

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AGROINDUSTRIA

OBTENCIÓN DE HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE PROTEÍNA DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis*) A PARTIR DE HARINA INTEGRAL

PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA AGROINDUSTRIAL

JIMENA ELIZABETH CAIZA AYALA
jimebrsk@yahoo.com

DIRECTOR: ING. OSWALDO ACUÑA
oswaldo.acuna@epn.edu.ec

Quito, Noviembre 2011

© Escuela Politécnica Nacional 2011
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Jimena Elizabeth Caiza Ayala, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Jimena Elizabeth Caiza Ayala

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Jimena Elizabeth Caiza Ayala, bajo mi supervisión.

Ing. Oswaldo Acuña
DIRECTOR DE PROYECTO

AUSPICIO

La presente investigación contó con el auspicio financiero del proyecto semilla N: 001, que se ejecuta en el Departamento de Ciencia de Alimentos y Biotecnología.

AGRADECIMIENTOS

Al Creador, por bendecirme, guiarme y por estar siempre presente en cada momento de mi vida.

A mis Padres, por su amor, comprensión y ayuda durante toda mi vida, en especial en este momento en el que deseo gratificar todo su esfuerzo, mi más infinito agradecimiento por convertirme en la persona que soy.

A mis hermanas por su cariño y todos sus consejos que hasta hoy me han ayudado en todo el camino que he recorrido.

A Pablo Munive por su ayuda y apoyo incondicional, es una gran persona y ser humano que se merece mi más eterno agradecimiento.

Al Ing. Oswaldo Acuña por la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, lo que ha permitido fortalecer las bases de mi formación académica e investigación, pero sobre todo por el ejemplo del gran sentido humano con el que dirige su grupo de tesistas.

Al la Ing. Elena Villacrés por las asesorías brindadas en el desarrollo de esta investigación y por el tiempo, dedicación y paciencia.

Al Ing. Patricio Castillo por el tiempo dedicado a la revisión de la investigación y por las acertadas observaciones para la mejora de este documento.

A la Ing. Cecilia Carpio por las asesorías y sugerencias en la realización de este proyecto.

A los profesionales del Departamento de Ciencia de Alimentos y Biotecnología por su contribución en el desarrollo del presente proyecto, Ing. Elena Coyago, Ing. Edwin Vera, Ing. Pablo Pólit, Dra. Rosario Barrera y Dra. Irma Paredes.

Al Sr. Germán Romo y al Sr. Héctor Ortiz por su ayuda en todo instante, mis más sinceros agradecimientos.

Al Ing. Oswaldo Proaño y a Don Camilo por su colaboración en la parte experimental.

Al Dr. Javier Carvajal por las facilidades otorgadas para el desarrollo del análisis de electroforesis.

A mis amigos de la Carrera que ha demostrado el verdadero valor de amistad, gracias por estar ahí siempre y el saber que puedo contar con ustedes; Mary, Gaby, Eve, Dany, Juankis, Soni, Fer y Santi.

A mis compañeros gracias por aquellos lindos momentos compartidos durante la Carrera.

Y a aquellas personas quién directa o indirectamente me apoyaron, gracias.

*Dedicada con mucho cariño a mis
Padres*

*como un pequeño gesto de agradecimiento
por enseñarme siempre a seguir y nunca
darme por vencida pero sobre todo
por la Vida Amor y Ejemplo.*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	x
1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 Situación actual del cultivo de chocho y destino de producción en el Ecuador	1
1.1.1 Situación actual del cultivo de chocho	1
1.1.2 Información agrícola del chocho	2
1.1.2.1 Generalidades	2
1.1.2.2 Variedades	2
1.1.2.3 Descripción botánica	2
1.1.2.4 Composición química	4
1.1.2.5 Valor nutritivo	5
1.1.2.6 Factores antinutricionales	6
1.1.3 Destino de producción en el Ecuador	8
1.1.4 Datos agronómicos del chocho en el Ecuador	9
1.2. Obtención de aislados proteicos de semillas de leguminosas	11
1.2.1 Procesamiento de leguminosas	11
1.2.2 Aislados proteicos	12
1.2.2.1 Extracción alcalina/precipitación isoelectrica	12
1.2.2.2 Extracción ácida	13
1.2.2.3 Extracción con sales	13
1.2.2.4 Ultrafiltración	13
1.3. Obtención de hidrolizados enzimáticos de proteína a partir de aislado proteico	14
1.3.1 Hidrólisis de proteínas	14
1.3.2 Hidrólisis enzimática de proteínas	15
1.3.3 Enzimas	17
1.3.3.1 Proteasas	17
1.3.3.2 Flavourzima	18
1.3.3.3 Papaína	18
1.3.4 Cinética enzimática	19
1.3.5 Cálculo de la K_M y de la V_{max} de un enzima	20
1.3.6 Factores que influyen en la velocidad de las reacciones enzimáticas	21
1.3.6.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	21
1.3.6.2 Efecto del pH sobre la actividad enzimática	22
1.3.6.3 Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de la reacción enzimática	22
1.3.6.4 Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad enzimática	22
1.3.7 Aplicación de hidrolizados de proteínas	23

2.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.1	Caracterización físico – química de la semilla y harina de chocho integral	25
2.1.1	Caracterización de la semilla de chocho	25
2.1.1.1	Caracterización física	25
2.1.1.2	Caracterización química	26
2.1.2	Caracterización de la harina de chocho integral	27
2.1.2.1	Caracterización física	27
2.1.2.2	Caracterización química	27
2.2	Determinación de las condiciones de obtención de aislados de proteína de chocho a partir de harina integral	27
2.2.1	Extracción básica	27
2.2.2	Precipitación ácida	28
2.3	Caracterización química del aislado de chocho	29
2.3.1	Análisis proximal del aislado de chocho	29
2.3.2	Solubilidad	29
2.3.3	Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE	30
2.3.4	Determinación de la concentración de alcaloides en el aislado de chocho	30
2.4	Determinación de las condiciones de elaboración de hidrolizados por vía enzimática, a partir de aislado de chocho	31
2.4.1	Determinación de la actividad enzimática	31
2.4.1.1	Determinación de la actividad enzimática de papaína	31
2.4.1.2	Determinación de la actividad enzimática de flavourzima	32
2.4.2	Determinación del tiempo de reacción	33
2.4.3	Determinación de las concentraciones de sustrato y enzima	33
2.4.4	Hidrólisis enzimática	35
2.5	Caracterización química del hidrolizado proteico de chocho	36
2.5.1	Grado de hidrólisis	36
2.5.2	Composición aminoacídica	37
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
3.1	Caracterización física de la semilla de chocho	38
3.2	Caracterización física y química de la harina cruda	39
3.2.1	Granulometría	39
3.2.2	Composición química	40
3.3	Obtención de aislado de proteína de chocho a partir de harina integral	41
3.3.1	Rendimiento del proceso	41
3.3.2	Composición química	44
3.3.3	Solubilidad	45
3.3.4	Determinación de los pesos moleculares del aislado de chocho	45
3.3.5	Determinación de la concentración de alcaloides	46

3.4	Obtención del hidrolizado de proteína de chocho	47
3.4.1	Actividad enzimática de papaína y flavourzima	47
3.4.2	Determinación del tiempo de reacción	47
3.4.3	Concentraciones de sustrato y enzima	49
3.4.3.1	Concentración de sustrato	49
3.4.3.2	Concentración de enzima	51
3.4.4	Obtención del hidrolizado enzimático	54
3.4.5	Perfil de aminoácidos	56
3.4.6	Determinación de los pesos moleculares del hidrolizado de chocho	58
3.4.7	Determinación de la concentración de alcaloides	59
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	60
4.1	Conclusiones	60
4.2	Recomendaciones	61
	BIBLIOGRAFÍA	62
	ANEXOS	72

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINA
Tabla 1.	Composición química del chocho y de la soya (%)	4
Tabla 2.	Contenido de minerales del chocho	5
Tabla 3.	Contenido de vitaminas del chocho	5
Tabla 4.	Contenido de aminoácidos del chocho (mg de aminoácidos/ g de proteína)	6
Tabla 5.	El cultivo de chocho a través de los datos del III Censo Nacional Agropecuario	10
Tabla 6.	Caracterización física del chocho (<i>Lupinus mutabilis</i>)	38
Tabla 7.	Perfil granulométrico de la harina integral de chocho	40
Tabla 8.	Composición química proximal de la harina integral de chocho (%)	40
Tabla 9.	Prueba de Tukey para el rendimiento (%) del aislado en la interacción pH de la solución vs relación sólido / líquido (g harina / mL agua)	41
Tabla 10.	Prueba de Tukey para el contenido de proteína (%) del aislado en la interacción pH de la solución vs relación sólido / líquido (g harina / mL agua)	42
Tabla 11.	Composición química proximal del aislado de chocho (%)	44
Tabla 12.	Contenido de aminoácidos del hidrolizado proteico del chocho expresados en (g de aminoácidos / 100 g de proteína)	56
Tabla 13.	Cuadro de análisis de varianza para el rendimiento (%) del aislado	73
Tabla 14.	Rendimiento en peso del aislado proteico de chocho (medias del test de Tukey)	73
Tabla 15.	Cuadro de análisis de varianza para el contenido de proteína (%) del aislado	74
Tabla 16.	Extracción de proteína del aislado proteico de chocho (medias del test de Tukey)	74
Tabla 17.	Solubilidad del aislado de chocho a pH 7,0, según la variación de la absorbancia con la concentración del aislado	75

Tabla 18.	Resultados de la determinación del tiempo de reacción del aislado de chocho con flavourzima	76
Tabla 19.	Resultados de la determinación del tiempo de reacción del aislado de chocho con papaína	76
Tabla 20.	Concentración de sustrato vs velocidad de reacción de la hidrólisis con papaína para la determinación de la concentración de sustrato	77
Tabla 21.	Concentración de sustrato vs velocidad de reacción de la hidrólisis con flavourzima para la determinación de la concentración de sustrato	77
Tabla 22.	Concentración de papaína vs velocidad de reacción para la determinación de la concentración de papaína	78
Tabla 23.	Concentración de flavourzima vs velocidad de reacción para la determinación de la concentración de flavourzima	78
Tabla 24.	Prueba de Tukey para la concentración de enzima vs velocidad de reacción para la determinación de la concentración de papaína y flavourzima	78
Tabla 25.	Cuadro de análisis de varianza para la concentración de papaína	79
Tabla 26.	Cuadro de análisis de varianza para la concentración de flavourzima	79
Tabla 27.	Pesos moleculares de referencia utilizados para la curva de calibración de pesos moleculares del aislado e hidrolizado de chocho	80
Tabla 28.	Datos de concentración de BSA y absorbancia para la curva de calibración de concentración de proteína	81
Tabla 29.	Propiedades de la papaína y flavourzima	82

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1.	Planta de chocho	3
Figura 2.	Reacción enzimática	17
Figura 3.	Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten	20
Figura 4.	Representación de Lineweaver-Burk	21
Figura 5.	Diagrama representativo del proceso para la obtención del aislado de proteína de chocho	29
Figura 6.	Diagrama representativo del proceso para la obtención del hidrolizado proteico de chocho	36
Figura 7.	Solubilidad del aislado de proteína de chocho a pH 7,0	45
Figura 8.	Análisis electroforético en geles de poliacrilamida SDS – PAGE (12,5%)	46
Figura 9.	Tiempo de reacción para la papaína	48
Figura 10.	Tiempo de reacción para la flavourzima	48
Figura 11.	Curva de Michaelis y Menten para la hidrólisis de papaína	49
Figura 12.	Regresión de Lineweaver – Burk para la hidrólisis de papaína	49
Figura 13.	Curva de Michaelis y Menten para la hidrólisis de flavourzima	50
Figura 14.	Regresión de Lineweaver – Burk para la hidrólisis de flavourzima	51
Figura 15.	Concentración de proteína soluble, en función del tiempo a diferentes concentraciones de papaína, pH = 7,0; 50° C y [S] = 90 mg / mL	51
Figura 16.	Velocidad de hidrólisis del aislado proteico en función de la concentración de papaína, pH = 7,0; 50° C y [S]= 90 mg / mL	52
Figura 17.	Concentración de proteína soluble en función del tiempo a diferentes concentraciones de flavourzima, pH = 7,0; 50° C y [S]= 90 mg / mL	53
Figura 18.	Velocidad de hidrólisis del aislado proteico, en función de la concentración de flavourzima, pH = 7,0; 50° C y [S]= 90 mg / mL	53
Figura 19.	Cinética de la hidrólisis de proteína de chocho (<i>Lupinus mutabilis</i>) producido por la acción secuencial de papaína y flavourzima	54

Figura 20.	Rendimiento en peso (%) en función de la interacción de los diferentes niveles de los factores pH y relación sólido / líquido (test de Tukey)	73
Figura 21.	Extracción de proteína (%) en función de la interacción de los diferentes niveles de los factores pH y relación sólido / líquido (test de Tukey)	74
Figura 22.	Balance de materiales de la composición química del aislado de chocho	75
Figura 23.	Curva de calibración de pesos moleculares	80
Figura 24.	Curva de calibración con BSA para la determinación de la concentración de proteína	81
Figura 25.	Aislado de proteína de chocho en polvo	83
Figura 26.	Solubilidad del aislado de proteína de chocho al 9 %	83
Figura 27.	Hidrólisis enzimática del aislado proteico de chocho con papaína	84
Figura 28.	Hidrólisis enzimática del aislado proteico de chocho con papaína y flavourzima	84
Figura 29.	Hidrolizado de proteína de chocho en polvo	85
Figura 30.	Placas de electroforesis con gel de separación 12,5 % y gel de concentración 5 %	85
Figura 31.	Muestras de aislado e hidrolizado proteico de chocho con tampón de muestra para electroforesis	86
Figura 32.	Muestras proteicas de chocho en la cámara de electroforesis	86
Figura 33.	Marcadores de pesos moleculares en la cámara de electroforesis	87
Figura 34.	Ampolleta de hidrólisis ácida del aislado proteico de chocho	87
Figura 35.	Filtración del aislado proteico hidrolizado con HCl	88
Figura 36.	Centrifugación del aislado proteico hidrolizado con HCl	88
Figura 37.	Sobrenadantes obtenidos de la centrifugación del aislado proteico de chocho hidrolizado con HCl	89

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO I	
Rendimiento en peso del aislado proteico de chocho	73
ANEXO II	
Recuperación de proteína del aislado proteico de chocho	74
ANEXO III	
Balance de materiales de la composición química del aislado de chocho	
Solubilidad del aislado de chocho	75
ANEXO IV	
Determinación del tiempo de reacción de la cinética de hidrólisis	76
ANEXO V	
Determinación de la concentración de sustrato y enzima	77
ANEXO VI	
Curva de calibración para la determinación de pesos moleculares del aislado e hidrolizado proteico	80
ANEXO VII	
Curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA) para la determinación de la concentración de proteína	81
ANEXO VIII	
Propiedades de la papaína y flavourzima	82
ANEXO IX	
Fotografías obtenidas de la parte experimental	83

RESUMEN

La semilla cruda de chocho (*Lupinus mutabilis*), considerada como fuente proteica debido al contenido de proteína presente, fue sometida a una limpieza, selección y molienda. Se obtuvo la harina integral, con grasa y alcaloides. Se determinaron las condiciones más adecuadas a escala de laboratorio, para obtener el mayor porcentaje de extracción de aislado e hidrolizado enzimático de proteína, a partir de harina integral de chocho (*Lupinus mutabilis*).

Las variables de extracción para el aislado fueron: pH (8,5; 9,5; 10,5); relación sólido: líquido agua destilada (1/7, 1/9, 1/11) y, 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, a pH 10,5, en dos etapas. La primera se desarrolló con una relación sólido: líquido de 1/11 y la segunda, de 1/5. El aislado proteico obtenido por solubilización básica y acidificación, de los dos filtrados a pH 4,5, dio un contenido de proteína del 62,78 % (base seca), con humedad del 3,78 %. El rendimiento del proceso fue del 42,74 %. El aislado se hidrolizó enzimáticamente, con las enzimas flavourzima y papaína, que han presentado especificidad con la harina de chocho (Villacrés, 2001). El sustrato, en una concentración del 9 %, se solubilizó en tampón fosfato a pH 7,0. Se llevó a cabo la hidrólisis secuencial con papaína y flavourzima, a una temperatura de reacción de 50 °C y por un tiempo de 40 min. Las alícuotas obtenidas en la respectiva hidrólisis se evaluaron a través de proteína soluble en TCA al 10 %, medida en un espectrofotómetro UV, a 280 nm. El hidrolizado mediante la acción secuencial de ambas enzimas, presentó un grado de hidrólisis del 26,91 %.

INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento de materiales ricos en proteína son utilizados en la elaboración de concentrados, aislados e hidrolizados, cuyas aplicaciones principales se encuentran en la alimentación humana y animal; así como, 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; y, bioestimulante de los sistemas hormonales y enzimáticos (Agroin, 2007). La aplicación de aminoácidos permite la recuperación de las plantas, por el suministro de nutrientes fáciles de metabolizar (Franco, 2004).

El chocho (*Lupinus mutabilis*) 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 (3 %), que confieren al chocho un sabor amargo y carácter tóxico.

La identificación, recuperación y cuantificación de los alcaloides es importante en el área farmacéutica, industrial y agrícola; ya que pueden ser utilizados como agentes fungicidas, insecticidas o nematocidas (Villacrés, 2009).

El chocho tiene buenos rendimientos agrícolas, que lo hacen un cultivo rentable. Es necesario buscar nuevas alternativas de uso (Acuña, 2001).

En la elaboración de aislados e hidrolizados se emplean materias primas con bajo nivel de grasa, y así, 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 chocho, para obtener un hidrolizado con funcionalidad en nutrición vegetal (Vioque, 2000).

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 SITUACIÓN ACTUAL DEL CULTIVO DE CHOCHO Y DESTINO DE PRODUCCIÓN EN EL ECUADOR

1.1.1 SITUACIÓN ACTUAL DEL CULTIVO DE CHOCHO

El chocho o tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) es nativo de la zona andina de Sudamérica. Es la única especie americana del género *Lupinus* domesticada y cultivada como una leguminosa en los Andes centrales (Tapia, 2000).

El cultivo se distribuye desde Colombia hasta el norte de Argentina; sin embargo, actualmente es de importancia sólo en Ecuador, Perú y Bolivia; por su altitud y sus condiciones climáticas, estos países constituyen una zona exenta de enfermedades para el chocho. Un estudio realizado para determinar la importancia de los cultivos andinos en sus países de origen permitió determinar que en Perú, Bolivia, Ecuador y Chile el chocho se constituía en un rubro prioritario; mientras que, en Argentina y Colombia constituía un rubro de prioridad media (FAO, 1986; Morales y Vacher, 1992).

El interés por el chocho ha aumentado en Europa, esto se debe, a su alta calidad nutritiva. Es una fuente rica en proteínas y grasa, con contenidos que van desde 41,0 hasta 51,0 % y de 14,0 a 24,0 %, respectivamente (Gross *et al.*, 1988).

En relación con otras leguminosas, el chocho contiene mayor porcentaje de proteínas ricas en lisina, razón por la cual representa un gran potencial, no solo para la alimentación humana, sino además para la alimentación de animales. Sin embargo, su crecimiento indeterminado y su alto contenido de alcaloides, desde 0,43 hasta 3,15 %, han obstaculizado su cultivo. El área total del cultivo de chocho en los Andes alcanza las 10000 ha (Mujica, 1994; Jacobsen y Mujica, 2006).

Las cualidades del chocho, desde el punto de vista agrícola, pueden disminuir la contaminación ambiental, al reducir los efectos negativos de la sobre exposición a plaguicidas (Cole *et al.*, 1998).

El chocho, semejante a otras leguminosas, es un excelente abono verde, capaz de fijar 400 kg de nitrógeno por ha (Popenoe *et al.*, 1989). Además, puede contribuir al manejo de plagas, en el sistema de rotación de cultivo andino, actúa como una barrera contra los nemátodos, que más demandan el empleo de plaguicidas en la sierra de Ecuador (González y Franco, 2001).

1.1.2 INFORMACIÓN AGRÍCOLA DEL CHOCHO

1.1.2.1 Generalidades

El chocho (*Lupinus mutabilis*) es una leguminosa que se cultiva en forma ancestral, en la serranía de nuestro país, principalmente en la provincia del Cotopaxi. Crece en suelos pobres de minerales y es tolerante al frío, condiciones que permiten su desarrollo en diversos ambientes. Por su contenido de proteína, se lo considera como una valiosa fuente alimenticia, de fácil acceso para la población indígena (FAO, 1994).

1.1.2.2 Variedades

En el caso del género *Lupinus* existe un elevado número de especies afines a la especie domesticada, *L. mutabilis*. Se han encontrado 82 especies de *Lupinus*, que están presentes en los Andes centrales; pero, se destacan como más representativas: *L. albus*, *L. mutabilis*, *L. angustifolius* y *L. luteus* (FAO, 2000).

1.1.2.3 Descripción botánica

El chocho es una leguminosa herbácea, erecta, de tallos cilíndricos, resistentes, de color verde oscuro, a veces varía de amarillento a castaño, alcanza alturas de 0,8 - 2,0 m, como se muestra en la Figura 1. Sus hojas bifurcan a partir de un eje

central y son palmeadas. La floración y formación de frutos es, a menudo, dispersa en el tiempo. Las flores son de color azul, pero varían a blanco y rosado (Colquehuanca, 1982).



Colquehuanca, 1982

Figura 1. Planta de chocho

El fruto es de forma elíptica y alargada, aguda en ambos extremos con aproximadamente 120 vainas por planta, en cada vaina se encuentran de 6 a 8 semillas de forma redonda u ovalada, lenticulares, de 5,0 – 15,0 mm de largo, de 6,0 – 8,0 mm de ancho y un diámetro aproximado de 0,6 a 1,0 cm. Su color puede ser blanco, marrón, amarillo, ocre, pardo o negro. Además, el color varía y se presentan en forma combinada, pueden ser marmoteado, ceja, media luna o esparcido (Colquehuanca, 1982).

El tegumento que cubre las semillas es duro y fibroso, rico en alcaloides amargos, que impiden el consumo directo y puede constituir hasta el 10 % del peso total (Colquehuanca, 1982).

1.1.2.4 Composición química

El grano de chocho es rico en proteínas y grasas, razón por la cual debería ser más utilizado en la alimentación humana. Su contenido proteico es incluso superior al de la soya y su contenido en grasas es similar, como lo muestran los datos presentados en la Tabla 1 (FAO, 2000).

Tabla 1. Composición química del chocho y de la soya (%)

	Chocho	Soya
Proteína	44,3	33,4
Grasa	16,5	16,4
Carbohidrato	28,2	35,5
Fibra	7,1	5,7
Ceniza	3,3	5,5
Humedad (%)	7,7	9,2

FAO, 2000

El aceite de chocho es aceptable para el uso doméstico por el color claro, consta fundamentalmente de cadenas de ácidos grasos insaturados. Los ácidos grasos más abundantes son el oleico y el linoleico que desde el punto de vista nutricional son esenciales para el hombre. Por la baja concentración de ácido linolénico, este aceite no se deteriora con facilidad, lo que favorece la conservación del mismo (Gross, 1982).

Con relación a los carbohidratos, el contenido de almidón y sacarosa es bajo comparado con los oligosacáridos como la rafinosa y verbascosa, los cuales son eliminados durante el desamargado o eliminación de alcaloides (Gross, 1982).

En la Tabla 2 se presenta el contenido de minerales del chocho, similar al de otras leguminosas. Únicamente los contenidos de fósforo, magnesio y potasio son más elevados.

Tabla 2. Contenido de minerales del chocho

Minerales	Contenido
K*	1,20 – 1,63
Na*	0,01 – 1,21
P*	0,44 – 0,88
Mg*	0,22 – 0,43
Ca*	0,09 – 0,18
Fe**	39,00 – 138,00
Zn**	54,00 – 59,00
Mn**	25,00 – 27,00
B**	20,00
Al**	11,80
Cu**	6,70 – 11,30

*(%), **(ppm)
Gross, 1982

En relación con el contenido de vitaminas, constituye una valiosa fuente de vitamina B para la alimentación humana. En la Tabla 3 se muestran las vitaminas presentes en el chocho.

Tabla 3. Contenido de vitaminas del chocho

Vitaminas	(mg / 100 g)
B-Carotina	0,09
Tiamina	0,51
Riboflavina	0,42
Niacina	4,10

Gross, 1982

1.1.2.5 Valor Nutritivo

Las semillas son óptimamente nutritivas, una vez eliminados sus contenidos tóxicos mediante cocción y desaguado prolongados. Además, al quitar la cáscara

a la semilla y moler el grano se obtiene una harina utilizada ampliamente en la alimentación humana (FAO, 1994).

La calidad proteica de una proteína puede medirse por su concentración, digestibilidad y por el contenido de aminoácidos esenciales que componen su estructura (FAO, 1994). Al igual que la mayoría de leguminosas, el chocho presenta deficiencia de aminoácidos azufrados como son la metionina y cistina, los demás aminoácidos se encuentran en proporciones recomendadas por la FAO, a excepción del triptófano que también presenta deficiencia, como se presenta en la Tabla 4 (FAO, 2000).

Tabla 4. Contenido de aminoácidos del chocho (mg de aminoácidos / g de proteínas)

Aminoácidos	Patrón de aminoácidos (mg / g proteínas)
Isoleucina	28
Leucina	66
Lisina	58
Metionina + cistina	25
Fenilalanina + tirosina	63
Treonina	34
Triptófano	11
Valina	35
Histidina	19

FAO, 2000

Estudios han demostrado que los cereales tienen deficiencia de lisina y treonina, por lo cual el chocho puede ser considerado como un suplemento alimenticio de estos productos (Schoeneberger *et al.*, 1982).

1.1.2.6 Factores antinutricionales

Al ser el chocho del grupo de las leguminosas, la segunda familia en orden de importancia, después de los cereales, debido a su consumo, la presencia de

diversos factores antinutricionales causa bajo aprovechamiento como alimento y limita su valor biológico. Estos compuestos se encuentran principalmente en las hojas, vainas y semillas (Fraile *et al.*, 2007; Aguilera *et al.*, 2009).

Los factores antinutricionales se clasifican en dos grupos: lábiles y estables al calor. Los lábiles son inhibidores de proteasas, lectinas, goitrógenos y antivitaminas.

Los inhibidores de proteasas son los factores antinutricionales más conocidos. Se encuentran principalmente en las semillas crudas de las leguminosas. Se pueden definir como compuestos termo lábiles de naturaleza proteica, que alteran la digestión de las proteínas e inhiben la acción de las enzimas digestivas, que catalizan la hidrólisis de las proteínas de la dieta. Los más conocidos son los que reaccionan con serina proteasas, como la tripsina y la quimotripsina (Elizalde, 2009). La actividad de este inhibidor se elimina a través de diversos tratamientos como procesos térmicos, la germinación y la fermentación. No existe evidencia que los inhibidores de proteasas tengan efecto adverso a la salud humana (Elizalde, 2009).

Las lectinas pertenecen a un grupo variado de proteínas no inmunes, conocido como hemaglutinas. Están ampliamente distribuidas en plantas, animales y organismos inferiores. Diversos estudios indican que las lectinas han demostrado propiedades biológicas, entre las que se puede incluir diversos tratamientos alternativos a enfermedades como es el cáncer (Elizalde, 2009).

Los goitrógenos son sustancias alimenticias presentes en muchas plantas de consumo común. Cuando se toman en grandes cantidades producen dilatación de la tiroides. Estos compuestos no influyen nutricionalmente cuando las leguminosas son adecuadamente procesadas (Pimentel, 1996).

En los factores antinutricionales estables al calor se encuentran las saponinas, los estrógenos, los cianógenos, los fitatos, los alcaloides y los oligosacáridos.

Las saponinas del chocho tienen poco efecto sobre el organismo. Los estrógenos naturales pueden ser eliminados por extracción con hexano y agua-etanol. Los compuestos cianogénicos presentan bajo nivel en los productos proteicos de chocho, por lo que no tienen importancia metabólica (Zamora *et al.*, 2008; Erdemoglu *et al.*, 2007).

Los alcaloides son compuestos naturales del chocho. Están localizados, principalmente, en la testa; algunos son la lupanina, esparteína, multiflorina y amodendrina. Los alcaloides son sustancias nitrogenadas básicas y de acción farmacológica potente, responsables del sabor amargo y la baja palatabilidad, en las semillas de chocho. Su concentración depende de la especie, naturaleza del suelo y temporada de cosecha (Zamora *et al.*, 2008; Erdemoglu *et al.*, 2007).

Estos compuestos se solubilizan en agua y es posible su eliminación a través del descascarado o durante el tratamiento hidrotérmico-alcalino de las semillas. Por ende, no causan efectos tóxicos acumulativos en animales y humanos (Jiménez *et al.*, 2003).

Los oligosacáridos del chocho pertenecen a la familia de la rafinosa. Son estables al calor y no son removidos por procesos térmicos. A través del lavado, cocción y deshidratación se reducen los niveles de oligosacáridos (Aguilera *et al.*, 2009).

1.1.3 DESTINO DE PRODUCCIÓN EN EL ECUADOR

En Ecuador, el 80 % de la producción del chocho se consume, principalmente, en la población urbana de la Sierra y el 19 % de la Costa. El consumo está limitado a grano entero. La desventaja del chocho es su contenido de alcaloides en el grano.

Se estima que la demanda insatisfecha de chocho desamargado es del 40 %, este porcentaje proviene de Perú y Bolivia. Según el criterio de varios agricultores, esto se debe al crecimiento del mercado en el que se puede comercializar esta leguminosa andina (INIAP, 2008).

El cultivo de chocho tiene un mercado potencial para la producción de grano amargo y grano desamargado, debido a que la producción solo abastece el 60 % de la demanda (INIAP, 2008). Para el mercado externo se espera una demanda progresiva si la competencia se basa en función de tres aspectos: poder competitivo del país, capacidad de la empresa de adaptarse al mercado externo y conocimiento de los mercados (Caicedo y Peralta, 2000).

Según el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), producir un quintal de chocho, de 45 kg, puede costar entre \$40 y \$45, mientras que ese mismo quintal se puede comercializar en el mercado nacional hasta en \$150. Unos de los principales motivos por los que el producto tiene estos precios es el crecimiento de su consumo per cápita, que en las regiones Sierra y Oriente alcanza los 0,8 kg mensuales, por su parte la Costa tiene un consumo mensual de 0,4 kg per cápita (INIAP, 2008).

El cultivo de chocho está ubicado en una franja altitudinal que va desde 2500 hasta 3600 msnm, con riesgos de heladas y granizadas. Normalmente, el chocho es una planta de clima moderado; la planta adulta es resistente a heladas, pero la planta joven es muy susceptible a las mismas (Caicedo y Peralta, 2000).

El cultivo de chocho, seguido de los de cereales, maíz, leguminosas y papa es el sistema más importante en Chimborazo, Pichincha e Imbabura (Moncayo *et al.*, 2000).

1.1.4 DATOS AGRONÓMICOS DEL CHOCHO EN EL ECUADOR

De acuerdo con la información obtenida por el III Censo Nacional Agropecuario, el número de UPAS registradas, para el período de referencia 1999 al 2000, fueron 9596, con una superficie sembrada de 5974 ha y una superficie cosechada de 3921 ha.

Para el período del censo, la producción obtenida fue de 789 t con ventas registradas por 601 t, que representan el 76 % en ventas de la producción del año

censal. Además, se observa que las pérdidas fueron significativas, se cosechó solo el 66 % de la superficie sembrada (MAG, 2003).

La superficie promedio por unidad productiva anual, no alcanza 1 ha. Esto se relaciona con la gran cantidad de productores, con pequeñas superficies sembradas con cultivo de chocho (Junovich, 2003).

El rendimiento promedio, en una chacra de 0,97 ha de tamaño promedio, es 317 kg / ha. Este rendimiento bajo se debe al ataque de plagas y enfermedades, falta de semilla de calidad y manejo deficiente de la fertilidad del suelo (Moncayo *et al.*, 2000).

Se considera que casi el 100 % de la producción se localiza en la región Sierra. Cotopaxi es la provincia de mayor aporte con 4869 UPAS y una producción obtenida de 327 t. Chimborazo, también registra un número de UPAS importante de 1882 y una producción de 185 t, como lo muestran los datos presentados en la Tabla 5 (Junovich, 2003).

Tabla 5. El cultivo de chocho a través de los datos del III Censo Nacional Agropecuario

Provincia	Cantón	UPAS	Superficie Sembrada (ha)	Superficie Cosechada (ha)	Producción Obtenida (t)	Rendimiento Promedio (kg / ha)
Cotopaxi	Latacunga	3 104			254	
Cotopaxi	Pujilí	1 765	1 189	686	73	106
Chimborazo	Riobamba	1 882	1 324	810	185	230

Adaptado de Junovich, 2003

Es importante recalcar que el 70 % de las UPAS del país se encuentran en las provincias de Cotopaxi y Chimborazo, así como el 75 % de la superficie sembrada y el 71 % de la superficie cosechada. Estas provincias abarcan el 65 % de la producción nacional (MAG, 2003).

1.2 OBTENCIÓN DE AISLADOS PROTEICOS DE SEMILLAS DE LEGUMINOSAS

1.2.1 PROCESAMIENTO DE LEGUMINOSAS

La forma en que el grano es procesado determina tanto las características funcionales y nutritivas de los productos finales, como su adaptabilidad para diversas aplicaciones. Los métodos tradicionales de procesamiento de semillas de leguminosas son altamente eficientes en la reducción de factores anti-nutricionales y mejoran la calidad organoléptica (Luna, 2007).

El lavado es parte integral de varios tratamientos, como cocción, enlatado, germinación y fermentación. Se hidratan las semillas, usualmente hasta alcanzar su peso máximo. El resultado depende del género, especie, variedad, duración del proceso, temperatura, pH, salinidad del medio de lavado y de las adecuadas condiciones de almacenamiento, antes del proceso. Esta etapa reduce los niveles de azúcares, minerales, ácido fítico e inhibidores enzimáticos (Prodanov *et al.*, 2004).

La cocción es un tratamiento ancestral utilizado para volver comestibles a las leguminosas. Generalmente, esta etapa desnaturaliza la proteína, al mismo tiempo que modifica el color. Su difusión en la fase líquida, inactiva los factores antinutricionales sensibles al calor, aumenta la disponibilidad de las proteínas y mejora la digestibilidad de las mismas (Prodanov *et al.*, 2004; Khattab *et al.*, 2009).

El descascarillado mejora las características funcionales e incrementa la aceptabilidad, además, los compuestos antinutricionales y los tiempos de cocción se reducen (Sreerama *et al.*, 2009).

A más de los procesos anteriores, el tostado es un proceso que permite producir una amplia gama de productos como harina integral, que contiene toda la grasa natural y se obtiene al moler el grano que conserva su cáscara y su germen;

harina enzimáticamente activa, la cual es tratada con calor muy ligero para extraer la grasa; y, harina desengrasada, tratada térmicamente para eliminar la actividad enzimática (Luna, 2007).

Con el procesamiento de las leguminosas se obtiene harina, sémola, salvado, concentrado y aislado. El salvado es un producto que se añade recientemente a la línea de productos, con alto contenido de fibra de la porción cuticular (cáscara) de la semilla. La harina y sémola difieren únicamente por el tamaño de partícula, el contenido mínimo de proteína es de 40 % si el aceite no es extraído o del 50 %, si se extrae el aceite con hexano (Luna, 2007).

1.2.2 AISLADOS PROTEICOS

El aislado es la proteína más refinada que existe. Se prepara a partir de harinas o de hojuelas desengrasadas. 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 proteína (Luna, 2007; Vioque *et al.*, 2001). Los métodos comúnmente seguidos, en la extracción de proteínas de vegetales, son:

1.2.2.1 Extracción alcalina/precipitación isoelectrica

En este proceso se realiza, primero, la extracción alcalina y posteriormente la precipitación isoelectrica. Generalmente, las semillas son descascarilladas y pulverizadas. De la harina se elimina la grasa, en forma de aceite.

En la primera etapa, las proteínas son solubilizadas para separarlas del resto de los compuestos no solubles, el extracto obtenido contiene proteínas y compuestos solubles. La mayoría de proteínas vegetales son solubles a valores de pH próximos a 7,0. Sin embargo, se opta por extraer a pH alcalinos (8,0 – 11,0), método en el que se aprovecha la alta solubilidad que presentan las proteínas a ese rango de pH (Vioque *et al.*, 2001).

La harina se dispersa en agua, se ajusta al pH indicado, la misma que se mezcla por un tiempo de 30 a 180 min y se centrifuga o filtra, para remover el material insoluble.

En la segunda etapa, el extracto obtenido se ajusta al punto isoeléctrico. 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 prevalencia de las interacciones hidrofóbicas. La solubilidad de las proteínas cambia de acuerdo con las características del disolvente (agua), que ocasiona la precipitación de las proteínas (Scopes, 1994).

El aislado recuperado, selectivamente, se presenta en forma de crema insoluble concentrada, que posteriormente es secada.

1.2.2.2 Extracción ácida

El proceso de extracción ácida se realiza de manera similar a la de la alcalina, excepto que la extracción de la etapa inicial se realiza en condiciones ácidas, menores a pH 4,0. Estos valores de pH permiten solubilizar proteínas, antes de la precipitación isoeléctrica (Boye *et al.*, 2010).

1.2.2.3 Extracción con sales

Este proceso se conoce también como micelización e involucra la precipitación de las proteínas en una solución salina diluida. La recuperación posterior del aislado se realiza por centrifugación o filtración, seguida, de un secado (Boye *et al.*, 2010).

1.2.2.4 Ultrafiltración

La ultrafiltración es un proceso físico-químico de separación, en el cual una solución presurizada fluye sobre una membrana porosa. El agua y solutos de bajo peso molecular pasan, influenciados por la presión, a través de la membrana para

formar el ultrafiltrado; mientras que, las proteínas son concentradas al ser retenidas por la membrana (Cassini *et al.*, 2010).

En este proceso el sobrenadante obtenido, después de la extracción alcalina, es sujeto a ultrafiltración para concentrar las proteínas; los compuestos comúnmente retenidos son las partículas coloidales, biomoléculas, polímeros y algunos azúcares. La principal ventaja de este método es que permite recuperar las proteínas solubles como las insolubles (Vioque *et al.*, 2001).

1.3 OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS DE PROTEÍNA A PARTIR DE AISLADO PROTEICO

1.3.1 HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS

La hidrólisis consiste en descomponer a las proteínas, incluso, en sus aminoácidos constitutivos, los que pueden ser incorporados, luego, a organismos vivos.

El agua es uno de los compuestos reaccionantes. Las descomposiciones directas por agua son raras y requieren altas temperaturas y presiones, por lo que, normalmente, la hidrólisis se efectúa en presencia de ácidos minerales fuertes o bases fuertes, como catalizadores. También pueden realizarse bajo la acción catalítica de determinadas enzimas, que no intervienen estequiométricamente en la reacción, sólo la aceleran (Greenfield y Southgate, 1992).

Como efectos de la hidrólisis se tiene una reducción del tamaño molecular, así como también cambios estructurales y de polaridad. Se incrementa el carácter hidrofílico por el aumento de la exposición de grupos carboxílicos libres y el carácter hidrófobo, por la exposición de restos de aminoácidos apolares. La solubilidad de las proteínas parcialmente hidrolizadas mejora en todo el rango de pH (Fleming, 1989).

La hidrólisis de proteínas puede producir péptidos hidrófobos amargos, con residuos de leucina o fenilalanina terminales. El sabor amargo es pronunciado si muchos péptidos de bajo peso molecular (menor a 6 kDa) son producidos. Para prevenir la formación de los compuestos amargos, se utiliza una combinación secuencial de endo y exoproteasas, que minimicen su producción y limiten el tiempo de reacción proteolítica (Lahl y Braun, 1994).

Los parámetros de proceso más críticos en la hidrólisis son la temperatura, el tiempo de hidrólisis, el pH y como parámetro de control, el grado de hidrólisis (Lahl y Braun, 1994).

1.3.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS

La hidrólisis enzimática es un proceso muy eficiente, que además puede ser llevado a cabo en condiciones suaves de temperatura y pH, con lo que la calidad nutricional de los aminoácidos se mantiene prácticamente inalterada, ya que no tiene lugar la destrucción o modificación de ciertos restos aminoácidos, como ocurre en el caso de la hidrólisis química.

En la hidrólisis enzimática se evita la neutralización de los hidrolizados y, por lo tanto, el alto contenido en sales, que limitaría el uso de los hidrolizados en ciertas aplicaciones, como por ejemplo en alimentos dietéticos y preparados parenterales (Millán, 1998).

En la producción de hidrolizados destinada a la nutrición vegetal se emplean los métodos enzimáticos, porque bajo condiciones de hidrólisis muy agresivas, parte de los aminoácidos llegan a perderse como amoníaco o a sufrir un proceso de racemización (cambio de configuración levógira, preferentemente la utilizable por la planta, a configuración dextrógira), por ello se utiliza la hidrólisis enzimática a bajas temperaturas (Franco, 2004).

Cuando se realiza la hidrólisis controlada de proteínas, se obtiene un equilibrio entre aminoácidos en forma libre y péptidos (moléculas formadas por varios

aminoácidos), que activan la síntesis de fitohormonas y confieren un significativo papel como nutriente directo (Franco, 2004).

La hidrólisis proteica se realiza normalmente en un reactor, con control de agitación, pH, temperatura y tiempo del proceso. El sustrato se disuelve o resuspende en agua hasta que el pH y la temperatura se estabilizan (pH 5,0 – 9,0; temperaturas entre 40 - 60° C). A continuación, se agrega la proteasa, que da inicio a la hidrólisis. A medida que ésta progresa, se produce una disminución del pH debido a la rotura de los enlaces peptídicos. En la hidrólisis enzimática, el pH debe mantenerse en el óptimo de la enzima mediante un sistema tampón, en el cual el pH se fija en el valor adecuado (Benítez *et al.*, 2008).

Para finalizar la hidrólisis proteica, la enzima puede ser inactivada con calor, mediante una disminución del pH o con una combinación de ambos. También puede ser retirada del medio mediante filtración y finalmente precipitada (Benítez *et al.*, 2008).

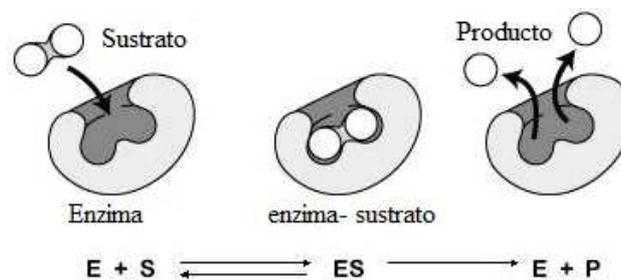
En relación con el grado de hidrólisis, que es el parámetro más utilizado para el control del proceso hidrolítico y va a determinar, en gran medida, las características nutricionales y funcionales de los hidrolizados proteicos, es una medida del alcance de la degradación hidrolítica de las proteínas y se define como la analogía que existe entre el número de enlaces peptídicos hidrolizados respecto al número de enlaces peptídicos hidrolizables. El grado de hidrólisis final está determinado por la concentración de sustrato, la relación enzima / sustrato, el tiempo de incubación y las condiciones fisicoquímicas, tales como el pH y la temperatura (Kinsella, 1976).

Otro factor que también va a determinar el grado de hidrólisis es la naturaleza de la enzima, caracterizada por su actividad específica y tipo de actividad. Así, la naturaleza de la enzima usada no sólo va a influir en el grado de hidrólisis, sino también en el tipo de péptidos producidos.

Los hidrolizados que se producen para uso en alimentación se pueden agrupar en hidrolizados con bajo grado de hidrólisis, entre el 1 % y el 10 %, para la mejora de las propiedades funcionales e hidrolizados extensivos, con grado de hidrólisis superior al 10 %, para su uso en alimentación especializada (Benítez *et al.*, 2008).

1.3.3 ENZIMAS

Las enzimas son macromoléculas con la capacidad de tratar otras moléculas, denominadas sustratos. Un sustrato es capaz de unirse al centro catalítico de la enzima que lo reconozca y transformarse en un producto, a lo largo de una serie de pasos denominados mecanismo enzimático, como se observa en la Figura 2. Algunas enzimas pueden unir varios sustratos diferentes y/o liberar diversos productos, como es el caso de las proteasas al romper una proteína en dos polipéptidos (Murray *et al.*, 2007).



González, 2010

Figura 2. Reacción enzimática

Debido a su naturaleza proteica, las enzimas son afectadas por la temperatura, los solventes, las sales, el pH, etc., que modifican la estructura química y provocan una pérdida de su actividad catalítica (Novozymes, 1999).

1.3.3.1 Proteasas

Actualmente, se encuentran disponibles muchas proteasas comerciales de grado-alimenticio. Estas proteasas pueden ser clasificadas por su origen (animal,

vegetal, bacteriano o fúngico), por su modo de acción catalítica (endo y exo actividad) y con base en la naturaleza de su sitio catalítico.

Las endoproteasas hidrolizan enlaces amídicos ubicados dentro de la cadena de la proteína. Las exoproteasas, por el contrario, eliminan aminoácidos terminales de las proteínas o péptidos. La naturaleza del centro catalítico de las proteasas difiere de acuerdo con los aminoácidos y otros ligandos que intervienen en la formación del complejo enzima-sustrato (Benítez *et al.*, 2008).

El centro activo contiene aminoácidos o cationes metálicos que promueven la catálisis. Se denominan serinproteasas, cisteinproteasas, aspartato proteasas, según intervengan directamente los aminoácidos serina, cisteína o ácido aspártico, en el mecanismo de acción catalítica. En las metalo-proteasas la actividad está promovida por un catión metálico, el más frecuente es el Zn^{2+} . Todas las serinproteasas tienen endo actividad. Contrariamente, las metalo-proteasas son sobre todo exo-proteasas (Adler-Nissen, 1993).

1.3.3.2 Flavourzima

La enzima flavourzima 1000 MG se produce por fermentación del *Aspergillus oryzae* y contiene actividad endoproteasa y exoproteasa. El peso molecular difiere de las proteasas presentes en este complejo enzimático. Es fácilmente soluble en agua. Tiene una actividad de 1000 LAPU / g, un pH óptimo de 7,0 y una temperatura óptima de 50° C (Novozymes, 1999).

1.3.3.3 Papaína

Es una endopeptidasa proveniente del látex de la papaya. La estabilidad y actividad de la papaína, en solución, cubre un amplio rango de condiciones: pH 4,0 a 10,0 y una temperatura óptima de 50 a 75° C. Posee una amplia especificidad, hidroliza tanto las proteínas como los pequeños péptidos (Fellows, 1994; Ward, 1983).

1.3.4 CINÉTICA ENZIMÁTICA

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas y los factores que afectan a la velocidad de las reacciones enzimáticas. Los factores importantes son la concentración de enzima, la concentración de sustrato, la concentración de producto, la fuerza iónica, el pH y la temperatura (González, 2010).

La velocidad inicial (v_0) se determina, en los primeros minutos de la reacción, al medir la disminución de la concentración del reactivo o el aumento en la concentración del producto (Lehninger, 1970).

Para estudiar la cinética enzimática, se mide el efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción, mientras la cantidad de enzima permanece constante. Si se representa v_0 frente a $[S]_0$ se obtiene una hipérbola, que simboliza gráficamente la ecuación de Michaelis-Menten, como se observa en la Figura 3.

A concentraciones relativamente bajas de sustrato, la velocidad inicial de reacción aumenta conforme se añade más sustrato, pero con concentraciones más altas de sustrato, el aumento en la velocidad es cada vez más lento hasta el punto en que la velocidad se hace constante sin importar cuánto sustrato esté presente. En este punto, la velocidad constante se define como la velocidad máxima o (V_{max}) (Lehninger, 1970).

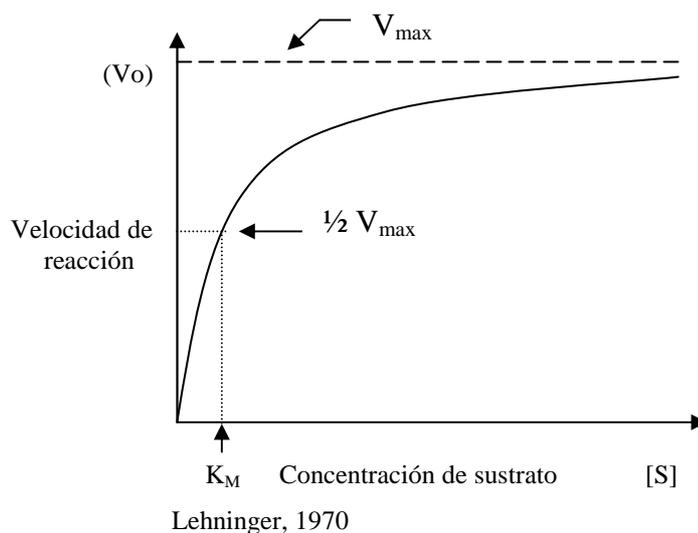


Figura 3. Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten

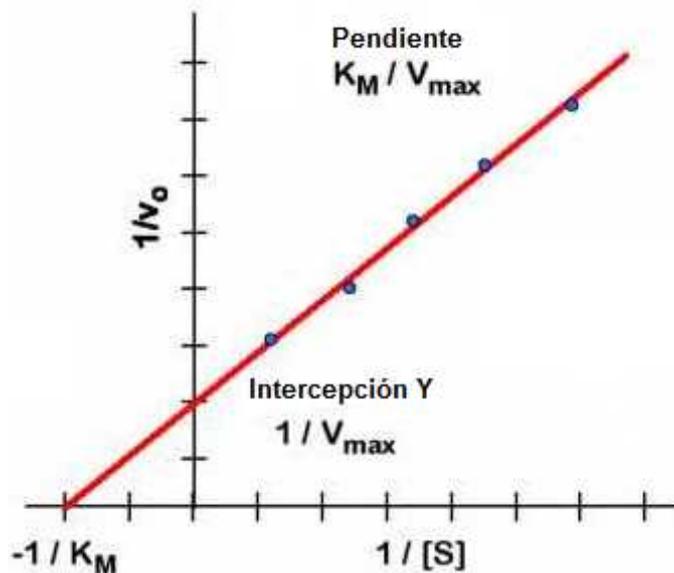
1.3.5 CÁLCULO DE LA K_M Y DE LA V_{max} DE UNA ENZIMA

Como se indicó, en la Figura 3, la representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten (v_0 frente a $[S]_0$) es una hipérbola. La V_{max} corresponde al valor máximo al que tiende la curva experimental y la K_M corresponde a la concentración de sustrato, a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la V_{max} (Lehninger, 1970).

Para determinar gráficamente los valores de K_M y V_{max} es más sencillo utilizar la representación doble recíproca ($1/v_0$ frente a $1/[S]_0$), que recibe el nombre de Lineweaver-Burk. Como se muestra en la Figura 4, es una recta en la cual:

- La pendiente es K_M/V_{max}
- La abscisa en el origen ($1/v_0 = 0$) es $-1/K_M$
- La ordenada en el origen ($1/[S]_0 = 0$) es $1/V_{max}$

A partir de los datos experimentales se pueden determinar, gráficamente, los valores de K_M y V_{max} de una enzima para diversos sustratos (Lehninger, 1970).



González, 2010

Figura 4. Representación de Lineweaver-Burk

1.3.6 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VELOCIDAD DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS

1.3.6.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Un aumento en la temperatura provoca un aumento de la velocidad de reacción hasta cierta temperatura óptima. Después comienza a prevalecer la inactivación de la enzima por un proceso de desnaturalización, al que son sensibles la mayor parte de ellas. Los incrementos de temperatura muy grandes afectan más rápidamente la inactivación de la enzima, que su poder como catalizador. Debido al balance de estos factores, cada enzima presenta una temperatura óptima en la que se efectúan las reacciones a una velocidad máxima (Ward, 1983; McCormack, 2007).

La mayoría de enzimas tienen su óptimo en el intervalo de 30 a 50° C, se inactivan a partir de 75° C. Algunas enzimas son más resistentes al calor. La papaína es más estable al calor que las proteasas microbianas (Hicks, 2001).

1.3.6.2 Efecto del pH sobre la actividad enzimática

El pH no afecta la actividad enzimática directamente, sino que modifica la concentración de protones en el medio donde se desarrolla la reacción enzimática. Los protones, además de alterar la estructura de la enzima y el sustrato, pueden participar también en la reacción como sustrato o producto. En esos casos, la concentración de protones afecta directamente la velocidad de la reacción.

Cualquier cambio brusco de pH puede alterar el carácter iónico, por ejemplo, de los grupos amino y carboxilo en la superficie proteica, así afecta las propiedades catalíticas de una enzima. A pH alto o bajo se puede producir la desnaturalización de la enzima y en consecuencia su inactivación (Mc Cormack, 2007).

1.3.6.3 Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de la reacción enzimática

En la mayoría de las cinéticas enzimáticas la concentración de enzima es mucho menor que la del sustrato, pues éste suele encontrarse en condiciones de saturación, por lo que el factor limitante de la reacción es la cantidad de enzima presente, que permite una determinación confiable de su actividad.

Así la velocidad de la reacción es directamente proporcional a la concentración de la enzima a cualquier concentración de sustrato. Por ejemplo, si la concentración de enzima es disminuida a la mitad, la velocidad inicial de la reacción es reducida también a la mitad (Díaz *et al.*, 1997).

1.3.6.4 Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad enzimática

La concentración de los diferentes iones presentes en la solución enzimática, influye sobre la estabilidad y la actividad enzimática. Así la interacción entre el solvente y el soluto no llega a generar la reacción (Díaz *et al.*, 1997).

1.3.7 APLICACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS

Una de las aplicaciones más importantes de los hidrolizados de proteínas es su utilización como fuente de nitrógeno, en la formulación de dietas enterales con destino a la alimentación infantil y / o de adultos enfermos (Benítez *et al.*, 2008).

Se estima que podría ser un suplemento importante a la dieta de sectores de la población de niveles de vida bajos; en este caso, podría formar parte de otros alimentos, como también ser consumido en forma directa (Acuña, 2001).

Los hidrolizados de proteína vegetal son muy utilizados como saborizantes, en guisos, salsas, sopas, carnes vegetales e industria cecinera. También se utiliza como materia prima en la elaboración de caldos desecados y para la producción de salsas de carne. Estas salsas de carne pueden reemplazar a la carne de vacuno en un 50 % (Acuña, 2001).

La utilización de aminoácidos, en sus formas libre y peptídica, como activadores de importantes fases del desarrollo, como reactivadores del crecimiento vegetativo ante accidentes fisiológicos o estrés abiótico, se considera cada vez de mayor interés en las prácticas de cultivo actuales (Franco, 2004).

Adicionalmente, los hidrolizados proteicos podrían ser utilizados como aditivo para raciones alimenticias de animales, principalmente los que contienen aminoácidos esenciales, que actualmente se importan, como la lisina y metionina (Acuña, 2001).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y reactivos utilizados en el proceso de obtención del hidrolizado enzimático de proteína de chocho a partir de harina integral fueron:

- Semilla de chocho (*Lupinus mutabilis*) adquirida en el mercado Mayorista de la ciudad de Quito.
- Enzimas de grado alimenticio: flavourzima de la casa Novo Industrias y papaína Fluka. Sus principales características se observan en el ANEXO VIII.
- Caseína de leche bovina, Merck, Darmstadt
- Albúmina de suero bovino (BSA), 98% de pureza, Sigma
- Hidróxido de sodio 1 N, Merck
- Ácido clorhídrico 2 N, Merck
- Tampón fosfato 0,1 M pH 7,0, Merck
- Ácido tricloroacético (TCA) al 5 %, Sigma
- Agua destilada
- Tubos de ensayo Kimax, de 10 mL
- Vasos de precipitación Kimax, 50, 500 y 1000 mL
- Barras agitadoras magnéticas
- Pipetas graduadas Kimax, de 10 mL
- Bureta volumétrica Kimax, de 25 mL
- Micropipetas Eppendorf

Los equipos utilizados en el desarrollo de obtención del hidrolizado enzimático de proteína de chocho a partir de harina integral fueron:

- Molino de sistema de clavos, marca Alpine, modelo 160UPZ, serie 3644.1
- Balanza electrónica Mettler de 2 kg de capacidad, sensibilidad 0,01 g, modelo PE 3600
- Agitador mecánico Eberbach Corporation
- Termómetro marca Matheson
- PH metro, marca Consort, modelo C383, Bélgica

- Cronómetro, Thomas Scientific, modelo 5500
- Calibrador pie de rey T&O, modelo 605-TL
- Centrífuga Damon/IEC Division, modelo HIT-SK
- Centrífuga Eppendorf, PROMSA AQ - CV - 010, modelo 5445D
- Baño termostático, Edelstahl Rost Frei
- Equipo de digestión y destilación micro Kjeldahl, Selecta, modelo 05-01510
- Espectrofotómetro UV – VIS, Shimadzu, modelo UV – 240
- Liofilizador Stokes, Freezer Dryer, Stokes, modelo 90-2001-8
- Cámara de Electroforesis, Fisher Biotech, FB500

2.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICO – QUÍMICA DE LA SEMILLA Y HARINA DE CHOCHO INTEGRAL

2.1.1 CARACTERIZACIÓN DE LA SEMILLA DE CHOCHO

2.1.1.1 Caracterización física

a) Peso de 100 granos

Se determinó el peso en gramos de dos muestras aleatorias de 100 granos de semilla de chocho y se realizó el promedio de los pesos obtenidos, de acuerdo con la metodología desarrollada por Orbea y Chérrez (1996).

b) Densidad y volumen de 100 granos

Se determinó con base en el principio de Arquímedes. Se midió la variación de volumen, al sumergir cada muestra de 100 granos de chocho en agua destilada, los dos resultados obtenidos se promediaron, de acuerdo con la metodología desarrollada por Orbea y Chérrez (1996).

c) Color, granos coloreados y deshidratados

De las dos muestras aleatorias de 100 granos de chocho se observó el color característico de la semilla, el número de granos coloreados y deshidratados. Los resultados encontrados se promediaron para expresar como porcentaje.

d) Dimensiones de la semilla

Se determinó la longitud, el diámetro y el espesor del grano con la ayuda de un calibrador. Los resultados obtenidos se promediaron, de acuerdo con la metodología desarrollada por Orbea y Chérrez (1996).

e) Partes de la semilla

El grano fue sometido a un pelado manual, se separó la cáscara, el cotiledón y el germen, partes que fueron pesadas en una balanza. Los resultados se promediaron, de acuerdo con la metodología desarrollada por Orbea y Chérrez (1996).

2.1.1.2 Caracterización química

Las semillas de chocho, previamente separadas de materiales extraños, clasificadas, seleccionadas y sometidas a limpieza con el uso de corriente de aire, se molieron y en la harina obtenida se determinó la composición química con las siguientes técnicas de la A.O.A.C. 2005:

- | | |
|----------------------------|--|
| a) <u>Proteína:</u> | A.O.A.C., 920.165, Kjeldahl method |
| b) <u>Extracto etéreo:</u> | A.O.A.C., 920.85, Direct method |
| c) <u>Cenizas:</u> | A.O.A.C., 941.12, Gravimetric method |
| d) <u>Humedad:</u> | A.O.A.C., 925.10, Air Oven method |
| e) <u>Fibra:</u> | A.O.A.C., 962.09, Ceramic Fiber Filter method |
| f) <u>Carbohidratos:</u> | Los carbohidratos totales o carbohidratos por diferencia se determinaron al restar de 100 la suma de los porcentajes de proteína bruta, cenizas, fibra y grasa, de acuerdo con el método propuesto por Hart y Fisher (1971). |

2.1.2 CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DE CHOCHO INTEGRAL

2.1.2.1 Caracterización física

El análisis granulométrico se determinó con 100 g de harina integral, según la norma INEN 517 (1980). Se utilizó una serie de tamices *U.S.A Standard Testing Sieve* (N° 20, 40, 50, 70, 80, 100) y un agitador mecánico de tamices *Portable Sieve Shaker Model RX - 24*, el tiempo de agitación fue de 20 min.

2.1.2.2 Caracterización química

La determinación de proteína, el extracto etéreo, carbohidratos, contenido de ceniza, humedad y fibra de la harina integral, se realizó con los métodos citados en el numeral 2.1.1.2.

2.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OBTENCIÓN DE AISLADO DE PROTEÍNA DE CHOCHO A PARTIR DE HARINA INTEGRAL

2.2.1 EXTRACCIÓN BÁSICA

La extracción de la proteína de chocho se efectuó en dos etapas. En la primera se prepararon tres suspensiones con una relación harina-agua (p / v) 1:7, 1:9, 1:11 y se ajustó el pH a 8,5; 9,5 y 10,5, con NaOH 1 N, respectivamente. Se agitaron durante 30 min, con un agitador mecánico. Se centrifugaron a $6439 \times g$, durante 10 min y se recuperó cada sobrenadante.

En la segunda etapa, cada residuo insoluble de la etapa anterior se resuspendió con agua, en una relación 1:5 (p / v). Se ajustó, respectivamente, el pH a 8,5; 9,5 y 10,5 con NaOH 1 N. Se agitaron durante 10 min. Se centrifugaron a $6439 \times g$, durante 10 min y se recuperaron los sobrenadantes. El material insoluble se desechó.

2.2.2 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 2 N. Se agitó durante 15 min, se centrifugó a $14489 \times g$, durante 10 min y se obtuvo una pasta proteica, que fue sometida a liofilización, en la cual se determinó la proteína total, según el método desarrollado por Rodríguez *et al.*, 1981. En la Figura 25, en el Anexo IX, se indica una fotografía del aislado proteico de chocho en polvo.

Las variables de control en el proceso de obtención del aislado fueron los porcentajes de rendimiento y extracción de proteína.

Con el fin de determinar las mejores condiciones de rendimiento del proceso, se ensayó el efecto de los siguientes factores: pH de la suspensión (8,5; 9,5 y 10,5) y relación sólido / líquido (1:7, 1:9 y 1:11), en un diseño factorial 3*3, con 2 repeticiones.

Para los factores e interacciones significativos se aplicó la prueba de Tukey al 5 %.

En la Figura 5 se presenta el esquema del proceso utilizado para la obtención del aislado de proteína de chocho.

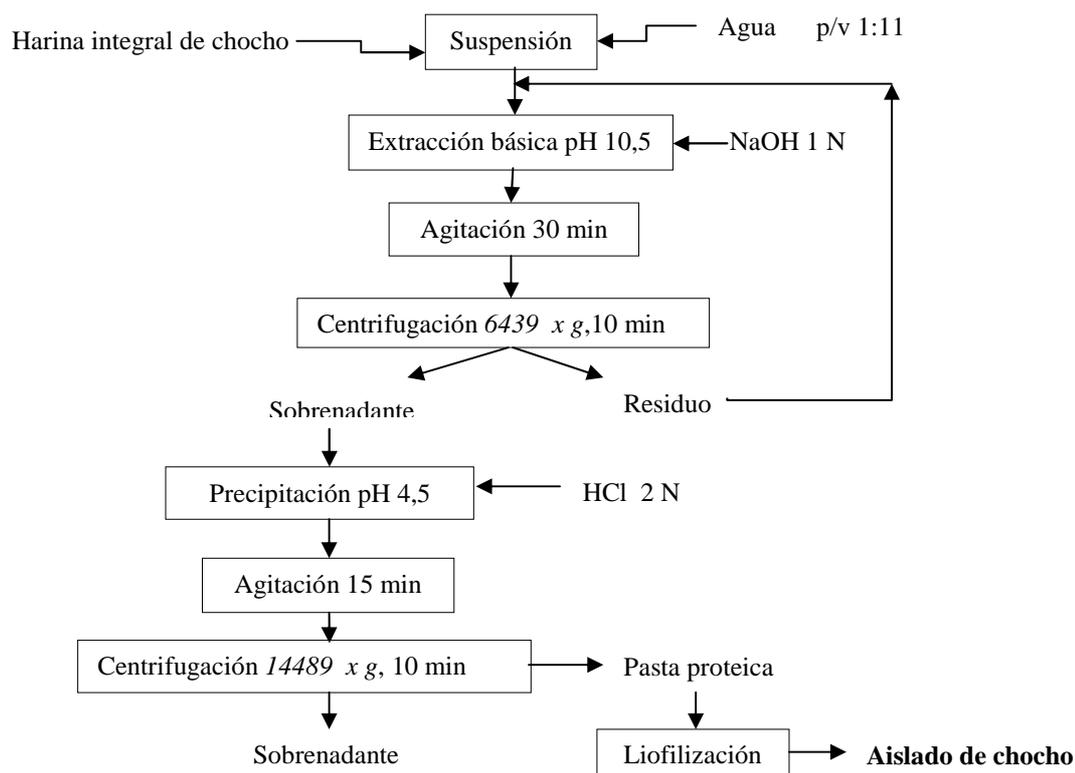


Figura 5. Diagrama representativo del proceso para la obtención del aislado de proteína de chocho.

2.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL AISLADO DE CHOCHO

2.3.1 ANÁLISIS PROXIMAL DEL AISLADO DE CHOCHO

La composición química proximal del aislado de chocho se determinó con los métodos citados en el numeral 2.1.1.2.

El índice de proteína dispersible se determinó por el método 46 – 24 de la A.A.C.C (American Association of Cereal Chemists), 1984.

2.3.2 SOLUBILIDAD

La solubilidad se determinó espectrofotométricamente mediante el método descrito por Cheftel *et al.*, 1989. El aislado de proteína se solubilizó a diferentes concentraciones (20, 40, 60, 90, 120 mg / mL) en una solución tampón fosfato

0,2 M pH 7,0. Las soluciones se agitaron por 10 min y se centrifugaron a $4528 \times g$, durante 10 min, en una centrífuga Eppendorf. Se tomó una alícuota de 600 μl de cada sobrenadante, se mezcló con 2400 μl de tampón en una celda de cuarzo y se cuantificó la cantidad de proteína soluble, mediante la densidad óptica a 280 nm. El blanco utilizado fue la solución tampón fosfato pH 7,0. En la Figura 26, en el Anexo IX, se calcula la solubilidad del aislado proteico de chocho al 9,0 % (90 mg / mL).

2.3.3 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE

Los pesos moleculares se determinaron por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (12,5%), de acuerdo con el método descrito por Weber y Osborn (1969). Se utilizó un juego de marcadores de pesos moleculares de marca Invitrogen, que consiste en una mezcla de 10 proteínas altamente purificadas y bien caracterizadas, con pesos moleculares entre 4 y 250 kDa. La separación se realizó con tampón de solución 3,0 M Tris-HCl (pH 8,8). Se preparó cada muestra a una concentración de proteína de 0,06 g / mL. Los pesos moleculares de las muestras se calcularon mediante la comparación de su movilidad electroforética con la de los marcadores de pesos moleculares, como lo muestran los datos presentados en la Tabla 27, en el ANEXO VI. La curva de calibración con base en las proteínas estándar, se presenta en la Figura 23, dentro del ANEXO VI.

En las Figuras 30, 31, 32 y 33, en el Anexo IX, se encuentran fotografías relacionadas con el procedimiento de electroforesis aplicado a las muestras de aislado e hidrolizado proteico de chocho.

2.3.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ALCALOIDES EN EL AISLADO DE CHOCHO

La concentración de alcaloides se determinó según el método cualitativo del test de Dragendorff (1978), que consiste en la identificación de la intensidad de coloración naranja: leve (+), moderada (++), elevada (+++), del reactivo de

Dragendorff al reaccionar con alcaloides quinolizidínicos (alto contenido de esparteína, lupanina y otros). Las tiras de papel filtro se humedecieron con el reactivo y se aplicó la solución acuosa con el posible alcaloide.

La cuantificación de alcaloides se realizó según el método modificado de Von Baer *et al.*, (1979). Los alcaloides se transformaron en sus bases. El material resultante se secó con óxido básico de aluminio. La extracción se realizó con cloroformo y su titulación, con hidróxido de sodio, con rojo de metilo como indicador. El contenido se expresó como porcentaje de lupanina.

2.4. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ELABORACIÓN DE HIDROLIZADOS POR VÍA ENZIMÁTICA, A PARTIR DE AISLADO DE CHOCHO

2.4.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

2.4.1.1 Determinación de la actividad enzimática de papaína

Para determinar la actividad proteolítica de la papaína, se midió la actividad caseinolítica, mediante la hidrólisis enzimática de la caseína, determinada a través de la densidad óptica, a una longitud de onda de 280 nm, de acuerdo con el método de Anson, modificado por Félix (2008).

La caseína fue disuelta en tampón fosfato 0,05 M pH 7,0 a una concentración de 10 mg / mL. Con la papaína se preparó una solución de 5 mg / mL de tampón a pH 7,0, de acuerdo con las condiciones óptimas de la enzima (Fellows, 1994; Ward, 1983).

Se incubaron 100 μ l de solución enzimática, con 1100 μ l de caseína al 1 %, a 37 ° C, por 20 min, en un baño termostatzado. La reacción se detuvo con 1800 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 5 %, se centrifugó a 5590 x g, durante 10 min en una centrifuga Eppendorf. Del sobrenadante se realizó la lectura a 280 nm en el

espectrofotómetro UV-VIS. Para la medición del blanco se mezcló de forma consecutiva los 100 µl de solución de enzima, 1800 µl de TCA y los 1100 µl de caseína, después de seguir con el mismo proceso se midió la absorbancia a 280 nm.

2.4.1.2 Determinación de la actividad enzimática de flavourzima

La actividad enzimática de la flavourzima se determinó como la actividad caseinolítica, al igual que la papaína. Para hacerlo, la flavourzima se diluyó 1:1000, en el mismo tampón fosfato pH 7,0, de acuerdo con las condiciones óptimas de la enzima (Novozymes, 1999).

Se mezclaron 100 µl de solución enzimática, con 1100 µl de caseína al 1 % y se incubó la mezcla a 37° C, por 20 min. La reacción se detuvo con 1800 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 5 %, se centrifugó a 5590 x g, durante 10 min. Se realizó la lectura del sobrenadante a 280 nm en el espectrofotómetro UV-VIS. Para la medición del blanco se preparó de forma sucesiva los 100 µl de solución de enzima, 1800 µl de TCA y los 1100 µl de caseína, después de seguir con el mismo proceso se midió la absorbancia a 280 nm.

La actividad enzimática se calculó en la ecuación utilizada por Félix (2008) [1]:

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

donde:

AE : actividad enzimática (U / mL)

h : promedio de las lecturas de densidad óptica a 280 nm obtenidas para cada ensayo realizado en paralelo

La unidad de actividad enzimática (U) es la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 µmol de sustrato por min, a las condiciones de reacción establecidas.

2.4.2 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE REACCIÓN

Se prepararon suspensiones de aislado al 5 %, para cada enzima, en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0 y la temperatura a 50° C. Se utilizó una concentración de enzima de 0,4 UA / g sustrato y 50 LAPU / g sustrato para la papaína y flavourzima, respectivamente, de acuerdo con la metodología desarrollada por Villacrés (2001).

Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de reacción 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 60 min para la papaína y 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 min para la flavourzima. El contenido de proteína soluble en TCA de las muestras extraídas durante la hidrólisis de cada enzima, se realizó mediante la determinación espectrofotométrica de la absorción de luz ultravioleta a la longitud de onda de 280 nm (Chang, 1998). Los valores de proteína soluble se obtuvieron al reemplazar las lecturas de absorbancia de las muestras en la ecuación de la curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA), que se encuentra en función de su concentración y sus valores de absorbancia. En la Tabla 28 y en la Figura 24, en el ANEXO VII, se observa los datos y el gráfico con la ecuación de la curva de calibración antes mencionada.

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

2.4.3 DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE SUSTRATO Y ENZIMA

Para la determinación de la concentración de sustrato, se mantuvo constante la concentración de enzima, 0,04 UA / mL solución tampón para la papaína y 5 LAPU / mL solución tampón para la flavourzima, de acuerdo con la metodología desarrollada por Villacrés (2001). Se prepararon suspensiones de aislado proteico a concentraciones de 1,0; 2,5; 4,0; 6,0; 9,0; 12,0 y 16,0 % para la papaína y flavourzima. Para cada concentración de aislado proteico, se determinó la

pendiente de la curva proteína soluble en función del tiempo, que a su vez constituyó la velocidad inicial a los 30 min de reacción (Villacrés, 2001).

Para la determinación de la constante de Michaelis-Menten (K_M), se siguió el método de Lineweaver-Burk. Se calcularon los recíprocos de la velocidad y de la concentración de sustrato. Se graficaron estos valores. A partir del intercepto de la línea recta obtenida con el eje $1/[S]$ se determinó K_M (Cheftel *et al.*, 1989).

Se determinó la concentración de sustrato mediante los datos del análisis de solubilidad del aislado de chocho, obtenidos como se describe en el apartado 2.3.2. Se consideró como más adecuada, aquella concentración que permite obtener una suspensión sustrato / tampón fluida, para que facilite el proceso hidrolítico.

Para la determinación de la concentración de cada enzima, se mantuvo constante la concentración de sustrato a 9 % (90 mg / mL). La hidrólisis se realizó a pH 7,0 y la temperatura a 50° C para las dos enzimas. Se probaron por separado las concentraciones de papaína de 0,01; 0,04; 0,06; 0,09 UA / mL y flavourzima 4, 10, 30, 50 LAPU / mL. Durante el transcurso de la hidrólisis, se extrajeron 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 120 min para la flavourzima. Se determinó el contenido de proteína soluble en TCA, mediante el método de Chang (1998), que se describió en el apartado 2.4.2.

Para cada concentración de enzima, se calculó y se graficó la concentración de producto (proteína soluble) en función del tiempo. A partir de este gráfico, se determinó la pendiente de la porción lineal, la cual constituyó la velocidad inicial de reacción para cada concentración de enzima en estudio. Del gráfico de velocidad en función de la concentración de enzima, se seleccionó como más adecuada, aquella concentración de enzima que permitió obtener en el segmento lineal de la curva, la mayor pendiente.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente, se empleó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con dos repeticiones, en el cual los tratamientos fueron las diferentes concentraciones de enzima y la variable fue la velocidad de reacción para cada uno de los casos. Los tratamientos significativos se analizaron mediante, la prueba de significación Tukey al 5 %.

2.4.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis del aislado proteico de chocho se llevó a cabo en un reactor de un litro, termostatzado a 50° C con agitación, 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 tampón fosfato 0,1 M pH 7,0. La reacción enzimática inició tras la adición de las enzimas, a una concentración de 0,06 UA / mL de solución tampón para la papaína y de 50 LAPU / mL de solución tampón para la flavourzima.

Se añadió, primero, papaína la cual hidrolizó a la proteína del aislado por 10 min, luego se añadió flavourzima y actuó por 30 min. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de reacción (0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 y 40 min) durante el avance de la hidrólisis y se cuantificó el contenido de proteína soluble en TCA.

Finalmente, se calentó la mezcla de reacción a 90° C para inactivar las enzimas. Se liofilizó el hidrolizado obtenido, según el método de Cheftel *et al.*, (1989).

En la Figura 6 se presenta el esquema del proceso utilizado para la obtención del hidrolizado proteico de chocho.

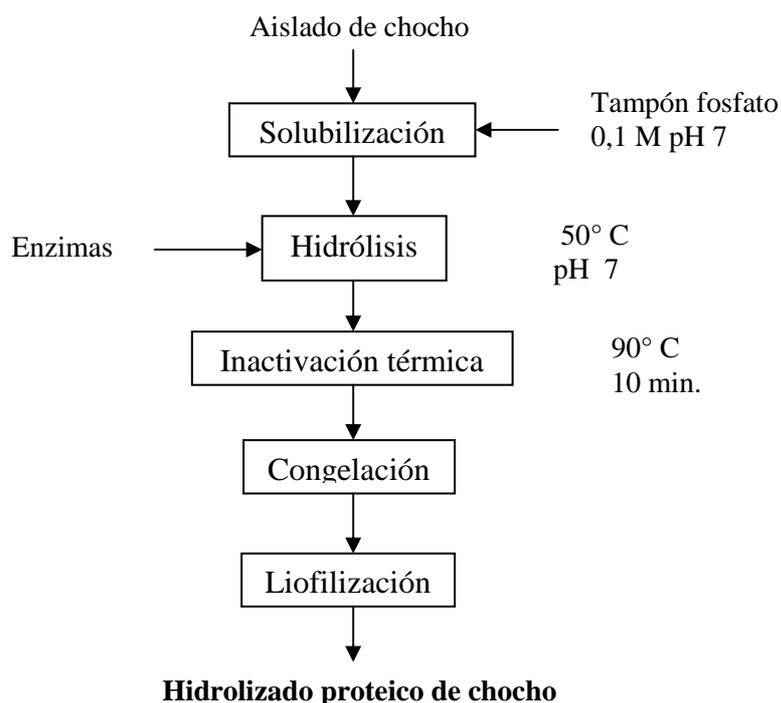


Figura 6. Diagrama representativo del proceso para la obtención del hidrolizado proteico de chocho

2.5. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL HIDROLIZADO PROTEICO DE CHOCHO

Los pesos moleculares del hidrolizado de chocho se determinaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, de acuerdo con la metodología indicada en el apartado 2.3.3.

La concentración de alcaloides se determinó como se señaló en el apartado 2.3.4.

2.5.1 GRADO DE HIDRÓLISIS

El grado de hidrólisis se determinó mediante el método descrito por Kim *et al.*, (1990), a partir de la proteína soluble de las muestras hidrolizadas y tratadas con ácido tricloroacético al 10 %. Se tomaron alícuotas de 0,5 mL de proteína hidrolizada y se añadieron 0,5 mL de TCA. La mezcla se agitó durante 10 min y

se centrifugó a $9447 \times g$, durante 15 min. La proteína soluble en el sobrenadante se determinó espectrofotométricamente a 280 nm. El grado de hidrólisis se calculó en la ecuación utilizada por Kim *et al.*, (1990) [2]:

$$\text{Grado de hidrólisis (\%)} = \frac{\text{proteína soluble en TCA (10\%)}}{\text{Proteína total}} \times 100 \quad [2]$$

Para la determinación de la proteína total se realizó la hidrólisis ácida a fin de que la proteína se hidrolice completamente en sus aminoácidos constituyentes. Se mezclaron 50 mg de aislado de chocho con 2 mL de HCl 6 N en ampollitas, se cerraron herméticamente y fueron calentadas a 110°C , por 2 días, en la estufa Memmert, según el procedimiento de Wilchek y Miron (2003).

Las muestras hidrolizadas fueron filtradas y centrifugadas a $4528 \times g$, durante 10 min. En el sobrenadante obtenido se determinó el contenido de proteína total espectrofotométricamente a 280 nm.

2.5.2 COMPOSICIÓN AMINOACÍDICA

Para determinar el contenido de aminoácidos se utilizó el método expuesto en la norma AOAC (1970), la muestra de 100 g de hidrolizado de chocho, fue analizada en un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) marca *Shimadzu*, modelo *LC-10^a*, en el laboratorio del Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos del Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

La muestra fue hidrolizada con HCl 6N por 22 horas a 110°C . El ácido fue evaporado en un rotavapor *BUCHI*, *RE 111* y el residuo seco fue disuelto con tampón citrato a pH 2.2 e inyectados en el HPLC. El OPA (orto-ftaldehido) fue usado como reactivo derivatizante. Este reactivo en presencia de un grupo tiol (SH), reacciona con los grupos amino primario ($-\text{NH}_2$) y origina un compuesto altamente fluorescente, el cual fue detectado selectivamente por un detector de fluorescencia. RF-10. La longitud de onda de excitación fue de 350 nm y la de emisión 450 nm (Manual Shimadzu, 1993).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LA SEMILLA DE CHOCHO

En la Tabla 6, se presentan los resultados obtenidos de las propiedades físicas del grano de chocho. Se observan las dimensiones de la semilla en mm, el peso de sus partes, cáscara, germen y cotiledón en g / 100 g. Conjuntamente se muestra el promedio de los parámetros: peso, volumen, densidad, granos bicolorados y deshidratados.

Tabla 6. Caracterización física del chocho
(*Lupinus mutabilis*)

Parámetro	Promedio*
Peso de 100 granos (g)	25,74
Volumen de 100 granos (mL)	22,50
Densidad (g / mL)	1,15
Granos bicolorados (%)	2,50
Granos deshidratados (%)	3,00
Dimensiones (mm)	
Longitud (eje mayor)	9,37
Diámetro (eje menor)	7,58
Espesor	5,29
Partes de la semilla (g / 100 g)	
Cáscara	10,74
Germen	4,61
Cotiledón	84,66

*Datos promedio de dos determinaciones

La semilla de chocho posee un color blanco opaco y una forma ovoide con longitudes variables en las tres dimensiones. El diámetro promedio es 7,58 mm. Este tamaño de la semilla se considera intermedio si se compara con el tamaño de otras semillas leguminosas como fréjol y arveja que tienen un diámetro de 10,2 y 6,6 mm, respectivamente. La semilla de lupino posee un 17 % más de diámetro en comparación con la semilla de soya (6,3 mm). El tamaño del chocho frente a otras semillas como la arveja y la soya, es un indicador de la mayor capacidad de nutrientes que puede almacenar (Ortega, 2010).

La forma de cada cotiledón es de casquete y es la parte de la semilla más representativa, equivalente a 84,66 % del peso total. Es de color amarillo oscuro debido al contenido de grasas y carotenoides (Ortega, 2010). El 10,74 % de la semilla está compuesta por un tegumento blanco de textura plástica y resistente. Se estima que su espesor es de 0,20 mm, no obstante varía de acuerdo con la zona cubierta (Ortega, 2010).

El volumen promedio de 100 granos es de 22,50 mL que corresponde a 0,225 mL / semilla y el peso promedio es de 25,74 g, valor que se encuentra entre 20,0 y 28,0 g, dentro de los rangos determinados en 100 semillas, según la FAO (1992).

Los porcentajes de granos bicoloreados 2,5 % y deshidratados 3 % son indicadores de uso de semilla no seleccionada, debido a que en nuestro medio no se ha desarrollado la industria de la semilla, sin embargo, particularmente en el chocho, es posible obtener buena calidad de semilla de los campos, si se selecciona después de la trilla por tamaño, sanidad, madurez, pureza y vigor (Caicedo y Peralta, 2000).

3.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DE LA HARINA CRUDA

3.2.1 GRANULOMETRÍA

En la Tabla 7, se presenta el perfil granulométrico de la harina integral de chocho. Se determinó que el 90,43 % de la harina tiene un tamaño de partícula menor a 850 μm y el 9,57 % restante, un tamaño de partícula mayor a 850 μm . El 89,83 % de la harina integral quedó retenida en el tamiz N° 40, que corresponde a 425 μm , lo que indica que este tipo de molienda da como resultado una harina gruesa, debido a que, las harinas con partículas de tamaño entre 212 y 425 μm , son consideradas harinas gruesas (Fernández *et al.*, 2008). El tamaño promedio de las partículas de la harina integral se encuentra entre el tamiz N°20 (850 μm) y 40

(425 μm), resultado no esperado, al comparar con los resultados reportados en el análisis granulométrico de la harina cruda de chocho utilizada por Mosquera (1999) en el que señala un tamaño promedio de partícula entre 2000 y 850 μm .

Tabla 7. Perfil granulométrico de la harina integral de chocho

No. Tamiz	Abertura Tamiz (μm)	% Retenido	% Retenido Acumulado	% Pasante acumulado
Tapa		0,11	0,11	99,89
20	850	9,46	9,57	90,43
40	425	80,26	89,83	10,17
50	300	5,23	95,06	4,94
70	212	0,91	95,97	4,03
80	180	0,81	96,78	3,22
100	150	1,23	98,01	1,99
Fondo		1,99	100,00	-

Datos promedio de tres determinaciones

3.2.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA

En la Tabla 8, se presentan los resultados de la composición química proximal, encontrados en la materia prima.

Tabla 8. Composición química proximal de la harina integral de chocho (%)

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

En base húmeda

* Se incluye en los carbohidratos totales

Se encontró un alto contenido de nutrientes en la harina integral de chocho, en la que se destaca el de proteína, grasa y carbohidratos. El valor proteico de la harina integral de chocho es superior al de otras materias primas comúnmente utilizadas

en la industria alimentaria, como la soya que tiene valores aproximados de 40% (Ortega, 2010).

El valor de proteína de 46,59 % es inferior a los reportados en la literatura. Se citan contenidos de 51,00 % de proteína en semillas de chocho (FAO, 1992).

De igual manera, la grasa y los carbohidratos presentaron valores de 16,56 % y 25,11 %, respectivamente. Desde el punto de vista nutritivo estos resultados confirman que el chocho es una leguminosa de alto potencial energético.

La fibra cruda representa el 9,0 % en la harina integral de chocho, está contenida principalmente en el tegumento, que representa el 10,74 % de la semilla, esto demuestra que el tegumento tiene un alto contenido de fibra (Ortega, 2010).

3.3 OBTENCIÓN DE AISLADO DE PROTEÍNA DE CHOCHO A PARTIR DE HARINA INTEGRAL

3.3.1 RENDIMIENTO DEL PROCESO

En la Tabla 9, se presentan los resultados obtenidos de la prueba de Tukey para el rendimiento del aislado de las interacciones pH de la solución vs relación sólido / líquido (g harina / mL agua).

Tabla 9. Prueba de Tukey para el rendimiento (%) del aislado en la interacción pH de la solución vs relación sólido / líquido (g harina / mL agua)

Interacción		Medias	Desviación estándar	Rango				
pH	Relación			A	B	C	D	E
10,5	1/11	42,74	± 0,21	A				
9,5	1/11	39,76	± 0,43		B			
9,5	1/9	37,77	± 0,32			C		
8,5	1/11	37,60	± 0,22			C		
10,5	1/9	37,05	± 0,40			C		
8,5	1/9	37,03	± 0,21			C		
10,5	1/7	36,40	± 0,08			C	D	
9,5	1/7	35,30	± 0,77				D	E
8,5	1/7	34,45	± 0,29					E

A,B,C,D,E: letras que indican diferencias significativas (Tukey 5 %), n: 2

El análisis de varianza, muestra que existe diferencia significativa en el rendimiento del aislado de chocho, a los diferentes valores de pH y relaciones sólido / líquido analizados. Con la prueba de significación Tukey al 5 %, se comprobó que el pH de la suspensión de 10,5 y la relación sólido / líquido de 1/11 permitieron alcanzar el mayor rendimiento del aislado (42,74 % en peso). Los datos experimentales obtenidos en el análisis de varianza para el rendimiento del aislado, se presentan en la Tabla 13, en el Anexo I.

En la Tabla 10, se presentan los resultados obtenidos de la prueba de Tukey para el contenido de proteína de las interacciones pH de la solución vs relación sólido / líquido (g harina / mL agua).

Tabla 10. Prueba de Tukey para el contenido de proteína (%) del aislado en la interacción pH de la solución vs relación sólido / líquido (g harina / mL agua)

Interacción		Medias	Desviación estándar	Rango			
pH	Relación			A	B	C	D
8,5	1/11	83,34	± 0,82	A			
8,5	1/9	82,69	± 0,62	A	B		
8,5	1/7	81,37	± 0,01	A	B	C	
9,5	1/9	80,72	± 0,93	A	B	C	
9,5	1/11	78,53	± 0,89	A	B	C	
9,5	1/7	78,09	± 0,93	A	B	C	
10,5	1/7	76,78	± 0,95		B	C	
10,5	1/9	75,91	± 0,93			C	
10,5	1/11	62,79	± 0,01				D

A,B,C,D : letras que indican diferencias significativas (Tukey 5 %), n: 2

El análisis de varianza muestra que existe diferencia significativa en el contenido de proteína del aislado de chocho, a los diferentes valores de pH analizados y relaciones sólido / líquido.

La prueba de significación Tukey al 5 % determinó que a un pH de 8,5 y una relación sólido / líquido de 1/11 se obtuvo el mayor porcentaje de contenido proteico (83,34 %). Los datos experimentales obtenidos en el análisis de varianza para el contenido de proteína del aislado, se presentan en la Tabla 15, en el Anexo II.

Con el análisis de varianza de la Tabla 13 en los anexo I, se determinó que el pH analizado como factor independiente, no resultó ser influyente en el rendimiento de extracción, sin embargo la relación sólido / líquido, resultó significativo, porque a medida que aumenta la relación sólido / líquido en la solución, el rendimiento en peso del aislado también se incrementa.

Con el análisis de varianza de la Tabla 15 en el anexo II, se comprobó que el contenido de proteína del aislado, resultó significativo para el pH de la solución, y la relación sólido / líquido como factor independiente no influyó, porque al disminuir el pH de 10,5 a 8,5, el contenido de proteína aumenta.

El máximo rendimiento y contenido de proteína, debería alcanzarse a pH 10,0 ya que a estas condiciones la proteína es más soluble. Sin embargo en condiciones muy alcalinas, probablemente ocurre una ligera hidrólisis y la consecuente pérdida de proteína en el aislado, obteniéndose una menor concentración del nutriente a este pH (Valdemiro y Galeazzi, 1978).

A partir de la prueba de significación Tukey al 5 %, se estableció que el material apropiado para la hidrólisis constituye el aislado que presenta mayor rendimiento en peso, debido a que, las proteínas aisladas a más de su calidad nutricional y funcional que poseen, son una alternativa de las proteínas tradicionales utilizadas en nutrición humana, animal y vegetal. Además los aislados proteicos junto con los hidrolizados representan un producto intermedio con un mercado estable y que la demanda global será creciente en la medida que incrementen las condiciones de vida de la población y surjan nuevas formas de industrialización, así el rendimiento de extracción del aislado también es una alternativa económica e influye desde el punto de vista financiero (The Solae Company, 2003; Acuña, 2001).

Los datos experimentales de la prueba de Tukey del rendimiento en peso del aislado proteico de chocho y porcentaje de proteína a los diferentes niveles de los factores utilizados se presentan en las Tablas 14 y 16, en el ANEXO I y II.

3.3.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA

En la Tabla 11, se presentan los resultados de la composición química proximal, determinados en el aislado proteico de chocho.

Tabla 11. Composición química proximal del aislado de chocho (%)

Determinación	Aislado de chocho
Humedad	3,37
Extracto etéreo	17,31
Carbohidratos totales	14,22
Fibra cruda *	2,37
Ceniza	2,32
Proteína total	62,78

En base húmeda

* Se incluye en los carbohidratos totales

De los valores indicados se destaca la proteína con un 62,78 % y la grasa con 17,31 %, con un incremento en 16,19 % y 0,75 %, respectivamente, con relación al contenido en la harina integral. Esto es debido a la disminución de carbohidratos solubles e insoluble (Cheftel *et al.*, 1989).

Las cantidades de carbohidratos, de fibra y de ceniza son valores que se vieron afectados en una disminución en su cantidad en comparación con la harina integral. Esto se debe a que para la obtención del aislado se realizó tratamientos de extracción básica, precipitación ácida y lavados que se dan durante el proceso. Los datos de la disminución de carbohidratos, de ceniza y de fibra se presentan en la Figura 22 en el Anexo III.

El índice de proteína dispersible del aislado fue de 97,56 %, resultado similar a lo reportado por Mosquera (1999). Esto demuestra, que durante el tratamiento de extracción no se produjo desnaturalización proteica, debido a que los tratamientos más suaves, como los que se utilizan para la extracción o purificación de las proteínas, pueden provocar cierto grado de desnaturalización y de insolubilidad, por lo que la determinación de esta propiedad es importante para los procesos posteriores (Villacrés, 2001).

3.3.3 SOLUBILIDAD

La solubilidad del aislado de proteína de chocho a pH 7,0, obtenida por medio de la lectura de la densidad óptica a 280 nm, mostró que a partir de la concentración de 90 mg / mL, la densidad óptica disminuye, como se muestra en la Figura 7. Este resultado se debería a que la suspensión se satura, razón por la cual se tomó esta concentración de trabajo para las pruebas de hidrólisis.

Los resultados de la absorbancia a las diferentes concentraciones de aislado se presentan en la Tabla 17, dentro del ANEXO III.

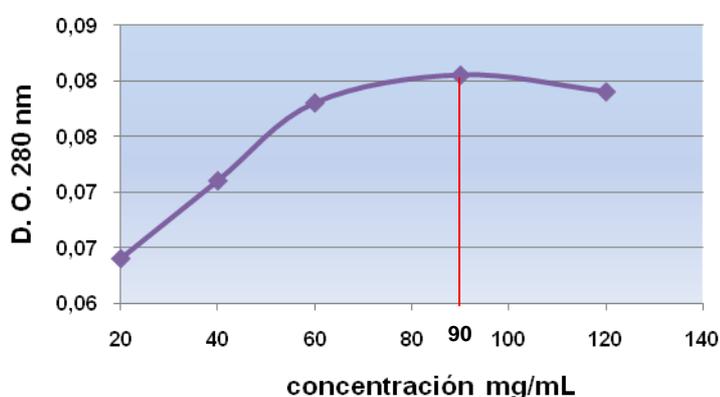


Figura 7. Solubilidad del aislado de proteína de chocho a pH 7,0

3.3.4 DETERMINACIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES DEL AISLADO DE CHOCHO

El análisis electroforético de las proteínas del aislado de chocho mostró la presencia de 5 bandas proteicas predominantes, con pesos moleculares aparentes de 93,30; 63,90; 56,64; 49,99 y 41,46 kDa, como se muestra en el carril 2 de la Figura 8.

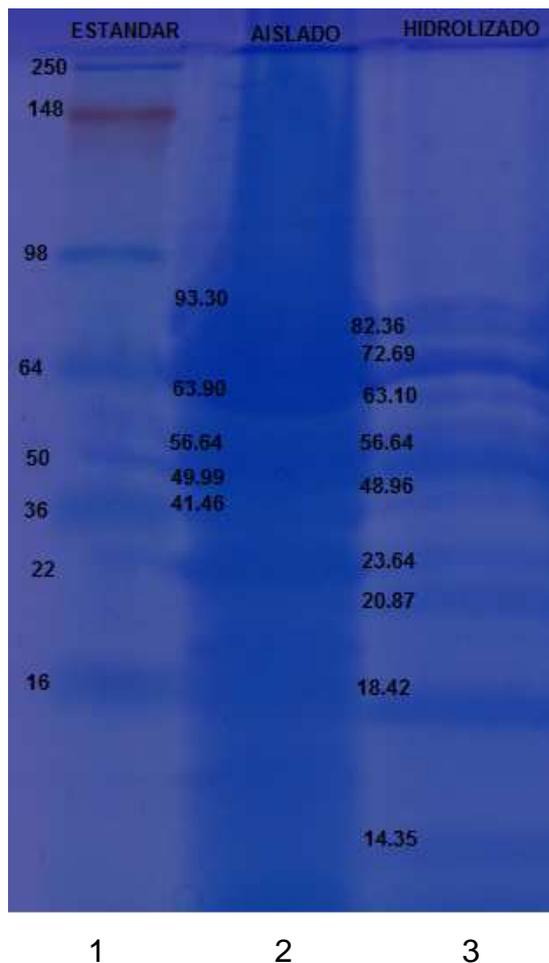


Figura 8. Análisis electroforético en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (12,5%). Las muestras se disponen de la siguiente forma: marcadores de peso molecular (1), aislado de chocho (2) e hidrolizado proteico de chocho (3).

3.3.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ALCALOIDES

La determinación cualitativa realizada en el aislado mostró que la presencia de alcaloides fue moderada (++) . Cuantitativamente, los alcaloides representan el 1,36 %. La pérdida de alcaloides que presenta el aislado, respecto a la harina con 3,96 %, se debe a los tratamientos básico, ácido y lavados que se aplicaron durante el proceso de extracción de la proteína.

Esto se explica a que en su estado natural los alcaloides se encuentran en forma de sales, solubles en soluciones de ácidos en agua o hidroalcohólicas. Puesto que el agua es el mejor extractante de los alcaloides del chocho, provocó una

expansión de la pared celular de las fracciones de harina y produjo la extracción de los alcaloides (Villacrés *et al.*, 2007).

3.4 OBTENCIÓN DEL HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE CHOCHO

3.4.1 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PAPAÍNA Y FLAVOURZIMA

La actividad enzimática de la papaína y flavourzima fue determinada para verificar que las enzimas presentan actividad proteolítica, expresada como actividad caseinolítica.

El promedio de dos determinaciones de absorbancia a 280 nm, obtenidas en el ensayo, permitió establecer la actividad enzimática de 0,6 U / mL para la solución de papaína al 0,5 % (p / v).

Para la flavourzima, que se presenta en estado líquido, se realizó una dilución 1:1000, para determinar la lectura apropiada, los promedios de la absorbancia a 280 nm, permitieron obtener la actividad enzimática de 9,4 U / mL para la solución de enzima al 0,10 % (p / v).

Las dos enzimas muestran actividad proteolítica, sin embargo la actividad enzimática de la papaína es menor a la de la flavourzima.

3.4.2 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE REACCIÓN

A partir de suspensiones de aislado proteico al 5 % (p / v) y con una carga enzimática de 0,4 UA / g de sustrato para la papaína y 50 LAPU / g sustrato para la flavourzima, se realizó la cinética de hidrólisis para cada enzima, como se observa en la Figura 9 y Figura 10.

Para tiempos de reacción mayores, a 10 min para la papaína y 30 min para la flavourzima, la velocidad máxima, determinada por las pendientes de las curvas, disminuye. Razón por la cual se determino para la elaboración del hidrolizado, tiempos de reacción de 10 min y 30 min respectivamente, durante los cuales se obtiene la máxima velocidad de reacción.

Los resultados de la cinética de hidrólisis para la determinación del tiempo de reacción del aislado proteico con las dos enzimas se presentan en la Tabla 18 y Tabla 19 en el ANEXO IV.

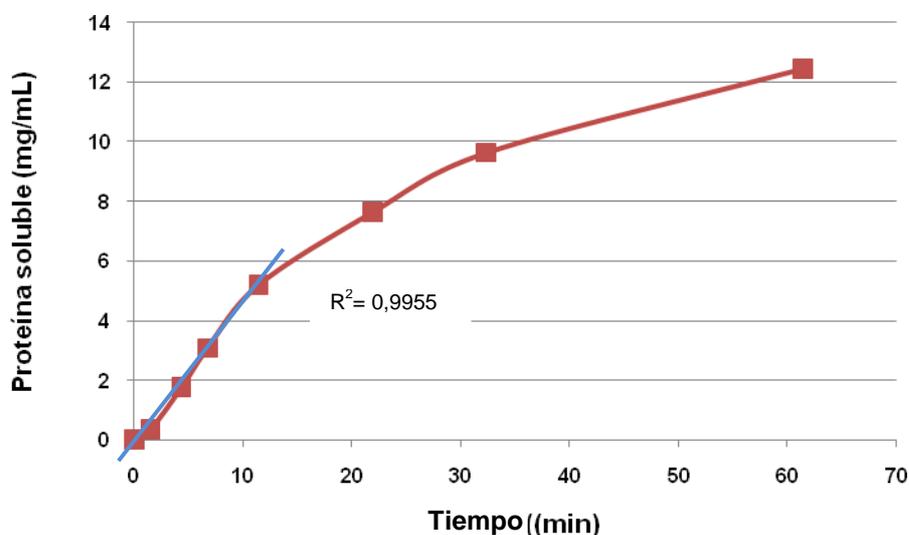


Figura 9. Tiempo de reacción para la papaína

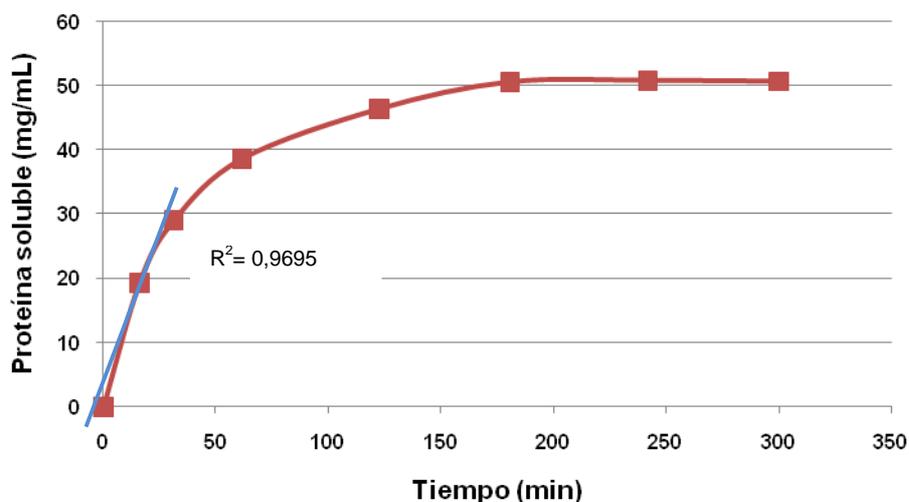


Figura 10. Tiempo de reacción para la flavourzima

3.4.3 CONCENTRACIONES DE SUSTRATO Y ENZIMA

3.4.3.1 Concentración de sustrato

En la Figura 11 se observa el gráfico de Michaelis-Menten del efecto de la concentración del sustrato (aislado de chocho) sobre la velocidad de reacción catalizada por la papaína y en la Figura 12 la regresión de Lineweaver-Burk, método por el cual se determinó el valor de la constante de equilibrio de la disociación (K_M), conocida generalmente como la constante de Michaelis Menten y el valor de V_{max} de la reacción enzimática.

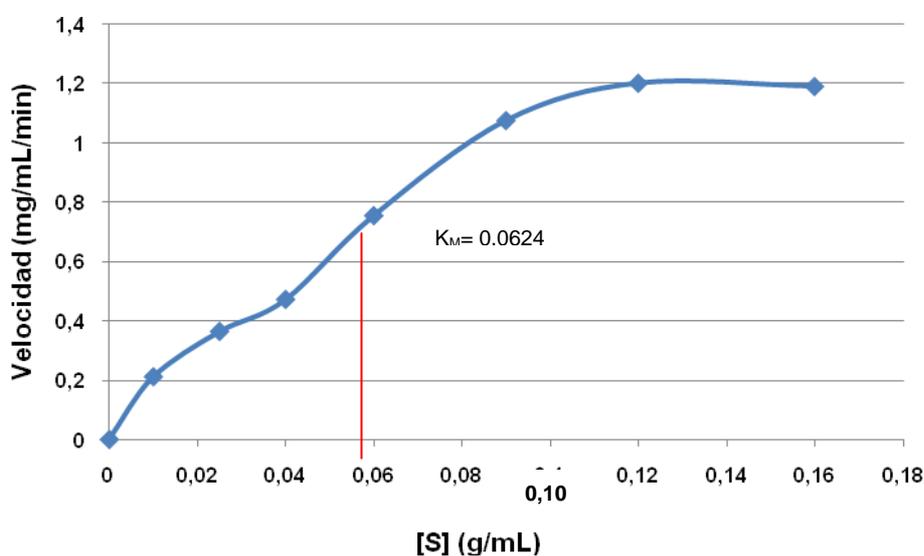


Figura 11. Curva de Michaelis y Menten para la hidrólisis con papaína

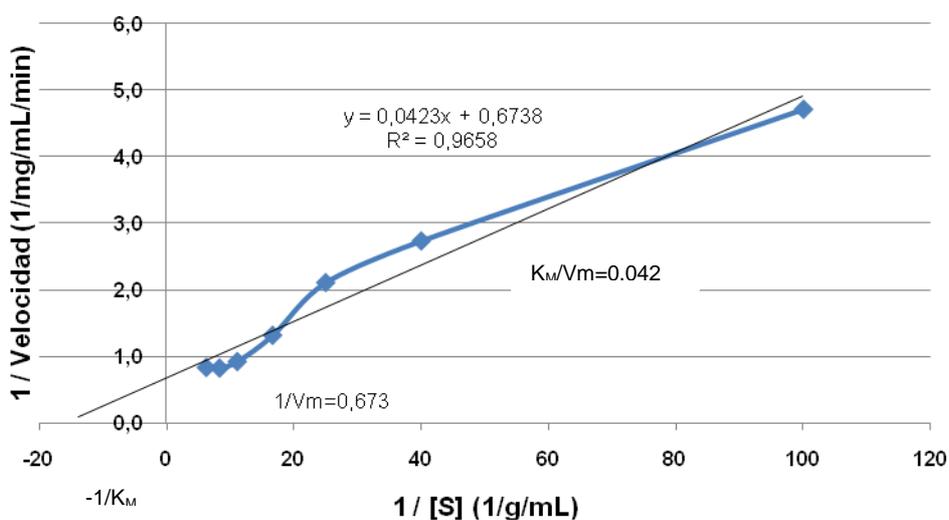


Figura 12. Regresión de Lineweaver – Burk para la hidrólisis con papaína

En la cinética de hidrólisis del aislado con papaína se determinó el valor de K_M igual a 0,0624 g / mL. De acuerdo con Chávez (1990), se debe trabajar con valores de concentración de sustrato de $10 K_M$ para garantizar que se trabaja con el 90,0 % 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 0,09 g / mL. Los resultados de la velocidad de reacción a las diferentes concentraciones de sustrato se presentan en la Tabla 20, dentro del ANEXO V.

En las Figuras 13 y 14 se muestra el gráfico de Michaelis-Menten y el método de Lineweaver – Burk para la determinación de K_M y V_{max} de la reacción enzimática con flavourzima. El valor de K_M fue igual a 0,0481 g / mL, pero debido a la baja solubilidad de la muestra, la concentración de sustrato fue igual a 0,09 g / mL, que equivale a $1,87 K_M$. Los resultados de la velocidad de reacción a las diferentes concentraciones de sustrato se presentan en la Tabla 21, dentro del ANEXO V.

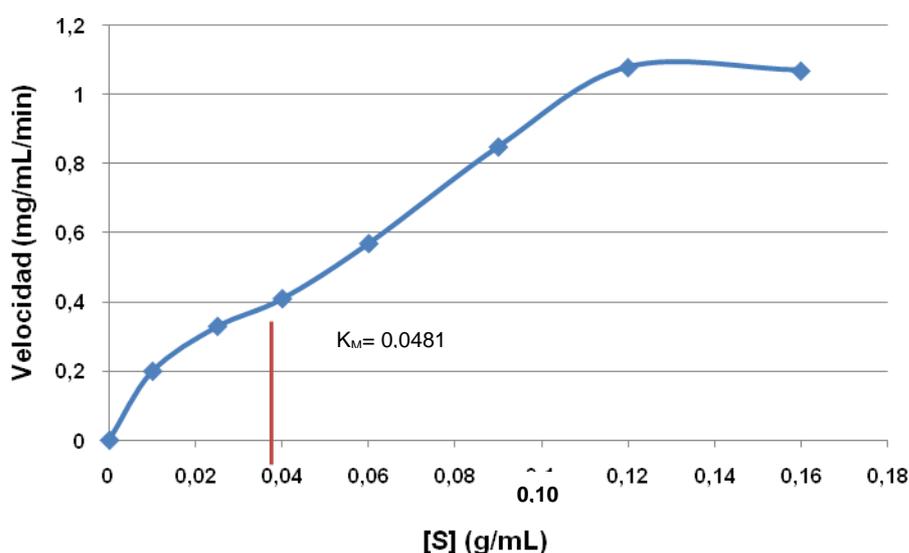


Figura 13. Curva de Michaelis y Menten para la hidrólisis con flavourzima

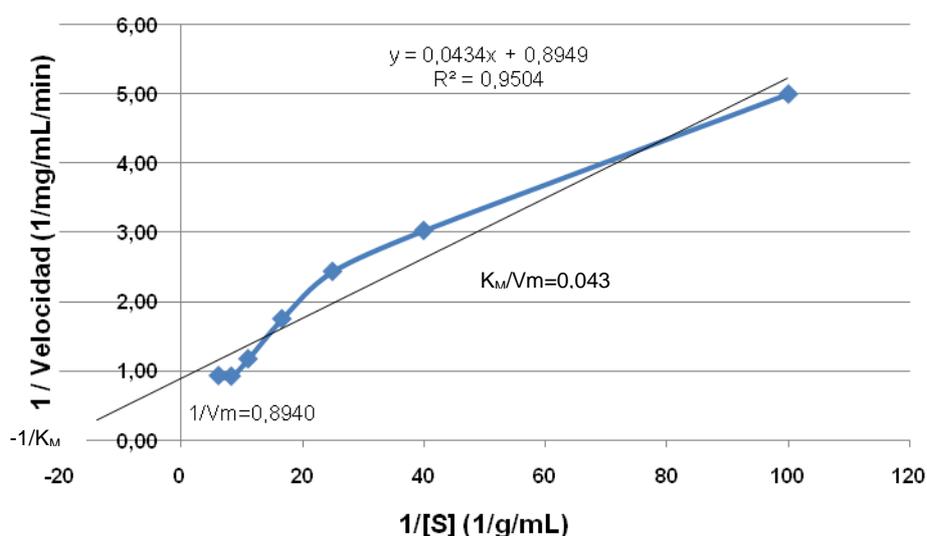


Figura 14. Regresión de Lineweaver – Burk para la hidrólisis con flavourzima

3.4.3.2 Concentración de enzima

Para una concentración de sustrato de 0,09 g / mL; pH 7,0; temperatura 50° C; y, concentraciones de papaína de 0,01; 0,04; 0,06 y 0,09 UA / mL solución, se realizó la hidrólisis para cada concentración de enzima y se obtuvieron las curvas proteína soluble en función del tiempo de reacción, como se observa en la Figura 15.

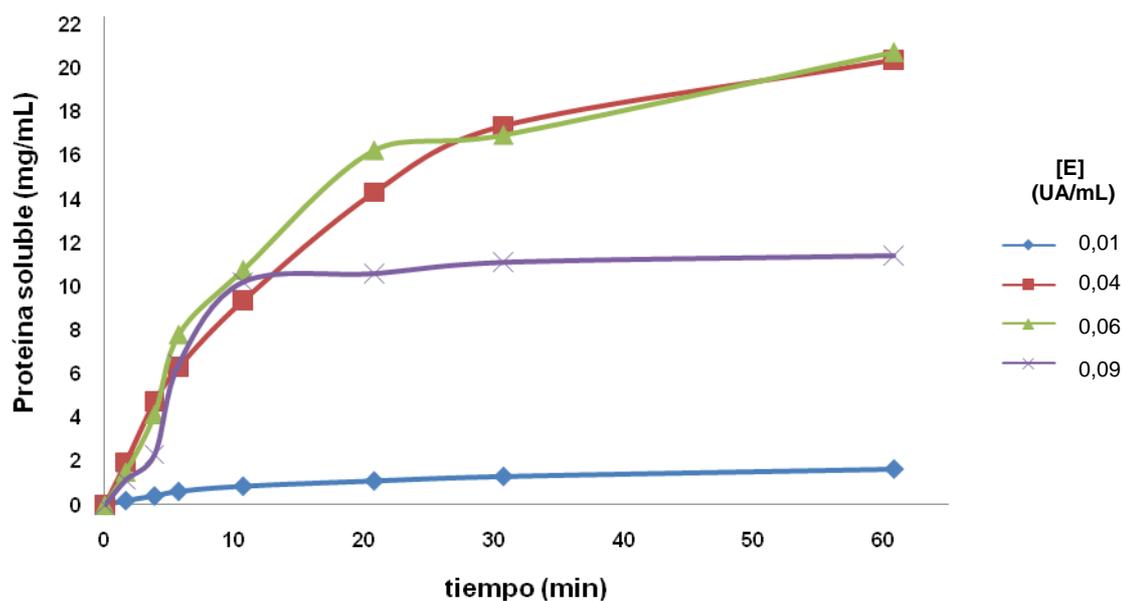


Figura 15. Concentración de proteína soluble en función del tiempo a diferentes concentraciones de papaína, pH = 7,0; 50° C y [S] = 90 mg / mL.

Con un tiempo de reacción de 10 min, la velocidad de reacción presentó linealidad hasta una concentración de papaína igual a 0,06 UA / mL. A partir de este punto no se incrementó la velocidad con el aumento de la concentración de enzima como se observa en la Figura 16. Se determinó como más adecuada la concentración de papaína de 0,06 UA / mL de solución.

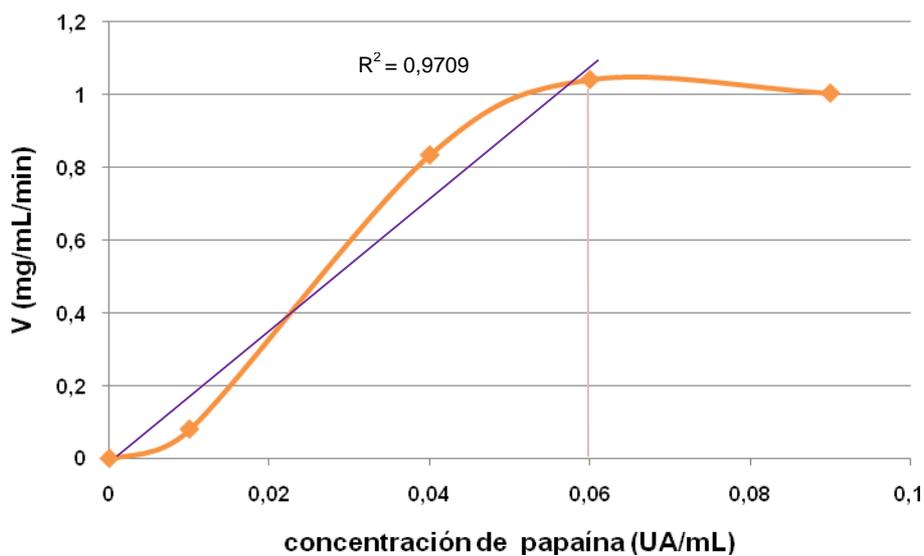


Figura 16. Velocidad de hidrólisis del aislado proteico en función de la concentración de papaína, pH = 7,0; 50° C y [S]= 90 mg / mL.

El análisis de varianza muestra que existe diferencia significativa en la velocidad de reacción, a cada concentración de papaína analizada. La prueba de Tukey (5 %) determinó que la mayor velocidad se obtuvo a una concentración de papaína de 0,06 UA / mL de solución, como se presenta en la Tabla 24, en el Anexo V.

Para la flavourzima con concentraciones de 4, 10, 30 y 50 LAPU / mL solución, bajo condiciones de concentración de sustrato de 0,09 g / mL; pH 7,0; y, temperatura 50° C, se realizó la hidrólisis para cada concentración de enzima y se obtuvieron las curvas proteína soluble en función del tiempo de reacción, como se observa en la Figura 17.

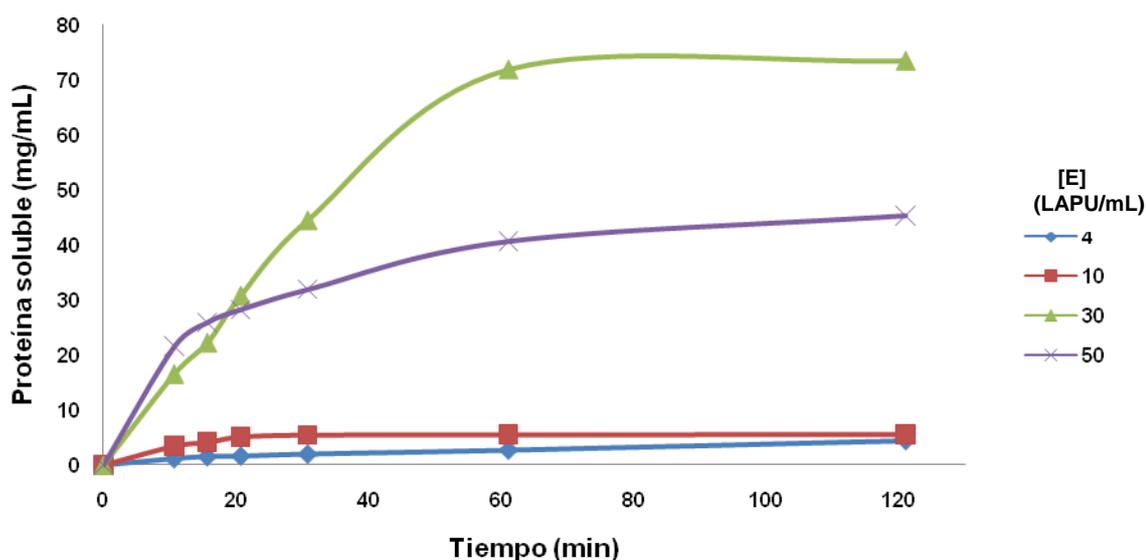


Figura 17. Concentración de proteína soluble en función del tiempo a diferentes concentraciones de flavourzima, pH = 7,0; 50° C y [S]= 90 mg / mL.

En la flavourzima, con un tiempo de reacción de 30 min, la velocidad de reacción respecto a las concentraciones de la enzima es proporcional hasta 50 LAPU / mL de solución, a concentraciones más altas de enzima tiene tendencia a disminuir como se observa en la Figura 18. Se determinó como la concentración más adecuada los 50 LAPU / mL de solución. Los resultados de la velocidad de reacción a diferentes concentraciones de papaína y flavourzima se presentan en la Tabla 22 y Tabla 23, dentro del ANEXO V.

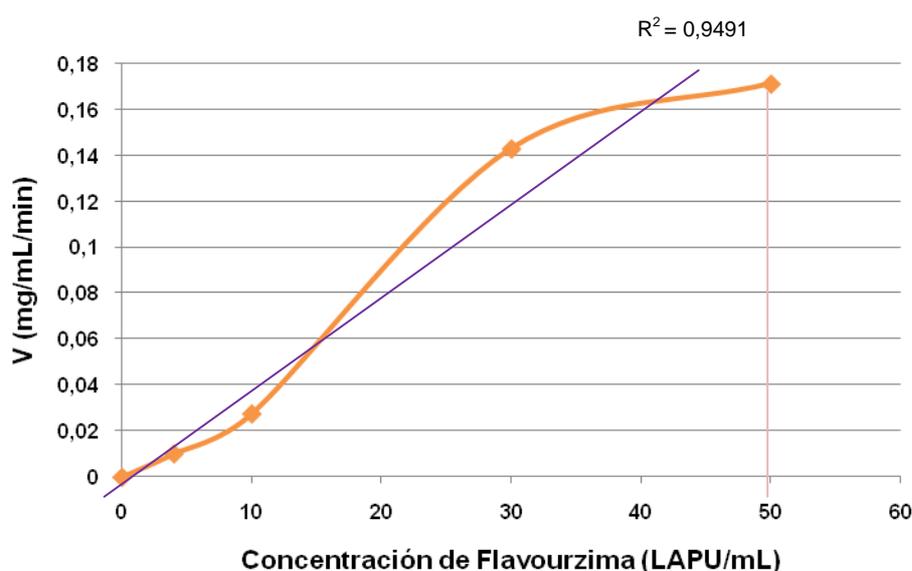


Figura 18. Velocidad de hidrólisis del aislado proteico en función de la concentración de flavourzima, pH = 7,0; 50° C y [S]= 90 mg / mL.

El análisis de varianza muestra que existe diferencia significativa en la velocidad de reacción, a cada concentración de flavourzima analizada. La prueba de Tukey (5 %) determinó que la mayor velocidad se obtuvo a una concentración de flavourzima de 50 LAPU / mL de solución, como se presenta en la Tabla 24, en el Anexo V.

En las figuras 16 y 18 se observa que para una concentración de papaína de 0,06 UA / mL, la velocidad de hidrólisis de 1,0431 mg / mL / min, es alta si se compara con la velocidad de hidrólisis de 0,17138 mg / mL / min, alcanzada a una concentración de flavourzima de 50 LAPU / mL.

3.4.4 OBTENCIÓN DEL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO

La hidrólisis secuencial del aislado proteico de chocho a pH 7,0, 50° C, con una concentración de 0,06 UA / mL de solución y 50 LAPU / mL de solución para la papaína y flavourzima, respectivamente, se presenta en la Figura 19.

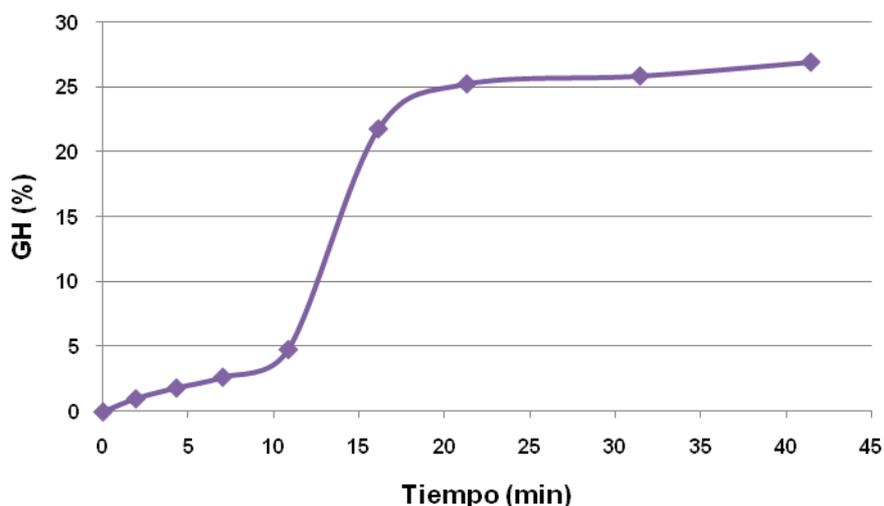


Figura 19. Cinética de la hidrólisis de proteína de chocho (*Lupinus mutabilis*) producido por la acción secuencial de papaína y flavourzima

Los resultados presentados corresponden al grado de hidrólisis (GH) obtenido por la acción catalítica de las enzimas. Con la papaína se alcanzaron grados de hidrólisis de 1,01; 1,83; 2,67 y 4,80 %, a los tiempos 1, 3, 5 y 10 min de reacción.

A partir de este tiempo, se aplicó la flavourzima, dejándola actuar por 30 min y se alcanzaron grados de hidrólisis de 21,77; 25,23; 25,84 y 26,91% a los 15, 20, 30 y 40 min de reacción.

Con base en el tiempo de reacción y a la acción secuencial de las enzimas, se indica que el grado de hidrólisis (GH) alcanzado fue del 26,91 %, valor conseguido debido a la ruptura de los enlaces peptídicos internos por la acción de la papaína, así se logró una mayor exposición de estos enlaces hacia el exterior de la proteína, los mismos que fueron atacados posteriormente por la flavourzima.

El GH del 26,91 % permite clasificar al hidrolizado enzimático de chocho, según Adler-Nissen (1986), como un hidrolizado extensivo, debido a que el GH es mayor que 10 %. La funcionalidad de este producto está destinada a alimentación especializada.

Es primordial mencionar que la concentración de proteína en el hidrolizado enzimático no se ve afectada, debido a que, la concentración de proteína con la que aportan las enzimas al producto sometido a hidrólisis es muy pequeña.

El GH de 26,91 %, para un tiempo de 40 min de reacción, con una concentración de sustrato del 9,0 %, es similar al grado de hidrólisis de 26 % alcanzado por Rodríguez, (1999) al cabo de 180 min de incubación, para una concentración de sustrato igual al 10,0 %. Este resultado no se esperaba por el uso de harina con carbohidratos, componentes que aumentan el peligro de interacciones entre azúcares reductores y proteínas, por lo que disminuyen la eficacia del proceso y causan pérdida de la calidad proteica especialmente con el aminoácido lisina. Por otro lado, pueden conducir al pardeamiento de proteínas y péptidos debido a la reacción de Maillard que es la reacción de un grupo amino de aminoácidos como lisina, arginina, histidina y triptófano con un grupo carbonilo de azúcares reductores como aldosas y cetosas (Erikson, 1981).

3.4.5 PERFIL DE AMINOÁCIDOS

El perfil de aminoácidos, presentes en el hidrolizado de chocho, se comparó con el perfil de aminoácidos de los hidrolizados proteicos de chocho obtenidos por Rodríguez (1999) y por Villacrés (2001). Los resultados se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. Contenido de aminoácidos del hidrolizado proteico del chocho expresados en (g de aminoácidos / 100 g de proteína)

Aminoácidos	Hidrolizado	Hidrolizado Rodríguez (1999)	Hidrolizado Villacrés (2 001)
Ácido aspártico	6,12	11,4	12,0
Treonina	1,43	3,1	3,9
Serina	2,27	6,2	5,8
Ácido glutámico	13,39	25,7	23,4
Prolina	1,32		3,9
Glicina	2,99	2,9	4,2
Alanina	3,56	2,7	3,3
Cisteína	0,48	1,7	1,0
Valina	1,46	3,0	3,2
Metionina	0,22	1,8	0,5
Isoleucina	1,83	4,5	5,1
Leucina	3,04	6,0	8,5
Tirosina	1,64	4,5	4,3
Fenilalanina	1,84	3,7	3,3
Histidina	1,25	3,2	2,8
Lisina	1,40	5,6	5,3
Arginina	1,83	13,3	11,0

El contenido de aminoácidos obtenido en el hidrolizado de chocho es bajo en comparación con los resultados de los hidrolizados de Rodríguez 1999 y Villacrés 2001 señalados en la Tabla 12. La diferencia más significativa se observa en la cantidad de metionina y cisteína, esto se debe a que, durante el procesamiento de obtención del aislado, gran parte de dichos aminoácidos se ubica en la fracción insoluble, es decir en el residuo de la extracción de este proceso, lo que provoca una mayor pérdida e incide en la disminución de la calidad nutritiva de la proteína,

ya que la metionina es su primer aminoácido limitante, como lo señala Oliveros *et al.*, (1983).

En los niveles de aminoácidos como leucina, treonina, isoleucina, valina, lisina, entre otros, también se produjo una disminución en su cantidad, esto se debería, a que durante la obtención del aislado de chocho en la etapa de extracción básica, probablemente ocurrió una ligera hidrólisis de la proteína que afecto negativamente a los aminoácidos esenciales específicamente a la lisina, como indica Rodríguez *et al.*, (1981).

Además de lo mencionado, lo que también influyo en la disminución de los aminoácidos fue el no concentrar la proteína, como desarrollaron en sus investigaciones Rodríguez y Villacrés, en la primera fase de sus trabajos, a partir de harina obtenida del grano amargo descascarado y mediante lavados sucesivos con una mezcla isopropanol-agua obtuvieron una torta desamargada y desengrasada, denominada concentrado. Esta operación permitió reducir sustancialmente el contenido de grasa, azúcares, alcaloides y elevar el contenido de proteína total en el producto concentrado, el cual sirvió de base para la preparación del aislado proteico.

El procedimiento de obtención del concentrado mediante el empleo de soluciones hidroalcohólicas juega un papel muy importante, cuya finalidad es evitar la pérdida de la proteína por solubilización y arrastre en el proceso posterior de extracción básica en la obtención del aislado proteico (Vioque *et al.*, 2001).

La modificación enzimática no altera la composición de aminoácidos, sin embargo la hidrólisis ácida de las proteínas, previa su inyección en el HPLC, generalmente introduce una cierta pérdida de treonina, serina, cisteína, metionina y tirosina. Particularmente el triptófano se destruye en su totalidad, la asparagina y la glutamina se convierten a ácido aspártico y ácido glutámico respectivamente, razón por la cual puede haber favorecido a las bajas concentraciones de los aminoácidos (Bernardi *et al.*, 1991).

La composición de aminoácidos ofrece una información completa sobre la disponibilidad biológica de la proteína; sin embargo, durante el procesamiento tecnológico de los alimentos, es factible que se reduzca el valor nutritivo de las proteínas. Una de las primeras alteraciones que se observan es la oxidación de aminoácidos azufrados, cuyo resultado es una gama de compuestos con diversos estados de transformación, tales como sulfóxidos, sulfonas, disulfóxidos, etc. Generalmente, las formas químicas de estos nuevos compuestos no son biológicamente aprovechables, excepto en algunos casos como en el del sulfóxido de metionina que se utiliza en una proporción de 60% en relación con la metionina (Oliveros *et al.*, 1983).

3.4.6 DETERMINACIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES DEL HIDROLIZADO DE CHOCHO

El resultado electroforético realizado para el hidrolizado de chocho se encuentra en la Figura 8.

El análisis electroforético de la proteína hidrolizada reveló la presencia de especies proteicas, con pesos moleculares aparentes de 82,36; 72,69; 63,10; 56,64; 48,96; 23,64; 20,87; 18,42 y 14,35 kDa, las cuales, debido a la proteólisis enzimática fueron de menor tamaño que las especies características del aislado proteico, que presentan complejidad de la proteína.

En la muestra hidrolizada se obtuvieron péptidos con variadas características moleculares, que se deberían a la diferente especificidad de las enzimas utilizadas. Debido a la actividad endopeptidasa producida por la papaína (enzima de baja especificidad que hidroliza tanto las proteínas como los péptidos de pequeño tamaño, amidas y ésteres), corta entre las cadenas polipeptídicas y produce péptidos de menor tamaño molecular. Preferentemente actúa sobre los aminoácidos básicos, Leucina, Glicina, así como sobre Arginina, Lisina y Fenilalanina. (Adler-Nissen, 1986; Ward, 1983).

Por acción de la actividad exopeptidasa de la flavourzima, que cataliza la eliminación de residuos de aminoácidos uno por uno, desde el extremo C-terminal o desde el extremo N-terminal de las cadenas peptídicas, hacia el interior de la molécula, se produce aminoácidos individuales y simultáneamente cadenas largas (González, 2010).

3.4.7 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ALCALOIDES

La determinación cualitativa realizada en el hidrolizado mostró que la presencia de alcaloides fue moderada (++) , similar al aislado.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- El diámetro promedio de 7,58 mm, encontrado en la semilla de chocho, lo ubica como una semilla de tamaño intermedio, con un 17 % más de diámetro que la semilla de soya (6,3 mm). El tamaño de una semilla indica la capacidad de nutrientes que puede almacenar.
- El tamaño promedio de partícula de la harina integral de chocho se ubica entre 425 y 850 μm , por lo que se considera una harina gruesa.
- La harina integral de chocho tiene un alto potencial energético, debido a su contenido de grasa (16,56 %) y de carbohidratos (25,11 %). El valor proteico (46,59 %) de la harina integral de chocho es superior al de otras materias primas comúnmente utilizadas en la industria alimentaria.
- Se obtuvo el aislado de proteína, a partir de harina integral de chocho, a pH 10,5 y con una relación sólido / líquido de 1/11. Se aplicó una segunda extracción del material insoluble que se encontró después de la centrifugación, para conseguir un mayor rendimiento, en peso, del 42,74 %.
- El aislado proteico de chocho presentó un porcentaje de proteína de 62,78 % y grasa de 17,81 %, con un incremento en 16,19 % y 0,75 %, respectivamente, en relación al contenido en la harina integral. Las cantidades de carbohidratos, de fibra y de ceniza disminuyeron en comparación con la harina integral.
- La concentración de enzima determinada fue de 0,06 UA / mL de solución para la papaína y de 50 LAPU / mL de solución para la flavourzima.
- La concentración de sustrato ($[S] = 9,0 \%$) utilizada se explica debido a la máxima solubilidad que presentó el aislado.

- En el proceso de hidrólisis a pH 7,0 y 50° C, mediante la acción secuencial de la papaína y flavourzima, se alcanzó un grado de hidrólisis de 26,91 %, con un contenido en proteína del 62,78 %.
- El análisis electroforético del hidrolizado mostró la presencia de péptidos de bajo peso molecular, con relación a los pesos moleculares que presentó el aislado.
- El aislado e hidrolizado de chocho mostró que la presencia de alcaloides fue moderada.
- La presencia de alcaloides en el aislado proteico no inhibió la actividad de las proteasas durante el proceso hidrolítico.

4.2 RECOMENDACIONES

- Desarrollar nuevas y mejores investigaciones agroindustriales, debido a que la principal limitación es el contenido de alcaloides que poseen el grano y la misma planta, así extender y promover el cultivo y mejorar sus precios.
- Realizar pruebas para la aplicación del hidrolizado enzimático de proteína de chocho en nutrición animal y vegetal.
- Realizar investigaciones con el aislado e hidrolizado de proteína de chocho hacia su posible utilización en dietas destinadas para alimentación en pollos de engorde, debido a que el contenido de alcaloides presentes no es apto para consumo humano.

BIBLIOGRAFÍA

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, pp. 108-111.
2. Adler-Nissen, J., 1993, "Enzymes in food processing", Academic Press, San Diego, USA, pp. 159-203.
3. Adler-Nissen, J., 1986, "Some fundamentals aspects of food proteins hydrolysis. En: "Enzymatic hydrolysis of food proteins", Elsevier Applied Science Publishers, Nueva York, pp. 9-24, 110-131.
4. Aguilera, Y., Martín, A., Benítez, V., Mollá, E., López, J. y Esteban, M., 2009, "Changes in carbohydrate fraction during dehydration process of common legumes", *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 678-683.
5. Benítez, R., Ibarz, A. y Pagán, J., 2008, "Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones", *Chemical Abstract Service*, 42, 227- 236.
6. Bernardi, D., Pilosof, A. y Bartholomai, G., 1991 "Enzymatic Modification of Soy Protein Concentrates by Fungal and Bacterial Proteases", *JAOCS*, 2, 102.
7. Boye, I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, M., Mondor, M. y Farnworth, E., 2010, "Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation technological", *Food Research International*, 43, 537-546.
8. Caicedo, C. y Peralta, E., 2000, "Zonificación potencial para el cultivo de chocho", En *Zonificación potencial, sistemas de producción y procesamiento*

artesanal del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) en Ecuador, Fundacyt, INIAP, 89, pp. 33-35.

9. Cassini, S., Tessaro, C., Marrczak, D. y Pertile, C., 2010, "Ultrafiltration of wastewater from isolated soy protein production: A comparison of three UF membranes", *Journal of Cleaner Production*, 18, 260-265.
10. Chang, S., 1998, "Protein Analysis", Chapter 15, In: "Food Analysis", editor Nielsen, S., second edition, Aspen Publishers, Inc., Maryland, USA, pp. 243, 244.
11. Cole, D., Carpio, F., Julián, J. y León, N., 1998, "Assessment of peripheral nerve function in an Ecuadorian rural population exposed to pesticides", *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 55, 77-91.
12. Colquehuanca, H., 1982, "Desamargado del Tarwi en la Planta Piloto del Cuzco", III Congreso Internacional de Cultivos Andinos, Universidad del Cuzco, La Paz, Bolivia, pp. 291-297.
13. Chávez, M., Díaz, J., Pérez, U. y Delfín, J., 1990, "Temas de Enzimología", Tomo I, Universidad de la Habana, Facultad de Biología, Cuba, pp. 7-67.
14. Cheftel, J., Cuq, J. y Lorient, D., 1989, "Proteínas alimentarias: Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas", Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España, pp. 40-56, 258-259, 280.
15. Chérrez, M. y Orbea, M., 1996, "Estudio del procesamiento integral y de las condiciones de preservación del chocho cocido", Tesis previa a la obtención del Título de Ingeniero Químico, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador, p. 32.
16. Díaz, J., Fernández, M. y Paredes, F., 1997, "Aspectos básicos de bioquímica clínica", Primera edición, Editorial Días de Santos S.A, Madrid, España, pp.100-101.

17. Elizalde, A., Porrilla, Y. y Chaparro, D., 2009, "Factores antinutricionales en semillas", Facultad de Ciencias Agropecuarias, Z, 46-54.
18. Erdemoglu, N., Ozkan, S. y Tosum, F., 2007, "Alkaloid profile and antimicrobial activity of *Lupinus angustifolius* L. alkaloid extract", *Phytochem Rev*, 6, 197-201.
19. Erikson, C., 1981, "Maillard reaction in food: chemical, physiological and technological aspects" Pergamon Press, Oxford, U.K, p. 501.
20. FAO, 1986, "Reunión sobre cultivos andinos subexplotados de valor nutricional", Oficina Regional para América Latina y el Caribe, Santiago de Chile, <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/.../home10.htm>, (Febrero, 2011).
21. FAO, 2000, "Cultivos andinos subexplotados y su aporte en la alimentación", Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, Santiago de Chile, http://www.issuu.com/b.mendozaelizabeth/.../cultivos_andinos_subexplotados_y, (Noviembre, 2010).
22. FAO, 1992, "Granos y leguminosas andinas", Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, Arequipa, Perú, http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/.../Cap3_2.htm, (Octubre, 2010).
23. FAO, 1994, "Neglected crops 1492 from a different perspective", *Plant Production and Protection*, series 26, edited by Hernandez, J. y León, J, Rome , Italy, pp. 139-144.
24. Félix, R., 2008, "Aislamiento, purificación y caracterización de proteasas de origen vegetal, a partir de muestras de hierba mora (*Solanum nigrum*) e higuerón (*Ficus apollinaris*)", Proyecto de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniero Químico, EPN, Quito, Ecuador, pp. 34-37.

25. Fellows, P., 1994, "Tecnología del procesado de los alimentos", Editorial Acribia, S.A., Zaragoza, España, pp. 98, 113,178.
26. Fernández, J., San Martín, E., Díaz, J., Calderón, A. y Ortiz H., 2008, "Evaluación de las distribuciones de tamaño de partícula de harina de maíz Nixtamalizado por medio de RVA", *Superficies y Vacío*, 21, 25-30.
27. Fraile, E., García, D. y Martínez, A., 2007, "Nutritivas y apetecibles: conozca de leguminosas comestibles", Parte I, "Hojas, vainas y semillas",66, pp. 27-35.
28. Franco, J., 2004, "Aminoácidos", Departamento de producción agraria, Área de producción vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, <http://www.uvademesa.cl>, (Octubre, 2009).
29. Fleming, M., 1989, "Enzyme technology versus engineering technology in the food industry", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 11, 249-265.
30. González, A. y Franco, J., 2001, "Los Nemátodos en la producción de semilla de papa", Producción de Tubérculos - Semillas de Papa Manual de Capacitación,http://www.cipotato.org/csd/materials/tuberculos-semilla/semilla_3-9.pdf, (Septiembre, 2009).
31. González, J., 2010, "Curso orientado a estudiantes de Bioquímica y Biología Molecular", Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad del País Vasco, <http://www.ehu.es/biomoleculas/enzimas/enz3.htm>, (Septiembre, 2010).
32. Greenfield, H. y Southgate, D., 1992, "Datos de composición de alimentos, obtención, gestión y utilización", Primera edición, Roma, Italia, pp. 115-116.
33. Gross, R., Von Baer, E., Koch, F., Marquard, R., Trugo, L. y Wink, M., 1988, "Chemical composition of a new variety of the Andean lupin (*Lupinus*

- mutabilis* cv. Inti) with low alkaloid content”, *Journal of Food Composition Analysis*, 1, 353-361.
34. Gross, R., 1982, “El cultivo y la utilización del tarwi, (*Lupinus mutabilis sweet*)”, Serie: Producción y Protección Vegetal, 36, FAO, Roma, Italia, pp. 141-169.
 35. Hicks, J., 2001, “Bioquímica”, McGraw Hill Interamericana Editores, D.F., México, pp. 107, 109, 117.
 36. INIAP, 2008, “Manual Agrícola de Granos Andinos”, Programa nacional de leguminosas y granos andinos del Instituto Nacional Autónomo de investigaciones Agropecuarias, <http://www.iniap.gob.ec>, (Agosto 2011).
 37. Jacobsen, S. y Mujica, A., 2006, “El tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) y sus parientes silvestres”, Botánica Económica de los Andes Centrales, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia, pp. 458-482.
 38. Jimenez, C., Hernandez, H. y Dávila, G., 2003, “Production of a yogurth like product from *Lupinus campestris* sedes”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 515-522.
 39. Junovich, A., 2003, “El Cultivo de chocho a través de los datos del III Censo Nacional Agropecuario”, <http://www.ajunovich@sica.gov.ec>, (Agosto, 2009).
 40. 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.
 41. Kinsella, J., 1976, “Functional properties of proteins in food: a survey”, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7, 219-244.

42. Khattab, R., Arntfield, S. y Nyachoti, C., 2009, "Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments", Part 1: Protein quality evaluation, *LWT- Food Science and Technology*, 42, 1107-1112.
43. Lahl, W. y Braun, S., 1994, "Enzymatic production of protein hydrolysates for food use", *Journal of Food Technology*, 48, 68-71.
44. Lehninger, A., 1970, "Biochemistry", Worth Publishers, Inc., New York, United States of America, pp. 60, 153, 158, 159, 169, 170.
45. Luna, A., 2007, "Composición y procesamiento de la soya para consumo humano", *Investigación y ciencia*, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México, 15, pp. 35-44.
46. MAG, 2003, "El Cultivo de chocho a través de los datos del III Censo Nacional Agropecuario", Ministerio de agricultura, ganadería, acuicultura y pesca del Ecuador, <http://www.sica.gov.ec>, (Agosto, 2009).
47. Mc Cormack, L., 2007, "La química en las ciencias de la salud", Escuela Superior de Salud y Ambiente, Universidad Nacional del Comahue, http://essa.uncoma.edu.ar/academica/materias/morfo/ARCHIVOPDF6/PART E5/ENZIMAS2_Cinetica_enzimatica.pdf, (Octubre, 2010).
48. Millán, F., Bautista, J. y Ollas, J., 1998, "Procedimiento de obtención de peptonas vegetales de alto grado de hidrólisis y sus aplicaciones", Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad de Sevilla, Madrid, España, 2, 116-937.
49. Moncayo, L., Barrera, V., Caicedo, C., Peralta, E. y Rivera, M., 2000, "Sistemas de producción de chocho en la sierra ecuatoriana", En *Zonificación potencial, sistemas de producción y procesamiento artesanal del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) en Ecuador*, Fundacyt, INIAP, pp. 5-18.

50. Morales, D. y Vacher, J., 1992, "Actas del VII Congreso Internacional sobre Cultivos Andinos", Primera edición, La Paz, Bolivia, pp. 173-185.
51. Mosquera, E., 1999, "Obtención de hidrolizado enzimático de proteína de chocho (*Lupinus mutabilis*) a escala semi piloto. Determinación de las propiedades físico químicas y funcionales", Tesis previa a la obtención de Ingeniero Químico, EPN, Quito, Ecuador, pp. 54-84.
52. Mujica, F., Latrille, L. y Barriga, P., 1994, "VIII Congreso Internacional de Sistemas Agropecuarios Andinos y su Proyección al tercer milenio", Agro Sur, Chile, 22, pp. 3-6.
53. Murray, R., Granner, D. y Rodwell, V., 2007, "Bioquímica Ilustrada", 17ª edición, Editorial El Manual Moderno, País Vasco, España, p. 80.
54. Novozymes, Information Sheet, Special Food, 1999, "Introduction to proteins and protein hydrolysis".
55. Oliveros, M., Schoeneberger, H., Gross, R. y Reynoso, Z., 1983, "Influencia fenotípica y tecnológica de la semilla del *Lupinus mutabilis* sobre la disponibilidad de metionina y el contenido de azufre", Archivos latinoamericanos de nutrición, 31, 573-587.
56. Ortega, E., Rodríguez, A., David, A. y Zamora, A., 2010, "Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia", Acta Agronómica, 59, 111-118.
57. Pimentel, D., Culliney, T. y Bashore, T., 1996, "Riesgos de salud pública asociados con pesticidas y toxinas naturales en alimentos", Universidad de Minnesota, <http://www.impworld.umn.edu/cancelado/spchapters/Pimentelsp.htm>, (Mayo, 2011).

58. Popenoe, H., King, S., Leon, J., Kalinowski, L., Vietmeyer, N. y Dafforn, M., 1989, "Lost crops of the Incas: Little known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation", National Academies Press, Washington DC, 4, pp. 180-189.
59. Prodanov, M., Sierra, I. y Vidal, C., 2004, "Influence of soaking and cooking on the thiamin, riboflavin and niacin contents of legumes", Food Chemistry, 84, 271-277.
60. Rodríguez, N., 1999, "Obtención de hidrolizado de chocho (*Lupinus mutabilis*) por vías enzimáticas", Proyecto de Titulación previo a la obtención del Título de Ingeniera Química, EPN, Quito, Ecuador, pp. 40-42.
61. Rodríguez, T., Aliaga, T., Schoeneberger, H. y Gross, R., 1981, "Establecimiento de las condiciones óptimas a nivel de laboratorio y de planta piloto para la preparación de un aislado proteínico de *Lupinus mutabilis*", Archivos latinoamericanos de nutrición, 31, 782-795.
62. Schoeneberger, H., Gross, R., Cremer, H. y Elmadfa, I., 1982, "The protein quality of lupinus (*Lupinus mutabilis*) alone and in combination with other protein sources", Institut of nutrition Tizon y Bueno, Lima, Perú, 32, 133-143.
63. Scopes, K., 1994, "Protein Purification", Principles and Practice, Springer-Advanced, Tercera edición, New York, Heidelberg Berlin, pp. 70-72.
64. Sreerama, N., Sashikala, B. y Pratape, M., 2009, "Effect of enzyme predehulling treatment on dehulling and cooking properties of legumes", Journal of Food Engineering, 92, 389-395.
65. Tapia, M., 2000, "Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación", segunda edición, Santiago, Chile, p. 7.

66. The Solae Company, 2 003, “Información Básica de la Soya – Proteína de Soya”, <http://www.solae.com/company/sp/soyessentials/soyprotein.html>, (Junio, 2 011).
67. Valdemiro, S. y Galeazzi, M., 1978, “Some Physicochemical and Nutritional Properties of a Sweet Lupin (*Lupinus albus* var. multolupa) Protein”, *Journal Agric Food Chemistry*, 26, 1458-1462.
68. Villacrés, E., 2001, “Obtención de un hidrolizado enzimático de alta funcionalidad a partir del chocho (*Lupinus mutabilis* sweet)”, Tesis de Maestría, EPN, Quito, Ecuador, pp. 58, 62, 63, 64, 65.
69. Villacrés, E., Rubio, A., Cuadrado, L., Abdo, S. y Aldaz, R., 2007, “Desarrollo de la tecnología de extracción de alcaloides a partir del chocho crudo y cocido”, Informe técnico anual – INIAP, Quito, Ecuador, pp. 29 – 31.
70. Vioque, J., Sánchez, R., Pedroche, J., Del Mar, M. y Millán, F., 2001, “Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos”, *Grasas y aceites*, 52, pp. 127-131.
71. Von Baer, D., Reimerdes, E. y Feldheim, W., 1979, “Methoden zur Bestimmung der Chinolizidin-Alkaloid” In: “*Lupinus mutabilis*”, I. Schnellmethoden, *Z. Lebensm, Unters, Forsch*, 169, 27-31.
72. Ward, O., 1983, “Proteolytic Enzymes”, *Industrial Chemicals, Biochemicals and Fuels*, National Institute for Higher Education, Dublin, Ireland, pp. 801-803.
73. 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.

74. Wilchek, M. y Miron, T., 2003, "Oriented versus random protein immobilization", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 55, 67-70.
75. Zamora, F., García, P., Ruíz, M. y Salcedo, E., 2008, "Composición de alcaloides en semillas de *Lupinus* y evaluación antifúngica y alelopática del extracto alcaloideo", *Agrociencia*, 42, 185-192.

ANEXOS

ANEXO I

Rendimiento en peso del aislado proteico de chocho

Tabla 13. Cuadro de análisis de varianza para el rendimiento (%) del aislado

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F	Probabilidad
pH	16,84	2	8,42	59,80	* 6,34E-06
Relación (S/L)	65,62	2	32,81	233,03	* 1,77E-08
pH*Relación	14,33	4	3,58	25,45	* 6E-05
Error	1,27	9	0,14		
Total	98,06	17			

ns: no significativo

* significativo al 5%

Tabla 14. Rendimiento en peso del aislado proteico de chocho (medias del test de Tukey)

pH	Rendimiento en peso (%)		
	R: 1/7	R: 1/9	R: 1/11
8,5	34,45	37,03	37,60
9,5	35,30	37,77	39,76
10,5	36,40	37,05	42,74

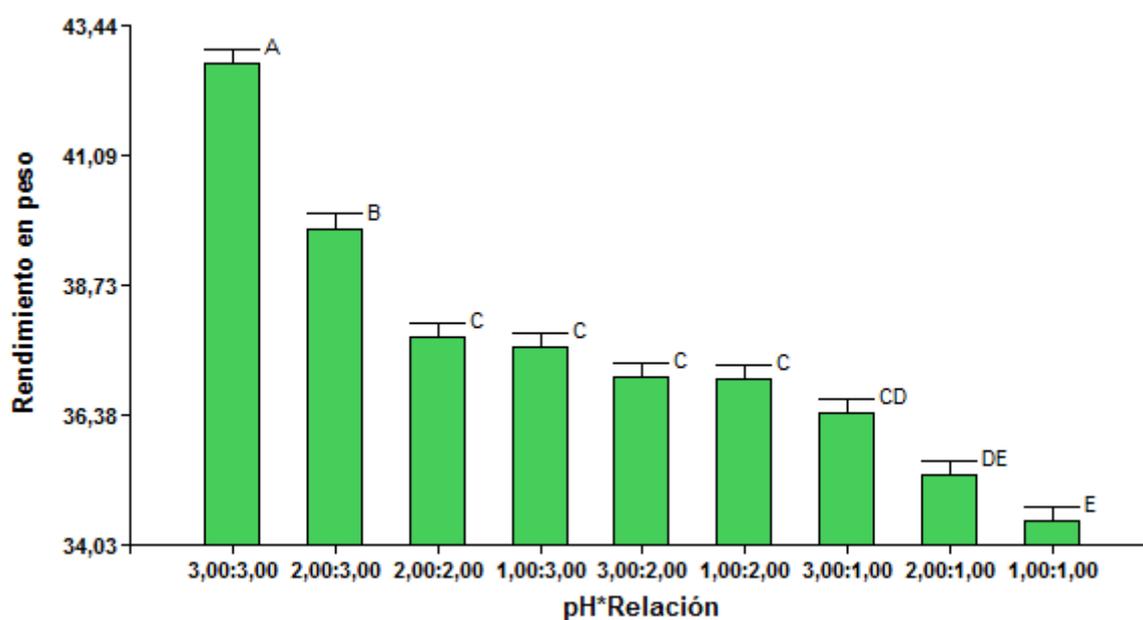


Figura 20. Rendimiento en peso (%) en función de la interacción de los diferentes niveles de los factores pH y relación sólido / líquido (test de Tukey)

ANEXO II

Recuperación de proteína del aislado proteico de chocho

Tabla 15. Cuadro de análisis de varianza para el contenido de proteína (%) del aislado

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F	Probabilidad
pH	355,13	2	177,57	74,10	*2,57E-06
Relación (S/L)	79,59	2	39,79	16,61	* 0,00095
pH*Relación	178	4	44,50	18,57	*0,00022
Error	21,57	9	2,40		
Total	634,29	17			

ns: no significativo

* significativo al 5%

Tabla 16. Extracción de proteína del aislado proteico de chocho (medias del test de Tukey)

pH	Extracción de proteína (%)		
	R: 1/7	R: 1/9	R: 1/11
8,5	81,37	82,69	83,34
9,5	78,09	80,72	78,53
10,5	76,78	75,91	62,79

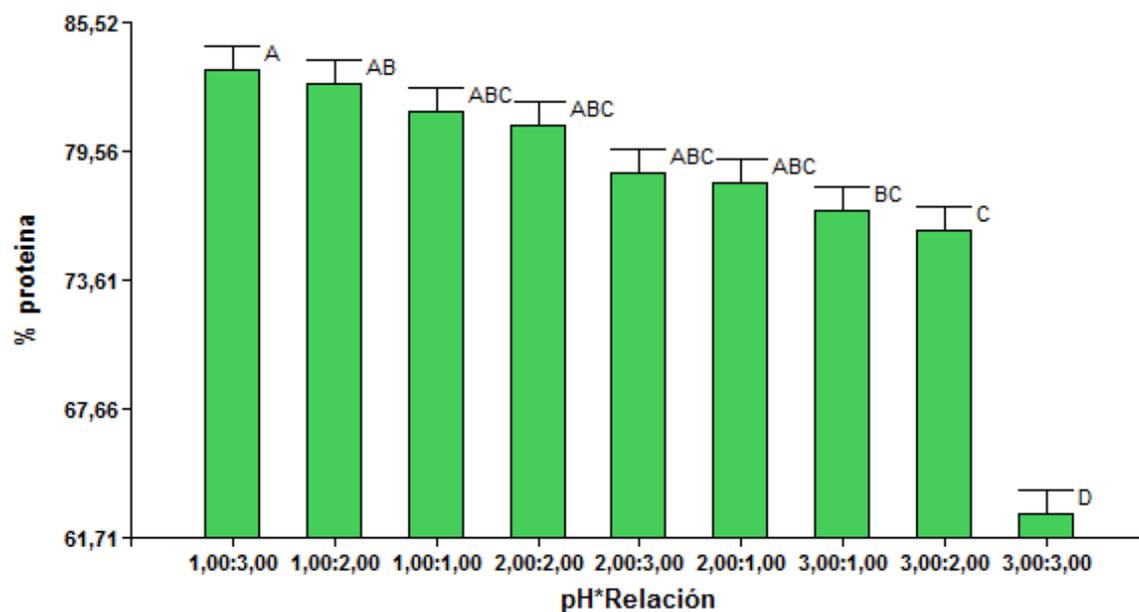


Figura 21. Extracción de proteína (%) en función de la interacción de los diferentes niveles de los factores pH y relación sólido / líquido (test de Tukey)

ANEXO III

Balance de materiales de la composición química del aislado de chocho

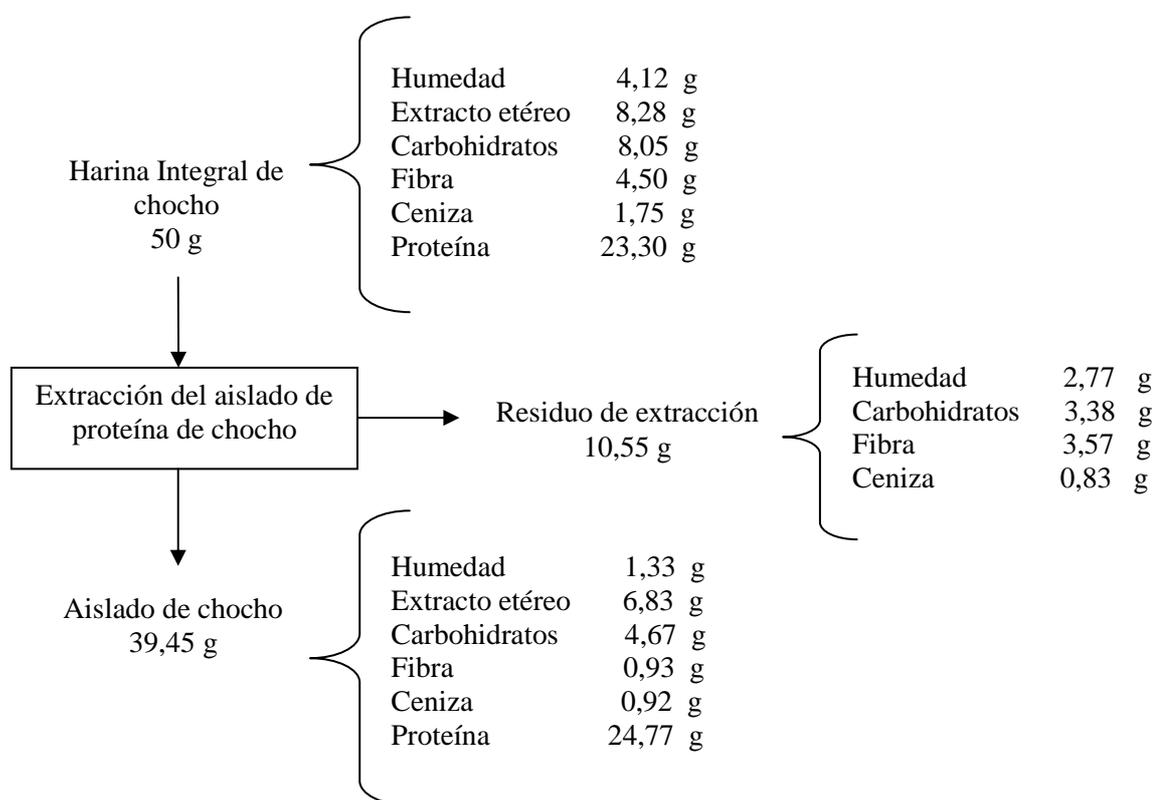


Figura 22. Balance de materiales de la composición química del aislado de chocho

Solubilidad del aislado de chocho

Tabla 17. Solubilidad del aislado de chocho a pH 7,0 según la variación de la absorbancia con la concentración del aislado

[S]	Absorbancia
(mg / ml)	280 nm
20	0,064
40	0,071
60	0,078
90	0,081
120	0,079

ANEXO IV

Determinación del tiempo de reacción de la cinética de hidrólisis

Tabla 18. Resultados de la determinación del tiempo de reacción del aislado de chocho con flavourzima

Tiempo de Reacción	Absorbancia	Proteína soluble*
min	280 nm	mg / mL
0	0,000	0,00
15	0,194	19,36
30	0,285	29,03
60	0,379	38,61
120	0,454	46,37
180	0,495	50,57
240	0,493	50,80
300	0,495	50,68

*Dato calculado con la ecuación 3, presente en el ANEXO VII

Tabla 19. Resultados de la determinación del tiempo de reacción del aislado de chocho con papaína

Tiempo de Reacción	Absorbancia	Proteína soluble*
min	280 nm	mg / mL
0	0,000	0,00
1	0,018	0,35
3	0,058	1,76
5	0,096	3,09
10	0,159	5,21
20	0,227	7,65
30	0,283	9,64
60	0,365	12,47

*Dato calculado con la ecuación 3, presente en el ANEXO VII

ANEXO V

Determinación de la concentración de sustrato y enzima

Tabla 20. Concentración de sustrato vs velocidad de reacción de la hidrólisis con papaína para la determinación de la concentración de sustrato

[S]	V
g / mL	mg /mL / min
0,010	0,212
0,025	0,365
0,040	0,473
0,060	0,756
0,090	1,077
0,120	1,203
0,160	1,192

Tabla 21. Concentración de sustrato vs velocidad de reacción de la hidrólisis con flavourzima para la determinación de la concentración de sustrato

[S]	V
g / mL	mg /mL / min
0,01	0,20
0,025	0,33
0,04	0,41
0,06	0,57
0,09	0,85
0,12	1,08
0,16	1,07

Tabla 22. Concentración de papaína vs velocidad de reacción para la determinación de la concentración de papaína

[E]	V
UA / mL	mg / mL / min
0,01	0,080
0,04	0,835
0,06	1,043
0,09	1,005

Tabla 23. Concentración de flavourzima vs velocidad de reacción para la determinación de la concentración de flavourzima

[E]	V
LAPU / mL	mg / mL / min
4	0,010
10	0,027
30	0,143
50	0,171

Tabla 24. Prueba de Tukey para la concentración de enzima vs velocidad de reacción para la determinación de la concentración de papaína y flavourzima

[E] papaína	Velocidad	Rango	[E] flavourzima	Velocidad	Rango
0,06	1,06	A	50	0,17	A
0,09	1,01	B	30	0,15	B
0,04	0,83	C	10	0,03	C
0,01	0,09	D	4	0,01	D

A,B,C,D: letras que indican diferencias significativas ($p = 5\%$)

Tabla 25. Cuadro de análisis de varianza para la concentración de papaína

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F	Probabilidad
[E] papaína	1,22	3	0,41	3366,85	*2,94E-07
Error	0	4	0,00		
Total	1,22	7			

ns: no significativo

*significativo al 5 %

Tabla 26. Cuadro de análisis de varianza para la concentración de flavourzima

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F	Probabilidad
[E] flavourzima	0,04	3	0,014	1061,35	*2,95E-06
Error	0	4	1,29E-05		
Total	0,04	7			

ns: no significativo

*significativo al 5 %

ANEXO VI

Curva de calibración para la determinación de pesos moleculares del aislado e hidrolizado proteico

Tabla 27. Pesos moleculares de referencia utilizados para la curva de calibración de pesos moleculares del aislado e hidrolizado de chocho

cm	PM (kDa)	log PM
0,1	250	2,40
0,2	148	2,17
0,9	98	1,99
1,3	64	1,81
1,9	50	1,70
2,6	36	1,56
3,6	22	1,34
4,0	16	1,20

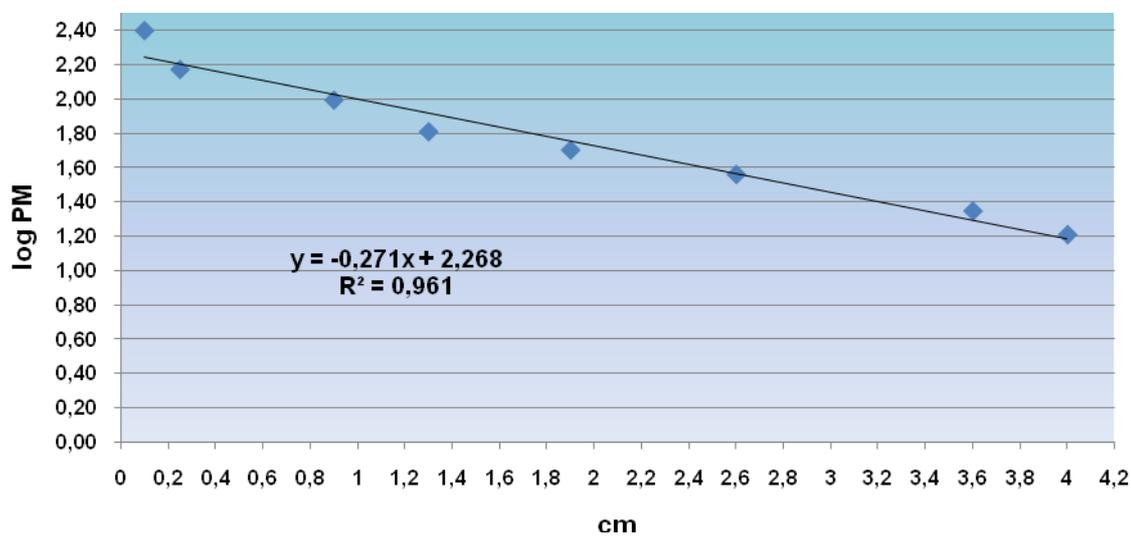


Figura 23. Curva de calibración de pesos moleculares

ANEXO VII

Curva de calibración con Albúmina de suero bovino (BSA) para la determinación de la concentración de proteína

Tabla 28. Datos de concentración de BSA y absorbancia para la curva de calibración de concentración de proteína

Concentración	Absorbancia
ug BSA /mL	280 nm
0,00	0,000
98,56	0,062
190,23	0,114
473,62	0,280
565,51	0,335
755,58	0,449
947,14	0,558
1447,30	0,839
1927,40	1,100

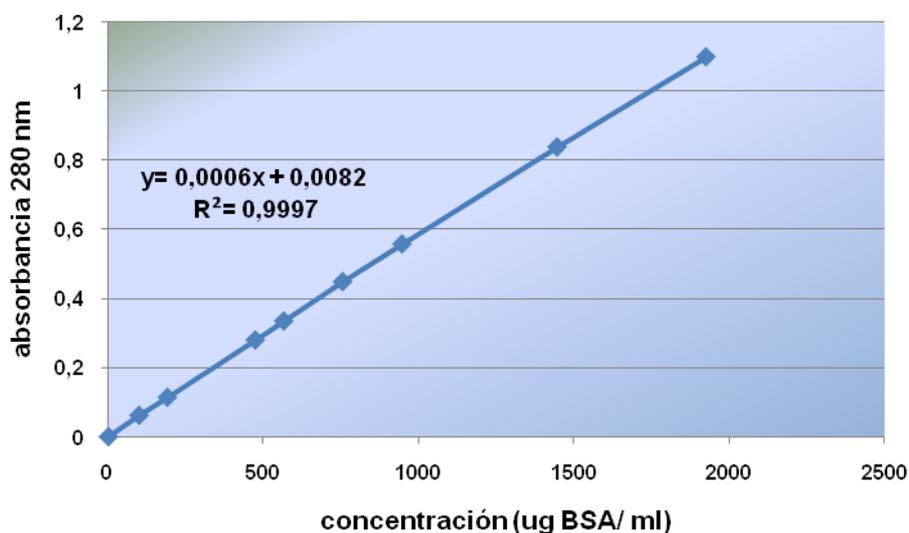


Figura 24. Curva de calibración con BSA para la determinación de la concentración de proteína

Para obtener los valores de concentración de proteína a partir de los datos de absorbancia, la ecuación de la recta se presenta:

$$X = 1\,747,7y - 13,964$$

[3]

ANEXO VIII

Tabla 29. Propiedades de la papaína y flavourzima

Enzima	Papaína	Flavourzima
Número EC	3.4.22.2	3.4.1.2
Fuente	<i>Carica papaya</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
Actividad enzimática	3.18 UA ¹ /mg de enzima	500 LAPU ² /g de enzima
Tipo de acción	Endopeptidasa	Exopeptidasa
PH óptimo	4.5-7.0	5.0-7.0
Temperatura óptima	50-75°C	50-55°C
Amino ácidos específicos	Amplia	
Sitio activo	Cisteína 25	
Inhibidores	Agentes oxidantes, reactivos sulfhidrilo y metales pesados	
Inactivación enzimática	90°C, 10 min.	85°C, 5 min.
Activadores	Agentes reductores, compuestos tiol, EDTA.	

¹UA= Unidad Anson

²LAPU=Unidad leucina aminopeptidasa

ANEXO IX

Fotografías obtenidas de la parte experimental



Figura 25. Aislado de proteína de chocho en polvo



Figura 26. Solubilidad del aislado de proteína de chocho al 9 %



Figura 27. Hidrólisis enzimática del aislado proteico de chocho con papaína



Figura 28. Hidrólisis enzimática del aislado proteico de chocho con papaína y flavourzima



Figura 29. Hidrolizado de proteína de chocho en polvo

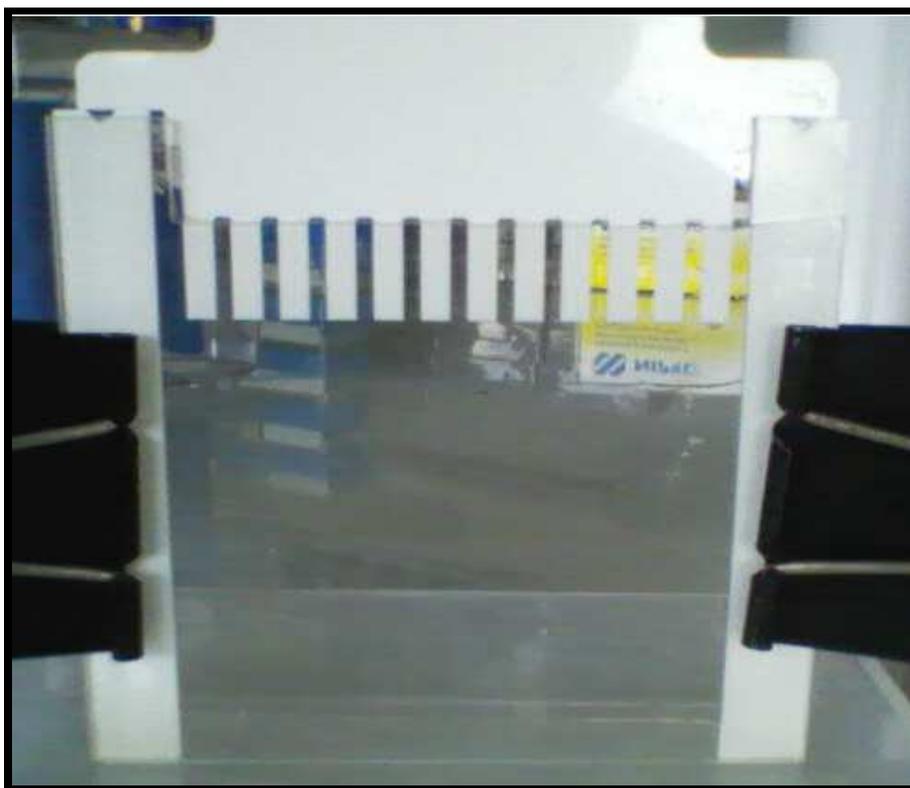


Figura 30. Placas de electroforesis con gel de separación 12,5 % y gel de concentración 5 %



Figura 31. Muestras de aislado e hidrolizado proteico de chocho con tampón de muestra para electroforesis



Figura 32. Muestras proteicas de chocho en la cámara de electroforesis

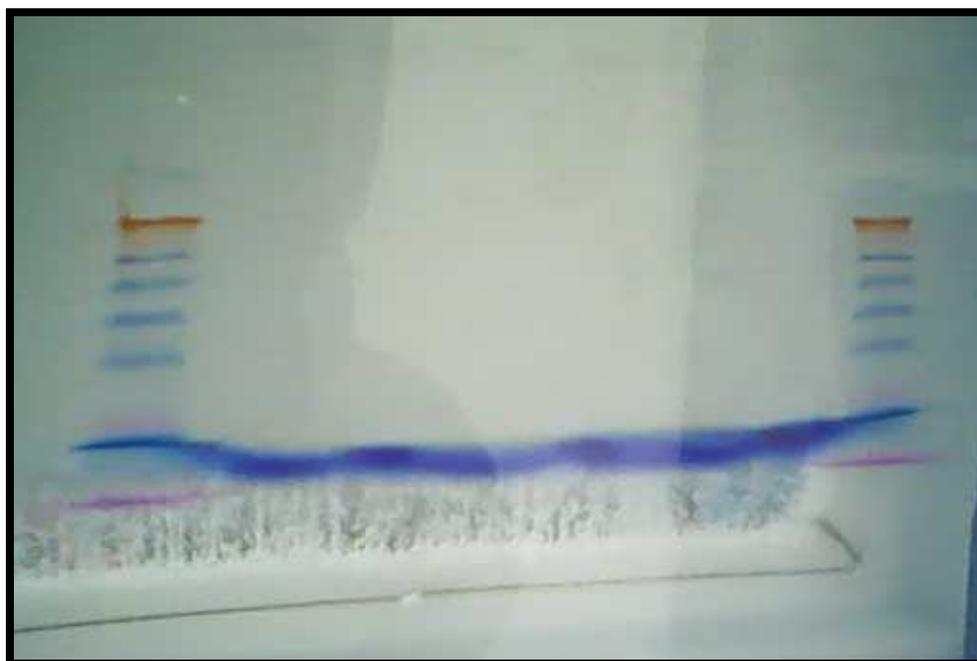


Figura 33. Marcadores de pesos moleculares en la cámara de electroforesis



Figura 34. Ampolleta de hidrólisis ácida del aislado proteico de chocho



Figura 35. Filtración del aislado proteico hidrolizado con HCl



Figura 36. Centrifugación del aislado proteico hidrolizado con HCl



Figura 37. Sobrenadantes obtenidos de la centrifugación del aislado proteico de chocho hidrolizado con HCl