

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**“OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE  
LAS PROTEÍNAS DE LA TORTA DE SACHA INCHI  
(*Plukenetia volubilis* L.)”**

**Presentada por:**

**EDSON MARTÍN AQUINO MÉNDEZ**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGISTER SCIENTIAE EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Lima - Perú**

**2015**

## **DEDICATORIA**

*Dedico este trabajo de investigación a mis padres Juana Graciela Méndez Núñez y Abel Cesar Aquino Garay por darme la vida y en ella la capacidad por superarme y desear lo mejor en cada paso de mi vida. Gracias por ser como son, porque su presencia y persona han ayudado a construir y forjar la persona que ahora soy.*

*Los amo, Dios los bendiga por siempre.*

## AGRADECIMIENTO

*A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarte cada día más.*

*A ti Madre, por haberme educado y soportar mis errores. Gracias por tus consejos, por el amor que siempre me has brindado, por cultivar e inculcar ese sabio don de la responsabilidad.*

*A ti Padre, a quien le debo todo en la vida, le agradezco el cariño, la comprensión, la paciencia y el apoyo que me brindó para culminar mi carrera profesional.*

*A mis Hermanos y familiares por el apoyo que siempre me han brindado y de alguna manera u otra celebraron mi éxito.*

*A mis Maestros, gracias por su tiempo, apoyo y por las enseñanzas que me transmitieron en el desarrollo y transcurso de la maestría, en especial: a la Dra. Rosana Chirinos Gallardo y el Dr. David Campos Gutiérrez por haber guiado el desarrollo de este trabajo de investigación y llegar a la culminación del mismo.*

*A todos mis amigos del IBT: Adelaida, Manuel, Sheila, Melissa, Eric, Ruly, Raquel, Cathy, James y Margot por su valiosa amistad y compañerismo.*

*Gracias a Manuel Guerrero, sin cuya colaboración este trabajo hubiera sido mucho más largo, complicado y menos entretenido. Gracias por tu buen criterio, tu capacidad de esfuerzo y tu simpatía.*

*A mi amor Rosa, gracias por permitirme formar parte de tu vida, gracias por tu amor, gracias por ser como eres, gracias por ser la mujer con los mejores sentimientos que he conocido, gracias por estar a mi lado en los momentos más difíciles, pero sobre todo gracias por enseñarme a creer en mí y motivarme hacer las cosas de la mejor manera.*

*Gracias por todo lo que me enseñaste y apoyaste. ¡Te Amo!*

# ÍNDICE GENERAL

## RESUMEN

## ABSTRACT

	<b>Pág.</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
2.1. Generalidades sobre sachá inchi.....	3
2.1.1. Clasificación taxonómica.....	4
2.1.2. Producción nacional del sachá inchi.....	4
2.2. Composición química del sachá inchi.....	5
2.2.1. Semilla del sachá inchi.....	5
2.2.2. Torta del sachá inchi.....	6
2.3. Aminoácidos de la semilla y torta del sachá inchi.....	8
2.4. Proteínas vegetales.....	9
2.4.1. Solubilidad de las proteínas en el agua.....	12
2.4.2. Clasificación de las proteínas.....	14
2.5. Extracción de proteínas.....	15
2.6. Métodos de extracción de proteínas.....	16
2.6.1. Extracción alcalina y precipitación isoelectrica.....	16
2.6.2. Extracción alcalina con adición de sal.....	17
2.6.3. Extracción enzimática asistida.....	18
2.7. Hidrólisis enzimática de la proteína.....	19
2.7.1. Grado de hidrólisis.....	21
2.7.2. Proteasas comerciales.....	21
2.8. Metodología de superficie de respuesta.....	22
2.8.1. Terminología.....	24

2.8.2. Etapas de optimización.....	27
a. <i>Screening</i> .....	27
b. Escalamiento.....	31
c. Optimización final.....	31
2.8.3. Optimización de respuestas múltiples .....	34
2.8.4. Empleo de la metodología de superficie de respuesta en la optimización de la extracción de proteínas .....	38
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
3.1. Lugar de ejecución .....	41
3.2. Materia prima .....	41
3.3. Materiales, equipos y reactivos.....	41
3.3.1. Materiales .....	41
3.3.2. Equipos .....	42
3.3.3. Reactivos .....	43
3.4. Métodos de análisis .....	43
3.4.1. Análisis proximal.....	43
3.4.2. Determinación de proteína total .....	44
3.4.3. Determinación de proteína soluble.....	44
3.4.4. Rendimiento de proteína.....	44
3.4.5. Grado de hidrólisis total de la harina desgrasada de torta del sacha inchi.....	45
a. Determinación del grado de hidrólisis de la proteína soluble .....	45
3.5. Metodología experimental .....	46
3.5.1. Preparación de la muestra.....	46
3.5.2. Extracción de la proteína de la torta del sachá inchi .....	47
3.6. Diseño experimental .....	48
3.6.1. Extracción alcalina .....	48

3.6.2. Extracción enzimática asistida.....	53
3.7. Análisis estadístico .....	57
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>58</b>
4.1. Materia prima .....	58
4.1.1. Análisis proximal de la torta del sachá inchi.....	58
4.1.2. Contenido de proteína total en la HDTSI.....	59
4.2. Extracción alcalina .....	60
4.2.1. <i>Screening</i> .....	60
4.2.2. Escalamiento.....	66
4.2.3. Optimización del proceso .....	67
4.2.4. Validación del modelo.....	79
4.3. Extracción enzimática asistida.....	80
4.3.1. Optimización del proceso .....	80
a. Rendimiento de proteína.....	81
b. Grado de hidrólisis .....	88
4.3.2. Optimización de respuestas múltiples .....	92
4.3.3. Validación del modelo.....	96
4.4. Comparación de resultados por los dos métodos de extracción de proteínas .....	96
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>100</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>101</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>102</b>
<b>VIII. ANEXOS .....</b>	<b>115</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1:</b> Análisis químico de la semilla del sachá inchi en base seca (%).....	5
<b>Cuadro 2:</b> Análisis centesimales en la semilla de nueve ecotipos del sachá inchi, en base seca.....	6
<b>Cuadro 3:</b> Composición química proximal de la torta del sachá inchi en base seca (%).....	8
<b>Cuadro 4:</b> Perfil de aminoácidos esenciales de la semilla del sachá inchi comparada con otras semillas oleaginosas.....	9
<b>Cuadro 5:</b> Perfil de aminoácidos en la semilla y torta del sachá inchi.....	10
<b>Cuadro 6:</b> Contenido proteínico de las principales semillas cultivadas.....	12
<b>Cuadro 7:</b> Extracción enzimática asistida de algunas fuentes de alimentos.....	20
<b>Cuadro 8:</b> Algunas proteasas disponibles comercialmente de grado alimentario.....	23
<b>Cuadro 9:</b> Representación del análisis de varianza.....	26
<b>Cuadro 10:</b> Coordenadas del diseño compuesto central.....	33
<b>Cuadro 11:</b> Las variables independientes y sus niveles evaluados en el <i>screening</i> .....	51
<b>Cuadro 12:</b> Las variables independientes y sus niveles evaluados en la optimización.....	51
<b>Cuadro 13:</b> Las variables independientes y sus niveles evaluados en la optimización.....	55
<b>Cuadro 14:</b> Composición proximal de la torta del sachá inchi.....	58
<b>Cuadro 15:</b> Contenido de proteína total de la HDTSI.....	59
<b>Cuadro 16:</b> Arreglo factorial $2^K$ con repeticiones en el centro, variables codificadas y la respuesta experimental (observado) y estimada en la etapa de <i>screening</i> (n = 3).....	63
<b>Cuadro 17:</b> ANVA para el modelo lineal en la etapa de <i>screening</i> .....	65
<b>Cuadro 18:</b> Diseño compuesto central, respuesta experimental (observado) y estimada en la etapa de optimización (n = 3).....	69
<b>Cuadro 19:</b> ANVA para el modelo cuadrático en la etapa de optimización.....	71
<b>Cuadro 20:</b> Prueba de significancia de los coeficientes de regresión de la ecuación cuadrática para el rendimiento de proteínas.....	73

<b>Cuadro 21:</b> Condición óptima recomendado por el modelo de segundo orden, respuesta estimada y experimental.....	80
<b>Cuadro 22:</b> Diseño compuesto central, respuesta experimental (observado) y estimada en la etapa de optimización (n = 3). .....	82
<b>Cuadro 23:</b> ANVA para el modelo cuadrático del rendimiento de proteína.....	83
<b>Cuadro 24:</b> Prueba de significancia de los coeficientes de regresión de la ecuación cuadrática para el rendimiento de proteínas. ....	85
<b>Cuadro 25:</b> ANVA para el modelo lineal del grado de hidrólisis. ....	89
<b>Cuadro 26:</b> Prueba de significancia de los coeficientes de regresión de la ecuación lineal para el grado de hidrólisis. ....	90
<b>Cuadro 27:</b> Condición óptima recomendado por los modelos $\hat{Y}_1$ y $\hat{Y}_2$ , respuesta estimada y experimental. ....	96
<b>Cuadro 28:</b> Comparación de los métodos de extracción de proteínas con respecto al rendimiento de proteína. ....	97

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> La torta del sachu inchi, presentado en plaquetas.....	7
<b>Figura 2:</b> Esquema de las técnicas de extracción y fraccionamiento de proteínas y péptidos empleados en los alimentos. ....	16
<b>Figura 3:</b> Diagrama de flujo de la metodología de superficie de respuesta. ....	28
<b>Figura 4:</b> Función de deseabilidad individual para la maximización de una respuesta. ....	35
<b>Figura 5:</b> Función de deseabilidad individual para la minimización de una respuesta. ....	36
<b>Figura 6:</b> Función de deseabilidad para la obtención de un nivel específico de una respuesta.....	37
<b>Figura 7:</b> Diagrama de flujo para la obtención de HDTSI. ....	46
<b>Figura 8:</b> Diagrama de flujo para la extracción alcalina. ....	49
<b>Figura 9:</b> Diagrama de flujo para la extracción enzimática asistida. ....	49
<b>Figura 10:</b> Diagrama de Pareto estandarizado para el DCA con arreglo factorial $2^k$ con réplica en el punto central.....	61
<b>Figura 11:</b> Comparación del rendimiento de extracción de proteínas entre el experimental (observados) y estimado (predichos) por el modelo cuadrático.....	72
<b>Figura 12:</b> Superficie de respuesta del rendimiento de extracción de proteína de la HDTSI en función de los factores: temperatura ( $X_2$ ) y relación materia prima/solvente ( $X_3$ ). Factor constante: concentración de NaCl de 1,25 M ( $X_4$ ). ....	75
<b>Figura 13:</b> Superficie de respuesta del rendimiento de extracción de proteína de la HDTSI en función de los factores: relación materia prima/solvente ( $X_3$ ) y concentración de NaCl ( $X_4$ ). Factor constante: temperatura de 55 °C ( $X_2$ ).....	77
<b>Figura 14:</b> Superficie de respuesta del rendimiento de extracción de proteína de la HDTSI en función de los factores: temperatura ( $X_2$ ) y concentración de NaCl ( $X_4$ ). Factor constante: relación materia prima/solvente 1/35 (p/v) ( $X_3$ ) .....	78
<b>Figura 15:</b> La condición óptima del rendimiento de proteína utilizando el método de la función de deseabilidad en la extracción alcalina.....	79
<b>Figura 16:</b> Comparación del rendimiento de extracción de proteínas entre el experimental (observados) y estimado (predichos) por el modelo cuadrático.....	84

<b>Figura 17:</b> Superficie de respuesta del rendimiento de extracción de proteína de la HDTSI en función de los factores: concentración de enzima ( $Z_1$ ) y tiempo de extracción ( $Z_2$ ).....	87
<b>Figura 18:</b> Superficie de respuesta del grado de hidrólisis de la HDTSI en función de los factores: concentración de enzima ( $Z_1$ ) y tiempo de extracción ( $Z_2$ ).....	91
<b>Figura 19:</b> Gráfica de contorno sobrepuesto del rendimiento de proteína (%) y grado de hidrólisis (%), en función de los factores concentración de enzima ( $Z_1$ ) y tiempo de extracción ( $Z_2$ ). ....	94
<b>Figura 20:</b> Condición óptima del rendimiento de proteína y grado de hidrólisis utilizando el método de la función de deseabilidad global de Derringer en la extracción enzimática asistida.....	95

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1:</b> Curva estándar de albúmina de suero de bovino .....	115
<b>ANEXO 2:</b> Curva estándar de leucina .....	116
<b>ANEXO 3:</b> Análisis de varianza para el grado de hidrólisis (modelo cuadrático) .....	117

## RESUMEN

En la presente investigación se optimizaron los factores de la extracción alcalina y la extracción enzimática asistida de la proteína del sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.), a partir de la torta desgrasada, aprovechando su alto contenido proteico (61,98 %; base seca) y empleándose para la optimización la metodología de superficie de respuesta (MSR). En el método de extracción alcalina, se realizó en primera instancia un *screening* para determinar las variables que afectan la extracción de la proteína del sachá inchi utilizando para ello el diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial  $2^k$  con réplica en el punto central, donde se determinó los factores más influyentes sobre el rendimiento de extracción de la proteína (variable respuesta), el pH, la temperatura, la relación materia prima/solvente y la concentración de NaCl. En la etapa de optimización se utilizó un diseño compuesto central (DCC), dando como resultado las siguientes condiciones óptimas: temperatura de 54,2 °C, relación materia prima/solvente de 1/41,8 (p/v) y concentración de NaCl de 1,65 M, bajo las condiciones de pH 9,5 y tiempo de 15 min; obteniendo un rendimiento máximo de 30,2 g de proteína soluble/100g de proteína total (valor experimental). En el método de extracción enzimática asistida, se aplicó directamente la optimización mediante el DCC para el rendimiento de extracción de proteína (maximizar) y el grado de hidrólisis (minimizar). Posteriormente, se aplicó una optimización de respuestas múltiples mediante la función de deseabilidad global de Derringer, con la finalidad de obtener ambas respuestas simultáneamente, dando como resultado las condiciones óptimas para cada factor de concentración de enzima Alcalasa de 5,62 % y el tiempo de extracción de 40,49 min; bajo las condiciones de pH 9,0, relación materia prima/solvente 1/50 (p/v) y temperatura de 55 °C, obteniendo un rendimiento máximo de 44,78 g de proteína soluble/100g de proteína total y un mínimo grado de hidrólisis de 7,86 % (valor experimental). Habiéndose recuperado un aproximado de 48 % más de proteína respecto al método de extracción alcalina.

**Palabras claves:** *Plukenetia volubilis*, superficie respuesta, extracción alcalina, extracción enzimática, DCC, grado hidrólisis.

## ABSTRACT

In this research factors alkaline extraction and enzymatic extraction assisted protein sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) are optimized, from the defatted cake, taking advantage of its high protein content (61,98 % dry basis) and being used to optimize the response surface methodology (RSM). In the alkaline extraction method it was performed primarily a screening to determine the variables that affect protein extraction sacha inchi by using the completely randomized design (CRD) with factorial  $2^k$  with replication in the central point, where the most influential factors on the extraction yield of the protein (response variables), pH, temperature, raw material/solvent ratio and the concentration of NaCl was determined. It used a central composite design (CCD) in step optimization, resulting in the following optimum conditions: temperature of 54,2 °C, solvent/raw material ratio 41,8/1 (v/w) and NaCl concentration 1,65 M, under the conditions of pH 9,5 and 15 min time; obtaining a maximum 30,2 g yield of soluble/100 g of total protein (experimental value) protein. In the method of assisted enzymatic extraction, optimization is directly applied by CCD for protein extraction yield (maximize) and the degree of hydrolysis (minimize). Subsequently, a multiple response optimization was applied using the function of Derringer overall desirability, in order to obtain both responses simultaneously, resulting in optimal conditions for each factor Alcalase enzyme concentration of 5,62 % and the time extracting 40,49 min; under the conditions of pH 9,0, solvent/raw material ratio 50/1 (v/w) solvent and temperature of 55 °C material, obtaining a maximum 44,78 g yield of soluble/100 g of total protein and a minimum degree of hydrolysis of 7,86 % (experimental value). Having recovered approximately 48 % more protein relative to the alkaline extraction method.

**Keywords:** *Plukenetia volubilis*, response surface, alkaline extraction, enzyme extraction, CCD, hydrolysis degree.

## I. INTRODUCCIÓN

Las proteínas vegetales constituyen hoy en día una fuente importante para la nutrición humana, especialmente en poblaciones de bajos ingresos de los países en desarrollo (Evangelista, 2006). Debido a los suministros insuficientes de proteínas de calidad, se ha realizado una constante búsqueda de nuevas fuentes de proteínas, especialmente procedentes de las semillas leguminosas, oleaginosas y cereales, que han aumentado considerablemente en las últimas décadas, como alternativas a las proteínas animales en la nutrición, como agentes funcionales y componentes bioactivos no solo en los alimentos, sino también en cosméticos y productos farmacéuticos (Zivanovic *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2014).

El sacha inchi, es una planta oleaginosa de la familia Euphorbiaceae, que crece en las selvas tropicales del Perú en altitudes entre 200 y 1500 m.s.n.m. Las semillas contienen alrededor de 54 % de aceite y 27 % de proteínas, ocupando un lugar importante entre las semillas oleaginosas más producidas en todo el mundo (soja, colza, algodón, maní y girasol) (Guillén *et al.*, 2003; FAO, 2009). En el Perú, la producción del sacha inchi ha ido en aumento, alcanzando en el 2010 un total de 860,28 TM; siendo la principal zona de producción San Martín (DRASAM, 2010; citado por García, 2013). La finalidad principal de su cultivo es la obtención de aceite virgen y como subproducto de la extracción, se obtiene un residuo que recibe el nombre de torta.

La torta del sacha inchi es una valiosa fuente dietética de proteína 59 % (Pascual y Mejía, 2000; Ruiz *et al.*, 2013). Sin embargo, no se ha utilizado como ingrediente alimentario humano, ya que el concentrado o aislado de proteína no se produce comercialmente debido a la falta de un método de extracción de proteína tecnológicamente factible. Sin embargo la torta del sacha inchi está siendo ampliamente utilizado en la alimentación de aves (Muirragui, 2013) y peces (Escobedo, 2013).

Entre los métodos más comunes que se recurren para la extracción de proteínas vegetales son a base de álcali, ácido y asistida con enzimas. La extracción con ácidos, parece menos prometedora, ya que, la extracción de las proteínas es deficiente obteniendo valores muy inferiores (Sari *et al.*, 2013). La extracción alcalina muestra mejores resultados y ha sido probado en varias semillas oleaginosas como las semillas de calabaza (Quanhong y Caili, 2005), semillas de sandía (Wani *et al.*, 2008), semillas de pimiento (Firatligil- Durmus y Evranuz, 2010), harina de canola (Tan *et al.*, 2011), semillas de uva (Lv *et al.*, 2011), avellana chilena (Villarroel *et al.*, 2012), torta de palma (Chee y Ayob, 2013), entre otras. Aunque, una extracción alcalina demasiado severa conduce a varios efectos negativos, como la racemización de los aminoácidos, la reducción de la digestibilidad de la proteína y el daño de algunos aminoácidos (lisina y cisteína) que reducen el valor nutritivo de las proteínas (Schwass y Finley, 1984). Para evitar la desnaturalización de la proteína y reacciones secundarias durante la extracción, se ha considerado la extracción asistida con enzimas como una buena opción, (1) las carbohidrasas (celulasa, hemicelulasa y pectinasa) (Ansharullah *et al.*, 1997; Guan y Yao, 2008) y (2) las proteasas (Shen *et al.*, 2008).

La eficiencia de la extracción de la proteína puede ser afectada por varios factores (temperatura, pH, tiempo, adición de sales, concentración de enzima, relación sustrato solvente, tamaño de partículas, etc.) en el proceso y sus efectos pueden ser independientes o interactivos. Por lo tanto, la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) se convierte en una herramienta útil para optimizar los factores de extracción, evaluar los múltiples factores e identificar sus interacciones significativas con el reducido número de ensayos experimentales (Wani *et al.*, 2008). Por lo general se utiliza un diseño experimental, tal como el Diseño Compuesto Central (DCC) para adaptarse a un modelo polinomial de segundo orden completamente empírico (Ortega *et al.*, 2005).

Los objetivos del presente trabajo de investigación fueron: (1) Determinar los factores que afectan la extracción de la proteína procedente de la torta del sachá inchi; (2) Maximizar el rendimiento de extracción de la proteína a partir de la torta del sachá inchi mediante el método alcalino y el método con enzima asistida utilizando la MSR.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Generalidades sobre sacha inchi

El sacha inchi es una especie vegetal de la familia de Euphorbeaceae, comúnmente llamado también maní del monte, sacha maní, maní del Inca, sacha inchic, maní jibaro, mountain peanut, inca peanut, inca nut (Gorriti, 2013). Esta planta nativa crece en la Amazonía y en las gradientes altitudinales en América del Sur hasta Bolivia. Se puede cultivar desde los 50 hasta los 2100 metros de altitud. Actualmente, se cultiva en la selva alta y baja del Perú, en la región San Martín y en toda la cuenca de los ríos Huallaga y Mayo (Adrianzén *et al.*, 2011).

Esta planta nativa de la Amazonía peruana ha sido conocida y utilizada por los pobladores de estas regiones por miles de años; fue utilizada por los pre-incas e Incas en su alimentación, como se evidencia en los ceramios Mochica y Chimú y en tumbas prehispánicas que sugieren que civilizaciones pre incas la consumían 3000 A.C. (García, 2013).

Como muchas otras especies amazónicas, el sacha inchi se desarrolla mejor en climas cálidos, húmedos y en suelos ácidos y arcillosos. Es un cultivo que presenta características favorables para la reforestación y su producción se inicia entre 6 y 7 meses después del trasplante, con rendimientos promedio de entre 0,7 y 2,5 toneladas por hectárea a los 16 meses después de haber sido realizado el trasplante (García, 2013).

La semilla del sacha inchi, dependiendo de sus características varietales, posee un contenido de grasas que oscila entre 49 % y 54 %, además de poseer entre un 29 y 33 % de proteínas. Esta proteína presenta un contenido importante de aminoácidos esenciales y no esenciales, altas cantidades de vitamina A, E y yodo (Rojas, 2003).

### 2.1.1. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de acuerdo a Téllez (2008) es la siguiente:

<b>Reino</b>	:	Plantae
<b>División</b>	:	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	:	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	:	Rosidae
<b>Orden</b>	:	Euphorbiales
<b>Familia</b>	:	Euphorbiaceae
<b>Género</b>	:	<i>Plukenetia</i>
<b>Especie</b>	:	<i>volubilis</i> Linneo.

### 2.1.2. Producción nacional del sacha inchi

En el Perú se produce sacha inchi en San Martín, Loreto y Ucayali. Las zonas productoras del sacha inchi en San Martín se encuentran concentradas en la cuenca del Huallaga (Tocache en el alto Huallaga, Picota y Bellavista en Huallaga Central, provincia de Lamas, Valle de Sisa, Alto Mayo y Bajo Mayo). Existe, según la Dirección Estadística de la DRASAM un área potencial de aproximadamente 20000 hectáreas en la zona para el desarrollo del cultivo, en su mayoría en la parte centro del departamento (DRASAM, 2010; citado por García, 2013).

Las series históricas demuestran un incremento continuo en el área cultivada; en el caso de la región San Martín, en el año 2005 – 2006 el área cultivada fue de 1266 Ha logrando una producción de 209,50 TM; en el año 2006 – 2007 se redujo a 907,50 Ha y una producción de 524 TM; en la campaña 2007 – 2008 se incrementó a 1755 Ha logrando una producción de 882,50 TM; en el año 2008 – 2009 aumentó a 1908 Ha y una producción de 694 TM y en el 2009 – 2010 el cultivo se incrementó a 1918,50 Ha produciendo 860,28 TM (DRASAM, 2010; citado por García, 2013).

## 2.2. Composición química del sachá inchi

### 2.2.1. Semilla del sachá inchi

Los primeros reportes de análisis fueron realizados en la Universidad de Cornell (USA), que indican que la almendra de las semillas contiene 54,8 % de aceite y 28,52 % de proteína, además, se señala que el aceite de sachá inchi tiene un alto contenido de ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico y linoléico) (Hazen y Stoewesand, 1980; citado por Manco, 2006).

Mientras que Hamaker *et al.* (1992) obtuvieron 54 % de aceite y 27 % de proteína; valores muy similares a los indicados por Hazen y Stoewesand (1980); citado por Manco (2006). Así mismo, García (1992) reportó los siguientes resultados con respecto a la composición química proximal del sachá inchi: proteína 24,22 %, grasa 43,10 %, carbohidratos 7,72 % y ceniza 2,80 %. Por otro lado, Benavides y Morales (1994) obtuvieron en su caracterización un 54 % de aceite y 28 % de proteínas en esta semilla. Pascual y Mejía (2000) reportaron resultados en el análisis químico proximal de la semilla del sachá inchi, con un alto contenido de proteínas, como se muestra en el Cuadro 1.

**Cuadro 1: Análisis químico de la semilla del sachá inchi en base seca (%).**

<b>Componentes</b>	<b>Pascual y Mejía (2000)</b>	<b>Jagersberger (2013)</b>	<b>Ruiz <i>et al.</i> (2013)</b>
Proteína	25,86	21,97	29,6
Grasa	54,90	40,48	49
Fibra	12,07	21,26	6,6
Ceniza	2,87	2,66	2,7
Carbohidratos	4,3	13,63	12,1

Por otro lado, Merino *et al.* (2008) realizaron la caracterización química de las semillas de nueve ecotipos del sachá inchi. del “Centro de Investigaciones de Pucayacu” en Tarapoto y San Martín. Se determinó que los mejores ecotipos en cuanto a los valores de proteínas totales, reportaron mayor porcentajes los ecotipos 12 y 18 con 44,55 % y 45,07 % respectivamente, y menor porcentaje el ecotipo 17 con 33,58 %, así como se muestra en el Cuadro 2.

**Cuadro 2: Análisis centesimales en la semilla de nueve ecotipos del sachá inchi, en base seca.**

Ecotipos	Análisis centesimales (%)			
	Ceniza	Proteína	Grasa	Carbohidratos
2	2,20	35,43	21,50	47,15
3	2,46	36,50	16,15	52,05
4	2,44	35,34	21,52	50,85
5	2,55	36,63	15,08	52,96
6	2,36	37,44	12,05	55,75
9	2,30	37,05	8,34	59,24
12	2,60	44,55	9,58	50,08
17	2,34	33,58	10,73	60,13
18	2,38	45,07	8,08	50,53

**FUENTE:** Merino *et al.* (2008).

Gutiérrez *et al.* (2011) reportaron con respecto a la composición química en la semilla del sachá inchi, un contenido de humedad, aceite, proteína, carbohidrato y cenizas de 3,3 %, 41,4 %, 24,7 %, 30,9 % y 4 %, respectivamente y principales minerales presentes en la semilla al potasio (5563,5 ppm), magnesio (3210 ppm) y calcio (2406 ppm).

Sathe *et al.* (2012) analizaron muestras de harinas desengrasadas de semillas del sachá inchi, determinando su porcentaje de proteína (59,1 %); humedad (8,32 %); cenizas (6,46 %) y el contenido de hidratos de carbono solubles en la harina desengrasada (1,03 %).

### **2.2.2. Torta del sachá inchi**

La torta es un subproducto resultante de la trituración de las semillas para obtener aceite comestible, representa una importante fuente de proteínas, especialmente por las características nutricionales y funcionales que puede aportar a los alimentos (Kinsella, 1976). El sistema de fabricación que se emplea para facilitar la separación del aceite en las semillas, requiere el uso del vapor indirecto (alta temperatura) y la fricción de la prensa continua durante el proceso. El proceso a elevada temperatura, utiliza prensas continuas para extraer el aceite de las semillas debidamente acondicionadas (rotura y laminación

previa), produciendo tortas que con un contenido residual de aceite entre el 8 – 10 % (Aceites de Semillas, 2009).

Según Cheftel y Cheftel (1980) la extracción del aceite se efectúa, mediante presión, seguida en algunos casos de un disolvente. No obstante, dada la diversidad de materias primas vegetales, la extracción suele ir precedida de distintos tratamientos mecánicos, para eliminar materias extrañas o conseguir el descascaro y rotura. En ciertos casos antes o después del triturado, se aplica un tratamiento con vapor (15 a 90 mm a 70 – 130 °C), pues tiene la ventaja de hacer estallar las células, con lo que el aceite se libera más fácilmente y se destruyen algunas sustancias indeseables, como el gopipol, presente en las semillas de algodón, así aumenta el rendimiento pero la calidad desciende.

Por otra parte, Cheftel y Cheftel (1980) mencionan que para la obtención de aceite virgen, se realiza exclusivamente por presión en frío con prensa hidráulica, sin ninguna otra operación salvo la decantación, centrifugación, filtración y desaireación bajo vacío, en frío; para evitar cualquier tipo de desnaturalización de sus propiedades y asegurar la estabilidad de las moléculas de los ácidos grasos. Según Ferchau (2000) la torta obtenida por prensado en frío, son más valiosos en aceite residual (8 – 12 %) y por lo tanto es más útil para la alimentación de animales, que la torta obtenido normalmente por prensado en caliente o extracción con solventes. En la Figura 1 se muestra la presentación final de la torta del sachá inchi (plaquetas), después del proceso de prensado en frío.



**Figura 1: La torta del sachá inchi, presentado en plaquetas.**

**FUENTE:** Archivo propio (2015).

Pascual y Mejía (2000) determinaron un alto porcentaje de proteínas (58,72 %) en la torta del sachu inchi proveniente de Pucallpa; Mercado (2012) determinó un 53 % de proteína, proveniente de San Martín, mientras que Jagersberger (2013) encontró un 51,76 %, proveniente de Amazonas y Ruiz *et al.* (2013) encontraron un 59 % de proteína, en la torta de la semilla proveniente de San Martín. En el Cuadro 3 se presenta la composición proximal de la torta del sachu inchi, reportados por los autores citados.

**Cuadro 3: Composición química proximal de la torta del sachu inchi en base seca (%).**

<b>Componentes</b>	<b>Pascual y Mejía (2000)</b>	<b>Mercado (2012)</b>	<b>Jagersberger (2013)</b>	<b>Ruiz <i>et al.</i> (2013)</b>
Proteína	59,13	53,73	51,76	59
Grasa	6,93	20,49	19,9	7,8
Fibra	17,30	3,12	21,43	4,5
Ceniza	8,72	6,07	5,50	4,8
Carbohidratos	7,91	18,83	1,41	23,9

### **2.3. Aminoácidos de la semilla y torta del sachu inchi**

El perfil de aminoácidos del sachu inchi es comparable con algunas oleaginosas. Según Hamaker *et al.* (1992) el perfil de aminoácidos de la semilla del sachu inchi incluye fenilalanina + tirosina (79 mg/g), leucina (64 mg/g), tirosina (55 mg/g), isoleucina (50 mg/g), lisina (43 mg/g), treonina (43 mg/g) y valina (40 mg/g). Los niveles de leucina y lisina son menores que en la proteína de soya, aunque iguales o mejores que la proteína de maní, algodón o girasol. El contenido de aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), tirosina, treonina y triptófano se presentó en mayores cantidades. El triptófano fue más del doble y la cisteína cercana al doble de los niveles de las otras fuentes proteicas tal como se muestra en el Cuadro 4.

Sathe *et al.* (2002) solubilizaron las proteínas de la semilla del sachu inchi y cuantificaron los aminoácidos más abundantes: ácido glutámico (133 mg/g de proteína) y la glicina (118 mg/g de proteína). Las proteínas solubilizadas mostraron un patrón polipeptídico que se caracterizó en el rango de 10 – 70 kDa. En un estudio reciente, Ruiz *et al.* (2013) compararon el perfil de aminoácidos de la semilla y torta del sachu inchi, encontrando

deficiencia en los aminoácidos lisina, leucina y fenilalanina + tirosina, en la torta, dichos resultados se presenta en el Cuadro 5.

**Cuadro 4: Perfil de aminoácidos esenciales de la semilla del sachá inchi comparada con otras semillas oleaginosas.**

Aminoácidos	Sachá inchi	Soya	Maní	Algodón	Girasol	Canola *	FAO/OMS Patrón de puntuación
Total de proteína, %	27	28	23	33	24	25	-
Histidina	26	25	24	27	23	27	19
Isoleucina	50	45	34	33	43	40	28
Leucina	64	78	64	59	64	70	66
Lisina	43	54	35	44	36	58	58
Metionina	12	13	12	13	15	19	-
Cisteína	25	13	13	16	15	17	-
Metionina + Cisteína	37	26	25	29	30	36	25
Fenilalanina	24	49	50	52	45	19	-
Tirosina	55	31	39	29	19	31	-
Fenilalanina + Tirosina	79	80	89	81	54	50	53
Treonina	43	39	26	33	37	45	34
Triptófano	29	13	10	13	14	13	11
Valina	40	48	42	46	51	50	35

**FUENTE:** Hamaker *et al.* (1992); Shahidi (1990)\*.

Los valores mostrados están en mg/g de proteína (N x 6.25).

#### 2.4. Proteínas vegetales

Las proteínas vegetales juegan un papel importante en la nutrición humana, especialmente en los países en desarrollo, donde la ingesta promedio de proteínas es inferior a la requerida (Evangelista *et al.*, 2006). Debido a los suministros insuficientes de proteínas de calidad, ha habido una constante búsqueda de legumbres no convencionales y oleaginosas como nuevas fuentes de proteínas para su uso como ingredientes de alimentos funcionales y suplementos nutricionales (Chang *et al.*, 2014).

**Cuadro 5: Perfil de aminoácidos en la semilla y torta del sachu inchi.**

Aminoácidos	Contenido en mg/g de proteína		
	Semilla	Torta	FAO/OMS
Ácido aspártico	14	11	-
Ácido glutámico	30	21	-
Asparagina	80	46	-
Serina	18	61	-
Treonina	36	64	34
Glicina	218	201	-
Alanina	14	22	-
Arginina	44	17	-
Prolina	23	59	-
Valina	40	47	35
Metionina	14	17	-
Isoleucina	26	30	28
Leucina	37	39	66
Fenilalanina	13	20	-
Cisteína	8	11	-
Metionina + Cisteína	22	28	25
Lisina	28	12	58
Histidina	17	32	19
Tirosina	58	24	-
Glutamina	31	65	-
Triptófano	13	11	11

**FUENTE:** Ruiz *et al.* (2013).

Las proteínas vegetales que se aplicaran con éxito en productos alimenticios, deben poseer varias características deseables, tales como propiedades funcionales y un contenido adecuado de aminoácidos esenciales (Semiu *et al.*, 2009). Las proteínas que se utilizan en la industria alimentaria son de diversas fuentes, tales como animal (gelatina), vegetal (soja, maní y proteínas de marañón), y derivados de fuente animal (proteínas de la leche). Con el aumento de las necesidades de proteínas, las nuevas fuentes han sido desarrolladas, tales como concentrados y aislados de proteína de anacardos (Semiu *et al.*, 2009) y semillas de algodóncillo (Mila *et al.*, 2009). Recientemente, se ha convertido en popular obtener proteínas tanto con funcionalidad ideal y bioactividad, tales como el aislado de proteína de semilla de colza, que exhibe actividad antioxidante (Semiu *et al.*, 2009) y el de lupino que muestra actividad antihipertensiva (Boschin *et al.*, 2014).

La función biológica de las principales proteínas vegetales que se explotan comercialmente es formar parte del endosperma de la semilla, a la que nutren durante la germinación y desarrollo, procesos durante los que se modifican los niveles de las diferentes proteínas. El grupo proteínico preponderante varía de acuerdo al grupo de plantas del que se trate: en el caso de los cereales dominan las glutelinas, en las leguminosas las globulinas (Badui, 2006).

Las proteínas de origen vegetal son usadas como ingredientes en formulas nutricionales dietéticas y productos emulsionados e igualmente como extensores en productos cárnicos (Andújar *et al.*, 2000; citado por Jaimes *et al.*, 2012). El Codex Alimentarius (1995) los denomina Productos Proteínicos Vegetales (PPV), los cuales pueden clasificarse dependiendo de su porcentaje de proteínas en: harinas proteínicas (50 – 65 %), concentrados proteínicos (65 – 90 %) y aislados proteicos (> 90 %). Los aislados proteicos son la forma comercial más purificada, que se logran eliminando los polisacáridos, oligosacáridos y algunos otros componentes ya sea por: hidrólisis y posterior precipitación, por adición de ácido, controlando los diferentes parámetros como: el pH, temperatura, solubilidad y otros, que permiten el enriquecimiento de la proteína requerida (Bohinski, 1976). En el Cuadro 6 se presenta las diversas proteínas vegetales según su contenido de proteína total.

**Cuadro 6: Contenido proteínico de las principales semillas cultivadas.**

<b>Cultivo</b>	<b>Proteína total %</b>
<b>Leguminosas</b>	
Garbanzo	20 – 28
Haba	20 – 30
Lenteja	23 – 29
Frijol	19 – 21
Chícharo	21 – 28
Cacahuete	25 – 28
Soya	32 – 42
<b>Oleaginosas</b>	
Algodón	17 – 21
Colza	20 – 25
Ajonjolí	25
Girasol	27

**FUENTE:** Badui (2006).

#### **2.4.1. Solubilidad de las proteínas en el agua**

La solubilidad de las proteínas está determinada por tres factores principales: (1) su grado de hidratación, (2) su densidad y distribución de cargas a lo largo de la cadena, y (3) la presencia de compuestos no proteicos como fosfatos, carbohidratos o lípidos que puedan tener un efecto estabilizante (Badui, 2006). Desde el punto de vista termodinámico, la solubilización corresponde a una disociación simultánea de las moléculas del disolvente y de las moléculas de proteínas, previa a una dispersión de estas últimas en el disolvente, con una superficie interfacial de máximo contacto entre la proteína y el disolvente. Por tanto, para que una proteína pueda solubilizarse será necesario que reaccione, en todo lo posible, con el disolvente (enlaces hidrógeno, interacciones dipolo – dipolo e iónicas). La solubilidad depende fundamentalmente del pH, fuerza iónica, tipo de disolvente, temperatura (Cheftel *et al.*, 1989) y relación materia prima: solvente (Rodrigues *et al.*, 2012).

### **a. Influencia del pH**

Una proteína, con valores de pH superiores o inferiores al punto isoeléctrico, tiene carga negativa o positiva y las moléculas de agua reaccionan con estas cargas contribuyendo así a su solubilización. Además, las cadenas proteicas que llevan cargas eléctricas del mismo signo, tienen tendencia a repelarse y por tanto a disociarse y desdoblarse. Si se representa, en función del pH, las variaciones de la solubilidad de una proteína determinada, se obtiene, corrientemente, una curva en V o en U, en la que el mínimo corresponde al punto isoeléctrico (pI). La solubilidad, y por tanto el rendimiento de la extracción, es mayor a pH alcalino que a pH ácido. Para valores de pH próximos al pI, las moléculas proteicas que manifiestan un mínimo de interacciones con el agua y sus cargas netas, son lo bastante débiles para que puedan aproximarse las cadenas polipeptídicas. Algunas veces, se forman estos agregados, lo que puede conducir a una precipitación. La cantidad de precipitado aumenta cuando la densidad de los agregados difiere mucho de la del disolvente y es grande el diámetro de los nuevos agregados (Cheftel *et al.*, 1989).

### **b. Influencia de la temperatura**

A pH y fuerza iónica constante, un incremento moderado de la temperatura, hasta alrededor de 40 °C, mejora la solubilidad de las proteínas. Las temperaturas más altas conllevan a su desnaturalización y a la exposición de residuos hidrófobos inicialmente encerrados en el interior de la estructura. La solubilidad disminuye de manera importante por aumento de las fuerzas de atracción entre las proteínas (Jeantet *et al.*, 2010).

### **c. Influencia de la fuerza iónica**

El efecto de la fuerza iónica sobre la solubilidad de las proteínas se manifiesta en dos fases. Para las concentraciones bajas de sal, un incremento de la fuerza iónica favorece la aparición de carga en la superficie de la proteína lo que aumenta su potencial de superficie y su hidratación: la solubilidad de la proteína aumenta, es el efecto *salting-in*. Para valores elevados de fuerza iónica, las cargas de superficie de la proteína están neutralizadas y la hidratación disminuye: la solubilidad disminuye, lo que puede conducir a la precipitación, es el efecto *salting-out* (Jeantet *et al.*, 2010).

#### **d. Influencia de los disolventes**

La adición de algunos disolventes, tales como el etanol o la acetona, a una solución acuosa de proteína, disminuye la constante dieléctrica del medio. De esta forma disminuyen las fuerzas electrostáticas de repulsión existentes entre las moléculas proteicas, lo que contribuye a su agregación y precipitación. Estos disolventes entran así en competencia con las moléculas de agua y por tanto pueden reducir la solubilidad de las proteínas (Cheftel *et al.*, 1989).

#### **e. Influencia relación materia prima/solvente**

La cantidad de materia prima a solubilizar en el sistema, influye significativamente en la composición y cantidad porcentual de la proteína recuperada, sin embargo el solvente (solución extraente que es ajustada a pH de extracción) debe ser adecuado para que no se sature los componentes proteicos solubilizados, lo que indica que es de vital importancia determinar la relación apropiada para que sea adecuado entre la cantidad de disolvente y la cantidad de proteínas a solubilizar (Ventura *et al.*, 2005).

#### **2.4.2. Clasificación de las proteínas**

Según Badui (2006) las cuatro categorías en las que se clasifican las proteínas de acuerdo con las características de solubilidad son las siguientes:

- Albuminas: Se solubilizan en agua a pH 6,6.
- Globulinas: Son solubles en soluciones salinas diluidas a pH 7.
- Glutelinas: Son solubles en soluciones ácidas (pH 2) y alcalinas (pH 12).
- Prolaminas: Son solubles en etanol al 70 %.

Cabe mencionar que las prolaminas como las glutelinas son proteínas altamente hidrofóbicas. Algunas proteínas globulares conservan una fuerte solubilidad a cualquier valor de pH (Jeantet *et al.*, 2010).

Sathe *et al.* (2012) reportaron que la albumina, globulina y glutelina fueron las fracciones más importantes entre las proteínas solubles de la harina de semilla del sachu inchi, la prolamina contribuye en pequeña proporción. Señala también que el 90 % de proteínas de la harina de semilla del sachu inchi pueden solubilizarse y que las fracciones de proteínas, albúminas (43,7 %), globulinas (27,3 %), prolaminas (3 %) y glutelinas (31,9 %) representaron el total de proteínas solubles acuosas.

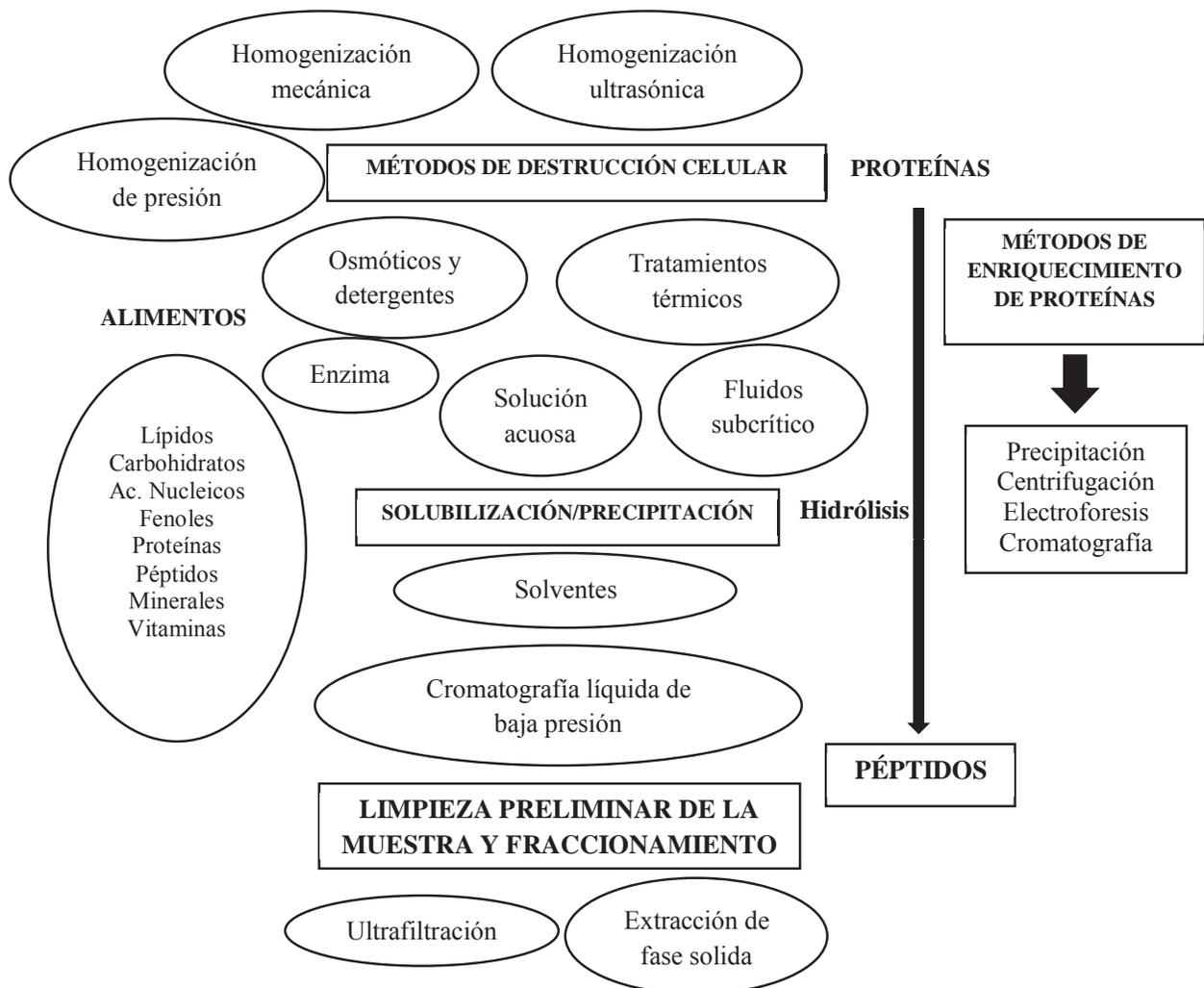
## **2.5. Extracción de proteínas**

Callisaya (2011) indica que la moderna tecnología de alimentos permite una utilización más eficaz de las proteínas vegetales, mediante la elaboración de extractos proteicos de mayor calidad, además del adecuado control de sus propiedades hace que su utilización sea cada vez más frecuente en la formulación de alimentos nuevos. Entre los fines perseguidos cuando se extraen las proteínas vegetales están: nutricional, funcional, organoléptico y económico.

Linden y Lorient (1996) reportan que en la solubilización de la proteína intervienen al menos cuatro factores simultáneamente: pH, fuerza iónica, temperatura y el tipo de solvente. Los pH<sub>s</sub> alcalinos producen una máxima solubilidad de la proteína; sin embargo a partir de pH 10 se provoca una racemización de los aminoácidos y la formación de puentes covalentes intra o intermoleculares disminuyendo la digestibilidad de la proteína. El aumento considerable de la fuerza iónica disminuye la solubilidad a pH extremos, las temperaturas bajas son preferidas pues son poco desnaturizantes.

Según Rodríguez (1981) los factores que también intervienen en la extracción de la proteína son: el tamaño de partícula de la harina y la relación solvente/materia prima. A un menor tamaño de partícula de la harina y una mayor relación materia prima/solvente se obtiene una mayor solubilidad proteica; estas relaciones tienen un límite de máxima efectividad las cuales están en función del tipo de materia prima utilizada. Fennema (2010) indica para la obtención de proteína aislada de leguminosas utilizar semillas desgrasadas, para poder extraer la proteína, la presencia de lípidos provoca durante la solubilización alcalina la formación de emulsiones establecidas por las proteínas, las cuales son resistentes a la centrifugación.

En la Figura 2, se muestra una visión integral de técnicas de extracción y fraccionamiento de proteínas y péptidos en los diversas fuentes de alimentos.



**Figura 2: Esquema de las técnicas de extracción y fraccionamiento de proteínas y péptidos empleados en los alimentos.**

**FUENTE:** Martínez *et al.* (2013).

## 2.6. Métodos de extracción de proteínas

### 2.6.1. Extracción alcalina y precipitación isoelectrica

Este procedimiento se basa en la solubilización de las proteínas en un medio alcalino; la solución se filtra y se centrifuga para eliminar los polisacáridos insolubles (incluye la fibra)

(Fennema, 2010). Fidantsi y Doxastakis (2001) indican que mediante este método de extracción proteica se obtiene principalmente globulinas y una considerable cantidad de polisacáridos pero no albúminas.

Según Ramírez *et al.* (2007); citado por Urrutia (2010) este método consiste en el uso de una base para solubilizar las proteínas, comúnmente se utiliza hidróxido de sodio NaOH para la extracción alcalina, posteriormente se procede a la precipitación isoeléctrica (solubilidad mínima de las proteínas a pH alrededor de 4,5). Generalmente el procedimiento consiste en mezclar harina con agua destilada en relación de 1/10, ajustando el pH a 9 con NaOH 0,1 N. La extracción se realiza agitando la suspensión por 45 minutos a temperatura ambiente. Para separar la proteína extraída del residuo, el extracto se centrifuga a 10000 rpm. La precipitación de las proteínas aisladas se realiza ajustando el pH a 4,5 con HCl 0,1 N. El aislado proteico precipitado se recupera por centrifugación a 10000 rpm (30 min a 4 °C), posteriormente se procede a lavar preferentemente dos veces con agua químicamente pura.

Por otra parte, Shen *et al.* (2008) las proteínas en las células vegetales son poco solubles en agua debido a su naturaleza hidrófoba y la unión de disulfuro entre las moléculas de proteína. Se cree que la alta concentración alcalina ayuda a romper los enlaces de hidrógeno y disociar el hidrógeno del carbónico y grupos sulfato. El aumento de la carga de la superficie de las moléculas de proteínas nos llevará a un aumento de solubilidad en agua. Esto ha sido demostrado por Guo *et al.* (2005), que utiliza una solución de NaOH 0,1 M y consigue el 55 % de extracción de proteínas de arroz. Otras investigaciones se realizaron en semillas de pimiento (Firatligil-Durmus y Evranuz, 2010), legumbres (guisantes, garbanzos, lentejas y frijoles) (Boye *et al.*, 2010), torta de leche de coco (Chambal *et al.*, 2012), té (Shen *et al.*, 2008), entre otros.

### **2.6.2. Extracción alcalina con adición de sal**

Las sales neutras ejercen efectos pronunciados sobre la solubilidad de las proteínas globulares. A baja concentración, las sales incrementan la solubilidad de muchas proteínas, fenómeno que recibe el nombre de solubilización por salado. Las sales de iones divalentes tales como el  $MgCl_2$  y el  $(NH_4)_2SO_4$ , son mucho más eficaces en la solubilización de las proteínas que las sales de iones monovalentes tales como el NaCl, KCl y  $NH_4Cl$ . Las

capacidades de las sales neutras para influir en la solubilidad de las proteínas está en función de su fuerza iónica que constituye una medida tanto de la concentración como del número de las cargas eléctricas existentes en los cationes y aniones aportados por la sal. El efecto de la solubilidad por salado está causado por cambios de tendencia a la ionización de los grupos -R disociables de la proteína (Nelson y Cox, 2001).

De manera similar existe un trabajo de extracción de proteínas a partir de la harina desgrasada de la semilla del sacha inchi por el método de extracción alcalina adicionada con NaCl, realizado por Sathe *et al.* (2012), donde hallaron la máxima extracción de proteínas a pH 12 (con NaOH), temperatura ambiente, relación harina/solvente 1/10 (p/v), NaCl 2 M y tiempo de extracción de 15 minutos, obteniendo un rendimiento de recuperación de proteínas de 79,5 %. Estudios recientes reportan el uso principalmente de las sales de sodio y calcio para extraer proteínas de diferentes alimentos vegetales (Ghaly y Alkokaik 2010; Lestari *et al.*, 2010; Karaca *et al.*, 2011; Nadal *et al.*, 2011). Como el caso de la torta de palma asistida con hexametáfosfato de sodio (1,5 %), que se obtuvo un rendimiento de recuperación de proteínas de 28,86 % (Chee y Ayob, 2013); las semillas de melón amargo con NaCl (1,3 M), obtuvieron un rendimiento de 80,4 % (Horax *et al.*, 2011); girasol 80 % (NaCl 2,8 M) (Pickardt *et al.*, 2009); frijol castilla 87 % (NaCl 0,15 M) (Mune *et al.*, 2008); las semillas de calabaza 32 % (NaCl 4,26 %) (Quanhong y Caili, 2005) y canola 48,4 % (NaCl 0,1 M) (Milanova *et al.*, 2003).

### **2.6.3. Extracción enzimática asistida**

La extracción enzimática asistida ha despertado un gran interés, y se ve como un método alternativo para extraer proteínas de semillas oleaginosas (Sui *et al.*, 2011). Las enzimas pueden ayudar en la extracción de proteínas de varias maneras. Carbohidrasas, que pueden atacar los componentes de la pared celular, pueden aumentar el rendimiento de proteína liberando más proteína de la fuente de la matriz. Una combinación de enzimas (es decir, Viscozyme L) para hidrolizar la pared celular, se ha utilizado para escindir enlaces dentro de la matriz de polisacárido de manera efectiva y, por tanto, liberar más proteína intracelular a partir de salvado de avena (Guan y Yao 2008).

En los últimos años, diferentes proteasas, solos o en combinación, se han utilizado para hidrolizar parcialmente proteínas a péptidos, aumentando su solubilidad y hacerlas más

fácilmente extraíbles. De Moura *et al.* (2011) desarrollaron un proceso de extracción enzimática asistida de dos etapas en contracorriente para la soja, reduciendo significativamente la cantidad de agua utilizada. Lograron ligeramente, altos rendimientos de aceite y proteínas que los de extracción estándar enzimática asistida de una sola etapa.

La extracción enzimática asistida de proteínas ha sido definida como una alternativa ecológica, segura y barata para extraer aceite y proteínas simultáneamente (Latif y Anwar 2009). Además, este proceso evita daños graves a las proteínas producido por las etapas de refinación, mejorando sus propiedades nutricionales y funcionales (Domínguez *et al.*, 1994). Sin embargo, y aunque el proceso de extracción enzimática no produce productos químicos tóxicos, muestra algunas desventajas, tales como el largo tiempo requerido y el elevado costo de las enzimas. El uso de enzimas inmovilizadas en la extracción de proteína puede reducir el costo global permitiendo la reutilización de las enzimas (Sari *et al.*, 2013). Algunos estudios que utilizan este proceso de extracción se muestran en el Cuadro 7.

## **2.7. Hidrólisis enzimática de la proteína**

En los hidrolizados de proteínas se alteran sus diversas características tecnofuncionales, tales como la solubilidad, viscosidad, características sensoriales, emulsión y características de la espuma, que les conceden ventajas para el uso en muchos productos alimenticios, respecto a las proteínas originales (Yin *et al.*, 2008; Ruíz *et al.*, 2007). Según Acchouri *et al.* (1998) el grado de hidrólisis óptimo para mejorar las propiedades tecnofuncionales es menor al 3 %, ya que una hidrólisis intensa aumenta la solubilidad y perjudica las propiedades gelificantes, espumantes y emulsificantes de las proteínas de los alimentos.

Por otra parte, las propiedades tecnofuncionales de los hidrolizados de proteína dependen del grado de hidrólisis (GH) y de las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos en el hidrolizado (Adler-Nissen, 1986). Así mismo, los hidrolizados que se producen para su uso en alimentación se pueden agrupar en: hidrolizados con bajo grado de hidrólisis, entre 1 % y 10 %, para la mejora de las propiedades tecnofuncionales y para su uso como saborizantes; por último, hidrolizados extensivos, con grado de hidrólisis superior al 10 %, para su uso en alimentación especializada (Benítez *et al.*, 2008).

**Cuadro 7: Extracción enzimática asistida de algunas fuentes de alimentos.**

Enzima	Alimento	Muestra	Proteína extraída (%)	Referencia
Alcalasa™	Arroz	Salvado	81	Hamada 2000
	Avellana	Semilla	92,2	Sui <i>et al.</i> 2011
	Pino	Semilla	87,4	Wang <i>et al.</i> 2011
	Maní	Semilla	82,5	Wang <i>et al.</i> 2008
	Maní	S. tostada	80,1	Zhang <i>et al.</i> 2011
Alcalase + Protamex (1:3)	Té	Hoja	34	Shen <i>et al.</i> 2008
Proteasa alcalina	Arroz	Arroz partido	75,5	Hou <i>et al.</i> 2010
Flavourzyme	Arroz	Salvado	88	Hamada 2000
Glucoamilasa	Lenteja	Haba	-	Bildstein <i>et al.</i> 2008
Neutrasa 1,5MG	Coco	Jugo	83	Sant'Anna <i>et al.</i> 2003
Olivex + Celluclast	<i>Guevina avellana</i>	Torta	65	Moure <i>et al.</i> 2002
Papaína	Arroz	Arroz partido	46,3	Hou <i>et al.</i> 2010
Pectinasa + Proteasa P	Arroz	Salvado	80	Tang <i>et al.</i> 2003
Fitasa	Arroz	Salvado	80	Wang <i>et al.</i> 1999
Protex 40XL	Colza	Harina	80	Sari <i>et al.</i> 2013
Protex 6L	Lupino	Semilla	77,2	Jung 2009
	Soya	Hojuelas	96	De Moura <i>et al.</i> 2011
Protex 5L	Colza	Harina	61	Sari <i>et al.</i> 2013
Protex 7L	Sésamo	Semilla	87,1	Latif y Anwar 2011
	<i>Moringa oleífera</i>	Semilla	75,4	Latif y Anwar 2009
Viscozyme L	Coco	Jugo	83	Sant'Anna <i>et al.</i> 2003
	Avena	Salvado	55,7	Guan y Yao 2008
	Soya	Harina	56,3	Rosset <i>et al.</i> 2012
Viscozyme L + Cellulast 1,5L	Arroz	Salvado	37	Tang <i>et al.</i> 2002
Xilanasa	Arroz	Salvado	82	Wang <i>et al.</i> 1999
Xilanasa + Amilasa Fitasa	Arroz	Salvado	75	Wang <i>et al.</i> 1999
Tripsina	Palma	Torta	61	Chee <i>et al.</i> 2012

**FUENTE:** Martínez *et al.* (2013).

### 2.7.1. Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis es la propiedad fundamental de un hidrolizado y va a determinar en gran medida las restantes características del mismo y por tanto su posible uso. Se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original (Adler-Nissen, 1986). El grado de hidrólisis final está determinado por las condiciones utilizadas, siendo éstas, la concentración de sustrato, naturaleza de la enzima, temperatura, pH, relación enzima – sustrato y el tiempo de reacción. Si el proceso de hidrólisis no se controla, el pH de la solución cambiará después del inicio de la hidrólisis debido a la formación de grupos aminos nuevos, los cuales son capaces de liberar o aceptar protones, dependiendo del pH de la hidrólisis. A un pH bajo todos los grupos amino están protonados y solamente parte de los grupos carboxilo están desprotonados, resultando en una captación neta de protones por cada enlace peptídico roto, causando un incremento del pH. A pH neutro y alcalino la hidrólisis resulta en una disminución de pH, pues todos los carboxilos están desprotonados y solamente parte de los grupos amino están protonados. Con el fin de prevenir un cambio de pH durante la hidrólisis, la reacción debería llevarse a cabo en un sistema buffer o en un sistema de pH – stat (mantiene la disolución de proteínas a pH constante añadiendo NaOH) en el cual el pH se fija en el valor deseado (Benítez *et al.*, 2008). Los métodos para medir el grado de hidrólisis se basan en:

- La determinación de los grupos  $\alpha$ -amino libres, utilizando los reactivos como ninhidrina, ortoftaldialdehído (OPA) y ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) (Adler-Nissen, 1986).
- La determinación de nitrógeno soluble; utilizando el método de Kjeldahl (A.O.A.C. 2005), método de Biuret (Hung *et al.*, 1984) o el método de Lowry *et al.* (1951).

### 2.7.2. Proteasas comerciales

Actualmente se encuentran disponibles comercialmente muchas proteasas de grado alimentario. Estas proteasas pueden ser clasificadas, por su origen, (animal, vegetal, bacteriano o fúngico), por su modo de acción catalítica (endo- o exo-actividad) o con base en su sitio catalítico. Las endoproteasas hidrolizan enlaces amídicos 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. Las primeras enzimas proteolíticas utilizadas en la industria alimentaria fueron proteasas pancreáticas de origen animal, si bien cada vez están adquiriendo mayor importancia las de origen bacteriano o fúngico. Los preparados enzimáticos suelen ser mezclas de estas enzimas y normalmente se venden en estado líquido o como polvos (Benítez *et al.*, 2008).

En el Cuadro 8 se presentan algunas de las proteasas comerciales de grado alimentario disponibles en el mercado y se indica la especificidad de parte de ellas.

## 2.8. Metodología de superficie de respuesta

La Metodología de Superficies de Respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de interés está influenciada por varios factores de carácter cuantitativo. El propósito inicial de estas técnicas es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta  $y$ , a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos (Montgomery, 2002).

Según Montgomery (2002) el valor real esperado,  $\eta$ , que toma la variable de interés considerada está influenciado por los niveles de  $k$  factores cuantitativos,  $x_1, x_2, \dots, x_k$ , esto significa que existe alguna función de  $x_1, x_2, \dots, x_k$  que proporciona el correspondiente valor de  $\eta$  para alguna combinación dada de niveles:

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_k) \quad (1)$$

De tal forma que la variable respuesta puede expresarse como:

$$Y = \eta + \varepsilon = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon \quad (2)$$

Donde  $\varepsilon$  es el ruido o error observado en la respuesta  $Y$ . La relación existente entre  $\eta$  (función) y los niveles de los  $k$  factores representa la superficie de respuesta (Montgomery, 2002).

**Cuadro 8: Algunas proteasas disponibles comercialmente de grado alimentario.**

Tipos de proteasa		Nombre	Fuente	Temp. (°C)	pH	Acción catalítica
Serinproteasa	Animal	Tripsina	-	30 – 60	7 – 9	-*Lis (o Arg)---
		Quimiotripsina Elastasa	Porcino, bovino -	45 – 55 -	8 – 9 6 – 8	-*Trp (o Tir, Fe, Leu)--- -*Ala---
Cisteinproteasas	Bacteriana	Alcalasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	50 – 60	7 – 10	-*AAhf---
	Planta	Papaína	Papaya	40 – 75	5 – 8	-*Fe (o Val, Leu)- AAhf---
		Bromelina	Piña	20 – 65	5 – 8	
		Ficina	Latex de Ficus	-	5 – 8	
Aspartato proteasas	Animal	Pepsina Quimosina	Porcino, bovino Becerro	- -	1 – 4 4 – 6	-Fe (o Tir, Leu)*-Trp (o Fe, Tir)
	Fúngica	Aspergillopeptidasa A	<i>Aspergillus saitoi</i>	35 – 50	2 – 5	Glu, Asp, Leu *---
		Newlasa	<i>Rhizopus sp.</i>	40 – 50	3 – 6	Similar a la pepsina
	Animal	Carboxipeptidasa A	Pancreas	-	7 – 8	*Carbonilo del AA terminal del péptido, excepto Pro, Arg, Lis
Metalo proteasas	Bacteriana	Neutrasa® Termolisina	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>B. thermoproteolyticus</i>	40 – 55 -	6 – 7,5 7 – 9	-Fe, Leu, Val*--- -Ile, Leu, Val, Fe*---
	Pancreatina	Páncreas (bovino y porcino)	-	30 – 80	7 – 9	Muy amplia especificidad

**FUENTE:** Benítez *et al.* (2008).

\* Indica sitio de acción de la proteasa sobre el sustrato. AAhf Indica aminoácidos hidrofóbicos.

## **2.8.1. Terminología**

### **a. Variable**

Una variable es un símbolo, tal como X, Y, H, x o B, que puede tomar un conjunto prefijado de valores llamado dominio de esa variable. Si la variable puede tomar un solo valor se llama constante (Spiegel, 1991). La notación se clasifica en:

#### **a.1. Variable independiente**

Es una variable de proceso que puede tomar valores independientemente de las otras variables. Así, para definir una variable dependiente debe existir por lo menos una variable independiente (Ayala y Pardo, 1995).

#### **a.2. Variable dependiente**

Son aquellas variables que describen los resultados de un proceso. Esta denotado comúnmente por  $Y_i$ . También se le llama variable performance o criterio de optimización (Ayala y Pardo, 1995).

### **b. Parámetro**

Se denomina parámetro de proceso a aquellos que no cambian o no pueden cambiar su valor durante el rango de validez del modelo matemático o físico de un proceso. Comúnmente aparecen como simples constantes en las ecuaciones matemáticas (Ayala y Pardo, 1995).

### **c. Diseño experimental**

Un experimento es una prueba o ensayo. Un experimento diseñado es una prueba o una serie de pruebas en las cuales se inducen cambios deliberados en las variables de entrada de un proceso o sistema, de manera que sea posible observar e identificar las causas de los cambios con el criterio de optimización (Ayala y Pardo, 1995).

#### **d. Modelo matemático**

Consiste en una ecuación o sistema de ecuaciones algebraicas o diferenciales que representan cuantitativamente el proceso o algunos aspectos del proceso (Ayala y Pardo, 1995).

#### **e. Función objetivo**

El punto de partida básico en un proceso de optimización es definir adecuadamente un criterio de optimización, es decir, que se va a optimizar. Se debe escoger entre las variables dependientes, aquellas que bajo algún criterio adecuado brinde mejores resultados (Ayala y Pardo, 1995).

Según Ayala y Pardo (1995) la relación entre el criterio de optimización y las variables independientes consideradas en el estudio se denomina función objetivo. El principal objetivo de un proceso será maximizar o minimizar una función objetivo el cual está definida por:

$$F_{(max)} = \Phi(x, u, h, z) \quad (3)$$

Donde:

$F$ : Criterio de optimización.

$x, u, h, z$ : Variables independientes.

#### **f. Superficie de respuesta**

Es la representación geométrica de la función objetivo o más propiamente del modelo matemático obtenido. Debe distinguirse claramente de una superficie de respuesta estimada de una superficie de respuesta real (Ayala y Pardo, 1995). Una superficie de respuesta estimada, es la representación geométrica del modelo matemático obtenido. Una superficie de respuesta real, es la representación geométrica de un modelo, solo podemos aproximarnos a ella con los modelos matemáticos comúnmente usados (superficie de respuesta predicha) (Ayala y Pardo, 1995).

**g. Gráfica de contorno**

La grafica de contornos facilita la visualización de la forma de una superficie de respuesta en tres dimensiones. En ésta las curvas de los valores iguales de respuesta se grafican en un plano donde los ejes coordenados representan los niveles de los factores. Cada curva representa un valor específico de la altura de la superficie, es decir un valor específico  $\hat{Y}$  (Montgomery, 2002).

**h. Análisis de varianza**

Los resultados del análisis de varianza de un conjunto de datos que provienen de un experimento, pueden ser presentados según el Cuadro 9, cuyas entradas representan medidas de información acerca de las fuentes de variación de los datos.

**Cuadro 9: Representación del análisis de varianza.**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio
Regresión (Modelo ajustado)	$p - 1$	$SS_{Reg} = \sum_{i=1}^N (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2$	$\frac{SS_{Reg}}{(p - 1)}$
Residual	$N - p$	$SS_R = \sum_{i=1}^N (Y_i - \hat{Y}_i)^2$	$\frac{SS_R}{(N - p)}$
Falta de ajuste	$N - p - n_c + 1$	$SS_R - SS_E$	$\frac{SS_R - SS_E}{N - p - n_c + 1}$
Error puro	$n_c - 1$	$SS_E = \sum_{i=1}^N (Y_i^\circ - \bar{Y}^\circ)^2$	$\frac{SS_E}{(n_c - 1)}$
Total	$N - 1$	$SS_T = \sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^2$	$\frac{SS_T}{(N - 1)}$

**FUENTE:** Box y Draper (1987).

Donde:

$p$ : Número de tratamientos.

$n_c$ : Número de puntos centrales.

$N$ : Número total de unidades experimentales.

$SS_{Reg}$ : Suma de cuadrados de la regresión.

$SS_R$ : Suma de cuadrado residual.

$SS_E$ : Suma de cuadrado del error puro.

$SS_T$ : Suma de cuadrado del total.

$Y_i$ : Valores observados en el diseño experimental.

$\hat{Y}_i$ : Valores estimados por el modelo.

$\bar{Y}_i$ : Media de los valores observados en el diseño experimental.

$Y_i^o$ : Valores observados en el punto central.

$\bar{Y}^o$ : Media de los valores observados en el punto central.

Cabe indicar que la suma total de cuadrados ( $SS_T$ ) representa la variación total en un conjunto de datos y la suma de cuadrados de regresión ( $SS_{Reg}$ ) representa la porción de  $SS_T$  atribuible a la ecuación de regresión ajustada. Por otro lado, la falta de ajuste permite conocer la existencia o no de ajuste de los resultados experimentales a la ecuación de regresión estimada y la  $SS_E$  da idea de la buena reproducibilidad del experimento (Box y Draper, 1987).

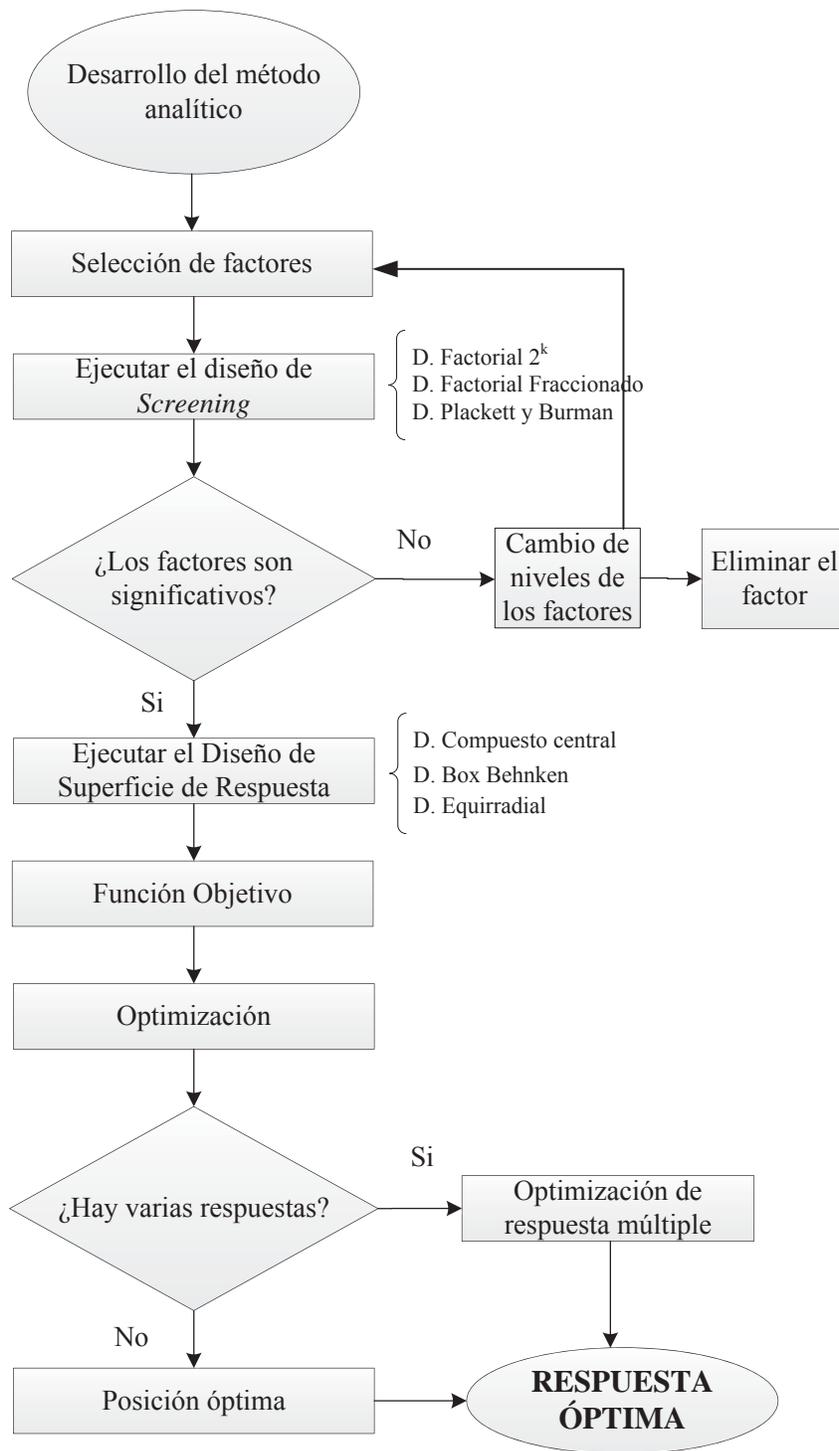
### **2.8.2. Etapas de optimización**

Según Ayala y Pardo (1995) optimizar un proceso o producto requiere una estrategia adecuada para encontrar valores óptimos. Para llegar a esta meta se sigue 3 etapas: *screening*, escalamiento y optimización final.

Candiotti *et al.* (2014) muestran un esquema general para un proceso de optimización aplicando el método de superficie respuesta, mostrado en la Figura 3.

#### **a. Screening**

Esta etapa es identificar aquellas variables que verdaderamente aumenten la eficacia de un proceso (la más significativa). Al inicio de un proceso de optimización, cuando no se tiene un buen conocimiento del comportamiento del proceso, la lista de variables que pueden influir en el proceso son muchas (Ayala y Pardo 1995), por lo que es necesario identificar a las más relevantes. Los diseños más usados en esta etapa son los diseños factorial  $2^k$ , factorial fraccionado y el diseño de Plackett y Burman.



**Figura 3: Diagrama de flujo de la metodología de superficie de respuesta.**

**FUENTE:** Candiotti *et al.* (2014).

Montgomery (2002) señala que el primer paso en la MSR consiste en determinar una aproximación apropiada a la relación funcional real entre “y” y el conjunto de variables independientes. Por lo general se emplea un polinomio de orden bajo sobre alguna región de las variables independientes. Si la respuesta es descrita adecuadamente por una función lineal de las variables independientes, la función de aproximación es el modelo de primer orden:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_kx_k + \varepsilon \quad (4)$$

En esta clase de diseños de primer orden se tiene:

- Diseños factoriales  $2^k$  (con réplicas en el punto central).
- Diseño factorial fraccionado.
- Diseños Plackett y Burman.

#### **a.1. Diseño factorial $2^k$**

Los diseños de tratamiento factoriales  $2^k$  son útiles para realizar estudios preliminares con muchos factores, para identificar los más importantes y sus interacciones. Sin embargo, el número de unidades experimentales aumenta geométricamente con el número de factores en el estudio (Kuehl, 2000). Según Montgomery (2002) es aquel diseño donde se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores en cada ensayo completo o réplica. Por lo tanto, el número total de experimentos a llevarse a cabo viene definido por la relación:

$$N = 2^k \quad (5)$$

Donde:

$k$ : Es el número de variables o factores

$N$ : El número de experimentos.

En este diseño los factores ( $k$ ) se codifican a los niveles +1 (para el más alto) y -1 (para el más bajo). El diseño no permite la estimación del error experimental a menos que se repitan los experimentos, para lograr esto se aumenta el diseño con observaciones en el centro. La adición de los puntos centrales no tiene influencia sobre los coeficientes  $\beta_i$  para  $i$

$\geq 1$ , pero la estimación de  $\beta_0$  es el promedio general de todas las observaciones (Montgomery, 2002).

### **a.2. Diseño factorial $2^k$ con réplica en el punto central**

El diseño factorial a dos niveles, asume que la relación entre las variables y la respuesta es representada por un modelo matemático lineal. De ser cierta dicha linealidad, el modelo debe predecir adecuadamente todos los puntos del diseño, inclusive el punto central. Por supuesto, es innecesaria la linealidad perfecta y el sistema  $2^k$  funcionará bastante bien incluso cuando la suposición de linealidad se cumple solo de manera aproximada. De no ser cierta esta hipótesis, es decir que no prediga adecuadamente, especialmente el punto central del diseño, se puede afirmar que el modelo matemático lineal no es suficiente para explicar las respuestas en dicha región experimental y se asume una posible existencia de curvatura. Para ello la adición de pruebas en el punto central del diseño sirve para dar una estimación promediada del efecto curvatura (Ayala y Pardo, 1995).

La suma de cuadrados para la curvatura está dada por:

$$SS_{curvatura} = \frac{N \times n_0 (\bar{Y} - \bar{Y}^0)^2}{(N + n_0)} \quad (6)$$

Donde:

$\bar{Y}^0$ : Promedio de las réplicas.

$n_0$ : Número de réplicas en el centro del diseño.

$N$ : Número de pruebas experimentales.

$\bar{Y}$ : Promedio de los puntos exteriores del diseño.

### **a.3. Diseño Plackett-Burman**

Según Ayala y Pardo (1995) el diseño Plackett-Burman es un tipo especial del diseño factorial fraccionado, donde se puede construir diseños apropiados para el estudio de  $k$  variables en  $N$  pruebas experimentales, donde  $N > k$ . Como pueden estudiarse con  $N$  experimentos hasta  $N - 1$  variables, la diferencia se asigna a variables denominadas ficticias (no representa a ninguna variable experimental), cuya utilidad básica es la determinación de la varianza del error experimental. Por esta razón es conveniente que se

apliquen al menos dos variables ficticias. Según Vatanara *et al.* (2007) el diseño Plackett-Burman permite la proyección de los factores principales de un gran número de variables de proceso. Por tanto, este diseño es bastante útil como paso previo para seleccionar factores clave para futuros procesos de optimización.

### **b. Escalamiento**

El escalamiento se da cuando se tiene evidencia que la región óptima se encuentra lejos de los experimentos iniciales (*screening*), o para confirmar una hipótesis previa (según experiencias del investigador o según el análisis del efecto de curvatura en la etapa *screening*). Esta etapa consiste en escalar sucesivamente hacia la región óptima (curvatura) hasta llegar ubicarla. Existen varios métodos entre los cuales destacan el método de pendientes ascendentes o descendentes y el método de búsqueda simple (*Simplex Search*). Estos métodos permitirán acercarse a la denominada “región experimental de respuesta estacionarias”, es decir, a una zona en la cual ya no es posible mejorar las respuestas por las técnicas mencionadas. En esta situación los efectos cuadráticos toman importancia y el uso de modelos de segundo orden es necesario para describir dicha región (Ayala y Pardo, 1995).

### **c. Optimización final**

En la región óptima los efectos de segundo orden son mayores en valor absoluto a los efectos de primer orden, lo que indica que esta región puede describirse apropiadamente por modelos matemáticos de segundo orden. Los diseños experimentales más apropiados para estos casos son los diseños rotables y los diseños compuestos (Ayala y Pardo, 1995). Dentro de los diseños rotables de segundo orden se incluyen:

- Diseño compuesto central.
- Diseño equirradial.
- Diseño Box Behnken.

Montgomery (2002) menciona, cuando el experimentador se encuentra relativamente cerca del óptimo, por lo general se requiere de un modelo que incorpore la curvatura para aproximar la respuesta, siendo el de segundo orden el más adecuado. La ecuación ajustada de segundo orden es la siguiente:

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j}^k \sum_{i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (7)$$

Donde los  $\beta_i$  son los coeficientes de regresión para los términos de primer orden, los  $\beta_{ii}$  son los coeficientes para los términos cuadráticos puros, los  $\beta_{ij}$  son los coeficientes para los términos de interacción y  $\varepsilon$  es el término del error aleatorio. Los términos cuadráticos puros y de interacción son de segundo orden (Montgomery, 2002).

Ayala y Pardo (1995) aseguran que los coeficientes del modelo matemático de segundo orden pueden ser estimados sometiendo los valores observados a un análisis de regresión múltiple (método de mínimos cuadrados), el cual puede llevarse a cabo bajo la forma de ecuaciones normales o en forma matricial, siendo esta última la más recomendable por la facilidad que otorga para su ejecución en programas de computadora.

### c.1. Diseño compuesto central (DCC)

Tiene como característica esencial menor número de tratamientos que los factoriales completos. Son los diseños más utilizados y estudiados para ajustar un modelo de segundo orden (Chacín, 1998; Montgomery, 2002).

En general, el DCC consiste en un diseño factorial  $2^k$  (cuando las variables son menores a cinco), además de puntos axiales ( $2^k$ ) en los ejes de coordenadas a una distancia  $(\pm\alpha, 0, 0, 0)$ ,  $(0, \pm\alpha, 0, 0)$ ,  $(0, 0, 0, \pm\alpha)$  del punto central del diseño, más los puntos replicados en el centro del diseño necesario para hallar la varianza del error experimental. Los puntos axiales fueron agregados al diseño factorial para proporcionar la estimación de la curvatura del modelo (Joglekar y May, 1987). Según Montgomery (2002) este diseño se convierte en rotatable mediante la elección de  $\alpha$ , el valor de  $\alpha$  para la rotabilidad depende del número de puntos en la porción factorial del diseño; ésta se calcula de la siguiente manera:

$$\alpha = (n_F)^{1/4} \quad (8)$$

Donde:

$\alpha$ : Es la distancia al punto axial.

$n_F$ : es el número de puntos usados en la porción factorial del diseño.

Box y Drape (1987) señala algunas razones por las que deben incluirse las repeticiones en el punto central del diseño:

- Produce un buen perfil de la función.
- Minimiza el cuadrado medio del error.
- Permite hacer un análisis medio del error.
- Permite hacer un análisis de falta de ajuste a un modelo de segundo orden.
- Incrementa la robustez del diseño.

Al respecto, Montgomery (2002) afirma que de tres a cinco experimentos usados en el punto central son suficientes para alcanzar dichos objetivos. Por su parte, Box y Draper (1987) indican que si quiere introducir más puntos centrales que lo sugeridos no hay ningún inconveniente, excepto por el costo adicional que significa ejecutar más mediciones. En el Cuadro 10 se muestra el número de puntos y el valor  $\alpha$ , por el número de variables utilizadas.

**Cuadro 10: Coordenadas del diseño compuesto central.**

Número de variables X (k)	Número de puntos en $2^k$			Total N	Valor de $\alpha$
	Factorial	Axial	Centro		
3	8	6	5	19	1,68
4	16	8	5	29	2,00
5	16	10	6	32	2,00
6	32	12	9	53	2,00

**FUENTE:** Cochran y Cox (1990).

### c.2. Diseño de Box-Behnken (DBB)

En el diseño de Box-Behnken se forman combinados factoriales  $2^k$  con diseños de bloques incompletos. Los diseños resultantes suelen ser muy eficientes en términos del número requerido de experimentos, y son rotables o casi rotables y hace la estimación de los coeficientes de primer y segundo orden más eficientes (Montgomery, 2002). Estos diseños son esféricos más que cuboidales puesto que los puntos del diseño se encuentran en las orillas de un cubo en lugar de las esquinas como los del DCC con centros en las caras (Kuehl, 2000).

### **2.8.3. Optimización de respuestas múltiples**

Muchos problemas de superficies de respuesta incluyen el análisis de varias respuestas. La consideración simultánea de respuestas múltiples requiere construir primero un modelo de superficie de respuesta apropiado para cada respuesta y después intentar encontrar un conjunto de condiciones de operación que optimice en cierto sentido todas las respuestas o que al menos las mantenga en los rangos deseados (Montgomery, 2002).

Un enfoque relativamente directo para optimizar varias respuestas que funciona bien cuando solo hay pocas variables en el proceso es la superposición de las gráficas de contorno de cada respuesta. Cuando hay más de tres variables del diseño, se hace muy complicada la superposición de las gráficas de contorno, ya que la gráfica de contorno es bidimensional, y  $k - 2$  de las variables del diseño deben mantenerse constante para construir la gráfica. Con frecuencia se necesita una gran cantidad de ensayo y error para determinar cuáles son los factores que deben mantenerse constante y que niveles seleccionar para obtener la mejor vista de la superficie. Por lo tanto, existe interés práctico en métodos de optimización más formales para las respuestas múltiples (Montgomery, 2002).

#### **a. Función de deseabilidad**

En 1980, Derringer y Suich encontraron una de las soluciones para optimizar respuestas múltiples mediante el desarrollo de la función de deseabilidad, que ha sido ampliamente utilizado desde entonces en la industria. Esta función se basa en la idea de que la calidad de un producto o proceso que tiene muchas características es completamente inaceptable si uno de ellos está fuera de un límite deseable. Su objetivo es encontrar las condiciones de operación que aseguren el cumplimiento de los criterios de todas las respuestas involucradas y, al mismo tiempo, proporcionar el mejor valor de respuesta conjunta deseable. Esto se logra mediante la conversión de las respuestas múltiples en una sola, la combinación de las respuestas individuales en una función compuesta seguida por su optimización (Candiotti *et al.*, 2014).

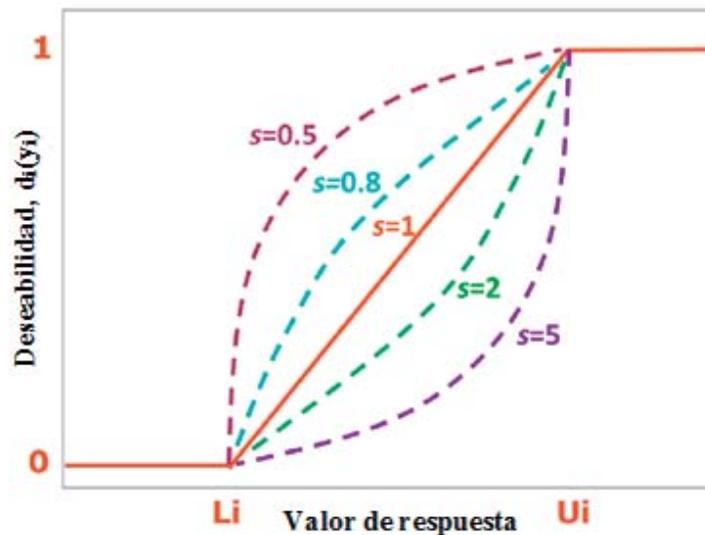
La función de deseabilidad de Derringer permite al analista encontrar las condiciones experimentales (niveles de factor) para alcanzar, al mismo tiempo, el valor óptimo para

todas las variables evaluadas, incluidas las prioridades del investigador durante el procedimiento de optimización. El enfoque general consiste en convertir primero cada respuesta  $\hat{y}_i$  en una función con condición de deseabilidad individual  $d_i$  que varía en el rango  $0 \leq d_i \leq 1$ , donde  $d_i = 0$  para una respuesta indeseable, y  $d_i = 1$  representa un valor completamente deseable, es decir, respuesta ideal. Los valores intermedios indican respuestas más o menos deseables (Candiotti *et al.*, 2014).

La función de deseabilidad individual a utilizar cuando se desea maximizar una respuesta es la siguiente:

$$d_i(\hat{y}_i(x)) = \begin{cases} 0 & \hat{y}_i(x) < L_i \\ \left(\frac{\hat{y}_i(x) - L_i}{U_i - L_i}\right)^s & L_i \leq \hat{y}_i(x) \leq U_i \\ 1 & \hat{y}_i(x) > U_i \end{cases} \quad (9)$$

Donde  $U_i$  representa el objetivo de la respuesta, es decir, el valor máximo que se desea alcanzar;  $L_i$ , es el mínimo valor aceptable;  $s$ , es un valor de potencia llamado ponderación, establecido por el analista para determinar lo importante que es para  $\hat{y}_i$  estar cerca del máximo. La representación gráfica de dicha respuesta se muestra en la Figura 4.



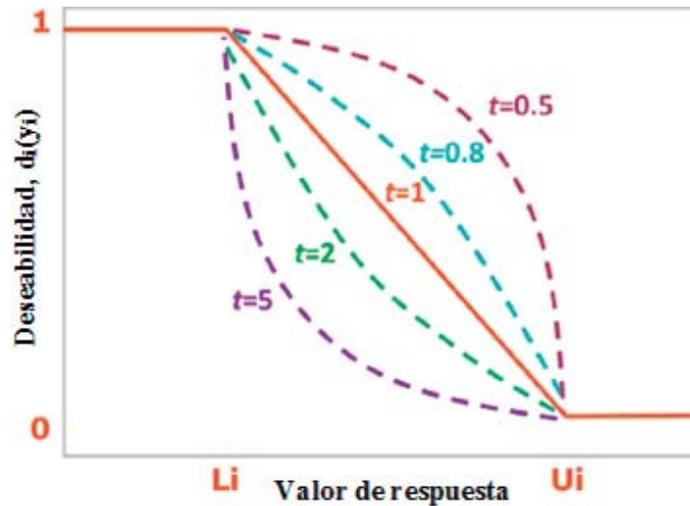
**Figura 4: Función de deseabilidad individual para la maximización de una respuesta.**

**FUENTE:** Candiotti *et al.* (2014).

Si el objetivo es minimizar una respuesta, la función de deseabilidad es la siguiente:

$$d_i(\hat{y}_i(x)) = \begin{cases} 1 & \hat{y}_i(x) < L_i \\ \left(\frac{U_i - \hat{y}_i(x)}{U_i - L_i}\right)^t & L_i \leq \hat{y}_i(x) \leq U_i \\ 0 & \hat{y}_i(x) > U_i \end{cases} \quad (10)$$

Donde  $L_i$  representa el objetivo de la respuesta, es decir, el valor mínimo que se desea alcanzar;  $U_i$ , es el máximo valor aceptable;  $t$ , es la ponderación, para determinar qué tan importante es para  $\hat{y}_i$  estar cerca del mínimo. La representación gráfica de dicha respuesta se muestra en la Figura 5.



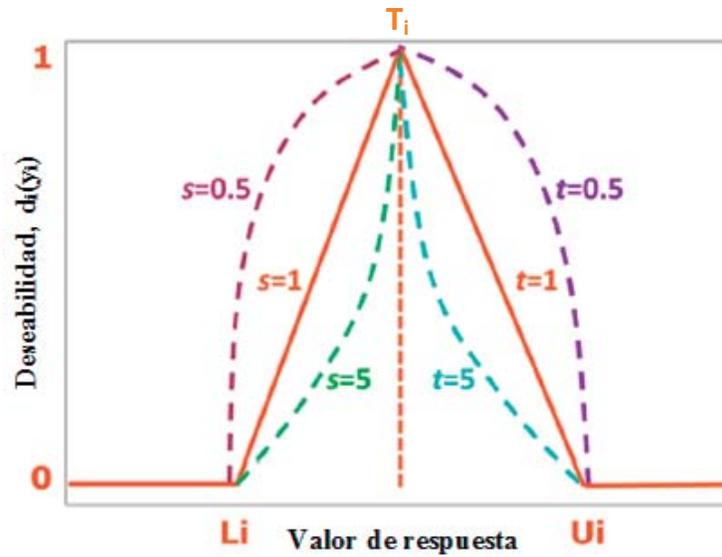
**Figura 5: Función de deseabilidad individual para la minimización de una respuesta.**

**FUENTE:** Candiotti *et al.* (2014).

Si el objetivo es obtener una respuesta a nivel específico, la función de deseabilidad es:

$$d_i(\hat{y}_i(x)) = \begin{cases} 0 & \hat{y}_i(x) < L_i \\ \left(\frac{\hat{y}_i(x) - L_i}{T_i - L_i}\right)^s & L_i < \hat{y}_i(x) < T_i \\ 1 & \hat{y}_i(x) = T_i \\ \left(\frac{\hat{y}_i(x) - U_i}{T_i - U_i}\right)^t & T_i < \hat{y}_i(x) < U_i \\ 0 & \hat{y}_i(x) > U_i \end{cases} \quad (11)$$

Donde  $T_i$  representa el punto que se desea obtener;  $U_i$ , es el máximo valor aceptable; y  $L_i$ , es mínimo valor aceptable. La representación gráfica de dicha respuesta se muestra en la Figura 6.



**Figura 6: Función de deseabilidad para la obtención de un nivel específico de una respuesta.**

**FUENTE:** Candiotti *et al.* (2014).

Una vez que la  $n$  variable (niveles de factores y respuestas) se transforman en funciones de deseabilidad, se combinan en una única función llamada Deseabilidad Global ( $D$ ), se define como la media geométrica ponderada de la deseabilidad individuales ( $d_i$ ), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$D = (d_1 \times d_2 \dots \dots d_m)^{1/m} \quad (12)$$

Donde  $d_1, \dots, d_m$  corresponde a la función de deseabilidad individual para cada respuesta. Si  $D$  alcanza un valor diferente de cero, todas las variables que están siendo optimizados simultáneamente se puede considerar que tienen un valor deseable. Por otro lado, si una de las respuestas es completamente indeseable,  $D$  será cero (Candiotti *et al.*, 2014).

#### **2.8.4. Empleo de la metodología de superficie de respuesta en la optimización de la extracción de proteínas**

Mizubuti *et al.* (2000) realizaron la optimización de extracción de proteínas de gandul, mediante superficie de respuesta, evaluando tres variables independientes: concentración de NaCl, pH y relación sólido/líquido. Las condiciones óptimas para la extracción de proteínas fueron: pH 8,5 sin NaCl y una relación sólido/líquido de 1/5 (p/v). Siguiendo un modelo de segundo orden y un diseño compuesto central. Obteniendo un 75 % de rendimiento de extracción de proteínas.

Quanhong y Caili (2005) emplearon la metodología de superficie de respuesta para estudiar los efectos de relación sólido/líquido, concentración de NaCl y el tiempo de extracción de proteínas en la semilla de calabaza. La variable más relevante fue la relación sólido/líquido y utilizaron un diseño compuesto central. Se encontró que eran óptimas para la extracción de proteína a partir de relación sólido/líquido 1/30,2 (p/v), concentración de NaCl 4,26 % y tiempo de extracción de 18 minutos. Obteniendo un rendimiento de proteína 26 %.

Mune *et al.* (2008) emplearon la metodología de superficie de respuesta para la preparación del concentrado de proteínas de frijol castilla con un diseño compuesto central giratorio, evaluando dos variables independientes: pH y concentración de NaCl sobre cuatro respuestas: el contenido de proteína (%), el rendimiento de proteína (%), lisina reactiva (g/16 g N) y el contenido de zinc (mg/100 g). Utilizó un modelo polinomial de segundo orden para predecir las respuestas. Los resultados experimentales mostraron que en condiciones óptimas (pH 9,91 y la concentración de NaCl 15 M) el contenido de proteína fue  $\geq 84$  %, rendimiento de proteína  $\geq 87$  %, lisina  $\geq 1,175$  g/16 g N y el contenido de zinc  $\geq 7,75$  mg/100 g.

Guan y Yao (2008) investigaron la aplicación de un pretratamiento enzimático en el salvado de avena, utilizando viscozyme L para mejorar la extracción de proteínas. Utilizó la metodología de superficie de respuesta, para estudiar los efectos de las variables del pretratamiento enzimático (concentración de viscozyme L, pH, tiempo de incubación y temperatura) en la extracción de proteína. Las condiciones óptimas del pretratamiento enzimático fueron identificados como concentración de Viscozyme L 30 FBG/10 g de

salvado de avena, pH 4,6, tiempo de incubación 2,8 h y la temperatura de 44 °C. En las condiciones óptimas, la proteína extraída fue 56,2 %.

Wani *et al.* (2008) realizaron la extracción para la recuperación máxima de proteína de la harina de semilla de sandía (*Citrullus vulgaris* Cv azúcar bebé), utilizando la metodología de superficie de respuesta con un diseño compuesto central y con cuatro variables independientes: temperatura (40, 45, 50, 55 y 60 °C), concentración de NaOH (0,03; 0,06; 0,09; 0,12 y 0,15 g/L), tiempo de extracción (5, 10, 15, 20 y 25 min) y relación harina/solvente (1/30, 1/40, 1/50, 1/60 y 1/70 p/v); y la variable respuesta fue el rendimiento de proteína. La extracción de la proteína óptima se obtuvo con 0,12 g/L de concentración alcalina, 15 min de tiempo de extracción y 1/70 (p/v) relación harina/solvente en 50 °C, confirmando la producción de proteína en condiciones óptimas de 80,71 %.

Ma *et al.* (2010) emplearon la metodología de superficie de respuesta, para aislar el concentrado de proteína de maní a partir de la harina desgrasada, usando tres variables independientes como: relación sólido/líquido, concentración de etanol y temperatura. Los resultados mostraron los valores de cada factor para la extracción primaria de relación sólido/líquido 1/11,79 (p/v), concentración de etanol de 85 ml/100 ml, temperatura de 36,35 °C y una lista correspondiente de las variables de 1/8 (p/v), 97,50 ml/100 ml y 38 - 40 °C para la extracción secundaria, y se encontró que eran óptimas para la extracción de proteínas a partir de la harina desgrasada de maní, obteniendo un 65,3 % de rendimiento.

Firatligil-Durmus y Evranuz (2010) optimizaron la extracción de proteínas de las semillas del pimiento rojo mediante la metodología de superficie de respuesta. Incluyeron un diseño compuesto central con cuatro variables independientes (temperatura, pH, tiempo de extracción y relación harina/solvente) y una variable independiente (rendimiento de proteína). El máximo rendimiento obtenido fue 47 % en condiciones de extracción a 31 °C, pH 8,8, 20 minutos y 1/21 (p/v).

Sui *et al.* (2011) utilizaron la avellana de la zona noreste de China y la enzima Alcalasa para extraer las proteínas, mediante la metodología de superficie de respuesta con DCC. Los resultados mostraron que las condiciones óptimas fueron: concentración de enzima

2 %, temperatura de hidrólisis 55 °C, tiempo 2,5 h, relación sólido/líquido de 1/05 y pH 8,9. Obtuvieron un rendimiento de 92,02 %.

Villarroel *et al.* (2012) demostraron la utilidad y eficacia de la aplicación de la metodología de superficie de respuesta para la optimización de la extracción de proteínas de la torta de avellana chilena. Utilizaron un DCC con tres variables independientes: tiempo de contacto de la torta con el solvente, relación muestra/solvente y pH, con cinco niveles de trabajo cada uno y tres replicaciones en el punto central. La mejor combinación de los factores resultó ser tiempo entre 30 y 40 minutos, pH entre 9 y 9,5 y la relación muestra/solvente entre 1/15 a 1/16, con un rendimiento final de 76 %.

Chee *et al.* (2012) extrajeron proteínas de la torta de semilla de palma mediante el ensayo de tripsina asistida. A partir de la metodología de superficie de respuesta con un diseño de compuesto central rotatable. Las condiciones óptimas fueron: la enzima a una concentración de 1,36 g/100 g, temperatura 50 °C y pH 9,5. Obtuvieron un rendimiento de extracción de proteína de 62 %. Mientras que con el método de extracción alcalina con los mismo parámetros obtuvo 10,21 % de rendimiento de extracción de proteínas.

Chee y Ayob (2013) aplicaron la metodología de superficie de respuesta para estudiar la optimización (DCC) de extracción de proteínas, a partir de la torta de palma asistida con hexametáfosfato de sodio. Las condiciones óptimas para la extracción de proteínas fueron: 1,50 % de hexametáfosfato de sodio, pH 10, 50 °C y la relación harina/solvente 1/70 (p/v). Obteniendo un rendimiento de extracción de proteínas de 28,37 %. Mientras que con el método de extracción alcalina a pH 10 y solvente agua desionizada, obtuvo 8,12 %.

Finalmente, Parra *et al.* (2014) utilizó la metodología de superficie de respuesta, para optimizar la extracción alcalina de proteínas de harina de lentejas. Los factores que influyeron en la extracción de proteínas fueron relación harina/solvente 1/10 (g/ml) y pH 9, con un rendimiento de 82 % a 22 °C y 60 min de extracción.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de ejecución**

La presente investigación se llevó a cabo en el Área de Biotecnología Industrial del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM).

#### **3.2. Materia prima**

La torta del sacha inchi, procedente de la provincia de Bagua del departamento de Amazonas del Perú, obtenida después de la extracción de aceite por prensado en frío (uso de expeller), fue adquirida de la empresa Olivos del Sur S.A.C., ubicado en el distrito de Lurín, provincia Lima, departamento de Lima.

#### **3.3. Materiales, equipos y reactivos**

##### **3.3.1. Materiales**

- Bagueta.
- Beakers de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Bolsa de polietileno.
- Cronómetro.
- Cubeta UV de vidrio y cuarzo.
- Embudo Buchner.
- Envases de vidrio ambar de 150, 250 y 500 ml.
- Espátula y cuchara.
- Fiola de 50, 100, 250 y 500 ml.
- Kitasato 250 y 500 ml.
- Magnetos.
- Matraz de Erlenmeyers de 50, 100 y 500 ml.

- Micropipetas de 20 – 200; 100 – 1000 y 500 – 5000  $\mu$ l (BRAND Transferpette).
- Papel de aluminio.
- Papel Whatman N° 1 y N° 4.
- Parafilm.
- Placa Petri.
- Probetas 50, 100 y 500 ml.
- Tamiz W.S Tyler, malla N° 35.
- Termómetro de mercurio (-10 a 110 °C).
- Tips para micropipeta de 200, 1000 y 5000  $\mu$ l.
- Tubos de centrifugación de 50 ml.
- Tubos de ensayo de 5 ml.
- Vaso de vidrio para licuadora.

### **3.3.2. Equipos**

- Agitador magnético (Velp Scientifica).
- Balanza analítica (Ohaus Adventurer™).
- Baño maría (GFL – 1083).
- Campana extractora.
- Centrifuga refrigerada (Hettich Zentrifugen – Mikro 220R).
- Equipo de filtración al vacío.
- Espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation – Genesys 10 UV).
- Estufa (F-Travil).
- Licuadora (Oster).
- Placa calefactora.
- Potenciómetro (Thermo Orion – 410).
- Purificador de agua (Millipore Simplicity UV).
- Refrigeradora – Congeladora (LG – GR482BEF).
- Selladora (Machintek).
- Vortex (Velp Scientifica).

### **3.3.3. Reactivos**

- Ácido bórico 99,9 % (Sigma Aldrich).
- Ácido clorhídrico (Fisher).
- Ácido picrilsulfónico 5 % (p/v) solución (Sigma Aldrich).
- Ácido trinitrobenzeno-sulfónico (Sigma Aldrich)
- Albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma Aldrich).
- Carbonato de sodio anhidro (Baker® ACS).
- Cloruro de sodio (Baker® ACS).
- Duodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma Aldrich).
- Enzima Alcalasa (Novozyme).
- Éter de petróleo (Baker® ACS).
- Folin – Ciocalteau (Merck).
- Hidróxido de sodio (Merck).
- L-leucina 99 % (Sigma Aldrich).
- Sulfato de cobre pentahidratado (Sigma Aldrich).
- Tartrato de sodio y potasio (Scharlau).
- Tetraborato de sodio anhidro 99,9 % (Sigma Aldrich).

### **3.4. Métodos de análisis**

#### **3.4.1. Análisis proximal**

El análisis proximal se determinó a la torta del sachá inchi, para sus distintas comparaciones y discusión y constó de:

- Determinación de ceniza (A.O.A.C. 942.05 – 2005).
- Determinación de fibra (A.O.A.C. 962.09 – 2005).
- Determinación de grasa (A.O.A.C. 2003.05 – 2005).
- Determinación de humedad (A.O.A.C. 950.46 – 2005).
- Determinación de proteína (A.O.A.C. 984.13 – 2005).
- Determinación de carbohidratos (por diferencia).

### 3.4.2. Determinación de proteína total

El contenido de proteína total fue determinado por el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 2005), utilizando como factor de conversión de nitrógeno 5,7 (Sathe *et al.* 2012) para la harina desgrasada de torta del sachá inchi. Los resultados se expresaron en porcentaje.

### 3.4.3. Determinación de proteína soluble

La proteína soluble se determinó según el método de Lowry *et al.* (1951). Este método está basado en la reacción de Biuret, donde el péptido obtenido de proteínas reacciona con el cobre bajo condiciones alcalinas formando enlaces y originando complejos de color violeta, estos complejos cuproproteicos reducen al reactivo Folin Ciocalteu el cual vira a color azul oscuro y cuya intensidad depende proporcionalmente de los aminoácidos tirosina y triptófano.

El procedimiento realizado fue el siguiente: 400 µl del sobrenadante fue mezclado con 2 ml del reactivo C (contiene Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2 % en 0,1 N de NaOH, solución de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O al 0,5 % en agua destilada y solución de tartrato de sodio al 1 % en agua destilada, estas tres soluciones fueron mezcladas en proporciones 100:1:1), a esta mezcla se añadió 200 µl del reactivo Folin Ciocalteu 1 M, el conjunto se agitó e incubó por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad y luego se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a 650 nm. Los resultados fueron expresados en mg/ml utilizando una curva estándar de albúmina de suero de bovino (BSA) (ANEXO 1).

### 3.4.4. Rendimiento de proteína

El rendimiento de extracción de proteína de la HDTSI, se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Rendimiento de proteína (\%)} = \frac{\text{Proteína soluble en el sobrenadante (Lowry)}}{\text{Proteína total en la HDTSI (Kjeldahl)}} \times 100 \quad (13)$$

### 3.4.5. Grado de hidrólisis total de la harina desgrasada de torta del sachá inchi

Se utilizó el método reportado por Adler y Nissen (1979) con ligeras modificaciones. En un tubo pírex con tapa, se pesó 100 mg de harina desgrasada de torta del sachá inchi y se disolvió con 10 ml de HCl a 6 N, luego se homogenizó en un vortex y fue colocado en un beaker de 100 ml que contenía arena fina, para mantener la temperatura a 110 °C en una estufa por 24 horas. Transcurrido el tiempo se sacó la muestra y se dejó enfriar a temperatura ambiente, luego se vortexeó y filtró al vacío utilizando papel Whatman N°4, seguidamente se tomó 2 ml del filtrado obtenido y se neutralizó con NaOH a 0,24 M hasta pH 7,0 en una probeta de 50 ml. Finalmente, esta solución se enrazó en una fiola de 50 ml para determinar el grado de hidrólisis.

#### a. Determinación del grado de hidrólisis de la proteína soluble

Se utilizó el método reportado por Adler y Nissen (1979) con ligeras modificaciones. La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera: en un tubo de reacción se agregó 0,5 ml de buffer borato 0,2 M (ác. bórico más tetraborato de sodio anhidro ajustado a pH 8,2); 0,63 ml de cada hidrolizado proteico (bajo diluciones adecuadas con solución de duodecil sulfato de sodio (SDS) en agua al 1 %); a este conjunto se le agregó 0,5 ml de una solución de ácido picrilsulfónico (TNBS, a la concentración de 1 mg/ml). La mezcla obtenida se agitó e incubó a 50 °C durante 60 minutos en un baño maría (la reacción se realizó en la oscuridad). Terminado el tiempo de reacción, este fue detenido agregando 1 ml de HCL 0,1 N, luego se dejó reposar a temperatura ambiente por 20 min y se agregó 2 ml de agua destilada dejándose reposar nuevamente por 10 min, para luego hacer la lectura de la absorbancia a 340 nm. Las lecturas obtenidas fueron llevadas a una curva estándar utilizando a la leucina como patrón (ANEXO 2). Para la preparación del blanco se sustituyó la muestra hidrolizada por 0,63 ml de solución de SDS al 1 %.

Los péptidos libres fueron determinados mediante la siguiente fórmula usada por Benítez *et al.* (2008):

$$DH (\%) = \frac{h}{h_{total}} \times 100 \quad (14)$$

Donde:

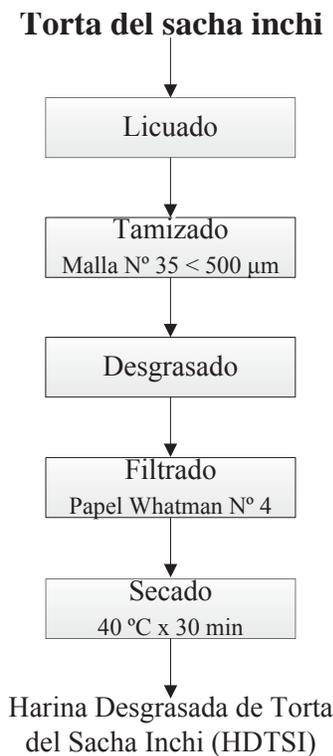
$h$ : Es el número de enlaces peptídicos rotos durante el proceso de hidrólisis.

$h_{total}$ : Es el número total de enlaces rotos obtenidos de la hidrólisis total.

### 3.5. Metodología experimental

#### 3.5.1. Preparación de la muestra

Se utilizó la metodología de Firatligil- Durmus y Evranuz (2010) y Guerrero-Ochoa *et al.* (2015) con algunas modificaciones. La torta se licuó hasta obtener una harina capaz de pasar por una malla N° 35 ( $< 500 \mu\text{m}$ ). La harina obtenida fue desgrasada con éter de petróleo en una relación 1/10 (g/ml) con agitación magnética continua por 16 h a temperatura ambiente. Luego se filtró al vacío (papel Whatman N° 4) y se secó en la estufa con recirculación de aire a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Obtenida la harina desgrasada de torta del sachá inchi (HDTSI) se empaquetó en bolsa de polietileno y se almacenó a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso. El flujo de operaciones para la obtención de la harina desgrasada de torta del sachá inchi, se muestra en la Figura 7.



**Figura 7: Diagrama de flujo para la obtención de HDTSI.**

### **3.5.2. Extracción de la proteína de la torta del sachá inchi**

#### **a. Extracción alcalina**

Se basó en la metodología descrita por Sathe *et al.* (2012) y Chee y Ayob (2013) con algunas modificaciones. Se consideraron cinco factores a evaluar: pH, temperatura, tiempo de extracción, relación materia prima/solvente y concentración de NaCl (Oomah *et al.*, 1994; Quanhong y Caili, 2005; Firatligil- Durmus y Evranuz, 2010; Lv *et al.*, 2011; Sathe *et al.*, 2012; Chee y Ayob, 2013; Parra *et al.*, 2014).

En un matraz de 50 ml, se pesó 1 g de la HDTSI y se disolvió con 15 ml de solución de NaCl (0 a 1 M). Luego se procedió a adicionar 1 mol/L de NaOH hasta ajustar al pH requerido para los ensayos (7,0 a 9,5), seguidamente se adicionó la solución restante para completar los 20 ml de solvente, para obtener la relación materia prima/solvente 1/20 (p/v) (se realiza el mismo procedimiento, cuando varía la relación materia prima/solvente entre 1/10 a 1/40 p/v). Luego, se llevó a baño maría bajo agitación constante (250 rpm) a una determinada temperatura (25 a 60 °C) y tiempo de extracción (10 a 60 min) en concordancia con el diseño experimental. Al final de la extracción, la suspensión se centrifugó a 4000 rpm por 20 min a 10 °C, obteniendo un sobrenadante el cual se filtró al vacío utilizando papel Whatman N °1 y se determinó el contenido de proteína soluble por el método de Lowry *et al.* (1951). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El flujo de operaciones para la extracción alcalina, se muestra en la Figura 8.

#### **b. Extracción enzimática asistida**

Se basó en la metodología de Sui *et al.* (2011) y Chee *et al.* (2012) con algunas modificaciones. Se consideraron dos factores: concentración de enzima y tiempo de extracción (Shen *et al.*, 2008; Sui *et al.*, 2011; Sari *et al.*, 2013).

En un matraz de 50 ml, se pesó 1 g de la HDTSI y se disolvió con 45 ml de agua destilada. Luego se procedió a adicionar 1 mol/L de NaOH hasta ajustar a pH 9,0, seguidamente se añadió la enzima (2 a 5 %, definida como el volumen de enzima por peso de proteína total determinada por Kjeldahl v/p) y después el agua restante para completar 50 ml de solvente, para obtener la relación materia prima/solvente 1/50 (p/v). Posteriormente, se llevó a baño

maría a temperatura de 55 °C y agitación magnética continua (300 rpm). Durante la extracción se mantuvo constante la temperatura y pH por un tiempo determinado según el diseño experimental (15 a 45 min). Después de la extracción, el extracto proteico se sometió a 100 °C por 5 min para la inactivación de la enzima Alcalasa. Finalmente, el extracto se centrifugó a 4000 rpm por 20 min a 10 °C y el sobrenadante obtenido se filtró al vacío utilizando papel Whatman N° 1 y se determinó el contenido de proteína soluble y grado de hidrólisis (GH). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El flujo de operaciones para la extracción enzimática asistida, se muestra en la Figura 9.

### **3.6. Diseño experimental**

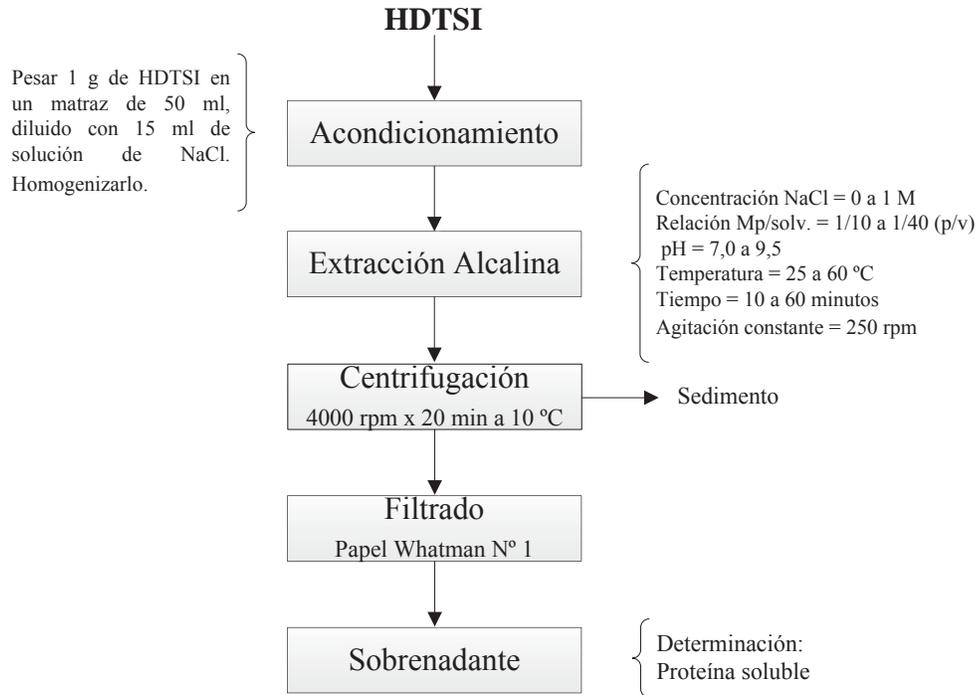
#### **3.6.1. Extracción alcalina**

El Diseño Completamente al Azar con arreglo Factorial  $2^k$  con réplicas en el punto central (primer orden) fue generado por Minitab® versión 16.1.0 (Minitab Inc., US); y el Diseño Compuesto Central (segundo orden), por *Statgraphics Centurión XVI* versión 16.2.04 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, US).

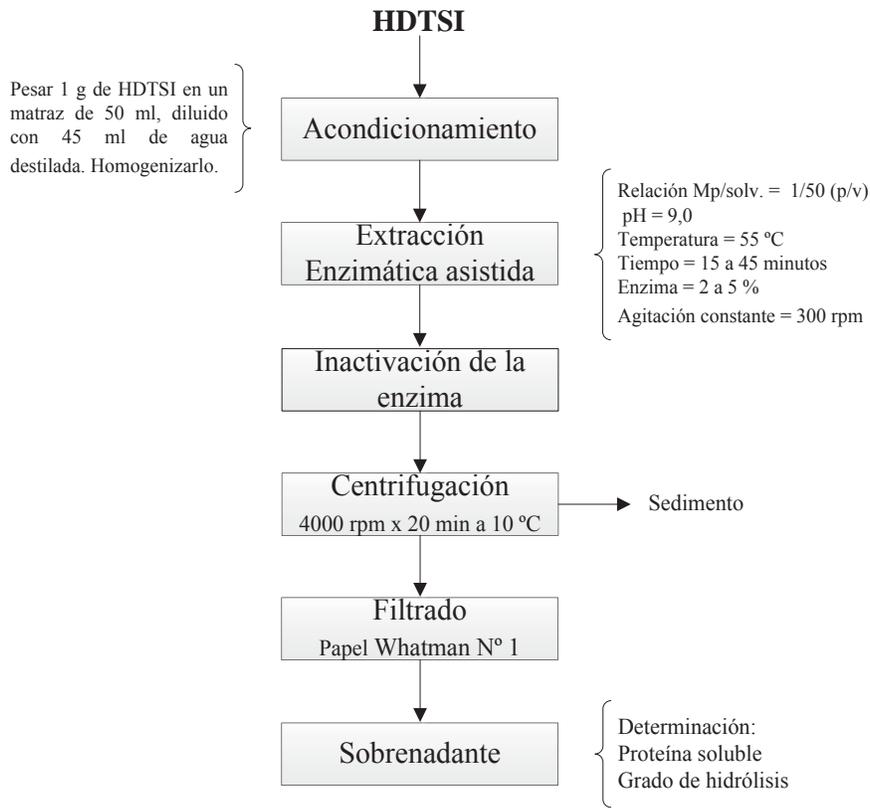
##### **a. Screening: Diseño experimental de primer orden**

En la etapa de *screening*, se analizaron los efectos de cinco variables independientes o factores:  $X_1$  (pH),  $X_2$  (temperatura),  $X_3$  (relación materia prima/solvente),  $X_4$  (concentración de NaCl) y  $X_5$  (tiempo de extracción); sobre la variable dependiente Y (rendimiento de extracción de proteínas). Con la finalidad de determinar los factores más importantes en el proceso de extracción de proteínas. Por lo tanto, los factores más eficientes podrían reducir los experimentos posteriores, lo que requiere un menor número de pruebas.

En esta etapa se aplicó un Diseño Completamente al Azar con arreglo Factorial  $2^k$  con réplicas en el punto central, lo cual sirve para dar una estimación promediada del efecto curvatura (Ayala y Pardo, 1995; Morales, 2003; Parra *et al.*, 2014). Según Ayala y Pardo (1995) para  $k = 5$  variables, consta de 32 puntos factoriales y tres repeticiones en el punto central; dando un total de 35 puntos experimentales. Cada variable fue codificada en dos niveles: -1 y 1, y los puntos centrales en 0; como se muestra en el Cuadro 11.



**Figura 8: Diagrama de flujo para la extracción alcalina.**



**Figura 9: Diagrama de flujo para la extracción enzimática asistida.**

Los factores y sus niveles (mínimo y máximo) se establecieron en base a la revisión de literatura (Oomah *et al.*, 1994; Quanhong y Caili, 2005; Firatligil- Durmus y Evranuz, 2010; Lv *et al.*, 2011; Sathe *et al.*, 2012; Chee y Ayob, 2013; Parra *et al.*, 2014) y de las pruebas preliminares. La importancia de cada factor en la etapa de *screening* se determinó mediante el diagrama de Pareto estandarizado y el análisis de varianza (ANVA) ( $\alpha = 0,05$ ).

### **b. Escalamiento**

La etapa de escalamiento se obvió, debido a que el efecto curvatura fue positivo. De acuerdo a Pinto (1995) citado por Morales (2003), si existe efecto curvatura, el siguiente paso sería la optimización del proceso utilizando un polinomio de segundo orden, mediante un Diseño Compuesto Central.

### **c. Optimización: Diseño experimental de segundo orden**

Los factores que fueron identificados como significativos en la etapa anterior, se optimizaron por la metodología de superficie de respuesta y la función de deseabilidad. El pH máximo se mantuvo a 9,5 para evitar la racemización de los aminoácidos y la desnaturalización e hidrólisis de las proteínas (Schwass y Finley, 1984; Cheftel *et al.*, 1989; Linden y Lorient, 1996; Badui, 2006; Fennema, 2010; Callisaya, 2011; Lv *et al.*, 2011; Chee y Ayob, 2013).

El análisis de superficie de respuesta de segundo orden para Y, se realizaron mediante un Diseño Compuesto Central (Ayala y Pardo, 1995; Quanhong y Caili, 2005; Wani *et al.*, 2006; Firatligil-Durmus y Evranuz, 2010; Chee y Ayob, 2013). Según Ayala y Pardo (1995) para  $k = 3$  variables, consta de ocho puntos factoriales ( $2^k$ ), seis puntos axiales en los ejes coordenados (a una distancia  $\alpha$ ) y cinco repeticiones en el punto central (para la estimación de la suma de cuadrados del error puro); dando un total de 19 puntos experimentales. Para determinar la ubicación de los puntos axiales se consideró  $\alpha = (n_f)^{1/4} = (8)^{1/4} = 1,682$  que, garantiza un diseño central compuesto rotatable (Montgomery, 2002). Cada variable fue codificada en cinco niveles: -1,682; -1; 0; 1 y 1,682; como se muestra en el Cuadro 12. Las variables independientes  $X_i$  se codificaron como  $x_i$ , que se define como adimensional, de acuerdo con la siguiente ecuación:



$$x_i = (X_i - X_0)/\Delta X_i \quad (15)$$

Donde  $x_i$  es el valor codificado de una variable independiente;  $X_i$  es el valor real de una variable independiente;  $X_0$  es el valor real de una variable independiente en el punto central;  $\Delta X_i$  es el valor de cambio gradual. Los códigos específicos son:

$$x_2(\text{Temperatura}) = (X_2 - 55)/15 \quad (16)$$

$$x_3(\text{Relación H/S}) = (X_3 - 35)/15 \quad (17)$$

$$x_4(\text{NaCl}) = (X_4 - 1,25)/0,75 \quad (18)$$

Los experimentos se llevaron a cabo en un orden completamente al azar para minimizar el sesgo.

El modelo propuesto para la variable respuesta, rendimiento de extracción de proteínas (Y), fue analizado y ajustado a un modelo de segundo orden, que incluye la curvatura de la superficie y la dependencia de dicha respuesta en función de los factores bajo estudio. Dicho polinomio de segundo orden (cuadrática) corresponde a la siguiente ecuación:

$$\hat{Y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k=3} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{k=3} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j}^{k=3} \sum_{i < j}^{k=3} \beta_{ij} x_i x_j \quad (19)$$

Donde:

$\hat{Y}$ : Rendimiento de proteína estimado (% g de proteína soluble/100 g de proteína total).

$\beta_0$ : Término independiente.

$\beta_i$ : Coeficientes de regresión lineal.

$\beta_{ii}, \beta_{ij}$ : Coeficientes de regresión cuadráticos.

$x_i, x_j$ : Variables independientes o factores.

$k$ : Número de variables independientes o factores.

Posteriormente, se realizó el ANVA y la prueba de significancia de los coeficientes del modelo estimado ( $p < 0,05$ ). La significancia estadística del modelo se estableció mediante la prueba de Fischer, y de los coeficientes mediante la prueba  $t$  de *Student*; debiéndose

registrar un valor de probabilidad menor a 0,05. Por otro lado, la falta de ajuste del modelo, también fue establecida mediante la prueba de Fischer, debiendo ser un valor de probabilidad F mayor a 0,05. La prueba de bondad de ajuste de la ecuación de regresión de las observaciones experimentales fue verificada por el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{\text{ajustado}}$ ). También se realizó la gráfica de dispersión, relacionando los resultados observados con los estimados.

Con la finalidad de brindar una visión panorámica de la variación del rendimiento de extracción de proteínas ( $\hat{Y}$ ) en función a los factores estudiados, se graficó la superficie de respuesta (tridimensional) y la curva de contorno correspondiente a la Ecuación 19, que representa el efecto de dos factores sobre la respuesta.

#### **d. Función de deseabilidad**

Los valores estimados ( $\hat{Y}_i$ ) se transforman en un valor de deseabilidad individual ( $d$ ), que varía en el rango  $0 \leq d \leq 1$ , y mide el grado de deseabilidad de la respuesta en referencia al valor óptimo destinado a ser alcanzado. En este caso, se ha querido que la variable dependiente sea lo más alto posible. El valor óptimo ideal es  $d = 1$ ; pero un valor aceptable puede ser entre 0,6 y 0,8 (Firatligil- Durmus y Evranuz, 2010). En la función de deseabilidad individual, se utilizó el programa Minitab® versión 16.1.0 (Minitab Inc., US).

#### **e. Validación del modelo**

Las condiciones óptimas de los niveles de las variables independientes en la extracción de proteínas, se obtuvieron mediante la metodología de superficie de respuesta. Para la validación, se realizaron tres repeticiones experimentales. Los valores obtenidos experimentalmente (con los niveles óptimos de las variables independientes) se compararon con los valores estimados por el modelo.

### **3.6.2. Extracción enzimática asistida**

El arreglo del experimento bajo el Diseño Compuesto Central (segundo orden), fue generado por *Statgraphics Centurión XVI* versión 16.2.04 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, US).

### a. Optimización: Diseño experimental de segundo orden

La etapa de optimización se aplicó la metodología de superficie de respuesta y la función de deseabilidad, para determinar la influencia de dos variables independientes o factores:  $Z_1$  (concentración de enzima) y  $Z_2$  (tiempo de extracción); sobre  $Y_1$  (rendimiento de extracción de proteínas) y  $Y_2$  (grado de hidrólisis).

El análisis de superficie de respuesta de segundo orden para  $Y_1$  y  $Y_2$ , se realizaron mediante un DCC (Ayala y Pardo, 1995; Quanhong y Caili, 2005; Wani *et al.*, 2006; Firatligil-Durmus y Evranuz, 2010; Chee y Ayob, 2013). Según Ayala y Pardo (1995) para  $k = 2$  variables, consta de cuatro puntos factoriales ( $2^k$ ), cuatro puntos axiales en los ejes coordenados (a una distancia  $\alpha$ ) y cinco repeticiones en el punto central (para la estimación de la suma de cuadrados del error puro); dando un total de 13 puntos experimentales. Para determinar la ubicación de los puntos axiales se consideró  $\alpha = (n_f)^{1/4} = (4)^{1/4} = 1,41$  que garantiza un diseño central compuesto rotatable (Montgomery, 2002). Cada variable fue codificada en cinco niveles: -1,41; -1; 0; 1 y 1,41; como se muestra en el Cuadro 13. Los factores y sus niveles (mínimo y máximo) se establecieron en base a la revisión de literatura (Shen *et al.*, 2008; Sui *et al.*, 2011; Sari *et al.*, 2013) y de las pruebas preliminares. Las variables  $Z_i$  se codificaron como  $z_i$ , que se define como adimensional, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$z_i = (Z_i - Z_0)/\Delta Z_i \quad (20)$$

Donde  $z_i$  es el valor codificado de una variable independiente,  $Z_i$  es el valor real de una variable independiente,  $Z_0$  es el valor real de una variable independiente en el punto central,  $\Delta Z_i$  es el valor de cambio gradual. Los códigos específicos son:

$$z_1(\text{Enzima}) = (Z_1 - 3,5)/1,5 \quad (21)$$

$$z_2(\text{Tiempo}) = (Z_2 - 30)/15 \quad (22)$$

El modelo propuesto para las variables respuesta, rendimiento de extracción de proteínas ( $Y_1$ ) y grado de hidrólisis ( $Y_2$ ), fueron analizados por separados y ajustados a un modelo de segundo orden, que incluye la curvatura de la superficie y la dependencia de dicha

respuesta en función de los factores bajo estudio. Dicho polinomio de segundo orden (cuadrática) corresponde a la siguiente ecuación:

$$\hat{Y}_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k=2} \beta_i z_i + \sum_{i=1}^{k=2} \beta_{ii} z_i^2 + \sum_{i < j}^{k=2} \sum_{i < j}^{k=2} \beta_{ij} z_i z_j \quad (23)$$

Donde:

$\hat{Y}_1$ : Rendimiento de proteína estimado (%).

$\hat{Y}_2$ : Grado de hidrólisis estimado (%).

$\beta_0$ : Término independiente.

$\beta_i$ : Coeficientes de regresión lineal.

$\beta_{ii}, \beta_{ij}$ : Coeficientes de regresión cuadráticos.

$z_i, z_j$ : Variables independientes o factores.

$k$ : Número de variables independientes o factores.

**Cuadro 13: Las variables independientes y sus niveles evaluados en la optimización.**

Nº	Variable independiente	Codificado	No Codificado	Niveles				
				-1,41	-1	0	1	1,41
1	Concentración de enzima (%)	$z_1$	$Z_1$	1,4	2	3,5	5	5,62
2	Tiempo de extracción (min)	$z_2$	$Z_2$	9	15	30	45	51

Posteriormente, se realizó el ANVA y la prueba de significancia de los coeficientes del modelo estimado ( $p < 0,05$ ). La significancia estadística del modelo se estableció mediante la prueba de Fischer, y de los coeficientes mediante la prueba  $t$  de *Student*; debiéndose registrar un valor de probabilidad menor a 0,05. Por otro lado, la falta de ajuste del modelo, también fue establecida mediante la prueba de Fischer, debiendo ser un valor de probabilidad F mayor a 0,05. La bondad de ajuste de la ecuación de regresión de las observaciones experimentales fue verificada por el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{ajustado}$ ). También se realizó la gráfica de dispersión, relacionando los resultados observados con los estimados.

Con la finalidad es brindar una visión panorámica de la variación del rendimiento de extracción de proteínas ( $\hat{Y}_1$ ) y grado de hidrólisis ( $\hat{Y}_2$ ) en función a los factores estudiados.

Se graficó la superficie de respuesta (tridimensional) y la curva de contorno correspondiente a la Ecuación 23.

### b. Función de deseabilidad

Los valores estimados ( $\hat{Y}_i$ ) se transforman en un valor de deseabilidad individual ( $d$ ), que varía en el rango  $0 \leq d \leq 1$ , y mide el grado de deseabilidad de la respuesta en referencia al valor óptimo destinado a ser alcanzado. En este caso, se ha querido que la variable dependiente sea lo más alto posible. El valor óptimo ideal es  $d = 1$ ; pero un valor aceptable puede ser entre 0,6 y 0,8 (Firatligil- Durmus y Evranuz, 2010). En la función de deseabilidad individual, se utilizó el programa Minitab® versión 16.1.0 (Minitab Inc., US).

### c. Optimización de respuestas múltiples

La optimización de respuestas múltiples se llevó a cabo luego de obtener los modelos matemáticos correspondientes a cada respuesta evaluada  $\hat{Y}_1$  y  $\hat{Y}_2$ . La finalidad de esta optimización, se debió para obtener las dos respuestas simultáneamente. El procedimiento consiste en la construcción de una función para cada respuesta evaluada de deseabilidad individual ( $d_i$ ), como se muestra a continuación:

$$\begin{array}{l} \text{Maximización del} \\ \text{rendimiento de} \\ \text{proteína} \end{array} \quad d_1 = \begin{cases} 0 & \hat{Y}_1 < RP_{MIN} \\ \left( \frac{\hat{Y}_1 - RP_{MIN}}{RP_{MAX} - RP_{MIN}} \right)^1 & RP_{MIN} \leq \hat{Y}_1 \leq RP_{MAX} \\ 1 & \hat{Y}_1 > RP_{MAX} \end{cases} \quad (24)$$

Donde:

$d_1$ : Función de deseabilidad para el rendimiento de proteína.

$RP_{MAX}$ : Máximo rendimiento de extracción de la proteína.

$RP_{MIN}$ : Mínimo rendimiento de extracción de la proteína.

$$\begin{array}{l} \text{Minimización del} \\ \text{grado de hidrólisis} \end{array} \quad d_2 = \begin{cases} 1 & \hat{Y}_2 < GH_{MIN} \\ \left( \frac{GH_{MAX} - \hat{Y}_2}{GH_{MAX} - GH_{MIN}} \right)^1 & GH_{MIN} \leq \hat{Y}_2 \leq GH_{MAX} \\ 0 & \hat{Y}_2 > GH_{MAX} \end{cases} \quad (25)$$

Donde:

$d_2$ : Función de deseabilidad para el grado de hidrólisis.

$GH_{MAX}$ : Máximo contenido de grado de hidrólisis.

$GH_{MIN}$ : Mínimo contenido de grado de hidrólisis.

El valor denominado Deseabilidad Global ( $D$ ) representó la media geométrica de los valores de las deseabilidades individuales ( $d_i$ ), es decir:

$$D = (d_1 \times d_2)^{1/2} \quad (26)$$

La función  $D$ , elige las mejores condiciones para las variables diseñadas. Por lo tanto, las condiciones ideales para  $\hat{Y}_1$  (maximizar) y  $\hat{Y}_2$  (minimizar), fueron optimizados simultáneamente con la función de Deseabilidad Global de Derringer (Montgomery, 2002; Candiotti *et al.*, 2014). Para la realización de esta optimización de respuesta múltiples, se utilizó el programa Minitab® versión 16.1.0 (Minitab Inc., US).

#### **d. Validación del modelo**

Las condiciones óptimas de los niveles de las variables independientes en la extracción de proteínas, se obtuvieron mediante la metodología de superficie de respuesta. Para la validación, se realizaron tres repeticiones experimentales. Los valores obtenidos experimentalmente (con los niveles óptimos de las variables independientes) se compararon con los valores estimados por el modelo.

### **3.7. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos correspondientes a la MSR tanto en la extracción alcalina y enzimática asistida, se realizaron utilizando el programa *Statgraphics Centurión XVI* versión 16.2.04 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, US) y Minitab® versión 16.1.0 (Minitab Inc., US).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Materia prima

#### 4.1.1. Análisis proximal de la torta del sachu inchi

En el Cuadro 14 se presenta el análisis proximal de la torta del sachu inchi (molida y sin desgrasar).

**Cuadro 14: Composición proximal de la torta del sachu inchi.**

Componentes	Base húmeda (%)	Base seca (%)
Humedad	7,99	0
Proteína*	53,8	58,47
Grasa	8,23	8,94
Fibra cruda	3,77	4,09
Ceniza	5,26	5,72
Carbohidrato	20,95	22,77

\*Factor de conversión de nitrógeno (F.C.N.) = 5,7.

Los resultados muestran que la torta del sachu inchi es una fuente importante de proteínas, lo cual justifica el proceso de extracción de las mismas. Kinsella (1976) indica que la torta subproducto generado de la extracción de aceites, representa una fuente interesante de proteínas.

Según los datos mostrados, el contenido de proteína (58,47 %) y grasa (8,94 %) de la torta del sachu inchi son similares a los reportados por Pascual y Mejía (2000) con un 59,13 % y 6,93 % de proteína y grasa, respectivamente, para sachu inchi procedente de Pucallpa; y por Ruiz *et al.* (2013) con 59 % de proteína y 7,8 % de grasa (sachu inchi procedente de San Martín). Por otro lado, Mercado (2012) y Jagersberger (2013) reportaron un mayor

contenido de grasa 20,49 % y 19,9 %, pero menor porcentaje de proteínas 53,73 % (procedente de San Martín) y 51,76 % (procedente de Amazonas), respectivamente.

Las diferencias encontradas pueden ser atribuidas al lugar de procedencia de la semilla, las diferentes condiciones climáticas donde se desarrollaron, el tipo de almacenamiento y su tratamiento post-cosecha (Hamaker *et al.*, 1992; Pascual y Mejía, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2011; Ruíz *et al.*, 2013). Además, cabe indicar que Mercado (2012) y Jagersberger (2013), obtuvieron la torta a nivel de laboratorio, mientras que la torta utilizada en esta investigación fue obtenida a nivel industrial, haciendo uso de un prensado en frío utilizando un expeller. Ferchau (2000) indica que la torta obtenida después del prensado en frío (a nivel industrial) contiene aceite residual entre 8 – 12 %, rango donde se encontró la grasa de la torta empleada en esta investigación.

#### 4.1.2. Contenido de proteína total en la HDTSI

El contenido de proteína total de la harina desgrasada de la torta de sacha inchi (HDTSI) con humedad de 6,58 %, se muestra en el Cuadro 15.

**Cuadro 15: Contenido de proteína total de la HDTSI.**

Producto	Base húmeda (%)	Base seca (%)
Harina Desgrasada de Torta del Sacha Inchi (HDTSI)*	57,9 ±6,6	61,98 ±6,6

Media ± desviación estándar; n=3; \*F.C.N.= 5,7.

La HDTSI presentó un alto valor de proteínas en base seca (61,98 %), dicho valor se aproxima a lo reportado en la literatura, donde se indica que las harinas desgrasadas de las semillas oleaginosas pueden contener proteínas en el rango entre el 35 – 60 % (b.s.) (Moure *et al.*, 2006). Similar resultado lo presentaron Sathe *et al.* (2012) para la harina del sacha inchi, tras un proceso de desgrasado por solvente, obteniendo un 64,46 % de proteína (F.C.N. = 5,7); mientras que Mercado (2012) reportó un 67,23 % (F.C.N. = 6,25). Esta ligera diferencia puede ser atribuida al factor de conversión de nitrógeno, el método de extracción de grasa y el tipo de solvente (López *et al.*, 2009; Badwaik *et al.*, 2012). Mercado (2012) y Sathe *et al.* (2012), utilizaron el método Soxhlet con éter de petróleo (10 h) y hexano (6 h), respectivamente.

La HDTSI presentó un mayor contenido de proteínas (en base seca) en comparación a otras harinas oleaginosas desgrasadas como: las semillas de linaza 42,8 % (Oomah *et al.*, 1994), torta de *Guevina avellana* 20 % (Moure *et al.*, 2002), colza 42,7 % (Pedroche *et al.*, 2004), semillas de calabaza 25 – 36 % (Quanhong y Caili, 2005), semillas de sandía 56,13 % (Wani *et al.*, 2008), canola 43,6 – 45,5 % (Tan *et al.*, 2011; Akbari y Wu, 2015), ajonjolí 42 % (Onsaard *et al.* 2010), girasol 57,3 – 59,9 % (Pickardt *et al.*, 2009), cacahuete 47 – 55 % (Rustom *et al.*, 1991; Ma *et al.*, 2010), semillas de pimienta 26,02 % (Firatligil-Durmus y Evranuz, 2010) soya 47,8 % (Rosset *et al.*, 2012) y torta de palma 16,9 % (Chee y Ayob, 2013).

Sari *et al.* (2013) mencionan que la influencia de la grasa en la extracción de proteínas no sólo se basa en características de la estructura celular de la muestra, sino también en las características químicas. Químicamente, la grasa se hidroliza mediante la saponificación en condiciones alcalinas. Cuando esto sucede, la proteína puede disolverse mejor en solución, obteniendo posiblemente mejores resultados. Por lo tanto, se recomienda desgrasar la materia prima antes de la extracción de proteína.

## **4.2. Extracción alcalina**

### **4.2.1. Screening**

El criterio de optimización usado fue el de maximizar el rendimiento de extracción de las proteínas de la HDTSI (función objetivo). De acuerdo con varias investigaciones publicadas sobre la extracción de proteínas y las experiencias de las pruebas preliminares, cinco factores que pueden afectar en la extracción de las proteínas, fueron evaluados: pH ( $X_1$ ), temperatura ( $X_2$ ), relación materia prima/solvente ( $X_3$ ), concentración de NaCl ( $X_4$ ) y tiempo de extracción ( $X_5$ ) (Oomah *et al.*, 1994; Quanhong y Caili, 2005; Firatligil- Durmus y Evranuz, 2010; Lv *et al.*, 2011; Sathe *et al.*, 2012; Chee y Ayob, 2013; Parra *et al.*, 2014).

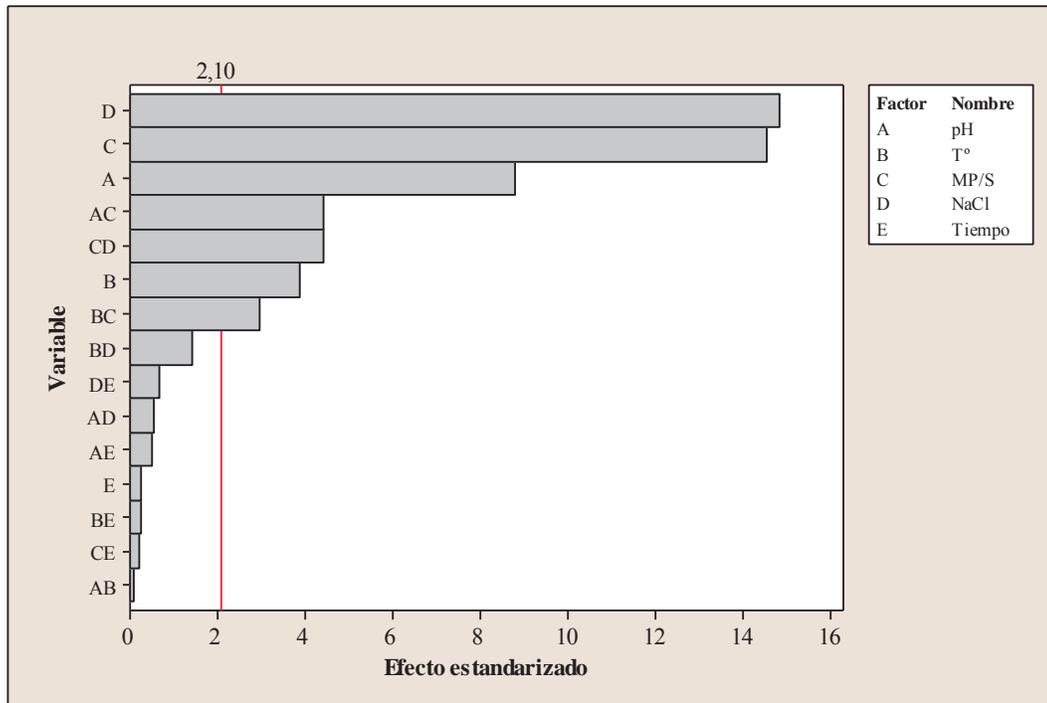
Sin embargo, para confirmar estadísticamente que estas variables influyen en el proceso de extracción de la proteína, se procedió con la etapa de *screening*, cuyo objetivo fue identificar aquellas variables que son significativas para el proceso. Son significativas aquellas variables, que al hacerlas variar de un nivel bajo a un nivel alto, afectan

sensiblemente las respuestas de un proceso; eliminando de esta manera aquellas variables que resulten poco significativa (Ayala y Pardo, 1995). Para ello se asumió un diseño completamente al azar con arreglo factorial  $2^k$  con réplica en el punto central.

La metodología del diseño completamente al azar con arreglo factorial  $2^k$  con réplica en el punto central, es aquel donde se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores. Además, la adición de pruebas en el punto central del diseño, sirve para dar una estimación del efecto curvatura (Ayala y Pardo, 1995).

La matriz del diseño para esta etapa se muestra en el Cuadro 16. Las pruebas se realizaron en orden aleatorio, ejecutando 32 experimentos y 3 puntos centrales, dando un total de 35 experimentos. Los resultados revelan que el rendimiento de extracción de las proteínas varió de 3,5 a 25,65 % (g de proteína soluble/100 g de proteína total).

La importancia de cada factor en la etapa de *screening*, se determinó mediante el diagrama de Pareto estandarizado (Figura 10) y el análisis de varianza (Cuadro 17).



**Figura 10: Diagrama de Pareto estandarizado para el DCA con arreglo factorial  $2^k$  con réplica en el punto central.**

**Cuadro 16: Arreglo factorial  $2^k$  con repeticiones en el centro, variables codificadas y la respuesta experimental (observado) y estimada en la etapa de *screening* (n = 3).**

Experimentos	Variable codificada					Rendimiento de proteína (%)					
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	x <sub>4</sub>	x <sub>5</sub>	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Observado, $\bar{Y}$	Estimado, $\hat{Y}$	
1	-1	-1	-1	-1	-1	3,48	3,36	3,64	3,50	2,88	
2	1	-1	-1	-1	-1	5,40	4,99	5,36	5,25	5,96	
3	-1	1	-1	-1	-1	5,07	4,57	4,83	4,82	4,36	
4	1	1	-1	-1	-1	6,24	5,48	5,94	5,89	7,34	
5	-1	-1	1	-1	-1	5,05	4,61	4,49	4,72	4,54	
6	1	-1	1	-1	-1	14,60	12,71	12,96	13,42	12,54	
7	-1	1	1	-1	-1	7,02	7,20	6,49	6,90	9,31	
8	1	1	1	-1	-1	20,12	20,54	18,27	19,65	17,22	
9	-1	-1	-1	1	-1	8,32	7,81	7,33	7,82	9,42	
10	1	-1	-1	1	-1	14,42	14,03	13,44	13,97	11,87	
11	-1	1	-1	1	-1	10,13	9,43	9,38	9,65	9,34	
12	1	1	-1	1	-1	12,39	12,46	11,00	11,95	11,69	
13	-1	-1	1	1	-1	17,47	17,10	15,84	16,80	16,00	
14	1	-1	1	1	-1	20,89	20,65	21,80	21,11	23,38	
15	-1	1	1	1	-1	22,16	21,48	18,94	20,86	19,21	
16	1	1	1	1	-1	25,06	25,14	25,50	25,23	26,49	
17	-1	-1	-1	-1	1	4,27	4,11	3,93	4,10	3,17	

Continuación

18	1	-1	-1	-1	1	5,80	5,28	5,14	5,41	5,70
19	-1	1	-1	-1	1	5,56	5,32	5,21	5,36	4,39
20	1	1	-1	-1	1	6,26	6,10	6,47	6,28	6,82
21	-1	-1	1	-1	1	4,27	4,44	4,69	4,47	4,59
22	1	-1	1	-1	1	10,32	10,95	10,42	10,56	12,05
23	-1	1	1	-1	1	9,23	7,98	8,26	8,49	9,11
24	1	1	1	-1	1	18,99	16,15	17,69	17,61	16,46
25	-1	-1	-1	1	1	9,57	8,68	8,77	9,01	10,46
26	1	-1	-1	1	1	12,78	12,32	13,15	12,75	12,36
27	-1	1	-1	1	1	9,84	9,92	9,87	9,88	10,12
28	1	1	-1	1	1	12,92	11,37	12,11	12,13	11,91
29	-1	-1	1	1	1	18,66	16,90	16,78	17,45	16,80
30	1	-1	1	1	1	24,80	25,36	24,87	25,01	23,63
31	-1	1	1	1	1	20,92	18,10	19,89	19,63	19,75
32	1	1	1	1	1	25,32	25,85	25,78	25,65	26,48
33	0	0	0	0	0	20,63	20,63	20,63	20,63	20,57
34	0	0	0	0	0	20,11	20,11	20,11	20,11	20,57
35	0	0	0	0	0	20,98	20,98	20,98	20,98	20,57

En la Figura 10, se observa que la longitud de cada barra es proporcional al impacto de cada efecto en la respuesta. Cualquier barra que se extienda más allá de la línea vertical (en rojo) resulta ser estadísticamente significativa, en el nivel de significancia seleccionado (5 %). La concentración de NaCl, relación materia prima/solvente (MP/S), pH y la temperatura fueron los factores más significativos que afectaron el rendimiento de extracción de proteína (Y). Los efectos de interacción de pH – relación MP/solvente, relación MP/solvente – concentración de NaCl y la temperatura – relación MP/solvente, también fueron significativos para el rendimiento de extracción de la proteína. El tiempo de extracción no fue significativo ( $p > 0,05$ ).

Sin embargo, hasta este punto no se asume la linealidad del modelo (primer orden), y no se evaluó ningún efecto curvatura. Este efecto se evalúa con las repeticiones en el centro y por ello es necesario hacer un análisis de varianza, el cual se muestra en el Cuadro 17.

El análisis de varianza (Cuadro 17) confirma lo establecido en el diagrama de Pareto a un nivel de significancia de 5 %. Las variables  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  y  $X_4$  fueron significativas, es decir, afectaron sensiblemente a la respuesta Y. Las interacciones  $X_1X_3$ ,  $X_2X_3$  y  $X_3X_4$  también fueron significativas, al igual que el efecto curvatura, por lo que se puede decir que el modelo lineal no es apropiado para este caso.

Como se puede observar, los cuatro factores que afectaron significativamente el proceso de extracción de las proteínas de la HDTSI, están sustentados por Cheftel *et al.* (1989) quienes afirman que la solubilidad depende fundamentalmente del pH, fuerza iónica, tipo de solvente y la temperatura. De manera similar, Linden y Lorient (1996) afirman que en la solubilización de las proteínas intervienen al menos cuatro factores simultáneamente: pH, fuerza iónica, la temperatura y el tipo de solvente, pero que depende fundamentalmente del pH (alcalino), ya que producen la máxima solubilidad de la proteína. Tan *et al.* (2011) indican que el rendimiento de extracción de proteínas está influenciado por el tipo de proceso de extracción y por diferentes factores, tales como el pH, la concentración de sales, fuerza iónica del medio, carga neta y repulsiones electrostáticas.

Rodrigues *et al.* (2012) mencionan que la solubilización de las proteínas vegetales, de las harinas de semillas oleaginosas (soja, girasol, colza, linaza) o semillas de sandía, calabaza, uva y melón; dependen fundamentalmente de las soluciones acuosas o de la concentración

de las sales (ej. NaCl) con niveles de pH muy variables, así como el cambio en la relación sólido/solvente y temperatura. Martínez *et al.* (2013) añaden que la extracción de proteínas vegetales, es particularmente difícil debido a las características metabólicas y estructurales de los tejidos de las plantas, incluyendo la matriz de la pared celular.

**Cuadro 17: ANVA para el modelo lineal en la etapa de *screening*.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Grado de libertad	Cuadrado Medio	Valor F <sub>c</sub>	Valor-P	Sig.
Modelo	1430,92	15	95,394	39,31	0,000	***
X <sub>1</sub>	192,13	1	192,129	77,16	0,000	***
X <sub>2</sub>	37,48	1	37,476	15,05	0,001	**
X <sub>3</sub>	526,42	1	526,420	211,42	0,000	***
X <sub>4</sub>	548,38	1	548,384	220,24	0,000	***
X <sub>5</sub>	0,16	1	0,158	0,06	0,804	n.s.
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	0,021	1	0,021	0,01	0,929	n.s.
X <sub>1</sub> .X <sub>3</sub>	48,59	1	48,585	19,51	0,000	***
X <sub>1</sub> .X <sub>4</sub>	0,78	1	0,784	0,32	0,582	n.s.
X <sub>1</sub> .X <sub>5</sub>	0,60	1	0,602	0,24	0,629	n.s.
X <sub>2</sub> .X <sub>3</sub>	21,66	1	21,665	8,70	0,009	**
X <sub>2</sub> .X <sub>4</sub>	4,89	1	4,891	1,96	0,178	n.s.
X <sub>2</sub> .X <sub>5</sub>	0,14	1	0,137	0,05	0,818	n.s.
X <sub>3</sub> .X <sub>4</sub>	48,44	1	48,437	19,45	0,000	***
X <sub>3</sub> .X <sub>5</sub>	0,11	1	0,112	0,04	0,835	n.s.
X <sub>4</sub> .X <sub>5</sub>	1,12	1	1,121	0,45	0,511	n.s.
Curvatura	199,66	1	199,660	80,18	0,000	***
Error residual	44,82	18	2,490			
Falta de ajuste	44,43	16	2,777	14,49	0,066	n.s.
Error puro	0,38327	2	0,192			
Total	1675,40	34				
R <sup>2</sup>	0,9732					
R <sup>2</sup> <sub>ajustado</sub>	0,9490					

\* Significancia a un nivel de  $\alpha=0,05$ ; n.s.= No significativo.

\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0,01$ .

\*\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0,001$ .

Por tanto, las variables más importantes identificadas en esta etapa del estudio (concentración NaCl, relación materia prima/solvente, pH y temperatura), están relacionadas con los factores mencionados en la literatura, puesto que el solvente es una solución de NaCl e influye directamente con la fuerza iónica, la cual reduce la atracción electrostática entre las cargas opuestas de grupos próximos, produciendo la solvatación de los iones que permitirán la solubilidad de las proteínas. Asimismo el pH que debido a la naturaleza anfótera de la proteína, influye en función a cuan cerca o lejos se encuentre del punto isoeléctrico. De igual manera, la temperatura que como regla general mejora la solubilidad de las proteínas; y la relación materia prima/solvente, que permite que haya un equilibrio y evite la saturación de los componentes solubilizados que a la vez depende del porcentaje y el tipo de proteínas de la harina (Cheftel *et al.*, 1989; Fennema, 2010; Urrutia, 2010). También hay que resaltar la influencia de las interacciones, comprobadas estadísticamente por los resultados, y justificados por Badui (2006) quien menciona que la solubilidad de las proteínas, se debe de forma conjunta a los distintos factores y que no se pueden aislar fácilmente uno de otro.

#### **4.2.2. Escalamiento**

La necesidad de profundizar el análisis en esta etapa no fue requerida, debido a que el análisis de varianza en la etapa de *screening* (Cuadro 17) comprobó un efecto curvatura altamente significativo.

Por otro lado, fue posible localizar un rendimiento máximo de extracción de la proteína del sacha inchi en el diseño completamente al azar con arreglo factorial  $2^k$  con réplica en el punto central. Las variables para dicho rendimiento fueron: pH 9,5, temperatura de 60 °C, relación materia prima/solvente 1/40 (p/v), concentración de NaCl 1 M y tiempo de extracción 10 min; obteniendo un valor estimado de 26,48 %. Esto puede indicar que este punto se encontraría en la región más cercana a la óptima. Por lo tanto, para la siguiente etapa se realizó un nuevo cuadro de codificaciones de variables (Cuadro 12), es decir, se variaron los parámetros de los niveles de las variables, partiendo como nuevo punto central, el punto más alto hallado en el diseño anterior y se siguió con la estimación de segundo orden.

Cabe indicar que el pH fue significativo, sin embargo no se tomó en cuenta en la etapa de optimización; debido a que muchos autores indican no ajustar a  $\text{pH} > 9,5$ , ya que provoca la racemización de los aminoácidos sobre todo los azufrados y a otros esenciales tales como lisina generando lisinoalanina que pueden ser tóxicos, además propician la formación de puentes covalentes intra o intermoleculares que reducen la solubilidad de la proteína y la capacidad de extracción. También se ha reportado que la desnaturalización e hidrólisis de las proteínas, incrementan la reacción de Maillard y la extracción de componentes no proteicos, los cuales co-precipitan con las proteínas, bajando así la calidad del aislado proteico (Schwass y Finley, 1984; Cheftel *et al.*, 1989; Linden y Lorient, 1996; Mizubuti *et al.*, 2000; Moure *et al.*, 2006; Badui, 2006; Fennema, 2010; Callisaya, 2011; Lv *et al.*, 2011; Chee y Ayob, 2013).

Según Ruíz *et al.* (2013) el contenido de aminoácidos azufrados de la torta del sachá inchi (metionina y cisteína), se presentan en mayores cantidades (28 mg/g de proteína) a comparación de otras fuentes (soya y maní). Por lo tanto, trabajar con pH mayor a 9,5 afectaría negativamente a la calidad de las proteínas por las razones ya expuestas.

#### **4.2.3. Optimización del proceso**

Para la etapa de optimización, se consideró un diseño compuesto central (DCC) de segundo orden, de acuerdo a la metodología descrita por Ayala y Pardo (1995), Quanhong y Caili (2005), Wani *et al.* (2006), Firatligil-Durmus y Evranuz (2010) y Chee y Ayob (2013).

Para ello, se consideraron tres variables significativas obtenidas en la etapa de *screening*: la temperatura ( $X_2$ ), la relación materia prima/solvente ( $X_3$ ) y la concentración de NaCl ( $X_4$ ). El pH ( $X_1$ ) de 9,5 se mantuvo constante, debido a las razones expuestas anteriormente; mientras que el tiempo ( $X_5$ ) seleccionado fue de 15 min, ya que las respuestas no difirieron significativamente entre un corto y largo tiempo. Este tiempo seleccionado coincide con empleado por Quanhong y Caili (2005), Wani *et al.* (2008) y Lv *et al.* (2011) quienes trabajaron en la extracción de las proteínas de las semillas de calabaza, semillas de sandía y semillas de uva, respectivamente. El criterio de optimización usado fue maximizar el rendimiento de proteína de la HDTSI (función objetivo).

El DCC consiste en un factorial  $2^k$ , ampliado con puntos axiales y centrales que aportan la curvatura necesaria para la estimación de los efectos cuadráticos (Goundan, 1992). Este diseño ha sido utilizado para la optimización de extracciones de proteína de diferentes fuentes de origen alimentario, como: las semillas de linaza (Oomah *et al.*, 1994), gandul (Mizubuti *et al.*, 2000), semillas de calabaza (Quanhong y Caili, 2005), salvado de avena (Guan y Yao, 2008), caupi (Mune *et al.*, 2008), semillas de sandía (Wani *et al.*, 2008), girasol (Pickardt *et al.*, 2009), sorgo malteado (Irakoze y Sindyigaya, 2010), semillas de pimienta (Firatligil-Durmus y Evranuz, 2010), tarwi (Urrutia, 2010), cacahuete (Rustom *et al.*, 1991 y Ma *et al.*, 2010), semillas de melón amargo (Horax *et al.*, 2011), avellana (Sui *et al.*, 2011), soya (Rosset *et al.*, 2012), torta de palma (Chee *et al.*, 2012; Chee y Ayob, 2013), almorta (Shahraki *et al.*, 2013), lentejas (Parra *et al.*, 2014) y quinua (Guerrero-Ochoa *et al.*, 2015).

Los valores promedio del rendimiento de extracción de proteínas experimentales ( $\bar{Y}$ ) y estimados ( $\hat{Y}$ ) para cada punto, se presentan en el Cuadro 18. Las pruebas se realizaron en orden aleatorio, ejecutando ocho puntos factoriales, seis puntos axiales y cinco repeticiones en el punto central; dando un total de 19 experimentos.

Los resultados revelan que el rendimiento de extracción de proteínas varió de 11,59 a 28,98 %. Anteriormente, Mercado (2012) recuperó 99,4 % de proteínas presente en la harina del sacha inchi (250  $\mu$ m) en condiciones de extracción a pH 11, relación harina/solvente 1/30 (p/v), temperatura 50 °C y tiempo de extracción 60 min. Mientras que Sathe *et al.* (2012) recuperaron 69,2 % – 79,5 % de proteínas en condiciones de extracción a pH 1 – 12 respectivamente, NaCl 2 M, relación harina/solvente 1/10 (p/v), temperatura ambiente y tiempo de extracción 15 min. Recientemente, Jagersberger (2013) recuperó 7,34 % de proteínas en condiciones de extracción a pH 7, buffer fosfato de sodio 0,1 M, relación harina/solvente 1/20 (p/v), temperatura ambiente y tiempo de extracción 60 min. Las diferencias observadas respecto al presente trabajo, puede deberse a las condiciones de extracción de aceite, las características físico-químicas de la materia prima inicial empleada, entre otras.

**Cuadro 18: Diseño compuesto central, respuesta experimental (observado) y estimada en la etapa de optimización (n = 3).**

Experimentos	Variable codificada				Variable no codificada				Rendimiento de proteína (%)	
	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	x <sub>4</sub>		x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	x <sub>4</sub>		Observado, $\bar{Y}$	Estimado, $\hat{Y}$
1	-1	-1	-1		40	1/20	0,50		13,06	11,38
2	1	-1	-1		70	1/20	0,50		11,59	12,68
3	-1	1	-1		40	1/50	0,50		16,53	18,45
4	1	1	-1		70	1/50	0,50		23,95	23,62
5	-1	-1	1		40	1/20	2		22,92	24,17
6	1	-1	1		70	1/20	2		20,52	19,52
7	-1	1	1		40	1/50	2		26,58	26,40
8	1	1	1		70	1/50	2		23,02	25,62
9	-1,682	0	0		29,77	1/35	1,25		22,61	22,27
10	1,682	0	0		80,23	1/35	1,25		23,67	22,71
11	0	-1,682	0		55	1/9,77	1,25		13,85	14,49
12	0	1,682	0		55	1/60,23	1,25		27,50	25,56
13	0	0	-1,682		55	1/35	0		13,43	13,28
14	0	0	1,682		55	1/35	2,51		26,87	25,72
15	0	0	0		55	1/35	1,25		28,10	27,98
16	0	0	0		55	1/35	1,25		26,53	27,98
17	0	0	0		55	1/35	1,25		28,98	27,98
18	0	0	0		55	1/35	1,25		28,60	27,98
19	0	0	0		55	1/35	1,25		27,47	27,98

Por otro lado, se han reportado anteriormente la recuperación de proteína en otras oleaginosas utilizando la extracción alcalina, así como, las semillas de linaza (82 %) (Oomah *et al.*, 1994), semillas de calabaza (26 %) (Quanhong y Caili, 2005), semillas de sandía (80,71 %) (Wani *et al.*, 2008), semillas de pimienta (47 %) (Firatligil-Durmus y Evranuz, 2010), semillas de uva (36 %) (Lv *et al.*, 2011), colza (18 %) (Sari *et al.*, 2013), canola (13,6 – 56 %) (Akbari y Wu, 2015), torta de palma (28,37 %) (Chee y Ayob, 2013), soya (33,04 %) (Rosset *et al.*, 2012), cacahuete (65,3 %) (Ma *et al.*, 2010), girasol (80 %) (Pickardt *et al.*, 2009) y semillas de melón (80,4 %) (Horax *et al.*, 2011).

#### a. Evaluación del modelo matemático

El modelo matemático de segundo orden (cuadrático) obtenido para este diseño, es una relación empírica entre el rendimiento de extracción de proteínas y las variables independientes en unidades codificadas, como se indica en la siguiente ecuación:

$$\hat{Y} = 27,981 + 0,129x_2 + 3,291x_3 + 3,699x_4 - 1,94x_2^2 - 2,812x_3^2 - 2,998x_4^2 + 0,966x_2x_3 - 1,489x_2x_4 - 1,209x_3x_4 \quad (27)$$

Mediante la conversión de los valores codificados en valores reales (unidades no codificadas), se presenta de la siguiente manera:

$$\hat{Y} = -41,60 + 0,972X_2 + 0,992X_3 + 29,294X_4 - 0,0086X_2^2 - 0,012X_3^2 - 5,329X_4^2 + 0,004X_2X_3 - 0,132X_2X_4 - 0,107X_3X_4 \quad (28)$$

El modelo cuadrático, derivado de los diseños rotatables y compuestos, fue evaluado estadísticamente para ver el grado de ajuste a los datos experimentales. El análisis de varianza del modelo cuadrático de la Ecuación 27, se presenta en el Cuadro 19.

En la evaluación estadística, el análisis de varianza del modelo cuadrático indica que es altamente significativo ( $p < 0,001$ ), además el modelo presentó una falta de ajuste no significativo ( $p > 0,05$ ), indicando que los resultados experimentales se ajustan adecuadamente al modelo para predecir el rendimiento de proteínas. Tan *et al.* (2014) mencionan que si el valor  $p$  es mayor al nivel de significancia, el modelo es adecuado. Por

lo tanto, el modelo desarrollado representaría adecuadamente la relación entre los factores elegidos.

**Cuadro 19: ANVA para el modelo cuadrático en la etapa de optimización.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Grado de libertad	Cuadrado Medio	Valor F <sub>c</sub>	Valor-P	Sig.
Modelo	593,352	9	65,928	21,61	0,000	***
Lineal	334,991	3	111,664	36,60	0,000	***
Cuadrático	221,473	3	73,824	24,20	0,000	***
Interacción	36,889	3	12,296	4,03	0,045	*
Error residual	27,458	9	3,051			
Falta de ajuste	23,706	5	4,741	5,06	0,071	n.s.
Error puro	3,752	4	0,938			
Total	620,81	18				
R <sup>2</sup>	0,9558	Sd	1,74669			
R <sup>2</sup> <sub>ajustado</sub>	0,9115	CV (%)	7,79			

\* Significancia a un nivel de  $\alpha=0,05$ ; Sd= Desviación estandar; CV = Coeficiente de variabilidad.

\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0,01$ ; n.s.= No significativo.

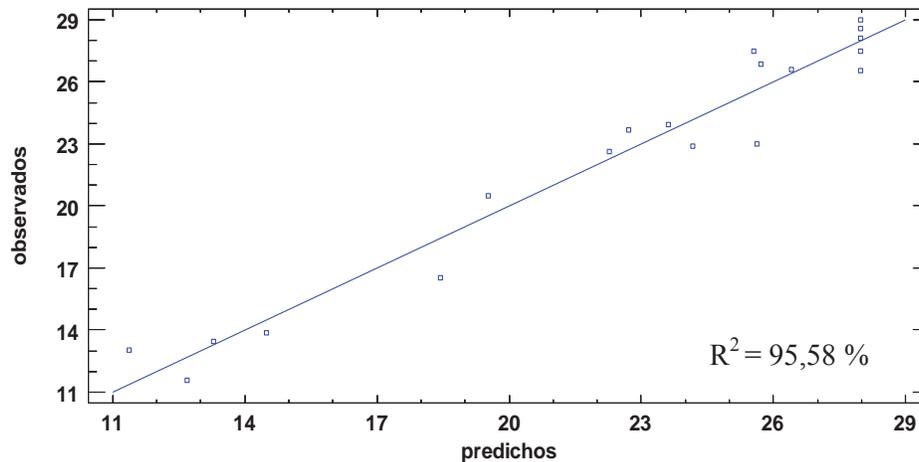
\*\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0,001$ .

Con respecto al error puro, se observa que la suma de cuadrados es pequeña en comparación a la suma de cuadrados del total, presentando así una buena reproducibilidad en el punto central (Ayala y Pardo, 1995; Morales, 2003; Quanhong y Caili, 2005).

Al evaluar el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se pudo establecer que el 95,58 % de variabilidad de los resultados es explicado por el modelo cuadrático. Además, existe un alto grado de correlación entre los valores experimentales y estimados, debido a que el  $R^2$  fue 0,9558 y el  $R^2_{ajustado}$  de 0,9115 (Tan *et al.*, 2014; Parra *et al.*, 2014). Para reforzar el alto grado de correlación entre los resultados experimentales y estimados por el modelo cuadrático, se presenta dicha correlación en la Figura 11.

Eren y Kaymak (2007) mencionan que un valor alto de  $R^2$  no siempre implica que el modelo de regresión sea bueno, es decir, que si se adiciona una variable al modelo se incrementaría el  $R^2$ , haciendo caso omiso si la variable adicional es estadísticamente

significativa o no. Por esta razón el  $R^2_{\text{ajustado}}$  debe ser superior a 0,900 para indicar un buen ajuste del modelo. Por el contrario, Firatligil-Durmus y Evranuz, (2010) mencionan que el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) más cercano a la unidad, indican un ajuste razonable del modelo a los datos experimentales. Estudios anteriores han reportado valores de  $R^2$  que van desde 0,775 a 0,995 para gandul, maní y torta de palma (Mizubuti *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2010; Chee y Ayob, 2013).



**Figura 11: Comparación del rendimiento de extracción de proteínas entre el experimental (observados) y estimado (predichos) por el modelo cuadrático.**

Al evaluar el coeficiente de variación (CV), se pudo establecer un 7,79 %, lo que sugiere una buena precisión y alta confiabilidad del experimento realizado. Como regla general, un modelo puede considerarse razonablemente reproducible si su CV no es mayor al 10 % (Irakoze y Sindayigaya, 2010; Parra *et al.*, 2014).

**b. Análisis de significancia de los coeficientes de regresión**

En el Cuadro 20, se presenta la prueba de significancia de los coeficientes de la ecuación de regresión cuadrática para el rendimiento de extracción de proteínas. Cada coeficiente del modelo estimado, fue analizado mediante la prueba *t* de Student y el valor *p* ( $\alpha = 0,05$ ). Según Amin y Anggoro (2004) las variables o factores correspondientes serán más significativos si el valor *t* absoluto se hace más grande y el valor *p* se hace más pequeño.

**Cuadro 20: Prueba de significancia de los coeficientes de regresión de la ecuación cuadrática para el rendimiento de proteínas.**

Parámetro	Factores	Coefficientes de regresión	Error estándar	Valor-t	Valor-P	Sig.
$\beta_0$	Intercepto	27,981	0,7802	35,862	0,000	***
Lineal						
$\beta_1$	$x_2$	0,129	0,4726	0,275	0,790	n.s.
$\beta_2$	$x_3$	3,291	0,4726	6,963	0,000	***
$\beta_3$	$x_4$	3,699	0,4726	7,826	0,000	***
Cuadrático						
$\beta_{11}$	$x_2^2$	-1,941	0,4728	-4,105	0,003	**
$\beta_{22}$	$x_3^2$	-2,812	0,4728	-5,948	0,000	***
$\beta_{33}$	$x_4^2$	-2,998	0,4728	-6,341	0,000	***
Interacción						
$\beta_{12}$	$x_2x_3$	0,966	0,6175	1,565	0,152	n.s.
$\beta_{13}$	$x_2x_4$	-1,489	0,6175	-2,411	0,039	*
$\beta_{23}$	$x_3x_4$	-1,209	0,6175	-1,957	0,082	n.s.

\* Significancia a un nivel de  $\alpha=0,05$ ; n.s.= No significativo.

\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0,01$ .

\*\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0,001$ .

Se puede observar del Cuadro 20 que los coeficientes de regresión de la ecuación del término lineal más significativos sobre el rendimiento de extracción de proteína fueron la concentración de NaCl ( $x_4$ ) ( $p < 0,001$ ) y la relación materia prima/solvente ( $x_3$ ) ( $p < 0,001$ ). Especialmente, la concentración de NaCl tuvo la mayor influencia sobre el rendimiento de extracción de proteína de la HDTSI (valor  $t = 7,826$ ). La temperatura ( $x_2$ ) no fue significativa ( $p > 0,05$ ). Oomah *et al.* (1994), Quanhong y Caili (2005) y Horax *et al.* (2011) reportaron un efecto similar para las pruebas de extracción de proteínas en las semillas de linaza, calabaza y melón amargo, respectivamente. Sin embargo, otros autores han informado que la temperatura influye en la extracción de proteínas (Ma *et al.*, 2010; Chee y Ayob, 2013).

Con respecto al término cuadrático, la concentración de NaCl ( $x_4^2$ ) ( $p < 0,001$ ), la relación materia prima/solvente ( $x_3^2$ ) ( $p < 0,001$ ) y la temperatura ( $x_2^2$ ) ( $p < 0,01$ ), tuvieron un

efecto altamente significativo sobre el rendimiento de extracción de proteína. Mientras que el término de interacción, la temperatura – concentración de NaCl ( $x_2x_4$ ), tuvo un efecto significativo ( $p < 0,05$ ). Esto sugiere que hay curvatura en la superficie de respuesta, que se verá más adelante.

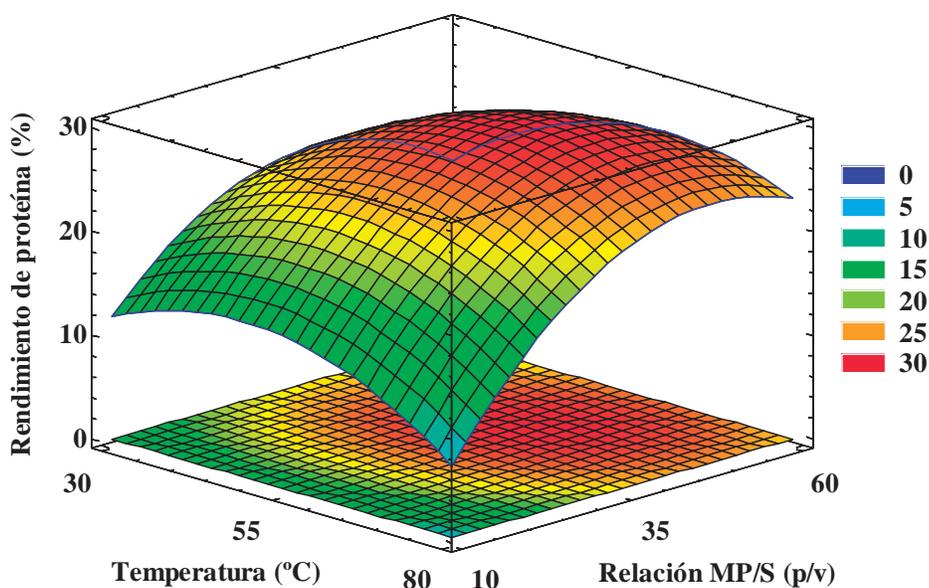
Por lo tanto, los efectos del término lineal fueron más significativos que los efectos del término cuadrático. Esto significa que los factores como la concentración de NaCl ( $x_4$ ) y la relación materia prima/solvente ( $x_3$ ), tienen una relación directa en la extracción de proteína de la HDTSI.

### **c. Análisis de la superficie de respuesta**

La gráfica de superficie de respuesta (tridimensional), se elaboró a partir del modelo cuadrático (Ecuación 28) para ilustrar los efectos principales e interactivos de las variables independientes sobre la variable respuesta (rendimiento de proteína). El objetivo principal fue identificar el valor óptimo de las variables independientes de manera eficiente para maximizar la respuesta. Estas gráficas (Figura 12, 13 y 14) se obtuvieron mediante la fijación de una variable independiente codificada a nivel cero, mientras que las dos variables restantes varían dentro del rango experimental.

En la Figura 12 se muestra el efecto de la temperatura y la relación materia prima/solvente sobre el rendimiento de proteína. Se observa que ambos ejercen un efecto cuadrático en el rendimiento de proteína. La variación de la temperatura y la relación materia prima/solvente revelaron que el máximo rendimiento de proteína (29,01 %) se obtuvo cuando la temperatura fue de 57,54 °C y la relación materia prima/solvente de 1/44,8 (p/v), mientras que la concentración de NaCl fue de 1,25 M (nivel cero). Este comportamiento es similar al reportado por Chee y Ayob (2013), quienes obtuvieron un mayor rendimiento de proteínas en la harina de torta de palma, cuando la relación materia prima/solvente fue de 1/70 (p/v) que es mayor al presente estudio y la temperatura de 50 °C. Otros estudios realizados en harina de semillas de tomate (1/30) (Liadakis *et al.*, 1995), semillas de calabaza (1/30) (Quanhong y Caili, 2005), semillas de sandía (1/70) (Wani *et al.* 2008), semilla de palma (1/60) (Arifin *et al.*, 2009) y granos de destilería (1/37) (Dong *et al.*, 2012), están de acuerdo con el presente estudio, ya que con el aumento de la relación materia prima/solvente dio lugar a un mayor rendimiento de proteínas.

Por el contrario, Oomah *et al.* (1994) menciona que el rendimiento de proteína aumenta con la disminución de la relación materia prima/solvente. Así mismo, Nilo-Rivas *et al.* (1981) también informaron que un gran exceso de solvente disminuye el rendimiento de proteína. Por su parte, Ventura *et al.* (2005) mencionan que la cantidad de harina a solubilizar en el sistema, influye significativamente en la composición y cantidad porcentual de la proteína recuperada, sin embargo el solvente debe ser adecuado para que no se sature los componentes solubilizados, lo que indica que es de vital importancia determinar la relación apropiada entre la cantidad de solvente y la cantidad de proteínas a solubilizar.



**Figura 12:** Superficie de respuesta del rendimiento de extracción de proteína de la HDTSI en función de los factores: temperatura ( $X_2$ ) y relación materia prima/solvente ( $X_3$ ). Factor constante: concentración de NaCl de 1,25 M ( $X_4$ ).

Por otro lado, el aumento tanto de la temperatura y la relación materia prima/solvente pueden causar el incremento de la extracción de proteínas. Sin embargo cuando la temperatura fue mayor a 57,54 °C y la relación materia prima/solvente mayor a 1/44,8 (p/v), el rendimiento de proteína se redujo a valores por debajo de 29,01 %. Esto pudo deberse a que la alta temperatura pudo provocar la desnaturalización de las proteínas, disminuyendo su solubilidad. Es por ello que no se recomienda trabajar a temperaturas

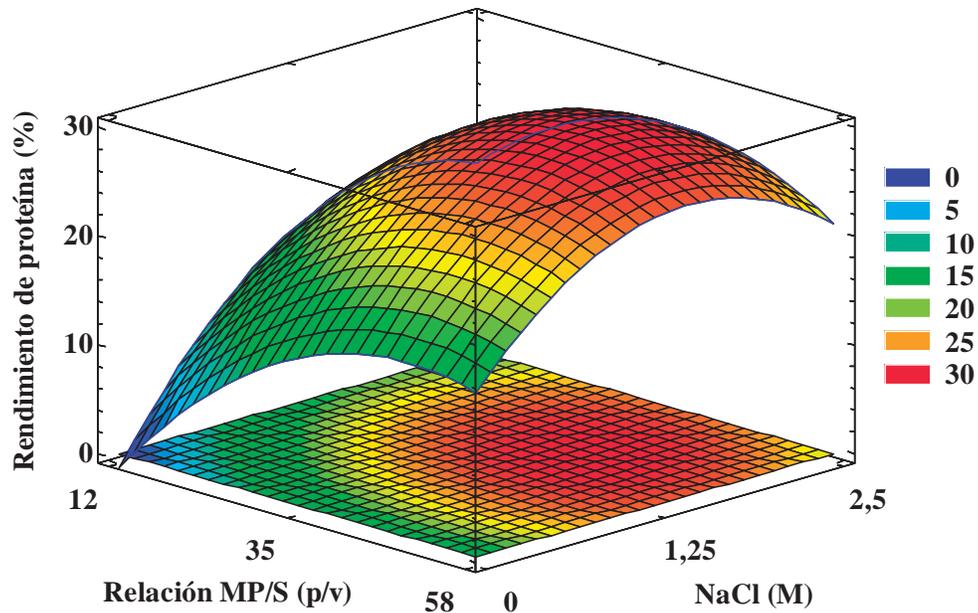
mayores a 60 °C (Rustom *et al.*, 1991; Linden y Lorient, 1996; Lv *et al.*, 2011; Chee y Ayob, 2013).

En la Figura 13 se muestra el efecto de la relación materia prima/solvente y la concentración de NaCl sobre el rendimiento de proteína. Se observa que ambos ejercen un efecto cuadrático en el rendimiento de extracción de la proteína. La variación de la relación materia prima/solvente y la concentración de NaCl revelaron que el máximo rendimiento de proteína (29,72 %) se obtuvo cuando la relación materia prima/solvente fue 1/42 (p/v) y la concentración de NaCl de 1,65 M, mientras que la temperatura fue 55 °C (nivel cero). Este comportamiento fue similar al reportado por Sathe *et al.* (2012), quienes obtuvieron un mayor rendimiento de proteínas en harina de semillas del sachá inchi, cuando la concentración de NaCl fue de 2 M que es menor al presente estudio. Así mismo, Oomah *et al.* (1994), Pickardt *et al.* (2009) y Horax *et al.* (2013) reportaron similares resultados en el empleo del uso del NaCl como solvente extractante de las proteínas en las harinas de semillas de linaza (1,5 M), girasol (2,3 M) y semillas de melón amargo (1,3 M), respectivamente. Quanhong y Caili (2005), Mune *et al.* (2008) y Arifin *et al.* (2009) emplearon menores valores de concentración de NaCl para la harina de semillas de calabaza (0,72 M), caupi (0,15 M) y palma (0,2 M), respectivamente. Esta diferencia, puede deberse al tipo de materia prima, características físico-químicas de las proteínas, entre otras.

Cheftel *et al.* (1989) explica que la presencia de NaCl en el medio, puede aumentar la solubilidad de las proteínas dado el efecto *salting in*. Los iones reaccionan con las cargas de las proteínas y rebajan la atracción electrostática entre las cargas opuestas de grupos próximos, por otro lado la solvatación debido a estos iones, permite aumentar la solvatación de las proteínas y por lo tanto su solubilidad. Este comportamiento explica la razón por la cual a una concentración de 1,65 M de NaCl se obtuvo mayor rendimiento respecto al no empleo de NaCl en el solvente de extracción. Así mismo, estudios recientes reportan el uso principalmente de las sales de sodio y calcio para extraer proteínas de diferentes alimentos vegetales (Ghaly y Alkoaik 2010; Lestari *et al.*, 2010; Karaca *et al.*, 2011; Nadal *et al.*, 2011; Chee y Ayob, 2013).

Por otro lado, cuando la concentración de NaCl fue mayor a 1,65 M y la relación materia prima/solvente mayor a 1/42 (p/v), el rendimiento de proteína se redujo (< 29,72 %). Esto

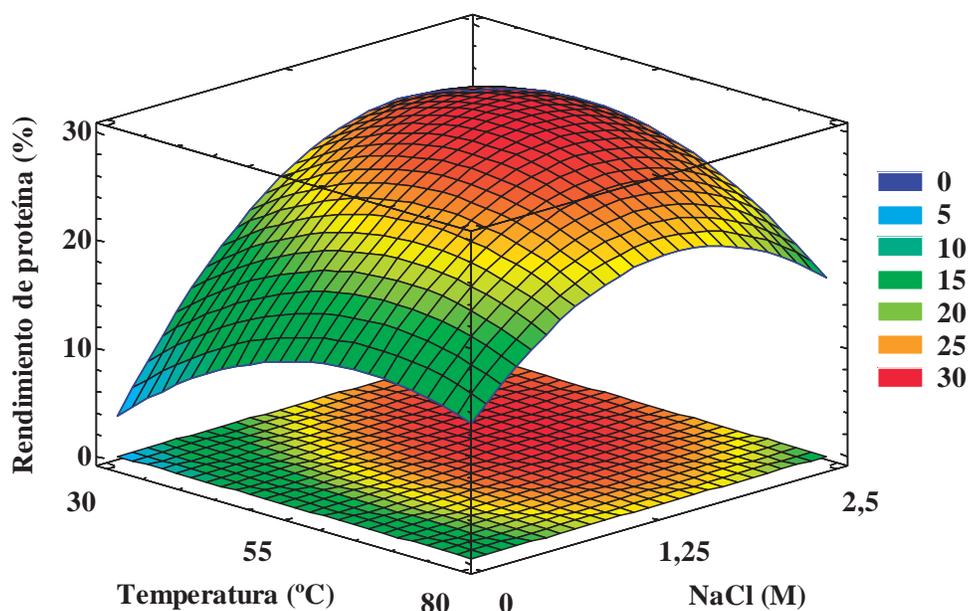
pudo deberse a que la excesiva adición de sal a soluciones de pH alto ( $> 9$ ) pudo favorecer el efecto *salting out* en la extracción de proteínas (Tan *et al.*, 2011). Además, Cheftel *et al.* (1989) menciona que este efecto provoca la competencia entre la proteína y los iones salinos por las moléculas de agua necesarias para su solvatación respectiva, con una fuerte concentración salina, no hay bastantes moléculas de agua disponibles para la solvatación de la proteína, porque la mayor parte del agua está fuertemente ligada a las sales.



**Figura 13: Superficie de respuesta del rendimiento de extracción de proteína de la HDTSI en función de los factores: relación materia prima/solvente ( $X_3$ ) y concentración de NaCl ( $X_4$ ). Factor constante: temperatura de 55 °C ( $X_2$ ).**

En la Figura 14 se muestra el efecto de la temperatura y la concentración de NaCl sobre el rendimiento de extracción en proteína. Se observa que ambos ejercen un efecto cuadrático en el rendimiento de proteína. La variación de la temperatura y la concentración de NaCl revelaron que el máximo rendimiento de proteína (29,21 %) se obtuvo cuando la temperatura fue de 52 °C y la concentración de NaCl de 1,75 M, mientras que la relación materia prima/solvente fue de 1/35 (p/v) (nivel cero). Este comportamiento es similar al reportado por Chee y Ayob (2013), quienes obtuvieron un mayor rendimiento de proteínas en la harina de torta de palma, cuando la temperatura fue de 50 °C y la concentración de la sal hexametáfosfato de sodio del 2 %. De otro lado se observó que cuando la temperatura

fue mayor a 52 °C y la concentración de NaCl mayor a 1,75 M, el rendimiento se redujo (< 29,21 %).

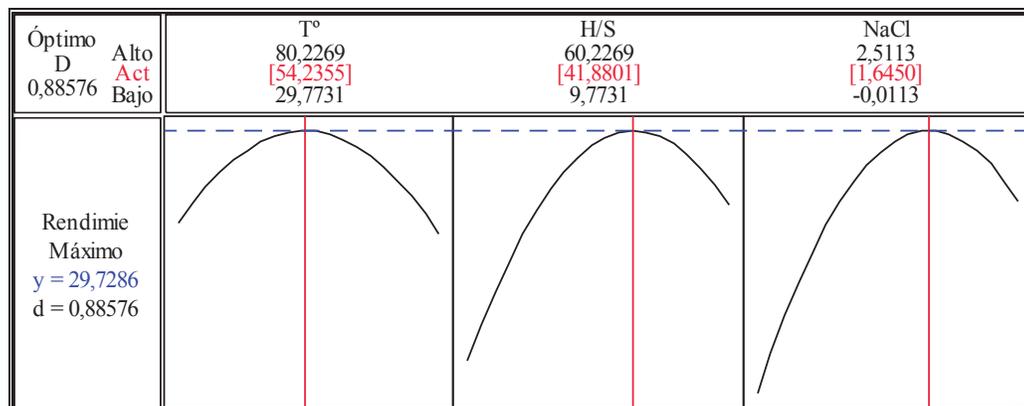


**Figura 14: Superficie de respuesta del rendimiento de extracción de proteína de la HDTSI en función de los factores: temperatura ( $X_2$ ) y concentración de NaCl ( $X_4$ ). Factor constante: relación materia prima/solvente 1/35 (p/v) ( $X_3$ )**

Teniendo en cuenta todos los resultados en la extracción alcalina, es evidente que el incremento de la concentración de NaCl y la relación materia prima/solvente son los principales contribuyentes en la extracción de proteína de la HDTSI. Este hecho puede deberse, al tipo de proteínas presentes en la harina de semilla del sachu inchi. Sathe *et al.* (2012) encontraron en la proteína del sachu inchi fracciones importantes de proteínas solubles como las albuminas (43,7 %), globulinas (27,3 %) y glutelinas (31,9 %), que son solubles en agua, sal y medio alcalino, respectivamente. Adicionalmente, Rodrigues *et al.* (2012) mencionan que la presencia de sales (fuerza iónica) influye de manera eficiente en la extracción de proteína de las harinas de semillas oleaginosas.

Las condiciones óptimas de extracción de las proteínas del sachu inchi fueron estimadas por el método de deseabilidad, utilizando el programa Minitab (Figura 15). La variable dependiente se fijó al valor máximo de deseabilidad ( $d = 1,00$ ), las condiciones óptimas

obtenidas correspondieron a una temperatura de 54,2 °C, relación materia prima/solvente de 1/41,8 (p/v) y concentración de NaCl de 1,65 M, obteniéndose un rendimiento de proteína estimado de 29,7 %.



**Figura 15: La condición óptima del rendimiento de proteína utilizando el método de la función de deseabilidad en la extracción alcalina.**

Este valor estimado de rendimiento de proteína de la HDTSI resultó cercano o mayor al reportado para otras fuentes vegetales. Así podemos citar al estudio de Chee y Ayob (2013), quienes trabajaron en la extracción de proteínas de torta de palma utilizando MSR, donde encontraron como condiciones óptimas de extracción a una temperatura de 50 °C, pH 10, relación harina/solvente 1/70 (p/v) y concentración de hexametáfosfato de sodio 1,5 %; obteniendo un rendimiento de proteína de 28,37 %. Por otro lado, Zhang *et al.* (2013) estudiaron la extracción de proteínas del fresno espinoso usando también la MSR y concluyeron que el rendimiento máximo (18,9 %) se obtuvo a pH 8,75, relación harina/solvente 1/17,5 (p/v), 0,79 mol/L de NaCl a 35 °C durante 60 min. Finalmente, Quanhong y Caili (2005) estudiaron la extracción de proteína de semilla de calabaza usando MSR y concluyeron que el rendimiento máximo (26 %) se obtuvo a la relación harina/solvente 1/30,2 (p/v), 4,26 % de NaCl y tiempo de extracción de 18,1 min.

#### 4.2.4. Validación del modelo

La idoneidad de la ecuación del modelo para predecir los valores de la respuesta óptima se probó usando las condiciones óptimas recomendadas. Bajo este conjunto de condiciones se determinó que fue óptimo para el enfoque de optimización (MSR), que también se utiliza

para validar experimentalmente y predecir los valores de las respuestas utilizando la ecuación del modelo. Se encontró que los valores experimentales están de acuerdo con el valor estimado por el modelo (Cuadro 21).

**Cuadro 21: Condición óptima recomendado por el modelo de segundo orden, respuesta estimada y experimental.**

Condiciones óptimas	Codificado	No codificado	
Temperature (°C)	-0,06	54,2	
Relación materia prima/solvente (p/v)	0,46	1/41,8	
Concentración de NaCl (M)	0,54	1,65	
Variable respuesta	Estimada	*Experimental	Rango
Rendimiento de proteína (%)	29,73	30,23 ±0,50	29,73 – 30,73

\* Media ± desviación estándar; n=3 (triplicado).

### 4.3. Extracción enzimática asistida

#### 4.3.1. Optimización del proceso

Para la etapa de optimización, se consideró un DCC de segundo orden de acuerdo a la metodología descrita por Ayala y Pardo (1995), Quanhong y Caili (2005), Wani *et al.* (2008), Ma *et al.* (2010), Firatligil-Durmus y Evranuz (2010), Chee y Ayob (2013) y Parra *et al.* (2014). Las variables consideradas fueron: concentración de enzima ( $Z_1$ ) y tiempo de extracción ( $Z_2$ ); ello de acuerdo a pruebas preliminares realizadas y según lo evaluado por Shen *et al.* (2008), Sui *et al.* (2011) y Sari *et al.* (2013). La enzima utilizada fue la Alcalasa (proteasa alcalina), trabajándose a pH 9 y temperatura de 55 °C de acuerdo a las condiciones óptimas de trabajo de la enzima. La relación materia prima/solvente fue 1/50 (p/v) de acuerdo a las pruebas preliminares. El criterio de optimización usado fue maximizar el rendimiento de extracción de proteína de la HDTSI ( $Y_1$ ) y minimizar el grado de hidrólisis ( $Y_2$ ) de la proteína. A este último punto indicamos que se minimiza porque afectaría las propiedades tecnofuncionales de las proteínas, que se explicará más adelante.

Los valores promedio de las respuestas experimentales ( $\bar{Y}$ ) y estimados ( $\hat{Y}$ ) para cada punto experimental, se presentan en el Cuadro 22. Las pruebas se realizaron en orden aleatorio, ejecutando cuatro puntos factoriales, cuatro puntos axiales y cinco repeticiones en el punto central; dando un total de 13 experimentos. Los resultados revelan que el rendimiento de extracción de proteínas ( $Y_1$ ) varió de 28,41 a 42,58 %.

Anteriormente, no se han desarrollado estudios sobre la extracción enzimática asistida de proteína de la HDTSI; sin embargo, se han reportado estudios similares en otras fuentes vegetales como: la harina de mostaza (52,4 %) (Pedroche *et al.*, 2004), semillas de pino (87,45 %) (Wang *et al.*, 2011), avellana (92,20 %) (Sui *et al.*, 2011), torta de palma (61,32 %) (Chee *et al.*, 2012), soya (56,3 %) (Rosset *et al.*, 2012), colza (50 – 80 %) (Sari *et al.*, 2013), hojas de té (24 – 34 %) (Shen *et al.*, 2008), hojas de olivo (41 – 90 %) (Vergara *et al.*, 2015) y torta de *Guevina avellana* (65 %) (Moure *et al.*, 2002).

Con respecto a los resultados del grado de hidrólisis ( $Y_2$ ) este varió de 0,96 a 7,72 %. Anteriormente, no se han desarrollado estudios sobre el grado de hidrólisis (GH) de la HDTSI y su efecto en la extracción de la proteína; sin embargo, se han reportado estudios similares en otras fuentes vegetales como: la harina de mostaza (*Brassica carinata*) (GH: 8,3 - 17,5 %, Pedroche *et al.*, 2004) y en la harina de cacahuate (GH: 0 -15 %, Zheng *et al.*, 2015).

## **a. Rendimiento de proteína**

### **a.1. Evaluación del modelo matemático**

El modelo matemático de segundo orden (cuadrático) obtenido para este diseño, es el de una relación empírica entre el rendimiento de extracción de proteínas y las variables independientes en unidades codificadas, como se indica en la siguiente ecuación:

$$\hat{Y}_1 = 35,046 + 4,516z_1 + 1,369z_2 + 0,4z_1^2 - 2,376z_2^2 + 1,417z_1z_2 \quad (29)$$

Mediante la conversión de los valores codificados en valores reales (unidades no codificadas), se presenta de la siguiente manera:

**Cuadro 22: Diseño compuesto central, respuesta experimental (observado) y estimada en la etapa de optimización (n = 3).**

Experimentos	Variables codificadas		Variable no codificada		Rendimiento de proteína (%)		Grado de hidrólisis (%)	
	$z_1$	$z_2$	$Z_1$	$Z_2$	Observado, $\bar{Y}_1$	Estimado, $\hat{Y}_1$	Observado, $\bar{Y}_2$	Estimado, $\hat{Y}_2$
1	-1	-1	2	15	28,97	28,60	0,96	1,33
2	1	-1	5	15	34,45	34,80	4,03	4,69
3	-1	1	2	45	29,18	28,51	3,75	3,60
4	1	1	5	45	40,33	40,37	5,38	6,95
5	-1,41	0	1,38	30	28,79	29,46	1,56	1,77
6	1,41	0	5,62	30	42,58	42,23	7,72	6,51
7	0	-1,41	3,5	8,79	28,41	28,36	2,97	2,54
8	0	1,41	3,5	51,21	31,85	32,23	6,44	5,74
9	0	0	3,5	30	35,23	35,05	4,67	4,14
10	0	0	3,5	30	34,85	35,05	3,82	4,14
11	0	0	3,5	30	34,95	35,05	4,57	4,14
12	0	0	3,5	30	34,64	35,05	3,72	4,14
13	0	0	3,5	30	35,56	35,05	4,25	4,14

$$\hat{Y}_1 = 21,058 - 0,125Z_1 + 0,504Z_2 + 0,178Z_1^2 - 0,0105Z_2^2 + 0,063Z_1Z_2 \quad (30)$$

El modelo cuadrático, fue evaluado estadísticamente para ver el grado de ajuste a los datos experimentales. El análisis de varianza del modelo cuadrático de la Ecuación 29, se presenta en el Cuadro 23.

En la evaluación estadística, el análisis de varianza del modelo cuadrático indica que fue altamente significativo ( $p < 0,001$ ). Además, presentó una falta de ajuste no significativo ( $p > 0,05$ ), indicando que los resultados experimentales se ajustan adecuadamente al modelo para predecir el rendimiento de proteínas. Tan *et al.* (2014) mencionan que si el valor  $p$  es mayor al nivel de significancia, el modelo es adecuado. Por lo tanto, el modelo desarrollado representaría adecuadamente la relación entre los factores elegidos.

**Cuadro 23: ANVA para el modelo cuadrático del rendimiento de proteína.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Grado de libertad	Cuadrado Medio	Valor F <sub>c</sub>	Valor-P	Sig.
Modelo	229,101	5	45,820	165,29	0,000	***
Lineal	178,191	2	89,096	321,41	0,000	***
Cuadrático	42,872	2	21,436	77,33	0,000	***
Interacción	8,037	1	8,037	28,99	0,001	**
Error residual	1,94043	7	0,277			
Falta de ajuste	1,43	3	0,477	3,73	0,118	n.s.
Error puro	0,511	4	0,128			
Total	231,041	12				
R <sup>2</sup>	0,9916	Sd	0,526			
R <sup>2</sup> <sub>ajustado</sub>	0,9856	CV (%)	1,56			

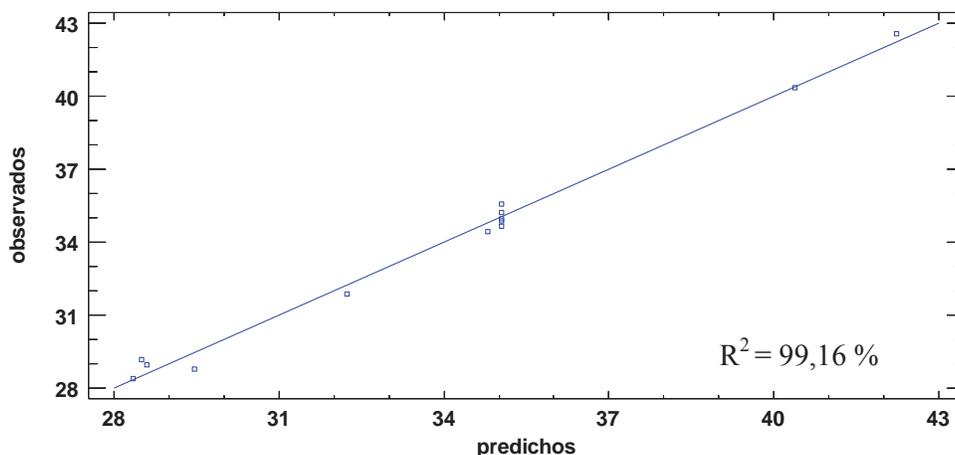
\* Significancia a un nivel de  $\alpha=0,05$ ; Sd= Desviación estandar; CV = Coeficiente de variabilidad.

\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0,01$ ; n.s.= No significativo.

\*\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0,001$ .

Con respecto al error puro, se observa que la suma de cuadrados es pequeña en comparación a la suma de cuadrados del total, presentando así una buena reproducibilidad en el punto central (Ayala y Pardo, 1995; Morales, 2003; Quanhong y Caili, 2005). Al evaluar el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) se pudo establecer que el 99,16 % de

variabilidad de los resultados es explicado por el modelo cuadrático. Además, existe un alto grado de correlación entre los valores experimentales y estimados, debido a que el  $R^2$  fue 0,9916 y el  $R^2_{ajustado}$  de 0,9856 (Tan *et al.*, 2014; Parra *et al.*, 2014). Para reforzar el alto grado de correlación entre los resultados experimentales y estimados por el modelo cuadrático, se presenta dicha correlación en la Figura 16.



**Figura 16: Comparación del rendimiento de extracción de proteínas entre el experimental (observados) y estimado (predichos) por el modelo cuadrático.**

Al evaluar el coeficiente de variación (CV), se pudo establecer un 1,56 %, lo que sugiere una buena precisión y alta confiabilidad del experimento realizado. Como regla general, un modelo puede considerarse razonablemente reproducible si su CV no es mayor al 10 % (Irakoze y Sindayigaya, 2010; Parra *et al.*, 2014).

### **a.2. Análisis de significancia de los coeficientes de regresión**

En el Cuadro 24, se presenta la prueba de significancia de los coeficientes de la ecuación de regresión cuadrática para el rendimiento de extracción de proteínas. Cada coeficiente del modelo estimado, fue analizado mediante la prueba *t* de *Student* y el valor *p* ( $\alpha = 0,05$ ). Según Amin y Anggoro (2004) las variables o factores correspondientes serán más significativos si el valor *t* absoluto se hace más grande y el valor *p* se hace más pequeño.

Se puede observar del Cuadro 24 que los coeficientes de regresión de la ecuación del término lineal fueron altamente significativos sobre el rendimiento de extracción de proteína en especial la concentración de enzima tuvo la mayor influencia sobre el rendimiento de extracción de proteína de la HDTSI (valor  $t = 24,26$ ). Este efecto coincide con los resultados obtenidos por Shen *et al.* (2008), Sui *et al.* (2011), Sari *et al.* (2013) y Vergara *et al.* (2015) cuando trabajaron en harina de hojas de té, avellana, canola y hojas de olivo, respectivamente; por el contrario, Wang *et al.* (2011) mencionan que el tiempo no influye en la extracción de proteínas de la harina de semillas de pino.

**Cuadro 24: Prueba de significancia de los coeficientes de regresión de la ecuación cuadrática para el rendimiento de proteínas.**

Parámetro	Factores	Coefficientes de regresión	Error estándar	Valor-t	Valor-P	Sig.
$\beta_0$	Intercepto	35,046	0,2355	148,841	0,000	***
Lineal						
$\beta_1$	$z_1$	4,516	0,1861	24,263	0,000	***
$\beta_2$	$z_2$	1,369	0,1861	7,356	0,000	***
Cuadrático						
$\beta_{11}$	$z_1^2$	0,400	0,1996	2,008	0,085	n.s.
$\beta_{22}$	$z_2^2$	-2,376	0,1996	-11,906	0,000	***
Interacción						
$\beta_{12}$	$z_1z_2$	1,417	0,2633	5,385	0,001	**

\* Significancia a un nivel de  $\alpha=0,05$ ; n.s.= No significativo.

\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0,01$ .

\*\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0,001$ .

Con respecto al término cuadrático, la concentración de enzima ( $z_1^2$ ) ( $p > 0,05$ ) no fue significativo, sin embargo el tiempo de extracción ( $z_2^2$ ) ( $p < 0,001$ ), tuvo un efecto altamente significativo sobre el rendimiento de extracción de la proteína; mientras que el término de interacción, concentración de enzima – tiempo de extracción ( $z_1z_2$ ), tuvo un efecto altamente significativo ( $p < 0,01$ ), lo que sugiere que habrá curvatura en la superficie de respuesta, lo que se verá más adelante.

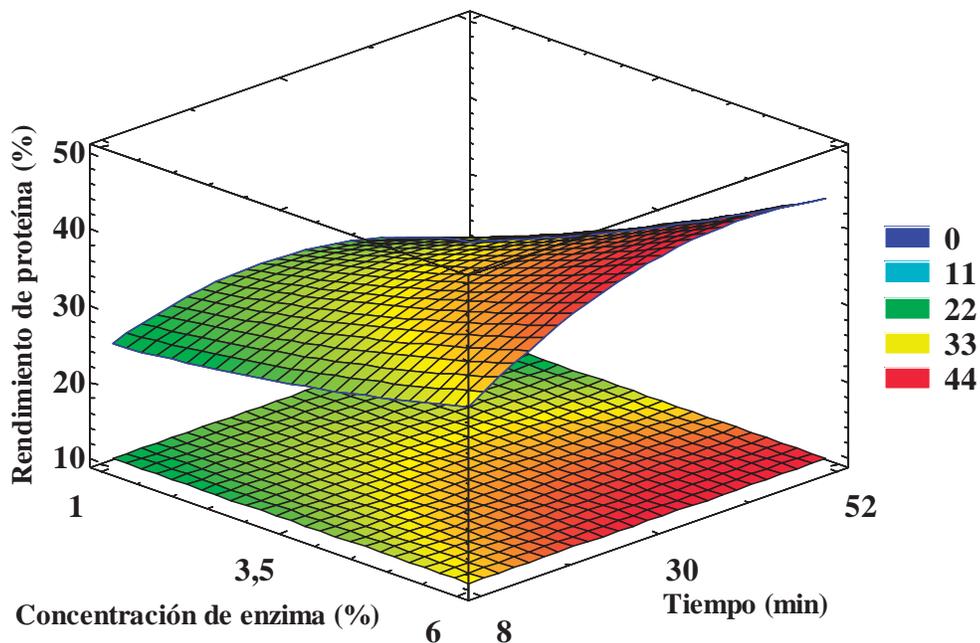
### a.3. Análisis de la superficie de respuesta

La gráfica de superficie de respuesta (tridimensional), se elaboró a partir del modelo cuadrático (Ecuación 30) para ilustrar los efectos principales e interactivos de las variables independientes sobre la variable respuesta (rendimiento de proteína). El objetivo principal fue identificar el valor óptimo de las variables independientes de manera eficiente para maximizar la respuesta. Esta gráfica (Figura 17) se obtuvo mediante la variación de las dos variables independientes dentro del rango experimental.

En la Figura 17 se muestra el efecto de la concentración de la enzima Alcalasa y el tiempo de extracción sobre el rendimiento de proteína. Se observa que el incremento de la concentración de la enzima, provoca un aumento en el rendimiento de extracción de proteína, cuando va de 1,4 a 5,6 % (efecto lineal). Este hecho concuerda con lo expresado por Shen *et al.* (2008), Chee *et al.* (2012) y Vergara *et al.* (2015) que el aumento de la concentración de la enzima normalmente mejora la solubilidad de la proteína, debido a que los enlaces peptídicos se rompen más a una mayor cantidad de enzima y que a la vez aumenta el rendimiento de extracción de la proteína. Sin embargo, la existencia de la enzima libre (exceso) en el solvente, podría hacer que interactúe de forma drástica con la proteína extraída y causar la degradación de la misma, y por consecuencia su disminución. Otra explicación del contenido máximo de proteína a extraer podría deberse a la llamada inhibición competitiva, en donde las moléculas de proteína extraídas actúan como inhibidor de la formación del complejo enzima-sustrato evitando de este modo su actividad (Laidler y Bunting, 1973). Por lo tanto, una concentración baja o demasiada alta de enzima no es deseable para la extracción de proteínas, debiéndose considerar una concentración óptima para un rendimiento máximo de proteína. Shen *et al.* (2008) reportaron un comportamiento similar, verificando un aumento en el rendimiento de extracción de la proteína de las hojas de té (10 - 22,5 %), cuando se incrementó la concentración de enzima (Alcalasa) de 1 a 4 %; por encima de 4 % encontró una disminución del rendimiento. Así mismo, Sari *et al.*, (2013) obtuvieron un mayor rendimiento de proteína en la harina de colza (50 – 80 %), microalga (50 – 80 %) y soya (90 %), utilizando como enzima Protex 40XL a una concentración de 5 %.

Con respecto al tiempo de extracción, se observa un efecto cuadrático sobre el rendimiento de proteína, el cual se incrementó cuando el tiempo varió de 15 a 31,5 min

aproximadamente, llegando a sus niveles máximos entre los 31,5 y 41 min, mientras que pasado los 41 min se da una ligera disminución en la respuesta, manteniéndose estable. Este comportamiento es similar al reportado por Vergara *et al.* (2015) quienes obtuvieron un mayor rendimiento en proteína de hojas de olivo, cuando el tiempo de extracción se incrementó de 5 a 15 min, determinando que por encima de 15 min se mantenía igual. Así mismo, Sui *et al.* (2011) obtuvieron un mayor rendimiento de extracción de proteína de la avellana (87 %) utilizando la enzima Alcalasa, cuando el tiempo de extracción se incrementó de 30 a 90 min, determinando que por encima de estos límites se mantiene estable con el aumento del tiempo. Shen *et al.* (2008) mencionan que el incremento del tiempo de extracción condujo a un alto rendimiento de extracción de proteína, cuando evaluaron a las enzimas Alcalasa y Protamex sobre la extracción de proteínas en las hojas de té, obteniendo como resultados un mayor rendimiento en las dos primeras horas, y que después de este tiempo la extracción se hizo menos significativa.



**Figura 17: Superficie de respuesta del rendimiento de extracción de proteína de la HDTSI en función de los factores: concentración de enzima ( $Z_1$ ) y tiempo de extracción ( $Z_2$ ).**

Teniendo en cuenta todos los resultados en la extracción enzimática asistida, es evidente que el incremento de la concentración de la enzima Alcalasa y el tiempo de extracción son los principales contribuyentes en la extracción de proteína de la HDTSI.

Investigaciones sobre la extracción de proteína de la HDTSI con el método enzimático no se han desarrollado anteriormente; sin embargo, se han reportado estudios similares utilizando otras fuentes vegetales. Así, Sui *et al.* (2011) trabajaron en la extracción de proteínas de la harina de avellana utilizando la MSR y concluyeron que el rendimiento máximo (92,2 %) se obtuvo a una concentración de la enzima Alcalasa al 2 %, tiempo de extracción 150 min, temperatura 55 °C, relación harina/solvente de 1/5 (p/v) y pH 9. Chee *et al.* (2012) trabajaron en la extracción de proteínas en la torta de palma, utilizando también la MSR y encontraron efectos altamente significativos sobre el rendimiento de proteína (61,32 %), trabajando a la temperatura de 50 °C, pH 9,5, relación harina/solvente de 1,1/100 g/ml a una concentración de la enzima Tripsina del 1,36 %.

## **b. Grado de hidrólisis**

### **b.1. Evaluación del modelo matemático**

El modelo cuadrático de segundo orden no se ajustó adecuadamente a los resultados del grado de hidrólisis (ANEXO 3), debido a que presentó insuficiencias en la correlación de los resultados experimentales y estimados. Por lo tanto, de acuerdo al análisis estadístico, se optó por el modelo lineal de primer orden, ya que el término lineal en el cuadro ANVA fue altamente significativo ( $p < 0,001$ ).

El modelo matemático de primer orden (lineal) obtenido para este diseño, es una relación empírica entre el grado de hidrólisis y las variables independientes en unidades codificadas, como se indica en la siguiente ecuación:

$$\hat{Y}_2 = 4,142 + 1,676z_1 + 1,131z_2 \quad (31)$$

Mediante la conversión de los valores codificados en valores reales (unidades no codificadas), se presenta de la siguiente manera:

$$\hat{Y}_2 = -2,032 + 1,117Z_1 + 0,075Z_2 \quad (32)$$

El modelo lineal, fue evaluado estadísticamente para ver el grado de ajuste a los datos experimentales, así el análisis de varianza del modelo lineal de la Ecuación 31, se presenta

en el Cuadro 25. De la evaluación estadística, el análisis de varianza del modelo lineal indica que es altamente significativo ( $p < 0,001$ ), también presentó una falta de ajuste no significativo ( $p > 0,05$ ), indicando que los resultados experimentales se ajustan adecuadamente al modelo para predecir el grado de hidrólisis (Tan *et al.*, 2014). Por lo tanto, el modelo desarrollado representaría adecuadamente la relación entre los factores elegidos.

**Cuadro 25: ANVA para el modelo lineal del grado de hidrólisis.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Grado de libertad	Cuadrado Medio	Valor $F_c$	Valor-P	Sig.
Modelo	32,715	2	16,3577	27,32	0,000	***
Error residual	5,987	10	0,5987			
Falta de ajuste	5,252	6	0,8754	4,76	0,076	n.s.
Error puro	0,734	4	0,1837			
Total	38,702	12				
$R^2$	0,8453	Sd	0,773			
$R^2_{ajustado}$	0,8144	CV (%)	18,68			

\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0,05$ ; Sd= Desviación estandar; CV = Coeficiente de variabilidad.

\*\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0,001$ ; n.s.= No significativo.

Con respecto al error puro, se observa que la suma de cuadrados es pequeña en comparación a la suma de cuadrados del total, presentando así una buena reproducibilidad en el punto central (Ayala y Pardo, 1995; Morales, 2003; Quanhong y Caili, 2005).

Al evaluar el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se pudo establecer que el 84,53 % de variabilidad de los resultados es explicado por el modelo lineal; también existió un alto grado de correlación entre los valores experimentales y estimados, debido a que el  $R^2$  fue 0,8453 y el  $R^2_{ajustado}$  de 0,8144 (Tan *et al.*, 2014; Parra *et al.*, 2014). Joglekar y May (1987) sugirieron que para un buen ajuste de un modelo, el  $R^2$  debe ser de al menos mayor a 0,80.

Al evaluar el coeficiente de variación (CV), se pudo establecer un 18,68 %, lo que sugiere una mediana precisión del experimento realizado.

## b.2. Análisis de significancia de los coeficientes de regresión

En el Cuadro 26, se presenta la prueba de significancia de los coeficientes de la ecuación de regresión lineal para el grado de hidrólisis. Cada coeficiente del modelo estimado, fue analizado mediante la prueba *t* de *Student* y el valor *p* ( $\alpha = 0,05$ ). Según Amin y Anggoro (2004) las variables o factores correspondientes serán más significativos si el valor *t* absoluto se hace más grande y el valor *p* se hace más pequeño.

**Cuadro 26: Prueba de significancia de los coeficientes de regresión de la ecuación lineal para el grado de hidrólisis.**

Parámetros	Factores	Coefficientes de regresión	Error estándar	Valor-t	Valor-P	Sig.
$\beta_0$	Intercepto	4,142	0,2146	19,299	0,000	***
Lineal						
$\beta_1$	$z_1$	1,676	0,2736	6,128	0,000	***
$\beta_2$	$z_2$	1,131	0,2736	4,134	0,002	**

\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0,01$ ; n.s.= No significativo.

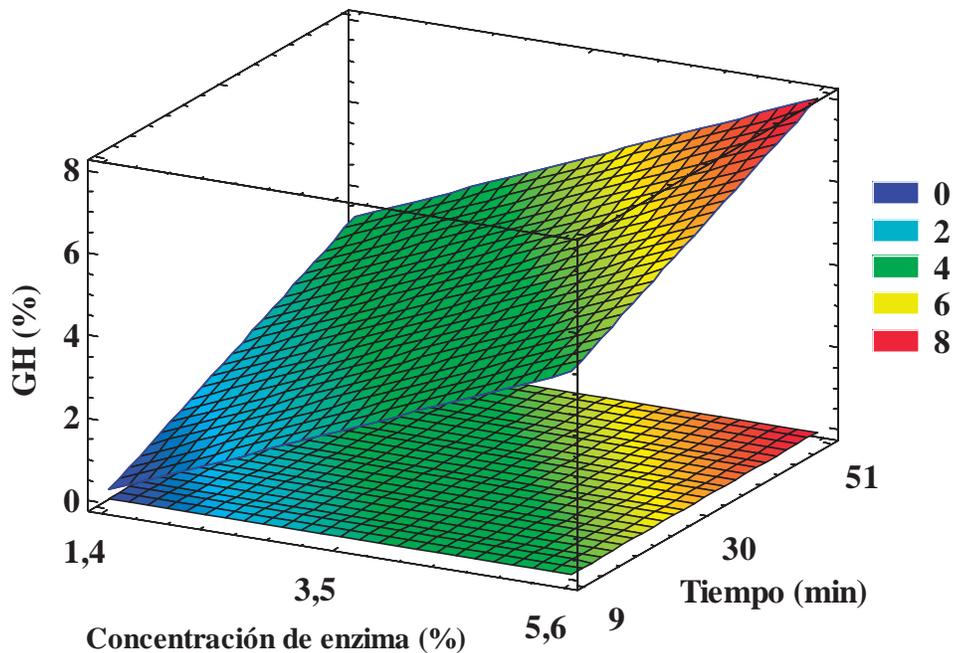
\*\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0,001$ .

Se puede observar del Cuadro 26 que los coeficientes de regresión de la ecuación del término lineal fueron altamente significativos sobre el grado de hidrólisis, en especial la concentración de enzima tuvo la mayor influencia sobre el grado de hidrólisis (valor  $t = 6,128$ ). Este efecto coincide con los resultados obtenidos por Pedroche *et al.* (2004), Ng y Khan (2009) y Sari *et al.* (2013) cuando trabajaron en harina de mostaza, torta de palma y colza, respectivamente.

## b.3. Análisis de la superficie de respuesta

La gráfica de superficie de respuesta (tridimensional), se elaboró a partir del modelo lineal (Ecuación 32) para ilustrar los efectos principales de las variables independientes sobre la variable respuesta (grado de hidrólisis). El objetivo principal fue identificar el valor óptimo de las variables independientes de manera eficiente para minimizar la respuesta. Esta gráfica (Figura 18) se obtuvo mediante la variación de las dos variables independientes dentro del rango experimental.

En la Figura 18 se muestra el efecto de la concentración de la enzima Alcalasa y el tiempo de extracción sobre el grado de hidrólisis. Se observa que ambos ejercen un efecto lineal en el grado de hidrólisis. La variación de la concentración de enzima y el tiempo de extracción revelaron que el mínimo grado de hidrólisis (0,215 %) se obtuvo cuando la concentración de enzima fue 1,4 % y el tiempo de 9 min. Este comportamiento es similar al reportado por Sari *et al.* (2013), quienes obtuvieron un menor grado de hidrólisis de la proteína de la harina de colza, cuando la concentración de la enzima Protex 40XL fue de 1 % durante los tiempos iniciales de la reacción el cual, es menor al presente estudio. Por otro lado, Klompong *et al.* (2007) menciona que el aumento de la concentración de la enzima aumenta el grado de hidrólisis, ya que los enlaces peptídicos son más propensos a ser rotos en presencia de una mayor concentración de enzima. Ng y Khan (2009) mencionan que el tiempo afecta significativamente el grado de hidrólisis hasta un valor crítico y que después tiende a ser estable, debido a que la enzima proteolítica interactúa rápidamente con las partículas de proteínas insolubles y que las cadenas polipeptídicas que están unidas débilmente a la superficie se hidrolizan. Por lo tanto, el núcleo más compacto de la proteína se escinde lentamente (Benjakul y Morrissey, 1997).



**Figura 18: Superficie de respuesta del grado de hidrólisis de la HDTSI en función de los factores: concentración de enzima ( $Z_1$ ) y tiempo de extracción ( $Z_2$ ).**

Teniendo en cuenta todos los resultados en la extracción enzimática asistida, es evidente que el incremento de la concentración de la enzima Alcalasa y el tiempo de extracción resultaron ser los principales contribuyentes que afectaron el aumento del grado de hidrólisis.

#### 4.3.2. Optimización de respuestas múltiples

La optimización múltiple se llevó a cabo luego de obtener los modelos matemáticos correspondientes de cada respuesta evaluada y aplicando la función de deseabilidad global de Derringer ( $D$ ) (Ecuación 26), descrita por Candiotti *et al.* (2014) y Montgomery (2002). Asignando un valor de 1 para el exponente en las funciones de deseabilidad individual para cada respuesta implicada (Ecuación 24 y 25).

De esta forma, las restricciones para el rendimiento de proteína, se estableció a criterio propio, debido a que se quiere llegar a una máxima extracción de proteínas (100 %); con respecto al grado de hidrólisis se estableció de acuerdo a Pedroche *et al.* (2004), Karayannidou *et al.* (2007), Benítez *et al.* (2008), Jamdar *et al.* (2010) y Avramenko *et al.* (2013) mencionando que una hidrólisis limitada (< 10 %) produce buenas propiedades tecnofuncionales (ej. emulsionante y espumante); además, ocasionaría un problema al momento de su recuperación por precipitación isoelectrica. De acuerdo a lo mencionado se estableció la función de deseabilidad individual para el rendimiento de proteína y grado de hidrólisis, fueron las siguientes:

$$\begin{array}{l} \text{Maximización del} \\ \text{rendimiento de} \\ \text{proteína} \end{array} \quad d_1 = \begin{cases} 0 & \hat{Y}_1 < 0 \\ \left(\frac{\hat{Y}_1 - 0}{100 - 0}\right)^1 & 0 \leq \hat{Y}_1 \leq 100 \\ 1 & \hat{Y}_1 > 100 \end{cases} \quad (33)$$

Donde 100 % representa la respuesta objetivo del rendimiento de proteína, es decir, el máximo valor que se desea alcanzar.

$$\begin{array}{l} \text{Minimización del} \\ \text{grado de hidrólisis} \end{array} \quad d_2 = \begin{cases} 1 & \hat{Y}_2 < 8 \\ \left(\frac{10 - \hat{Y}_2}{10 - 8}\right)^1 & 8 \leq \hat{Y}_2 \leq 10 \\ 0 & \hat{Y}_2 > 10 \end{cases} \quad (34)$$

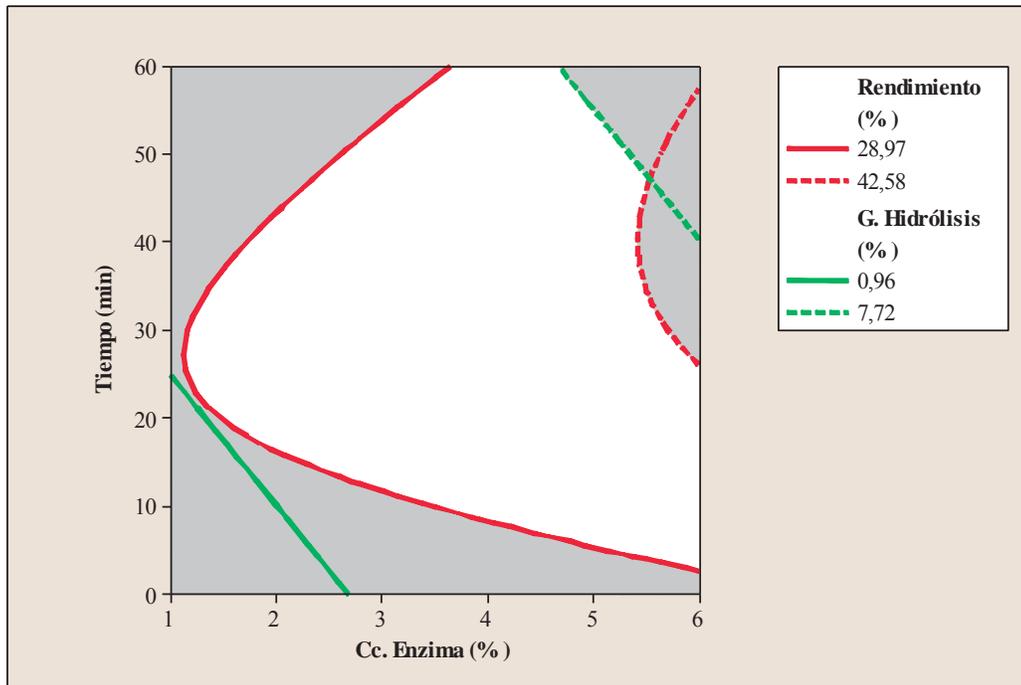
Donde 8 % representa la respuesta objetivo del grado de hidrólisis, es decir, el mínimo valor que se desea alcanzar; y 10 % es el máximo valor aceptable. Luego de considerar las restricciones y las funciones de deseabilidad antes señaladas y haciendo uso del programa estadístico Minitab, se determinó la solución.

#### **a. Análisis de la gráfica de contorno**

La gráfica de contorno (bidimensional) sobrepuesto  $Y_1$  y  $Y_2$ , se elaboraron a partir del modelo cuadrático (Ecuación 30) y lineal (Ecuación 32) para ilustrar los efectos principales de las variables independientes sobre las respuestas. El objetivo principal fue identificar el valor óptimo en los rangos deseados de las variables independientes de manera eficiente para minimizar y maximizar las respuestas. Esta gráfica se obtuvo mediante la variación de las dos variables independientes dentro del rango experimental.

En la Figura 19 se muestra la gráfica de contorno donde se ve el efecto de la concentración de la enzima Alcalasa y el tiempo de extracción sobre el rendimiento de proteína y grado de hidrólisis. Se observa que la concentración de la enzima Alcalasa y el tiempo de extracción aumentan de manera directa el rendimiento de proteína y grado de hidrólisis. Este aumento del grado de hidrólisis, podría afectar algunas propiedades tecnofuncionales (ej. emulsionantes y espumantes) y mejorar otras (ej. solubilidad). Según Karayannidou *et al.* (2007), Benítez *et al.* (2008), Jamdar *et al.* (2010) y Avramenko *et al.* (2013) una hidrólisis limitada (< 10 %) mejora las propiedades tecnofuncionales de las proteínas y su uso como saborizantes; sin embargo, por encima de un punto crítico (> 10 %) puede ocasionar un efecto perjudicial, pero podrían ser utilizados en la elaboración de alimentos especializados. Así mismo, Klompong *et al.* (2007) indican que la hidrólisis excesiva (> 10 %) disminuye las actividades interfaciales (emulsión, estabilidad de la emulsión, capacidad de formación de espuma, estabilidad de la espuma), posiblemente causado por la corta longitud de la cadena peptídica, ya que los péptidos pequeños migran rápidamente y se adsorben en la interfase, mostrando una menor eficiencia en la disminución de la tensión interfacial, puesto que no pueden desarrollarse y reorientar en la interfaz como péptidos grandes para estabilizar emulsiones (Gbogouri *et al.*, 2004). Además estos péptidos no tienen la fuerza necesaria para mantener una espuma estable (Pedroche *et al.*, 2004). Es por ello que los péptidos de alto peso molecular, es decir menor grado de hidrólisis, son

relacionados positivamente con la estabilidad de la emulsión (Mutilangi *et al.*, 1996) y espuma (Van der Ven *et al.*, 2002).



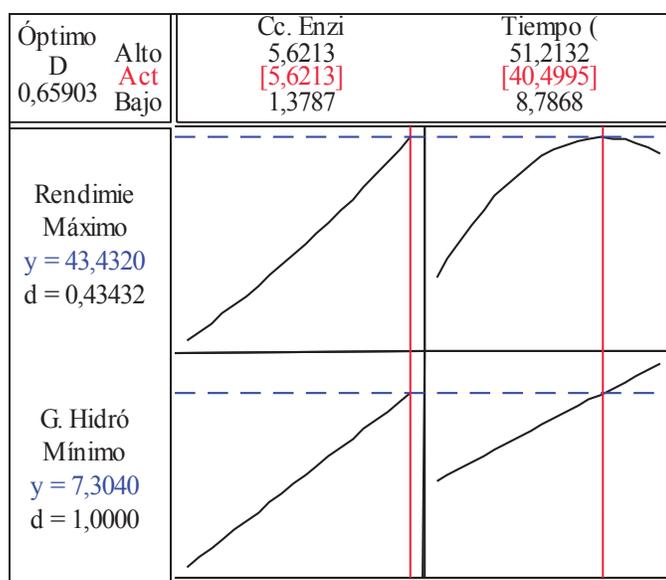
**Figura 19: Gráfica de contorno sobrepuesto del rendimiento de proteína (%) y grado de hidrólisis (%), en función de los factores concentración de enzima ( $Z_1$ ) y tiempo de extracción ( $Z_2$ ).**

Por el contrario, una extensa hidrólisis ( $> 10\%$ ) ha demostrado que aumenta la solubilidad y por ende el rendimiento de extracción de proteínas. Esto es explicado por Pedroche *et al.* (2004) quien menciona que la degradación de las proteínas a péptidos más pequeños conduce a productos más solubles. Además, la hidrólisis enzimática afecta potencialmente el tamaño y la hidrofobicidad molecular, con la capacidad de formar enlaces de hidrógeno con agua y aumentar la solubilidad (Klompong *et al.*, 2007).

También cabe indicar que un grado de hidrólisis mayor a  $10\%$ , provocaría la aparición de péptidos pequeños que, si bien favorece la solubilidad de los mismos, ocasionaría un problema al momento de su recuperación por precipitación isoeléctrica, dado a que su precipitación no sería eficiente. Como consecuencia, los hidrolizados con péptidos más pequeños, es decir, mayor grado de hidrólisis, tienen una excelente solubilidad (Spellman

*et al.*, 2003; Jamdar *et al.*, 2010; Wani *et al.*, 2015). Por lo expuesto, es que se maximizó el rendimiento de proteínas y minimizó el grado de hidrólisis (limitada).

Las condiciones óptimas del rendimiento de proteína y grado de hidrólisis fueron estimadas por el método de deseabilidad global utilizando el programa Minitab (Figura 20). Las variables dependientes se fijaron al valor máximo ( $Y_1$ ) y mínimo ( $Y_2$ ) de deseabilidad, las condiciones óptimas obtenidas corresponden a una concentración de la enzima Alcalasa de 5,62 % ( $\approx 0,081$  UA/g proteína) y tiempo de extracción de 40,49 min, obteniendo un rendimiento de proteína estimado de 43,4 % y grado de hidrólisis de 7,30 %.



**Figura 20: Condición óptima del rendimiento de proteína y grado de hidrólisis utilizando el método de la función de deseabilidad global de Derringer en la extracción enzimática asistida.**

Los valores estimados para el rendimiento de extracción de proteína y grado de hidrólisis de la HDTSI fueron cercanos a los reportados por Pedroche *et al.* (2004) que trabajaron en la harina de mostaza de Abisinia (*Brassica carinata*) y obtuvieron un rendimiento máximo de proteína de 52,4 % y un mínimo grado de hidrólisis de 8,3 %; siendo las condiciones de extracción concentración de la enzima Alcalasa de 0,036 UA/g proteína, pH 9, relación harina/solvente 1/10 (p/v), temperatura ambiente por 60 min.

### 4.3.3. Validación del modelo

La idoneidad de las ecuaciones de los modelos para predecir los valores de las respuestas óptimas se probó usando las condiciones óptimas recomendadas. Bajo este conjunto de condiciones se determinó que fue óptimo para el enfoque de optimización (MSR), que también se utiliza para validar experimentalmente y predecir los valores de las respuestas utilizando la ecuación del modelo. En el Cuadro 27 se muestra las condiciones óptimas, la deseabilidad global de Derringer ( $D$ ), la respuesta estimada por el programa y experimental para el rendimiento de proteína y grado de hidrólisis.

**Cuadro 27: Condición óptima recomendado por los modelos  $\hat{Y}_1$  y  $\hat{Y}_2$ , respuesta estimada y experimental.**

Condiciones óptimas	Codificado	No codificado		
Concentración de enzima (%)	1,41	5,62		
Tiempo de extracción (min)	0,71	40,49		
Variable respuesta	Estimada	*Experimental	Rango	D
Rendimiento de proteína (%)	43,43	44,78 $\pm$ 0,28	44,5 – 45,06	0,65903
Grado de hidrólisis (%)	7,30	7,86 $\pm$ 0,10	7,76 – 7,96	

\* Media  $\pm$  desviación estándar; n=3 (triplicado); D= Deseabilidad global de Derringer.

La comparación entre los resultados estimados y experimentales en el punto óptimo, revela una buena correspondencia entre ellos, lo cual implica que los modelos empíricos obtenidos por el MSR pueden ser usados para describir adecuadamente la relación entre los factores y respuestas, siempre y cuando se trabaje en cualquier condición que se encuentre dentro de la zona experimental analizada.

### 4.4. Comparación de resultados por los dos métodos de extracción de proteínas

En el Cuadro 28 se presenta la comparación de la extracción de la proteína optimizada por el método alcalino y el método enzimático asistida.

**Cuadro 28: Comparación de los métodos de extracción de proteínas con respecto al rendimiento de proteína.**

Método	Rendimiento de proteína (%)
Extracción alcalina	30,23 ±0,50*
Extracción enzimática asistida	44,78 ±0,28*

\* Media ± desviación estándar; n=3 (triplicado).

Como se puede observar en el Cuadro 28, el uso del método de extracción enzimática asistida resultó en un aumento de 48,13 % en el rendimiento de extracción de proteínas en comparación con el método de extracción alcalina. Esto se debe a que el método enzimático realiza un proceso hidrolítico favoreciendo la solubilización de una mayor cantidad de proteínas insolubles (Pedroche *et al.*, 2014). Los resultados encontrados concuerda con lo reportado por Pedroche *et al.* (2004) cuando compararon dos métodos de extracción de proteína en harina mostaza de Abisinia (*Brassica carinata*), obteniendo mejores resultados con el método enzimático (52,4 %) que el método alcalino (41,6 %) en el rendimiento de proteína. Así mismo, Chee *et al.* (2012) obtuvieron un mayor rendimiento de proteína en la torta de palma con el método enzimático (61,99 %) que el método alcalino (10,21 %). De la misma forma, Rosset *et al.* (2012) trabajaron con harina de soya, obteniendo un bajo rendimiento de proteína con el método alcalino de 33,04 % en comparación con el método enzimático de 56,27 %. Por último, Sari *et al.* (2013) también lograron obtener un mejor rendimiento con el método enzimático (50 %) que el método alcalino (15 %) en la extracción de proteínas de la harina de colza.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta investigación, indican que el método de extracción enzimática asistida, utilizando como enzima la Alcalasa, mejora la extracción de proteínas de la HDTSI. Además, este proceso evita la producción posible de productos tóxicos (lisinoalanina) y daños graves a las proteínas, mejorando sus propiedades nutricionales y tecnofuncionales (Domínguez *et al.*, 1994).

A pesar de que se logró optimizar el proceso de extracción de proteínas de la HDTSI, el rendimiento de proteína fue bajo (menor al 50 %), debido a varios factores que pueden influir en la extracción de proteínas, en el que incluyen la solubilidad, la estructura de la pared celular de la biomasa y la composición química (Sari *et al.*, 2013).

Las proteínas vegetales son estructuras bastante complejas, con distintas formas y figuras, que presentan zonas hidrófobas e hidrófilas, y determinan su comportamiento en solución, y en consecuencia su éxito o fracaso en su separación. Por lo tanto, la solubilidad de una proteína depende de las propiedades de los grupos que se encuentran a un nivel de la superficie en la molécula, de la clase de disolvente, temperatura y pH (Lewis y Gradison, 1996). Además, la hidrofobicidad de la superficie de la molécula de proteína afecta a la solubilidad de la proteína, donde una mayor solubilidad siempre está ligada a la presencia de menor número de residuos hidrofóbicos, particularmente en la superficie de proteínas (Chel-Guerrero *et al.*, 2011).

Por otro lado, Ng y Khan (2012) mencionan que la torta de semillas oleaginosas se produce después de un intenso prensado con tornillo que podrían causar daño por calor al componente de la proteína y, por tanto, puede reducir la capacidad de extracción de proteínas. Es por ello que se necesita una mayor concentración de solución alcalina para aumentar la capacidad de extracción de proteína. Sin embargo, una extracción alcalina extrema ( $\text{pH} > 10$ , que es la máxima concentración alcalina recomendada), puede provocar cambios extremos en el entorno de la proteína y ser perjudicial para la calidad (Eromosel *et al.* 2008).

Aghazu *et al.* (1979) mencionan que la semilla de oleaginosas consiste en sacos celulósicos microscópicos que contienen grasa en la que están incorporadas pequeños gránulos de proteína (15 – 20  $\mu\text{m}$  de tamaño) y carbohidratos (hasta 60  $\mu\text{m}$ ). Por lo tanto, es probable que la insolubilización de la proteína sea debida en parte a la unión o atrapamiento de las proteínas o polisacáridos por gránulos de almacenamiento bajo la influencia del calor y la presión aplicada durante los procesos de extracción de aceite de la semilla.

También se menciona que el bajo rendimiento se debe principalmente a la heterogeneidad de las proteínas, ya que estas se clasifican de acuerdo a su solubilidad en diferentes condiciones, por lo que no pueden ser todas a la vez, solubles e insolubles. Esto significa que una fracción de las proteínas estará en la fase líquida y otra en la sólida, ocasionando pérdida de proteínas localizadas en la fase no recuperada (Morales, 2003). Las proteínas vegetales (oleaginosas), son en su mayoría globulinas (solubles en solución salina) y albuminas (solubles en agua), y en menor contenido glutelinas (solubles a pH extremos) y prolaminas (solubles en alcohol) (Rodrigues *et al.*, 2012).

Por su parte, Sathe *et al.* (2012) determinaron que cuando las albúminas y globulinas de la harina de semilla del sacha inchi, se encuentran juntas, su comportamiento colectivo, es opuesto a su comportamiento individual y puede impactar en la solubilidad. Una posible razón del diferente comportamiento se debe a las interacciones proteína–proteína. Estas interacciones son facilitadas por diferentes fuerzas de enlace (por ejemplo, iónico, puentes de hidrógeno, interacción hidrofóbica, y disulfuro) dependiendo de las condiciones ambientales permitidas por las condiciones experimentales usadas (por ejemplo, pH, fuerza iónica, y la temperatura). Tales interacciones proteína–proteína pueden conducir a la formación de grandes complejos de proteínas (soluble e insoluble) afectando a su solubilidad.

Otra causa del bajo rendimiento de proteína podría deberse a la presencia de antinutrientes; como los taninos que pueden unirse o precipitar a las proteínas disminuyendo la solubilidad (Ruiz *et al.*, 2013). A sí mismo, Tan *et al.* (2014) mencionan que la interacción entre proteína y fitato, causa la disminución de la solubilidad, y por lo tanto baja el rendimiento de extracción proteína. El fitato o ácido fítico son componentes naturales que se encuentran en las leguminosas, cereales y semillas oleaginosas, que actúan como forma de almacenamiento de fósforo. Por su parte, Serraino y Thompson (1984) mencionan que la interacción proteína-fitato depende del pH y de iones divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ). A un pH alcalino, tanto la proteína y el ácido fítico están cargados negativamente, dando lugar a la formación de complejos proteína-mineral-fitato que solo ocurren en presencia de iones multivalentes. Para evitar la formación de estos complejos, es necesario eliminar estos iones, utilizando quelantes, tales como el EDTA (Rodrigues *et al.*, 2012).

## V. CONCLUSIONES

- Con la ayuda del diseño compuesto central, las condiciones óptimas de extracción de proteínas para el método alcalino fueron: pH 9,5, temperatura 54 °C, relación materia prima/solvente 1/42 (p/v) y concentración de NaCl de 1,65 M; obteniendo un rendimiento máximo de proteína de 30,23 g de proteína soluble/100 g de proteína total.
- En el método de extracción enzimática asistida, se maximizó el rendimiento de proteína y minimizó el grado de hidrólisis de manera simultánea, utilizando la optimización de respuestas múltiples, siendo las condiciones óptimas para ambas respuestas: la concentración de enzima de 5,62 % y tiempo de extracción de 40,7 min; obteniendo un rendimiento de proteína de 44,78 g de proteína soluble/100 g de proteína total y grado de hidrólisis de 7,86 %.
- Al comparar ambos métodos, se determinó que el método de extracción enzimática asistida, utilizando como enzima la Alcalasa, obtuvo un mayor rendimiento de extracción de proteína en la HDTSI (48,7 % más).
- Los modelos cuadráticos del diseño compuesto central representaron adecuadamente a los resultados experimentales; tanto en el método alcalino como en el enzimático para el rendimiento de extracción proteína de la HDTSI.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Evaluar el empleo de otras enzimas: proteasas y carbohidrasas en la extracción de las proteínas de la torta del sachá inchi.
- Evaluar las propiedades tecnofuncionales de la proteína de sachá inchi extraída por los métodos alcalino y asistida con enzima optimizados.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists, US). 2005. Official Methods of Analysis of the Association the Official Agricultural Chemists. De Board. USA.
2. ACCHOURI, A.; ZHANG, W. y SHIYING, X. 1998. Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate and effect of succinylation on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Food Research International* 31: 617 – 623.
3. ACEITES DE SEMILLAS, 2009. Tortas y harinas oleaginosas. [En línea] <<http://www.aceitesdesemillas.com/es/tortas-harinas.php>> [consultado: 28 de junio 2015].
4. ADLER-NISSEN, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27: 1256 – 1262.
5. ADLER-NISSEN, J. 1986. Enzymic hydrolysis of food proteins. New York: Elsevier Applied Science Publishers. 427p.
6. ADRIANZÉN, N.; ROJAS, C. y LINARES, G. 2011. Efecto de la temperatura y tiempo de tratamiento térmico de las almendras trituradas del sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) sobre el rendimiento y las características físico-químicas del aceite obtenido por prensado mecánico en frío. *Agroindustrial Science* 2: 46 – 55.
7. AGHAZU, B.; MEISSNER, H.; NGOOI, C. y TANNENBAUM, S. 1979. Protein-rich flours from palm kernels. *International Journal of Food Science & Technology* 14(1): 1 – 8.
8. AKBARI, A. y WU, J. 2015. An integrated method of isolating napin and cruciferin from defatted canola meal. *LWT - Food Science and Technology* 64: 308 – 315.
9. AMIN, N. y ANGGORO, D. 2004. Optimization of direct conversion of methane to liquid fuels over Cu loaded W/ZSM-5 catalyst. *Fuel* 83: 487 – 494.
10. ANSHARULLAH; HOURIGAN, J. y CHESTERMAN, C. 1997. Application of carbohidrases in extracting protein from rice bran. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 74(2): 141 – 146.

11. ARIFIN, B.; BONO, A.; FARM, Y.; LING, A. y FUI, S. 2009. Protein extraction from palm kernel meal. *Journal of Applied Sciences* 9(17): 2996 – 3004.
12. AVRAMENKO, N.; LOW, N. y NICKERSON, M. 2013. The effects of limited enzymatic hydrolysis on the physicochemical and emulsifying properties of a lentil protein isolate. *Food Research International* 51: 162 – 169.
13. AYALA, J. y PARDO, R. 1995. Optimización por diseños experimentales con aplicaciones en ingeniería. Lima, Perú, CONCYTEC. 261 p.
14. BADUI, S. 2006. Química de los alimentos. 4<sup>a</sup> ed. México, Editorial Pearson S.A. de C.V. 717 p.
15. BADWAIK, L.; PRASAD, K. y DEKA, S. 2012. Optimization of extraction conditions by response surface methodology for preparing partially defatted peanut. *International Food Research Journal* 19(1): 341 – 346.
16. BENAVIDES, J. y MORALES, J. 1994. Caracterización del aceite y proteína del cultivo del sacha inchi o maní del monte (*Plukenetia volubilis* L.) como alternativa para la alimentación humana y animal. Yurimaguas, Perú. 80 p.
17. BENÍTEZ, R.; IBARZ, A. y PAGAN, J. 2008. Protein hydrolysates: processes and applications. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 42(2): 227 – 236.
18. BENJAKUL, S. y MORRISSEY, M. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(9): 3423 – 3430.
19. BOHINSKI, R. 1976. Solutions manual to accompany modern concepts in biochemistry. 2<sup>a</sup> ed. Editorial Allyn and Bacon. 77 p.
20. BOSCHIN, G.; SCIGLIUOLO, G.; RESTA, D. y ARNOLDI, A. 2014. ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chemistry* 145: 34 – 40.
21. BOX, G. y DRAPER, N. 1987. Empirical model-building and response surfaces. New York, US, John Wiley and Sons. 669 p.
22. BOYE, J.; AKSAY, S.; ROUFIK, S.; RIBÉREAU, S.; MONDOR, M.; FARNWORTH, E. y RAJAMOHAMED, S. 2010. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International* 43: 537 – 546.
23. CALLISAYA, J. 2011. Aislados proteínicos de granos andinos quenopodiáceas quinua (*Chenopodium quinoa*) y cañihua (*Chenopodium pallidicaule*) por

- precipitación isoelectrica. Tesis para optar el título profesional de químico de alimentos. La Paz, Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés. 67 p.
24. CANDIOTI, L.; DE ZAN, M.; CÁMARA, M. y GOICOECHEA, H. 2014. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development, Review. *Talanta* 124: 123 – 138.
  25. CHACÍN, F. 1998. Diseño y análisis para generar superficie de respuesta. Venezuela, Universidad Central de Venezuela. 230 p.
  26. CHAMBAL, B.; BERGENSTÅHL, B. y DEJMEK. 2012. Edible proteins from coconut milk press cake; one step alkaline extraction and characterization by electrophoresis and mass spectrometry. *Food Research International* 47: 146 – 151.
  27. CHANG, S.; ISMAIL, A.; YANAGITA, T.; ESA, N y BAHARULDIN, M. 2014. Biochemical characterization of the soluble proteins, protein isolates and hydrolysates from oil palm (*Elaeis guineensis*) kernel. *Food Bioscience* 7: 1 – 10.
  28. CHEE, K. y AYOB, M. 2013. Optimization of hexametaphosphate-assisted extraction and functional characterization of palm kernel cake protein. *Food Science and Technology International* 19(2): 109 – 122.
  29. CHEE, K.; LING, H. y AYOB, M. 2012. Optimization of trypsin-assisted extraction, physico-chemical characterization, nutritional qualities and functionalities of palm kernel cake protein. *LWT - Food Science and Technology*. 46: 419 – 427.
  30. CHEFTEL, J.; CUP, J. y LORIENT, D. 1989. Proteínas alimentarias. Zaragoza, España, Editorial Acribia S.A. 346 p.
  31. CHEFTEL, J.C. y CHEFTEL, H. 1980. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Zaragoza, España, Editorial Acribia Vol. I. 333 p.
  32. CHEL-GUERRERO, L.; GALLEGOS-TINTORÉ, S.; MARTÍNEZ-AYALA, A.; CASTELLANOS-RUELAS, A. y BETANCUR-ANCONA, D. 2011. Functional properties of proteins from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) seed. *Food Science and Technology International* 17(2): 119 – 126.
  33. COCHRAN, W. y COX, G. 1990. Diseños experimentales. 2<sup>a</sup> ed. México, Editorial Trillas. 661 p.
  34. CODEX ALIMENTARIUS. 1995. Norma general del Codex Alimentarius para los productos proteínicos vegetales (PPV). *Codex Alimentarius* 7: 113-120.
  35. DE MOURA, J.; CAMPBELL, K.; DE ALMEIDA N.; GLATZ C. y JOHNSON L. 2011. Protein extraction and membrane recovery in enzyme-assisted aqueous extraction processing of soybeans. *J. Am Oil Chem. Soc.* 88: 877 – 889.

36. DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. y LEMA, J. 1994. Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds – a review. *Food Chemistry* 49:271–286.
37. DONG, Y.; LI, Q.; GAO, N.; CHEN, X.; CHENG, Y.; LU, J.; LIN, F.; MENG, Q. y TENG, L. 2012. Optimization of protein extraction from DDGS using response surface methodology and the properties of the protein. *Fifth International Conference on Intelligent Computation Technology and Automation* 67: 242 – 245.
38. EREN, I. y KAYMAK, F. 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering* 79: 344 – 352.
39. EROMOSELE, C.; AROGUNDADE, L.; EROMOSELE, I. y ADEMUYIWA, O. 2008. Extractability of African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*) protein in acid, salt and alkaline aqueous media. *Food Hydrocolloids* 22(8): 1622 – 1628.
40. ESCOBEDO, E. 2013. Determinación de la digestibilidad y energía digestible de la torta del sachá inchi (*Plukenetia volubilis* Linneo) extruida en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Zootecnista. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 130 p.
41. EVANGELISTA, R.; WU, Y. y HOJILLA-EVANGELISTA, M. 2006. Characterization of proteins in Cuphea (PSR23) seeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83(9): 785 – 790.
42. FAO. 2009. Perspectivas alimentarias – análisis de los mercados mundiales. [En línea] <<http://www.fao.org/docrep/012/ak341s/ak341s00.pdf>> [consultado: 20 de junio 2015].
43. FENNEMA, O. 2010. Química de los alimentos. 3ª ed. Zaragoza, España, Editorial Acribia S.A. 1258 p.
44. FERCHAU, E. 2000. Equipment for decentralised cold pressing of oil seeds. Folkecenter for Renewable Energy. 64 p.
45. FIDANTSI, A. y DOXASTAKIS, G. 2001. Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 21(1/3): 119-124.
46. FIRATLIGIL-DURMUS, E. y EVRANUZ, O. 2010. Response Surface methodology for protein extraction optimization of red pepper seed (*Capsicum frutescens*). *LWT – Food Science and Technology* 43: 226 – 231.

47. GARCÍA, E. 2013. Potencial del cultivo, industrialización y exportación del sachá inchi (*Plukenetia volubilis*) como producto nutracéutico. Trabajo profesional para optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina, 96 p.
48. GARCÍA, H. 1992. Resumen de investigaciones apoyadas por Fundeagro 1988 – 1992. Tomo I. Proyecto de Transformación de la Tecnología Agropecuaria. TTA. 61 – 63 p.
49. GBOGOURI, G.; LINDER, M.; FANNI, J. y PARMENTIER, M. 2004. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproduct hydrolysates. *Journal of Food Science* 69: 615 – 622.
50. GHALY, A. y ALKOAİK, F. 2010. Extraction of protein from common plant leaves for use as human food. *American Journal of Applied Sciences* 7: 323 – 334.
51. GORRITI, A. 2013. Actualización de la monografía sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). Lima, Perú. Perúbiodiverso. 22 p.
52. GOUNDAN, S. 1992. Isolation and characterization of chenopodin, the major seed storage protein of quinoa (*Chenopodium quinoa*). Master's Theses and Graduate Research. Washington, US. San Jose State University, Paper 389.
53. GUAN, X. y YAO, H. 2008. Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chemistry* 106: 345–351.
54. GUERRERO-OCHOA, M.; PEDRESHI, R. y CHIRINOS, R. 2015. Optimised methodology for the extraction of protein from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *International Journal of Food Science and Technology* 1 – 8.
55. GUILLÉN, M.; RUÍZ, A.; CABO, N.; CHIRINOS, R. y PASCUAL, G. 2003. Characterization of Sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil by FTIR spectroscopy and H NMR. Comparison with linseed oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80(8): 755 – 762.
56. GUO, R.; PANG, S. y WANG, K. 2005. Studies of the alkali and enzyme methods for rice protein extraction and the comparison of their functionalities. *Shiping Kexue* 26: 173 – 177.
57. GUTIÉRREZ, F.; ROSADA, L. y JIMÉNEZ, A. 2011. Chemical composition of sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction. *Grasas y aceites* 62(1): 76 – 83.
58. HAMAKER, B.; VALLES, C; GILMAN, R.; HARDMEIER, R.; CLARK, D.; GARCÍA, H.; GONZALES, A.; KOHLSTAD, I. y CASTRO, M. 1992. Amino

- acid and fatty acid profiles of the inca peanut (*Plukenetia volubilis*). American Association of general chemistry 69(4): 461 – 463.
59. HORAX, R.; HETTIARACHCHY, N.; KANNAN, A. y CHEN, P. 2011. Protein extraction optimisation, characterisation, and functionalities of protein isolate from bitter melon (*Momordica charantia*) seed. Food Chemistry 124: 545 – 550.
  60. HUNG, N.; VAS, M.; CHEKE, E. Y BOLCSI, S. 1984. Relative tryptic digestion rates of food proteins. Journal of Food Science 49: 1535 – 1542.
  61. IRAKOZE, P. y SINDAYIGAYA, E. 2010. Optimization of malted sorghum protein extraction by response surface methodology. J. Food Sci. Technol. Nepal 6: 53 – 58.
  62. JAGERSBERGER, J. 2013. Development of novel products on basis of Sacha Inchi – Use of press cakes and hulls. Titel angestrebter akademischer Grad Master of Science. Austria, Viena. Universität Wien. 125 p.
  63. JAIMES, J.; RETREPO, D. y ACEVEDO, D. 2012. Propiedades funcionales de aislados proteicos de leguminosas. ReCiTeIA 11(2): 21 – 32.
  64. JAMDAR, S.; RAJALAKSHMI, V.; PEDNEKAR, M.; JUAN, F.; YARDI, V. y SHARMA, A. 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. Food Chemistry 121: 178 – 184.
  65. JEANTET, R.; CROGUENNEC, T.; SCHUCK, P. y BRULÉ, G. 2010. Ciencia de los alimentos: Bioquímica, microbiología, procesos y productos. Zaragoza, España, Editorial Acribia S.A. Vol.1, 1391 p.
  66. JOGLEKAR, M. y MAY, T. 1987. Product excellence through design of experiments. Cereal Food World 32(12): 857 – 868.
  67. KARACA, A.; LOW, N. y NICKERSON, M. 2011. Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. Food Research International 44: 2742 – 2750.
  68. KARAYANNIDOU, A.; MAKRI, E.; PAPALAMPROU, E.; DOXASTAKIS, G.; VAINTRAUB, I.; LAPTEVA, N. y ARTICOV, G. 2007. Limited proteolysis as a tool for the improvement of the functionality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates produced by seeds or industrial by-products (solvent cake). Food Chemistry 104: 1728 – 1733.
  69. KINSELLA, J. E. 1976. Functional properties of food proteins: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 7: 219 – 280.

70. KLOMPONG, V.; BENJAKUL, S.; KANTACHOTE, D. y SHAHIDI, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry* 102: 1317 – 1327.
71. KUEHL, R. 2000. Diseños de experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. 2 ed. US, Editorial Thomson Learning. 666 p.
72. LAIDLER, K. y BUNTING, P. 1973. The chemical kinetics of enzyme action (2nd ed.). Oxford: Clarendon Press.
73. LATIF, S. y ANWAR, F. 2009. Effect of aqueous enzymatic processes on sun flower oil quality. *J. Am Oil Chem. Soc.* 86: 393 – 400.
74. LESTARI, D.; MULDERB, W. y SANDERSA, J. 2010. Improving *Jatropha curcas* seed protein recovery by using counter current multistage extraction. *Biochemical Engineering Journal* 50:16–23.
75. LEWIS, M. y GRADISON, A. 1996. Separation Process in the Food and Biotechnology Industries: Principles and Applications. Woodhead publishing Ltd., Cambridge.
76. LIADAKIS, G.; TZIA, N.; OREOPOULOU, V. y THOMOPOULOS, C. 1995. Protein isolation from tomato seed meal extraction optimization. *Journal of Food Science* 60(3): 477 – 482.
77. LINDEN, G. y LORIENT, D. 1996. Bioquímica agroindustrial: Revalorización alimentaria de la producción agrícola. 1ª ed. Zaragoza, España, Editorial Acribia S.A. 428 p.
78. LÓPEZ, O.; MÁRQUEZ, T.; SALOMÓN, S. y GONZÁLEZ, M. 2009. Extracción de lípidos de las semillas de *Cucurbita pepo* L. (calabaza). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 14(2): 1 – 6.
79. LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A. y RANDALL, R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265 – 275.
80. LV, C.; JIA, X.; LI, M.; YANG, J. y ZHAO, G. 2011. Optimization of extraction process of crude protein from grape seeds by RSM. *Food Science Technology* 17(5): 437 – 445.
81. MA, T.; WANG, Q. y WU, H. 2010. Optimization of extraction conditions for improving solubility of peanut protein concentrates by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology* 43: 1450-1455.

82. MANCO, E. 2006. Cultivo del sachu inchi. San Martín, Perú, Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria. 11 p.
83. MARTÍNEZ, D.; HERNÁNDEZ, B.; AMIGO, L.; MIRALLES, B.; y GÓMEZ, J. 2013. Extraction/fractionation techniques for proteins and peptides and protein digestion. *Food Microbiology and Food Safety* 2: 21 – 50.
84. MERCADO, J. 2012. Obtención de un aislado proteico a partir de torta del sachu inchi (*Plukenetia volubilis* L.) y evaluación de sus propiedades tecnofuncionales. Tesis para optar el título profesional de ingeniero en industrias alimentarias. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 115 p.
85. MERINO, C.; SOTERO, V.; DEL CASTILLO, D.; VÁSQUEZ, G.; CACHIQUE, D. y VÁSQUEZ, P. 2008. Caracterización química de nueve ecotipos de *Plukenetia volubilis* L. de los departamentos de Loreto y San Martín. *Folia Amazónica* 17(1/2): 39 – 45.
86. MILA, P.; ROQUE, L. y WUC, Y. 2009. Characterization of milkweed (*Asclepias spp.*) seed proteins. *Industrial Crops and Products* 29: 275–280.
87. MILANOVA, R.; MURRAY, E. y WESTDAL, P. 2003. Protein Extraction from Canola Oil Seed Meal. Patent 6992173.
88. MIZUBUTI, I.; JUNIOR, O.; SOUZA, L.; SILVA, R. y IDA, E. 2000. Response Surface methodology for extraction optimization of pigeon pea protein. *Food Chemistry* 70: 259 – 265.
89. MONTGOMERY, D. 2002. Diseño y análisis de experimentos. 2 ed. México, México DF, editorial Limusa S.A. de C.V. 686 p.
90. MORALES, E. 2003. Optimización de los parámetros físicoquímicos para la extracción alcalina de proteínas de hígado de bovino, aplicando el método de superficie de respuesta. Tesis para optar el título profesional de ingeniero en industrias alimentarias. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 128 p.
91. MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; ZUÑIGA, M.; SOTO, C. y CHAMY, R. 2002. Characterization of protein concentrates from pressed cakes of *Guevina avellana* (Chilean hazelnut). *Food Chemistry* 78: 179 – 186.
92. MOURE, A.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZA, H. y PARAJÓA, J. 2006. Functionality of oilseed protein products: a review. *Food Research International* 39(9): 945 – 963.
93. MUIRRAGUI, C. 2013. Estudio de factibilidad del uso de pasta del sachu inchi (*Plukenetia volubilis*) en dietas para aves. Tesis para optar el título profesional de

- Ingeniero en Agroempresas. Quito, Ecuador. Universidad San Francisco de Quito. 110 p.
94. MUNE, M.; MINKA, S. y MBOME, I. 2008. Response Surface methodology for optimisation of protein concentrate preparation from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Food Chemistry* 110: 735 – 741.
  95. MUTILANGI, W.; PANYAM, D. y KILARA, A. 1996. Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. *Journal of Food Science* 61(2): 270 – 275.
  96. NADAL, P.; CANELA, N.; KATAKIS, I. y O’SULLIVAN, C. 2011. Extraction, isolation, and characterization of globulin proteins from *Lupinus albus*. *Journal Agricultural Food Chemistry* 59: 2752 – 2758.
  97. NELSON, L. y COX, M. 2001. *Principios de bioquímica*. 4<sup>a</sup> ed. España, Editorial Legninger. 1776 p.
  98. NG, K. y KHAN, A. 2012. Enzymatic preparation of palm kernel expeller protein hydrolysate (PKEPH). *International Food Research Journal* 19(2): 721 – 725.
  99. NILO-RIVAS, R.; JANE, E.; DENCH, P. y CAYGILL, C. 1981. Nitrogen extractability of sesame (*Sesame indicum* L.) seed and the preparation of two proteins isolate. *Journal Science Food Agriculture* 32: 565 – 571.
  100. ONSAARD, E.; POMSAMUD, P. y AUDTUM, P. 2010. Functional properties of sesame protein concentrate from sesame meal. *Asian Journal of Food and Agro-Industry* 3(4): 420 – 431.
  101. OOMAH, B.; MAZZA, G. y CUI, W. 1994. Optimization of protein extraction from flaxseed meal. *Food Research International* 27: 355 – 361.
  102. ORTEGA, J.; MEDINA, L.; GÁMEZ, N. y NORIEGA, J. 2005. Optimization of bleaching condition for soybean oil using response surface methodology. *Food Science and Technology International* 11(6): 443 – 449.
  103. PARRA, M.; BAMDAD, F.; WANG, Y.; TIAN, Z.; TEMELI, F.; HAN, J. y CHEN, L. 2014. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. *LWT - Food Science and Technology* xxx: 1 – 9.
  104. PASCUAL, G. y MEJÍA, M. 2000. Extracción y caracterización de aceite del sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Anales Científicos UNALM* 42: 144 – 158.
  105. PEDROCHE, J.; YUST, M.; LQARI, H.; GIRON-CALLE, J.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J. y MILLAN, F. 2004. *Brassica carinata* protein isolates: chemical

- composition, protein characterization and improvement of functional properties by protein hydrolysis. *Food Chemistry* 88(3): 337 – 346.
106. PICKARDT, C.; NEIDHART, S.; GRIESBACH, C.; DUBE, M.; KNAUF, U.; KAMMERER, D. y CARLE, R. 2009. Optimization of mild-acidic protein extraction from defatted sunflower (*Helianthus annuus* L.) meal. *Food Hydrocolloids* 23: 1966 –1973.
  107. QUANHONG, L. y CAILI, F. 2005. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food Chemistry* 92: 701 – 706.
  108. RODRIGUES, I.; COELHO, J.; GRACA, M. y CARVALHO, S. 2012. Isolation and valorization of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. *Journal of Food Engineering* 109: 337 – 346.
  109. RODRÍGUEZ, P. 1981. Obtención de aislado proteico a partir de lupino (*Lupinus mutabilis*). Tesis para optar el título profesional de ingeniero en industrias alimentarias. Lima, Perú. UNALM. 90 p.
  110. ROJAS, E. 2003. Sacha inchi, cultivo cativo proteico y oleaginoso del Perú. *Agro Enfoque* 140: 35 – 38.
  111. ROSSET, M.; ACQUARO, R. y BELÉIA, A. 2012. Protein extraction from defatted soybean flour whit Viscozyme L pretreatment. *Journal of Food Processing and Preservation* 1745 – 4549.
  112. RUÍZ, C.; DÍAZ, C.; ANAYA, J. y ROJAS, R. 2013. Análisis proximal, antinutrientes, perfil de ácidos grasos y de aminoácidos de semillas y tortas de 2 especies del sachá inchi (*Plukenetia volubilis* y *Plukenetia huayllabambana*). *Rev. Sociedad Química Perú* 79 (1): 29 – 36.
  113. RUÍZ, V.; CARRERA, C.; YUST, M.; PEDROCHE, J.; MILLAN, F. y RODRÍGUEZ J. 2007. Limited enzymatic hydrolysis can improve the interfacial and foaming characteristics of beta-conglycinin. *Journal Agriculture Food Chemistry* 55(4): 1536 – 1545.
  114. RUSTOM, M.; ISMAIL, Y.; LOPEZ, L.; BABOO, M. y NAIR, M. 1991. Optimization of extraction of peanut proteins with water by response surface methodology. *Journal of Food Science* 56(6): 1660 – 1663.
  115. SARI, Y.; BRUINS, M. y SANDERS, J. 2013. Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean and microalgae meals. *Industrial Crops and Products* 43: 78 – 83.

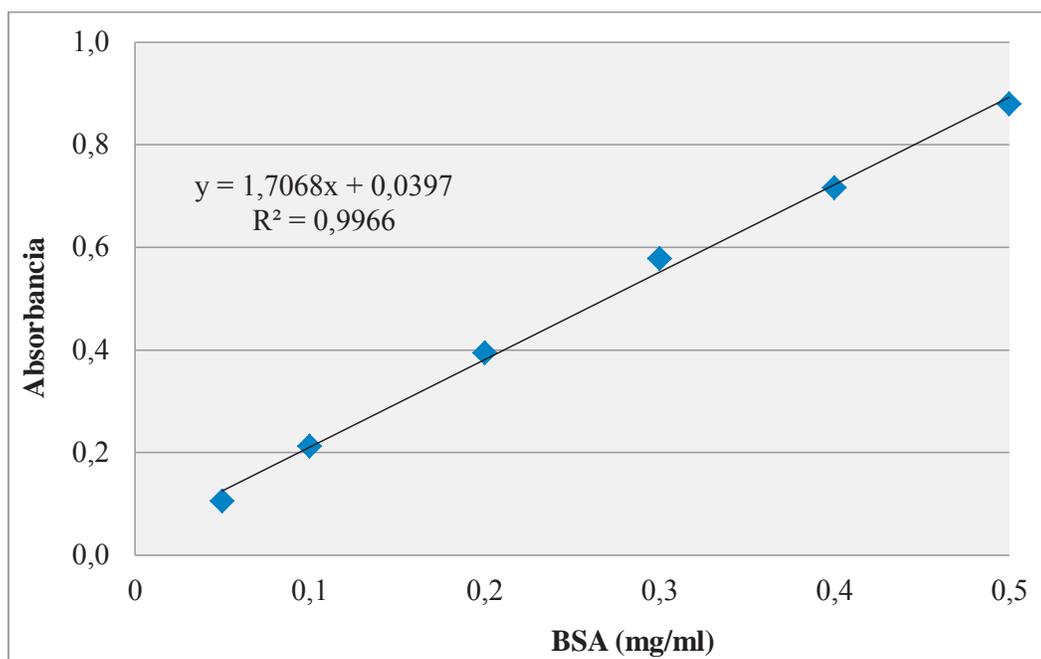
116. SATHE, S.; HAMAKER, B.; SZE-TAO, K. y VENKATACHALAM, M. 2002. Isolation, Purification, and Biochemical Characterization of a Novel Water Soluble Protein from Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.). J. Agric. Food Chemistry 50: 4906 – 4908.
117. SATHE, S.; KSHIRSAGAR, H. y SHARMA, G. 2012. Solubilization, fractionation, and electrophoretic characterization of Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.) proteins. Plant Foods Hum Nutr. Springer 67: 247 – 55.
118. SCHWASS, D. y FINLEY, J. 1984. Heat and alkaline damage to proteins: racemization and lysinoalanine formation. J. Agriculture Food Chemistry 32: 1377 – 1382.
119. SEMIU, O.; FOLAKE, O.; HANS-PETER, M.; ANDREA, S. y SAMUEL, O. 2009. Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut. Food Chemistry 115(3): 852–858.
120. SERRAINO, M. y THOMPSON, L. 1984. Removal of phytic acid and protein-phytic acid interactions in rapeseed. Journal of Agriculture and Food Chemistry 32: 38 – 40.
121. SHAHIDI, F. 1990. Canola and rapeseed: Production, chemistry, nutrition, and processing technology. New York, US, Van Nostrand Reinhold. 355 p.
122. SHAHRAKI, F.; HADAD, M.; HESARINEJAD, M.; MORTAZAVI, S.; MILANI, E. y HOSEINZADEH, A. 2013. The quality and purity of the proteins extracted from the *Lathyrus sativus* seeds and optimization by the response surface methodology (RSM). Mashhad, Iran. Ferdowsi University of Mashhad, Paper 4.
123. SHEN, L.; WANG, X.; WANG, Z.; WU, Y. y CHEN, J. 2008. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. Food Chemistry 107(2): 929 – 938.
124. SPELLMAN, D.; McEVOY, E.; O'CUINN, G. y FITZGERALD, R. 2003. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. International Dairy Journal 13: 447 –453.
125. SPIEGEL, M. 1991. Estadística. 2<sup>a</sup> ed. Madrid, España, Editorial McGraw-Hill. 556 p.
126. SUI, X.; JIANG, L.; LI, Y. y WANG, S. 2011. The study on extracting protein from hazelnut kernel by aqueous enzymatic extraction method. Procedia Engineering 15: 4661 – 4672.

127. TAN, E.; NGOH, Y. y GAN, CH. 2014. A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimisation. *Food Chemistry* 152: 447 – 455.
128. TAN, S.; MAILER, R.; BLANCHARD, C. y AGBOOLA, S. 2011. Extraction and characterization of protein fractions from Australian canola meals. *Food Research International* 44: 1075 – 1082.
129. TÉLLEZ, A. 2008. Colecta, identificación, determinación taxonómica y análisis de la concentración de ácidos grasos de ecotipos del sacha inchi en la región Amazonas. Lima, Perú. *Perúbiodiverso*. 28 p.
130. URRUTIA, W. 2010. Determinación de parámetros óptimos de extracción alcalina para la obtención de aislado proteico a partir de tarwi (*Lupinus mutabilis*). Tesis para optar el título profesional de ingeniero agroindustrial. Apurímac, Perú. Universidad Nacional Micaela Bastidas. 135 p.
131. VAN DER VEN, C.; GRUPPEN, H.; DE BONT, D. y VORAGEN, A. 2002. Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and -stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(10): 2938 – 2946.
132. VATANARA, A.; ROUHOLAMINI, A.; GILANI, K.; ASGHARIAN, R.; DARABI, M. y RAFIEE-TEHRANI, M. 2007. A Plackett-Burman design for *screening* of the operation variables in the formation of salbutamol sulphate particles by supercritical antisolvent. *The Journal of Supercritical Fluids* 40(1): 111 – 116.
133. VENTURA, M.; ELÍAS, C.; y SALVÁ, B. 2005. Obtención de aislado proteico a partir de nuez de marañón. Lima, Perú. Departamento de Tecnología de Alimentos y Productos Agropecuarios, UNALM.
134. VERGARA, M.; LERMA, M.; HERRERO, J. y SIMÓ, E. 2015. Use of an enzyme-assisted method to improve protein extraction from olive leaves. *Food Chemistry* 169: 28 – 33.
135. VILLARROEL, M.; ZAPATA, C.; PINO, L. y RUBILAR, M. 2012. Establecimiento de condiciones óptimas para obtener un aislado proteico de avellana chilena (*Gevuina avellana* Mol). *Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición* 62(1): 79 – 86.

136. WANG, S.; JIANG, L.; LI, Y.; LI, D. y SUI, X. 2011. Optimization on aqueous enzymatic extraction conditions of pine seed protein by response surface method. *Procedia Engineering* 15: 4956 – 4966.
137. WANI, A.; KAUR, D.; AHMED, I. y SOGI, D. 2008. Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology. *LWT – Food Science and Technology* 41(8): 1514 – 1520.
138. WANI, I.; SOGI, D. y GILL, B. 2015. Physico-chemical and functional properties of native and hydrolysed protein isolates from Indian black gram (*Phaseolus mungo* L.) cultivars. *LWT - Food Science and Technology* 60: 848 – 854.
139. YIN, S.; TANG, C.; CAO, J.; HU, E.; WEN, Q. y YANG, X. 2008. Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Food Chemistry* 106 (3): 1004 – 1013.
140. ZHANG, Z.; SONG, Y. y LIU, X. 2013. Optimization of protein extraction from prickly ash seed by response surface methodology. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences* 27: 988 – 995.
141. ZHENG, L.; ZHAO, Y.; XIAO, CH.; SUN, D.; ZHAO, M. y SU, G. 2015. Mechanism of the discrepancy in the enzymatic hydrolysis efficiency between defatted peanut flour and peanut protein isolate by Flavorzyme. *Food Chemistry* 168: 100 – 106.
142. ZIVANOVIC, I.; VASTAG, Z.; POPOVIC, S.; POPOVIC, L. y PERICIN, D. 2010. Hydrolysis of hullless pumpkin oil cake protein isolate by pepsin. *International Journal of Biological and Life Sciences* 6(1): 30 – 34.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: Curva estándar de albúmina de suero de bovino



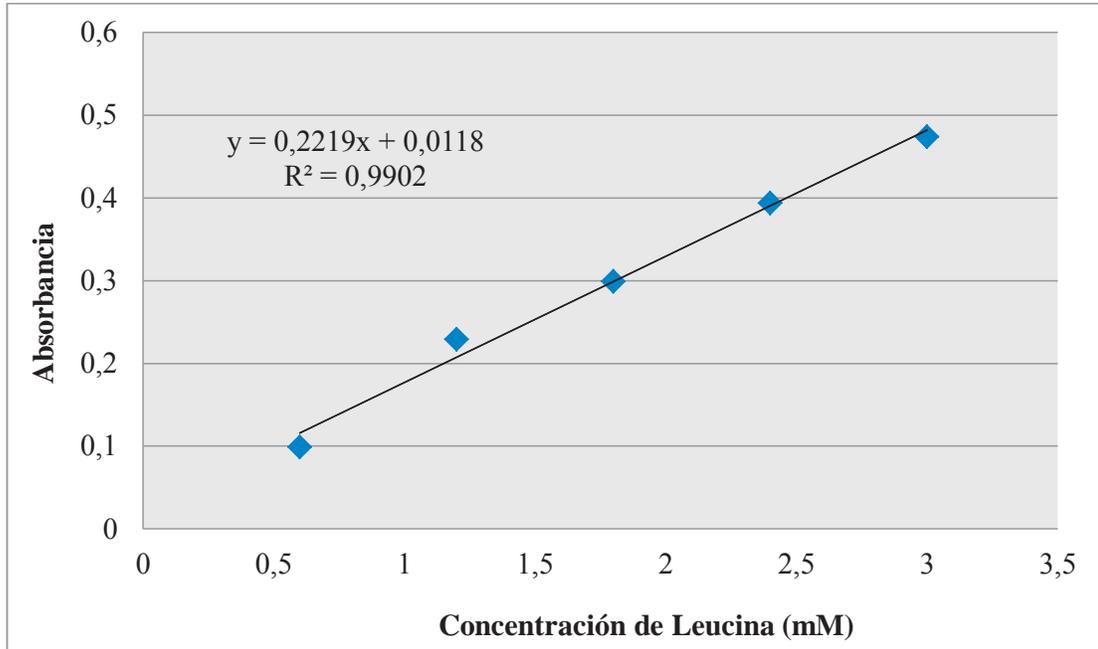
FUENTE: Elaboración propia.

$$y = 1,7068x + 0,0397$$

x: Concentración de BSA (mg/ml).

y: Absorbancia.

## ANEXO 2: Curva estándar de leucina



**FUENTE: Elaboración propia.**

$$y = 0,2219x + 0,0118$$

x: Concentración de Leucina (mM).

y: Absorbancia.

### ANEXO 3: Análisis de varianza para el grado de hidrólisis (modelo cuadrático)

Fuente	Suma de Cuadrados	Grado de libertad	Cuadrado Medio	Valor F <sub>c</sub>	Valor-P	Sig.
Modelo	33,2719	5	6,654	8,58	0,007	**
Lineal	32,7155	2	16,358	21,08	0,001	**
Cuadrático	0,038	2	0,019	0,02	0,976	n.s.
Interacción	0,5184	1	0,518	0,67	0,441	n.s.
Error residual	5,4307	7	0,776			
Falta de ajuste	4,6958	3	1,565	8,52	0,033	*
Error puro	0,7349	4	0,184			
Total	38,7026	12				
R <sup>2</sup>	0,8597					
R <sup>2</sup> <sub>ajustado</sub>	0,7595					

\* Significancia a un nivel de  $\alpha=0,05$ .

\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0,01$ ; n.s.= No significativo.

De acuerdo al Cuadro, el modelo cuadrático indica que fue altamente significativo ( $p < 0,01$ ). Sin embargo, presentó una falta de ajuste significativo ( $p < 0,05$ ), indicando que los resultados no se ajustan adecuadamente al modelo para predecir el grado de hidrólisis (Tan *et al.*, 2014). Además, al evaluar el coeficiente de determinación, se pudo establecer que existe un bajo grado de correlación entre los valores experimentales y estimados, debido a que el R<sup>2</sup> fue 0,8597 y el R<sup>2</sup><sub>ajustado</sub> de 0,7595.

Por lo tanto, de acuerdo al análisis estadístico se podría decir que este modelo (segundo orden) no se ajustaría adecuadamente para el grado de hidrólisis, y posiblemente se ajustaría mejor un modelo lineal de primer orden.