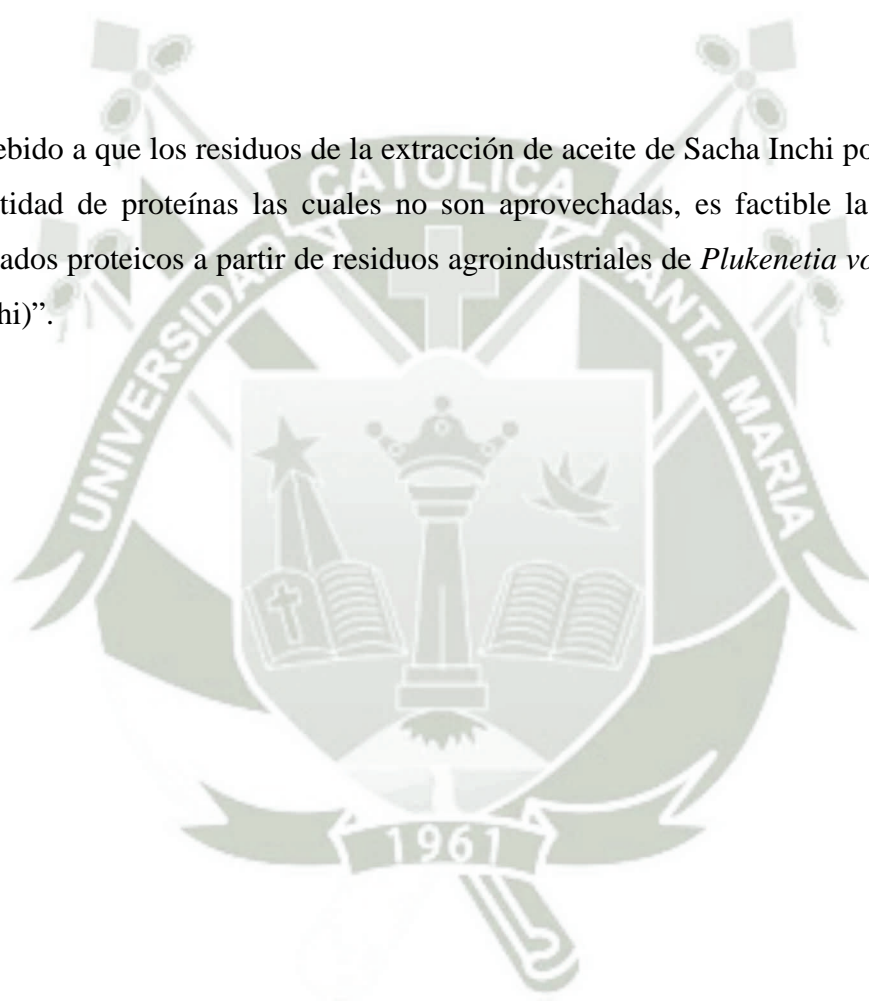
### 1.2. Objetivos Específicos

- Determinar y comparar las condiciones óptimas para obtener aislados proteicos mediante extracción alcalina y precipitación ácida a partir de residuos agroindustriales de *Plukenetia volubilis* (Sacha Inchi).
- Obtener aislados proteicos de residuos agroindustriales de *Plukenetia volubilis* (Sacha Inchi).
- Determinar la composición química proximal del aislado proteico de *Plukenetia volubilis* (Sacha Inchi).
- Determinar el perfil proteico del aislado proteico de *Plukenetia volubilis* (Sacha Inchi).
- Determinar las propiedades físicas que presentan las proteínas del aislado proteico de *Plukenetia volubilis* (Sacha Inchi).
- Analizar el perfil proteico por SDS-PAGE del aislado de *Plukenetia volubilis* (Sacha Inchi).
- Determinar la digestibilidad que exhiben las proteínas del aislado proteico de *Plukenetia volubilis* (Sacha Inchi).

## Capítulo II

### Hipótesis

“Debido a que los residuos de la extracción de aceite de Sacha Inchi poseen una gran cantidad de proteínas las cuales no son aprovechadas, es factible la obtención de aislados proteicos a partir de residuos agroindustriales de *Plukenetia volubilis* (Sacha Inchi)”.



## Capítulo III

### Marco Teórico

El ser humano ha utilizado en el transcurso de los siglos más de 7000 especies de plantas comestibles de las cuales ha domesticado solamente una parte. En la actualidad, más del 50% de los requerimientos humanos en proteínas y calorías están proporcionados únicamente por el maíz, trigo y arroz y solo 30 cultivos cubren el 95% de las necesidades en energía alimentaria del mundo. Paralelamente, los cultivos menos frecuentes “menores”, desplazados, promisorios o subutilizados en sus diferentes formas y conceptos, se mantienen en sectores marginales, regionales o locales; pero, sin embargo, podrían ayudar a mejorar, cuantitativa y cualitativamente, la alimentación y nutrición de millones de personas, tanto en la actualidad como en un futuro. (6)

#### 3.1. Oleaginosas

La palabra oleaginoso/a deriva etimológicamente del vocablo latino “*oleaginus*” que significa oleoso o aceitoso (7). El término es aplicado a las plantas cuyas semillas o frutos tienen como principal característica la gran cantidad de aceites que poseen.

Las plantas oleaginosas constituyen uno de los grandes grupos de cultivos de mayor producción, investigación, experimentación y comercialización mundial; precisamente por ser plantas útiles, cuyas semillas, granos o frutos tienen un alto porcentaje de ácidos grasos y proteínas de alta calidad (8).

Las oleaginosas poseen un gran valor agregado precisamente por su versatilidad, ya que de un solo fruto o semilla, es posible obtener cientos de productos: desde aceites, pastas para la alimentación animal, biocombustibles, plásticos biodegradables, así también proteínas, vitaminas liposolubles como la vitamina A y minerales, fundamentales en la nutrición del hombre. Por esa razón, las oleaginosas son alimentos básicos para millones de personas en los países en desarrollo, y hoy en día están adquiriendo una función todavía más importante como cultivos comerciales. (9).

Diez son los cultivos que en la actualidad son los de mayor producción y cotización en los mercados de todo el mundo: soya, canola, cártamo, algodón, girasol, olivo, maíz, lino, cacahuate y ajonjolí (8).

### **3.2. Sacha Inchi**

En el Perú se encuentran dos importantes centros de origen y domesticación de cultivos como son los Andes y la Amazonia. Dentro de los cultivos originarios de la amazonia destaca por sus características nutricionales los cultivos de la familia Euphorbiaceae, y en este caso nos referimos a la *Plukenetia volubilis* (Sacha Inchi).

El Sacha Inchi o *Plukenetia volubilis*, perteneciente a la familia Euphorbiaceae, conocido también con los nombres de sachá maní, maní del inca, maní del monte, maní jíbaro o inca peanuts, es una planta proteica oleaginosa silvestre. (10)

La familia Euphorbiaceae es reconocida en el Perú por presentar 61 géneros y 323 especies, mayormente arbustos y árboles. El género *Crotón* es el más numeroso en especies endémicas. Los taxones endémicos ocupan varias regiones, entre ellas Bosques Húmedos Amazónicos, Mesoandina y Bosques Muy Húmedos Montanos, entre los 110 y 3200 m.s.n.m. (11)

El Sacha Inchi es una liana trepadora, vigorosa, semileñosa y perenne de rápido crecimiento y desarrollo. Su eje principal alcanza una altura de más de 10 metros de largo y tiene hojas alternas acorazonadas de 10 a 12 centímetros de largo y de 8 a 10 centímetros de ancho, con nervaduras que nacen en la base y una nervadura central que se orienta hacia el ápice de la hoja. (12)

Los frutos del Sacha Inchi están formados por cuatro cápsulas dehiscentes, es decir, que se abren naturalmente. Dentro de las cápsulas se encuentran las semillas de color marrón oscuro, ovaladas, con un diámetro de 1,5 a 2 centímetros, ligeramente abultadas en el centro y aplastadas en los bordes. La semilla está compuesta en 33 a 35% de cáscara y 65 a 67% de almendra. (13)



*Figura 1: Semilla de Sacha Inchi*

Una de las características principales que hace atractiva la semilla de Sacha Inchi frente a otros productos alternativos es su alto contenido de aceites (54%) y proteínas (33%). Además, es una de las semillas que posee mayor cantidad de ácidos grasos omega 3 (48.6%) (14).

Es un alimento concentrado con más grasa que la crema de leche, más calorías que el azúcar y mayor calidad en vitaminas, proteínas y minerales que la mayoría de los productos cárnicos utilizados. Esta característica lo hace muy recomendable como alimento frente a otros productos como la aceituna, las semillas de lino y el pescado (12).

### **3.2.1. Clasificación taxonómica**

Identificación taxonómica según el sistema de Clasificación de Adolph Engler (15)

- División: *Angiospermae*
- Clase: *Dicotyledoneae*

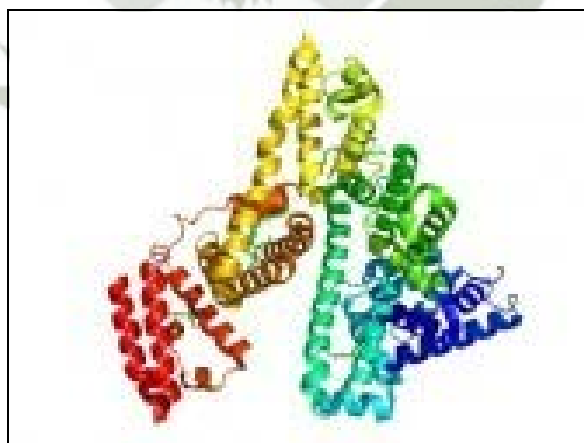
- Orden: *Geraniales*
- Familia: *Euphorbiaceae*
- Género: *Plukenetia*
- Especie: *volubilis* Linneo

### 3.2.2. Constituyentes químicos:

#### 3.2.2.1. *Semilla*

##### 3.2.2.1.1. **Proteínas**

Contiene albúmina, una proteína de almacenamiento, soluble en agua. Esta proteína representa el 25% del peso de la harina de la semilla desoleagenizada, que representa el 31% del total de proteína de la semilla. La albúmina es una proteína compuesta de dos polipéptidos glicosilados, con pesos moleculares estimados de 32800 y 34800 Dalton (Da) respectivamente. La albúmina de la semilla, es altamente digestible, y contiene todos los aminoácidos esenciales., cuando se compara con los patrones de recomendación para adultos y niños mayores a 1 año. Contiene todos los aminoácidos esenciales: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina. (16)



Fuente: <http://es.123rf.com>

**Figura 2: Estructura molecular de la albúmina**

### 3.2.2.1.2. Aminoácidos

El Sacha Inchi contiene aminoácidos los cuales muestran niveles altos de cisteína, tirosina, treonina y triptófano, comparado a otras proteínas de semillas oleaginosas. Los niveles de leucina y lisina en la semilla del Sacha Inchi fueron más bajos que los encontrados en la proteína del fréjol de soya (*Glycine max*) aunque igual o mejor que en la proteína del maní (*Arachis hypogaea*), algodón o girasol (*Helianthus annuus*); el perfil de aminoácidos de la semilla de Sacha Inchi se comparó con otras semillas oleaginosas. (17)

**Tabla 1: Perfil de aminoácidos de la proteína de Sacha Inchi comparada con otras proteínas de semillas oleaginosas.**

| Aminoácidos                      | Sacha Inchi | Soya | Maní | Algodón | Girasol | FAO/WHO/UNU<br>Patrón* |
|----------------------------------|-------------|------|------|---------|---------|------------------------|
| <b>P Total%</b>                  | 27          | 28   | 23   | 33      | 24      |                        |
| <b>Aminoácidos esenciales</b>    |             |      |      |         |         |                        |
| <b>His</b>                       | 26          | 25   | 24   | 27      | 23      | 19                     |
| <b>Ile</b>                       | 50          | 45   | 34   | 33      | 43      | 28                     |
| <b>Leu</b>                       | 64          | 78   | 64   | 59      | 64      | 66                     |
| <b>Lys</b>                       | 43          | 64   | 35   | 44      | 36      | 58                     |
| <b>Met + Cys</b>                 | 37          | 26   | 25   | 29      | 34      | 25                     |
| <b>Phe + Tyr</b>                 | 79          | 80   | 89   | 81      | 64      | 63                     |
| <b>Thr</b>                       | 43          | 39   | 26   | 33      | 37      | 34                     |
| <b>Trp</b>                       | 29          | 13   | 10   | 13      | 14      | 11                     |
| <b>Val</b>                       | 40          | 48   | 42   | 46      | 51      | 35                     |
| <b>Aminoácidos no esenciales</b> |             |      |      |         |         |                        |
| <b>Ala</b>                       | 36          | 43   | 39   | 41      | 42      | -                      |
| <b>Arg</b>                       | 55          | 72   | 112  | 112     | 80      | -                      |
| <b>Asp</b>                       | 111         | 117  | 114  | 94      | 93      | -                      |
| <b>Glu</b>                       | 133         | 187  | 183  | 200     | 218     | -                      |
| <b>Gly</b>                       | 118         | 42   | 56   | 42      | 54      | -                      |
| <b>Pro</b>                       | 48          | 55   | 44   | 38      | 45      | -                      |
| <b>Ser</b>                       | 64          | 51   | 48   | 44      | 43      | -                      |

\*Niveles recomendados para niños de edad pre-escolar (2-5 años), aunque recientemente recomendado para la evaluación de la calidad de proteínas de la dieta de todos los grupos de edad, excepto los bebés.

Fuente: Hamaker (14).

### 3.2.2.1.3. Minerales

La semilla de Sacha Inchi posee un gran potencial nutricional, 100 g de las semillas de Sacha Inchi contienen: zinc (15.95 mg) y magnesio (340.15 mg); sobrepasa la ingesta recomendada de zinc (11mg para hombres y 8 mg para mujeres) y magnesio (300-400 mg). Asimismo, 100g de estas semillas aportan 0.95 mg de cobre cantidad que cubre el requerimiento estimado de cobre 0.9 mg para adultos, también, posee otros minerales como: sodio (83.35 mg), potasio (863.65 mg), calcio (95.14 mg), hierro (4.61 mg) y manganeso (0.83 mg). (16)

### 3.2.2.1.4. Fibra

Según Pascual & Mejia (18), 100 g de almendras de Sacha Inchi contiene 11.30% de fibra cruda en base húmeda y 12.07% en base seca.

La Organización Mundial de la Salud (WHO) recomienda una ingesta diaria de 27 a 40 g. de fibra dietética mientras que Food and Drugs Administration (FDA) propone un consumo de 25 g/día de fibra por cada 2000 kcal/día para un humano adulto (19); teniendo en cuenta estos datos se puede apreciar claramente que el Sacha Inchi es una gran fuente de fibra dietética importante para la adecuada digestión y funciones del organismo.

### 3.2.2.1.5. Grasas

De todas las fuentes naturales conocidas, el aceite del Sacha Inchi tiene el mayor contenido de omega 3, en comparación de los aceites de otras semillas oleaginosas utilizadas en el mundo, para el consumo humano, el aceite del Sacha Inchi es el más rico en ácidos grasos insaturados, llega hasta 93.6%, es el de mayor contenido polinsaturados, en promedio está compuesto de 48.6% de ácido graso esencial alfa linolénico (omega 3), 36.8% de ácido graso esencial linoléico (omega 6) y 8.28% de ácido oleico (omega 9) y tiene el más bajo contenido de ácidos grasos saturados, 6.39% en promedio, 3.85% de palmítico y 2.54% de esteárico (16).

Algunos estudios bioquímicos de la semilla, reportaron sus resultados tal como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2: Composición química promedio de la semilla de Sacha Inchi**

| Componente            | García | Mejía |
|-----------------------|--------|-------|
| <b>Humedad</b>        | 5.63   | 6.37  |
| <b>Proteína total</b> | 24.39  | 24.21 |
| <b>Grasa cruda</b>    | 43.27  | 51.40 |
| <b>Fibra cruda</b>    | 16.53  | 11.30 |
| <b>Ceniza</b>         | 7.72   | 2.69  |
| <b>Carbohidratos</b>  | 2.80   | 4.03  |
| <b>TOTAL:</b>         | 100    | 100   |

Fuente: Pascual & Mejia (18).

### 3.2.3. *Constituyentes químicos de la torta o sub producto de Sacha Inchi:*

Como se puede apreciar en la Tabla 3 el porcentaje de las proteínas presentes en la torta de Sacha Inchi representa más de la mitad del peso total de la muestra y por las características mencionadas con anterioridad se puede confirmar el gran potencial que posee este residuo agroindustrial para la obtención de un aislado proteico.

**Tabla 3: Composición química de la torta de Sacha Inchi**

| Componente            | Base húmeda | Base seca (%) |
|-----------------------|-------------|---------------|
| <b>Humedad</b>        | 0.7         | 0.0000        |
| <b>Proteína Total</b> | 58.72       | 59.13         |
| <b>Grasa Cruda</b>    | 6.88        | 6.93          |
| <b>Fibra Cruda</b>    | 17.18       | 17.30         |
| <b>Ceniza</b>         | 8.66        | 8.72          |
| <b>Carbohidratos</b>  | 7.86        | 7.92          |
| <b>TOTAL:</b>         | 100         | 100           |

Fuente: Pascual & Mejia (18).

### 3.2.4. Uso Tradicional

El Sacha Inchi es un producto de consumo muy popular en la población nativa y mestiza de algunas áreas rurales de San Martín. La semilla actualmente se consume tostada, cocida con sal, en confituras (turrón), en mantequilla y como ingrediente de diversos platos típicos.

Las ancianas Mayorunas, Chayuhuitas, Campas, Huitotas, Shipibas, Yaguas y Boras, mezclan el aceite de *Plukenetia volubilis* con harina de esta misma almendra y preparan una crema especial para revitalizar y rejuvenecer la piel (17). También es usado como una sustancia con propiedades cicatrizantes.

Los indígenas Secoyas, Candoshis, Amueshas, Cashibos, Dapanahuas y Boras, consumen nueces tostadas de *Plukenetia volubilis* para recuperar fuerzas y como reconstituyente para el trabajo y con el aceite frotan sus cuerpos para curar sus dolores musculares y reumáticos (16).

Las sociedades indígenas; Sharanahua, Ameshua, Amahuaca, Aguaruna, Arabela, Chayahuita, Yagua, Shipibo, Huitoto, Murui, Campa del gran pajonal, Machiguenga, Asháninca campa, Mayoruna, Arabela, Quechua de San Martín, Quechua del Tigre, etc, extraen, artesanalmente, aceite de *Plukenetia volubilis* para uso alimentario y para combustible y también elaboran harina de la “torta”. Los Yaguas, Cocamas, Shipibos y Cayahuitas consumen hojas tiernas de *Plukenetia volubilis*, en forma de ensaladas como parte de su dieta alimenticia. (17)

## 3.3. Métodos de obtención de proteínas

### 3.3.1. Proteínas

Las proteínas son compuestos químicos muy complejos que se encuentran en todas las células vivas: en la sangre, en la leche, en los huevos y en toda clase de semillas y pólenes. La composición elemental de las proteínas básicamente está conformada por nitrógeno, oxígeno, hidrógeno y carbono, además de azufre, y en algunas fósforo y hierro (20).

Las proteínas estructuralmente están formadas por la unión de moléculas denominadas aminoácidos, que los vegetales sintetizan a partir de los nitratos y las sales amoniacales del suelo. Los animales herbívoros obtienen proteínas de las plantas; el hombre puede obtenerlas de las plantas o de los animales, siendo las proteínas de origen animal de mayor valor nutritivo que los vegetales. Esto se debe a que existen 24 aminoácidos de los cuales 9 son denominados esenciales para la vida (la leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, valina, triptófano y para los lactantes se considera la histidina) (20).

Estas macromoléculas son el resultado de la polimerización de los aminoácidos mediante enlaces peptídicos. Por esta razón, todas sus propiedades nutritivas y sus características físico-químicas dependen completamente del tipo de aminoácidos, la concentración y de la secuencia de unión de los monómeros constituyentes, determinando así su estructura (primaria) de la que depende la conformación de las moléculas (estructura secundaria y terciaria). En algunos casos las proteínas forman agregados que tienen una determinada geometría (estructura cuaternaria) (21). Las proteínas se clasifican en: homoproteínas que constan sólo de aminoácidos y heteroproteínas que contienen aminoácidos y otros compuestos no proteicos (grupos prostéticos) (22).

Las proteínas poseen una diversidad de funciones y se les clasifican en dos grupos (21):

- Proteínas estructurales (queratina, colágeno, elastina, etc.), que se encuentran en todos los tejidos: músculos, huesos, piel, órganos, etc.
- Proteínas con actividad biológica, que cumplen un papel activo en todos los procesos biológicos. Las más importantes son: enzimas, catalizadores específicos, hormonas, funciones transportadoras, las proteínas que protegen la sangre de los vertebrados y aquellas que desempeñan funciones de almacenamiento.

Las proteínas alimentarias, son aquellas que son digeribles, no tóxicas y organolépticamente aceptables para los seres humanos, estas no presentan un grupo

especial, porque la mayor parte de las proteínas estructural o biológicamente activas antes descritas son proteínas que cumplen con una función alimenticia.

### 3.3.2. Extracción y purificación de proteínas

Actualmente, debido al incremento de la demanda proteínica en el mundo y la importancia en la nutrición, para la población en general, es de gran interés en la dieta, las proteínas vegetales (oleaginosas, leguminosas, pseudocereales, cereales, algas y hojas), pues son una nueva alternativa saludable y de bajo costo en comparación a las proteínas animales, en este contexto las proteínas aisladas de los vegetales están ganando importancia en la industria alimenticia a causa de su alto contenido proteínico (21).

La moderna tecnología de alimentos permite una utilización más eficaz de las proteínas vegetales, mediante la elaboración de extractos proteicos de mayor calidad, además del adecuado control de las propiedades hace su utilización cada vez más frecuente en la formulación de alimentos nuevos (23).

La Obtencion de proteínas vegetales para uso nutricional obliga a realizar ciertos tratamientos con el objetivo de:

- Mejorar el valor nutricional, obteniéndose mediante la eliminación de sustancias tóxicas.
- Mejorar las características organoléptica, resulta de la eliminación durante la extracción de pigmentos y aromas.
- Lograr un enriquecimiento o concentración proteica a base de la eliminación de ciertos constituyentes indeseables.

De una manera general, y dependiendo de los métodos utilizados en su extracción, como en su posterior aplicación y niveles de pureza, los extractos proteicos pueden ser agrupados en concentrados proteicos y aislados proteicos.

### **3.3.2.1. Concentrados proteicos**

El concentrado contiene un mínimo de 70% de proteína en base seca, se extrae a partir de harina desgrasada, con la eliminación de compuestos solubles no proteicos presentes, obteniendo un producto rico en azúcares insolubles y proteínas (2).

Tres son los métodos principales utilizados en la actualidad para la obtención de concentrados proteicos (2) (3) (21).

#### **3.3.2.1.1. Extracción de compuestos no proteicos mediante el uso de agua ajustada al punto isoeléctrico de las proteínas.**

Este método, patentado por Sair en 1959, 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 desnaturalizante para las proteínas, lo cual permite mantener las propiedades funcionales del producto, aunque algunos compuestos responsables de olores y sabores desagradables no son eliminados.

#### **3.3.2.1.2. 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 desoleagenizada 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 en la extracción de compuestos no proteicos mediante el uso de agua ajustada al punto isoelectrico de las proteínas.

### **3.3.2.1.3. Extracción de compuestos no proteicos mediante soluciones hidroalcohólicas**

Ni el hexano usado en el desoleagenizado 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, fenoles, isoflavonas, esteroides, azúcares, etc. Además, las proteínas son generalmente poco solubles en mezclas agua-alcohol sobre todo si el alcohol representa más del 40% v/v. 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. El etanol es generalmente el alcohol de elección en la preparación de concentrados mediante mezclas hidroalcohólicas.

La principal diferencia entre estos tres 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 (2).

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, que consiste en extraer sucesivamente la harina con hexano, hexano-etanol y etanol-agua (3).

Aunque el concentrado exhibe mayor riqueza proteica respecto a la harina, aun presenta fibra, azúcares reductores, fenoles y lípidos, así como compuestos no deseados en el producto final. La fibra (celulosa, hemicelulosa, lignina y sustancias pépticas) es el componente mayoritario entre los no deseables y de gran importancia, por su abundancia en fuentes proteicas. Esta debe ser eliminada para enriquecer el

producto en proteína y facilitar su consumo. Por otro lado, los azúcares reductores causan una pérdida de la calidad proteica, ya que reaccionan con las proteínas mediante la reacción de Maillard. Los lípidos residuales ocasionan enranciamiento durante el procesado y almacenamiento de los concentrados proteicos (3). Al mismo tiempo los alcaloides quinolidizínicos y otros factores anti nutricionales son removidos (2).

### **3.3.2.2. Aislados proteicos**

El proceso de obtención supone una serie de etapas encaminadas a eliminar o disminuir los componentes no proteicos para lograr un producto final con el 80-90% de proteínas (2). Este proceso se realiza mediante la sucesión de dos operaciones (21) (3):

En la primera etapa, las proteínas son solubilizadas para separarlas del resto de los compuestos no solubles, principalmente glúcidos insolubles. El extracto obtenido contiene, además de las proteínas, el resto de compuestos solubles del concentrado proteico. Aunque muchas de las proteínas vegetales son solubles a pH próximos a la neutralidad, se prefiere extraer las proteínas a pH alcalinos para favorecer la solubilización de las proteínas desnaturalizadas durante la preparación de los concentrados. Además, algunas proteínas, como las glutelinas, requieren pH iguales o superiores a 11 para poder ser extraídas (3) (21).

La segunda etapa, tiene por objeto la concentración de las proteínas y sobre todo su purificación frente a otros compuestos (3) (21).

Los métodos comúnmente usados en la obtención de aislados de proteínas de vegetales son:

#### **3.3.2.2.1. Extracción alcalina/precipitación isoeléctrica**

Este proceso se realiza a través de la extracción alcalina seguido de una precipitación isoeléctrica, método en el que se aprovecha la solubilidad de las proteínas la cual es alta a pH alcalinos y baja en pH cercanos al pI.

Generalmente, las semillas son descascarilladas, pulverizadas y de la harina se elimina la grasa en forma de aceite. Posteriormente, se dispersa en agua ajustando a pH alcalinos (pH 8-11), para promover la solubilización de las proteínas y separarlas del resto de los compuestos no solubles.

La dispersión es mezclada por un tiempo de 30 a 180 min y enseguida filtrada para remover el material insoluble y ajustar al pI, en este punto la carga neta de la proteína es cero, las repulsiones electrostáticas entre las moléculas son mínimas y como consecuencia se obtienen agregados debido a la presencia de las interacciones hidrofóbicas. La solubilidad de las proteínas cambia de acuerdo a las características del disolvente (agua), ocasionando la precipitación de las proteínas. (2) (3).

#### **3.3.2.2.2. Extracción ácida**

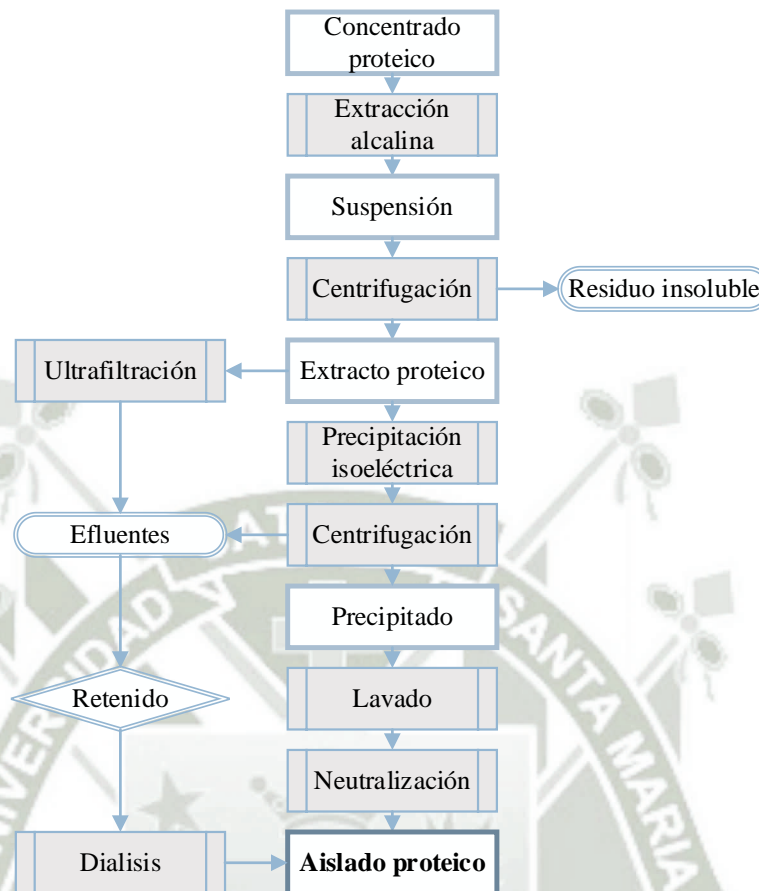
El principio de la extracción ácida es similar al de la alcalina excepto que la extracción inicial se realiza en condiciones ácidas (pH 4); estos valores de pH, se usan para solubilizar proteínas antes de la precipitación isoeléctrica, crio-precipitación o separación por membranas (2).

#### **3.3.2.2.3. Extracción con sales (micelización)**

Este proceso, involucra la precipitación de las proteínas con una solución salina diluida y posteriormente la recuperación se realiza por centrifugación o filtración seguido de un secado (2).

#### **3.3.2.2.4. Ultrafiltración**

El uso de membranas promueve la separación de moléculas en solución; en este proceso el sobrenadante obtenido después de la extracción alcalina es sujeto a ultrafiltración o ultrafiltración/diafiltración para concentrar las proteínas; los compuestos comúnmente retenidos son las partículas coloidales, biomoléculas, polímeros y algunos azúcares (3). La principal ventaja de este método es la recuperación tanto de las proteínas solubles como insolubles.



Fuente: Vioque & Col. (3)

**Figura 3: Elaboración de aislados proteicos a partir de harinas o concentrados proteicos mediante precipitación isoelectrica y ultrafiltración.**

### 3.4. Absorción de agua y grasa

La absorción de agua y grasa son propiedades funcionales básicas de los componentes proteicos los cuales determinan la calidad (textura, apariencia, retención de sabor) y rendimiento de productos cárnicos terminados, así como de muchas otras preparaciones alimenticias (2) (3) (21) (22) (24).

Las interacciones proteína agua se efectúan por medio de los aminoácidos polares de naturaleza catiónica, aniónica, y cada uno de ellos tiene diferente capacidad de retención de agua, siendo mayor esta cuando el aminoácido se encuentra en forma ionizada (24) .

La capacidad de absorción de agua de los aislados proteicos puede ser afectada por factores conformacionales y del medio ambiente o del entorno donde este el aislado; cambios conformacionales en las moléculas de proteínas pueden exponer los aminoácidos internos en la estructura, haciendo que puedan interactuar con el agua. Diferencias en el contenido de carbohidratos podrían también afectar la absorción de agua. Por otra parte, factores extrínsecos como el pH y la temperatura influyen marcadamente en la capacidad de absorción de agua de los materiales proteicos (2) (24).

La capacidad de absorción de grasa de las proteínas es una importante propiedad funcional de estos polímeros debido a que aumenta o mejora la retención del sabor y el gusto de muchos productos alimenticios donde son usados como ingredientes. El mecanismo de absorción de aceite no está entendido claramente, aunque se conoce que los parámetros como: tamaño de las macromoléculas, área superficial, la carga eléctrica y la hidrofobicidad afectan la absorción de aceite (24).

### **3.5. Aplicaciones de aislados proteicos**

El interés de la incorporación de Aislados Proteicos en productos alimentarios se debe a (2) (3) (21) (22) (24):

- El crecimiento de países en vías de desarrollo,
- El aporte nutricional y beneficios sobre la salud, se ha investigado que una de las ventajas de consumir alimentos ricos en proteínas, causa una sensación de saciedad parecida al de alimentos a base de carbohidratos con el mismo valor calórico,
- Los cambios en la preferencia del consumidor,
- Los cambios demográficos (edad, diversidad racial),
- El incremento en la incidencia de alergias alimentarias
- La continua investigación en el desarrollo de novedosos productos y procesos tecnológicos.

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. 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 (3).

Así, en un gran número de aplicaciones, los aislados proteicos vegetales se usan también por sus propiedades funcionales. Así, se emplean para aclarar el color, mejorar la textura de carnes de aves deshuesadas y para unir piezas intactas de músculos. También proporcionan textura a las salchichas, mejoran la funcionalidad de pates y mejoran la textura de los productos de panadería y pastas. Por último, también se han usado en el procesado de quesos (2) (3).

## Capítulo IV

### Materiales y Métodos

#### 4.1. Materiales

Para poder realizar la parte experimental de la investigación, se necesitó los siguientes requerimientos:

##### 4.1.1. Material biológico

- Harina desoleagenizada de Sacha Inchi
- Suero Sanguíneo

##### 4.1.2. Material de Vidrio

- Baguetas
- Balones 250 mL
- Beackers 50 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL.
- Celdas electroforéticas.
- Fiolas 25 mL., 100 mL, 1000 mL.
- Luna de reloj.
- Matraces 100 mL, 250 mL.
- Pipetas 2 mL, 5 mL, 1 0mL.
- Probetas 50 mL, 100 mL, 500 mL.

- Termómetro.
- Tubos de ensayo 20 x 150 mm.
- Tubos de vidrio con tapa 20 x 150 mm.

#### **4.1.3. Reactivos**

- Ácido Clorhídrico (P.A) MERCK
- Acrilamida 30% SIGMA ALDRICH
- Etanol 96% (P.A) J.T. BAKER
- Éter de Petróleo (P.A) J.T. BAKER
- Hidróxido de sodio (Q.P) J. T. BAKER
- Nitrato de Plata (Q.P) DIPROQUIM
- Pepsina RIELUM
- Reactivo de Biuret
- Nitrógeno líquido PRAXAIR
- SDS GLOBAL CHEMIE
- Triptófano SIGMA ALDRICH
- Tris base CBH

#### **4.1.4. Equipos**

- Agitador magnético AGIMATIC -ED P. SELECTA
- Balanza analítica electrónica OHAUS AR 2140
- Baño maría SELECTA.
- Cámara electroforética SHIMADZU UV – V.

- Centrifuga IEC CENTRA CL2
- Extractor tipo Soxhlet PYREX
- Fuente de poder IBI SCIENTIFIC
- Liofilizador LABCONCO
- Micropipetas 10  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000 $\mu$ L EPPENDORF
- Mufla MEMMERT
- pHmetro HANNA
- Trituradora MOULINEX

#### **4.1.5. Otros**

- Algodón
- Crisoles.
- Espátulas.
- Papel Kraft
- Tamiz N° 60
- Tips Amarillos, Azules y Blancos

#### **4.2. Métodos**

El desarrollo metodológico a desarrollar en la presente tesis, es la siguiente:

##### **4.2.1. Obtención de harina**

El proceso de obtención de harina de la torta de Sacha Inchi sigue las siguientes etapas (22):

- Recepción de materia prima: Se recibió la torta de Sacha Inchi (desecho del proceso de extracción de aceite) de la empresa agroindustrias Oro Inka S.A.C.
- Lavado: Esta operación se realizó en forma manual para retirar todas las impurezas presentes en la torta de Sacha Inchi, se realizaron 3 lavados con agua fría.
- Secado: Se realizó en secado a temperatura ambiente durante 3 días con la torta de Sacha Inchi envuelta en papel Kraft para evitar cualquier tipo de contaminación.
- Molienda: Esta operación se efectuó en molino de tipo cuchillo.
- Tamizado: Este se realizó utilizando una malla N° 60.
- Almacenamiento: Se almacena en papel Kraft en un lugar a temperatura ambiente y seca.



*Figura 4: Secado de la torta de Sacha Inchi*

#### **4.2.2. Desoleagenizado de la harina o torta**

##### *Fundamento*

El desoleagenizado se realiza para lograr la extracción de la mayor cantidad posible de aceites presentes en las harinas y eliminar otros compuestos antinutricionales presentes en la harina de Sacha Inchi.

##### *Procedimiento*

La extracción de aceite de la harina o torta se realizó mediante el extractor tipo Soxhlet, utilizando éter de petróleo como disolvente por 3 horas a 60°C (22).

### **4.2.3. Determinación de parámetros óptimos de extracción de proteínas**

#### *Fundamento*

Para lograr la mayor calidad y cantidad de proteínas a partir del residuo agroindustrial de Sacha Inchi es necesario optimizar los parámetros para su extracción. Se debe evaluar la influencia del pH, relación materia prima/solvente, temperatura y tiempo de extracción para obtener la mayor cantidad de proteínas solubilizadas y además se debe determinar el pH óptimo para la recuperación de las mismas.

#### *Procedimiento*

Previamente a la determinación de los parámetros óptimos, la harina desoleagenizada de Sacha Inchi fue tamizada con una malla N° 60 (25).

#### **4.2.3.1. pH**

Debido a que la solubilización de proteínas es superior a pH alcalino, se ajustó el pH de la solución a valores de 7, 8, 9 y 10 con HCl 0,1 N o NaOH 0,1 N según lo requerido. Se mantuvo constantes la relación materia prima/solvente (1:20); a una temperatura de 50°C, empleando un equipo de baño maría y se agitó continuamente la solución durante 30 min. Luego la solución se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min, la proteína solubilizada fue determinada por el método colorimétrico de Biuret (26) (Anexo 1), tomando alícuotas de 60 µL del sobrenadante. El porcentaje de proteína extraída fue definido como la relación de la cantidad total de proteína en el extracto (mg) respecto a la cantidad total de la proteína en la harina (mg) expresado como un porcentaje (%). El pH óptimo fue aquel en el que se logró extraer la mayor cantidad de proteínas (2) (21) (22) (25) (24) (27) (28) (29) (30).

#### **4.2.3.2. Relación materia prima / solvente**

Se trabajó con el pH definido en la sección anterior, temperatura de 50°C y un tiempo de extracción de 30 min. Las relaciones materia prima/solvente analizadas

fueron: 1/10, 1/15, 1/20, 1/25 y 1/30. Todas las soluciones fueron centrifugadas a 4000 rpm x 20 min. La proteína solubilizada fue determinada por el método colorimétrico de Biuret, tomándose alícuotas de 60  $\mu$ L del sobrenadante, expresándose como porcentaje (%) de proteínas extraídas. Se determinó la relación materia prima/solvente que permitió extraer la mayor cantidad de proteínas (2) (21) (22) (25) (24) (27) (28) (29) (30).

#### 4.2.3.3. Temperatura

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la cantidad de proteína extraída, se trabajó con temperaturas de 18, 25, 37, 50 y 60°C; manteniéndose constante el pH de la solución, la relación materia prima/solvente y el tiempo de extracción (30 min). Todas las soluciones fueron centrifugadas a 4000 rpm x 20 min. La proteína solubilizada fue determinada por el método colorimétrico de Biuret, tomándose alícuotas de 60  $\mu$ L del sobrenadante, expresándose como porcentaje (%) de proteínas extraídas. La temperatura óptima de extracción fue aquella que permitió extraer la mayor cantidad de proteínas (2) (21) (22) (25) (24) (27) (28) (29) (30).



*Figura 5: Solubilización de la proteína de Sacha Inchi*

#### 4.2.3.4. Tiempo

Para determinar el tiempo óptimo de extracción, se evaluarán tiempos de 15, 30, 60, 90 y 120 min. Se mantuvieron constantes el pH, la relación materia prima/solvente y la temperatura de extracción; los mismos que fueron optimizados previamente. Las

soluciones fueron centrifugadas a 4000 rpm x 20 min. La proteína solubilizada fue determinada por el método colorimétrico de Biuret, tomándose alícuotas de 60  $\mu$ L del sobrenadante, expresándose en porcentaje (%) de proteínas extraídas. El tiempo óptimo de extracción fue determinado con el tratamiento que permitió extraer la mayor cantidad de proteínas (2) (21) (22) (25) (24) (27) (28) (29) (30).

#### **4.2.3.5. pH óptimo para la recuperación de las proteínas:**

##### **Precipitación ácida**

Para determinar el pH óptimo de recuperación de las proteínas (pH de mínima solubilidad proteica), se tomaron alícuotas de 25 mL del sobrenadante obtenido previamente y se adicionara HCl 0,1N hasta alcanzar diferentes valores de pH: 2, 3, 4, 4.8, 5, 5.6, 5.8, 6, 6.2, 6.5, 7. Las soluciones así obtenidas se mantuvieron a 4°C durante 24 horas para luego ser centrifugada a 4000 rpm x 20 min. La proteína solubilizada fue determinada por el método colorimétrico de Biuret, tomándose alícuotas de 60 $\mu$ L del sobrenadante, expresándose en porcentaje (%) de proteínas extraídas. El pH óptimo de recuperación será aquel que permitió obtener menor porcentaje de proteínas en la solución (2) (21) (22) (25) (24) (27) (28) (29) (30).

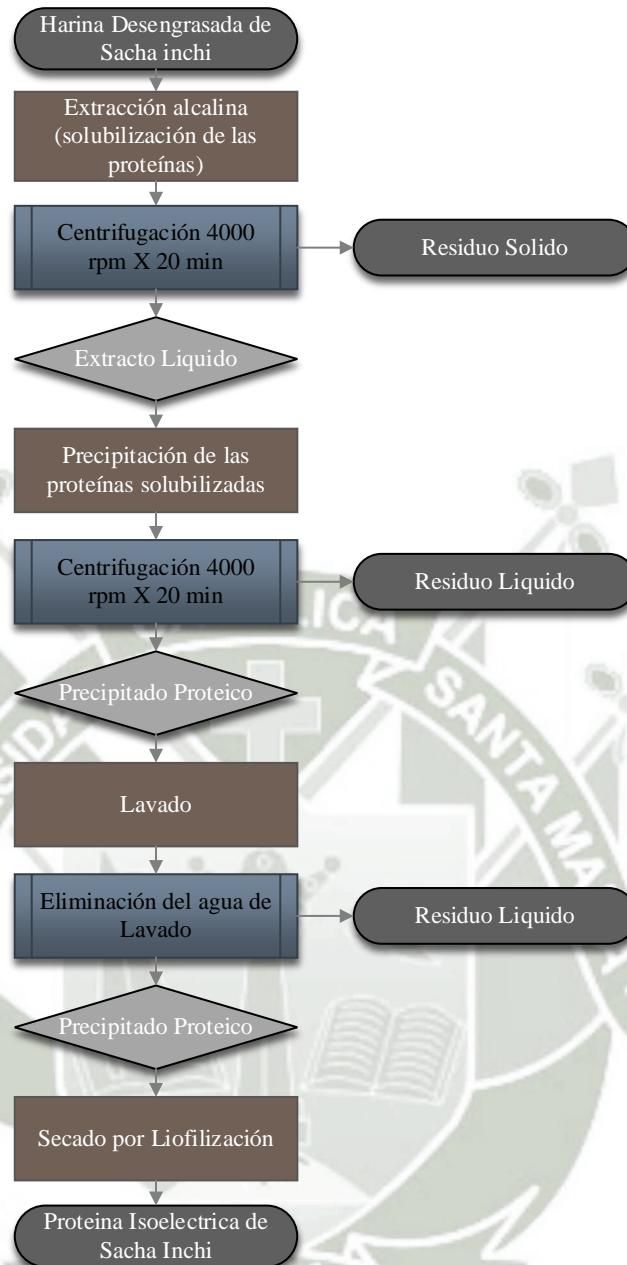
#### **4.2.4. Obtención del aislado proteico**

##### *Fundamento*

La obtención del aislado proteico se inicia con la extracción alcalina la cual permite mediante la solubilización de la proteína la separación de esta de otros compuestos no deseados, posteriormente el sobrenadante proteico es precipitado acidificando el medio en el que se encuentra. A fin de que el aislado proteico obtenido tenga un periodo de vida más largo se realiza el secado por liofilización de la muestra, el cual evita la oxidación y la contaminación por microorganismos.

##### *Procedimientos*

Para la obtención el aislado proteico de la materia prima se siguió las operaciones que se describen a continuación (Figura 6):



**Figura 6:** Flujo de operaciones para la obtención de aislado proteico de Sacha Inchi

#### 4.2.4.1. Extracción alcalina

En esta etapa, la extracción de las proteínas se llevó a cabo por tratamiento de la materia prima a pH alcalino. Se utilizaron los parámetros de extracción (pH, relación materia prima/ solvente, temperatura y tiempo) optimizados en los ensayos realizados previamente (25).

#### **4.2.4.2. Centrifugación**

Las proteínas solubilizadas fueron separadas de los compuestos insolubles por centrifugación a 4000 rpm x 20 min (25).

#### **4.2.4.3. Precipitación de las proteínas solubilizadas**

Se adicionó al extracto líquido de proteínas solubilizadas HCl 1N hasta obtener el pH de mínima solubilidad proteica, manteniendo la solución en agitación constante durante 15 min a temperatura ambiente y se dejó sedimentar durante 24 horas, para disminuir la dispersión de la proteína en la solución (25).

#### **4.2.4.4. Centrifugación**

Las proteínas solubilizadas fueron separadas de los compuestos insolubles por centrifugación a 4000 rpm x 20 min (25).

#### **4.2.4.5. Lavado**

Se procedió a lavar el precipitado proteico, con agua destilada a fin de remover el exceso de ácido, sales, azúcares, etc. La relación precipitado proteico/agua será de 1/5 (v/v). Esta operación se realizara dos veces por 15 min cada una (25).

#### **4.2.4.6. Centrifugación**

El precipitado proteico fue separado del agua de lavado por centrifugación a 4000 rpm x 20 min (25).

#### **4.2.4.7. Secado**

Se realizó un pre tratamiento de la muestra con nitrógeno líquido a fin de evitar que el aislado proteico obtenido mantenga sus características funcionales por un periodo de tiempo más largo. Para el secado de la muestra se utilizó el método de liofilización, la cual fue realizada en la Universidad Nacional de San Agustín en el Programa Profesional de Industria Alimentaria en el laboratorio de Microbiología.

Para la liofilización se congeló las muestras a una temperatura de  $-35^{\circ}\text{C}$ , mientras que la sublimación se realizó a una presión al vacío de 4 Pa, el secado se realizó desde  $-30$  hasta  $30^{\circ}\text{C}$  (31).

#### **4.2.5. Determinación del contenido de proteínas totales**

Se determinó usando el método NMX-F-068-S-1980 (32) (Anexo 2). La medición se efectuó al residuo agroindustrial de Sacha Inchi (Torta) y su aislado proteico. El método descrito es el de Kjeldahl que es el método oficial más ampliamente usado para la determinación del contenido de proteínas en los alimentos, la razón se debe a su grado de precisión y reproducibilidad. Consiste en la digestión ácida total de la proteína y conversión cuantitativa de nitrógeno a amoníaco que se valora por retrotitulación. El factor de conversión de nitrógeno utilizado para obtener el contenido de proteínas total será de 6.25.

#### **4.2.6. Determinación composición química proximal de los aislados proteicos obtenidos**

##### *Fundamentos*

Los análisis comprendidos dentro de este grupo, son también conocidos como análisis proximales, y se aplican en primer lugar a los materiales que se usarán para formular una dieta como fuente de proteína o de energía y a los alimentos terminados, como un control para verificar que cumplan con las especificaciones o requerimientos establecidos durante la formulación. Estos análisis nos indicarán el contenido de humedad, proteína, fibra, lípidos y cenizas en la muestra.

##### *Procedimientos*

Para determinar las propiedades fisicoquímicas de los aislados proteicos obtenidos de la harina semidesoleagenizada de muestra materia prima se realizó la siguiente metodología.

- 4.2.6.1.** Cenizas, según método oficial de análisis de la NTP 209.265.2001 (33) (ver anexo 3). Método Gravimétrico.

**4.2.6.2.** Humedad, según método oficial de análisis de la NMX F-428 (34) (Ver Anexo 4), Método rápido de termobalanza.

**4.2.6.3.** Grasa, según método oficial de análisis de la NTP 209.263.2001 (35) (ver anexo 5), Método Gravimétrico.

**4.2.6.4.** Fibra, según método oficial de análisis de la NTP 205.003.1980 (36) (ver Anexo 6)

**4.2.6.5.** Carbohidratos, se determinó por calculo (26) utilizando la ecuación 1 donde:

$$\% \text{Carbohidratos} = 100 - (\% \text{Cenizas} + \% \text{Humedad} + \% \text{Grasa} + \% \text{Fibra} + \% \text{Proteínas}) (1)$$

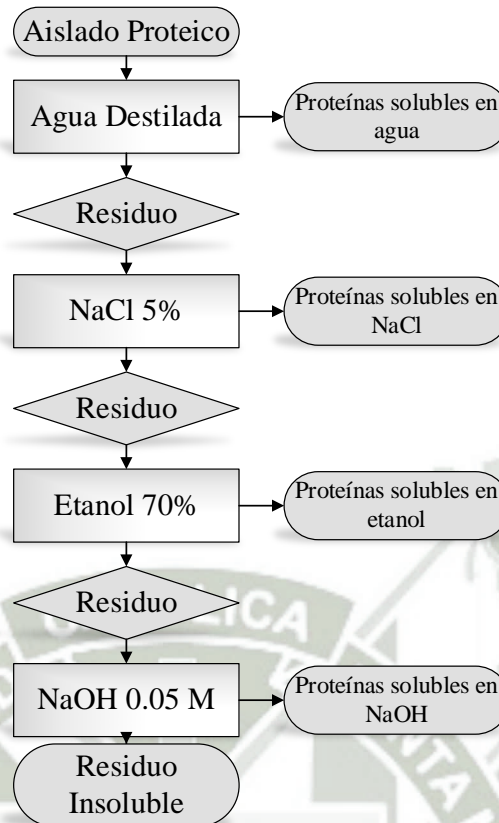
Además se realizó el análisis de las propiedades organolépticas del aislado proteico obtenido.

#### **4.2.7. Perfil de proteínas por solubilidad**

Las proteínas fueron separadas en diferentes fracciones en base a su solubilidad en los siguientes solventes: Agua destilada (albúminas), solución de NaCl al 5% (globulinas), etanol al 70% (prolaminas) y NaOH 0.05 M (glutelinas).

En tubos de centrífuga, se colocó una mezcla de harina-solvente en relación 1:20 (w/v). Los tubos fueron agitados durante 20 min a 25°C en baño maría. Los extractos fueron centrifugados a 4000 rpm x 20 min. La extracción con cada solvente fue repetida tres veces sobre la misma muestra de manera secuencial, combinándose los sobrenadantes de las tres extracciones (24).

La proteína solubilizada fue determinada por el método colorimétrico de Biuret, tomándose alícuotas de 60 µL del sobrenadante, expresándose en porcentaje (%) de proteínas extraídas.



**Figura 7: Procedimiento para solubilización de proteínas**

#### 4.2.8. Absorción de agua

La capacidad de absorción de agua del aislado proteico fue determinada por el método desarrollado por Naczki. 0.5 gramos del aislado proteico fueron pesados en tubos de centrífuga y dispersados en 4 mL de agua destilada. Cada 10 min se agitó el contenido de los tubos con una varilla de vidrio, por 30 seg, hasta un periodo total de 70 min. Los tubos fueron centrifugados a 2000 rpm por 15 min. Luego se decantó cuidadosamente el sobrenadante y se dejaron drenando los tubos en posición invertida durante 15 min. Posteriormente fueron pesados. El agua absorbida se expresó como el porcentaje de incremento en peso de la muestra (24).

#### 4.2.9. Absorción de grasa

La determinación de la capacidad de absorción de grasa del aislado proteico se hizo de acuerdo a la metodología descrita por Xu y Diosady. El procedimiento experimental realizado fue idéntico al efectuado para determinar la capacidad de

absorción de agua del aislado, descrito anteriormente, con la diferencia que se utilizó aceite en lugar de agua y las dispersiones aceite-aislado fueron agitadas cada 5 min en vez de 10, por un período total de 30 min (24).

#### **4.2.10. Análisis y caracterización de las proteínas que integran los aislados proteicos mediante Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS – PAGE)**

##### *Fundamento*

La separación y purificación de proteínas son necesarias para llevar a cabo el estudio y caracterización del proteoma de los sistemas biológicos. Los métodos de separación se basan en diferentes características de las proteínas tales como solubilidad, tamaño o carga, entre otras. Una de las técnicas más utilizadas es la electroforesis.

Los soportes de elección para la electroforesis de proteínas son los geles de poliacrilamida (PAGE) debido a su buena resolución y gran versatilidad. Además, poseen una serie de ventajas tales como: ser químicamente inertes, estables en un amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica, además son fáciles de generar mediante la polimerización de acrilamida.

La SDS-PAGE se usa frecuentemente para determinar el peso molecular de proteínas desconocidas mediante la comparación con la de proteínas estándar de peso molecular conocido.

##### *Procedimiento*

La electroforesis en gel de poliacrilamida fue realizada siguiendo la metodología descrita por Laemmli (37) (Anexo 7). Las placas de poliacrilamida fueron hechas de modo discontinuo presentando un gel de concentración de 4% y un gel de corrida de 10%. Las placas fueron preparadas utilizando una solución de acrilamida stock (30% T, 0.8% C). El gel de concentración fue preparado utilizando un tampón Tris HCl 0.5 M de pH = 6.8 y el gel de corrida fue hecho utilizando un tampón Tris HCl 1.5 M de pH = 8.8. A ambos geles se les agregó SDS al 20% en cantidad suficiente para llevar a una concentración final de 0.5% (v/v).

La SDS-PAGE fue realizada en sistema doble de mini placas. En los pozos se colocaron las muestras y los marcadores de masa molecular. La corrida electroforética fue realizada a 150 V. Los geles fueron coloreados con solución de Azul de Comassie al 0.05% y destañido con metanol al 10% y ácido acético al 5%.

#### **4.2.11. Determinación de la digestibilidad proteica *in vitro***

##### *Fundamento*

El análisis de digestibilidad por pepsina es un ejemplo de un procedimiento de control de calidad que intenta proporcionar información adicional en relación al valor nutricional verdadero de las fuentes de proteína.

La pepsina es una enzima digestiva que en la presencia de un medio ácido desdobla las proteínas del alimento. Colocando una muestra de la materia prima que se desea analizar en una solución que contenga pepsina y midiendo qué cantidad de proteína es digestible, podemos estimar el valor nutritivo relativo de dicha materia prima.

Es muy importante tener en cuenta que en el tracto digestivo existen otras enzimas que también ayudan a desdoblar las proteínas y que las condiciones son mucho más complejas que las que pueden simularse en un laboratorio. Por lo tanto, los resultados de porcentaje de digestibilidad en pepsina que se obtengan mediante este método nunca deberán confundirse con la digestibilidad verdadera de la materia prima.

##### *Procedimiento*

Para la determinación de la digestibilidad *in vitro* se utilizó la metodología de Torry descrita por Miller & Col. (38).

Se preparó una solución de pepsina al 0.020%, para lo cual se pesó con precisión 0.05g de pepsina y se enraso en una fiola de 250 mL con HCl 0.075 N. A partir de ésta se preparó una solución de pepsina al 0.0002% tomando 1 mL de la primera solución y enrasándola en una fiola de 100 mL con HCl 0.075N. Las dos soluciones se prepararon el mismo día en el que iban a ser utilizadas.

Se pesó 0.25 g del aislado proteico y se colocó en un matraz de 100 mL; a este se le añadió 50 mL de la solución de pepsina al 0.0002%, teniendo cuidado de no dejar nada de muestra en las paredes. Se marcó este matraz con el nombre de “Pepsina”.

Se pesó por segunda vez 0.25 g del aislado proteico y se colocó en otro matraz de 100 mL y en este frasco se añadió 50 mL de HCl 0.075 N, sin dejar muestra en las paredes. Se marcó este matraz con el nombre de “Ácido”.

Cada matraz se colocó en un agitador magnético a 45°C durante 4 horas. Al finalizar la incubación, se paró la reacción del matraz con pepsina, colocando el matraz en hielo por 15 min. Luego, debido a que la proteína es insoluble a pH ácido, se centrifugó el contenido de ambos matraces a 6000 rpm por 15 min.

Se descartó el sobrenadante y cada pellet (de ácido y de pepsina) se disolvieron en 4 mL de NaOH 0.05 M cada uno; La proteína solubilizada fue determinada por el método colorimétrico de Biuret, tomándose alícuotas de 60 µL del sobrenadante, expresándose en porcentaje% de proteínas.

#### 4.2.12. Costo de producción y rentabilidad del proceso

El costo de producción se realizó trabajando en condiciones ideales, esto implica que se trabajó con todo el residuo agroindustrial de Sacha Inchi que se genera en el Perú que represento el 57% de la semilla de Sacha Inchi el cual tiene una producción anual de 1.8 mil toneladas (4). Además del residuo agroindustrial de Sacha Inchi se trabajó con HCl y NaOH cuyos precios fueron obtenidos de la base de datos de la UCSM.

Se estableció el proceso productivo más adecuado para la obtención de del aislado proteico, a partir del proceso establecido y utilizando las metodologías descritas por Lang, Ulrich y Alkayat, citadas por Roque (47), las cuales permitieron hallar:

- **Costo total de la manufactura** en el cual se incluye el costo de las materias primas, costo de tratamiento de desechos, costo de utilitarios (agua, luz, etc), costo de la mano de obra, y el costo de la maquinaria.

- **Costo fijo total de manufactura** en el cual se incluye la depreciación de los equipos, los impuestos locales y seguros, y alquileres.
- **Costo general total de manufactura** en el cual se incluye el costo de administración, costo de distribución y ventas y el costo de investigación y desarrollo.

#### 4.2.13. Análisis Estadístico

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), completamente aleatorio, para evaluar los resultados obtenidos en la determinación de los parámetros adecuados para la obtención del aislado proteico.

Se obtuvieron estadísticas descriptivas para cada variable determinada en la valoración nutricional y funcional del aislado proteico.

Los cálculos estadísticos fueron realizados utilizando el programa computacional Statgraphics Centurion XVI.I. Un valor de P: 0.05 fue considerado significativo.

## Capítulo V

### Resultados y Discusión

#### 5.1. Composición química proximal del residuo agroindustrial de Sacha Inchi

Los resultados del análisis proximal obtenido a partir del residuo agroindustrial de Sacha Inchi se reportan en la Tabla 4 y en la Figura 8:

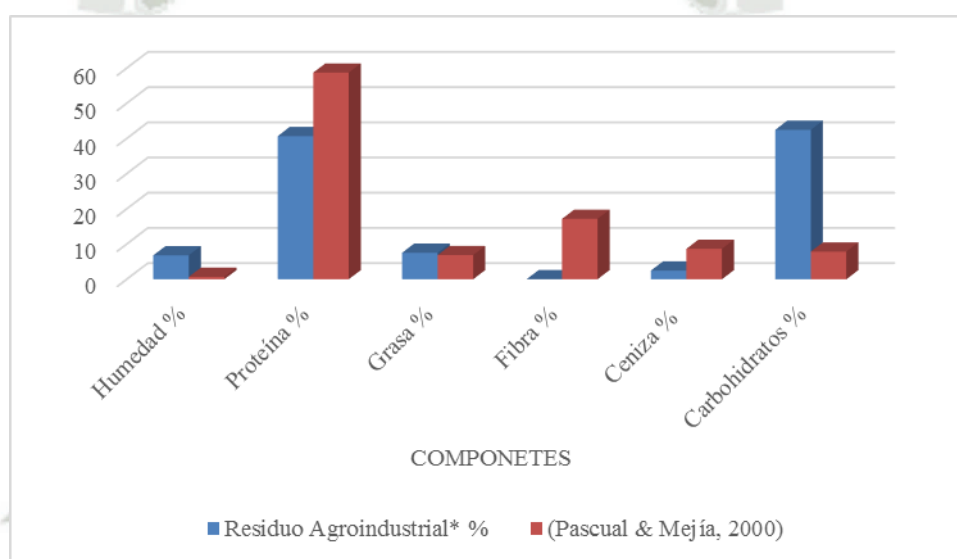
*Tabla 4: Análisis proximal del residuo agroindustrial de Sacha Inchi*

| Componente     | Residuo Agroindustrial*% | <i>Pascual &amp; Mejía (18)</i> |
|----------------|--------------------------|---------------------------------|
| Humedad%       | 6.8                      | 0.7                             |
| Proteína%      | 40.7                     | 58.7                            |
| Grasa%         | 7.5                      | 6.9                             |
| Fibra%         | 0                        | 17.2                            |
| Ceniza%        | 2.5                      | 8.7                             |
| Carbohidratos% | 42.5                     | 7.9                             |

\*: Promedio de tres determinaciones

El resultado del análisis proximal de la muestra determina que, tomando en cuenta los datos establecidos por Pascual & Mejía (18), varían considerablemente en comparación a los resultados obtenidos para la presente muestra. Esto podría deberse al método de extracción de aceite, el cual podría ser distinto, al realizado por Pascual & Mejía (18) a cada uno de las muestras; esta variación también puede deberse al lugar de procedencia de la materia prima (m.s.n.m., características fenológicas de la variedad, contenido de sales y pH de los suelos, etc.) (21), factores que no entran dentro de los objetivos del presente estudio.

Al realizar el desoleagenizado de la muestra con éter de petróleo el peso total de la muestra disminuyó en un 21.7% mientras que el porcentaje de proteína se incrementó a 58%, la disminución de grasas no es muy significativa solo se redujo a un 6.4%. Las harinas que se utilizan como materia prima en la extracción de proteínas tienen por lo general contenidos inferiores al 1% de grasa (25); sin embargo, considerando que la funcionalidad de las proteínas es dependiente de su estado nativo y que el desoleagenizado refiere un mayor grado de desnaturalización de proteínas no se realizó una posterior extracción por solvente.



**Figura 8:** Composición proximal de los residuos agroindustriales de Sacha Inchi en comparación con los datos establecidos por Pascual & Mejía (2000)

## 5.2. Parámetros óptimos de extracción de las proteínas del residuo agroindustrial de Sacha Inchi.

### 5.2.1. Parámetro Óptimo de pH

Los resultados del efecto del pH en la extracción de proteínas se muestran en la Tabla 5. El análisis estadístico realizado indica que el pH tiene un efecto significativo ( $\alpha=0.05$ ) en la extracción de proteínas. La solubilidad de las proteínas de Sacha Inchi puede ser incrementada por aumento del pH por encima de 8.0; no obstante por encima de pH 10, la solubilidad de las proteínas podría ser significativamente afectada conllevando a una rápida desnaturalización de las mismas.

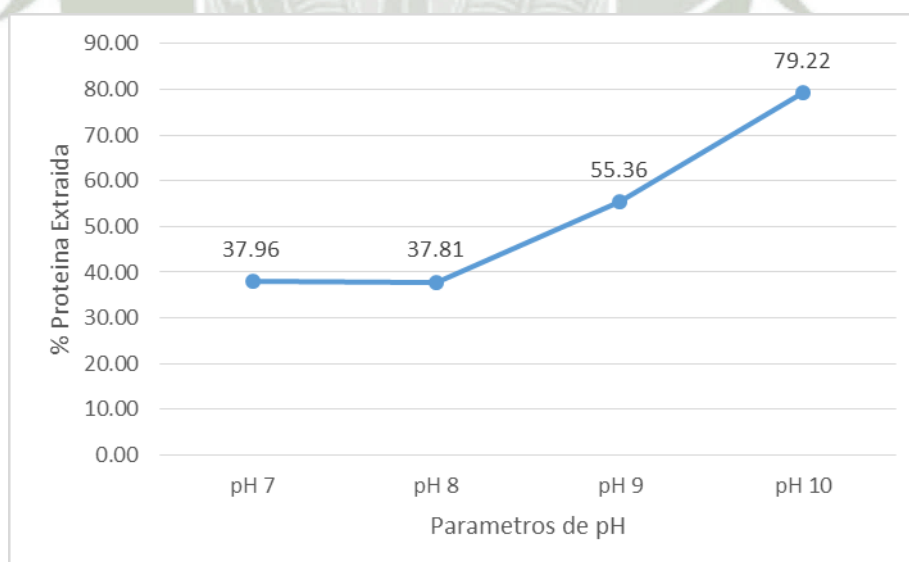
**Tabla 5: Efecto del pH en la extracción de proteínas de los residuos agroindustriales de Sacha Inchi**

| Parámetros | Proteína Extraída* (%) | Desviación Estándar |
|------------|------------------------|---------------------|
| pH 7       | 38 <sup>a</sup>        | 1.6                 |
| pH 8       | 37.8 <sup>a</sup>      | 4.4                 |
| pH 9       | 55.4 <sup>b</sup>      | 7.4                 |
| pH 10      | 79.2 <sup>c</sup>      | 2.4                 |

\* Promedio de cuatro determinaciones.

\*\* Letras diferentes indican diferencias significativas

En la Figura 9, se observa que la solubilidad de las proteínas de Sacha Inchi aumenta cuando se incrementa el pH, alcanzando un máximo a pH 10 (79.2%), aunque se recomienda realizar la extracción de proteínas en el rango de pH 8 a 9; considerando que a partir de pH 9 se favorece reacciones que podrían volver a la proteína menos digerible (25); se trabajó con un pH 10 debido a la gran diferencia entre la cantidad de proteína obtenida a pH 9 y pH 10 además que diversos autores como Porras (2), Calisaya & Alvarado (21), Silva (22) y Gonçalvess & Col. (27) trabajaron a pH 10 presentando buenos resultados de digestibilidad proteica.



**Figura 9: Influencia del pH en la extracción de proteínas de Sacha Inchi**

En la extracción alcalina, las proteínas solubilizadas serían básicamente globulinas por ser estas solubles en álcali. Además, el extracto proteico presentaría azúcares y sales que serían extraídos de la harina junto con las proteínas. El residuo sólido contendría polisacáridos insolubles en agua, residuos de proteínas y fibras (39).

### 5.2.2. Parámetro óptimo de la relación materia prima/solvente

Los resultados de la influencia de la relación materia prima/solvente en la extracción de proteínas de Sacha Inchi se reportan en el Tabla 6. El análisis estadístico indica que la relación MP/S tiene en efecto significativo ( $\alpha=0,05$ ) en la extracción de proteínas y que la mayor extracción de proteínas se logra con la relación MP/S de 1/20 (75%), no existiendo diferencias significativas con las mayores diluciones empleadas.

**Tabla 6: Influencia de la relación materia prima/solvente en la extracción de proteína de residuos agroindustriales de Sacha Inchi**

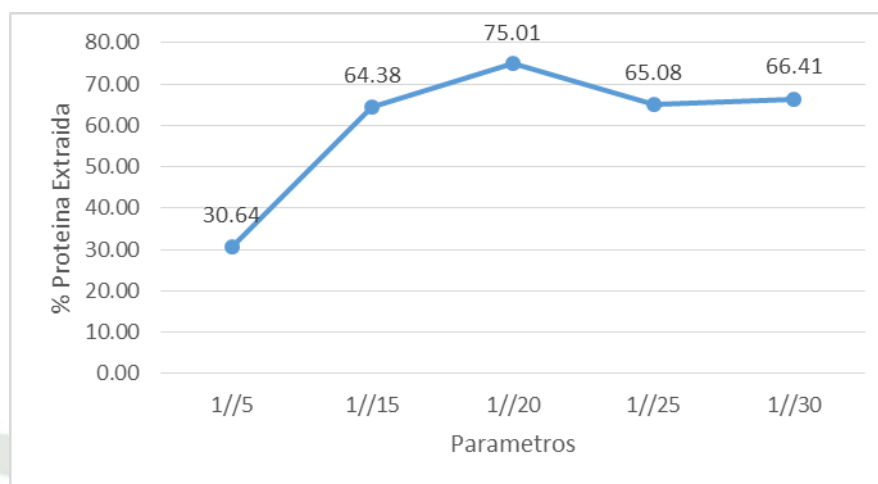
| Parámetros | Proteína Extraída* (%) | Desviación Estándar |
|------------|------------------------|---------------------|
| 1/5        | 30.6 <sup>a</sup>      | 0.3                 |
| 1/15       | 64.4 <sup>b</sup>      | 5.2                 |
| 1/20       | 75 <sup>c</sup>        | 5.5                 |
| 1/25       | 65 <sup>b</sup>        | 4                   |
| 1/30       | 66.4 <sup>b</sup>      | 4.4                 |

\* Promedio de cuatro determinaciones.

\*\* Letras diferentes indican diferencias significativas

En la Figura 10, se aprecia que la cantidad de proteínas extraídas se incrementa inicialmente al variar la relación MP/S de 1/5 a 1/15 siendo la relación materia prima solvente con mayor extracción de proteínas 1/20, y que a mayores cantidades de solvente no se logran incrementos en la solubilización de proteínas. Asimismo, se observa que mayores cantidades de solvente producen una disminución en el extracto proteico. Al respecto, Ventura & Col. (25) obtuvieron una buena solubilización de proteínas de Nuez de marañón (*Anacardium occidentale*) con una relación MP/S de 1/15 utilizando también NaOH. Por otro lado otros investigadores han determinado

como óptimas relaciones de materia prima/solvente que van de 1/15 en proteínas de germen de quinua (*Chenopodium quinoa*) (21), a 1/40 con proteínas de lupino (*Lupinus sp.*) (2).



**Figura 10: Influencia de la relación materia prima/ solvente en la extracción de proteínas de Sacha Inchi**

### 5.2.3. Parámetro óptimo de temperatura

Los resultados de la influencia de la temperatura en la extracción de proteínas se reportan en la Tabla 7. El análisis estadístico indica que la temperatura tiene un efecto significativo ( $\alpha=0,05$ ) en la solubilización de proteínas de Sacha Inchi. Guerrero (39), 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. Esta desnaturalización va seguida, frecuentemente de una agregación y la solubilización de la proteína desnaturalizada llega a ser inferior a la de la proteína natural.

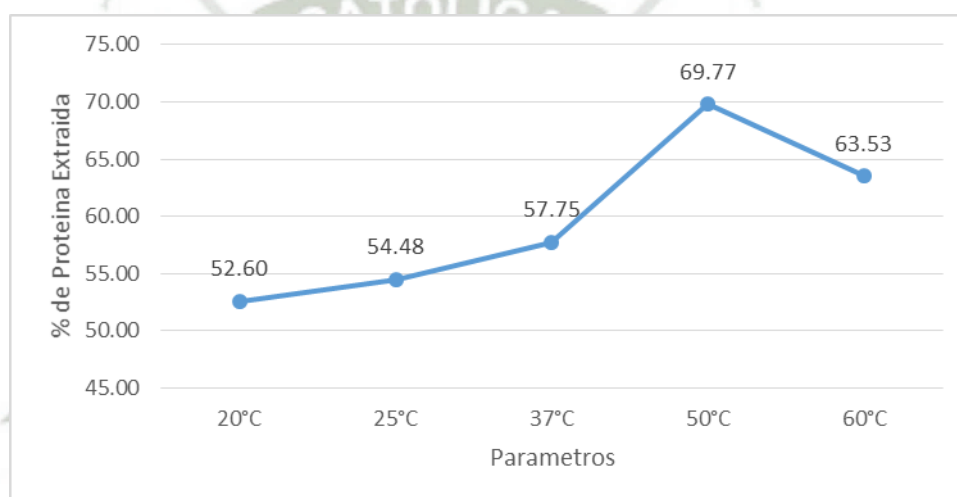
En la Figura 11, se puede apreciar que la máxima extracción de proteínas de Sacha Inchi (69.8%) es a 50°C. Esto se podría deber a que, en el presente estudio, se trabajó con una harina con un mayor contenido de grasa, la que podría ser emulsionada con parte de las proteínas presentes, por lo que el calentamiento origina la desnaturalización de las proteínas con la consiguiente ruptura de la emulsión, facilitando por tanto la extracción de estas proteínas (25).

**Tabla 7: Efecto de la temperatura en la extracción de proteínas de los residuos agroindustriales de Sacha Inchi**

| Parámetros | Proteína Extraída* (%) | Desviación Estándar |
|------------|------------------------|---------------------|
| 20°C       | 52.6 <sup>a</sup>      | 1.6                 |
| 25°C       | 54.5 <sup>a</sup>      | 1.9                 |
| 37°C       | 57.8 <sup>b</sup>      | 0.8                 |
| 50°C       | 69.8 <sup>c</sup>      | 1.4                 |
| 60°C       | 63.5 <sup>d</sup>      | 2.6                 |

\* Promedio de cuatro determinaciones.

\*\* Letras diferentes indican diferencias significativas



**Figura 11: Influencia de la temperatura en la extracción de proteína de Sacha Inchi**

#### 5.2.4. Parámetro óptimo de tiempo

Los resultados de los diferentes tratamientos empleados para determinar el efecto del tiempo en la extracción de proteínas se muestra en la Tabla 8. El análisis estadístico nos indica que el tiempo tiene un efecto significativo ( $\alpha=0.05$ ) en la solubilización de proteínas de Sacha Inchi. El parámetro que presento la mayor extracción de proteínas se obtiene a los 90 min, dicho resultado es el parámetro muy alto en comparación con otros aislados que emplean un tiempo máximo de 40 min.

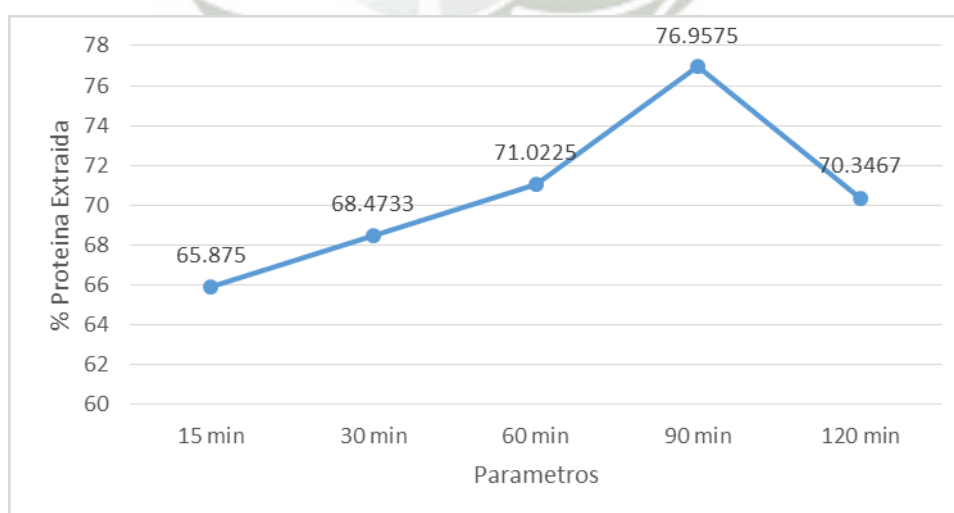
**Tabla 8: Efecto del tiempo en la extracción de proteínas de los residuos agroindustriales de Sacha Inchi**

| Parámetros | Proteína Extraída* (%) | Desviación Estándar |
|------------|------------------------|---------------------|
| 15 min     | 65.9 <sup>a</sup>      | 1.1                 |
| 30 min     | 68.5 <sup>ab</sup>     | 1.6                 |
| 60 min     | 71 <sup>b</sup>        | 1.4                 |
| 90 min     | 77 <sup>c</sup>        | 2.5                 |
| 120 min    | 70.3 <sup>b</sup>      | 1                   |

\* Promedio de cuatro determinaciones.

\*\* Letras diferentes indican diferencias significativas

En la Figura 12, se puede observar que hay una máxima extracción de proteínas (77%) a los 90 min de extracción. Luego de este tiempo se registró una disminución en la concentración del extracto proteico, que influyó negativamente en la cantidad de proteínas extraídas. Sin embargo, el tiempo de extracción de proteínas está relacionado con otros factores tales como, grado de agitación, tamaño de partícula, naturaleza de la fuente proteica y otras circunstancias concurrentes en la disolución. Así Vioque & Col. (27), reportaron como tiempo óptimo de extracción de proteína de colza (*Brassica napus*), 30 min. Porras (2) reportó un tiempo óptimo de extracción de 40 min para las proteínas de lupino (*Lupinus sp.*), respectivamente. Por lo general el parámetro reportado más utilizado es a los 30 min como lo demuestran los estudios realizados por Calisaya & Alvarado (21), Manso (22), Gonzales (24).



**Figura 12: Influencia del tiempo en la extracción de proteínas de Sacha Inchi**

### 5.2.5. Parámetro óptimo de recuperación de proteínas: precipitación ácida

Luego de obtener los parámetros adecuados para la extracción de las proteínas de Sacha Inchi, se evaluó la influencia del pH en la recuperación de las proteínas solubilizadas. Los resultados se observan en el Tabla 9. El análisis estadístico del factor en estudio, indica que el pH influye significativamente ( $\alpha = 0,05$ ) en la recuperación de las proteínas de Sacha Inchi. La prueba nos indica que el pH de mínima solubilidad proteica es 5.8 (21.34%), las pruebas fueron realizadas utilizando el parámetro de tiempo de 30 min y no el de 90 min a fin de realizar las pruebas en un menor tiempo, al realizar la prueba a 90 min y utilizando el pH de 5.8 se determinó que la mínima solubilidad proteica es 12.724% siendo mucho más efectiva nuestra recuperación de proteínas.

**Tabla 9: Influencia del pH en la recuperación de las proteínas de los residuos agroindustriales de Sacha Inchi, se trabajó a 30 min**

| Parámetros          | Proteína en solución*% | Desviación Estándar |
|---------------------|------------------------|---------------------|
| <b>pH 2</b>         | 58.2 <sup>a</sup>      | 1.9                 |
| <b>pH 3</b>         | 51.1 <sup>b</sup>      | 1.3                 |
| <b>pH 4</b>         | 38.5 <sup>c</sup>      | 1.3                 |
| <b>pH 4.8</b>       | 32.4 <sup>d</sup>      | 1.2                 |
| <b>pH 5</b>         | 27.4 <sup>e</sup>      | 1.2                 |
| <b>pH 5.6</b>       | 26.9 <sup>ef</sup>     | 2.3                 |
| <b>pH 5.8</b>       | 21.3 <sup>g</sup>      | 1.4                 |
| <b>pH 6</b>         | 26.1 <sup>ef</sup>     | 2.5                 |
| <b>pH 6.2</b>       | 26.3 <sup>ef</sup>     | 1.5                 |
| <b>pH 6.5</b>       | 25.3 <sup>f</sup>      | 0.7                 |
| <b>pH 5.8 90min</b> | 12.7 <sup>h</sup>      | 0.9                 |

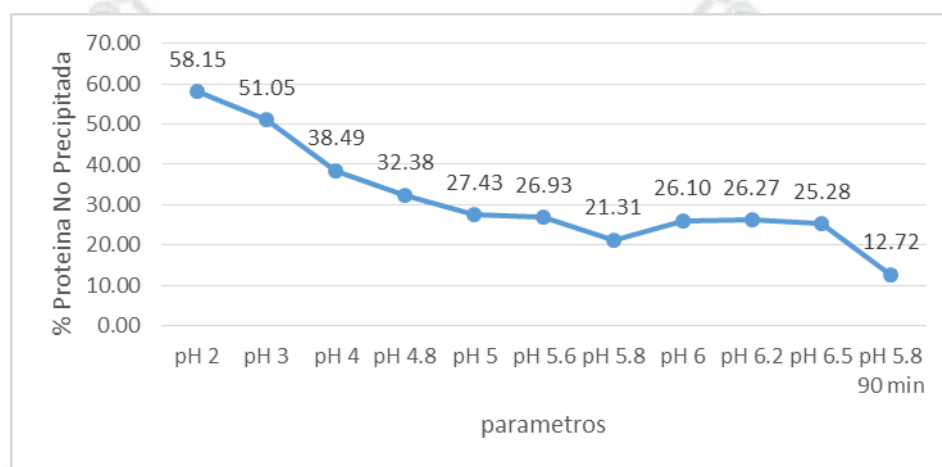
\* Promedio de cuatro determinaciones.

\*\* Letras diferentes indican diferencias significativas

En la Figura 13 en la que se puede apreciar que las proteínas son menos solubles en el rango de pH de 5.0 a 6.5, rango que correspondería a la región isoelectrica. El

mínimo de solubilidad en las proximidades del punto isoeléctrico (pI) 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 aparente (precipitación isoeléctrica) precipita la mayor fracción proteica, pudiéndose perder en el líquido sobrenadante algunas proteínas tipo albúmina ricas en azufre, solubles ordinariamente en el punto pI (25).

La recuperación de proteínas a temperaturas bajas (4°C) permitió obtener un coágulo proteico de color blanco marfil brillante, de textura cremosa, cohesiva y suave.



**Figura 13: Influencia del pH en la recuperación de proteínas de Sacha Inchi a 30 min.**

### 5.3. Composición química proximal de los aislados proteicos obtenidos

Los resultados de las propiedades organolépticas se presentan en la Tabla 10 y la Figura 14. Se puede apreciar que nuestro aislado proteico presenta una coloración beige claro, no presenta olor, tampoco presenta sabor y la textura que presenta el aislado es muy fina. Estos resultados son los esperados según lo descrito por Calisaya & Alvarado (1) quienes indicaron que dichas propiedades son las esperadas en cualquier aislado proteico a excepción del color que puede variar de acuerdo a la materia prima utilizada.

**Tabla 10: Propiedades organolépticas del aislado proteico del residuo agroindustrial de Sacha Inchi**

| Propiedades | Características |
|-------------|-----------------|
| Color       | Beige claro     |
| Olor        | Inodoro         |
| Sabor       | Insípido        |
| Textura     | Muy Fina        |



**Figura 14: Proteína de Sacha Inchi obtenida**

Los resultados del análisis proximal de los aislados proteicos obtenidos, se presentan en la Tabla 11 y la Figura 15. Se puede observar que el contenido proteico expresado en base seca, es mayor al 90%; al respecto se sabe los aislados proteicos son productos con un contenido mayor a 80% de proteína expresado en base seca, por lo que a los productos obtenidos a partir de Sacha Inchi se les puede considerar como aislados proteicos (25).

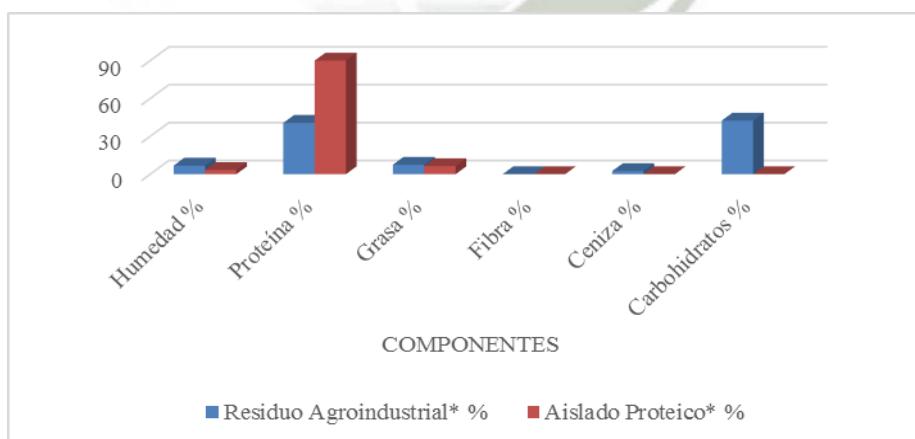
Respecto al contenido de grasa, se puede observar que es mayor a lo reportado para productos similares que presentan por lo general un nivel de grasa menor al 1% como se puede observar en los trabajos realizados por Calisaya & Alvarado (21), Silva (22), Gonzales (24), Gonçalves y Col. (27), Martínez y Col. (30). Este mayor

tenor graso se debería a que se trabajó con una harina semidesoleagenizada y no con una harina completamente desoleagenizada. Los aislados proteicos obtenidos presentaron olor y sabor neutro. Si se compara los valores del aislado proteico con respecto a la muestra inicial puede notarse en el aislado una disminución en cenizas y carbohidratos en relación a la harina. Este decrecimiento podría explicarse sobre la base de la solubilidad de los componentes no proteicos en la semilla. Así, es de considerar que los compuestos insolubles permanecieron en el residuo durante la extracción de proteínas, mientras que los solubilizados, en su mayor parte no precipitaron durante la precipitación isoelectrica, quedando por consiguiente sobrenadante. En el caso de las cenizas, la disminución podría atribuirse además a la lixiviación de minerales por el lavado realizado al aislado.

**Tabla 11: Composición química proximal del aislado proteico de Sacha Inchi**

| Componente            | Residuo Agroindustrial* % | Aislado Proteico* % |
|-----------------------|---------------------------|---------------------|
| <b>Humedad%</b>       | 6.8                       | 3.3                 |
| <b>Proteína%</b>      | 40.7                      | 94.2                |
| <b>Grasa%</b>         | 7.5                       | 6.4                 |
| <b>Fibra%</b>         | 0                         | 0                   |
| <b>Ceniza%</b>        | 2.5                       | 0                   |
| <b>Carbohidratos%</b> | 42.5                      | 0                   |

\*: Promedio de tres determinaciones



**Figura 15: Composición proximal del aislado proteico de Sacha Inchi en comparación con la composición proximal de los residuos agroindustriales de Sacha Inchi**

#### 5.4. Perfil de proteínas por solubilidad

Los resultados de la extracción secuencial de proteínas con los cuatro solventes utilizados en el fraccionamiento proteico de los residuos agroindustriales de Sacha Inchi así como los aislados proteicos obtenidos a partir de esta, son presentados en la Tabla 12 y Figura 16 expresados como porcentajes del total del contenido proteínico.

En la clasificación de las proteínas vegetales de acuerdo a su solubilidad, desarrollada por Osborne citado por Gonçalves y Col. (27), se distinguen cuatro fracciones diferentes: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en solución salina), prolaminas (solubles en alcohol) y glutelinas (parcialmente solubles en NaOH diluido). En este estudio adoptamos este procedimiento de fraccionamiento proteico, por ser uno de los más frecuentemente usados.

Como puede apreciarse en la Tabla 11 y en la Figura 16, las proteínas más abundantes en el residuo agroindustrial de Sacha Inchi fueron proteínas solubles en agua las cuales podrían ser albúminas (42.9%), seguidas por las proteínas solubles en NaOH 0.5N las cuales probablemente se trate de glutelinas (33.3%) y por último las proteínas solubles en ClNa 5% correspondientes probablemente a globulinas (19.1%). Las leguminosas y oleaginosas son en su mayoría globulinas y albúminas, características que el fraccionamiento proteico del residuo agroindustrial de Sacha Inchi también posee. La proteínas con contenido bajos fueron las aquellas solubles en etanol las que podrían corresponder a prolaminas (4.6%). Respecto a esta última fracción, los resultados confirman que las semillas de leguminosas y oleaginosas no contienen prolamina o sólo están presentes en cantidades muy pequeñas (24).

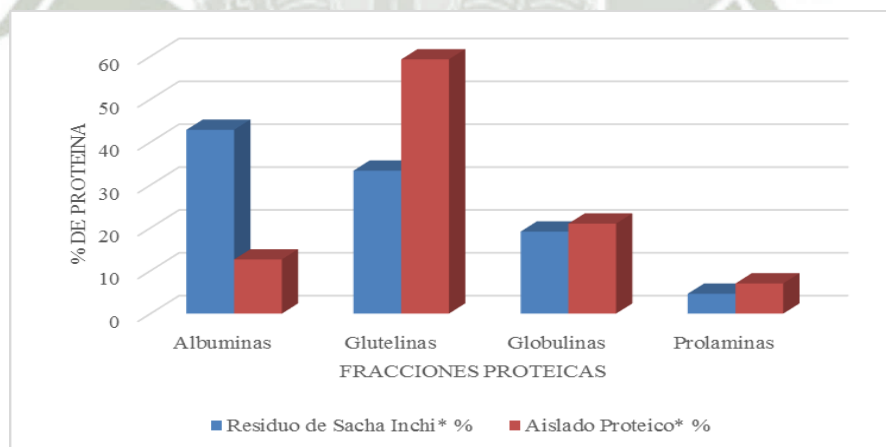
**Tabla 12: Fracciones proteicas en el residuo agroindustrial de Sacha Inchi y el aislado proteico de Sacha Inchi**

| <b>Fracción Proteica</b> | <b>Residuo de Sacha Inchi*%</b> | <b>Aislado Proteico*%</b> |
|--------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| <b>Albúminas</b>         | 42.9                            | 12.6                      |
| <b>Glutelinas</b>        | 33.3                            | 59.3                      |
| <b>Globulinas</b>        | 19.1                            | 21                        |
| <b>Prolaminas</b>        | 4.6                             | 7                         |

\*: Promedio de tres determinaciones

A realiza el mismo análisis en el aislado proteico se pudo apreciar un incremento en el porcentaje de las proteínas solubles en NaOH 0.5N (Glutelinas) (59.3%) esto se podría deben a que el porcentaje de proteínas solubles en agua (albúmina) de nuestro aislado (12.6%) es mucho menor al que contenía inicialmente la muestra, ya que como indican Ventura & Col. (25) al realizar la precipitación ácida de las proteínas se pueden perder en el líquido sobrenadante algunas proteínas tipo albúmina ricas en azufre, solubles ordinariamente en el punto pI, esto trajo como consecuencia una disminución en el total de proteína obtenida del aislado proteico.

En el caso de las proteínas solubles en ClNa 5% (Globulinas) en el aislado proteico no presenta una diferencia significativa con respecto a la muestra inicial, esto puede deberse al hecho de que la mejor forma para la extracción de ésta es utilizando NaCl y en nuestro medio se puede encontrar NaCl puesto que para estabilizar el pH y para aumentar o residir este se hace un uso frecuente tanto de NaOH como de HCl que al mezclarse reaccionan formando NaCl, además no sufre una cambio muy fuerte en su estructura debido a que las globulinas son prácticamente insolubles en agua (24), es más las globulinas pueden haberse solubilizado junto con las albúminas, debido a las sales neutras existentes y por efectos del pH.



**Figura 16: Fracciones proteicas en el aislado proteico de Sacha Inchi**

Existe una diferencia significativa en el caso de las proteínas solubles en etanol (prolaminas), pero el contenido de las mismas continua siendo muy bajo con respecto al resto de proteínas presentes en el aislado.

### 5.5. Capacidad de absorción de agua

Como se puede observar en la Tabla 13 y Figura 17, el aislado proteico obtenido en nuestro estudio mostró una capacidad de absorción de agua concordante con la de los aislados de las otras plantas allí tabuladas. Su valor es ligeramente más alto al del aislado de habas (*Vicia faba*) y ébano (*Pithecellobium flexicaule*) pero ligeramente inferior al de los otros aislados referidos. El valor encontrado para esta propiedad funcional es más alto que el del aislado proteico de frijol (*Phaseolus vulgaris*) es y comparable al determinado por en aislados de garbanzos (*Cicer arietinum*) (24).

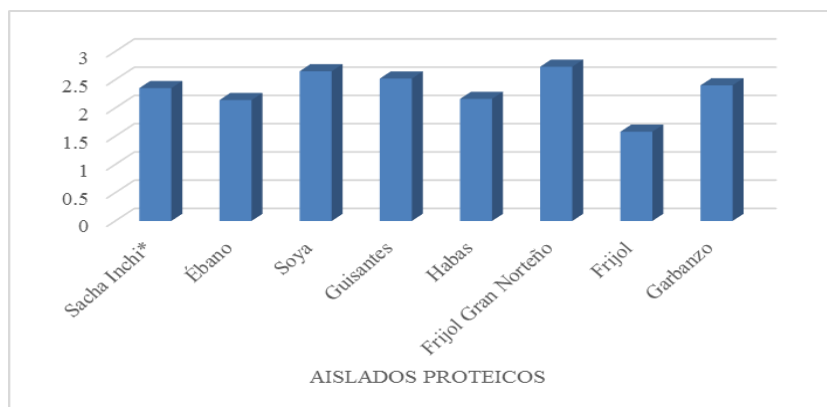
**Tabla 13: Capacidad de absorción de agua del aislado proteico de Sacha Inchi y de los aislados de otros productos alimenticios**

| Capacidad de Absorción de Agua | Valor (mL) |
|--------------------------------|------------|
| <b>Sacha Inchi*</b>            | 2.4        |
| <b>Ébano</b>                   | 2.1        |
| <b>Soya</b>                    | 2.7        |
| <b>Guisantes</b>               | 2.5        |
| <b>Habas</b>                   | 2.2        |
| <b>Frijol Gran Norteño</b>     | 2.7        |
| <b>Frijol</b>                  | 1.6        |
| <b>Garbanzo</b>                | 2.4        |

\*: Promedio de tres determinaciones

\*\* : Gonzales (24)

Como se mencionó anteriormente, las condiciones experimentales operadas en el proceso de obtención de los aislados juegan un papel importante en los valores determinados para esta y las otras propiedades funcionales. El agua absorbida por las proteínas es función de varios parámetros, entre los cuales mencionan: características conformacionales de la molécula de proteína, factores estéricos, balance de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, presencia de lípidos y carbohidratos asociados con las proteínas, medio ambiente fisicoquímico (pH, fuerza iónica, temperatura, etc.) y propiedades termodinámicas del sistema (24).



**Figura 17:** Comparación de la capacidad de absorción de agua del aislado proteico de Sacha Inchi con respecto a otros productos alimenticios

El aislado proteico de Sacha Inchi fue evaluado para su capacidad de absorción de agua en su forma isoelectrica, donde su solubilidad es mínima y las interacciones proteína-proteína son máximas. De acuerdo con lo antes señalado, los cambios conformacionales en las moléculas de proteínas generadas por estas interacciones, bajo la influencia del pH del medio, pueden haber expuesto o encubierto a sitios hidrofílicos de las proteínas, afectando de una u otra forma su capacidad de absorber agua.

### 5.6. Capacidad de absorción de grasa

Como se puede observar en la Tabla 14 y Figura 18, el aislado proteico obtenido en nuestro estudio mostró una capacidad de absorción de grasa concordante con la de los aislados de las otras plantas allí tabuladas. Su valor es aproximadamente igual al del aislado de Frejol Gran Norteño pero ligeramente inferior al de Habas (*Vicia faba*) y Garbanzos (*Cicer arietinum*). El valor encontrado por nosotros para esta propiedad funcional es más alto que el reportado que el reportado para el resto de aislados proteicos.

La capacidad de absorción de grasa también es función de los parámetros antes mencionados, y al igual que la absorción de agua es afectada por los cambios conformacionales que pueden haber sufrido las moléculas de proteínas durante el procesamiento del aislado; aunque en este caso está en relación directa con el número

de sitios hidrofóbicos (no polares) de las cadenas de proteínas que estén disponibles para enlazarse con las moléculas de lípidos (24).

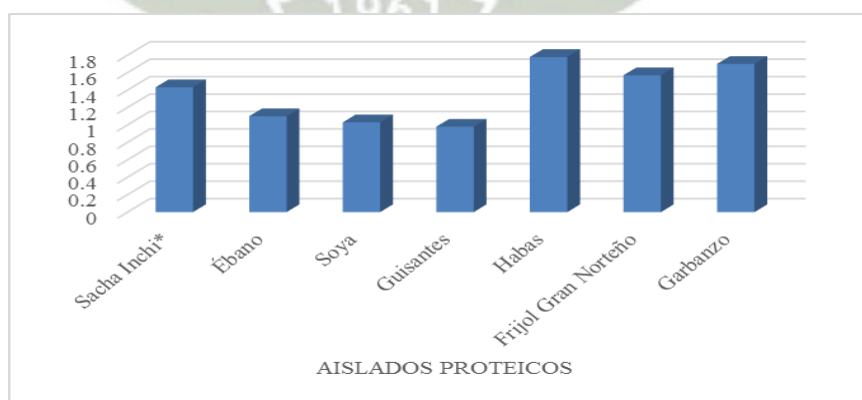
**Tabla 14: Capacidad de absorción de grasas del aislado proteico de Sacha Inchi y de los aislados de otros productos alimenticios**

| Capacidad de Absorción de Grasas | Valor (mL) |
|----------------------------------|------------|
| <b>Sacha Inchi*</b>              | 1.4        |
| <b>Ébano</b>                     | 1.1        |
| <b>Soya</b>                      | 1.0        |
| <b>Guisantes</b>                 | 0.9        |
| <b>Habas</b>                     | 1.8        |
| <b>Frijol Gran Norteño</b>       | 1.6        |
| <b>Garbanzo</b>                  | 1.7        |

\*: Promedio de tres determinaciones

\*\* : Gonzales (24)

La capacidad de absorber grasa puede determinar si un material proteico tendría un buen desempeño como extensor de carne en una preparación alimenticia. Como hemos podido apreciar, la capacidad de absorción de grasa del aislado proteico de Sacha Inchi es superior al de la Soya (*Glycine max*). Puesto que la soya (*Glycine max*) es el alimento más utilizado como extensor en productos cárnicos; se puede inferir que el aislado de Sacha Inchi podría ser utilizado para este fin (24).



**Figura 18: Comparación de la capacidad de absorción de grasas del aislado proteico de Sacha Inchi con respecto a otros productos alimenticios**

### **5.7. Análisis y caracterización de las proteínas que integran los aislados proteicos mediante SDS-PAGE**

Se realizó una corrida en gel de poliacrilamida para cada una de las muestras por duplicado, como se puede observar en la Figura 19, para resaltar los resultados obtenidos en la solubilidad de las fracciones proteicas, donde se obtuvo como resultado la presencia de albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas.

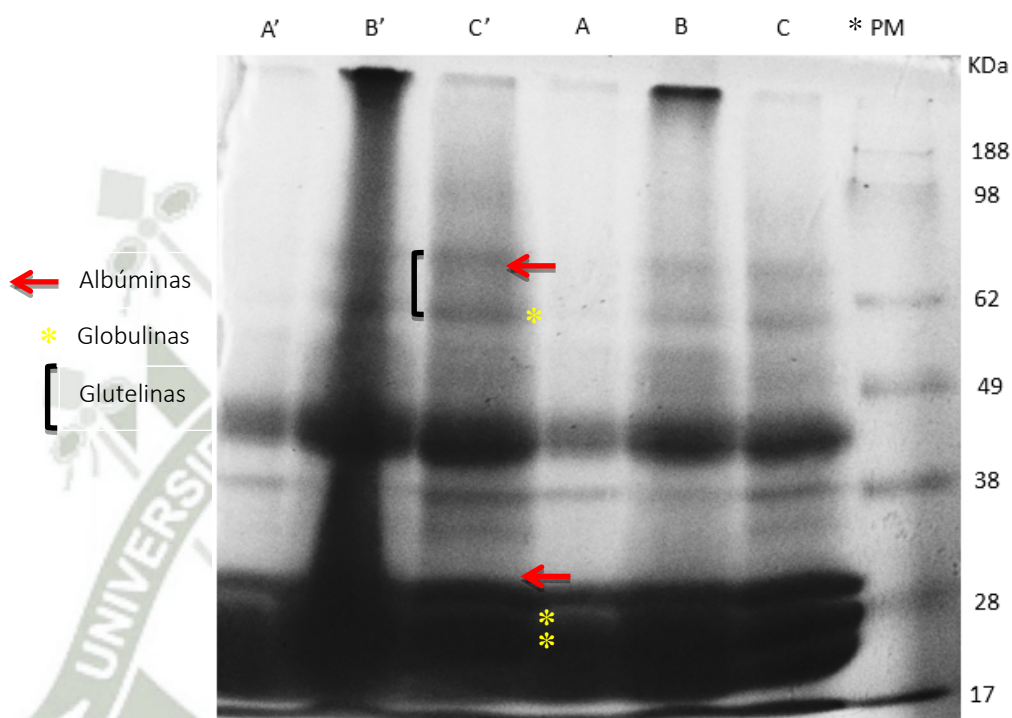
Se observa que todas las muestras presentan el mismo patrón en la corrida; sin embargo el aislado proteico presenta una mejor diferenciación de las bandas, por eso será el único pozo a analizar específicamente.

Según Gorriti (40) en la proteína de Sacha Inchi se destaca la presencia de una albúmina como proteína de almacenamiento, soluble en agua y a su vez fácilmente digerible por las enzimas proteicas del hombre. La albúmina es una proteína compuesta de dos polipéptidos glicosilados, con pesos moleculares estimados de 32,800 y 34,800 Dalton (Da) respectivamente; los cuales pueden ser observados en la Figura 19, a su vez según Sathe & Col. (41) (Anexo 9) las albúminas también presentan una banda menos intensa de un peso aproximado de 70 kDa presente también en nuestro aislado proteico. Las albúminas son buena fuente de lisina y aminoácidos azufrados, la presencia de aminoácidos azufrados en estas proteínas da lugar a la formación de agregados de alto peso molecular los cuales después de la reducción con mercaptoetanol son resueltos en cadenas polipeptídicas de bajo peso molecular (42).

Las globulinas en nuestro gel presentan 3 bandas bien diferenciadas, una aproximadamente a 60 kDa y las otras dos bastante juntas a 23 y 25 kDa, respectivamente. Sathe & Col. (41) Señala estas tres bandas como resaltantes en un gel electroforético de Sacha Inchi, mientras que Nogueira & Col. (43) resalta que los genotipos salvajes y los cultivos de arroz presentan una banda bastante intensa de globulinas a 25 kDa aproximadamente.

Se puede observar una banda que va desde los 60 a 70 kDa, la cual pertenece a las glutelinas (41). Las prolaminas contribuyen solo con un pequeño porcentaje en la

composición del aislado proteico, a su vez éstas están compuestas principalmente por 4 polipéptidos con masa molar menos a 15 kDa (41), es por esta razón que no se pueden observar bandas definidas al final del gel electroforético; además el marcador presenta una última banda a 17 kDa.



**Figura 19: Electroforesis SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10%. (A) Residuo agroindustrial de Sacha Inchi; (B) Harina desoleagenizada de Sacha Inchi; (C) Aislado proteico. \*Marcador de Peso molecular: SeeBlue® Plus2 (Anexo 8)**

Nuestro aislado proteico presento un patrón polipeptídico comprendido entre 20 y 70 kDa, muy parecido al patrón polipeptídico para harina desoleagenizada de Sacha Inchi descrito por Sathe (41), donde los polipéptidos se observaron en un rango de 10-70 kDa. A su vez las proteínas solubles de la harina de semilla, están compuestas principalmente por dos especies moleculares (rango de 32-35 kDa y 60-62 kDa). Igualmente, la albúmina verdadera, globulina y glutelina fueron las fracciones más importantes entre las proteína solubles de la harina de semillas, la prolamina contribuye en pequeña proporción.

### 5.8. Digestibilidad *in vitro* del aislado proteico de Sacha Inchi

En la Tabla 14 se puede observar el valor obtenido para la digestibilidad *in vitro* de la proteína del aislado de Sacha Inchi. Este resultado es promedio de tres determinaciones realizadas utilizando el método de Torry.

Si se compara este resultado con el valor de la digestibilidad verdadera de la proteína de la semilla completa, determinada previamente por Hamaker (14), como se muestra en la Tabla 15; se puede notar que la digestibilidad de la proteína de Sacha Inchi disminuyó en aproximadamente 32% con el proceso de aislamiento proteico realizado. Esta disminución se podría deber a que el método utilizado por nosotros utiliza una concentración muy baja de pepsina, lo cual hace mucho más sensible la digestibilidad de las proteínas, además de ellos esto también podría ser un indicador de que la calidad de nuestra proteína podría no ser buena o presentar daños en su estructura como lo indica la FAO (43), una prueba de ello podría ser la reducción de la cantidad de albúmina total durante el proceso de obtención del aislado proteico.

Este decremento en la digestibilidad también se podría deberse a la presencia de ser atribuido a que nuestra proteína contiene una buena cantidad compuestos antinutricionales (taninos, fitatos) que no pudieron ser eliminados durante el proceso de obtención.

**Tabla 15: Digestibilidad *in vitro* de la proteína del aislado obtenido de Sacha Inchi, comparada con la digestibilidad de Sacha Inchi**

| Material                  | Digestibilidad % |
|---------------------------|------------------|
| <b>Aislado Proteico*</b>  | 65.355           |
| <b>Semilla Completa**</b> | 96               |

\*: Promedio de tres determinaciones

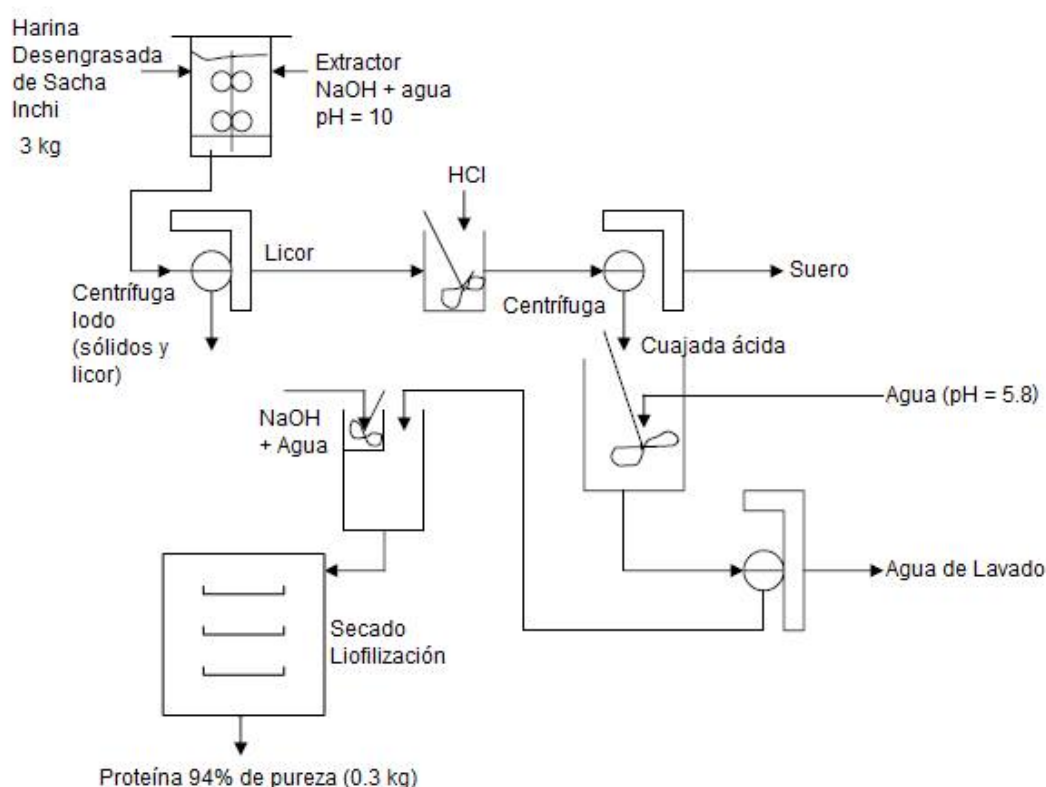
\*\* : Hamaker (14)

Los taninos y fitatos forman complejos insolubles con las proteínas, reduciendo su valor biológico, además se ha comprobado que los fitatos pueden inhibir a enzimas como pepsina, alfa-amilasa y tripsina bajo condiciones *in vitro*; cuando esto ocurre las proteínas no son digeridas adecuadamente y en consecuencia disminuye la absorción de aminoácidos en el organismo.

### 5.9. Costo de producción del aislado proteico de Sacha Inchi

Se determinó que el residuo agroindustrial producido por la extracción de aceite de Sacha Inchi corresponde a 35 9100 Tm/año, además se determinó que para poder obtener un aislado proteico de esta cantidad de Sacha Inchi se necesita de 3.15 Tm/año de NaOH y 3.14 Tm/año de HCl.

En la Figura 20 se puede apreciar el proceso de producción del aislado proteico de Sacha Inchi el cual fue generado a partir de los resultados previamente establecidos en el presente trabajo, se puede observar claramente que para la producción del aislado proteico se requerirá de 4 tanques con agitación constante, 3 centrifugas y un liofilizador que terminara el proceso de extracción. Además de estos equipos se requerirá de una selladora y una empaquetadora las cuales no son incluidas en el proceso productivo.

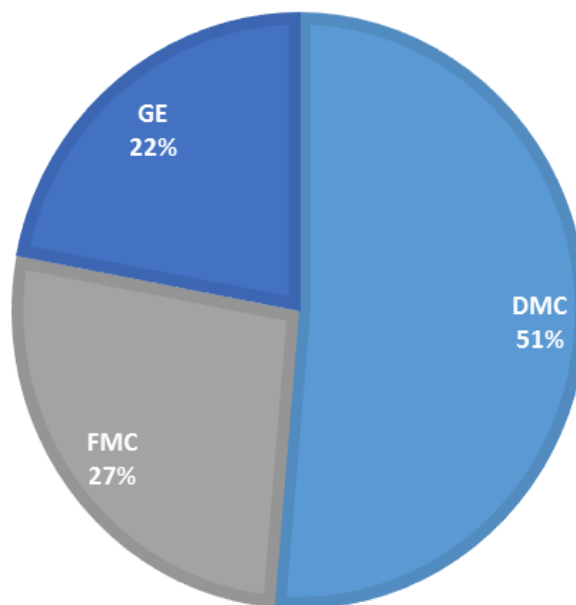


**Figura 20: Proceso de producción del aislado proteico del residuo agroindustrial de Sacha Inchi**

Con todos los datos obtenidos se realizó el costo de producción del aislado proteico de Sacha Inchi el cual como se puede observar en la Tabla 16 y Figura 21, donde se presenta un costo de 5.6 \$/kg de Aislado siendo el costo más elevado el DMC (Costo Total de Manufactura) el cual representa el 51% del total de costo de producción. Esto se debe a que el rendimiento de la producción del aislado proteico de Sacha Inchi es de solo en 10%.

**Tabla 16: Costo de producción del aislado proteico de Sacha Inchi**

| <b>Tipos de costos</b>                         | <b>Costo (\$/año)</b> | <b>Costo (\$/kg)</b> |
|--|-----------------------|----------------------|
| <b>Costo total de la manufactura (DMC)</b>     | 103877.3              | 2.9                  |
| <b>Costo fijo total de manufactura (FMC)</b>   | 53827.1               | 1.5                  |
| <b>Costo general total de manufactura (GE)</b> | 44550.2               | 1.2                  |
| <b>Costo total</b>                             | 202254.7              | 5.6                  |



**Figura 21: Distribución de los costos de producción del aislado proteico del residuo agroindustrial de Sacha Inchi**

En la Tabla 17 se realizó la comparación del costo de producción del aislado proteico de Sacha Inchi con respecto al costo producción del aislado proteico de Tarwi y de soya por Salas (48) en donde se puede observar claramente que el coste de

producción de aislado proteico de Sacha Inchi es mucho más barato que el del Tarwi (97 \$/Kg) pero más caro que el costo de producción de aislado proteico de Soya (3 \$/Kg).

**AISLADO PROTEICO COSTO DE PRODUCCIÓN (\$/KG)**

| AISLADO PROTEICO   | COSTO DE PRODUCCIÓN (\$/KG) |
|--------------------|-----------------------------|
| <b>SACHA INCHI</b> | 5.6                         |
| <b>SOYA*</b>       | 3                           |
| <b>TARWI*</b>      | 97                          |

\*Salas (47)

*Tabla 17: Costo de producción de diferentes aislados proteicos*



## Capítulo VI

### Conclusiones

1. Los parámetros adecuados de extracción alcalina de las proteínas de Sacha Inchi fueron: pH 10,0; relación materia prima / solvente: 1:20; temperatura 50°C y tiempo: 90 min. La recuperación de proteínas del extracto proteico se realizó a pH 5,8 (punto isoeléctrico aparente).
2. Se obtuvo aislados proteicos de Sacha Inchi con un porcentaje de 94.24% de pureza.
3. Se determinó que el aislado proteico obtenido contiene 3.3% de humedad y 6.4% de grasa; siendo exento de fibras, cenizas y carbohidratos.
4. En el aislado proteico de Sacha Inchi las fracciones proteicas principales son aquellas solubles en NaOH y ClNa, siendo las primeras las más abundantes. Las proteínas solubles en agua se encontraron en bajos contenidos y las proteínas solubles en etanol se encontraron en cantidades inferiores al 8%.
5. El aislado proteico de Sacha Inchi mostró buenas propiedades físicas equiparables a las de la soya (*Glycine max*) y a las de otros alimentos.
6. El perfil electroforético de las albúminas, globulinas y glutelinas de la semilla de Sacha Inchi muestra que estas se componen de proteínas con pesos moleculares diferentes que van desde 23- 70kDa. Las prolaminas en cambio presentan pesos moleculares menores a 15kDa.
7. Se determinó que la digestibilidad relativa del aislado proteico fue de 65.355%, este valor fue muy bajo en comparación con otros estudios.

## Recomendaciones

- En razón de que el cocimiento reduce compuestos antinutricionales e incrementa la digestibilidad de las proteínas, se sugiere investigar si el tratamiento térmico puede mejorar la calidad de la proteína del aislado de Sacha Inchi.
- El lavado previo de la muestra de la torta de Sacha Inchi se debería realizar con a un pH ácido a fin de que se reduzca la pérdida de proteínas durante este procedimiento.
- Se recomienda hacer un estudio HPLC para evaluar los aminoácidos presentes en las proteínas de los aislados proteicos obtenidos.
- Se debe realizar un estudio de la presencia de fitoestrógenos en el Sacha Inchi debido a que esta es una de las principales desventajas de utilizar proteínas vegetales, y a su vez determinar los compuestos anti nutricionales presentes en el aislado proteico obtenido.
- Se sugiere emplear un proceso de separación por membranas en la recuperación de proteínas del sobrenadante generado durante la precipitación isoeléctrica de estas macromoléculas, con fines de optimizar su proceso de extracción.
- Debido a la cantidad de proteínas solubles en NaOH y ClNa, además del contenido de grasa presente en este aislado proteico se debería verificar la cantidad presente de gluten en el aislado.

## Bibliografía

1. Alonso Lago O, González Hernández D, Abreu Suárez G. Malnutrición proteico-energética en niños menores de 5 años. Rev Cubana Pediatr. 2007.
2. Porras Saavedra J. Caracterización del proceso de obtención de aislados de proteína de *lupinus* silvestre del estado de Hidalgo. Hidalgo, Mexico; 2010.
3. Vioque J, Sánchez-Vioque R, Pedroche J, Yust MdM. Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. Grasas y Aceites. 2001;: p. 127-131.
4. ProFound AiD. Sacha inchi investigación de mercado Lima, Perú: Perúbiodiverso; 2008.
5. Mejía Lovatón MR. Extracción y Refinación de Aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*). Lima, Perú; 2002.
6. Pastor S, Fuentealba B, Ruiz M. Cultivos subutilizados en el Perú Italia: The Global Facilitation Unit for Underutilised Species (GFU); 2006.
7. De conceptos. De Conceptos. [Online].; 2013 [cited 2013 Diciembre 18. Available from:  
<http://deconceptos.com/ciencias-naturales/oleaginosa#ixzz2nqBMAHDg> .
8. Comité Nacional Sistema Productos. Oleaginosas. [Online].; 2012 [cited 2013 Diciembre 18. Available from: [http://www.oleaginosas.org/cat\\_57.shtml](http://www.oleaginosas.org/cat_57.shtml) .
9. Dirección Regional Peninsular. Boletín acerca Regional Peninsular "Oleaginosas" Distrito Federal: Gobierno Federal de México; 2012.
10. Arévalo G. El cultivo de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la Amazonía.

- INIA, Pronargeb. 2000.
11. Leon B, Riina R, Berry P. *Euphorbiaceae* endémicas del Perú. Rev. peru. biol. 2006;; p. 295-301.
  12. Chirinos O, Adachi L, Calderón F, Díaz R, Larrea L, Mucha G, et al. Exportación de aceite de Sacha Inchi al mercado de Estados Unidos. Lima: ESAN; 2009.
  13. Valles CR. Sacha Inchi, importante oleaginosa selvática. Revista Pura Selva. 1992;; p. 40-41.
  14. Hamaker BR. Perfiles de aminoácidos y ácidos grasos del «maní del inca» (*Plukenetia volubilis L.*). Fayetteville;; 1992.
  15. Mostacero L, Mejía C. Taxonomía de fanerógamas peruanas. Trujillo;; 1993.
  16. Ventura JA. Sacha Inchi *Plukenetia volúbilis L.* Lima: Perubiodiverso; 2010.
  17. Ventura JA. Sacha Inchi Lima; 2009.
  18. Pascual G, Mejía M. Extracción y caracterización de aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis L.*). Anales Científicos UNALM. 2000;; p. 146-160.
  19. Olagnero G, Abad A, Bendersky S, Genevois C, Granzella L, Montonati M. Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. DIAETA. 2007.
  20. Torres V. Biquímica de los alimentos. La Paz;; 1987.
  21. Callisaya JC, Alvarado J. Aislados proteínicos de granos altoandinos chenopodiáceas; quinua “*chenopodium quinoa*” – cañahua “*chenopodium pallidicaule*” por precipitación isoelectrica San Andres: Revista Boliviana de Química; 2009.
  22. Silva Manzo JA. Obtencion, caracterizacion y relacion estructura - funcionalidad y relacion estructura - funcionalidad proveniente de la VI region de Chile.

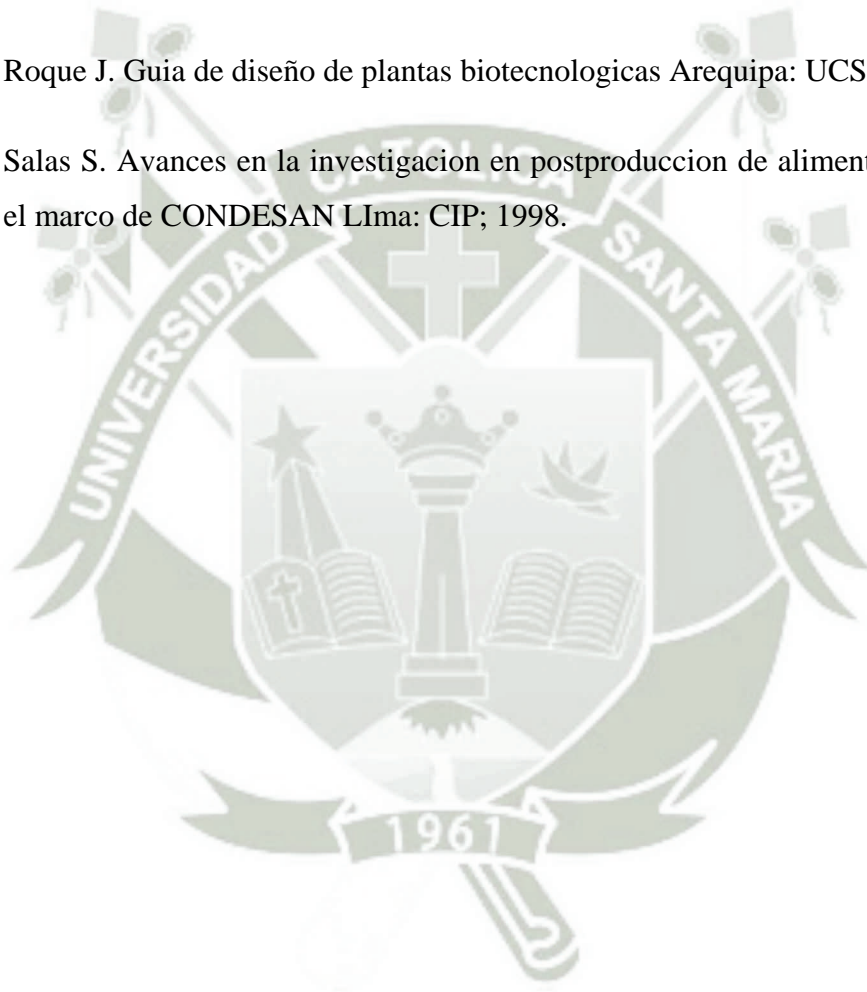
Santiago de Chile: Universidad de Chile; 2006.

23. Ecodigital. [Online]. Available from:  
<http://www.ecodigital.com.ar/Biodiversidad%20folder/BioAgricola.htm>.
24. Gonzalez Quijada MR. Caracterizacion fisicoquimica y valoracion nutricional de un aislado proteico obtenido de la semilla de Ebano Monterrey: Universidad Autonoma de Nuevo Leon; 1999.
25. Ventura Chuquiere M, Elías Peñafiel C, Salvá Ruiz B. Obtención de aislado proteico a partir de nuez de marañón (*Anacardium occidentale L.*). Anales Científicos UNALM. 2011;; p. 181-203.
26. Paz I. Guia de practicas de enzimologia Arequipa: UCSM; 2008.
27. Gonçalvess N, Vioque J, Clemente A, Sánchez-Vioque J, Bautista J, Millán F. Obtención y caracterización de aislados proteicos de colza. Grasas y Aceites. 1997;; p. 282-289.
28. Robles Ramírez MdC, Mora Escobedo R. Influencia del método de obtención en las características fisicoquímicas, y estructurales de aislados de soya. Distrito Federal;; 2007.
29. Madrigal LV, Ortega ME. Obtención de un concentrado proteico de cártamo (*Carthamus tinctorius L.*) para su uso en reemplazantes de leche para becerras. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 2002;; p. 211-216.
30. Martínez JJ, Medina OJ, Zambrano R. Estudio fisicoquímico funcional de los aislados proteicos en semillas de maracuya. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 2011;; p. 70-76.
31. LABCONCO. A guide to freeze drying for the Laboratory Kansas City, Missouri: Labconco Corporation; 2004.
32. Direccion General de Normas. NMX-F-068--1980 Determinacion de proteinas.

- In Direccion General de Normas. Normas Mexicanas. Distrito Federal; 1980.
33. INDECOPI. NTP 209.265.2001 Determinacion de cenizas Metodo Gravimetrico. In INDECOPI. Norma Tecnica Peruana. Lima; 2001.
34. Direccion General de Normas. NMX-F-428-1982 Determinacion de humedad. In Direccion General de Normas. Normas Mexicanas. Distrito Federal; 1982.
35. INDECOPI. NTP 209.263.2001 Determinacion de grasa Metodo Gravimetrico. In INDECOPI. Norma Tecnica Peruana. Lima; 2001.
36. INDECOPI. NTP 205.263.1980 Determinacon de fibra. In INDECOPI. Norma Tecnica Peruana. Lima; 1980.
37. Laemmlli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;; p. 680-685.
38. Miller E, Bimbo A, Walters E, Barlow S, Sheridan B. RING TEST FOR DETERMINATION RING TEST FOR DETERMINATION MEAL. ; 2000.
39. Guerrero D. Obtención de un aislado proteico a partir de germen de quinua (*Chenopodium quinoa willd*) desgrasado. Tesis de Grado. Lima - Perú: UNALM, Ingenieria Alimentaria; 1989.
40. Gorriti A. Actualización de la monografía Sacha Inchi (*Plukenetia volúbilis L.*). ; 2013.
41. Sathe S KHSG. Solubilization, fractionation, and electrophoretic characterization of Inca Peanut (*Plukenetia volubilis L.*) Proteins. Plant Foods Hum Nutr. 2012; 67: p. 247–255.
42. Peralta Flores M. Caracterización bioquímica de las proteínas de la semilla de *Jatropha curcas L.* ; 2006.
43. Castro E, Avila L. Determinacion de la digestibilidad de la proteina por metodo

in vitro. Santiago de Chile.; 2006.

44. de Almeida Costa GE, Queiroz- Monici Kd, Machado Reis SM. Chemical Composition, dietary fibre and resistand starch contenes of Raw cooked pea, common bean, chicpea and lentil legumes. Food Chemistry. 2006;; p. 327-330.
45. Nogueira Santos KFD, Dias Silveira RD, Garcia Martin-Didonet CC, Brondani C. Storage protein profile and amino acid content in wild rice *Oryza glumaepatula*. Pesq. agropec. bras. 2013; 48(1): p. 66-72.
46. Roque J. Guia de diseño de plantas biotecnologicas Arequipa: UCSM; 2010.
47. Salas S. Avances en la investigacion en postproduccion de alimentos andinos en el marco de CONDESAN Lima: CIP; 1998.



## Anexos

### Anexo 1: Método Biuret para determinación de proteínas

#### Reactivos

- Reactivo de Biuret

#### Materiales

- Celdas de Vidrio
- Micropipetas 10 $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000 $\mu$ l
- Tips Amarillos
- Tips Azules
- Tubos de ensayo 20 x 150mm.

#### Equipos

- Espectrofotómetro

#### Metodología

1. En tubos de ensayo apropiados colocar 20 $\mu$ l de solución de proteína
2. Anadir 80  $\mu$ l del reactivo de Biuret.
3. Agitar y dejar 15 min a temperatura de 37°C
4. Dejar reposar por un periodo de 10 min a temperatura ambiente.
5. Leer la absorbancia a 545 nm.
6. Se debe hacer cada vez un blanco.

### Calculo

$$\text{Proteína Totales} = \frac{\text{Abs de muestra}}{\text{Abs del Calibrador}} \times \text{Valor del Calibrador} \quad (2)$$



**Anexo 2: NMX-F-068-S-1980. Alimentos. Determinación de proteínas.  
Foods. Determination of proteins. Normas Mexicanas. Dirección General  
De Normas.**

**Reactivos**

- Ácido bórico al 2%
- Ácido sulfúrico concentrado
- Hidróxido de sodio: Disolver con 500 cm<sup>3</sup> de agua 500 g de hidróxido de sodio.
- Indicador Shiro Tashiro: Disolver 0.2 g de rojo de metilo en 60 cm<sup>3</sup> de alcohol y aforar a 100 cm<sup>3</sup> con agua. Disolver 0.2 g de azul de metileno y aforarlos a 100 cm<sup>3</sup> con agua. Mezclar 2 partes de rojo de metilo y una de azul de metileno.
- Solución de ácido clorhídrico 0.1 N
- Sulfato de cobre pentahidratado
- Sulfato de sodio anhidro
- Zinc granulado

**Materiales**

- Material común de laboratorio
- Matraces de 500 y/o 800 cm<sup>3</sup>

**Equipos**

- Balanza analítica con  $\pm 0.1$  mg de sensibilidad
- Digestor y destilador Kjeldahl

## Metodología

1. Determinar la masa, en la balanza analítica, de aproximadamente un gramo de muestra y pasarla cuantitativamente a un matraz Kjeldahl, añadirle 2 g de sulfato de cobre, 10 g de sulfato de sodio anhidro, 25 cm<sup>3</sup> de ácido sulfúrico y unas perlas de vidrio.
2. Colocar el matraz en el digestor y calentar cuidadosamente a baja temperatura hasta que todo el material esté carbonizado, aumentar gradualmente la temperatura hasta que la disolución esté completamente clara y dejar por 30 min más a esa temperatura.
3. Enfriar y añadir de 400 a 450 cm<sup>3</sup> de agua para disolver completamente la muestra, agregar 3 o 4 gránulos de zinc, un poco de parafina cuando sea necesario y 50 cm<sup>3</sup> de hidróxido de sodio 1:1.
4. Inmediatamente conectar el matraz a un sistema de destilación, el cual previamente se le ha colocado en la salida del refrigerante un matraz Erlenmeyer de 500 cm<sup>3</sup> que contenga 50 cm<sup>3</sup> de ácido bórico y unas gotas del reactivo Shiro Tashiro como indicador.
5. Destilar hasta que haya pasado todo el amoníaco, que unas gotas de destilado no den alcalinidad con el papel tornasol, aproximadamente 300 cm<sup>3</sup>

NOTA: Las primeras gotas de destilado deben hacer virar el color del indicador de violeta a verde.

6. Retirar el matraz receptor y titular el destilado con ácido clorhídrico 0.1 N

## Cálculos

$$\% \text{ de Nitrogeno} = \frac{V \times N \times 0.014 \times 100}{m} \times 6.25 \quad (3)$$

En donde:

V = Volumen de ácido clorhídrico empleado en la titulación, en  $\text{cm}^3$

N = Normalidad del ácido clorhídrico.

m = Masa de la muestra en g.

0.014 = Miliequivalente del nitrógeno.

6.25 = Factor de Conversión



### **Anexo 3 Alimentos Cocidos de Reconstitución Instantánea. Determinación de cenizas. Método gravimétrico NPT 209.265:2001**

#### **Equipos**

- Balanza Analítica: Con Precisión de 0.0001g
- Mufla Eléctrica: Con termostato, que permita mantener durante el ensayo una temperatura de 500°C

#### **Metodología**

1. Se determina exactamente una masa de 2g a 5g de la muestra con aproximación de 0.0001g.
2. Se introduce en la mufla a 500°C por 8 horas
3. Se calcina hasta la formación de Ceniza, se enfría en el desecador y se determina la masa, la cifra obtenida representa la masa de la ceniza obtenida.

#### **Calculo**

$$\%Cenizas = \frac{\text{Peso Cenizas (g)}}{\text{Peso Muestra Inicial (g)}} \times 100 \} (4)$$

**Anexo 4: NMX-F-428-1982. Alimentos. Determinación de Humedad (Método Rápido de la Termobalanza). Foods. Determination of Moisture (Thermobalance Rapid Method). Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.**

**Equipos**

- Amperímetro de 120 V, C.A. o 2000 mA.
- Balanza de determinación de humedad equipada con una lámpara infrarroja de 250W.
- Fuente de potencia tipo 120 V, C.A.
- Platos de aluminio.

**Metodología**

1. Soltar el sujetador del plato para muestra, revisándolo para asegurarse de que el plato corre libremente sobre su soporte finamente punteado, y que esté limpio y seco.
2. Ajustar al 0 y 100%.
3. Determinar 5 g de la muestra pesada en la misma balanza y distribuirla cuidadosamente y uniformemente en el platillo.
4. Con la fuente de potencia debidamente ajustada, bajar la tapa de la balanza. La muestra comenzará a perder humedad y la manecilla se moverá hacia arriba.

Después de pasado un tiempo de 10 a 20 min, deberá tomarse la lectura, y si ésta permanece estable durante 2 min se registrará como porcentaje total de humedad.

**Anexo 5: Alimentos Cocidos de Reconstitución Instantánea. Papilla.  
Enriquecido lácteo. Determinación de grasa. Método gravimétrico  
209.263:2001**

**Reactivos**

- Agua destilada
- Éter de petróleo p.a. intervalo de ebullición de 40°C — 60°C
- Solución de ácido clorhídrico 8 N

**Materiales**

- Dedales para extracción
- Desecador de vidrio con agente desecante
- Embudos de vidrio
- Lunas de reloj
- Papel filtro de porosidad media
- Probeta graduada de 100 mL
- Vasos de precipitación de 300 mL o 500 mL

**Equipos**

- Balanza analítica, con resolución de 0,1 mg
- Equipo de extracción tipo soxhlet con balón de capacidad de 250 mL
- Estufa con regulador de temperatura a 100°C ± 2°C
- Planchas de calentamiento

## Metodología

### 1. Preparación de la muestra

Homogeneizar la muestra en forma manual, en una bolsa de plástico, cuya capacidad sea el doble de la cantidad de muestra a analizar, aproximadamente 1 min.

2. Pesar 4 g - 5 g de muestra en un vaso de precipitación de 300 mL-500 mL.
3. Agregar lentamente mientras se agita, 45 mL de agua hirviendo para lograr una buena homogeneización.
4. Adicionar 55 mL de ácido clorhídrico 8 N y agitar.
5. Cubrir con una luna de reloj y llevar lentamente a ebullición por 15 min.
6. Enjuagar la luna de reloj con agua destilada (aproximadamente 100 mL).
7. Filtrar a través de papel filtro de porosidad inedia, enjuagando el vaso de precipitación tres veces con agua destilada.
8. Continuar lavando el filtro hasta que el agua de lavado no de reacción ácida
9. Transferir el papel húmedo y la muestra a un dedal de extracción y secar en un vaso pequeño a 100°C por un tiempo de 2 horas.
10. Secar el balón de 250 mL por 1 h a 100°C, enfriar en desecador hasta temperatura ambiente y pesar.
11. Colocar el dedal de extracción que contiene la muestra, en el Soxhlet y añadir éter de petróleo (120 mL a 150 mL, según la capacidad del soxhlet).
12. Reflujar la muestra 4h, ajustando el calor de modo que el extractor sifonee más de 30 veces.
13. Secar el balón con la grasa extraída a 100°C hasta peso constante.
14. Enfriar en desecador hasta temperatura ambiente y pesar.

### Calculo

(5)

En Donde:

P2: peso de balón con grasa, g

P1: peso de balón vacío, g

m: peso de muestra, g



## **Anexo 6: Cereales y Menestras. Determinación de Fibra Cruda NPT 209.003.1980**

### **Reactivos**

- Alcohol etílico al 95%.
- Éter etílico o éter de petróleo
- Solución de ácido sulfúrico al 1,25%.
- Solución de hidróxido de sodio al 1.25% libre de carbonatos.

### **Materiales**

- Crisoles o Gooch: Preparados con amianto o de porosidad media.
- Dos vasos de 600 cm<sup>3</sup>.
- Embudo Buchner.
- Papel de filtro Whatman N°1 o equivalente.
- Papel de filtro tarado. Whatman N° 42 o equivalente.

### **Equipos**

- Estufa: Con termostato y aproximación de  $\pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- Mufla eléctrica: Con termostato. que permita mantener durante el ensayo una temperatura de 600°C a 650°C.
- Balanza analítica: Con precisión de 0,0001g.

### **Metodología**

1. Preparación de la muestra: Se muele la muestra de manera que el 99% de las partículas pasen por el tamiz ITINTEC 0.841 mm (N° 20).

2. Se determina exactamente una masa de 2g a 5g de la muestra con aproximación de 0.0001g.
3. Se extrae la grasa de la muestra con éter de petróleo o éter etílico hasta que el solvente quede incoloro.
4. Se seca la muestra hasta evaporar el solvente y se transfiere al vaso de 600cm<sup>3</sup>. Se añade 200 cm<sup>3</sup> de la solución de ácido sulfúrico caliente y se hierve durante 30 min contados desde el momento en que empieza la ebullición manteniéndose el volumen inicial.
5. Se filtra en caliente, utilizando el papel de filtro, y se lava el residuo con agua caliente destilada, hasta neutralidad del líquido del lavado.
6. Se filtra en caliente en el crisol o sobre el papel filtro. Con ayuda de Un chorro fino de agua destilada, se pasa todo el residuo del vaso al filtrado. Se sigue lavando el vaso y el filtro hasta que el líquido cristalino no de reacción alcalina. Luego se lava con por lo menos 2 porciones de 100 cm<sup>3</sup> de alcohol etílico de 95%.
7. Se seca en estufa a 130°C. Se deja enfriar en desecador y se determina la masa. Se repite este proceso hasta obtener masa constante. Descontada la tara, la cifra obtenida representa la masa de la fibra bruta.
8. Se calcina hasta cenizas blancas, se enfría en desecador y se determina la masa. Descontada la tara, la cifra obtenida representa la masa de las cenizas de la fibra.

### Calculo

$$Fc = \frac{Fb - C \times 1000}{M \times (100 - H)} \quad (6)$$

Donde:

Fc: Por Ciento de Fibra Cruda

C: Masa de Cenizas de la Fibra, en gramos

Fb: Masa de Fibra Bruta en Gramos.

M: Masa de la muestra en Gramos

H: Humedad de la Muestra

## **Anexo 7: Método de Laemli para Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS PAGE)**

### **Reactivos**

- 0.5M Tris pH 6.8
- 1.5M Tris pH 8.8
- 10% SDS
- 1X Solución Buffer de Reserva
- 2-Mercaptoetanol.
- 30% Acrilamida
- APS 10%
- Azul de bromofenol.
- Azul de Coomassie.
- dH<sub>2</sub>O
- Glicerol.
- Glicina (forma ácida).
- SDS.
- TEMED

### **Materiales**

- Bandejas de plástico para el teñido de geles.
- Espátulas.

- Frasco lavador con agua destilada.
- Gradillas.
- Imán para agitación magnética.
- Matraz.
- Papel de filtro.
- Pipetas automáticas y puntas (2-50  $\mu$ l, 50-200  $\mu$ l y 200-1000  $\mu$ l).
- Pipetas de cristal de 1, 2, 5 y 10 mL y pipetas Pasteur.
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL.
- Vasos de precipitado y probetas (25, 50 y 100 mL).

### Equipos

- Agitador magnético.
- Balanzas de precisión.
- Centrífuga de mesa.
- Equipo de electroforesis para mini-geles con accesorios (sistema de montaje y preparación de geles, espaciadores para geles de 0,75 mm de espesor, peines para formar 10 pocillos, placas de cristal).
- Fuente de electroforesis.
- pH-metro.

### Metodología

#### 1. Preparación de la muestra:

La muestra a analizar se mezcló con SDS, detergente aniónico que desnaturaliza las estructuras terciarias y secundarias no unidas a disulfuro, y posteriormente se aplica una carga negativa para cada proteína en proporción a su masa. El

calentamiento de las muestras al menos a 65°C facilita aún más la desnaturalización de las proteínas, ayudando a la unión del SDS.

- a. Mezclar las proteínas en relación 4:1 con el tampón de muestra.  
Calentar la muestra
- b. Al Punto de ebullición durante 5-10 min (Funciona para la mayoría de las proteínas)

## 2. Verter el gel de resolución

- a. Limpiar las placas de vidrio con agua y jabón, y luego con etanol.  
Montar las placas de vidrio y los espaciadores.
- b. Para geles grandes, sellar con 1 mL de gel de resolución. Eliminar 2 mL y cuando el sellador se polimeriza, el resto de 1 mL de gel se polimeriza. Añadir a 2 mL de solución de gel, 4 mL de TEMED y 60 mL de APS 10%. Sellar las placas grandes de gel mediante el vertido de 1 mL de gel de resolución (después de añadir el APS / TEMED) a las placas e inclínelas para difundir el sellante. Permita que el exceso de sellador se elimine. Mientras esto sucede, elimine el gas (10 min), de la cantidad restante de gel de resolución sin polimerizar. Para el minigel, conecte el conjunto de la placa de vidrio al aparato y el coloque todo el conjunto en un recipiente pequeño y plano tipo tupperware.
- c. Con una pipeta Pasteur, selle la parte inferior de las placas mediante la difusión de agarosa al 1% en la solución tampón de electroforesis SDS PAGE en la parte inferior de las placas de vidrio para que ascienda por las grietas gracias a la acción capilar.
- d. Transferir el gel de resolución desgasificado a un vaso y añadir EPA / TEMED. Añadir rápidamente la solución de gel de resolución al centro de las placas a una altura de aproximadamente 4 cm desde la parte superior de las placas grandes. Para el minigel, añadir el gel de resolución con una pipeta.

- e. Rápidamente añadir isobutanol en la parte superior hasta que el nivel llegue a la parte superior de las placas.

El Isobutanol impedirá que el oxígeno entre en el gel lo que podría oxidar e inhibir la polimerización.

- f. El gel de resolución se debe polimerizar en 30 min.
- g. Añadir los reactivos gel de apilamiento a un matraz y se desgasifica durante diez min.

### 3. Verter el gel de apilamiento

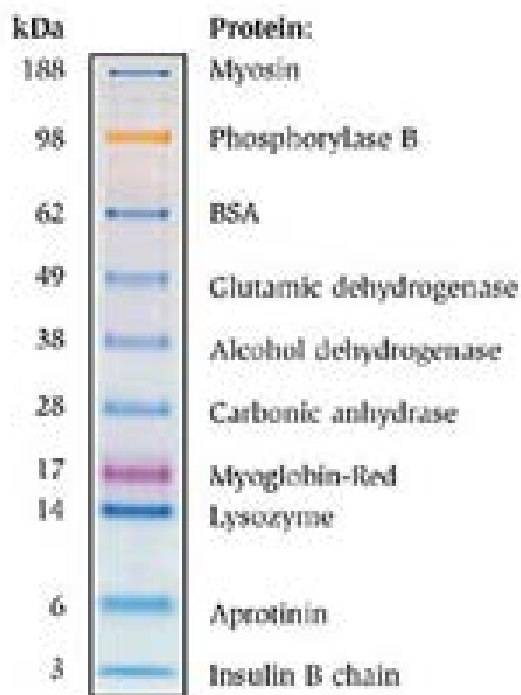
- a. Retirar el isobutanol. Vierta el agua varias veces en el espacio de la placa de gel para enjuagar todo el isobutanol.
- b. para polimerizar el gel de apilamiento, añadir mezcla APS / TEMED, luego se vierte en la parte superior del gel polimerizado de resolución.
- c. A continuación, inserte el peine recto hacia abajo, vierta un poco más de gel de apilamiento en los lados del peine para sellarlo en su totalidad.
- d. Eliminar las burbujas de debajo del peine, si es posible, moviendo el peine suavemente de lado a lado de modo que las burbujas entren en el espacio intermedio y floten hacia arriba.
- e. El gel de apilamiento debe polimerizar en 20 a 30 min.

### 4. Cargue el gel

- a. Fije las placas de gel de gran tamaño que contienen el gel polimerizado al aparato a través de los clips proporcionados.
- b. Verter el tampón de electroforesis Tris-glicina en las cámaras superior e inferior. En el gel grande, alrededor de 1 litro, en el minigel alrededor de 200 mL.

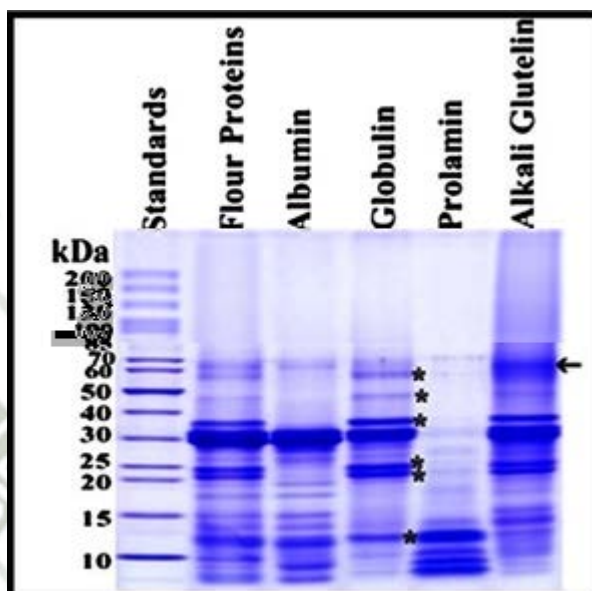
- c. Eliminar las burbujas atrapadas en la parte inferior de las placas de vidrio en el gel grande con una jeringa.
  - d. Lavar los pocillos con una jeringa justo antes de la carga para deshacerse de cualquier poliacrilamida no polimerizada que pueda haberse filtrado.
  - e. Al cargar el gel, colocar algo de carga (1X tampón de carga en los carriles en blanco) en cada carril y el frente de colorante migrará de forma más uniforme.
  - f. Ejecutar una corriente constante de 20 mA en los grandes geles finos. Después de que el frente del colorante penetre en el gel de resolución, puede aumentarse la corriente hasta 30 mA. La parada del gel dependerá de cuán grande es la proteína más pequeña que se quiere visualizar. Si espera hasta que el frente de tinte llegue al final del gel, son necesarias alrededor de 2 1/2 - 3 horas para que corra completamente en el caso de un gel grande y delgado. Un gel espeso podría necesitar 6 - 7 horas. Ejecutar minigeles a 15 mA. necesitaran una hora para acabar de correr.
5. Teñir y desteñir el gel.
- a. Tiña el gel con 10 volúmenes de tinte azul de Coomassie durante 1 hora a temperatura ambiente. Guarda solución de tinción. La solución se puede reutilizar durante 1 mes a 1 año. Este paso se puede realizar durante la noche.
  - b. Destiñe el gel en 10 volúmenes de solución de destiñe 1X durante 30 min a temperatura ambiente.
  - c. Después del desteñido, el gel está listo para visualizar o secar.

**Anexo 8: Marcador de Peso molecular: SeeBlue® Plus2**



*Figura 22: Peso molecular aparente del standard pre-teñido SeeBlue® Plus2 en un gel Bis-Tris NuPAGE Novex 4-12%*

**Anexo 9: Electroforesis SDS PAGE del fraccionamiento de las proteínas de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.).**



*Figura 23: SDS-PAGE (gradiente de monómero lineal de acrilamida al 8-25%) en presencia de un agente reductor (2% (v/v)  $\beta$ -ME) para las fracciones proteicas de Osborne. Se cargó 75  $\mu$ g de proteína en cada carril, excepto en el standard. Nótese la diferencia de los polipéptidos de las globulinas (\*) comparados con el perfil del polipéptido de la fracción de albumina. El polipéptido marcado (←) en el perfil de la fracción alcalina de glutelina fue distintamente diferente cuando lo comparan con el perfil polipeptídico de la fracción de globulina.*