

# Obtención de hidrolizado enzimático de proteína de chocho (*lupinus mutabilis*) a partir de harina integral

Oswaldo Acuña y Jimena Caiza

*Departamento de Ciencias de los Alimentos y Biotecnología (DECAB)*

oswaldo.acuna@epn.edu.ec

## Resumen

La semilla cruda de *lupinus mutabilis* considerada como fuente proteica debido al contenido de proteína presente, fue sometida a una limpieza, selección y molienda, obteniéndose una harina integral con grasa y alcaloide. Se determinó las condiciones más adecuadas a nivel de laboratorio para obtener el mayor porcentaje de extracción de aislados e hidrolizados enzimáticos de proteína a partir de harina integral de chocho (*Lupinus Mutabilis*). Las variables de extracción de aislados fueron: pH (8.5, 9.5, 10.5); relación sólido: líquido agua destilada (1/7, 1/9, 1/11); temperatura (20°C). Se encontró que la proteína del chocho precipita en el punto isoeléctrico pH 4.5. La proteína se obtuvo por extracción básica pH 10.5 en dos etapas, la primera con relación sólido: líquido 1/11 y la segunda 1/5. El aislado proteico obtenido por acidificación de los dos filtrados a pH 4.5, dio un contenido de proteína del 78.96 % (base seca) con humedad del 4 %. El rendimiento del proceso fue del 42.6 % con una recuperación de proteína del 72.22 %. Para hidrolizar el aislado, se evaluaron los métodos, hidrólisis ácida y enzimática. La hidrólisis ácida se realizó con HCl 6N, a 110°C por 48 horas, para el caso de enzimática se evaluaron las enzimas, Flavourzyme y Papaína debido a que estas enzimas han presentado especificidad con la harina de chocho. De acuerdo a la concentración óptima de sustrato (9 %), se solubilizó en buffer fosfato a pH 7, se llevó a cabo la hidrólisis de cada enzima y secuencial para Papaína y Flavourzyme, a una temperatura óptima de reacción de 50°C para las dos enzimas, por diferentes períodos de tiempo. Las alícuotas obtenidas en las respectivas hidrólisis se visualizaron a través de proteína soluble en TCA al 10 % medida en un espectrofotómetro monitor UV a 280nm. Se obtuvo el hidrolizado mediante la acción secuencial de ambas enzimas con un tiempo de reacción de 40min y un grado de hidrólisis del 51,13 %.

**Palabras claves:** Enzimas; hidrólisis; *lupinus mutabilis*.

## Abstract

The raw seeds of *Lupinus mutabilis* considered as a protein source because of the content of protein was subjected to cleaning, sorting and grinding, resulting in a meal with fat and alkaloid. We determined the most suitable conditions in the laboratory to get the highest percentage of extraction of isolated and enzymatic hydrolysates of protein from whole wheat chocho (*Lupinus mutabilis*). The extraction of isolated variables were: pH (8.5, 9.5, 10.5); ratio solid: liquid distilled water (1/7, 1/9, 1/11), temperature (20°C). We found that the protein precipitated pussy at the isoelectric point pH4.5. The protein was obtained by basic extraction pH 10.5 in two stages, first with regard solid: liquid 1/11 and the second 1/5. The isolated protein obtained by acidification of the filtrates at pH 4.5, gave a protein content of 78.96 % (dry basis) with 4 % humidity. The process yield was 42.6 % with a protein recovery of 72.22 %. To hydrolyze the isolated, evaluated methods, acid and enzymatic hydrolysis. Acid hydrolysis was carried out with 6N HCl at 110°C for 48 hours, in the case of enzyme were tested enzymes, papain Flavourzyme and because these enzymes have submitted specificity with lupine flour. According to the optimal concentration of substrate (9 %), was solubilized in phosphate buffer pH 7, was carried out for each enzyme hydrolysis, sequential and Flavourzyme Papain, an optimum reaction temperature of 50°C for two enzymes, for varying periods of time. The rates obtained in the respective hydrolysis were visualized by TCA soluble protein to 10 % measured in a spectrophotometer at 280nm UV monitor. Hydrolyzate was obtained by the sequential action of two enzymes with a reaction time of 40min and a degree of hydrolysis of 51.13 %.

**Keywords:** Enzymes, hydrolysis, *Lupinus mutabilis*.

## 1 Introducción

El aprovechamiento de materiales ricos en proteína están siendo utilizados en la elaboración de concentrados, aislados e hidrolizados cuyas aplicaciones principales son en la alimentación humana y en la elaboración de fertilizantes vegetales radicular y foliar.

El uso de aminoácidos y péptidos en agricultura presenta múltiples posibilidades de aplicación e importantes resultados: aumentos de producción y mejora de calidad; corrección y prevención de deficiencias de macro y micronutrientes, acción anti estrés, bioestimulante de los sistemas hormonales y enzimáticos [2]. La aplicación de aminoácidos permiten la recuperación de las plantas por el suministro de nutrientes fáciles de metabolizar [3].

El chocho, *Lupinus mutabilis* Sweet, es una leguminosa andina, cuyas raíces tienen la capacidad de fijar nitrógeno en el suelo. Su elevado contenido de proteína (44,3 %) y grasa (16,5 %) en la semilla, es útil para mejorar la nutrición de la población; sin embargo, el grano contiene algunas sustancias que limitan su uso directo en la alimentación humana y animal. Estas sustancias son los alcaloides, que confieren al chocho un sabor amargo y carácter tóxico.

La identificación y cuantificación de los alcaloides es importante en el área farmacéutica, industrial y agrícola como agentes fungicidas, insecticidas o nematocidas [7].

El lupino tiene buenos rendimientos agrícolas haciéndolo un cultivo rentable, siendo necesario buscar nuevas alternativas de uso en nutrición vegetal [1].

En la elaboración de aislados e hidrolizados se emplean materias primas con bajo nivel de grasa para evitar interferencias que disminuyan el grado de extracción. En el presente trabajo se determinarán las condiciones de operación y control en la obtención de aislado e hidrolizado a partir de la harina integral de *Lupinus mutabilis* (44,3 % proteína, 16,5 % grasa y 3 % alcaloide) para obtener un hidrolizado con funcionalidad en nutrición vegetal (Vioque, 2000).

## 2 Materiales

Semilla de chocho (*Lupinus Mutabilis*) adquirida en el mercado mayorista de la ciudad de Quito.

Enzimas comerciales: exopeptidasa flavourzyme de la casa Novo Industrias y endopeptidasa papaína suministrada por la ingeniera Villacrés INIAP.

## 3 Métodos

### 3.1 Caracterización física - química de la semilla y harina integral de chocho

**Caracterización física de la semilla.** Se determinó el peso y volumen de 100 granos, densidad, color, porcentaje de granos bicoloreados, chupados y dimensiones de las semillas, longitud, diámetro y espesor, así como la

valoración de los partes constitutivas, cáscara, cotiledón y germen.

**Obtención de la harina integral a partir de la semilla de chocho.** Las semillas de chocho fueron sometidas a limpieza utilizando corriente de aire, clasificación y selección, separando todo material extraño, granos bicoloreados y chupados. La molienda se realizó en un molino de alta revolución Alpine, instalada con elementos de molienda el sistema de clavos.

**Caracterización física de la harina.** Se determinó el tamaño de partícula utilizando una serie de tamices U.S.A Standard Testing Sieve (N°10, 20, 40, 50, 80) que fueron instalados en un agitador mecánico Portable Sieve Shaker Model RX - 24, el tiempo de agitación fue de 20 minutos.

**Caracterización química de la harina.** El análisis químico nutricional se realizó aplicando los métodos oficiales A.O.A.C., 2005.

### 3.2 Obtención de aislado proteico a partir de harina integral de chocho

**Extracción básica.** La extracción de la proteína de chocho se efectuó en 2 etapas: en la 1era se prepararon suspensiones en una relación harina-agua destilada (1:7, 1:9, 1:11), se ajustó el pH (8.5, 9.5, 10.5) con NaOH 1N, se agitó durante 30min, utilizando un agitador mecánico Eberbach Corporation. La suspensión fue centrifugada a 8000rpm en la centrifuga Damon/Iec Division Modelo HIT-SK, y se recuperaron los sobrenadantes. En la 2da etapa los residuos insolubles se re-suspendieron con agua destilada a una relación 1:5(p/v), se ajustó el pH a 10,5 con NaOH 1N, se agitó durante 10min, se centrifugó a 8000rpm y se recuperó el sobrenadante, desechando el material insoluble.

**Precipitación ácida.** La precipitación de la proteína se realizó en los sobrenadantes obtenidos en la extracción básica, se reguló el pH a 4.5 con HCl 2N, se agitó durante 15min, se centrifugó a 12000rpm y se obtuvo una pasta proteica, que fue sometida a deshidratación por liofilización, en donde se determinó la proteína total e índice de proteína dispersible (PDI), seleccionando el material de mayor contenido.

La variable de control en el proceso de obtención del aislado fueron los porcentajes de recuperación y cantidad de proteína.

### 3.3 Caracterización química del aislado proteico

**Análisis proximal.** Se realizó en el material seleccionado con mayor índice de proteína dispersible, aplicando los métodos de análisis A.O.A.C, 2005.

**Solubilidad del aislado.** Se siguió el método descrito por Cheftel et al., (1989). El aislado de proteína se solubilizó a diferentes concentraciones (20, 40, 60, 90, 120mg/mL) en una solución buffer fosfato 0.2 M pH 7, se agitó para su homogenización y se centrifugó a 9000rpm por 10min, en una centrifuga Eppendorf. Se tomaron del sobrenadante, alícuotas de 600µL, que se mezclaron con 2400µL de buffer en una celda de cuarzo, y se cuantificó la cantidad de proteína soluble midiendo la densidad óptica de luz ultravioleta ( $\lambda = 280\text{nm}$ ), valores que fueron interpolados con una curva de calibración de albúmina de suero bovino (BSA) de la concentración versus absorbancia, el blanco utilizado fue solución buffer pH 7, método descrito por Chang (1998).

**Determinación de pesos moleculares.** Se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. SDS-PAGE (10-12.5 %), método descrito por Weber y Osborn (1969), en el se utilizará un kit de marcadores de pesos moleculares de marca Benchmark, mezcla de 10 proteínas altamente puras y caracterizadas sus pesos moleculares entre 6 y 180kDa. La separación se realizará con buffer de solución 3,0M Tris-HCl (pH 8,8). Cada muestra se preparó a una concentración de proteína de 3mg/mL. Los pesos moleculares de las muestras se calcularán mediante comparación de su movilidad electroforética referido a la de los marcadores.

**Determinación de alcaloides.** Según el método cualitativo del test de Dragendorff, que consiste en la identificación subjetiva de la intensidad de coloración naranja: presencia (+), leve, (++) moderada, (+++) intensa, del reactivo al reaccionar con alcaloides quinolizidínicos (alto contenido de esparteína, lupinina y otros). Las tiras de papel filtro se humedecieron con el reactivo, y se aplicó agua con posible alcaloide.

### 3.4 Obtención del hidrolizado proteico de *Lupinus mutabilis*

**Determinación de la actividad enzimática.** La actividad enzimática de las enzimas fue medida como actividad caseinolítica, aplicando el método de Anson modificado (Félix, 2008). La caseína fue disuelta en buffer fosfato 0,05M pH 7,0 a una concentración de 10mg/mL. Con la papaína, se preparó una solución de 5mg/mL de buffer y para la flavourzima se diluyó 1:1000 con el mismo buffer.

Se mezcló 100mL de solución enzimática con 1100mL de caseína, que se incubó en un baño termostático a 37°C por 20min, se adicionó 1800mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5% para detener la reacción, se centrifugó por 10min a 10000rpm y se desechó el precipitado; del sobrenadante se realizó la lectura a 280nm. La unidad de actividad caseinolítica se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1µmol de caseína por minuto a las condiciones de reacción establecidas.

La actividad enzimática se calculó aplicando la relación:

$$AE = \frac{h}{(0,1)^2}$$

donde:

AE= actividad enzimática (U/ml) h= promedio de las lecturas de densidad óptica a 280 nm obtenidas para cada ensayo realizado en paralelo.

**Determinación del tiempo de reacción.** Se preparó suspensiones de aislado al 5% para cada enzima, en buffer fosfato 0,1M, pH 7,0 y un baño termostático a 50°C con agitación. Se utilizó una concentración de enzima de 0,4UA/g sustrato y 50LAPU/g sustrato para la papaína y flavourzima, respectivamente.

Se tomaron alícuotas a diferentes intervalos de tiempos de reacción 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 60min para la papaína y 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300min para la flavourzima, y se determinó el contenido de proteína soluble en TCA espectrofotométricamente a 280nm y se utilizó la curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA), en función de su concentración y los valores de absorbancia.

El tiempo óptimo de reacción en la determinación de la velocidad inicial, se obtuvo a partir de la curva concentración de producto (proteína soluble) vs tiempo, de acuerdo a la metodología utilizada por Villacrés (2001).

**Determinación de la concentración óptima de sustrato y enzima.** Sustrato: se mantuvo constante la concentración de enzima, 0,04UA/mL para la papaína y 5LAPU/mL para la flavourzima (Villacrés 2001). Se preparó suspensiones de aislado proteico a diferentes concentraciones: 1, 2.5, 4, 6, 9, 12 y 16% para la papaína y flavourzima. En cada concentración, se determinó la pendiente que constituyó la velocidad inicial a los 30min de reacción.

Enzima: se mantuvo constante la concentración de sustrato a 9% (90mg/mL) para la papaína y 6% (60mg/mL) para la flavourzima. Las concentraciones de papaína fueron de 0.01, 0.04, 0.06, 0.09 UA/mL y flavourzima 4, 10, 30, 50 LAPU/mL. En cada concentración de enzima, se calculó y graficó la velocidad de formación de producto (proteína soluble) en función del tiempo. La concentración óptima de enzima fue la que permitió obtener un comportamiento lineal de la velocidad.

Durante el transcurso de la hidrólisis se tomaron alícuotas a los tiempos de reacción de 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30 y 60 min para la papaína y 0, 10, 15, 20, 30, 60 y 120min para la flavourzima, se determinó el contenido de proteína soluble en TCA. El pH al que se trabajó fue de 7,0 para las dos enzimas y la temperatura a 50°C.

**Hidrólisis enzimática.** Se llevó a cabo en un reactor de 1L, utilizando un baño termostático a 50°C con agitación marca Precision Scientific. El paso inicial, previo a la

adición de las enzimas hidrolíticas, consistió en la solubilización máxima del aislado proteico a una concentración del 9% en buffer fosfato 0,1M pH 7,0. La reacción enzimática inició tras la adición de las enzimas, a una concentración de 0,06 UA/mL de solución para la papaína y de 50 LAPU/mL de solución para la Flavourzyme.

En el proceso hidrolítico secuencial, se añadió primero papaína que hidrolizó a la proteína del aislado por 10min, luego se añadió flavourzyme y actuó por 30min. Se recogieron muestras a diferentes tiempos de reacción (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40min) durante el avance de la hidrólisis y se cuantificó el contenido de proteína soluble en TCA al 10%. La hidrólisis termina con la inactivación térmica a 90°C. Posteriormente se liofilizó el hidrolizado obtenido.

### 3.5 Caracterización química del hidrolizado proteico de chocho

**Grado de hidrólisis.** El grado de hidrólisis es el porcentaje de enlaces peptídicos rotos respecto al total y se determinó mediante el método descrito por Kim et al., (1990), midiendo la proteína soluble de las muestras hidrolizadas y tratadas con ácido tricloroacético al 10%. Se tomó alícuotas de 0.5 mL de proteína hidrolizada y se añadió 0.5 mL de TCA, la mezcla se agitó durante 10min y se centrifugó a 13000 rpm por 15min. La proteína soluble en el sobrenadante se determinó espectrofotométricamente a 280 nm.

**Composición aminoacídica.** Se determinó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), siguiendo el procedimiento de Alaiz (1992).

Los pesos moleculares del hidrolizado y la determinación de alcaloides se realizaron de acuerdo a la metodología mostrada en caracterización del aislado de chocho.

**Tabla 1.** Caracterización física de las semillas de chocho (*Lupinus Mutabilis*)

Parámetros	Promedios
Peso de 100 granos (g)	25,51
Volumen de 100 granos (mL)	22,2
Densidad (g/mL)	1,15
Color	crema
Granos bicolorados (%)	2,8
Granos chupados (%)	1,4
<b>Dimensiones (mm)</b>	
Longitud	9,69
Diámetro	7,83
Espesor	5,4
<b>Partes constituyentes de la semilla (g/100mg)</b>	
Cáscara	10,8
Germen	4,67
Cotiledón	84,53

## 4 Resultados y discusión

### 4.1 Caracterización física - química de la semilla y harina integral de chocho

**Caracterización física de la semilla de chocho.** Los valores de la tabla 1, son los esperados para este tipo de leguminosa, que coinciden con los reportes bibliográficos.

Los porcentajes de granos bicolorados y chupados son indicadores de uso de semilla no clasificada o certificada.

**Obtención de la harina integral.** El material extraño piedrecillas y tierra retirado representó el 0.5% y granos bicolorados y chupados fue del orden del 4,2%. El rendimiento harinero fue del 99%, conversión a harina integral que se debe a la humedad que presentaron los granos 8,24%.

**Caracterización física.** El perfil granulométrico de la harina integral se presenta en la tabla 2.

**Tabla 2.** Perfil granulométrico de la harina integral de chocho

No. Tamiz	Abertura Tamiz ( $\mu\text{m}$ )	% Retenido Acumulado	% Pasante Acumulado
Tapa		0.11	
20	850	9.57	90.43
40	425	89.83	90.43
50	300	95.06	4.94
70	212	95.97	4.03
80	180	96.78	3.22
100	150	98.01	1.99
Fondo		100.00	

Se puede observar que el 90.43% corresponde a un tamaño de partícula menor a 850 $\mu\text{m}$  y el 9.57% a 850 $\mu\text{m}$ . El tamaño de partícula alcanzado se debe a que el material contiene el 16.56% de grasa y el 9.5% de fibra, factores que inciden en la eficiencia de molienda.

**Caracterización química.** La tabla 3 presenta los resultados de la composición proximal de la harina integral.

### 4.2 Obtención de aislado proteico a partir de harina integral de chocho

**Tabla 3.** Composición química proximal de la harina integral (g/100g)

Determinación	Harina de Chocho
Humedad	8,24
Extracto etéreo	16,56
Carbohidratos	25,11
Fibra cruda	9,00
Ceniza	3,50
Proteína total	46,59



Se determinó que la muestra de relación harina-agua destilada 1:11 y ajuste a pH 10.5 con NaOH, registró el 72.2% de recuperación en proteína y rendimiento en peso del 42,6%. Estos valores son congruentes al tipo de harina integral, que tienen 16% de grasa, y que por fines de uso del aislado como fertilizante no fue sometido a lavado de carbohidratos.

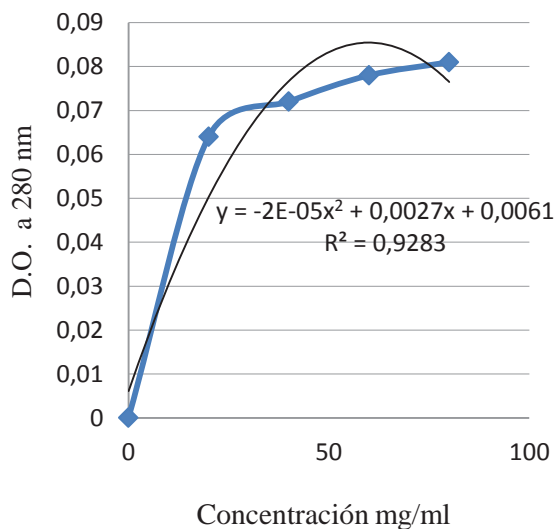
### 4.3 Caracterización química del aislado proteico

**Análisis proximal.** En la tabla 4 se presentan los resultados de composición química proximal, observándose incremento de proteína en el 19.3% con relación al contenido en la harina, una ligera disminución del carbohidratos, en extracto etéreo existe una disminución del (16%).

**Tabla 4.** Análisis proximal del aislado de proteína de chocho (g/100g)

Determinación	Aislado
Humedad	5,54
Proteína (Nx6.25)	55,58
Extracto Etéreo	14,28
Cenizas	4,70
Fibra Cruda	3,89
Carbohidratos	23,12

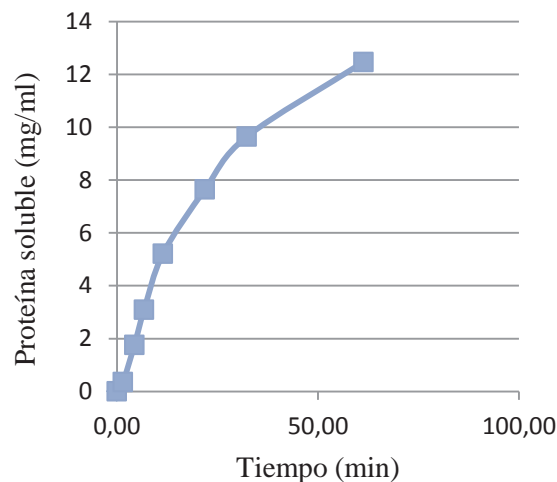
**Solubilidad.** La figura 1 presenta la solubilidad del aislado de proteína medida a 280nm. A una concentración superior a 90mg/mL, la densidad óptica disminuye, este resultado se debe a que la suspensión se satura, razón por la cual se toma la concentración de trabajo fija del 9% como adecuada en las pruebas de hidrólisis.



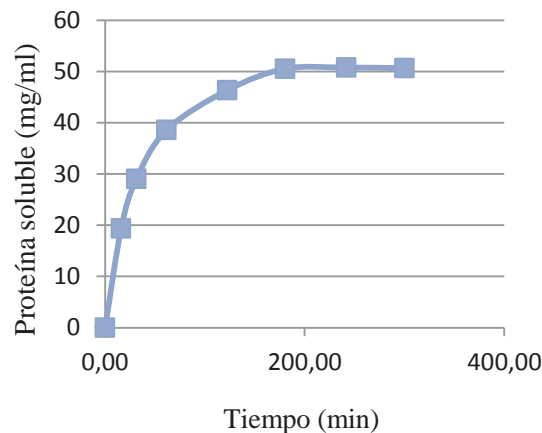
**Figura 1.** Solubilidad del aislado de proteína de chocho

**Pesos moleculares.** El análisis electroforético de las proteínas del aislado de chocho, mostró la presencia de 6 bandas proteicas con pesos moleculares aparentes de 93.30, 77.37, 64.17, 56.64, 49.99 y 41.46kDa. La determinación de los pesos moleculares se visualizan en la figura 9.

**Determinación de alcaloides.** La determinación cualitativa realizada en el aislado fue intensa (+++), debido a que no se realizó, en razón de que se requiere la presencia funcional de los alcaloides en la aplicación como fertilizante.



**Figura 2.** Tiempo de reacción para la papaína



**Figura 3.** Tiempo de reacción para la Flavourzyme

**Concentración óptima del sustrato.** En la cinética de hidrólisis de papaína se determinó el valor de  $K_M$  igual a 0.0624g/mL. De acuerdo a Chávez (1990), se debe trabajar con valores de concentración de sustrato de  $10 K_M$  para garantizar que se esté trabajando con el 90% de la velocidad máxima de reacción, debido a la baja solubilidad del aislado, se trabajó con una concentración de sustrato equivalente a  $1.44 K_M$ , es decir a una concentración de 0.09g/mL.

En la figura 4 se observa el efecto de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato (Michaelis y Menten) catalizada por la papaína y en la figura 5 la regresión de Lineweaver-Burk, método por el cual se determinó el valor de  $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$ .

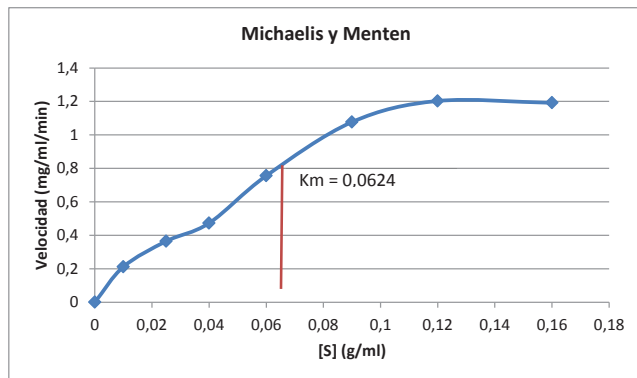


Figura 4. Curva de Michaelis y Menten para la hidrólisis de Papaína

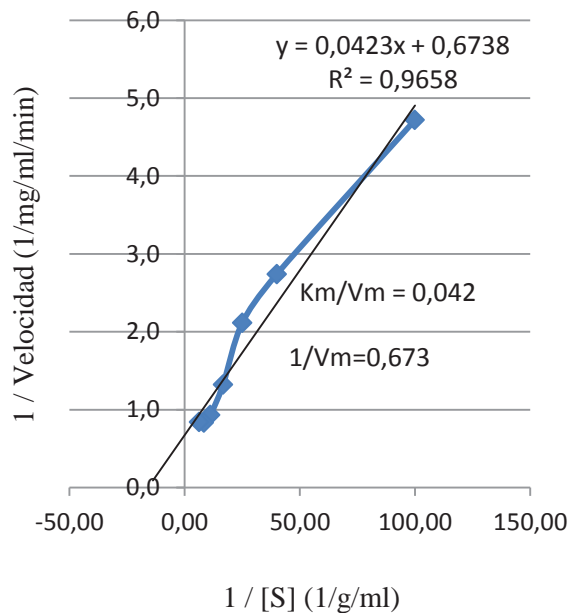


Figura 5. Regresión de Lineweaver - Burk para la hidrólisis de Papaína

En la determinación de la concentración óptima de sustrato con flavourzima el valor de  $K_M$  fue igual a 0.0481g/mL, pero debido a la baja solubilidad de la muestra, la concentración de sustrato fue igual a 0.09g/mL, que equivale a 1.87  $K_M$ . En las figuras 6 y 7 se muestra el gráfico de Michaelis-Menten y el método de Lineweaver - Burk para la determinación de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ .

**Hidrólisis enzimática.** En la figura 8 se presenta la hidrólisis secuencial del aislado proteico de chocho a pH 7,0, 50°C, con una relación enzima/sustrato de 0.67UA/g de sustrato y 555.56 LAPU/g de sustrato para la papaína y flavourzima, respectivamente. Los resultados presentados corresponden al grado de hidrólisis (GH) obtenido por la acción catalítica de las enzimas.

Con la papaína se alcanzó grados de hidrólisis de 1,91; 3,48; 5,08 y 9,12% a los tiempos 1, 3, 5 y 10min de reacción. A partir de este tiempo, se aplicó la Flavourzima, dejándola actuar por 30 minutos y se alcanzaron grados de hidrólisis de 41,37; 47,94; 49,10 y 51,13% a los 15, 20, 30 y 40min de reacción.

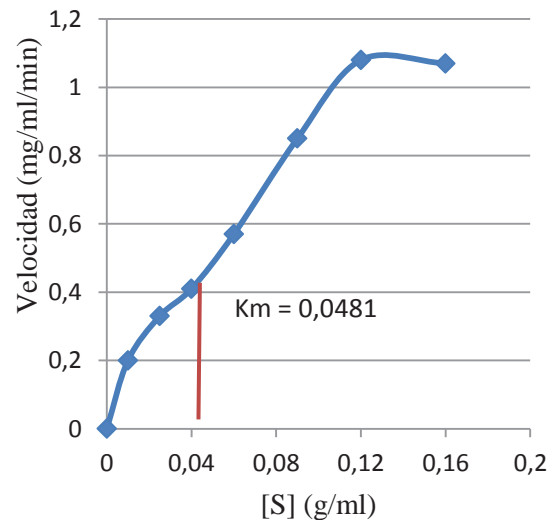


Figura 6. Curva de Michaelis y Menten para la hidrólisis de Flavourzima

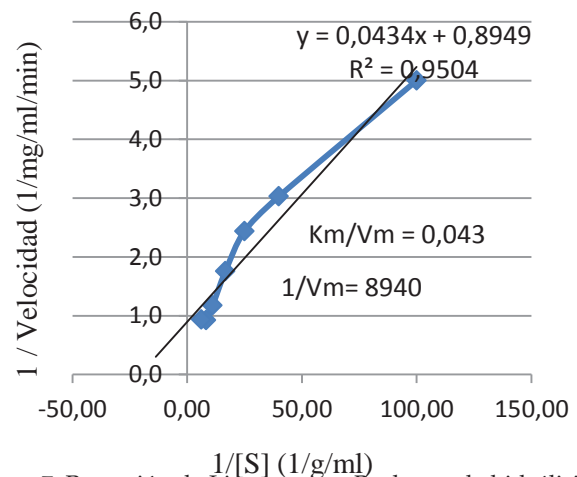
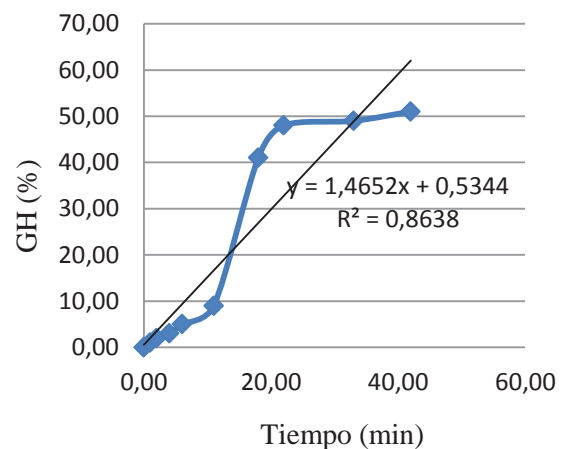


Figura 7. Regresión de Lineweaver - Burk para la hidrólisis de Flavourzima



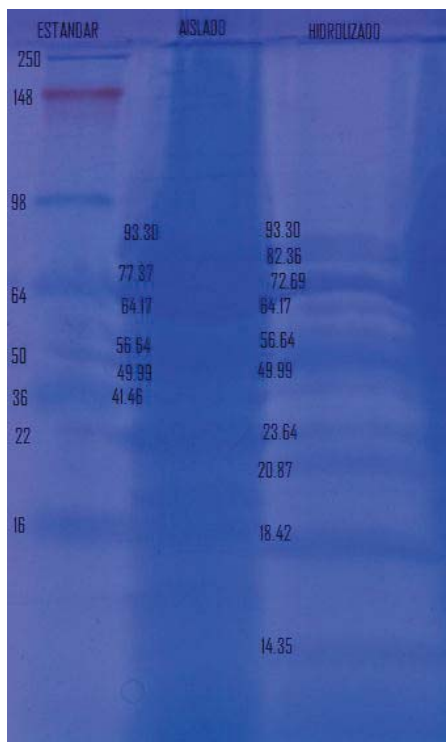
**Figura 8.** Grado de hidrólisis (GH) producido por la acción secuencial de la papaína y la Flavourzyme

#### 4.4 Caracterización química del hidrolizado proteico de chocho

**Tabla 5.** Composición de aminoácidos del hidrolizado proteico de chocho

Aminoácidos	Porcentaje
Acido aspártico	6,12
Treonina	1,43
Serina	2,27
Acido glutámico	13,39
Prolina	1,32
Glicina	2,99
Alanina	3,56
Cistina	0,48
Valina	1,46
Metionina	0,22
Isoleucina	1,83
Leucina	3,04
Tirosina	1,64
Fenilalanina	1,84
Histidina	1,25
Lisina	1,40
Arginina	1,83

**Grado de hidrólisis.** Después del proceso hidrolítico del aislado de proteína de chocho por la acción secuencial de papaína y flavourzyme se obtuvo un grado de hidrólisis del 51,13 %, clasificándose como un hidrolizado extensivo.



**Figura 9.** Determinación de los pesos moleculares de las proteínas del aislado e hidrolizado de chocho por electroforesis

**Composición aminoacídica.** En la tabla 5, se visualiza la composición de aminoácidos del hidrolizado proteico de chocho. La cantidad de ácido glutámico es significativo (13.4 %), aminoácido muy importante porque la planta lo requiere para su nutrición.

En la figura 9 se indica la determinación de los pesos moleculares de las proteínas del hidrolizado de chocho por electroforesis, demuestra la presencia de bandas proteicas con pesos moleculares que van desde 93.30 a 14.35kDa y se comprueba que se produjo la hidrólisis de las proteínas.

## 5 Conclusiones

1. Para una eficaz obtención de aislado de proteína es indispensable realizar la segunda relación de extracción del material insoluble que se encuentra después de la centrifugación, para conseguir un mayor rendimiento en peso y recuperación de proteína.
2. La molienda fina del aislado proteico de chocho es esencial para determinar los parámetros de trabajo en la obtención del hidrolizado.
3. El aislado de proteína de chocho, alcanzó un rendimiento en peso de 42,6 % y una recuperación de proteína de 72,22 %. El contenido de proteína del producto fue de 78,96 %, superior al contenido de proteína que presenta la harina integral.
4. El grado de hidrólisis alcanzado fue 51,13 %, se demostró que los productos obtenidos presentaron compuestos en forma mayoritaria por péptidos pequeños de bajo peso molecular.

## Referencias

- [1] Acuña, P., 2001, *Estudio de prefactibilidad técnico económico para la obtención de hidrolizado de proteína vegetal a partir de Lupino*, Proyecto de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniero Industrial mención Agroindustria, Universidad de la Frontera, Chile, <http://www.cabierta.uchile.cl/revista/23/articulos/pdf/rev3.pdf>, (Octubre, 2009).
- [2] Agronomía e Investigación, S.L. (Agroin), 2007, *Aminoácidos y Péptidos*, Madrid, España, <http://www.terralia.com/tecnico@agroin.es>, (Septiembre, 2009).
- [3] Franco, J., 2004. *Aminoácidos*, <http://www.uvademesa.cl/ARCHIVOS%20PDF/AminoacidosJAFrancoAbril04.pdf>, Cartagena, Colombia, (Julio, 2009).
- [4] Kim, S., Peter, S. y Rhee, K., 1990, *Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38, 651-656.

- [5] Rodríguez, N., 1999, *Obtención de hidrolizado de chocho (*Lupinus mutabilis*) por vías enzimáticas*, Tesis previa a la obtención de Ingeniero Químico, Escuela Politécnica Nacional, Quito. Ecuador.
- [6] Vioque, J., 2000, *Jornada Internacional sobre Proteínas Alimentarias*, Universidad de Sevilla España, <http://www.books.google.com.ec/books?isbn=8447206114>, (Diciembre, 2009).
- [7] Villacrés, E., 2009, *Propiedades y aplicaciones de los alcaloides del chocho*, Boletín Técnico, No 133, pp. 19, [http://www.mail.iniap-ecuador.gov.ec/.../view\\_detail.php?...CHOCHO](http://www.mail.iniap-ecuador.gov.ec/.../view_detail.php?...CHOCHO), (Diciembre, 2009).
- [8] Weber, K. y Osborn, M., 1969, *The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, Journal of Biological Chemistry, 244, 4 406.