

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**



**“OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE  
CAÑIHUA (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) UTILIZANDO LA  
METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA”**

**Presentado por:**

**LIZBETH MERA OYOLA**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Lima - Perú

2018

---

La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente tesis (Art. 24.  
Reglamento de Propiedad Intelectual de la UNALM)

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**“OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE CAÑIHUA  
(*Chenopodium pallidicaule* Aellen) UTILIZANDO LA METODOLOGÍA DE  
SUPERFICIE DE RESPUESTA”**

Presentado por:

LIZBETH MERA OYOLA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado:

---

Dra. Rosana Chirinos Gallardo

PRESIDENTE

---

Dra. Patricia Glorio Paulet

MIEMBRO

---

Dra. Ritva Repo-Carrasco Valencia

MIEMBRO

---

Dra. Indira Betalleluz Pallardel

ASESORA

---

Mg.Sc. Marianela Inga Guevara

CO-ASESORA

Lima-Perú

2018

## **DEDICATORIA**

La presente tesis está dedicada a mi madre Zenaida, mi modelo a seguir, por su esfuerzo y paciencia durante mi desarrollo académico, pero sobre todo por su apoyo incondicional, todo lo que soy ahora es gracias a ella.

## AGRADECIMIENTO

A mi jurado de tesis y en especial a mi asesora, Dra. Indira Betalleluz, por su constante apoyo y paciencia durante la realización de la investigación. También al personal del Instituto de Biotecnología (IBT) y a mis compañeros de laboratorio, que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme.

Les agradezco especialmente a mis grandes amigos, Ingrid y Rafael quienes estuvieron presentes durante todo el proceso de la realización de la tesis, hasta la sustentación y me apoyaron y motivaron en todo momento.

La presente tesis ha sido financiada por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (INNÓVATE PERÚ), de acuerdo al convenio 354-PNICPPIAP-2014 en el marco del proyecto: "Estudio de la Biotransformación Enzimática de la Proteína de Cañihua (*Chenopodium pallidicaule*) para la Obtención de Péptidos Bioactivos, con Actividades Antihipertensiva, Antioxidante y Antihipercolesterolemica"

# ÍNDICE GENERAL

## RESUMEN

### ABSTRACT

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1.	CAÑIHUA.....	3
2.1.1.	GENERALIDADES DE LA CAÑIHUA.....	3
2.1.2.	COMPOSICIÓN QUÍMICA Y NUTRICIONAL DE LA CAÑIHUA.....	5
2.1.3.	USOS DE LA CAÑIHUA.....	10
2.2.	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS .....	11
2.2.1.	FUNDAMENTO .....	11
2.3.	FACTORES QUE INFLUYEN EN EL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS .....	12
2.4.	CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SEGÚN SU SOLUBILIDAD.....	17
2.5.	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS BASADOS EN DIFERENCIA DE SOLUBILIDAD .....	19
2.5.3.	FRACCIONAMIENTO CON DISOLVENTES.....	21
2.6.	METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA (MSR).....	21
2.6.1.	ELEMENTOS DE LA MSR .....	22
2.6.2.	MODELOS.....	23
2.6.3.	ETAPAS DE OPTIMIZACIÓN.....	23
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	27
3.2.	MATERIA PRIMA .....	27
3.3.	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS .....	27
3.3.1.	MATERIALES.....	27
3.3.2.	EQUIPOS .....	28
3.3.3.	REACTIVOS.....	28
3.4.	MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	29
3.5.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	31

3.5.1.	EXTRACCIÓN ALCALINA.....	31
3.6.	DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
3.6.1.	SCREENING: DISEÑO EXPERIMENTAL DE PRIMER ORDEN .....	34
3.6.2.	ESCALAMIENTO.....	35
3.6.3.	OPTIMIZACIÓN: DISEÑO EXPERIMENTAL DE SEGUNDO ORDEN .....	36
3.6.4.	FUNCIÓN DE DESEABILIDAD.....	40
3.6.5.	VALIDACIÓN DEL MODELO .....	40
3.7.	ANÁLISIS DE DATOS.....	40
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>41</b>
4.1.	SCREENING.....	43
4.2.	ESCALAMIENTO.....	59
4.3.	OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO.....	59
4.3.2.	OPTIMIZACIÓN .....	63
4.4.	VALIDACIÓN DEL MODELO .....	67
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIA BIBLIOGRAFICA .....</b>	<b>71</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>83</b>

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1:	Rangos de composición proximal de diferentes granos andinos (g/100 g materia seca).....	6
Cuadro 2:	Contenido de aminoácidos en los granos andinos (mg de aminoácido/16 g de nitrógeno).....	7
Cuadro 3:	Fracciones proteicas de quinua y cañihua (% proteína total).....	7
Cuadro 4:	Contenido de azúcares en los granos andinos (g/100 g materia seca).....	8
Cuadro 5:	Contenido de fibra dietética total (FDT), fibra dietética insoluble (FDI) y fibra dietética soluble (FDS) en la Cañihua (g/100 g base seca).....	9
Cuadro 6:	Diseño factorial ( $2^5$ ) empleado en la etapa del screening.....	35
Cuadro 7:	Variables Independientes y sus niveles evaluados en el screening.....	38
Cuadro 8:	Variables Independientes y sus niveles evaluados en la optimización.....	38
Cuadro 9:	Arreglo del Diseño central compuesto generado de la etapa de la optimización de la extracción de la proteína de la cañihua.....	39

Cuadro 10:	Análisis proximal de la harina de cañihua empleada comparada con otros pseudo-cereales andinos de referencias.....	42
Cuadro 11:	Arreglo Factorial ( $2^5$ ) con repeticiones en el centro, variables codificadas, respuesta experimental (observado) y estimada en la etapa de screening.....	45
Cuadro 12:	Resultados de análisis de varianza del diseño factorial $2^5$ utilizado en la etapa de screening.....	46
Cuadro 13:	Efecto de la concentración de NaCl y pH sobre el rendimiento de extracción de proteínas de la cañihua.....	55
Cuadro 14:	Resultados experimentales del diseño central compuesto de la etapa de la optimización referida al rendimiento de extracción de la proteína de la cañihua .....	60
Cuadro 15:	Resultado del análisis de varianza para el modelo cuadrático de la metodología de superficie de respuesta correspondiente al rendimiento en proteína. ....	62
Cuadro 16:	Valor predicho y experimental del rendimiento de extracción de proteína de cañihua bajo las condiciones óptimas recomendadas por el modelo.....	67
Cuadro 17:	Resultados de rendimiento en la extracción de proteínas de la cañihua evaluado a diferentes pHs. ....	68



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Producción Nacional de Cañihua, 2000-17 (Miles de toneladas)....	4
Figura 2:	Perú: Superficie Cosechada y Rendimiento de Cañihua, 2000-17...	5
Figura 3:	Curva de solubilidad de proteínas en agua en función del pH del medio.....	14
Figura 4:	Efectos principales para el rendimiento de proteína en el proceso de extracción.....	16
Figura 5:	Modelos de 1° y 2° orden en la MSR.....	23
Figura 6:	Secuencia de pasos a seguir para la aplicación de la metodología de superficie de respuesta.....	24
Figura 7:	Flujo de operaciones para la extracción alcalina de la proteína de la cañihua.....	32
Figura 8:	Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados según el modelo factorial ( $2^5$ ).....	47
Figura 9:	Diagrama de los efectos principales para el rendimiento de extracción de la proteína de la cañihua.....	63
Figura 10:	Gráficos de las superficies de respuesta para los efectos de: (a) pH vs temperatura, (b) pH vs tiempo, (c) pH vs relación MP/S, (d) tiempo vs temperatura, (e) tiempo vs relación (MP/S) y (f) temperatura vs relación MP/S sobre el rendimiento de extracción.....	65

## INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1:	CURVA ESTÁNDAR DE ALBUMINA DE SUERO BOVINO.....	83
ANEXO 2:	CÁLCULO DE RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS EN LA ETAPA DE SCREENING.....	84
ANEXO 3:	CÁLCULO DE RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS EN LA ETAPA DE SCREENING – REPETICIÓN 1.....	86
ANEXO 4:	CÁLCULO DE RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS EN LA ETAPA DE SCREENING – REPETICIÓN 2.....	89
ANEXO 5:	CÁLCULO DE RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS EN LA ETAPA DE OPTIMIZACIÓN.....	92
ANEXO 6:	CÁLCULO DE RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS EN LA ETAPA DE OPTIMIZACIÓN – REPETICIÓN 1.....	94
ANEXO 7:	CÁLCULO DE RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS EN LA ETAPA DE OPTIMIZACIÓN – REPETICIÓN 2.....	96

## RESUMEN

La cañihua (*Chenopodium pallidicaule*) es un grano andino considerado un cereal con alto valor nutricional, que destaca por su alto contenido de proteínas y calidad excepcional de perfil de aminoácidos. Lamentablemente, la atención es insuficiente hacia la producción, estudio de sus propiedades nutricionales y funcionales que propicien una industrialización con mayor valor agregado, tal como los aislados proteicos. Por lo cual la siguiente investigación tuvo como objetivo identificar cuáles eran las condiciones óptimas para una alta recuperación de proteínas durante la extracción de proteínas, utilizando la metodología superficie de respuesta. Los parámetros de extracción de la proteína de la harina de cañihua desgrasada fueron optimizados empleando la metodología de superficie de respuesta (MSR). Se realizó en primera instancia un screening bajo un diseño Factorial de  $2^n$  ( $n=5$ ), el que fue aplicado para evaluar los efectos potenciales de diferentes factores sobre la extracción de la proteína (Y (%), g de proteína soluble/g de proteína total) siendo estos factores: pH, concentración de NaCl, tiempo, temperatura y relación harina/solvente (MP/S). Cuatro factores: pH, tiempo, temperatura, y relación harina/solvente (MP/S), fueron seleccionados en esta etapa. Para la optimización se aplicó un diseño central compuesto por el que se generó un modelo de segundo orden, lográndose un buen ajuste entre los valores experimentales y estimados ( $R^2 = 0.8010$ ). Bajo este modelo se determinó las condiciones para una máxima extracción de la proteína a partir de harina (tamaño de partícula  $\leq 500 \mu\text{m}$ ) que fueron: temperatura  $21.0 \text{ }^\circ\text{C}$ , relación MP/S de 1/37, pH de 11 y tiempo 5 minutos, bajo agitación constante (200 rpm), resultando en un rendimiento en proteína de  $85.1 \pm 3.56$  por ciento valor que estuvo muy cercano al predicho 88.3 por ciento. Estos resultados ayudan en el diseño del proceso óptimo de extracción de proteínas de la cañihua.

Palabras clave: cañihua, proteína, optimización, extracción, MSR.

## ABSTRACT

The cañihua (*Chenopodium pallidicaule*) is an Andean grain considered a cereal with high nutritional value, which stands out for its high protein content and exceptional quality of amino acid profile. Unfortunately, the attention is insufficient towards the production, study of its nutritional and functional properties that favor an industrialization with higher added value, such as protein isolates. Therefore, the following research aimed to identify what were the optimal conditions for high protein recovery during protein extraction, using the surface response methodology. The protein extraction parameters of the defatted cañihua flour were optimized using the response surface methodology (MSR). A screening was carried out in the first instance under a 2n Factorial design (n = 5), which was applied to evaluate the potential effects of different factors on the extraction of the protein (Y (%), g of soluble protein / g of total protein), these factors being: pH, NaCl concentration, time, temperature and flour / solvent ratio (MP / S). Four factors: pH, time, temperature, and flour / solvent ratio (MP / S), were selected in this stage. For the optimization, a central design was applied, which was generated by a second order model, achieving a good fit between the experimental and estimated values ( $R^2 = 0.8010$ ). Under this model conditions were determined for a maximum extraction of the protein from flour (particle size  $\leq 500 \mu\text{m}$ ) which were: temperature 21.0 °C, MP / S ratio of 1/37, pH of 11 and time 5 minutes, under constant agitation (200 rpm), resulting in a protein yield of  $85.1 \pm 3.56$  percent, which was very close to the predicted 88.3 percent. These results help in the design of the optimal process of extraction of proteins from the cañihua.

Keywords: cañihua, protein, optimización, extracción, MSR.

## I. INTRODUCCIÓN

Las proteínas son un grupo importante de bio-macromoléculas que están implicadas en funciones fisiológicas necesarias para el metabolismo humano como fuente de energía, nitrógeno y aminoácidos esenciales para el desarrollo y el mantenimiento de las células y los tejidos de nuestro organismo. Desde el punto de vista tecnológico, su presencia confiere propiedades fisicoquímicas, funcionales y organolépticas a los alimentos (Scopes 1986).

Los aislados y concentrados de proteínas obtenidos de fuentes vegetales representan un mercado en crecimiento, principalmente debido a su seguridad, alta biocompatibilidad, valor nutritivo, preferencias de los consumidores y su coste relativamente bajo por los pocos recursos involucrados en comparación con las proteínas de origen animal (Stone *et al.* 2015, Foste *et al.* 2015). Por otro lado, debido a las grandes cantidades de grasa saturada y colesterol presentes por lo general en fuentes de proteína animal, la mayoría de las organizaciones de salud recomiendan el consumo frecuente de proteínas vegetales, por su relación con la reducción de los niveles de colesterol sérico y el riesgo de enfermedades del corazón y la diabetes (Martínez-Villaluenga 2007). Esta preferencia responde también al aumento de la incidencia de alergias e intolerancias relacionadas con las proteínas del huevo y la leche (Foste *et al.* 2015). Por lo tanto, en la actualidad esfuerzos intensos de investigación están dirigidos hacia la identificación y evaluación de fuentes promisorias poco explotadas, pero de gran potencial como cultivos alternativos de proteínas para el futuro.

Las proteínas vegetales aisladas podrían tener un alto valor como ingredientes funcionales, sin embargo, en la actualidad sólo la de soja es la más utilizada; Pszczola (2004), señala que la industria alimentaria se encuentra en la búsqueda de proteínas alternativas que puedan competir con las que actualmente dominan el mercado. Los cultivos andinos ofrecen interesantes alternativas para ser explorados en este campo y específicamente los pseudocereales como la quinua, cañihua y kiwicha cuyo valor nutricional está relacionado a sus

proteínas y cuya importancia está basada en la calidad de las mismas, con una balanceada composición de amino ácidos esenciales similares a la composición de la proteína de la leche: la caseína (Repo-Carrasco *et al.* 2003). La quinua y la cañihua son pseudocereales que pertenecen a la familia de las quenopodiáceas. Estos cultivos aparte del alto contenido de proteínas son importantes por su contenido excepcional de aminoácidos comparado con otros cereales lo que los colocan como cultivos muy atractivos (Gross *et al.* 1989 y Ayala 2007).

El MINAGRI (2018) indica que la cañihua al igual que la quinua, son cereales que tiene gran poder nutritivo, porque poseen el doble de proteínas que tienen los alimentos comunes como el trigo, arroz o la avena. Asimismo, su potencial como substitutos de cereales con gluten es un aspecto a favor para incentivar su consumo en personas celiacas y empiezan a ser atrayente para la industria y a captar la atención científica. (Gallagher *et al.* 2004 y Ramos Díaz *et al.* 2013). Por lo que estudios más profundos son necesarios para proporcionar la base científica que incentive su aceptación por parte de la industria.

En la actualidad son muy pocas las investigaciones relacionados con la obtención de aislados proteicos en estas fuentes, los estudios están más avanzados en los casos de la quinua y kiwicha, no obstante, la cañihua puede presentar algunas ventajas comparativas sobre estos cultivos. Una efectiva extracción es esencial para una producción comercial, por lo que las condiciones de extracción deben ser optimizadas para una alta recuperación. Varios parámetros tales como: pH, temperatura, fuerza iónica, tipo de disolvente, tiempo de extracción, la relación de solvente /materia prima, afectan la extracción de proteínas (Wani *et al.* 2006). Cuando muchos factores y sus interacciones afectan a una respuesta deseada, la metodología de superficie de respuesta es una herramienta eficaz para la optimización del proceso (Rustom *et al.* 1991). Su empleo proporciona información relevante en el menor tiempo posible con el menor número de experimentos. Además de analizar los efectos de las variables independientes, esta metodología experimental genera un modelo matemático que describe los procesos químicos o bioquímicos (Bas y Boyaci 2007 y Pericin *et al.* 2008).

La presente investigación estudia el proceso de extracción de proteínas de cañihua; utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR), planteándose como objetivos: (1) Determinar el efecto de las variables: concentración de NaCl, relación materia prima/solvente, pH, temperatura y tiempo en el proceso de extracción y (2) Optimizar el proceso de extracción de proteínas de la cañihua, que garantice la máxima recuperación.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. CAÑIHUA**

#### **2.1.1. GENERALIDADES DE LA CAÑIHUA**

La cañihua es una de las especies agrícolas menos estudiadas y una de las más nutritivas dentro de los cereales. En varias oportunidades se la ha confundido con la quinua (Vargas 1938). Repo-Carrasco *et al.* (2009) mencionan que la cañihua es una planta resistente, que florece en tierras pobres y rocosas soportando climas fríos y secos como los que existen en el altiplano. La cañihua puede germinar a 5 °C, florecer a 10 °C y desarrollar semillas a 15 °C. Estas condiciones usualmente destruyen otros sembríos como los de cebada y quinua (NRC 1989).

#### **a. CULTIVO DE CAÑIHUA**

El cultivo de la cañihua no ha tenido mayor difusión fuera de las fronteras del altiplano de Perú y Bolivia y de las serranías de Cochabamba en Bolivia, y de Cusco, Ayacucho, Huancavelica y Junín en Perú (FAO 2000). Además, cabe indicar que según la NRC (1989) la cañihua crece intensivamente y en una larga escala en el norte del Lago Titicaca.

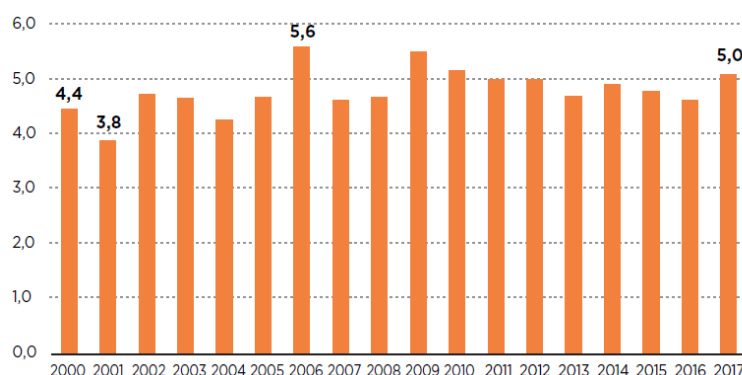
En el Perú, la mayor concentración de producción de cañihua se encuentra en el Altiplano de la Región Puno, principalmente en las provincias de Melgar (Distritos: Llalli, Macarí, Ayaviri, Ñuñoa), Azángaro, Huancané, San Román, Puno (Distrito: Acora) y Chuchito (Distritos: Pomata y Kelluyo). También se produce en zonas altas de Arequipa y Cuzco, pero a menor escala (Apaza 2010).

El Altiplano de la Región Puno se ubica a altitudes mayores a los 3800 msnm., (propicias para el cultivo de cañihua que crece en altitudes de 3812 a 4100 msnm.), las zonas más bajas del altiplano se encuentran alrededor del lago Titicaca. La temperatura media máxima varía

entre 13 y 19 °C y la temperatura media mínima entre -10 y 5 °C dependiendo del lugar y la época del año; la temperatura media anual varía de 6 a 9 °C dependiendo en la altitud y proximidad al lago Titicaca. En estas áreas la cañihua ha tenido éxito por sus características agronómicas de notable resistencia a bajas temperaturas (Apaza 2010). Por otro lado, en Bolivia se cultiva en el departamento de La Paz (provincias Omasuyos, Los Andes, Pacajes, Ingavi, Murillo, Aroma, Camacho y Manco Cápac); Oruro (provincias San Pedro de Totora, Samaja, Carangas, Nor Carangas, Litoral, Pantaleón Dalence y Saucari); Cochabamba (Provincia Bolívar) y Potosí (Antonio Quijarro) (FAO 2000 y Apaza 2010).

## b. PRODUCCIÓN NACIONAL DE CAÑIHUA

La Cañihua es uno de los cuatro granos andinos importantes que se produce en el Perú. De modo que en el 2000 se produjo 4.4 miles de toneladas hasta que en el 2006 se elevó la producción hasta 5.6 miles de toneladas (mayor producción de los últimos 18 años). Entre el 2000 y 2017, el volumen producido mantuvo un crecimiento sostenido, de modo que el promedio anual fue de 4.7 miles de toneladas durante ese periodo. Al cierre del 2017, el volumen producido sumó 5 mil t, mostrando un crecimiento del 10 por ciento respecto a lo que se produjo en el 2016 (4.6 mil t), tal como se puede ver en la Figura 1. Las principales zonas productoras, en este periodo fueron Cusco, Puno y Arequipa (MINAGRI, 2018).

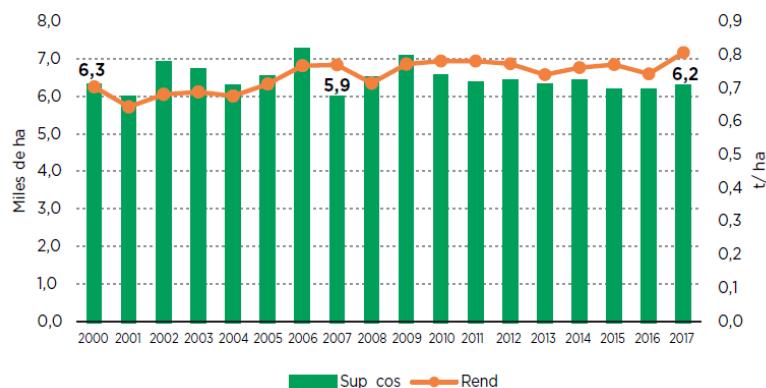


**Figura 1: Perú: Producción Nacional de Cañihua, 2000-17 (Miles de toneladas).**

**FUENTE:** Tomado de MINAGRI 2018.



En la Figura 2, se muestra la relación de la superficie cosechada y el rendimiento. En relación a la superficie cosechada, en el 2000 se alcanzó 6,3 miles de ha hasta que en el 2007 retrocedió a 5,9 miles de ha. Sin embargo, en el 2017, cerró en 6,2 miles de ha, superficie superior en 0,09 miles de ha respecto al 2016. Mientras que, el rendimiento en el 2000 fue de 0,7t/ha, manteniéndose entre 0,6t/ha y 0,8t/ha en los últimos 18 años (MINAGRI, 2018).



**Figura 2: Perú: Superficie Cosechada y Rendimiento de Cañihua, 2000-17.**

**FUENTE:** Tomado de MINAGRI 2018.

### 2.1.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y NUTRICIONAL DE LA CAÑIHUA

Apaza (2010) menciona que la cañihua se caracteriza por contener proteínas de alto valor biológico, mayor que el de la quinua, además de su contenido importante de fibra. Es un alimento considerado nutraceutico o alimento funcional, con un elevado contenido de proteínas con una proporción importante de aminoácidos esenciales, entre los que destaca la lisina, aminoácido escaso en los alimentos de origen vegetal. También concentra grandes proporciones de calcio, magnesio, sodio, fósforo, hierro, zinc, vitamina E, complejo vitamínico B; por lo que los nutricionistas la comparan con la leche. El grano también tiene alto nivel de fibra dietética, y grasas no saturadas. Considerándose a esta especie como uno de los componentes estratégicos de la seguridad alimentaria, del cual se podrían elaborar productos innovadores en la industria alimentaria.

Repo-Carrasco y Encina (2008) reportan que la cañihua (*Chenopodium pallidicaule*) presenta un elevado contenido de proteínas (15-19%) y, al igual que la quinua y kiwicha, tiene una proporción importante de aminoácidos azufrados; posee un balance de aminoácidos de primera línea, siendo particularmente rica en lisina (5-6%), isoleucina y

triptófano. Respecto a esto, White *et al.* (1995), Debruin (1964) y Gross *et al.* (1989) señalan que el valor nutricional de las proteínas de cañihua es equivalente al de la leche (caseína). En el Cuadro 1 se observa rangos de composición proximal de diferentes granos andinos reportados por Ligarda *et al.* (2012).

**Cuadro 1: Rangos de composición proximal de diferentes granos andinos (g/100 gramos materia seca)**

GRANO ANDINO	PROTEÍNA (%)	LÍPIDOS (%)	CENIZAS (%)
Quinoa	11.7-12.2	5.6-6.7	2.2-2.6
Kiwicha	13.2-15.2	6.1-8.0	2.2-2.3
Cañihua	15.6-17.0	6.8-8.2	3.6-4.0

**FUENTE:** Tomado de Ligarda *et al.* 2012.

#### a. PROTEÍNAS

La cañihua es un grano que tiene un alto valor nutricional por su elevado contenido de proteínas que varía entre 14 y 19 por ciento; además tiene una proporción importante de aminoácidos azufrados, metionina y cisteína (Repo-Carrasco *et al.*, 2009) tal como se puede apreciar en el Cuadro 2. La ventaja preponderante con respecto a la quinua es la ausencia de saponina, facilitando su utilización en la dieta alimentaria (Huamán, 2011). Las proteínas de la cañihua son principalmente del tipo albumina y globulina, estas tienen una composición balanceada de aminoácidos esenciales parecida a la composición de aminoácidos de la caseína, proteína de la leche (Apaza 2010). Otros estudios reportan que la cañihua presenta entre 15–18 por ciento de proteína (Gross *et al.* 1989 y Repo-Carrasco *et al.*, 2003). Ligarda *et al.* (2012) reporta valores de 15.6–17 por ciento de proteínas.

En el Cuadro 3 se muestra la conformación de las fracciones proteicas de la cañihua y de la quinua, la composición es muy similar debido a que las dos pertenecen a la misma familia de los *Chenopodium*.

**Cuadro 2: Contenido de aminoácidos en los granos andinos (mg de aminoácido/16 g de nitrógeno)**

AMINOÁCIDOS	QUINUA	KAÑIWA	KIWICHA	ARROZ	TRIGO
Acido aspártico	7.8	7.9	7.4	8	4.7
Treonina	3.4	3.3	3.3	3.2	2.9
Serina	3.9	3.9	5	4.5	4.6
Acido glutámico	13.2	13.6	15.6	16.9	31.3
Prolina	3.4	3.2	3.4	4	10.4
Glicina	5	5.2	7.4	4.1	6.1
Alanina	4.1	4.1	3.6	5.2	3.5
Valina	4.2	4.2	3.8	5.1	4.6
Isoleucina	3.4	3.4	3.2	3.5	4.3
Leucina	6.1	6.1	5.4	7.5	6.1
Tirosina	2.5	2.3	2.7	2.6	3.7
Fenilalanina	3.7	3.7	3.7	4.8	4.9
Lisina	5.6	5.3	6	3.2	2.8
Histidina	2.7	2.7	2.4	2.2	2
Arginina	8.1	8.3	8.2	6.3	4.8
Metionina	3.1	3	3.8	3.6	1.3
Cistina	1.7	1.6	2.3	2.5	2.2
Triptófano	1.1	0.9	1.1	1.1	1.2
<b>% de N del grano</b>	2.05	2.51	2.15	1.52	2.24
<b>% de proteína</b>	12.8	15.7	13.4	9.5	14

FUENTE: Tomado de Apaza 2010

**Cuadro 3: Fracciones proteicas de quinua y cañihua (% proteína total)**

GRANOS ANDINOS	ALBUMINA + GLOBULINAS	PROLAMINAS	GLUTELINAS + PROTEÍNAS INSOLUBLES
Cañihua	41	28	31
Quinua	45	23	32

FUENTE: Tomado de Scarpati, citado por Repo-Carrasco *et al.* 2003

## b. CARBOHIDRATOS

El almidón es el carbohidrato más importante en todos los granos, aproximadamente en la cañihua, el contenido de almidón es de 63-66 por ciento (Repo-Carrasco *et al.* 2003). El almidón de la cañihua no ha sido estudiado tan ampliamente como el de los otros cereales. Además, en adición a los polisacáridos, los granos de quinua y cañihua también poseen azúcares libres en pequeñas cantidades. Los cultivos andinos tienen un contenido más alto en azúcares que los granos comunes. En el Cuadro 4 se observa el contenido de azúcares en los granos de cañihua, quinua y Kiwicha. La cañihua posee un mayor contenido de glucosa, fructosa y maltosa, comparado con el grano de quinua y Kiwicha.

**Cuadro 4: Contenido de azúcares en los granos andinos (g/100 g materia seca)**

	<b>GLUCOSA</b>	<b>FRUCTOSA</b>	<b>SACAROSA</b>	<b>MALTOSA</b>
Quinua	1.70	0.20	2.90	1.40
Cañihua	1.80	0.40	2.60	1.70
Kiwicha	0.75	0.20	1.30	1.30

**FUENTE:** Tomado de Repo-Carrasco *et al.* 2003.

## c. LÍPIDOS

La cañihua es relativamente rica en lípidos. El aceite de este cereal tiene alto contenido en ácidos grasos insaturados, así como también de tocoferoles. Incluso, el contenido de tocoferoles en aceite de cañihua es mayor que en el de aceite de maíz (Repo-Carrasco *et al.* 2003). Se ha encontrado que el porcentaje más alto de ácidos grasos presentes en los aceites de cañihua y quinua es el Omega 6 (ácido linoléico), siendo 50.2 por ciento para la quinua y 42.6 por ciento para la cañihua. El omega 9 (ácido oleico) es el segundo ácido graso encontrado en mayor proporción, en cantidades de 26.0 por ciento para aceite de quinua y 23.5 por ciento para el de cañihua. El Omega 3 (ácido linoléico) también se encuentra presente en los aceites de estos cereales, siendo 4.8 por ciento para el de quinua y 6 por ciento para el de cañihua (Repo-Carrasco *et al.* 2003).

La FAO (2000) plantea que el alto contenido de aceite en estos cereales podría favorecer el establecimiento de industrias de extracción de aceites vegetales para consumo humano.

#### **d. MINERALES**

La cañihua es rica en micronutrientes tales como hierro y calcio (Repo-Carrasco *et al.* 2009). Apaza (2010) confirma el alto contenido en calcio, fósforo y hierro, reportando un valor de 110, 375 y 15 mg/100 g de materia seca; respectivamente. La FAO (2000) reporta una composición de 10-15 mg/100 g de hierro, 87-141 g/100g de calcio y 335-496 mg/100 g de fósforo presentes en la cañihua, dependiendo de la variedad.

#### **e. FIBRA**

Repo-Carrasco *et al.* (2009) reportaron que la cañihua posee un alto contenido de fibra dietética, especialmente la fracción insoluble. Actualmente se presta más atención no sólo al contenido de fibra cruda, sino también a las fibras solubles o dietéticas totales, por sus efectos benéficos para la digestión, en especial por su capacidad de absorción de agua, captación de cationes, absorción de compuestos orgánicos y formación de geles (FAO 2000).

Repo-Carrasco *et al.* (2003) efectuó el análisis de fibra dietética en los tres granos andinos, mediante el método combinado enzimático-gravimétrico. El alto contenido de fibra insoluble generalmente observado en la cañihua se debe probablemente a la presencia de perigonios (capa de celulosa adherida al grano) que envuelven el grano y que no han sido eliminados por completo (FAO 2000). En el Cuadro 5, Repo-Carrasco (2003) reporta valores de 16.41, 12.92, 3.49 g/100 g base seca para fibra dietética total, fibra dietética insoluble y fibra dietética soluble respectivamente.

**Cuadro 5: Contenido de fibra dietética total (FDT), fibra dietética insoluble (FDI) y fibra dietética soluble (FDS) en la cañihua (g/100 g base seca)**

<b>FIBRA DIETARIO</b>	<b>CONTENIDO (% B.S)<sup>1</sup></b>	<b>CONTENIDO (% B.S)<sup>2</sup></b>
Fibra insoluble	12.92	15.6 – 18.7
Fibra soluble	3.49	2.3 – 4.1.
FDT	16.41	18.7 -21.9

**FUENTE:** Elaborado en base a <sup>1</sup>Repo-Carrasco 2003, <sup>2</sup>Ligarda *et al.* 2012.

## **f. COMPONENTES ANTINUTRICIONALES**

El término anti nutriente se utiliza para calificar a aquellos compuestos que afectan el valor nutricional de algunos alimentos, especialmente semillas, pues dificultan o inhiben la asimilación de nutrientes que provienen de alimentos generalmente de origen vegetal (proteínas y minerales); desde el punto de vista bioquímico estos factores son de naturaleza variada y pueden llegar a ser tóxicos o causar efectos fisiológicos poco deseables como la flatulencia; distensión estomacal, afectaciones pancreáticas, aglutinación de glóbulos rojos, disminución en la asimilación de nutrientes, entre otros; los factores antinutricionales son sustancias naturales no fibrosas, generadas por el metabolismo secundario de las plantas como mecanismo de defensa a situaciones estresantes o contra el ataque de mohos, bacterias, insectos y aves (Elizalde *et al.* 2009).

La saponina es considerada un compuesto anti nutricional, esta posee una estructura compleja formada por un núcleo esteroidal hidrofóbico y una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos, son glucósidos que determinan en gran parte el sabor amargo de algunas semillas como la soya cruda y la quinua sin desaponificar; las saponinas presentan poca actividad antinutricionales (Elizalde *et al.* 2009). En contraste con la quinua que contiene un sabor ácido causado por las saponinas, la cañihua puede usarse directamente sin tratamiento previo. Respecto a las saponinas, es importante señalar que Rastrelli *et al.* (1996) encontraron siete triterpenos (saponinas) en las semillas de cañihua; no obstante, este contenido es bajo por lo que no produce un sabor amargo, como el de la quinua (Repo-Carrasco *et al.* 2003).

### **2.1.3. USOS DE LA CAÑIHUA**

La cañihua es mayormente cultivada por familias para su propio consumo. Se prepara normalmente en forma de harina, en Bolivia y Perú (FAO 2000). El grano se tuesta con mucho cuidado para evitar que se queme, luego se ventea para eliminar los perigonios que se han desprendido y se muele. Es un proceso laborioso pero que rinde un producto muy aromático, reconocido como alimento o "medicina" fortificante (FAO 2000). Esta harina es mezclada con agua o leche y se consume por su alto valor proteico y calórico. También se la utiliza en combinación con la harina de trigo para panificación o para bebidas calientes (api), mazamoras, tortas, frituras, entro otras (NRC 1989, FAO 2000).

En medicina tradicional, la cañihua es aprovechada por las cenizas de su tallo, llamadas “llipta”, la cual es usada cuando se mastica coca. La llipta es rica en calcio y provee los nutrientes esenciales para la dieta de las personas que viven en climas fríos como el de la sierra (Repo-Carrasco *et al.* 2009).

Se comercializa ocasionalmente fuera del área de producción, pero no siempre su pureza está garantizada; a menudo se mezcla con harina de cebada o de habas tostadas. Por otro lado, no se dispone de información de industrias dedicadas a su procesamiento, por lo que es necesario presentar alternativas naturales con cañihua que garanticen que con el proceso de elaboración mantengan sus características funcionales (FAO 2000).

## **2.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

### **2.2.1. FUNDAMENTO**

La extracción es una operación unitaria de transferencia de materia basada en la disolución de uno o varios de los componentes de una mezcla (líquida o que formen parte de un sólido) en un disolvente selectivo. Aprovecha, por tanto, la diferencia de solubilidades de los componentes de la mezcla en el disolvente añadido (Gomis, 1998).

La extracción de proteínas comienza siempre con una ruptura celular o lisis. Los métodos más utilizados se basan esencialmente en la homogenización de los tejidos y la destrucción de los límites celulares por medio de diferentes procedimientos físicos y/o químicos. Obteniéndose lo que se denomina extracto crudo. Se han desarrollado una amplia gama de técnicas de disrupción celular, que se usan a escala de laboratorio que se pueden clasificar como: a) métodos físicos mecánicos: agitación con abrasivos, homogeneización a alta presión o extrusión por presión; b) métodos físicos no mecánicos: shock osmótico, ciclos de congelación, descongelación, sonicación o secado) métodos químicos: tratamiento con álcali, solventes, detergentes, ácidos o sustancias caotrópicas. Luego de la lisis, suelen aplicarse sucesivos pasos de separación y purificación de los componentes celulares. (Universidad Nacional de Quilmes 2009).

La extracción de proteínas de cereales se realiza a través de la extracción alcalina seguido de una precipitación isoelectrónica, método en el que se aprovecha la solubilidad de las

proteínas la cual es alta a pH alcalinos y baja en pH cercanos al punto isoeléctrico (pI) (Scopes 1986).

Generalmente, las semillas son descascarilladas, pulverizadas y de la harina se elimina la grasa en forma de aceite. Posteriormente, se dispersa en agua ajustando a pH alcalinos (pH 8-11), para promover la solubilización de las proteínas y separarlas del resto de los compuestos no solubles (Scopes 1986).

La dispersión es mezclada por un tiempo de 30 a 180 minutos y enseguida filtrada para remover el material insoluble y ajustar al punto isoeléctrico (pI), en este punto la carga neta de la proteína es cero, las repulsiones electrostáticas entre las moléculas son mínimas y como consecuencia se obtienen agregados debido a la presencia de las interacciones hidrofóbicas. La solubilidad de las proteínas cambia de acuerdo con las características del disolvente (agua), ocasionando la precipitación de las proteínas (Scopes 1986).

El mecanismo empleado para explicar este fenómeno ocurre en cuatro etapas:

- Primero, se altera la solución proteica por la adición de un agente precipitante.
- Segundo, aparece la fase sólida como pequeñas partículas (primarias) esféricas de proteína sólida.
- Tercero, las partículas primarias forman agregados (floculación).
- Finalmente, el tamaño de los agregados es afectado por el desorden hidrodinámico, que genera partículas suaves y uniformes.

Subsecuente la separación de los sólidos depende del tamaño y densidad del agregado (Scopes 1986).

### **2.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

En la extracción de la proteína factores tales como solventes, pH, tiempo y temperatura de extracción, razón sólida – líquido y otros, son seleccionados para obtener óptimos rendimientos económicos y no necesariamente máximos.



- **Solventes de extracción**

Muchas proteínas se desnaturalizan por los solventes orgánicos, especialmente cuando se usan a temperatura ambiente. Por esto se recomienda que cuando deban usarse en el aislamiento de proteínas, se haga en frío. El alcohol, la acetona y el metanol son los solventes que se usan más frecuentemente y su calidad puede ser crítica para los resultados obtenidos, dependiendo si son reactivos altamente puros o menos purificados. Probablemente los solventes causan precipitación de proteínas bajando la constante dieléctrica y por lo tanto aumenta las interacciones proteína-proteína (Damián 2008).

Cuando se añade una sal a una solución de proteína ocurre un incremento en la solubilidad y esto se conoce con el nombre de solubilización por salado. Este incremento inicial en la solubilidad se debe a la estabilidad de la proteína efectuada por un descenso con el coeficiente de actividad de los grupos ionogénicos. A medida que aumenta la fuerza iónica, se obtiene un máximo en la solubilidad seguido de un descenso en la misma que se conoce como insolubilización por salado (Damián 2008).

Las sales de iones divalentes como el cloruro de magnesio  $MgCl_2$ , cloruro de manganeso  $MnCl_2$ , el sulfato de amonio  $(NH_4)_2SO_4$  entre otros, son mucho más eficientes tanto para la precipitación o solubilidad de proteínas que las sales de iones monovalentes como el cloruro de sodio  $NaCl$ , cloruro de potasio  $KCl$  o cloruro de amonio  $NH_4Cl$ . La sal más utilizada es el sulfato de amonio por su alta solubilidad y el alcanzar fuerzas iónicas muy elevadas (Damián 2008).

Para el caso de la soya, se han usado una gran variedad de solventes acuosos para extraer proteínas de la harina desgrasada de soya. De todos los solventes investigados, agua más álcali diluido (pH 7–9) y soluciones acuosas de  $NaCl$  (0.5–2M) están entre los más eficientes para extraer proteínas. No obstante, el empleo de álcalis se ha reportado como uno de los más atractivos, ya que permite obtener productos con buenas propiedades funcionales y buen rendimiento proteico a costos muy razonables (Smith y Circle 1972).

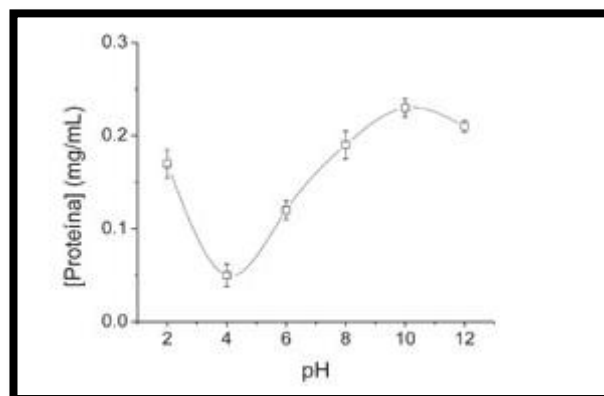
- **pH**

La solubilidad de las proteínas está muy influenciada por el pH al que se encuentren. Dependiendo del pH del sistema, estos polímeros pueden actuar como cationes o aniones; la repulsión electrostática y la hidratación de los restos cargados promueven la solubilización

de la proteína. Si se representa gráficamente la solubilidad en función del pH, la mayor parte de las proteínas de los alimentos exhiben una gráfica en forma de U, en la que el mínimo corresponde al pI (punto isoeléctrico). Debido a que la mayoría de las proteínas contienen más aminoácidos ácidos (Ac. aspártico y glutámico) que básicos (lisina, arginina e histidina) exhiben una solubilidad mínima a pH 4–5 (pH isoeléctrico) y máxima a pHs alcalinos (Badui 1999, Cheftel *et al.* 1989 y Fennema 2000).

Como la mayor parte de las proteínas son muy solubles a pH alcalino, la extracción de las proteínas de sus fuentes vegetales, como la harina de soja, se lleva a cabo a estos pHs. No obstante, se recomienda hacer la extracción a un pH entre 8.5 – 9.0 (Rodríguez 1981), ya que a partir de pH 9 se favorecen reacciones como las de racemización de los aminoácidos, la síntesis de enlaces isopeptídicos y la formación de puentes covalentes intra o intermoleculares que vuelven a las proteínas menos digestibles; manifestándose en el descenso del índice químico y el valor biológico de las proteínas (Linden y Lorient 1996 y Badui 1999).

Un perfil típico de solubilidad proteica en agua en función del pH se muestra en la Figura 3 se puede observar que solubilidad es máxima a pHs muy ácidos (pH=2-3) o muy alcalinos (pH=9-11). En estas zonas, las proteínas poseen carga neta positiva o negativa, respectivamente; y las fuerzas repulsivas son la causa del incremento en su solubilidad. También es posible observar un mínimo de solubilidad en las cercanías del pH isoeléctrico (pI) (pH=4-5), en donde la carga neta de la proteína es cero, por lo que disminuye la repulsión electrostática lo que promueve la agregación (Salgado 2009).



**Figura 3: Curva de solubilidad de proteínas en agua en función del pH del medio.**

**FUENTE:** Tomado de Salgado 2009.

- **Temperatura**

La temperatura se puede visualizar como agitación térmica. Una solución proteica tendrá mayor o menor agitación según la temperatura. Así una proteína normalmente plegada a 37 °C sufrirá un mayor número de choques de parte del agua a medida que aumenta la temperatura, ya que las moléculas de agua se agitarán cada vez más violentamente descubriendo a las cargas superficiales y haciendo que las interacciones internas (interacciones débiles) de la proteína, no puedan mantener la estructura hasta que se desnaturaliza desplegándose. En el caso contrario al bajar la temperatura a unos 10 °C, el agua se agita cada vez menos y la proteína no experimentará un número de choques suficientes de parte del agua para tener un grado de flexibilidad compatible a su función. Al mismo tiempo sus capas de agua aumentarán y se hará más rígida y poco funcional (Rocha 2009).

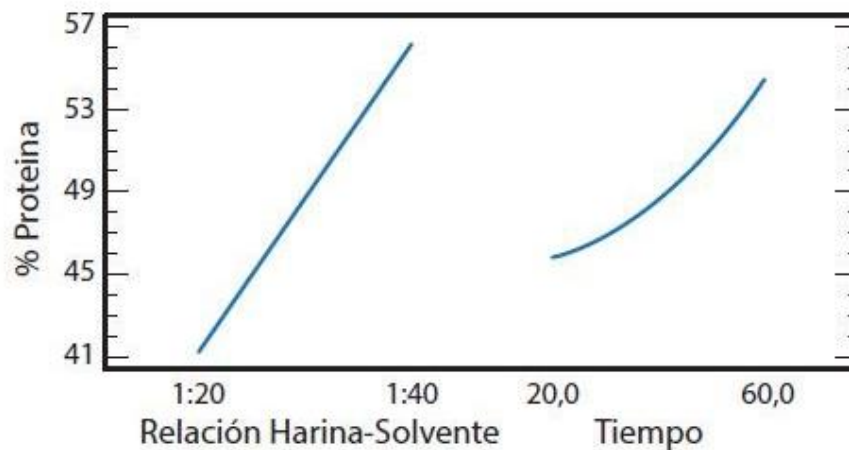
A pH y fuerza iónica constantes, la solubilidad de la mayor parte de las proteínas aumenta con la temperatura entre 0 a 40-50 °C, cuando se exceden estos límites, los polímeros tienden a la desnaturalización y, en ocasiones, a la precipitación. A temperaturas mayores de 50 °C, el movimiento de las moléculas, debido al incremento de la energía cinética térmica, es suficiente para romper los enlaces implicados en la estabilización de las estructuras secundaria y terciaria (desnaturalización), la exposición de grupos apolares, la agregación y la precipitación, es decir, provoca un descenso de la solubilidad (Cheftel *et al.* 1989 y Fennema 2000).

- **Tiempo de extracción**

Variaciones entre 15 minutos a 2 horas son generalmente usadas industrialmente. En general, la cantidad de nitrógeno extraído aumenta constantemente en los 30 primeros minutos llegando a un nivel constante luego de los 45 min. (Mustakas y Sohns, citado por Rodríguez 1981). No obstante, el tiempo de extracción y la temperatura están relacionados con otros factores tales como el grado de agitación, tamaño de partículas y otros. Arango *et al.* (2012) menciona que cuando el tiempo de extracción se incrementa de 20 a 60 minutos dicho incremento aumenta el rendimiento de extracción de proteínas en una 9 por ciento.

- **Relación materia prima/solvente**

A pesar de que volúmenes grandes de extracto pueden facilitar la completa extracción de la proteína, su uso en la práctica ocasiona dificultades de ingeniería. Para la producción a gran escala, la relación más económica está entre 1:10- 1:20 (Rodríguez 1981). Rodríguez (1981) recomienda en el ámbito industrial hacer una doble extracción con una relación 1/15 y la segunda con 1/5. Dos extracciones sucesivas de 1:10 y 1:5 también son usadas. De esta manera, si en el residuo queda todavía proteína, esta es extraída en la segunda extracción. En la Figura 4, se muestra la relación de harina-solvente, se observa que existe un mayor rendimiento cuando la relación materia prima: solvente aumenta. Según Arango *et al.* (2012) cuando la relación harina: solvente pasó de 1:20 a 1:40 g: mL se observó un aumento de 15 por ciento en la cantidad de proteína extraída. Al aumentar la concentración de disolvente se incrementa el coeficiente de transferencia de masa resultando una mayor extracción de proteína.



**Figura 4: Efectos principales para el rendimiento de proteína en el proceso de extracción**

**FUENTE:** Tomado de Arango *et al.* 2012

- **Tamaño de partícula**

Se ha encontrado que el tamaño de partícula de la materia prima tiene un efecto marcado en la eficiencia de la extracción. Las partículas más finas involucran un incremento en el área

de contacto entre el solvente y la harina permitiendo una mejor acción del solvente sobre la muestra (Rodríguez 1981). Un tamaño de malla de 100 o más es recomendable para una máxima extracción de proteínas (Malla N° 100 = abertura de 0.147 mm). No obstante, la molienda de la harina a un tamaño de partícula fina puede incrementar o reducir la solubilidad del nitrógeno dependiendo de la naturaleza de la molienda y el resultante calor o fricción (Rodríguez 1981).

- **Agitación**

El grado de extracción se incrementa con la agitación, aunque una agitación moderada para mantener la harina suspendida libremente en la dispersión es suficiente para lograr una eficiente extracción (Rodríguez 1981).

## **2.4. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SEGÚN SU SOLUBILIDAD**

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

1. Albuminas: Se solubilizan en agua a pH 6.6.
2. Globulinas: Son solubles en soluciones salinas diluidas a pH 7.
3. Glutelinas: Son solubles en soluciones ácidas (pH 2) y alcalinas (pH 12).
4. Prolaminas: Son solubles en etanol al 70%.

Según Sathe *et al.* (2012) la albumina, globulina y glutenina fueron las fracciones más importantes entre las proteínas solubles de la harina del sachu inchi, la prolamina contribuye en pequeña proporción. Señala también que el 90 por ciento de proteínas de la harina de sachu inchi pueden solubilizarse y que las fracciones de proteínas, albúminas, globulinas, prolaminas, y gluteninas representaron 43.7; 27.3; 3 y 31,9 por ciento, respectivamente, del total de proteínas solubles acuosas.

Muchas de las propiedades funcionales son dependientes del grado de solubilidad proteica (Rupnow 1991 citado por Giese 1994). 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 éstas últimas en el disolvente, con

una superficie interfacial de máximo contacto entre la proteína y el disolvente (Cheftel *et al.* 1989).

La solubilidad de las proteínas está determinada por tres factores principales: su grado de hidratación, su densidad y distribución de cargas a lo largo de la cadena y, la presencia de compuestos no proteicos como fosfatos, carbohidratos o lípidos que pueden tener un efecto estabilizante (Badui 1999).

Recientemente, se ha dado gran importancia a la hidrofobicidad de los polipéptidos y se ha visto que esta influye mucho en la solubilidad; ya que la solubilización de una proteína viene impuesta por la hidrofilia e hidrofobia de la superficie de la misma que contacta con el agua del entorno. Cuanto menor sea el número de zonas hidrofóbicas de la superficie mayor es la solubilidad (Fennema 2000).

Además de las propiedades fisicoquímicas intrínsecas, la solubilidad se ve influida por el pH, la fuerza iónica, la temperatura, la presencia de disolventes orgánicos y otras circunstancias concurrentes en la disolución (Fennema 2000).

Las pruebas más utilizadas para determinar el grado de solubilidad proteica son: La proporción de solubilidad de nitrógeno (NSI) y el perfil de solubilidad en función del pH, de la fuerza iónica o de un tratamiento térmico (Cheftel *et al.* 1989). En general, se determina el nitrógeno soluble contenido en el sobrenadante de centrifugación de la solución proteica (Bourgeois y Le Roux 1986).

Los datos sobre las características de solubilidad son muy útiles para poder determinar las condiciones óptimas de extracción y purificación de la proteína, así como para la separación de fracciones proteicas (Cheftel *et al.* 1989). Además, como la solubilidad de las proteínas está íntimamente relacionada con sus estados estructurales, se usa con frecuencia para medir el grado de desnaturalización durante los procesos de extracción, aislamiento y purificación (Fennema 2000).

La desnaturalización por el calor modifica el perfil de solubilidad de las proteínas frente al pH. La modificación del perfil de solubilidad inducida por la desnaturalización por el calor se debe al incremento de la hidrofobia superficial de la proteína debido al desplegamiento. El desplegamiento altera el equilibrio entre las interacciones proteína- proteína y proteína-disolvente, a favor de las primeras (Fennema 2000).

El perfil de solubilidad proteica en función del pH es un excelente índice de funcionalidad de las proteínas, indicando sus posibles aplicaciones (Kinsella 1976), ya que diferentes valores de pH son encontrados en diversos alimentos (Etheridge *et al.* 1981 citados por Campos 1985). Las proteínas que son altamente solubles pueden ser requeridas en aplicaciones en las cuales la emulsificación, batido y formación de películas son importantes (Kolar *et al.* 1985, citados por Giese 1994).

## **2.5. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS BASADOS EN DIFERENCIA DE SOLUBILIDAD**

Las proteínas presentes en ciertos vegetales son poco o insolubles en agua debido a su naturaleza hidrofóbica y a las uniones disulfuro entre las moléculas proteicas (Lianqing *et al.* 2008), dificultando su extracción debido a las características metabólicas y estructurales de los tejidos, especialmente de la pared celular (Martínez *et al.* 2013). Para lograr su precipitación, las proteínas deber ser liberadas de las células vegetales que las contiene, utilizando solventes selectivos con respecto al soluto. Los solventes altamente alcalinos ayudan a romper los puentes de hidrógeno y a disociar el hidrógeno de los grupos sulfato carbónico, así el incremento de la carga superficial de las moléculas proteicas aumenta la solubilidad en agua.

Las proteínas son solubles en agua cuando adoptan una conformación globular. La solubilidad es debida a los radicales (-R) libres de los aminoácidos que, al ionizarse, establecen enlaces débiles (puentes de hidrógeno) con las moléculas de agua. Así, cuando una proteína se solubiliza queda recubierta de una capa de moléculas de agua (capa de solvatación) que impide que se pueda unir a otras proteínas lo cual provocaría su precipitación (insolubilización) (Urrutia 2010).

La solubilidad de una proteína está influenciada por los siguientes factores: su composición en aminoácidos (una proteína rica en aminoácidos polares es en general más soluble que una rica en aminoácidos hidrofóbicos); su estructura tridimensional (las proteínas fibrosas son en general menos solubles que las globulares) y el entorno de la propia proteína (Fennema 2000). Los principales factores relacionados con el entorno son los siguientes: la

temperatura; la constante dieléctrica del medio, el pH del mismo, y la fuerza iónica. Estas variables que son reflejo del hecho de que las proteínas son electrolitos de peso molecular muy grande, pueden utilizarse para separar mezclas de proteínas, ya que cada proteína posee una composición en aminoácidos característica que determina su comportamiento como electrolito y propiedades (Ramírez *et al.* 2007; citado por Urrutia 2010).

### **2.5.1. EXTRACCIÓN ALCALINA Y PRECIPITACIÓN ISOELÉCTRICA**

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). La proteína solubilizada se precipita en su punto isoeléctrico donde se elimina los carbohidratos solubles y sales. Se obtiene un aislado con no menos de 90 por ciento de proteína (Fennema 2000).

### **2.5.2. SOLUBILIZACIÓN Y PRECIPITACIÓN POR SALADO DE LAS PROTEÍNAS**

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

Por otra parte, a medida que aumenta la fuerza iónica, la solubilidad de una proteína comienza a disminuir, a una fuerza iónica suficientemente elevada, una proteína puede ser casi completamente precipitada de su disolución, efecto llamado insolubilización por salado. La base fisicoquímica de la insolubilización por salado es muy compleja; uno de los factores



que concurren en ella es que la concentración elevada de la sal puede eliminar el agua de hidratación de las moléculas de proteína reduciendo la solubilidad (Nelson y Cox 2001).

### **2.5.3. FRACCIONAMIENTO CON DISOLVENTES**

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

### **2.6. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA (MSR)**

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) es una colección de técnicas que permiten al investigador inspeccionar una respuesta, que se puede mostrar como una superficie, cuando los experimentos investigan el efecto que tiene el variar factores cuantitativos en los valores que toma una variable dependiente o respuesta; y tratar de encontrar los valores que optimicen esta respuesta. Esto es, se trata de encontrar los valores óptimos para las variables independientes que maximizan, minimizan o cumplen ciertas restricciones en la variable respuesta. La MSR es la estrategia experimental y de análisis que permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, aquellas que dan por resultado “valores óptimos” de una o varias características de calidad del producto (Gutiérrez 2008).

La optimización por el método de superficie de respuesta es más ventajosa que la tradicional optimización simple por parámetros individuales donde el objetivo es localizar el tratamiento ganador entre todos aquellos que son probados, en la medida en que la MSR pretende localizar las condiciones óptimas de operación del proceso con un ahorro de tiempo, espacio y materia prima (Ye y Jiang 2011). Para lograrlo se requiere de una estrategia más completa, que incluye la posibilidad de efectuar varios experimentos secuenciales y el uso de técnicas matemáticas más avanzadas.

### **2.6.1. ELEMENTOS DE LA MSR**

La metodología de superficie de respuesta implica tres aspectos: *diseño, modelo y técnica de optimización*. El diseño y el modelo se piensan al mismo tiempo, y dependen del tipo de comportamiento que se espera en la respuesta. De manera específica, el modelo puede ser de primero o segundo orden (plano o con curvatura); por ello, el tipo de diseño utilizado y el método de optimización se clasifican, según sea el caso, como de primero o segundo orden. El aspecto diseño implica que para optimizar un proceso se debe aplicar el diseño de experimentos, en particular aquellos que sirven para ajustar un modelo de regresión lineal múltiple (Gutiérrez 2008).

El aspecto del modelo utiliza el análisis de regresión lineal múltiple, junto con sus elementos básicos que son: parámetros del modelo, modelo ajustado, significancia del modelo, prueba de falta de ajuste, residuos, predichos, intervalos de confianza para predichos y coeficiente de determinación (Gutiérrez 2008).

El aspecto de optimización está formado por algunas técnicas matemáticas que sirven para que, dado un modelo ajustado, explorarlo a fin de obtener información sobre el punto óptimo. Conviene recordar técnicas como: derivadas de funciones, multiplicadores de LaGrange, operaciones con matrices, valores y vectores propios y sistemas de ecuaciones simultáneas (Gutiérrez 2008).

### 2.6.2. MODELOS

Las superficies de respuesta se caracterizan ajustando un modelo a los datos experimentales. Los modelos que se utilizan en MSR son básicamente polinomios de primer y segundo orden como los que se muestran en la Figura 5 para k factores.

Modelo de Primer Orden

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

Modelo de Segundo Orden

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

**Figura 5: Modelos de 1° y 2° orden en la MSR.**

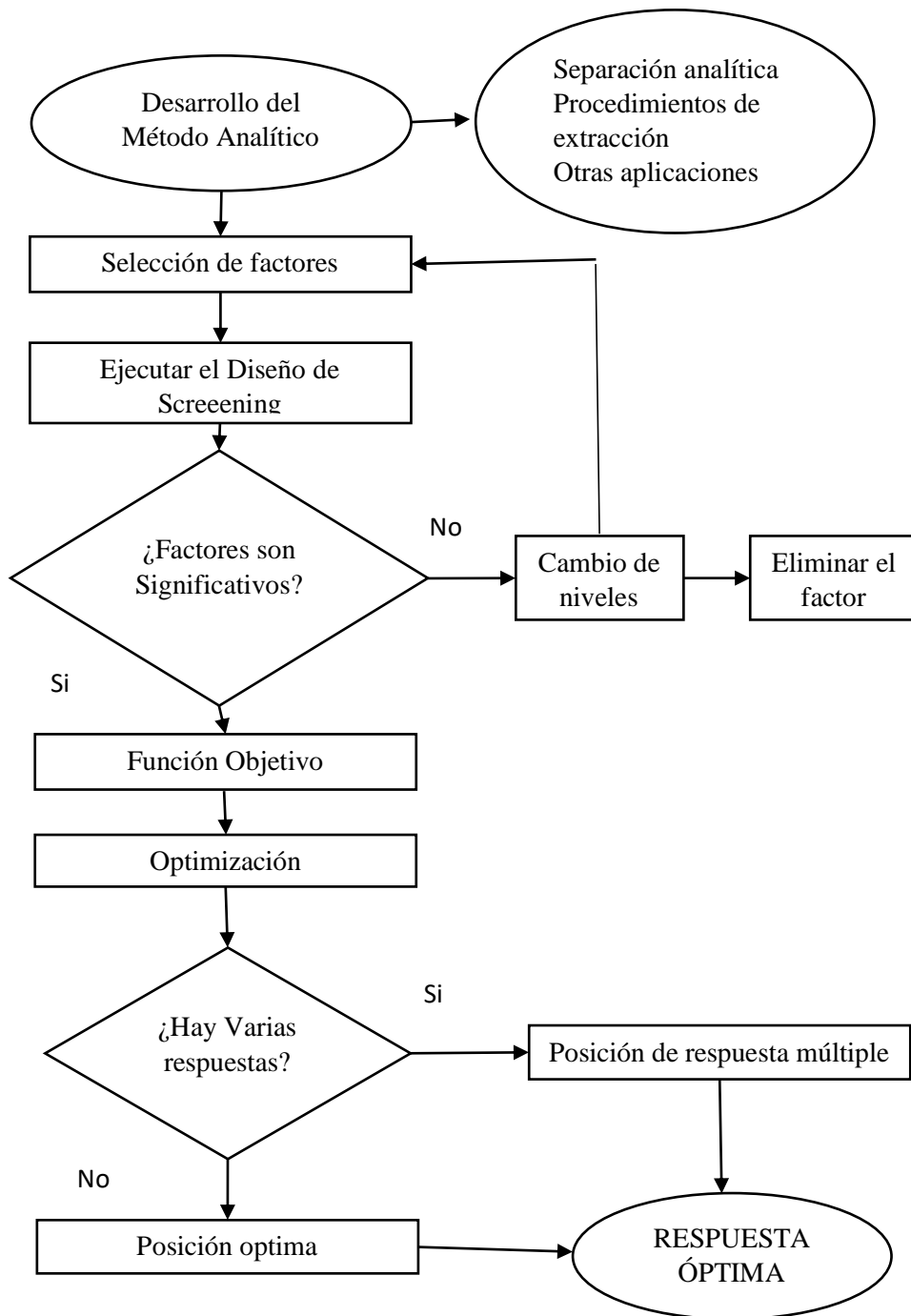
**FUENTE:** Tomado de Gutiérrez 2008.

Para más de dos factores las superficies de respuesta no se pueden graficar completas de una sola vez porque se encuentran en cuatro dimensiones o más, pero se preserva la misma idea. Esto es, para  $k > 2$  el modelo de primer orden representa un hiperplano y el de segundo orden constituye un hiperelipsoide o hiperboloide (Gutiérrez 2008).

Sin embargo, para  $k = 3$  factores es posible graficar la superficie haciendo las tres gráficas con dos factores cada vez, con el tercero constante (Gutiérrez 2008).

### 2.6.3. ETAPAS DE OPTIMIZACIÓN

Según Ayala y Pardo (1995) optimizar un proceso o producto requiere una estrategia adecuada para encontrar valores óptimos. En la Figura 6 se presente un esquema general de la metodología reportada por Candiotti et al. (2014) y en las siguientes líneas se explica las tres principales:



**Figura 6: Secuencia de pasos a seguir para la aplicación de la metodología de superficie de respuesta.**

**FUENTE:** Tomado de Candiotti *et al.* 2014.

## **Etapa I: Screening**

El objetivo de esta etapa es identificar aquellas variables que verdaderamente aumenten la eficacia de un proceso. 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 fraccionada y el diseño de Plackett y Burman.

Montgomery (2005) 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, como se muestra en la primera ecuación:

$$y = \beta_0 + \beta_1\beta_1 + \beta_2\beta_2 + \dots \beta_k\beta_k + \varepsilon \dots (\text{Ecuación 1})$$

En esta clase de diseños de primer orden se tiene:

- Diseños factoriales  $2^k$
- Fraccionales de la serie  $2^k$
- Diseños simplex.
- Diseños Placket – Burman.

## **Etapa II: 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 hasta su ubicación. Existen varios métodos que puede aplicarse en esta etapa, 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).

### **Etapa III: 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 central compuesto.
- Diseño equirradial.
- Diseño Box Behnken.

Debe usarse un polinomio de mayor grado cuando existe curvatura en el sistema, un modelo de segundo orden como se aprecia en la segunda ecuación:

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

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 un producto cruz y  $\varepsilon$  es el término del error aleatorio. Los términos cuadráticos puros y los de producto cruz son de segundo orden (Montgomery 2005).

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCION**

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**

Se utilizó granos de cañihua de la variedad Cupis, provenientes de la Estación Agronómica Experimental INIA (Instituto Nacional de Investigación Agraria) de Puno (Perú).

#### **3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS**

##### **3.3.1. MATERIALES**

- Probetas 50, 100, 250 ml.
- Embudo simple y cribado.
- Kitasato de 250 ml
- Beakers de 200, 250, 500 y 1000 ml
- Dosificador de agua destilada.
- Erlenmeyer de 100, 200 y 500 ml.
- Fiola de 10, 100, 250 y 1000 ml.
- Papel filtro Whatman N°1.
- Tubos de centrifuga.
- Parafilm.
- Magnetos de diferentes tamaños.
- Micropipetas de 0,1 – 5 ml.
- Tubos de ensayo de 12x75 mm.
- Cronómetro.
- Espátula y cuchara

- Bagueta.
- Soporte.
- Tamiz W.S Tyler N° 35. (500  $\mu\text{m}$ ).
- Otros.

### 3.3.2. EQUIPOS

- Balanza analítica (Ohaus Adventurer, Modelo AR2140).
- Bomba de vacío (Vacumbrand GMBH, Modelo 4EKF56CX-4).
- Congeladora (Electrolux).
- Baño María con agitación (GFL).
- Espectrofotómetro (Thermo Electrón Corporation, Modelo Genesys 5).
- Potenciómetro (Aplus Thermo Orión, Modelo 410<sup>a</sup>).
- Refrigeradora (LG).
- Sistema de filtración al vacío.
- Agitador magnético (IKA).
- Balanza de humedad infrarroja (MERCK).
- Molino (IKA, Modelo A11Basic).
- Agitador Vortex (IKA).

### 3.3.3. REACTIVOS

- Ácido clorhídrico 1N.
- Albúmina bovina (BSA).
- Hidróxido de sodio 1N.
- Cloruro de sodio.
- Reactivo de Lowry.
- Éter de petróleo.
- Reactivo de Folin – Ciocalteu 2N (todos los reactivos fueron de la marca MERCK).



### **3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

#### **a. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD.**

Según el método 950,46 (AOAC, 1996). Método de la estufa a 110 °C hasta peso constante. Los resultados se expresaron en porcentaje.

#### **b. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA TOTAL**

Según el método 984,13 (AOAC 1996). Método de Kjeldahl. El factor de conversión de proteína usado fue de 5.85 según lo recomendado por Becker et al. (1981) y Segura-Nieto *et al.* (1994). Los resultados se expresaron en porcentaje.

#### **c. DETERMINACIÓN DE GRASA.**

Según el método 2003.05 (AOAC 1996). Método Soxhlet. Los resultados se expresaron en porcentaje.

#### **d. DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA**

Según el método 962.09 (AOAC 1996). Los resultados se expresaron en porcentaje.

#### **e. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CENIZAS.**

Se utilizará el método N° 942.05 (AOAC 1996). Método por incineración en mufla. Los resultados se expresaron en porcentaje.

#### **f. EXTRACTO LIBRE DE NITRÓGENO**

Se determinó por diferencia después de haber completado los análisis de humedad, proteína, grasa, fibra y ceniza. Los resultados se expresaron en porcentaje.

#### **g. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE**

Las proteínas solubles fueron determinadas bajo la metodología propuesta por Lowry *et al.* (1951). Este método está basado en la reacción de Biuret, donde las proteínas reaccionan con el cobre  $\text{Cu}^{+2}$  bajo condiciones alcalinas formando enlaces y originando complejos de color violeta, estos complejos cupro-proteicos reducen al reactivo Folin Ciocalteau 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  $\mu\text{l}$  de la muestra (extracto proteico) fue mezclada con 2 ml del reactivo C (que contiene solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

al 2 por ciento en 0.1 M de NaOH, solución de CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O al 0.5 por ciento en agua destilada y solución de tartrato de sodio al 1 por ciento en agua destilada, estas tres soluciones fueron mezcladas en proporciones 100:1:1), a esta mezcla se le añadió 200 µl del reactivo Folin Ciocalteau, el conjunto se agitó e incubó por 30 min a temperatura ambiente y luego se procedió a la lectura a 550 nm. Los resultados fueron expresados en mg de proteína soluble/ml utilizando la curva estándar de albúmina de suero bovina (BSA) que se presenta en la ecuación 3:

$$\text{Absorbancia} = 1.7068 \left( \frac{\text{mg proteína}}{\text{ml}} \right) + 0.0397 \dots (\text{Ecuación 3})$$

Posteriormente se hicieron los cálculos para expresar los resultados en mg o g de proteína soluble/100 g de muestra (harina de cañihua).

#### **b. Cálculo de rendimiento de proteína extraída**

El cálculo del rendimiento de proteína extraída se realizó dividiendo la cantidad de proteína soluble entre la proteína total por 100, como se visualiza en la ecuación 4.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Proteína Soluble en el sobrenadante (Lowry)}}{\text{Proteína Total (Kjeldahl)}} * 100 \dots (\text{Ecuación 4})$$

$$\text{Proteína Soluble} = \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

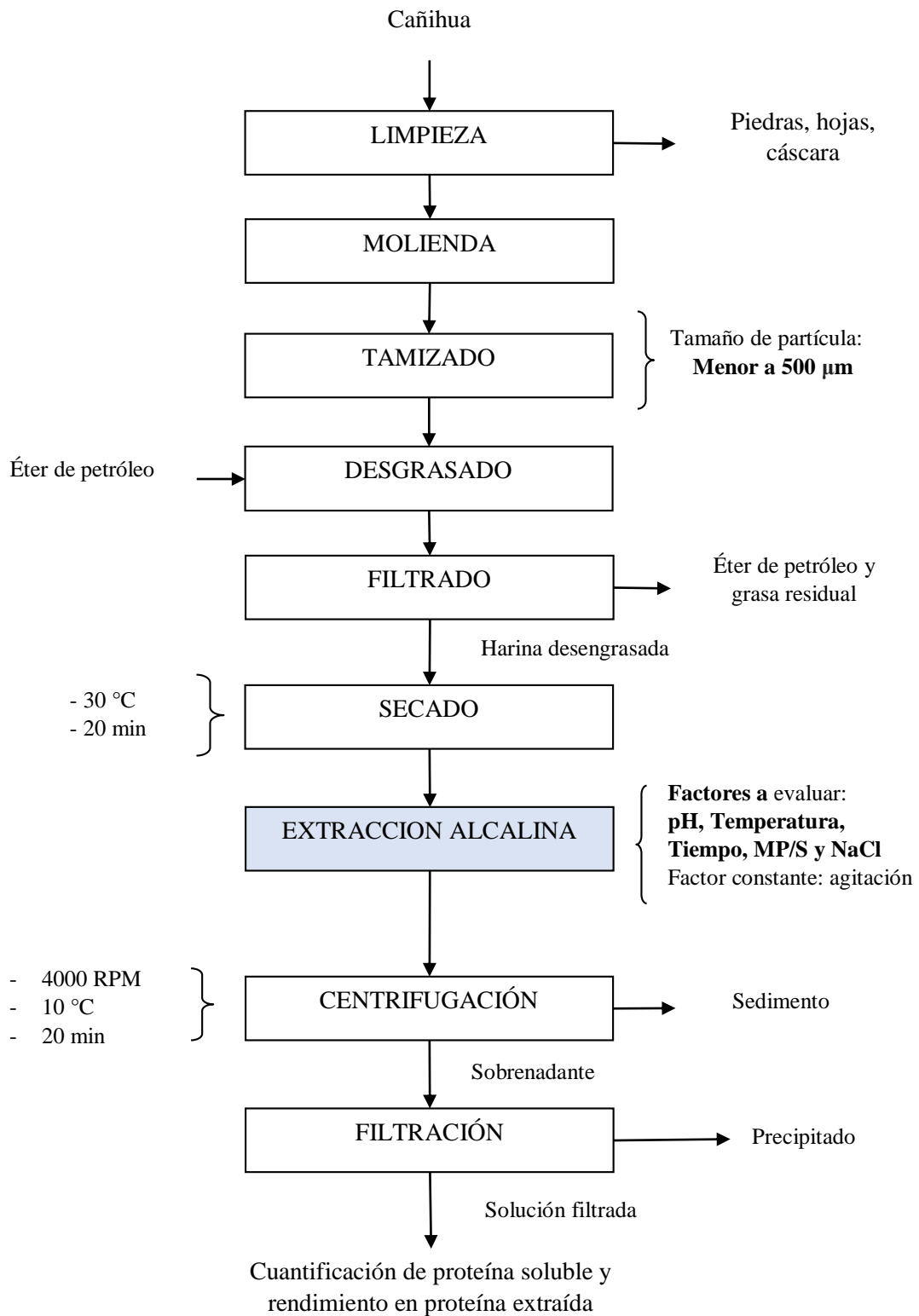
La ecuación para el cálculo del rendimiento de proteína extraída se realizó según la metodología descrita por Sathe *et al.* (2012), asimismo por Ali *et al.* (2008) durante la optimización de proteínas de semillas de sandía. Igualmente por Irakose y Sindayigaya (2010) para la optimización de extracción de proteínas de sorgo malteado.

### 3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

#### 3.5.1. EXTRACCIÓN ALCALINA

En la figura 7 se presenta el flujo seguido para el estudio de la extracción de proteína de cañihua, se eligió el método de extracción alcalina sólido-liquido utilizada por Fritz *et al.* (2011), el mismo que se detalla a continuación:

- **Limpieza:** Se procedió a eliminar todo material extraño contenido en las semillas de la cañihua como hojas, piedras, pajas, etc. La humedad inicial del grano fue de 6.5 por ciento.
- **Molienda:** Las semillas de cañihua se molieron haciendo uso de un molino eléctrico de análisis (IKA), el cual permitió fácilmente reducir el tamaño de partícula del grano.
- **Tamizado:** La harina de cañihua se pasó por un tamiz Tyler malla N° 35 (tamaño de partícula  $\leq 500 \mu\text{m}$ ). Se seleccionó este tamaño teniendo como referencias la investigación conducida por Guerrero *et al.* (2015) quienes reportan que tamaños de partícula inferiores a  $500 \mu\text{m}$  no tuvieron efecto en el proceso de extracción de la proteína de harina de quinua (*Chenopodium quinoa*).
- **Desgrasado:** La harina obtenida después del tamizado pasó por un desgrasado. Previo a la extracción de la proteína, se recomienda efectuar un desgrasado para evitar que la grasa interfiera con el proceso de extracción de la proteína, en especial si el contenido de grasa supera el 3 por ciento (Fenema 2000). Para ello se procedió a mezclar 300 g de harina con 1 l de éter de petróleo bajo agitación durante 16 horas, para el cual se utilizó un agitador magnético y una magneto.
- **Filtración:** Se filtró con papel Whatman N° 3 bajo vacío para separar el éter de petróleo con la grasa extraída de la harina de cañihua.
- **Secado:** En secador de bandejas con aire de recirculación a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  se colocó la harina de cañihua desengrasada con la finalidad de eliminar el solvente residual en la harina. Bajo esta condición a la harina desgrasada se realizó un análisis proximal.



**Figura 7: Flujo de operaciones para la extracción alcalina de la proteína de la cañihua**

- **Extracción alcalina sólido-líquido:** La proteína de la harina de la cañihua desengrasada fue extraída utilizando una combinación de las siguientes variables: pH, concentración de cloruro de sodio (M), relación harina desengrasada/solvente (g/ml), de ahora en adelante identificado con las siglas MP/S, temperatura (°C) y tiempo de extracción (min), en función al diseño experimental estadístico mencionado en el acápite 3.5.1.

En un Erlenmeyer de 500 ml se agregó la mezcla de harina desengrasada y solvente, luego se agito por 5 minutos con un agitador magnético y magnetos, después se ajustó el pH (los pH de las mezclas se regularon con NaOH 1N), la extracción de la proteína se llevó a cabo bajo condiciones alcalinas.

Luego de ajustar el pH de la solución: harina más solvente, fue sometida a una agitación constante (200 rpm) en un baño maría, siguiendo las condiciones de extracción ofrecidas por el diseño estadístico.

- **Centrifugación:** Transcurrida la extracción alcalina se procedió a centrifugar la solución a 4000 rpm por 20 minutos a la temperatura de 10 °C, recuperándose el sobrenadante.
- **Filtración.** El sobrenadante se filtró en papel Whatman N° 1 bajo vacío y la solución filtrada se le determinó proteína soluble, según lo señalado en el acápite 3.3. así como también se procedió a determinar el rendimiento en proteína extraída (%).

### 3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño completamente al azar con arreglo factorial  $2^k$  con replicas en el punto central (primer orden) fue generado por el paquete estadístico Minitab versión 16.1.0 (Minitab Inc., US) utilizado para la primera etapa diseño experimental (screening) y el diseño compuesto central (segundo orden) por Statgraphics Centurión XVI versión 16.02.04 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, US) usado en la optimización del diseño.

### 3.6.1. SCREENING: DISEÑO EXPERIMENTAL DE PRIMER ORDEN

En esta etapa se analizaron los efectos de cinco variables independientes o factores: concentración de NaCl ( $X_1$ ), temperatura ( $X_2$ ), tiempo ( $X_3$ ), MP/S [Relación materia prima/Solvente] ( $X_4$ ) y pH ( $X_5$ ); sobre la variable dependiente (Y) Rendimiento de extracción de proteínas, con la finalidad de determinar aquellos que tienen efecto significativo en el proceso de extracción de proteínas.

Se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo factorial  $2^k$  con replicas en el punto central, con la finalidad de determinar una estimación promediada del efecto curvatura (Ayala y Pardo 1995, Morales 2003 y Parra *et al.* 2014). Las variables fueron codificadas y los diferentes niveles establecidos de acuerdo a datos de la literatura basados en la extracción de proteínas de otras fuentes (Aluko y Monu 2003, Abugoch *et al.* 2011; Guerrero *et al.* 2015) y a pruebas preliminares.

El diseño experimental de primer orden consto de 5 variables lo cual hace que  $k = 5$  variables, y se tenga 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; como se muestra en los Cuadros 6 y 7. La importancia de cada factor en la etapa de screening se determinó mediante el diagrama de Pareto estandarizado y el análisis de varianza (ANVA) ( $\alpha = 0,05$ ). El análisis estadístico se realizó en el paquete estadístico Minitab versión 16.1.0 (Minitab Inc., US).

**Cuadro 6: Diseño factorial (2<sup>5</sup>) empleado en la etapa del screening**

CORRIDA	FACTORES/NIVELES				
	X <sub>1</sub> NACL	X <sub>2</sub> TEMPERATURA	X <sub>3</sub> TIEMPO	X <sub>4</sub> MP/S	X <sub>5</sub> PH
1	0 (-1)	60 (1)	60 (1)	1/10 (-1)	7 (-1)
2	2 (1)	60 (1)	60 (1)	1/10 (-1)	11 (1)
3	2 (1)	60 (1)	60 (1)	1/10 (-1)	7 (-1)
4	0 (-1)	60 (1)	60 (1)	1/10 (-1)	11 (1)
5	0 (-1)	25 (-1)	10 (-1)	1/10 (-1)	7 (-1)
6	0 (-1)	25 (-1)	60 (1)	1/10 (-1)	11 (1)
7	0 (-1)	25 (-1)	60 (1)	1/40 (1)	7 (-1)
8	1 (0)	42.5 (0)	35 (0)	1/25 (0)	9 (0)
9	0 (-1)	25 (-1)	10 (-1)	1/40 (1)	11 (1)
10	2 (1)	60 (1)	10 (-1)	1/10 (-1)	11 (1)
11	1 (0)	42.5 (0)	35 (0)	1/25 (0)	9 (0)
12	2 (1)	25 (-1)	10 (-1)	1/40 (1)	11 (1)
13	2 (1)	25 (-1)	10 (-1)	1/40 (1)	7 (-1)
14	2 (1)	60 (1)	10 (-1)	1/40 (1)	11 (1)
15	2 (1)	60 (1)	60 (1)	1/40 (1)	11 (1)
16	2 (1)	60 (1)	10 (-1)	1/10 (-1)	7 (-1)
17	2 (1)	25 (-1)	60 (1)	1/40 (1)	11 (1)
18	1 (0)	42.5 (0)	35 (0)	1/25 (0)	9 (0)
19	0 (-1)	60 (1)	60 (1)	1/40 (1)	11 (1)
20	2 (1)	25 (-1)	10 (-1)	1/10 (-1)	11 (1)
21	2 (1)	25 (-1)	60 (1)	1/40 (1)	7 (-1)
22	0 (-1)	25 (-1)	60 (1)	1/40 (1)	11 (1)
23	0 (-1)	25 (-1)	60 (1)	1/10 (-1)	7 (-1)
24	0 (-1)	60 (1)	10 (-1)	1/10 (-1)	11 (1)
25	0 (-1)	60 (1)	10 (-1)	1/40 (1)	7 (-1)
26	0 (-1)	60 (1)	60 (1)	1/40 (1)	7 (-1)
27	0 (-1)	25 (-1)	10 (-1)	1/40 (1)	7 (-1)
28	2 (1)	25 (-1)	10 (-1)	1/10 (-1)	7 (-1)
29	0 (-1)	25 (-1)	10 (-1)	1/10 (-1)	11 (1)
30	2 (1)	60 (1)	60 (1)	1/40 (1)	7 (-1)
31	0 (-1)	60 (1)	10 (-1)	1/40 (1)	11 (1)
32	2 (1)	25 (-1)	60 (1)	1/10 (-1)	7 (-1)
33	0 (-1)	60 (1)	10 (-1)	1/10 (-1)	7 (-1)
34	2 (1)	25 (-1)	60 (1)	1/10 (-1)	11 (1)
35	2 (1)	60 (1)	10 (-1)	1/40 (1)	7 (-1)

Leyenda: MP/S: Relación Materia prima/solvente

### 3.6.2. ESCALAMIENTO

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

### 3.6.3. OPTIMIZACIÓN: 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 análisis de superficie de respuesta de segundo orden para Y, se realizó mediante un Diseño Compuesto Central (Ayala y Pardo 1995, Quanhong y Caili, 2005; Wani *et al.* 2006, Firatligil-Durmus y Evranuz 2010 y Chee y Ayob 2013). Según Ayala y Pardo (1995) para  $k = 4$  variables, consta de 16 puntos factoriales ( $2^k$ ), ocho 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 29 puntos experimentales. Para determinar la ubicación de los puntos axiales se consideró  $\alpha = (nf)1/4 = (16)1/4 = 2$  que, garantiza un diseño central compuesto rotatable (Montgomery 2002). Cada variable fue codificada en cinco niveles: -2; -1; 0; 1 y 2; como se muestra en el Cuadro 8. Las variables independientes  $X_i$  se codificaron como  $x_i$ , que se define como adimensional, de acuerdo con la siguiente ecuación 5:

$$x_i = (X_i - X_0)/\Delta X_i \dots \text{(Ecuación 5)}$$

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:

$$x_2(\text{Temperatura})=(X_2 - 40)/10 \dots \text{(Ecuación 6)}$$

$$x_3(\text{Tiempo})=(X_3 - 65)/30 \dots \text{(Ecuación 7)}$$

$$x_4(\text{Relación MP/S})=(X_4 - 30)/10 \dots \text{(Ecuación 8)}$$

$$x_5(\text{pH})=(X_5 - 9)/1 \dots \text{(Ecuación 9)}$$



Las corridas se llevaron a cabo en un orden completamente al azar para minimizar el sesgo. En el Cuadro 8 se presentan el diseño experimental propuesto. El modelo propuesto para la variable respuesta (Y (%), rendimiento en proteína correspondió a:

$$\hat{Y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k=4} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{k=4} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j}^{k=4} \sum_{i < j}^{k=4} \beta_{ij} x_i x_j \dots \text{ (Ecuación 10)}$$

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.

La superficie de respuesta generada para obtener el máximo rendimiento de la proteína extraída, fue experimentalmente validada con tres repeticiones experimentales y los valores que se obtuvieron fueron comparados con los predichos por el modelo de MSR.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se graficaron las superficies variando dos variables dentro del rango experimental evaluado y manteniendo las otras constantes al punto central (cero 0). El análisis estadístico se realizó con el software Statgraphics Centurión XV (Stat Point Inc., VA, USA).

**Cuadro 7: Variables Independientes y sus niveles evaluados en el Screening**

VARIABLE INDEPENDIENTE	CODIFICADO	NO CODIFICADO	NIVELES	
			-1	1
Concentración de NaCl (M)	x <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	0	2
Temperatura (°C)	x <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	25	60
Tiempo de extracción (min)	x <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	10	60
Relación MP/S (g/ml)	x <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	1/10	1/40
pH	x <sub>5</sub>	X <sub>5</sub>	7	11

**Cuadro 8: Variables Independientes y sus niveles evaluados en la optimización**

VARIABLE INDEPENDIENTE	CODIFICADO	NO CODIFICADO	NIVELES				
			-2	-1	0	1	2
Temperatura (° C)	x <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	20	30	40	50	60
Tiempo de extracción (min)	x <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	5	35	65	95	125
Relación MP/S (g/ml)	x <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	1/10	1/20	1/30	1/40	1/50
pH	x <sub>5</sub>	X <sub>5</sub>	7	8	9	10	11

**Cuadro 9: Arreglo del Diseño central compuesto generado de la etapa de la optimización de la extracción de la proteína de la cañihua.**

CORRIDA	VARIABLES CODIFICADAS <sup>a</sup>				VARIABLES NO CODIFICADAS			
	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>
1	-1	-1	-1	-1	30	35	1/20	35
2	0	0	0	0	40	65	1/30	65
3	1	-1	1	-1	50	35	1/40	35
4	-2	0	0	0	20	65	1/30	65
5	-1	1	1	-1	30	95	1/40	95
6	0	0	2	0	40	65	1/50	65
7	1	-1	-1	1	50	35	1/20	35
8	-1	1	-1	1	30	95	1/20	95
9	-1	1	1	1	30	95	1/40	95
10	0	0	0	0	40	65	1/30	65
11	1	1	-1	1	50	95	1/40	95
12	0	0	0	0	40	65	1/30	65
13	-1	1	-1	-1	30	95	1/20	95
14	0	0	0	0	40	65	1/30	65
15	1	1	1	1	50	95	1/40	95
16	1	-1	1	1	50	35	1/40	35
17	0	0	0	-2	40	65	1/30	65
18	1	1	-1	-1	50	95	1/20	95
19	0	2	0	0	40	125	1/30	125
20	0	-2	0	0	40	5	1/30	5
21	1	-1	-1	-1	50	35	1/20	35
22	1	1	1	-1	50	95	1/40	95
23	2	0	0	0	60	65	1/30	65
24	-1	-1	1	-1	30	35	1/40	35
25	-1	-1	-1	1	30	35	1/20	35
26	0	0	0	2	40	65	1/30	65
27	0	0	-2	0	40	65	1/10	65
28	0	0	0	0	40	65	1/30	65
29	-1	-1	1	1	30	35	1/40	35

<sup>a</sup> x<sub>2</sub>: Temperatura, x<sub>3</sub>: Tiempo, x<sub>4</sub>: Relación materia MP/S y x<sub>5</sub>: pH.

### **3.6.4. 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).

### **3.6.5. VALIDACIÓN DEL MODELO**

El programa estadístico *Statgraphics Centurión XV.II* calculó las condiciones óptimas de extracción bajo el diseño Compuesto Central para la respuesta ( $Y$ ). Se realizaron experimentos bajo los niveles optimizados de las variables independientes estudiadas (tres repeticiones). Los valores obtenidos experimentalmente se compararon con los valores estimados por el modelo.

### **3.7. ANÁLISIS DE DATOS**

Para el análisis estadístico de los resultados correspondientes a la etapa de screening se utilizó un análisis de varianza ANVA simple ( $p < 0,05$ ). Seguidamente para la optimización se siguió un diseño experimental con los factores que tuvieron efectos significativos en la primera etapa y se aplicó la Metodología de Superficie de Respuesta para la optimización de las proteínas extraídas. Para la primera etapa (Screening) se utilizó el programa Minitab® versión 16.1.0 (Minitab Inc., US), para el cálculo de la curvatura; en la segunda etapa (Optimización) se utilizó los 2 programas el programa estadístico *Statgraphics Centurión XV. II*. Y Minitab® versión 16.1.0 (Minitab Inc., US), con el primer programa se optimizo y valido el modelo y con el segundo programa se calculó la deseabilidad.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 10 se presenta el análisis proximal de la harina de cañihua desgrasada empleada en la presente investigación. De manera comparativa se indica en el mismo cuadro los valores para otros pseudo-cereales andinos como referencia. Es de destacar su alto contenido de proteína comparado con las otras fuentes como la quinua y la kiwicha.

Para la obtención de aislados o concentrados de proteína se han estudiado y propuestos diferentes materias primas como: trigo, arroz, sorgo; soya, semillas de girasol, maní y otras semillas oleaginosas. No obstante hasta el momento, son los cereales, la principal fuente por contener más del 12 por ciento de proteína y por ser un cultivo extendido en todo el mundo.

El contenido de proteína obtenido para la harina desgrasada de cañihua (17.6%) se encuentra dentro del rango de 12 a 23 por ciento reportado por otros investigadores para este grano (Abugoch *et al.* 2008, González *et al.* 1989, Karyotis *et al.* 2003, White *et al.* 1955, DeBruin 1964, Gross 1989, Repo-Carrasco 2003, Repo-Carrasco 2009 y Ramos-Díaz *et al.* 2016). En comparación con los cereales, el contenido total de proteína es mayor que el de la cebada (11 %), arroz (7,5 %) y el maíz (13,4 %) (Abugoch *et al.* 2008) pero menor comparado con el contenido en semillas de leguminosas (22,75 a 37,9 %) reportados por Ogunbenle (2006).

Respecto al contenido de grasa, se observa que no obstante existir una reducción importante del contenido de grasa inicial (6-7%, FAO 2000) después de la operación de desengrasado aún queda un nivel residual de grasa de 2.4 por ciento. Es importante el control de este contenido a través de la etapa de desengrasado debido a que la presencia de lípidos provoca la formación de emulsiones estabilizadas por las proteínas durante la solubilización alcalina, las cuales son resistentes a la centrifugación reduciendo la recuperación (Fennema 2000). Otra investigación también ha reportado que los lípidos no son eliminados completamente después de un desgrasado con hexano, quedando como remanentes asociados con la proteína lo cual pudiera afectar el sabor (Rackis *et al.* 1979), y el valor nutricional de los aislados (Kikugawa *et al.* 1981 y Lqari *et al.* 2002).

Jauricque *et al.* (2011), estudiaron la extracción de proteínas de maíz a través de la solubilización en medio alcalino y su precipitación en el punto isoelectrico. En esta investigación partiendo de una harina con un contenido de grasa de 5 por ciento y desgrasada hasta un contenido de  $2.82 \pm 0.72$  por ciento, se obtuvo después del proceso de extracción un concentrado proteico con un contenido final de 1.19 por ciento, nivel que estaría favoreciendo la estabilidad del producto a través de la reducción de reacciones de oxidación de lípidos. Por estos resultados se puede afirmar que la extracción alcalina contribuye a la purificación de los concentrados y aislados de sustancias no deseables como azúcares, fibra y lípidos (Kain *et al.* 2009).

Los contenidos de los otros componentes se encuentran dentro de los rangos reportados por otras investigaciones. La presencia de fibra cruda y un alto contenido de extracto libre de nitrógeno (carbohidratos) podrían predecir la probable interferencia en la recuperación de la proteína y la pureza del extracto a obtener.

**Cuadro 10: Análisis proximal de la harina de cañihua desengrasada empleada comparada con otros pseudo-cereales andinos de referencias**

ANÁLISIS	CAÑIHUA VARIEDAD CUPIS		QUINUA <sup>1</sup> (b.s)	KIWICHA <sup>1</sup> (b.s)
	(b.h)	(b.s)		
<b>Humedad (%)</b>	11.9	-	-	-
<b>Proteína Total (N * 5.85) (%)</b>	15.4	17.6	14.4	14.5
<b>Grasa (%)</b>	2.4	2.8	6	6.4
<b>Fibra cruda (%)</b>	4.4	5.0	4	5
<b>Ceniza (%)</b>	3.4	3.9	2.9	2.6
<b>Extracto libre de nitrógeno (%)</b>	61.8	70.7	72.6	71.5

Donde b.h y b.s corresponden a base húmeda y base seca, respectivamente. <sup>1</sup> Repo- Carrasco *et al.* 2003.

#### 4.1. SCREENING

Numerosas variables pueden tener efecto sobre la respuesta de un sistema en estudio y es prácticamente imposible identificar y controlar las pequeñas contribuciones de cada una. Por lo tanto, es necesario seleccionar aquellas con efectos importantes. Diseños de screening deben ser conducidos para determinar las variables experimentales y sus interacciones que presentan efectos significativos. Diseños factoriales de dos niveles completo o fraccionado se pueden utilizar para este objetivo principalmente porque son eficientes y económicos (Almeida *et al.* 2008).

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 de poca significancia (Ayala y Pardo, 1995).

Después de la identificación de los parámetros importantes, se determina la dirección en la que se encuentran mejoras y los niveles de éstos parámetros (Bas y Boyaci, 2007).

De acuerdo a los resultados de las investigaciones publicadas sobre extracción de proteínas en diversas fuentes como: cereales, tubérculos y leguminosas, los siguientes factores han sido identificados por tener efecto en la extracción de las mismas: pH, temperatura, relación MP/S, concentración de NaCl (fuerza iónica del medio de extracción), tiempo de extracción, (Martínez *et al.* 2013, Rodrigues *et al.* 2012, Mizubuti *et al.* 2000, Quanhong y Caili 2005 y Kain *et al.* 2009), por lo que fueron elegidos para ser estudiados en esta etapa bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2k siendo el criterio de optimización maximizar el rendimiento de extracción.

El correcto uso de los diseños experimentales lleva a los experimentadores a reducir complejos experimentos a través de la identificación de factores claves que gobiernan a las variables respuesta. El diseño factorial 2k con 3 puntos centrales que se seleccionó para esta etapa, es muy eficiente en este tipo de experimentos, dado que permite investigar todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores y logra identificar los factores más importantes que influyen significativamente sobre una respuesta.

Los niveles de las variables independientes, sus codificaciones y los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 11. El diseño contempló 35 tratamientos: 32 corridas experimentales con 3 puntos centrales.

Los resultados experimentales del rendimiento en proteína extraída (%) para las 35 corridas fluctuaron en el rango comprendido entre 20.7 y 80.7 por ciento, para los niveles de los factores: NaCl=0 por ciento, T=60 °C, tiempo=60 minutos, MP/S=1/10, pH=7 y NaCl=0 por ciento, T=25 °C, tiempo=10 minutos, MP/S=1/40, pH=11 respectivamente.



**Cuadro 11: Arreglo Factorial (2<sup>5</sup>) con repeticiones en el centro, variables codificadas, respuesta experimental (observado) y estimada en la etapa de screening**

CORRIDA	VARIABLE CODIFICADA <sup>1</sup>					RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS %	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	OBSERVADO, Y	ESTIMADO, Y
1	-1	-1	-1	-1	-1	51.93	48.50
2	1	-1	-1	-1	-1	64.62	68.35
3	-1	1	-1	-1	-1	43.30	39.13
4	1	1	-1	-1	-1	59.13	61.01
5	-1	-1	1	-1	-1	44.65	43.45
6	1	-1	1	-1	-1	67.10	64.94
7	-1	1	1	-1	-1	20.79	28.73
8	1	1	1	-1	-1	54.88	52.24
9	-1	-1	-1	1	-1	48.88	53.44
10	1	-1	-1	1	-1	63.23	62.80
11	-1	1	-1	1	-1	48.49	46.77
12	1	1	-1	1	-1	58.62	58.16
13	-1	-1	1	1	-1	48.85	48.85
14	1	-1	1	1	-1	60.95	59.84
15	-1	1	1	1	-1	38.85	36.82
16	1	1	1	1	-1	48.69	49.84
17	-1	-1	-1	-1	1	68.71	70.28
18	1	-1	-1	-1	1	66.26	65.31
19	-1	1	-1	-1	1	61.82	63.32
20	1	1	-1	-1	1	60.56	60.38
21	-1	-1	1	-1	1	70.36	70.78
22	1	-1	1	-1	1	65.47	67.45
23	-1	1	1	-1	1	61.13	58.46
24	1	1	1	-1	1	58.87	57.16
25	-1	-1	-1	1	1	80.72	79.54
26	1	-1	-1	1	1	68.00	64.09
27	-1	1	-1	1	1	72.45	75.27
28	1	1	-1	1	1	61.57	61.85
29	-1	-1	1	1	1	81.29	80.50
30	1	-1	1	1	1	63.86	66.68
31	-1	1	1	1	1	72.58	70.87
32	1	1	1	1	1	57.45	59.08
33	0	0	0	0	0	64.52	64.55
34	0	0	0	0	0	64.05	64.55
35	0	0	0	0	0	65.08	64.55

<sup>1</sup> X<sub>1</sub>: Concentración de NaCl (M); X<sub>2</sub>: T (°C); X<sub>3</sub>: Tiempo de extracción (min); X<sub>4</sub>: Relación Materia prima/solvente (g/ml); X<sub>5</sub>: pH

El análisis de variancia que se muestra en el Cuadro 12 indica que los cinco factores tuvieron efecto significativo en la extracción de la proteína, presentando una significancia con un  $p < 0.05$ . El coeficiente de determinación  $R^2$ ajustado = 0.9160 fue satisfactorio siendo mayor a 0.80, nivel que garantiza un buen ajuste del modelo (Joglekar y May 1999).

**Cuadro 12: Resultados de análisis de variancia del diseño factorial  $2^5$  utilizado en la etapa de screening**

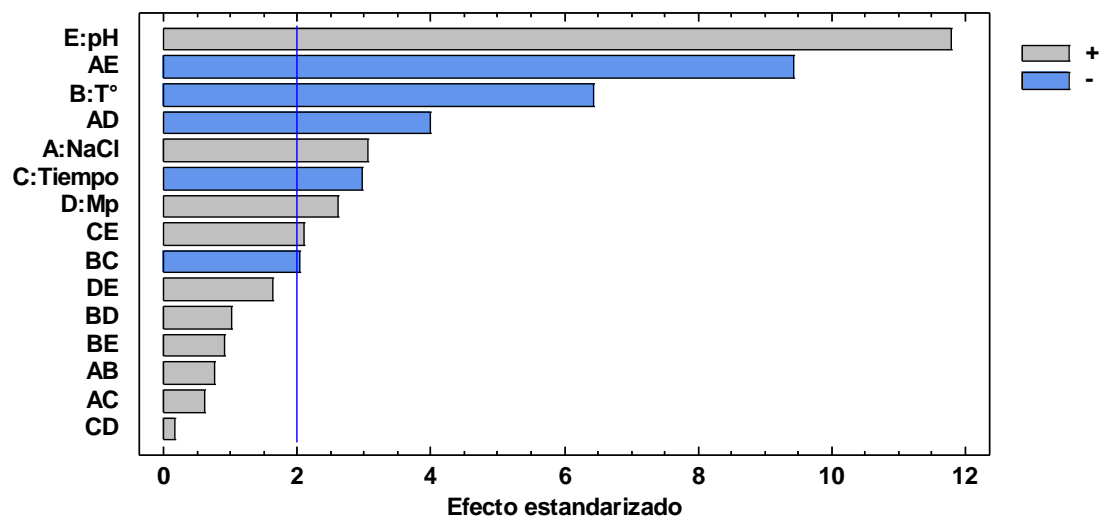
FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRA DO MEDIO	VALOR FC	VALOR - P	SIG.
<b>Modelo</b>	2845.81	15	519.16	48.16	0.000	***
<b>X<sub>1</sub></b>	129.85	1	129.85	10.99	0.004	**
<b>X<sub>2</sub></b>	575.45	1	575.45	48.69	0.000	***
<b>X<sub>3</sub></b>	122.15	1	122.15	10.34	0.005	**
<b>X<sub>4</sub></b>	94.19	1	94.19	7.97	0.011	**
<b>X<sub>5</sub></b>	1924.17	1	1924.17	162.82	0.000	***
<b>X<sub>1</sub>.X<sub>2</sub></b>	8.26	1	8.26	0.70	0.414	n.s
<b>X<sub>1</sub>.X<sub>3</sub></b>	5.35	1	5.35	0.45	0.510	n.s
<b>X<sub>1</sub>.X<sub>4</sub></b>	220.19	1	220.19	18.63	0.000	***
<b>X<sub>1</sub>.X<sub>5</sub></b>	1231.32	1	1231.32	104.19	0.000	***
<b>X<sub>2</sub>.X<sub>3</sub></b>	57.46	1	57.46	4.86	0.041	*
<b>X<sub>2</sub>.X<sub>4</sub></b>	14.50	1	14.50	1.23	0.283	*
<b>X<sub>2</sub>.X<sub>5</sub></b>	11.54	1	11.54	0.98	0.336	*
<b>X<sub>3</sub>.X<sub>4</sub></b>	0.41	1	0.41	0.04	0.854	n.s
<b>X<sub>3</sub>.X<sub>5</sub></b>	61.49	1	61.49	5.20	0.035	*
<b>X<sub>4</sub>.X<sub>5</sub></b>	37.37	1	37.37	3.16	0.092	*
<b>Curvatura</b>	78.82	1	78.82	6.67	0.019	*
<b>Error residual</b>	212.72	18	11.82			
<b>Falta de ajuste</b>	212.19	16	13.26	49.87	0.020	n.s
<b>Error puro</b>	0.53	2	0.27			
<b>Total</b>	4785.24	34				
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9555					
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0.9160					

\* 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  $\alpha=0,001$ .

X<sub>1</sub>: Concentración de NaCl (M); X<sub>2</sub>: T (°C); X<sub>3</sub>: Tiempo de extracción (min); X<sub>4</sub>: Relación Materia prima/solvente (g/ml); X<sub>5</sub>: pH

La importancia de cada factor en la prueba de screening también se muestra en el Diagrama de Pareto estandarizado (Figura 8), donde se presenta el efecto de los diferentes factores evaluados en orden decreciente, así como las tendencias positivas y negativas sobre la respuesta evaluada. La longitud de cada barra es proporcional al impacto de cada efecto en la respuesta. Cao *et al.* (2011) indican que el diagrama de Pareto se compone de barras con una longitud proporcional al valor absoluto de los efectos estimados, dividido por el error estándar. Cualquier barra que se extiende más allá de la línea vertical, que representa el nivel de significación seleccionado (5 %), es estadísticamente significativa.



A: Concentración de NaCl (M); B: T (°C); C: Tiempo de extracción (min); D: Relación Materia prima/solvente (g/ml); E: pH

**Figura 8: Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados según el modelo factorial (2<sup>5</sup>)**

Los factores en orden decreciente de importancia fueron: pH > temperatura > NaCl > tiempo > relación MP/S. Entre los factores evaluados se observa que la temperatura y el tiempo presentaron efectos negativos lo que indicaría que conforme los valores de estos factores son mayores se consiguen menores rendimientos, los demás factores presentan efectos positivos.

En el rango de pH estudiado (7-11) existe un efecto significativo de esta variable, se observa un incremento del rendimiento de extracción con el incremento del nivel de pH. Similar comportamiento ha sido reportado en otros estudios de extracción de proteína con soja (Anon *et al.* 2001), arroz (Wang *et al.* 1999), guisante (Tömösközi *et al.* 2001), amaranto

(Salcedo-Chávez *et al.* 2002) y quinua (Goundan 1992, Aora y alvarado 2009 y Lindeboom 2005).

Esta tendencia también ha sido reportado en otra investigación con proteína de quinua y fue atribuida al alto contenido de aminoácidos ácidos los cuales tienden a ser ionizados bajo altos niveles de pH (Alsohaimy *et al.* 2007). Otras explicaciones de este comportamiento son reportadas por la literatura y se mencionan a continuación.

La solubilidad de proteínas, especialmente en medio acuoso depende de la extensión en la cual la interacción proteína-agua predomina sobre la interacción proteína-proteína (Zayas, 1997). Las proteínas en las células vegetales son difícilmente solubles en agua debido a su naturaleza hidrófoba y los enlaces disulfuro entre las moléculas de proteína (Shen *et al.* 2008).

En disolución acuosa, los residuos hidrofóbicos de las proteínas se acumulan en el interior de la estructura, mientras que en la superficie aparecen diversos grupos con carga eléctrica, en función del pH del medio (Badui 2006). En torno a los grupos cargados, los dipolos del agua se orientan conforme a la carga eléctrica de cada grupo, de tal manera que la proteína presenta una capa de solvatación formada por el agua de hidratación, que es el agua retenida por las cargas eléctricas de la superficie de las proteínas, donde interaccionan con el agua mediante puentes de hidrógeno (Shen *et al.* 2008). La solubilidad es por tanto una propiedad que depende en gran parte de la interacción proteína-agua y se verá favorecida por los factores que incrementan esta interacción como el pH, la temperatura y la fuerza iónica (Vioque *et al.* 2001).

El uso de soluciones alcalinas ha sido ampliamente reconocido como método efectivo para extracción de proteínas de fuentes vegetales. No obstante su efectividad depende de las condiciones de extracción tales como: la concentración del agente alcalino, temperatura de extracción, tiempo, ratio volumen de solvente /peso del material (Guo *et al.* 2005, Sun y Tian, 2003). En la medida en que la ionización de las cadenas laterales de aminoácidos cargados es dependiente del pH, este factor determina la conformación de las proteínas. La distribución de cargas superficiales que determina la carga iónica global de la proteína, tiene un impacto en la interacción de las proteínas entre ellas y con el solvente (Creighton, 1993).

A valores de pH bajos, la mayor parte de los grupos carboxilo y amino de las cadenas laterales de aminoácidos se protonan bajo las formas  $-\text{COOH}$  y  $\text{NH}_3^+$ , respectivamente, siendo la carga global de la mayoría de las moléculas de proteína positiva. A medida que el pH aumenta algunos de los grupos carboxilo se disocian en  $-\text{COO}^-$  y  $\text{H}^+$  en función de sus constantes de disociación y las cargas positivas asociadas (Cherry y McWatters 1975). En este punto, la proteína no puede ser hidratada por las moléculas de agua, debido a las modificaciones de sus estructuras terciarias y cuaternarias por lo que su solubilidad alcanza un valor mínimo. El equilibrio en cargas positivas y negativas minimiza la repulsión electrostática, promoviendo la agregación y reduciendo la solubilidad de las proteínas (Kinsella 1979, Creighton 1993). A medida que el pH aumenta aún más, los grupos aminos se disocian en  $-\text{NH}_2$  y  $\text{H}^+$  y la carga total de las proteínas se hace negativa debido a la presencia de grupos  $-\text{COO}^-$  y en consecuencia se incrementa la interacción con el agua y por lo tanto la solubilidad de la proteína (Cherry y McWatters 1975). A este nivel la carga neta es mayor por lo que existe una mayor la repulsión electrostática y consecuentemente la solubilidad de la proteína aumenta (Creighton, 1993, Shen *et al.* 2008).

En conclusión, en ambos extremos de la escala de pH, la repulsión electrostática mejora y aumenta la solubilidad (Kain *et al.* 2009), las cadenas proteicas que llevan cargas eléctricas del mismo signo, tienen tendencia a repelerse y por tanto a disociarse y desdoblarse. Por tanto, la solubilidad y el rendimiento de la extracción, es mayor a pH alcalino que a pH ácido (Avia Ruiz *et al.* 2016).

En una investigación con proteína de quinua se señala que la solubilidad de sus aislados está relacionada al balance hidrofílico-hidrofóbico de sus proteínas y la termodinámica de su interacción con el solvente, los estudios en este pseudo-cereal demostraron que la solubilidad de su proteína también es pH dependiente, alcanzando una máxima solubilidad de 75.21% a pH 10 (Elsouhaimy *et al.* 2015). Recientes estudios reportaron para este pseudo cereal un máximo rendimiento de proteína de 76.3 por ciento a pH 11 y 0.1 N NaCl (Guerrero-Ochoa *et al.* 2015) y 74.3 por ciento a pH 11 (Avia Ruiz *et al.* 2016).

Se hace referencia a los estudios conducidos en proteína de quinua por la similitud de la riqueza proteica y el perfil de aminoácidos que podría predecir el comportamiento de la proteína de cañihua al ser ambos de la misma familia *Chenopodiaceae*.

No obstante los resultados hay que tener en cuenta que pH más altos aunque son más eficientes en la extracción de proteínas, deben ser evitados debido a la posibilidad de desorganización de la estructura de la proteína e impacto negativo en aminoácidos esenciales como la lisina donde se genera lisinoalanina, resultando en una pérdida de la digestibilidad y el valor biológico de la proteína (Cerletti *et al.* 1978, Sgarbieri *et al.* 1978 y Finot, 1997).

Por otro lado, se ha demostrado que el pH de extracción influye drásticamente en las propiedades funcionales de las globulinas de quinua. Calentamiento a pH alcalino (10.5) mejora la solubilidad y la actividad emulsionante, y también forma un gel con una estructura regular y alto módulo de almacenamiento tras la acidificación de la solución. El calentamiento a pH ligeramente alcalino (8.5 a 9.5) da lugar a la formación de un coágulo débil, mientras que las proteínas calentadas a un pH neutro no forman una estructura (Mäkinen *et al.* 2015 y Mäkinen *et al.* 2016).

Finalmente, un aspecto a tener en cuenta como una ventaja es que la extracción alcalina además de favorecer un mayor rendimiento de extracción de las proteínas, tiene el efecto adicional de contribuir en la remoción de componentes indeseables en el aislado proteico (fibra, azúcares, polifenoles, lípidos, alcaloides) y la preparación de un aislado proteico con cierta pureza (Vioque *et al.* 2001). Con este método Goncalves *et al.* (1997) eliminaron el 90 por ciento de componentes indeseables al obtener aislado proteico de colza.

Respecto al factor temperatura dado que éste parámetro influye en la conformación y el comportamiento hidrófilo de las proteínas y con el fin de evitar la desnaturalización irreversible de la proteína durante la extracción, la temperatura 60 °C se tomó como límite superior.

Generalmente en los procesos de extracción la temperatura es una variable independiente que incrementa la habilidad del solvente a solubilizar los componentes y, reduce la viscosidad del solvente líquido lo cual permite una mejor penetración del solvente en la matriz sólida (Samavati 2013). Por ejemplo, Zhang *et al.* (2009) encontraron un efecto positivo de la temperatura (20-80 °C) en la tasa de extracción de proteína de la semilla de algodón, explican esta tendencia señalando que cuando la temperatura aumenta, las moléculas se mueven rápidamente, desarrollando una mayor velocidad de transferencia de masa desde la superficie de contacto entre los sólidos y el líquido. Por lo tanto, el aumento

de la temperatura podría promover la transferencia de masa y la solubilidad, reduciendo la viscosidad de la solución. Sin embargo, también señalan que temperaturas muy altas podrían causar la reducción de la actividad de la proteína y su desnaturalización térmica.

Según el diagrama de Pareto, la temperatura es el segundo factor de importancia con un efecto negativo, lo que indica que para lograr la extracción es suficiente niveles bajos de temperatura, este resultado concuerda con lo obtenido por Foste *et al.* (2015) con salvado de quinua en donde un calentamiento desde temperatura ambiente (20 °C) a 25 °C sólo implica un 6 por ciento adicional en la solubilidad, no habiendo ningún aumento adicional para niveles más altos de temperatura. Temperaturas más bajas son ventajosas porque reduce los costes de fabricación y las modificaciones químicas.

Guerrero-Ochoa *et al.* (2015) encontraron una tendencia similar en la extracción de proteína de quinua, los autores indicaron que ello podría deberse a que un incremento de la energía cinética generada debido al incremento de la temperatura provocaría la exposición de los grupos no polares de la proteína (provocada por su desnaturalización), con el consecuente decrecimiento en su solubilidad (Chi *et al.* 2003). Según Goundan (1992) este efecto negativo principalmente ocurre con proteínas globulares hidrofóbicas. La cañihua presenta proteínas globulares de naturaleza predominantemente hidrofóbicas (Brinegar *et al.* 1996) lo que podría explicar el resultado expuesto.

En un estudio de extracción de proteína de frijol se encontró que el rendimiento se incrementó con el incremento de la temperatura hasta 30 °C y decreció bajo niveles más allá de 30 °C (Wang *et al.* 2011). En otro estudio con proteína de maní el rendimiento de extracción fue dependiente de la temperatura con óptimos rendimientos a 40 °C, mientras que más altas temperaturas, registraron más bajos rendimientos siendo más acentuado el descenso cuando la temperatura se incrementó a 70 °C (Kain *et al.* 2009). En un estudio con proteína de soya se reporta una tendencia decreciente en el rendimiento en el rango de temperatura desde 30 °C hasta 50 °C, acentuándose esta tendencia hasta 70 °C (Rosenthal *et al.* 1998).

La disminución en el rendimiento se puede atribuir a la degradación térmica de las proteínas. Sathe *et al.* (1982) señalan la formación de agregados insolubles con las proteínas ricas en azufre de la harina de soja cuando se calienta a 70 °C o por encima. Esta agregación depende

de varios factores entre ellos el medio de calentamiento. Puesto que, la extracción se llevó a cabo en medio acuoso, la disminución de la producción de proteína puede haber sido debido a la reducción de la solubilidad de la proteína con el aumento de la temperatura. Las altas temperaturas pueden mejorar la exposición de los residuos hidrofóbicos, que contribuyen a la reducción de la solubilidad de proteínas en general (Aider *et al.* 2011).

En procesos de extracción de proteína altas temperaturas no son favorables, debido no sólo a la reducción del rendimiento por coagulación de la proteína (Tangka 2003) e hidrólisis de la proteína (Bals y Dale 2011) sino porque pueden también reducir la calidad de la proteína como resultado de desnaturalización, hidrólisis o racemización de aminoácidos (Zhu *et al.* 2010).

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

Como regla general, la solubilidad de las proteínas aumenta, cuando la temperatura se eleva de 0 a 40-50°C. Por encima de 40-50°C el movimiento de las moléculas es suficiente para romper los enlaces implicados en la estabilización de las estructuras secundaria y terciaria. Esta desnaturalización va seguida, frecuentemente, de una agregación y la solubilidad de la proteína desnaturalizada llega ser inferior a la de la proteína nativa.

El tercer factor de importancia en la extracción, señalado por el Diagrama de Pareto (Figura 8) es la concentración de cloruro de Sodio (NaCl) con un efecto positivo. Rodríguez *et al.* (2012) mencionan que la solubilización de las proteínas 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 sales. Las sales aumentan la fuerza iónica de la solución y, como resultado, la solubilidad de las proteínas aumenta (Lestari *et al.* 2010).

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  $\text{MgCl}_2$  y el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , son mucho más eficaces en la solubilización de las proteínas que las sales de iones monovalentes tales como el  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$  y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Las capacidades de las sales neutras para influir en la solubilidad de las proteínas están 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 es causado por cambios de tendencia a la ionización de los grupos -R disociables de la proteína (Nelson y Cox, 2001).

Makkar (2008) menciona que en la extracción acuosa de proteína de torta de semillas de *Jatropha* en presencia de  $\text{NaCl}$  y bajo un rango de concentración de 0.3-0.6M y manteniendo constante los factores de pH y temperatura (pH 10, 60 °C), hay una menor recuperación de proteínas según aumenta la concentración de  $\text{NaCl}$ .

Elsohaimy *et al.* (2015) estudiaron el efecto de añadir  $\text{NaCl}$  bajo diferentes concentraciones sobre la extracción de proteína de quinua, sus resultados revelan que a concentraciones en el rango de 0-0.5M la presencia de  $\text{NaCl}$  tiene un efecto significativo en la solubilidad, no habiendo diferencias significativas en el rango 0.5-1M. En otro estudio Parakash (1986) reportó para el caso de semillas de sésamo un incremento en el rendimiento de extracción bajo concentraciones en el rango 0.05-2M. En otro estudio, la extracción de proteína de semilla de moringa fue también más alta bajo una concentración de 0.6 M (Makkar *et al.* 2008).

Por lo expuesto, al parecer la presencia de  $\text{NaCl}$  puede afectar negativamente en la solubilidad de la proteína en rangos de pH específicos. Por ejemplo, se ha encontrado bajas solubilidades en habas, lentejas y garbanzos a pH arriba de 7.5 o bajo pHs entre 1.0 -3.0, comportamiento que podría ser atribuido a un incremento de las interacciones hidrofóbicas (Foste *et al.* 2015). Estos mismos autores mencionan que las interacciones hidrofóbicas son la fuerza conductora para agregaciones proteína-proteína conduciendo a la insolubilización de las proteínas. Makkar *et al.* (2008) también reportaron que  $\text{NaCl}$  afecta negativamente a la solubilidad de la proteína mediante el aumento de la fuerza iónica en soluciones, resultando en una mayor interacción hidrófoba entre las moléculas de proteína y la disminución de la solubilidad de proteínas.

Es evidente por éstos reportes que el efecto de la concentración de NaCl sobre la extracción de proteína depende del valor pH, según su nivel, la adición de sal a una suspensión de proteínas puede afectar a la densidad de carga neta de las proteínas y por lo tanto modificar la solubilidad mediante la mejora o reducción de repulsiones inter-moleculares (Aider *et al.* 2011). Este comportamiento también se estaría presentando en la presente investigación al presentar un efecto significativo de la interacción NaCl x pH según el Diagrama de Pareto (Figura 8).

Como conclusión de los resultados de las investigaciones que se han mencionado se puede afirmar que los iones de sales neutras, con molaridades comprendidas entre 0.5 y 1.0 M, pueden aumentar la solubilidad de las proteínas (*salting in* o salazón), los iones de las sales reaccionan con las cargas de las proteínas y rebajan la atracción electrostática entre las cargas opuestas de grupos próximos de la misma proteína. Los cationes y los iones de las sales neutras reaccionan con las cargas de los residuos de los aminoácidos de las cadenas laterales y este efecto hace que disminuyan las interacciones proteína-proteína (disminución de las fuerzas repulsivas y un aumento de las fuerzas atractivas).

Si la concentración de las sales neutras es superior a 1.0 M, la solubilidad de las proteínas decrece y puede conducir a una precipitación. Este efecto se conoce como *Saltin -out*, desalado; este efecto resulta de 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. En estas condiciones, las interacciones proteína-proteína resultan más importantes que las interacciones proteína-agua y esto puede conducir a una agregación seguida de una precipitación de las moléculas proteicas.

Por lo expuesto anteriormente y a fin de evaluar el efecto real de la presencia de NaCl sobre el rendimiento de extracción en el rango de pH de altos rendimientos se decidió estudiar el efecto de la concentración del NaCl a 0, 1 y 2 M a los pH de 9.0 y 10.5, manteniendo constantes los factores de temperatura a 20 °C, tiempo de 10 min y relación MP/S de 1/40, los resultados se presentan en el Cuadro 13.

**Cuadro 13: Efecto de la concentración de NaCl y pH sobre el rendimiento de extracción de proteínas de la cañihua**

CONCENTRACIÓN MOLAR (M)	RENDIMIENTO DE PROTEINAS (%)	
	FACTORES CONSTANTES: TEMPERATURA: 20 °C, TIEMPO: 10 MINUTOS, RELACIÓN MP/S: 1/40.	
	PH=9	PH=10.5
NaCl= 0 M	65.0 ± 1.52 <sup>a</sup>	73.0 ± 1.99 <sup>a</sup>
NaCl= 1 M	66.8 ± 1.59 <sup>a</sup>	64.0 ± 2.43 <sup>b</sup>
NaCl= 2 M	63.1 ± 4.49 <sup>a</sup>	63.9 ± 2.01 <sup>b</sup>

Las letras diferentes en las columnas indican que existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Los resultados corroboran la relación del efecto de la presencia de NaCl con el nivel de pH. Cuando se trabajó a pH 9 los rendimientos obtenidos bajo las tres concentraciones de sal no tuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). A pH 10.5 el empleo del cloruro de sodio en el rango de concentración estudiada (1-2 M) no aseguró una mayor extracción, por el contrario, fueron menores a los obtenidos sin la presencia de NaCl. Estos resultados permiten concluir que al nivel de pH de 10.5 y bajo las concentraciones de sal estudiados, se esté presentando un medio favorable al fenómeno *salting-out*, debido probablemente a valores de fuerza iónica elevada, que hayan propiciado que las cargas de la superficie de la proteína estén neutralizadas por lo que la hidratación y solubilización haya disminuido conduciendo a la precipitación de parte de las proteínas (Jeantet *et al.* 2010).

Esto es consistente con lo reportado por Ismond *et al.* (1990) quienes encontraron que valores de pH en el rango de 5 y 6.5 son más efectivos en la extracción de proteínas de leguminosas por soluciones salinas.

Por otro lado, el exceso de sal interfiere con las propiedades funcionales, tales como la capacidad de formación de espuma y su estabilidad y la capacidad emulsionantes y su estabilidad teniendo en ellos un efecto negativo (Adubiaro *et al.* 2012, Ogungbenle 2008). El efecto positivo de NaCl en la capacidad de formación de espuma se da solamente a bajas concentraciones (Andualem y Gessesse 2013).

Teniendo en cuenta estos resultados y considerando que la presencia NaCl en el extracto tiene como desventaja la disminución del contenido de proteína y hace necesario un proceso de purificación adicional tal como diálisis, provocando un aumento significativo del coste de producción y, por lo tanto, menos interesante para su traslado a una escala industrial (Lestari *et al.* 2010) no se incluyó este factor en la etapa de optimización.

Otro factor crítico para procesos de extracción es el tiempo, ya que tanto los procesos de difusión y degradación son dependientes del tiempo, por lo que es un factor importante a estudiar. El diagrama de Pareto indica un efecto negativo, aparentemente se logra extraer la mayor cantidad de proteína en los primeros minutos por lo que mayores tiempos podrían estar significando alguna degradación dependiente del nivel de temperatura y pH. Esto es positivo porque además de significar tiempos cortos de proceso con menores costos reduciría el impacto negativo de la exposición a soluciones alcalinas (Foste *et al.* 2015). El impacto del tiempo de extracción fue evaluado en salvado de quinoa no encontrándose diferencias significativas entre 30 minutos y 4 horas de extracción.

En varias investigaciones el tiempo es un parámetro significativo con efecto positivo. Patwari *et al.* (2015) reportaron un aumento de la extracción de proteína de harina de colza con el tiempo. El aumento de tiempo al parecer aumentó la interacción entre el disolvente y la harina lo que aumentó la extracción de proteína. Asimismo, señalan que el aumento del tiempo de extracción más allá de una hora conlleva a la formación de espuma en la solución, debido a la desnaturalización y la coagulación de la proteína de la matriz (Kanu *et al.* 2007). En la extracción de proteína de soya bajo las condiciones: agitación 200 RPM, pH 8, T 50 °C, MP/S 1:10 el mayor rendimiento se obtuvo entre 10-15 minutos. La rápida liberación de las proteínas se debe probablemente a la más baja trayectoria de difusión debido a la finura de la harina, que permite la liberación casi instantánea de la proteína solubilizada de las células citoplásmicas fraccionadas (Rosenthal *et al.* 1998).

El tiempo corto necesario para la extracción podría estar relacionado con el tamaño de la partícula. En un estudio conducido en soya se ha demostrado el efecto del tamaño de partícula en el rango de 100-1200  $\mu\text{m}$  en el rendimiento de extracción de proteína. Los resultados de esta investigación revelaron el efecto significativo de este factor, cuanto más bajo fue el tamaño de la partícula más alto fue el rendimiento de extracción. Si el mecanismo de extracción es controlado por la velocidad de difusión una fuerte dependencia de la

velocidad de extracción con el tamaño de partícula debe esperarse. En este estudio se señala que la liberación significativa de la proteína se da en las células fraccionadas donde el solvente puede penetrar fácilmente y las especies solubles e insolubles asociados con las células pueden ser liberadas al solvente, por lo que rendimiento es proporcional a las células rotas después del proceso de reducción de tamaño (Rosenthal *et al.* 1998).

El tamaño de partícula es de interés por estar relacionado con la superficie reactiva de partículas, que es de particular importancia para la capacidad de extracción de los componentes.

El impacto del tamaño de la partícula (250, 500, 750  $\mu\text{m}$ ) en la solubilidad de la proteína de salvado de quinua fue estudiado. La reducción del tamaño de la partícula hasta 250 micras resultó en significativamente mayor solubilidad de la proteína (67.7%) no obstante no fue muy diferente de lo obtenido a 500  $\mu\text{m}$  (Foste *et al.* 2015). Al parecer el tamaño de la partícula, función del grado de trituración determina la accesibilidad a la proteína hasta cierto nivel.

El Diagrama de Pareto también indica un efecto positivo de la relación materia prima solvente, esto es un incremento del rendimiento de la extracción de proteína con el incremento de la proporción de solvente en relación a la materia prima MP/S. El estudio de esta variable es importante debido a que si es demasiado pequeña el componente no puede ser completamente extraído, debido a que la harina absorbe el agua y la solución extractora se vuelve densa haciendo que la viscosidad de la solución aumente lo que dificulta la difusión molecular y en consecuencia la velocidad de extracción se reduce (Zhang *et al.* 2009) y si es demasiada alta encarece el proceso, por lo tanto, debe ser seleccionada una relación apropiada.

Uno de los importantes aspectos en la extracción de proteína a gran escala es el uso de una baja cantidad de solvente como sea posible, para obtener una recuperación de la proteína a una más alta concentración en el extracto crudo. El empleo de bajas cantidades de solvente reduce los costos de producción y la capacidad de los equipos lo cual finalmente incrementa la eficiencia del proceso completo (Lestari *et al.* 2010).

En la mayoría de procesos de extracción esta variable tiene efecto significativo sobre el rendimiento, una posible explicación es el incremento de la difusividad del solvente en las células lo cual mejora la desorción del componente (Samavati 2013). Bendahou *et al.* (2007) atribuyen esta tendencia al aumento de la fuerza impulsora del proceso de transferencia de masa.

Durante la extracción, la relación materia prima: solvente afecta la facilidad de difusión de la proteína de la materia prima a la solución y la concentración de saturación. Para alcanzar una tasa de extracción óptima, la cantidad de solvente debería ser lo suficientemente alto para facilitar una mejor difusión y para asegurar que la concentración de equilibrio esté por debajo de la concentración de saturación. En relación al tamaño del equipo, la menor cantidad de solvente o la más alta concentración de proteínas requerirá de equipos más pequeños (Lestari *et al.* 2010).

Shen *et al.* (2008) estudiaron la extracción de proteína de hojas de té (contenido de proteína: 21-28%) y encontraron que la velocidad de extracción aumenta casi linealmente con la relación materia prima/solvente hasta una relación de 1:40, verificándose poco cambio a niveles más altos. Explican esta tendencia que un mayor volumen de solvente significaría una concentración de proteína inferior en el mismo. Esto dará una diferencia de concentración de proteína más grande entre la fase sólida y el disolvente y, por lo tanto, una fuerza impulsora mayor para la transferencia de masa durante el proceso de extracción. Sin embargo, este efecto beneficioso disminuirá gradualmente cuando se utiliza un gran volumen de disolvente y no será compensado por la dificultad de tener que manejar el volumen adicional de solvente. Similar tendencia ha sido reportada por Kain *et al.* (2009) para proteína de maní. El mecanismo que regula la extracción de proteínas sigue una cinética de disolución y/o difusión. Esta cinética está gobernada por una fuerza conductora relacionada con el gradiente de la concentración del componente entre las fases sólida y líquida (Kain *et al.* 2009). La extracción de proteínas obedece al mecanismo de transferencia de masa sólido-líquido donde la extracción aumenta con la relación sólido / líquido hasta que se alcance una posición de equilibrio, después de la cual la extracción de soluto permanece relativamente constante (Prabhudesal 1988).

La extracción sólido-líquido puede ser considerada como un proceso de difusión que implica la transferencia de moléculas de proteínas a partir de un sólido a un solvente e incluye una serie de aspectos a tener en cuenta (Aguilera 2003). La microestructura de los sólidos afecta

a la permeabilidad de los solutos (proteínas) debido a los gradientes de presión, las fuerzas capilares y la propia matriz celular que induce a pasar moléculas pequeñas a una tasa más rápida que las más grandes, lo que resulta en una transferencia selectiva. Por otra parte, la cantidad de sustancias que fluirán a través de un área por unidad de tiempo es dependiente del coeficiente de difusión, la superficie y el gradiente de concentración (Fick de Ley) (Sussmann *et al.* 2011).

Otros valores son reportados para diversas fuentes, Kain *et al.* (2009) reportaron una relación óptima de 1:10 para proteína de maní, Tzeng *et al.* (1988) 1:20 para proteína de colza y maní y Aguilera y García (1989) reportan ratios entre 1:5 y 1:30.

En función a estos resultados se decidió seleccionar como factores a evaluar en la optimización de la extracción de la proteína de la cañihua: la temperatura, relación MP/S, pH y tiempo; así como también se volvió a definir los rangos a evaluar de los factores/variables en la MSR

## **4.2. 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 12) comprobó un efecto curvatura significativo.

## **4.3. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO**

La MSR explora la relación existente entre las variables explicativas y una o más variables respuesta (Cao *et al.* 2012) y esta puede aplicarse utilizando diversos diseños como el diseño central compuesto (DCC) de segundo orden. El DCC comprende una factorial donde están considerados dos niveles. El diseño factorial de dos niveles es escogido para llegar a estimar todos los efectos de primer orden y los términos de interacción de dos factores, adicionando puntos axiales y centrales que contribuyan con una curvatura necesaria para estimar el efecto cuadrático puro (Goundan 1992). Los valores experimentales del rendimiento de extracción de la proteína de la cañihua utilizando el DCC se presentan en el Cuadro 14.

**Cuadro 14: Resultados experimentales del diseño central compuesto de la etapa de la optimización referida al rendimiento de extracción de la proteína de la cañihua**

CORRIDAS	VARIABLES INDEPENDIENTES				RENDIMIENTO DE PROTEINA (Y, %)	
	X <sub>2</sub> Temperatura	X <sub>3</sub> Tiempo	X <sub>4</sub> MP/S <sup>3</sup>	X <sub>5</sub> pH	Experimental	Predicho
1	30	35	20	8	73.69 ± 0.45	71.14
2	40	65	30	9	77.17 ± 1.04	76.84
3	50	35	40	8	68.77 ± 1.74	69.37
4	20	65	30	9	72.20 ± 0.40	72.78
5	30	95	40	8	64.05 ± 1.02	63.67
6	40	65	50	9	68.30 ± 1.95	67.98
7	50	35	20	10	72.91 ± 1.76	72.71
8	30	95	20	10	81.37 ± 0.26	80.19
9	30	95	40	10	76.29 ± 2.27	75.52
10	40	65	30	9	76.71 ± 1.56	76.84
11	50	95	40	10	75.85 ± 1.38	77.62
12	40	65	30	9	79.59 ± 0.15	76.84
13	30	95	20	8	75.16 ± 0.27	72.93
14	40	65	30	9	75.90 ± 1.80	76.84
15	50	95	40	10	75.24 ± 1.68	77.21
16	50	35	40	10	78.45 ± 1.64	78.71
17	40	65	30	7	64.32 ± 1.28	67.86
18	50	95	20	8	73.44 ± 0.48	73.02
19	40	125	30	9	76.94 ± 0.42	76.13
20	40	5	30	9	72.49 ± 1.28	75.84
21	50	35	20	8	69.16 ± 0.92	67.96
22	50	95	40	8	67.71 ± 0.69	68.01
23	60	65	30	9	74.11 ± 1.38	71.29
24	30	35	40	8	72.03 ± 1.75	68.29
25	30	35	20	10	80.82 ± 0.30	78.55
26	40	65	30	11	85.46 ± 1.46	84.46
27	40	65	10	9	68.39 ± 0.88	71.25
28	40	65	30	9	74.84 ± 1.74	76.84
29	30	35	40	10	80.44 ± 0.12	80.28

<sup>3</sup>MP/S: Relación materia prima/solvente



Del Cuadro 14, se observa que el rendimiento de extracción de la proteína varió entre 64.0 y 85.4 por ciento. El máximo valor de proteína de cañihua recuperada fue superior al reportado para su pariente cercano la quinua (68.4%), reportado por Guerrero *et al.* (2015) utilizando mismo procedimiento de optimización. Rendimientos de extracción de 52.5, 66.2 y 65.4 por ciento para la pprika, maní y harina de soya, respectivamente, han sido previamente reportado utilizando la metodología del DCC (Firatligil-Durmus y Evaranuz 2010, Ma *et al.* 2010 y Rosset *et al.* 2014).

La aplicación de la MSR generó una ecuación de regresión, la cual establece la relación entre el rendimiento en proteína (Y, %) y las variables evaluadas. Así la ecuación fue la siguiente:

$$\text{Rendimiento} = 37.2 + 1.68 \text{ pH} + 0.124 \text{ Tiempo} + 0.667 \text{ Temperatura} + 0.010 \text{ MP/S} + 0.081 \text{ pH}^2 - 0.000460 \text{ Tiempo}^2 - 0.00804 \text{ Temperatura}^2 - 0.02006 \text{ MP/S}^2 - 0.0012 \text{ pH} \cdot \text{Tiempo} - 0.0664 \text{ pH} \cdot \text{Temperatura} + 0.1148 \text{ pH} \cdot \text{MP/S} + 0.00272 \text{ Tiempo} \cdot \text{Temperatura} - 0.00534 \text{ Tiempo} \cdot \text{MP/S} + 0.01065 \text{ Temperatura} \cdot \text{MP/S}$$

#### 4.3.1. (Ecuación 11).

El análisis de varianza ANOVA para el modelo cuadrático de la MSR-DCC se presenta en el Cuadro 15.

**Cuadro 15: Resultado del análisis de varianza para el modelo cuadrático de la metodología de superficie de respuesta correspondiente al rendimiento en proteína**

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	VALOR -F	VALOR-P	SIGNIFICANCIA
Modelo	601.332	14	42.952	9.05	0.000	***
Lineal	386.287	4	96.572	20.35	0.000	***
Cuadrática	117.011	4	29.253	6.16	0.004	*
Interacción	98.034	6	16.339	3.44	0.027	*
Error residual	66.451	14	4.747			
Falta de ajuste	53.352	10	5.335	1.63	0.338	n.s
Error puro	13.100	4	3.275			
Total	667.784	28				
R <sup>2</sup>	0.9005					
R <sup>2</sup> ajustado	0.8010					

\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0.05$ ; \*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0.01$ , \*\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha=0.001$ , n.s.= No significativo

En la evaluación estadística, el análisis de varianza del modelo cuadrático indica que es significativo ( $p < 0,005$ ). El término carencia de ajuste (lack of fit) que aparece en el ANOVA es un indicador de que tan bien el modelo predice los valores experimentales de la respuesta. Desde que éste no fue significativo ( $p > 0,05$ ), el modelo fue validado por lo que el modelo desarrollado representaría adecuadamente la relación entre los factores elegidos (Tan *et al.* 2014 y Jarpa-Parra *et al.* 2014).

Esto es confirmado al estimar el rendimiento de proteína para los diferentes tratamientos aplicando el modelo de regresión y compararlo con los valores experimentales (Cuadro 14), se observa un alto grado de correlación entre los valores experimentales y estimados con un R<sup>2</sup> de 0.9005 y el R<sup>2</sup> ajustado de 0.8010.

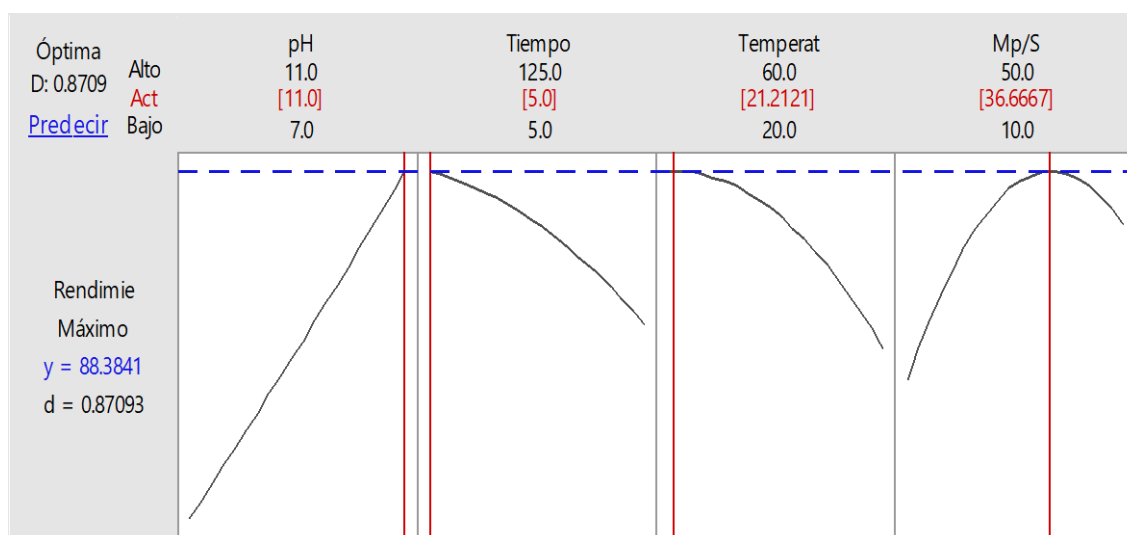
Firatligil-Durmus y Evranuz (2010) mencionan que el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) más cercano a la unidad, indica un ajuste razonable del modelo a los datos experimentales.

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).

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 y Quanhong y Caili 2005).

### 4.3.2. OPTIMIZACIÓN

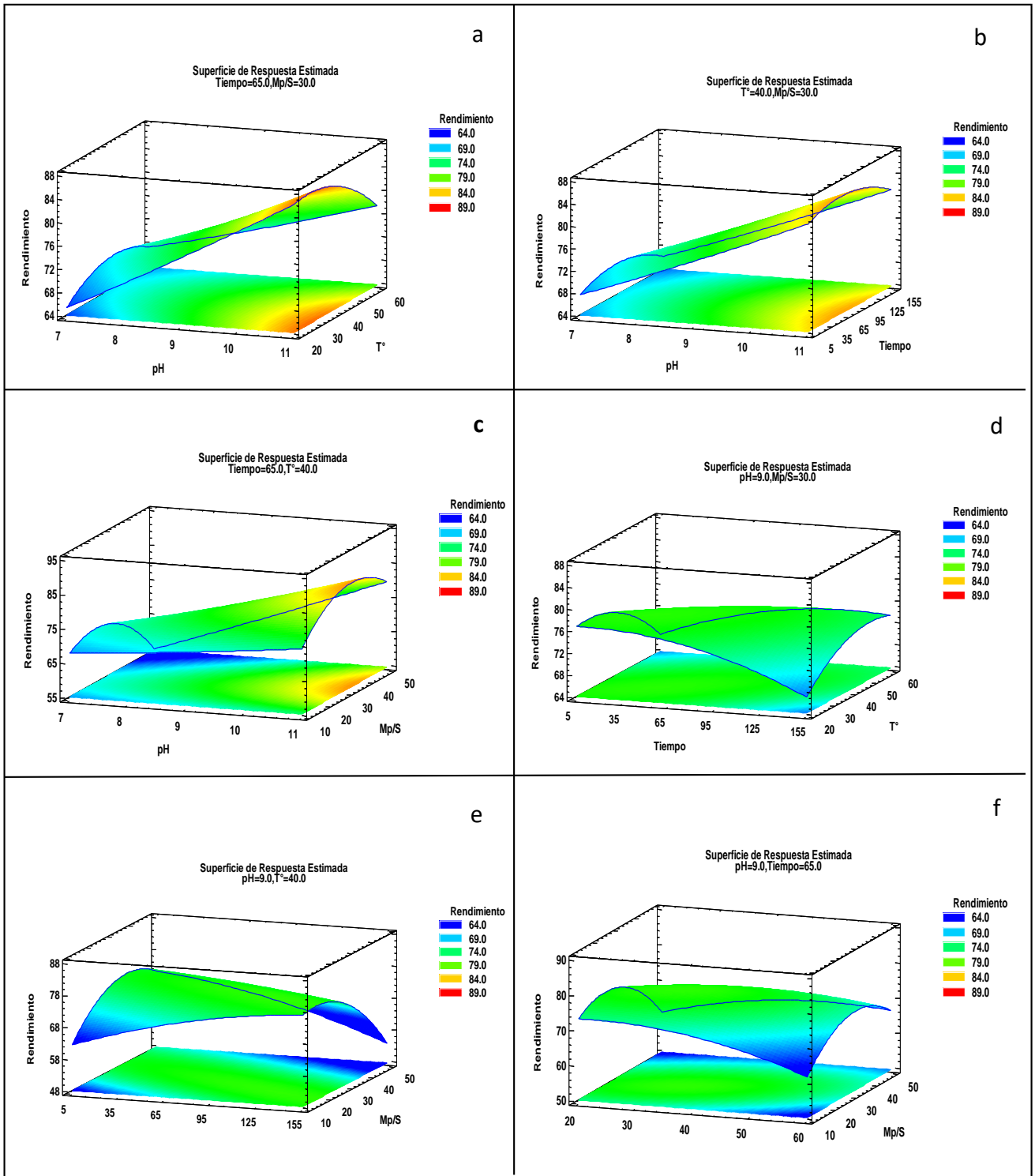
Las condiciones óptimas de extracción de las proteínas de la cañihua fueron estimadas por el método de deseabilidad, utilizando el programa Minitab (Figura 9). La variable dependiente se fijó al valor máximo de deseabilidad ( $d = 1,00$ ), en la Figura 9 se observa que el valor de la deseabilidad es de 0.8709, el cual se acerca mucho al valor máximo que es el valor 1. Las condiciones óptimas obtenidas correspondieron a una temperatura de 21.2 °C, relación MP/S de 1/36.6 (p/v), tiempo de 5 min y pH de 11, obteniéndose un rendimiento de proteína estimado de 88.38 por ciento.



**Figura 9: Diagrama de los efectos principales para el rendimiento de extracción de la proteína de la cañihua**

Las gráficas de los efectos principales, así como las superficies de respuesta obtenidas para los rendimientos de extracción de la proteína de la cañihua se presentan en las Figuras 9 y 10 respectivamente.

Gráficos de contorno 3D se elaboraron para demostrar los efectos principales e interacciones de las variables independientes sobre la variable dependiente. Estos gráficos (Fig. 10) se obtuvieron mediante la fijación de dos variables en codificado nivel cero, mientras que las otras dos variables varían para predecir la variable respuesta (rendimiento de extracción de proteína).



**Figura 10:** Gráficos de las superficies de respuesta para los efectos de: (a) pH vs temperatura, (b) pH vs tiempo, (c) pH vs relación MP/S, (d) tiempo vs temperatura, (e) tiempo vs relación (MP/S) y (f) temperatura vs relación MP/S sobre el rendimiento de extracción.

De las superficies mostradas en la Figura 10 a, b y c se observa nuevamente la tendencia al aumento del rendimiento con el aumento del valor de pH como se concluyó en la etapa de screening. Así mismo, se desprende de estos gráficos que altas temperaturas y tiempos prolongados en el intervalo de pH estudiado ejercen un efecto negativo sobre el rendimiento de extracción. Esto tendría su explicación en que los valores de pH extremos favorecen el desdoblamiento de la proteína y disminuye la estabilidad térmica de proteínas (Creighton 1993, Petruccelli y Añón 1996).

El efecto del pH y la temperatura sobre el rendimiento de extracción de la proteína se aprecia en la Figura 10a. Se observa que el pH tiene un efecto lineal con una pendiente positiva mientras que la temperatura tiene un efecto cuadrático sobre la extracción de la proteína; un efecto cuadrático similar pero más pronunciado se observa para el efecto relación MP/S frente a sus interacciones con el pH, tiempo y temperatura (Figura 10c, 10e y 10f). En la Figura 10b se expone la relación del pH con el tiempo, donde nuevamente el pH presenta un efecto lineal mientras que el tiempo presenta una tendencia ligeramente cuadrática. Finalmente, la interacción del tiempo con la temperatura (Figura 10d) muestra un efecto cuadrático para la temperatura y algo lineal con tendencia a una pendiente negativa para el tiempo. Los resultados indican que el incremento del pH, así como el llevar la relación MP/S hacia el punto central conduce a obtener los mayores rendimientos de extracción de la proteína de la cañihua.

Las condiciones óptimas para la extracción de la proteína de la cañihua fueron: pH de 11, tiempo de 5 minutos, temperatura de 21 °C y una relación MP/S de 1/37 alcanzándose un máximo de proteína extraída de 88.38 por ciento.

Este valor se encuentra entre el rango reportado por investigaciones en otras fuentes y en algunos casos superior. Por ejemplo en un estudio con proteína de colza se obtuvo un rendimiento del 88.9 por ciento a un pH de extracción de 10.5 y 97.3 por ciento a pH 12 (Lqari *et al.* 2002), en el caso de quinua ha sido reportado una máxima solubilidad a pH 10 (75.21%) (Elsohaimy *et al.* 2015), y en dos estudios recientes con esta misma materia prima se alcanza rendimientos de extracción de 76.3 por ciento a pH11 y 0,1 N NaCl (Guerreo-Ochoa *et al.* 2015) y 74.3 por ciento a pH 11 (Avia- Ruiz *et al.* 2016).

#### 4.4. VALIDACIÓN DEL MODELO

La idoneidad del modelo matemático generado para predecir el máximo rendimiento en proteína fue experimentalmente validada usando las condiciones determinadas en la optimización. Los valores de los rendimientos en proteína experimentales así como los valores predichos por el modelo generado se presentan en el Cuadro 16, de donde se observa que los valores experimentales son bastante cercanos al obtenido del modelo matemático, lo cual valida los resultados encontrados.

**Cuadro 16: Valor predicho y experimental del rendimiento de extracción de proteína de cañihua bajo las condiciones óptimas recomendadas por el modelo.**

CONDICIONES ÓPTIMAS RECOMENDADAS POR EL MODELO DE SEGUNDO ORDEN		RENDIMIENTO DE PROTEÍNA	
		PREDICHO	EXPERIMENTAL
Temperatura (°C)	21	88.38	85.15 ± 3.56 Rango: 81.59 – 88.71
Relación MP/S (mg/ml)	1/37		
pH	11		
Tiempo (min)	5.0		

Linden y Lorient (1996) mencionan que los pHs 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.

Condiciones altamente alcalinas pueden causar reacciones secundarias indeseables y potencial toxicidad debido a la formación de la lisinoalanina, y por consiguiente pérdida de su valor nutritivo. Entre estas reacciones se encuentran: (1) desnaturalización e hidrólisis de las proteínas; (2) aumento de la reacción de Maillard con formación de productos oscuros; (3) aumento de la extracción de los componentes no proteicos que co-precipitan con la proteína y disminuyen la calidad del aislado (Kolar *et al.* 1985 y Wang *et al.* 1999).

En el mismo sentido, una investigación conducida por Valenzuela *et al.* (2013) donde evaluaron el efecto de la extracción alcalina de proteína de quinua en el rango de pH 8-12 concluye que tratamientos alcalinos extremos arriba de pH 10 produce cambios estructurales significativos en la proteína tales como desnaturalización/agregación/disociación. No obstante, demostraron que para fines de su empleo en la formulación de films sin el uso de plastificantes una extracción a pH 12 es conveniente para provocar algún grado de desnaturalización/agregación/disociación. El pH de extracción estaría determinando características funcionales en la proteína favorables según el tipo de aplicación.

Por lo expuesto en el capítulo anterior se realizó una validación a otros pHs, introduciendo el valor del pH en el modelo matemático obtenido para predecir el rendimiento a obtener. Para la realización se cogieron los valores de las condiciones óptimas, en el cual sólo se modificó un valor del factor pH, todos los demás se mantuvieron constantes. Los resultados hallados se encuentran en el cuadro 17.

**Cuadro 17: Resultados de rendimiento en la extracción de proteínas de la cañihua evaluado a diferentes pHs**

VALORES DEL PH	RENDIMIENTO DE PROTEÍNA	
	EXPERIMENTAL	PREDICHO
pH=9	70.64 ± 1.10	75.59
pH=9.5	76.17 ± 0.84	78.55
pH=10	80.46 ± 1.39	81.44

Del cuadro 17 se puede deducir que el factor de pH tiene influencia en la extracción de proteínas, al disminuir el pH el rendimiento de la proteína también disminuye. Pero a valores de 9 aún se tiene un valor de 70.64 ± 1.10 comparado con el valor del predicho según el modelo matemático que fue de 75.59, que si bien no está dentro del rango se acerca mucho. Para los valores de pH 10 el valor experimental muestra un rango donde este el valor del predicho.



## V. CONCLUSIONES

- Las variables con efecto significativos sobre la extracción de proteína de harina de cañihua desgrasada identificadas en la etapa de screening y en orden de importancia fueron:  

pH > temperatura > concentración NaCl > tiempo > relación MP/S. La temperatura y el tiempo presentaron efectos negativos.
- La técnica de la metodología de superficie de respuesta resultó ser una herramienta útil en el establecimiento de las condiciones óptimas para la extracción de proteína de cañihua. El modelo de segundo orden generado exhibió un valor no significativo para la falta de ajuste y un alto valor del coeficiente de determinación ( $R^2 = 0.8092$ ), lo que indica que los valores predichos generados por el modelo para el rendimiento de proteína fueron consistentes y experimentalmente validados. Los valores experimentales del rendimiento de proteína estuvieron en el rango de 63.67- 80.28 por ciento.
- Los niveles óptimos de las variables estudiadas fueron: Solvente: solución acuosa alcalina pH 11 (ajustada con NaOH), Temperatura 21 °C, Relación MP/S 1/37, Tiempo 5 min. Rendimiento predicho 88.38 por ciento y Valor experimental  $85.15 \pm 3.56$ .
- Utilizando el modelo matemático de segundo orden obtenido con las siguientes variables: pH de 9, relación MP/S 1/37, Tiempo 5 min y Temperatura 21 °C, se obtuvo un rendimiento predicho de 75.59 y valor experimental de  $70.64 \pm 1.10$ . Si bien el rendimiento experimental no está dentro del rango de los valores del rendimiento predicho por el modelo. El rendimiento sigue siendo alto, por lo cual la opción de extracción a un pH 9, sigue siendo factible.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Evaluar las propiedades térmicas, funcionales y nutricionales de la proteína de cañihua extraída por el método alcalino optimizado.
- Evaluar el efecto del pH de extracción sobre las propiedades térmicas y funcionales, así como nutricionales (perfil de aminoácidos).
- Identificación de los tipos de proteínas que fueron extraídos por el método alcalino optimizado.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abugoch, L; Tapia, C; Villamán, M; Yazdani-Pedram, M; Díaz-Dosque, M. 2011. Characterization of quinoa protein-chitosan blend edible films. *Food Hydrocolloids* (25):879-886.
- Abugoch, LE; Romero, N; Tapia, CA; Silva, J; Rivera, M. 2008. Study of some physicochemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(12):4745–4750.
- Adubiaro, H; Olaofe, O; Akintayo, R. 2012. Effect of salts on the emulsifying properties of *adansonia digitata* (*baobab*) seed flour. *Journal Food Science and Technology* 4(3):126-129.
- Aguilera, J. 2003. Solid-liquid extraction. In *Extraction Optimization in Food Engineering*. Tzia, R; Liadakis, E (eds.). s. l., s.e. p 35–55.
- Aguilera, J; García, H. 1989. Protein extraction from lupin seeds: A mathematical model. *Journal Food Science and Technology* (19):17-27.
- Aider, M; Barbana, C. 2011. Canola proteins: Composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity - A practical and critical review. *Trends in Food Science and Technology* 22(1):21-39.
- Ali, A; Devinder, K; Idrees, A. 2007. Extraction optimization of watermelon seed protein usin response Surface methodology. *Food Science and Technology* 41(2): 1514-1520.
- Almeida, M; Santelli, R; Padua, E; Silveira, L; Escaleira, L. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for Optimization in analytical Chemistry. *Talanta* (76):965-977.
- Alsohaimy, S; Sitouhy, M; El-Masry, R. 2007. Isolation and partial characterization of chickpea, lupine and lentil seed proteins. *Journal of Agricultural Science* 3(1):123-129.
- Aluko, R; Monu, E. 2003. Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. *Journal Food Science and Technology* 68 (1):1254-1258.

- Anduaem, B; Gessesse, A. 2013. Effects of Salt (NaCl) Concentrations on the Functional Properties of Defatted Brebra (*Milletia ferruginea*) Seed Flour. Middle-East. Journal of Residuals Science and Technology 13 (7):889-897.
- Anon, M; Sorgentini, D; Wagner, J. 2001. Las relaciones entre las diferentes propiedades de hidratación de los aislados de soja comercial y de laboratorio. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(1):4852-4858.
- AOAC. 1996. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16a Edición. 4a Revisión. Arlington: Association of Official Agricultural Chemists.
- Aora, J; Alvarado, K. 2009. Aislados proteínicos de granos altoandinos chenopodiáceas; quinua "*Chenopodium quinoa*" – cañahua "*Chenopodium pallidicaule*" por precipitación isoelectrónica. Revista Boliviana de Química 26 (1):12–20.
- Apaza, V. 2010. Manejo y Mejoramiento de Kañiwa. Convenio Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA-Puno, Centro de Investigación de Recursos Naturales y Medio Ambiente –CIRNMA. Bioversity International y el International Fund for Agricultural Development- IFAD.
- Arango, O; Patiño, P; Ricaurte, D; Caicedo, M; Guerrero, Y. 2012. Obtención de un extracto proteico a partir de harina de chachafruto (*Erythrina edulis*). Revista Universidad de Salud 14(2):2-5.
- Avia, R; Xiao, W; Boekel, M; Minor, M; Stieger, M. 2016. Effect of extraction pH on heat induced aggregation, gelation and microstructure of protein isolate from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). Food Chemistry (209):203-210.
- Ayala, G. 2007. Aporte de los cultivos andinos a la nutrición humana. Universidad Mayor de San Marcos. Lima –Perú.
- Ayala, J; Pardo, R. 1995. Optimización por diseños experimentales con aplicaciones en ingeniería. Lima, Perú, CONCYTEC. 261 p.
- Badui, S. 1999. "Química de los Alimentos". Madrid. España. Alambra S.A. 430p.
- Badui, S. 2006. Química de los alimentos. 4 ed. México DC. México. Pearson Educación de México S.A. 717 p.
- Bals, B; Dale, BE. 2011. Economic comparison of multiple techniques for recovering leaf protein in biomass processing. Biotechnology Bioengineering 108 (3):530–537.
- Bas, D; Boyaci, I. 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. Journal of Food Engineering 78(3):836-845.

- Becker, R; Wheeler, L; Lorenz, K; Stafford, E; Grosjean, K; Betschart, A; Saunders, A. 1981. A compositional study of amaranth grain. *Journal Food Science and Technology* (46):1175-1180.
- Box, G; Draper, M. 2007. *Response Surfaces, Mixtures, and Ridge Analyses*. 2nd Ed. New Jersey: John Wiley y Sons Inc.
- Bendahou, A; Dufresne, A; KADDAMI, H; Habibi Y. 2007. Isolation and structural characterization of hemicelluloses from palm of *Phoenix dactylifera* L. *Carbohydrate Polymers* (68):601–608.
- Bourgeois, C; le Roux, P. 1986. “Proteínas animales.”. México DC, Mexico. El Manual Moderno. s.p.
- Brinegar, C; Sine, B; Nwokocla, L. 1996. High cysteine 2S seed storage proteins from quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(1):1621-1623.
- Campos, D. 1985. “Obtención de Suero de Sangre de Bovino secado por Atomización y Evaluación de sus propiedades Funcionales”. Tesis Ing. Lima, Perú. UNALM. 74 p.
- CandiotI, L; De Zan, G; Cámara, M; Goicoechea, H. 2014. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* (124):123–138.
- Cao, W; Zhang, C; Ji, H; Hao, J. 2011. Optimization of peptic hydrolysis parameters for the production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory hydrolysate from *Aceteschinensis* through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (92):42-48.
- CerlettI, P; FumagallI, A; Venturin, D. 1978. Protein composition of seeds of *Lupinus albus*. *Journal of Food Science* 43(1):1409–1414.
- Chee, L; Ayob, K. 2013. Optimization of hexametaphosphate-assisted extraction and functional characterization of palm kernel cake protein. *Food Science and Technology International* (19):109-122.
- Cheftel, J; Cuq, J; Lorient, D. 1989. *Proteínas Alimentarias*. Zaragoza. España. Acribia, S.A. s.p.
- Cherry, J; McWatters, H. 1975. Solubility properties of proteins relative to environmental effects and moist heat treatments o Hull-fat peanuts. *Journal of Food Science* (40):1257-1259.

- Chi, E; Krishnan, S; Randolph, T; Carpenter, J. 2003. Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation. *Pharmacol Research* (20):1325-1336.
- Creighton, T. 1993. Proteins in solution and in membranes. In *Proteins: Structures and molecular properties*. New York: W.H. Freeman and Company (2):261–325.
- Damian, A. 2008. *Fundamentos teorico-practicos de química orgánica*. 2da ed. Córdoba, Argentina. Brujas. p 39-55.
- Debruin, A. 1964. Investigation of the food value of quinoa and cañihua seed *Journal of Food Science* 26:872–876.
- Elizalde, A; Porrilla, Y; Chaparro, D. 2009. Factores antinutricionales en semillas. Grupo de Investigación Innovaciones Agroindustriales con Proyección Social, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad del Cauca. Colombia.
- Elsouhaimy, S; Refaay, T; Zaytoun, M. 2015. Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Annals of Agricultural Sciences* 60(2): 297-305.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2000. Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación. *Agronomía de los cultivos andinos. Qañiwa (Chenopodium pallidicaule Aellen)*.
- Fenema, O. 2000. *Food Chemistry*. 3th Ed. Marcel Dekker Inc. New York USA.
- Finot, P. 1997. Food proteins and their applications. In: Damodaran S. and Paraf A. (eds), *Effects of Processing and Storage on the Nutritional Value of Food Proteins*. New York: Marcel Dekker Inc. p 551–577.
- Firatligil-Durmus, E, Evranuz, O. 2010. Response surface methodology for protein extraction optimization of red pepper seed (*Capsicum frutescens*). *LWT-Food Science and Technology* (43):226-231.
- Föste, M; Elgeti, D; Brunner, A; Jekle, M; Becker, T. 2015. Isolation of quinoa protein by milling fractionation and solvent extraction. *Food and Bioproducts Processing* 96(1):20-26.
- Fritz, M; Vecchi, B; Rinaldi, G; Añón, M. 2011. Amaranth Seed Protein Hydrolysates Have in Vivo and in Vitro Antihypertensive Activity. *Journal of Food Chemistry* 126(3):878-84.
- Gallagher, E; Gormley, TR; Arendt, EK. 2004. Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends in Food Science and Technology* 15(2):142–143.
- Giese, I. 1994. “Proteins as Ingredients: Types Functions, Applications”. *Food Technology* 48(10):50-60.

- Gomis, A. 1998. Introducción a las operaciones de separación: Cálculos por etapas de equilibrio. Publicaciones de Universidad Alicante. Murcia, España. Compobell. p. 16-31.
- Gonçalvess, N; Vioque, J; Clemente, A; Sánchez-Vioque, R; Bautista, J; Millán, F. 1997. Obtención y caracterización de aislados proteicos de colza. *Grasas y Aceites* 48(5):282-289.
- Gonzalez, J; Roldan, A; Gallardo, T; Prado, F. 1989. Quantitative determinations of chemical compounds with nutritional value from INCA crop: *Chenopodium quinoa*. *Plant Foods for Human Nutrition* (39):331–337.
- Goundan, S. 1992. Isolation and characterization of chenopodin, the major seed storage protein of quinoa (*Chenopodium quinoa*). M.Sc. thesis. San Jose State University, California, USA.
- Gross, R; Koch, F; Malaga, I; De Miranda, A; Schöneberger, H; Trugo, L. 1989. Chemical composition and protein quality of some local Andean food sources. *Food Chemistry* 34(2):25–34.
- Guerreo-Ochoa, M.R; Pedreschi, R; Chirinos, R. 2015. Optimised methodology for the extraction of protein from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Food Science & Technology*.
- Guo, R; Pang, S; Wang, K. 2005. Studies of the alkali and enzyme methods for rice protein extraction and the comparison of their functionalities. *Shing Kexue* (26):173-177.
- Gutiérrez, H; De La Vara, R. 2008. Análisis y diseño de experimentos. 2 ed. México. Mc. Graw Hill. 393 p.
- Huamán, N. 2011. Evaluación de la difusividad térmica en granos de quinua (*Chenopodium quinoa* Wild) y cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Allen) sometidos a tratamiento térmico. Tesis Mg. Sc. Lima, Peru. UNALM.
- Irakoze, P; Sindayigaya, E. 2010. Optimization of malted sorghum protein extraction by response Surface methodology. *Journal Food Science and Technology* 6(4):53-58
- Ismond, MA; Georgiou, C; Arntfield, SD; Murray, E.1990. Role of noncovalent forces in micellization using legumen from *Vicia faba* as a study system. *Journal of Food Science and Technology* (55):1638–1642
- Jarpa-Parra, M; Bamdad, F; Wang, Y; Tian, Z; Temeli, F; Han, J; Chen, L. 2014. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. *LWT - Journal of Food Science and Technology* (57):461-469.

- Jauricque, U; Zhang, H. 2011. Defatted Corn Protein Extraction: Optimization by response Surface Methodology and Functional Properties. *Food Technology* 6(10):870-881.
- Jeantet, R; Croguennec, T; Schuck, P; Brulé, G. 2010. *Ciencia de los alimentos: Bioquímica, microbiología, procesos y productos*. Zaragoza, España. Acribia S.A. Vol.1, 1391 p.
- Joglekar, M; May, T. 1999. Product excellence through experimental design. In: Graf E and Saguy IS (eds). *Food Product and Development: From Concept to the Market place*. New York: Aspen Publishers Inc. p 211-230.
- Kain, RJ; Chen, Z; Sonda TS; Abu-Kpawoh, JC. 2009. Study on the Effect of Control Variables on the Extraction of Peanut Protein Isolates from Peanut Meal (*Arachis hypogaea* L.). *American Journal of Food Technology* (4):47-55.
- Kanu, PJ; Kerui, Z; Ming, ZH; Haifeng, Q; Kanu, JB; Kexue, Z. 2007. Sesame Protein 11: Functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) protein isolate as influenced by pH, temperature, time and ratio of flour to water during its production. *Asian Journal of Biochemistry* (2):289-301.
- Karyotis, T; Iliadis, C; Noulas, C; Mitsibonas, T. 2003. Preliminary research on seed production and nutrient content for certain quinoa varieties in a saline-sodic Soil. *Journal of Agronomic Crop Science* (189):402-408.
- Kikugawa, K; Ido, Y; Mikami, A. 1981. Studies on peroxidized lipids. VI. Fluorescent products derived from the reaction of primary amines, malonaldehyde and monofunctional aldehydes. *Journal of the American Oil Chemists Society* (61):1574-1581.
- Kinsella, JE. 1976. "Functional properties of proteins in foods: a survey". *Crit. Journal Food Science and Nutrition* (7):219-280.
- Kinsella, JE. 1979. Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists Society* (56):242-258.
- Kolar, CW; Richert, SH; Decker, CD; Steinke, FH; Vander Zanden, RJ. 1985. Isolated soy proteins. *New proteins food* vol. 5.
- Lestari, D; Mulder, W; Sanders, J. 2010. Improving *Jatropha curcas* seed protein recovery by using counter current multistage extraction. *Biochemistry Engineering Journal* 50(1):16-23.
- Lianqing, S; Xiangyang, W; Zhongyng, W; Yuan-Feng, W; Jianshe, C. 2008. Studies on tea protein extraction using alkaline and anzyme methods. *Food Chemistry* 107(2):929-938.



- Ligarda, S; Repo-Carrasco, R; Encina, Z; Herrera, B; Quinde, A. 2012. Comparación de métodos de extracción de fibra soluble e insoluble a partir de salvado de quinua (*Chenopodium quinoa* W.) y Kañiwa (*Chenopodium pallidicula* L). Revista de la Sociedad Química del Perú 78(1):55-63.
- Lindeboom, N. 2005. Studies on the characterization, biosynthesis and isolation of starch and protein from quinoa (*Chenopodium, quinoa* wild). PhD Thesis, Department of Applied Microbiology and Food Science. University of Saskatchewan. Saskatoon.
- Linden, G; Lorient, D. 1996. Bioquímica agroindustrial: Revalorización alimentaria de la producción agrícola. 1a ed. Zaragoza, España. Acribia S.A. 428 p.
- Lowry, O; Rosebough, N; Lewistarr, A; Randall, R. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. Journal Biological Chemical (193):265-275.
- Lqari, H; Vioque, J; Pedroche, J; Millán, F. 2002. Lupinus angustifolius protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. Food Chemistry 76(3):349-356.
- Ma, T; Wang, Q; 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.
- Mäkinen, E; Zannini, E; Koehler, P; Arendt, E. 2015. Modifying the cold gelation properties of quinoa protein isolate: Influence of heat-denaturation pH in the alkaline range. Plant Foods for Human Nutrition.
- Mäkinen, E; Zannini, E; Koehler, P; Arendt, E. 2016. Heat-denaturation and aggregation of quinoa (*Chenopodium quinoa*) globulins as affected by the Ph value. Food Chemistry (196):17-24.
- Makkar, HP; Francis, G; Becker, K. 2008. Protein concentrate from *Jatropha curcas* screw-pressed seed cake and toxic and antinutritional factors in protein concentrate. Journal Science Food Agriculture (88):1542-1548.
- Martínez, D; Hernández, B; Ami-Go, L; Miralles, B; Gómez, J. 2013. Extraction/Fractionation techniques for proteins and peptides and protein digestion. En: Toldrá, F., ed.; Nollet, L.M, ed. Pro-teomics in foods. New York, Springer, p. 21-51.
- Martínez, D; Hernández, B; Ami-Go, L; Miralles, B; Gómez, J. 2013. Extraction/fractionation techniques for proteins and peptides and protein digestion. Food Microbiology and Food Safety (2):21-50.

- Martínez-Villaluenga, C; Zielin'skib, H; Friasa, J; Piskula, MK; Kozłowski, H; Vidal-Valverde, C. 2009. Antioxidant capacity and polyphenolic content of high-protein lupin products. *Food Chemistry* (112):84–88.
- MINAGRI (Ministerio de Agricultura y Riego del Perú). Nota Técnica de Granos Andinos. Lima, junio 2018.
- Mizubuti, I; Junior, O; Souza, L; Silva, R; Ida, E. 2000. Response Surface methodology for extraction optimization of pigeon pea protein. *Food Chemistry* (70): 259-265.
- Montgomery, D. 2005. *Diseño y análisis de experimentos*. 2da ed. México D.F, México. Limusa, S.A. s.p.
- 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 Ing. Lima, Perú. UNALM. 128p.
- Nelson, L; Cox, M. 2001. *Principios de bioquímica*. 4a ed. España, Legninger. 1776 p.
- NRC (National Research Council). 1989. *Lost crops of the Incas: Littleknown plants of the Andes with promise for worldwide cultivation*. National Academy Press, Washington, DC. 200 p.
- Ogungbenle, HN. 2006. Chemical composition functional properties and amino acid composition of some edible seeds. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse* (83):74–79
- Parakash, V. 1986. The effect of sodium chloride on the extractability of proteins from sesame seeds (*Sesame indicum* L.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (34):256-259
- Parra, M; Bamdad, F; Wang, Y; Tian, Z; Temeli, F; Han, J; Chen, L. 2014. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. *LWT - Food Science and Technology* (2):1-9.
- Patwari, K; Lata Mahanta, CH. 2015. Optimization Of Extraction Of Protein Isolate From Rapeseed Meal Using Response Surface Methodology. Department of Food Processing Technology, School of Engineering, Tezpur University.
- Pericin, D; Radulovic, L; Trivic, S; Dimic, E. 2008. Evaluation of solubility of pumpkin seed globulins by response surface method. *Journal of Food Engineering* (84):591-594.
- Petrucelli, S; Añón, MC. 1996. pH-induced modifications in the thermal stability of soybean protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (10):3005-3009.

- Prabhudesal, RK. 1988. Leaching. In: Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers. Schweetzer, P.A., (Ed.). New York, USA. McGrawHill Book. p. 5.3-5.31.
- Pszczola, D. 2004. Ingredients, Journal Food Science and Technology (58):56-69.
- Quanhong, L; Caili, F. 2005. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. Food Chemistry (92):701-706.
- Rackis, J; Sessa, DJ; Honing, DH. 1979. Flavor problems of vegetable food proteins. Journal of the American Oil Chemists Society (56):262-271.
- Ramos Diaz, JM; Sundarrajan, L; Kariluoto, S; Lampi, AM; Tenitz, S; Jouppila, K. 2016. Partial Least Squares Regression Modeling of Physical and Chemical Properties of Corn-Based Snacks Containing Kañiwa and Lupine. Journal of Food Process Engineering.
- Ramos Díaz, JM; Kirjoranta, S; Tenitz, S; Penttilä, PA; Serimaa, R; Lampi, A; Jouppila, K. 2013. Use of amaranth, quinoa and kañiwa in extruded corn-based snacks. Journal of Cereal Science 58(1):59-67.
- Rastrelli, L; De Simone, F; Schettino, O; Dini, A. 1996. Constituents of *Chenopodium pallidicaule* (cañihua) seeds: isolation and characterization of new triterpene saponins. Journal of Agricultural and Food Chemistry (44):3528-3533.
- Repo-Carrasco, R; Encina C. 2008. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: Quinoa (*Chenopodium Quinoa*), Kañiwa (*Chenopodium Pallidicaule*) y Kiwicha (*Amaranthus Caudatus*). Revista Sociedad Química del Perú 74(2):85-99.
- Repo-Carrasco, R; Espinoza, C; Jacobsen, S-E. 2003. Nutritional value and use of the Andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kaniwa (*Chenopodium pallidicaule*). Food Reviews International (19):179-189.
- Repo-Carrasco, R; Acevedo, A; Icochea, J; Kallio, H. 2009. Chemical and Functional Characterization of Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) Grain, Extrudate and Bran. Plant Foods for Human Nutrition (64):94–101.
- Rocha, L. 2009. Las proteínas: Estructura y función (en línea). Consultado el 17 de abril del 2018. Disponible en: [http://www.med.ufro.cl/clases\\_apuntes/cs\\_basica/bioquimica\\_dr\\_rocha/D-CAPITULO\\_3-vinc-segunda-edicion.pdf](http://www.med.ufro.cl/clases_apuntes/cs_basica/bioquimica_dr_rocha/D-CAPITULO_3-vinc-segunda-edicion.pdf)
- Rodríguez, I; Coelho, J; Graca, M; Carvalho, S. 2012. Isolation and valorization of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. Journal of Food Engineering (109):337-346.

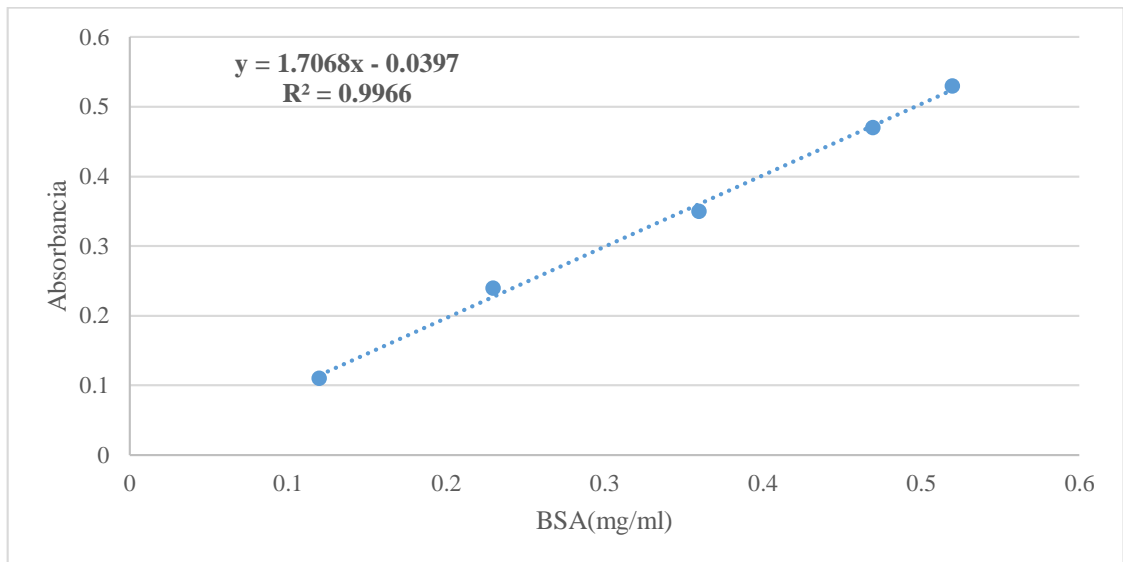
- Rodríguez, P. 1981. Obtención de aislado proteico a partir de lupino (*Lupinus mutabilis*). Tesis Ing. Lima, Perú. UNALM. 90 p.
- Rosenthal, A; Pyle, DL; Niranjan, K. 1998. Simultaneous Aqueous Extraction of Oil and Protein from Soybean: Mechanisms for Process Design. Department of Food Science and Technology 76(1): parte c.
- Rosset, M; Acquaro, R; Beléia, P. 2014. Protein extraction from defatted soybean flour with Viscozyme L pretreatment. Journal of Food Processing and Preservation (38):784-790.
- Rustom, VS; López-Leiva, MH; Nair, BM. 1991. Optimization of Extraction of Peanut Proteins with Water by Response Surface Methodology. Journal of Food Science (56):1660–1663.
- Salcedo-Chávez, B; Osuna-Castro, JA; Guevara-Lara, F; Domínguez-Domínguez, J; Paredes-López, O. 2002. Optimización del Método de precipitación isoeléctrica para Obtener Aislados de Proteínas de amaranto (*Amaranthus cruentus*) Semillas. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(22):6515-6520.
- Salgado, P. 2009. Proteínas de girasol: Aislamiento, caracterización y aplicación en la industria alimentaria. Tesis Mg Sc. Buenos Aires, Argentina. UNLP. 213 p.
- Samavati, V. 2013. Polysaccharide extraction from *Abelmoschus esculentus*: Optimization by response surface methodology Carbohydrate Polymers (95):588–597.
- Sathe, SK; Kshirsaga, R; Sharma, G. 2012. Solubilization, fractionation, and electrophoretic characterization of Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.) proteins. Plant Foods for Human Nutrition. Springer (67): 247-255.
- Sathe, SK; Deshpande, SS; Salunkhe, DK. 1982. Functional properties of lupin seed (*Lupinus mutabilis*) proteins and protein concentrates. Journal of Food Science (47):491-497.
- Scarpati De Briceño, Z; Briceño PO. 1980. Evaluación de la composición química y nutricional de algunas entradas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) del banco de germoplasma de la Universidad Técnica del Altiplano. Annales Científico (18):125–143.
- Scopes, R. 1986. Protein purification. Editorial Springer Veriag. New York, Heidelberg, Berlin.
- Segura-Nieto, M; Barba De La Rosa, P; Paredes-López, O. 1994. Biochemistry of amaranth proteins. In: Paredes-Lopez O. (Ed). Amaranth: Biology, Chemistry and Technology. Boca Raton: CRC, Press. p. 75-106.

- Sgarbieri, C; Antonia, M; Galeazzi, M. 1978. Some physicochemical and nutritional properties of a sweet lupin (*Lupinus albus* var. Multolupa) protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26(1):1438–1442.
- Shen, L; Wang, X; Wang, Z; Wu, Y; Chen, J. 2008. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food Chemistry* 107(15):929-938.
- Smith, S; Circle, S. 1972. Soybeans: Chemistry and Technology. AVI publishing (2):56-78.
- Stone, A; Karalash, A; Tylera, RT; Warkentin, TD; Nickerson, MT. 2015. Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Research International* (76):31–38.
- Sun, Q; Tian, Z. 2003. Studies of rice protein extraction using an alkali method. *Shaping Gongye Keji* (24):38-40.
- Sussmann, D; Pickardt, C; Schweiggert, U; Eisner, P. 2011. Influence of different processing parameters on the Isolation of lupin (*lupinus angustifolius* L.) Protein Isolates: a preliminary. *Journal of Food Process Engineering* (36):18–28.
- Tan, E; Ngoh, 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 optimization. *Food Chemistry* (152):447 – 455.
- Tangka, JK. 2003. Analysis of the thermal energy requirements for the extraction of leaf protein concentrate from some green plants. *Biosystems Engineering* 86(4):473–479.
- Tömösközi, S; Lasztity, R; Haraski, R; Baticz, O. 2001. El Aislamiento y estudio de las propiedades de las Proteínas Funcionales de guisante. *Food Nahrung* (45):399-401.
- Tzeng, YM; Diosady, LL; Rubin, LJ. 1988. Preparation of rapeseed protein isolate by sodium hexametaphosphate extraction, ultrafiltration, diafiltration and ion exchange. *Journal of Food Science* (53):1537-1541.
- Universidad Nacional De Quilmes. 2009. Extracción y Cuantificación de proteínas. s.p.
- Urrutia, W. 2010. Determinación de parámetros óptimos de extracción alcalina para la obtención de aislado proteico a partir de tarwi (*Lupinus mutabilis*). Tesis Ing. Apurímac, Perú. UNAMBA. 79 p.
- Valenzuela, C; Abugoch, A; Tapia, C; Gamboa, A. 2013. Effect of alkali extraction on the structure of the protein of quinoa (*Chenopodium quinoa* wild.) and its influence on film formation. *International Journal of Food Science and Technology* 48(2):843-849.
- Vargas, C. 1938. Nota etnobotánica sobre la cañihua. *Revista Argentina de Agronomía* 5(4):224-230.

- Vioque, J; Sánchez, R; Clemente, A; Bautista, J; Millán, F. 2001. Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados protéicos. Sevilla, España. Instituto de la Grasa. s.p.
- Wang, M; Hettiarachchy, NS; Qi, M; Burks, W; Siebenmorgen, T. 1999. Preparación y Propiedades Funcionales de arroz Aislado de protein de salvado. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(2):411-416.
- Wang, M; Jiang, L; Yang, L; Qi, LIU; Xiaonan, S. 2011. Optimization of Extraction Process of Protein Isolate from Mung Bean. *Procedia Engineering* 15(1)5250-5258.
- Wani, AA; Sogi, D; Grover, S; Saxena, DC. 2006. Effect of temperatura, alkali concentration, extration time and meal/solvent ratio on the extraction of watermelon seed proteins-a response surface approach. *Biosystems Engineering* (94):67-73.
- Wani, A; Kaur, D; Ahmed, I; SOGI, D. 2006. Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology. *LWT – Food Science and Technology* 41(8):1514-1520.
- White, P; Alvistur, E; Dias, C; Vinas, E; White, H; Collazos, C. 1955. Nutrient content and protein quality of quinoa and cañihua, edible seed products of the Andes Mountains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (6):531–534.
- Ye, CL; Jiang, C. J. 2011. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from *Plantago asiática* L. by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* (84):495–502.
- Zhang, B; Cui, Y; Ying, X; Zhou, X. 2009. Alkaline extraction method of cottonseed protein isolate. *Modern Applied Science* 3(3):77-82.
- Zhu, KX; Sun, XH; Chen, ZC; Peng, W; Qian, HF; Zhou, HM. 2010. Comparison of functional properties and secondary structures of defatted wheat germ proteins separated by reverse micelles and alkaline extraction and isoelectric precipitation. *Food Chemistry* 123(4):1163–1169.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: CURVA ESTANDAR DE ALBUMINA DE SUERO BOVINO



Fuente: Propia

$$y = 1.7068x + 0.0397$$

x: Concentración de BSA (mg/ml)

y: Absorbancia

**ANEXO 2. CÁLCULO DE RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS EN LA ETAPA DE SCREENING**

<b>N°</b>	<b>Abs (Neto)</b>	<b>mg proteína/ml</b>	<b>Volumen recuperado (ml)</b>	<b>proteína (mg)</b>	<b>g. proteína /100 g. de muestra</b>	<b>% (g ps./100 g pt Kjeldahl)</b>	<b>Promedio</b>
<b>1</b>	0.227	5.49	18.0	98.76	3.29	21.28	21.55
	0.230	5.57	18.0	100.35	3.34	21.62	
	0.231	5.60	18.0	100.87	3.36	21.74	
<b>2</b>	0.435	11.58	23.5	272.13	9.07	58.64	58.39
	0.454	12.14	23.5	285.21	9.51	61.46	
	0.411	10.88	23.5	255.61	8.52	55.08	
<b>3</b>	0.396	10.44	24.0	250.50	8.35	53.98	54.13
	0.397	10.47	24.0	251.21	8.37	54.13	
	0.398	10.50	24.0	251.91	8.40	54.28	
<b>4</b>	0.515	13.92	19.0	264.55	8.82	57.00	55.88
	0.494	13.31	19.0	252.86	8.43	54.48	
	0.508	13.72	19.0	260.65	8.69	56.16	
<b>5</b>	0.346	8.97	24.0	215.35	7.18	46.40	46.55
	0.352	9.15	24.0	219.57	7.32	47.31	
	0.343	8.89	24.0	213.24	7.11	45.95	
<b>6</b>	0.488	13.13	24.0	315.19	10.51	67.91	68.37
	0.487	13.10	24.0	314.48	10.48	67.76	
	0.498	13.43	24.0	322.22	10.74	69.43	
<b>7</b>	0.112	2.12	37.0	78.37	7.84	50.66	51.82
	0.111	2.09	37.0	77.28	7.73	49.96	
	0.118	2.29	37.0	84.87	8.49	54.86	
<b>8</b>	0.193	4.49	22.0	98.80	9.88	63.86	64.70
	0.196	4.58	22.0	100.73	10.07	65.11	
	0.196	4.58	22.0	100.73	10.07	65.11	
<b>9</b>	0.129	2.62	37.0	96.79	9.68	62.57	63.27
	0.130	2.65	37.0	97.88	9.79	63.27	
	0.131	2.67	37.0	98.96	9.90	63.97	
<b>10</b>	0.443	11.81	24.0	283.55	9.45	61.10	62.51
	0.455	12.17	24.0	291.99	9.73	62.91	
	0.459	12.28	24.0	294.80	9.83	63.52	
<b>11</b>	0.192	4.46	22.5	100.39	10.04	64.89	65.17
	0.194	4.52	22.5	101.70	10.17	65.74	
	0.192	4.46	22.5	100.39	10.04	64.89	
<b>12</b>	0.140	2.94	36.0	105.78	10.58	68.38	68.38
	0.145	3.08	36.0	111.05	11.10	71.78	
	0.135	2.79	36.0	100.50	10.05	64.97	



*Continuación*

<b>13</b>	0.140	2.94	37.0	108.72	10.87	70.27	69.57
	0.139	2.91	37.0	107.63	10.76	69.57	
	0.138	2.88	37.0	106.55	10.65	68.87	
<b>14</b>	0.136	2.82	36.5	102.97	10.30	66.56	66.10
	0.134	2.76	36.5	100.83	10.08	65.18	
	0.136	2.82	36.5	102.97	10.30	66.56	
<b>15</b>	0.122	2.41	36.5	88.00	8.80	56.88	55.73
	0.120	2.35	36.5	85.86	8.59	55.50	
	0.119	2.32	36.5	84.79	8.48	54.81	
<b>16</b>	0.417	11.05	23.0	254.22	8.47	54.78	54.73
	0.413	10.94	23.0	251.52	8.38	54.20	
	0.420	11.14	23.0	256.24	8.54	55.21	
<b>17</b>	0.136	2.82	37.0	104.38	10.44	67.47	67.94
	0.138	2.88	37.0	106.55	10.65	68.87	
	0.136	2.82	37.0	104.38	10.44	67.47	
<b>18</b>	0.193	4.49	22.5	101.04	10.10	65.32	64.32
	0.191	4.43	22.5	99.73	9.97	64.46	
	0.188	4.34	22.5	97.75	9.77	63.19	
<b>19</b>	0.142	3.00	35.0	104.89	10.49	67.80	68.91
	0.145	3.08	35.0	107.97	10.80	69.79	
	0.144	3.06	35.0	106.94	10.69	69.13	
<b>20</b>	0.494	13.31	24.0	319.40	10.65	68.82	68.47
	0.487	13.10	24.0	314.48	10.48	67.76	
	0.494	13.31	24.0	319.40	10.65	68.82	
<b>21</b>	0.132	2.70	37.0	100.04	10.00	64.67	60.70
	0.125	2.50	37.0	92.46	9.25	59.77	
	0.122	2.41	37.0	89.20	8.92	57.66	
<b>22</b>	0.164	3.64	37.0	134.73	13.47	87.09	86.39
	0.157	3.44	37.0	127.14	12.71	82.19	
	0.168	3.76	37.0	139.06	13.91	89.89	
<b>23</b>	0.323	8.30	24.0	199.18	6.64	42.92	42.77
	0.318	8.15	24.0	195.66	6.52	42.16	
	0.325	8.36	24.0	200.59	6.69	43.22	
<b>24</b>	0.520	14.07	19.0	267.33	8.91	57.60	57.60
	0.517	13.98	19.0	265.66	8.86	57.24	
	0.523	14.16	19.0	269.00	8.97	57.96	
<b>25</b>	0.108	2.00	35.0	70.03	7.00	45.27	46.15
	0.105	1.91	35.0	66.95	6.70	43.28	
	0.115	2.21	35.0	77.21	7.72	49.91	
<b>26</b>	0.085	1.33	35.0	46.45	4.64	30.02	30.02
	0.084	1.30	35.0	45.42	4.54	29.36	
	0.086	1.36	35.0	47.47	4.75	30.69	

Continuación

27	0.105	1.91	37.0	70.78	7.08	45.75	48.32
	0.107	1.97	37.0	72.95	7.29	47.15	
	0.114	2.18	37.0	80.53	8.05	52.06	
28	0.445	11.87	24.5	290.89	9.70	62.68	62.27
	0.429	11.40	24.5	279.41	9.31	60.20	
	0.453	12.11	24.5	296.63	9.89	63.92	
29	0.490	13.19	24.0	316.59	10.55	68.22	68.47
	0.482	12.96	24.0	310.97	10.37	67.00	
	0.503	13.57	24.0	325.73	10.86	70.19	
30	0.115	2.21	36.5	80.51	8.05	52.05	48.13
	0.108	2.00	36.5	73.03	7.30	47.21	
	0.105	1.91	36.5	69.82	6.98	45.13	
31	0.149	3.20	35.0	112.07	11.21	72.44	70.01
	0.143	3.03	35.0	105.91	10.59	68.46	
	0.144	3.06	35.0	106.94	10.69	69.13	
32	0.449	11.99	25.0	299.76	9.99	64.59	66.27
	0.464	12.43	25.0	310.74	10.36	66.96	
	0.466	12.49	25.0	312.21	10.41	67.27	
33	0.348	9.03	19.0	171.60	5.72	36.97	36.77
	0.344	8.91	19.0	169.37	5.65	36.49	
	0.347	9.00	19.0	171.04	5.70	36.85	
34	0.465	12.46	24.0	299.02	9.97	64.43	64.93
	0.469	12.58	24.0	301.83	10.06	65.04	
	0.471	12.63	24.0	303.23	10.11	65.34	
35	0.129	2.62	36.5	95.48	9.55	61.72	59.19
	0.123	2.44	36.5	89.07	8.91	57.58	
	0.124	2.47	36.5	90.14	9.01	58.27	

### ANEXO 3. CALCULO DE RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS EN LA ETAPA DE SCREENING – REPETICION 1

Nº	Abs (Neto)	mg proteína/ml	Volumen recuperado (ml)	proteína (mg)	g. proteína /100 g. de muestra	% (g ps./100 g pt Kjeldahl)	Promedio
1	0.214	5.11	17.0	86.80	2.89	18.70	18.99
	0.211	5.02	17.0	85.31	2.84	18.38	
	0.225	5.43	17.0	92.28	3.08	19.88	
2	0.432	11.49	22.5	258.58	8.62	55.72	56.38
	0.439	11.70	22.5	263.19	8.77	56.71	
	0.439	11.70	22.5	263.19	8.77	56.71	
3	0.373	9.76	24.0	234.33	7.81	50.49	52.87
	0.397	10.47	24.0	251.21	8.37	54.13	

*Continuación*

	0.396	10.44	24.0	250.50	8.35	53.98	
<b>4</b>	0.545	14.80	20.0	296.05	9.87	63.79	63.29
	0.542	14.71	20.0	294.29	9.81	63.41	
	0.536	14.54	20.0	290.78	9.69	62.65	
<b>5</b>	0.393	10.35	24.5	253.57	8.45	54.64	54.69
	0.395	10.41	24.5	255.00	8.50	54.95	
	0.392	10.32	24.5	252.85	8.43	54.48	
<b>6</b>	0.480	12.90	25.0	322.46	10.75	69.48	68.80
	0.471	12.63	25.0	315.87	10.53	68.06	
	0.476	12.78	25.0	319.53	10.65	68.85	
<b>7</b>	0.103	1.85	37.0	68.61	6.86	44.35	43.42
	0.101	1.80	37.0	66.44	6.64	42.95	
	0.101	1.80	37.0	66.44	6.64	42.95	
<b>8</b>	0.186	4.29	22.0	94.29	9.43	60.95	61.09
	0.184	4.23	22.0	93.00	9.30	60.12	
	0.189	4.37	22.0	96.22	9.62	62.20	
<b>9</b>	0.143	3.03	37.0	111.97	11.20	72.38	71.68
	0.139	2.91	37.0	107.63	10.76	69.57	
	0.144	3.06	37.0	113.05	11.31	73.08	
<b>10</b>	0.413	10.94	23.0	251.52	8.38	54.20	55.55
	0.419	11.11	23.0	255.56	8.52	55.07	
	0.435	11.58	23.0	266.34	8.88	57.39	
<b>11</b>	0.184	4.23	21.5	90.88	9.09	58.75	59.70
	0.189	4.37	21.5	94.03	9.40	60.78	
	0.186	4.29	21.5	92.14	9.21	59.56	
<b>12</b>	0.131	2.67	37.0	98.96	9.90	63.97	64.20
	0.131	2.67	37.0	98.96	9.90	63.97	
	0.132	2.70	37.0	100.04	10.00	64.67	
<b>13</b>	0.118	2.29	37.0	84.87	8.49	54.86	53.69
	0.119	2.32	37.0	85.95	8.60	55.56	
	0.112	2.12	37.0	78.37	7.84	50.66	
<b>14</b>	0.111	2.09	37.0	77.28	7.73	49.96	53.93
	0.119	2.32	37.0	85.95	8.60	55.56	
	0.120	2.35	37.0	87.04	8.70	56.26	
<b>15</b>	0.119	2.32	37.0	85.95	8.60	55.56	56.26
	0.119	2.32	37.0	85.95	8.60	55.56	
	0.122	2.41	37.0	89.20	8.92	57.66	
<b>16</b>	0.443	11.81	24.0	283.55	9.45	61.10	60.54
	0.436	11.61	24.0	278.63	9.29	60.04	
	0.439	11.70	24.0	280.74	9.36	60.49	
<b>17</b>	0.116	2.24	37.5	83.82	8.38	54.18	56.55
	0.118	2.29	37.5	86.02	8.60	55.60	
	0.124	2.47	37.5	92.61	9.26	59.86	

Continuación

<b>18</b>	0.192	4.46	21.5	95.92	9.59	62.01	62.55
	0.192	4.46	21.5	95.92	9.59	62.01	
	0.196	4.58	21.5	98.44	9.84	63.63	
<b>19</b>	0.132	2.70	35.5	95.99	9.60	62.05	63.62
	0.133	2.73	35.5	97.03	9.70	62.72	
	0.138	2.88	35.5	102.23	10.22	66.08	
<b>20</b>	0.443	11.81	23.5	277.64	9.25	59.82	60.71
	0.455	12.17	23.5	285.90	9.53	61.60	
	0.449	11.99	23.5	281.77	9.39	60.71	
<b>21</b>	0.125	2.50	37.0	92.46	9.25	59.77	58.13
	0.123	2.44	37.0	90.29	9.03	58.36	
	0.120	2.35	37.0	87.04	8.70	56.26	
<b>22</b>	0.145	3.08	36.5	112.59	11.26	72.78	72.09
	0.143	3.03	36.5	110.45	11.05	71.40	
	0.144	3.06	36.5	111.52	11.15	72.09	
<b>23</b>	0.324	8.33	24.0	199.88	6.66	43.07	44.28
	0.332	8.56	24.0	205.51	6.85	44.28	
	0.340	8.80	24.0	211.13	7.04	45.49	
<b>24</b>	0.507	13.69	21.0	287.48	9.58	61.94	62.91
	0.506	13.66	21.0	286.86	9.56	61.81	
	0.530	14.36	21.0	301.63	10.05	64.99	
<b>25</b>	0.112	2.12	35.5	75.19	7.52	48.60	48.38
	0.115	2.21	35.5	78.31	7.83	50.62	
	0.108	2.00	35.5	71.03	7.10	45.91	
<b>26</b>	0.109	2.03	35.0	71.05	7.11	45.93	45.71
	0.106	1.94	35.0	67.98	6.80	43.94	
	0.111	2.09	35.0	73.10	7.31	47.26	
<b>27</b>	0.110	2.06	36.5	75.17	7.52	48.59	46.98
	0.108	2.00	36.5	73.03	7.30	47.21	
	0.105	1.91	36.5	69.82	6.98	45.13	
<b>28</b>	0.452	12.08	24.5	295.91	9.86	63.76	63.71
	0.457	12.22	24.5	299.50	9.98	64.53	
	0.446	11.90	24.5	291.61	9.72	62.83	
<b>29</b>	0.471	12.63	24.0	303.23	10.11	65.34	65.49
	0.466	12.49	24.0	299.72	9.99	64.58	
	0.479	12.87	24.0	308.86	10.30	66.55	
<b>30</b>	0.110	2.06	36.0	74.14	7.41	47.92	46.79
	0.108	2.00	36.0	72.03	7.20	46.56	
	0.107	1.97	36.0	70.97	7.10	45.88	
<b>31</b>	0.145	3.08	35.5	109.51	10.95	70.79	71.24
	0.146	3.11	35.5	110.55	11.05	71.46	
	0.146	3.11	35.5	110.55	11.05	71.46	
<b>32</b>	0.447	11.93	25.0	298.29	9.94	64.27	64.54

Continuación

	0.450	12.02	25.0	300.49	10.02	64.75	
	0.449	11.99	25.0	299.76	9.99	64.59	
<b>33</b>	0.446	11.90	18.5	220.19	7.34	47.45	47.64
	0.449	11.99	18.5	221.82	7.39	47.80	
	0.448	11.96	18.5	221.28	7.38	47.68	
<b>34</b>	0.448	11.96	24.0	287.06	9.57	61.85	62.71
	0.458	12.25	24.0	294.09	9.80	63.37	
	0.455	12.17	24.0	291.99	9.73	62.91	
<b>35</b>	0.119	2.32	37.0	85.95	8.60	55.56	55.09
	0.119	2.32	37.0	85.95	8.60	55.56	
	0.117	2.26	37.0	83.79	8.38	54.16	

**ANEXO 4. CALCULO DE RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE LA ETAPA DE SCREENING – REPETICION 2**

<b>N°</b>	<b>Abs (Neto)</b>	<b>mg proteína/ml</b>	<b>Volumen recuperado (ml)</b>	<b>proteína (mg)</b>	<b>g. proteína /100 g. de muestra</b>	<b>% (g ps./100 g pt Kjeldahl)</b>	<b>Promedio</b>
<b>1</b>	0.214	5.11	17.0	86.80	2.89	18.70	18.99
	0.211	5.02	17.0	85.31	2.84	18.38	
	0.225	5.43	17.0	92.28	3.08	19.88	
<b>2</b>	0.432	11.49	22.5	258.58	8.62	55.72	56.38
	0.439	11.70	22.5	263.19	8.77	56.71	
	0.439	11.70	22.5	263.19	8.77	56.71	
<b>3</b>	0.373	9.76	24.0	234.33	7.81	50.49	52.87
	0.397	10.47	24.0	251.21	8.37	54.13	
	0.396	10.44	24.0	250.50	8.35	53.98	
<b>4</b>	0.545	14.80	20.0	296.05	9.87	63.79	63.29
	0.542	14.71	20.0	294.29	9.81	63.41	
	0.536	14.54	20.0	290.78	9.69	62.65	
<b>5</b>	0.393	10.35	24.5	253.57	8.45	54.64	54.69
	0.395	10.41	24.5	255.00	8.50	54.95	
	0.392	10.32	24.5	252.85	8.43	54.48	
<b>6</b>	0.480	12.90	25.0	322.46	10.75	69.48	68.80
	0.471	12.63	25.0	315.87	10.53	68.06	
	0.476	12.78	25.0	319.53	10.65	68.85	
<b>7</b>	0.103	1.85	37.0	68.61	6.86	44.35	43.42
	0.101	1.80	37.0	66.44	6.64	42.95	
	0.101	1.80	37.0	66.44	6.64	42.95	

Continuación

<b>8</b>	0.186	4.29	22.0	94.29	9.43	60.95	61.09
	0.184	4.23	22.0	93.00	9.30	60.12	
	0.189	4.37	22.0	96.22	9.62	62.20	
<b>9</b>	0.143	3.03	37.0	111.97	11.20	72.38	71.68
	0.139	2.91	37.0	107.63	10.76	69.57	
	0.144	3.06	37.0	113.05	11.31	73.08	
<b>10</b>	0.413	10.94	23.0	251.52	8.38	54.20	55.55
	0.419	11.11	23.0	255.56	8.52	55.07	
	0.435	11.58	23.0	266.34	8.88	57.39	
<b>11</b>	0.184	4.23	21.5	90.88	9.09	58.75	59.70
	0.189	4.37	21.5	94.03	9.40	60.78	
	0.186	4.29	21.5	92.14	9.21	59.56	
<b>12</b>	0.131	2.67	37.0	98.96	9.90	63.97	64.20
	0.131	2.67	37.0	98.96	9.90	63.97	
	0.132	2.70	37.0	100.04	10.00	64.67	
<b>13</b>	0.118	2.29	37.0	84.87	8.49	54.86	53.69
	0.119	2.32	37.0	85.95	8.60	55.56	
	0.112	2.12	37.0	78.37	7.84	50.66	
<b>14</b>	0.111	2.09	37.0	77.28	7.73	49.96	53.93
	0.119	2.32	37.0	85.95	8.60	55.56	
	0.120	2.35	37.0	87.04	8.70	56.26	
<b>15</b>	0.119	2.32	37.0	85.95	8.60	55.56	56.26
	0.119	2.32	37.0	85.95	8.60	55.56	
	0.122	2.41	37.0	89.20	8.92	57.66	
<b>16</b>	0.443	11.81	24.0	283.55	9.45	61.10	60.54
	0.436	11.61	24.0	278.63	9.29	60.04	
	0.439	11.70	24.0	280.74	9.36	60.49	
<b>17</b>	0.116	2.24	37.5	83.82	8.38	54.18	56.55
	0.118	2.29	37.5	86.02	8.60	55.60	
	0.124	2.47	37.5	92.61	9.26	59.86	
<b>18</b>	0.192	4.46	21.5	95.92	9.59	62.01	62.55
	0.192	4.46	21.5	95.92	9.59	62.01	
	0.196	4.58	21.5	98.44	9.84	63.63	
<b>19</b>	0.132	2.70	35.5	95.99	9.60	62.05	63.62
	0.133	2.73	35.5	97.03	9.70	62.72	
	0.138	2.88	35.5	102.23	10.22	66.08	
<b>20</b>	0.443	11.81	23.5	277.64	9.25	59.82	60.71
	0.455	12.17	23.5	285.90	9.53	61.60	
	0.449	11.99	23.5	281.77	9.39	60.71	
<b>21</b>	0.125	2.50	37.0	92.46	9.25	59.77	58.13
	0.123	2.44	37.0	90.29	9.03	58.36	
	0.120	2.35	37.0	87.04	8.70	56.26	
<b>22</b>	0.145	3.08	36.5	112.59	11.26	72.78	72.09

*Continuación*

	0.143	3.03	36.5	110.45	11.05	71.40	
	0.144	3.06	36.5	111.52	11.15	72.09	
<b>23</b>	0.324	8.33	24.0	199.88	6.66	43.07	44.28
	0.332	8.56	24.0	205.51	6.85	44.28	
	0.340	8.80	24.0	211.13	7.04	45.49	
<b>24</b>	0.507	13.69	21.0	287.48	9.58	61.94	62.91
	0.506	13.66	21.0	286.86	9.56	61.81	
	0.530	14.36	21.0	301.63	10.05	64.99	
<b>25</b>	0.112	2.12	35.5	75.19	7.52	48.60	48.38
	0.115	2.21	35.5	78.31	7.83	50.62	
	0.108	2.00	35.5	71.03	7.10	45.91	
<b>26</b>	0.109	2.03	35.0	71.05	7.11	45.93	45.71
	0.106	1.94	35.0	67.98	6.80	43.94	
	0.111	2.09	35.0	73.10	7.31	47.26	
<b>27</b>	0.110	2.06	36.5	75.17	7.52	48.59	46.98
	0.108	2.00	36.5	73.03	7.30	47.21	
	0.105	1.91	36.5	69.82	6.98	45.13	
<b>28</b>	0.452	12.08	24.5	295.91	9.86	63.76	63.71
	0.457	12.22	24.5	299.50	9.98	64.53	
	0.446	11.90	24.5	291.61	9.72	62.83	
<b>29</b>	0.471	12.63	24.0	303.23	10.11	65.34	65.49
	0.466	12.49	24.0	299.72	9.99	64.58	
	0.479	12.87	24.0	308.86	10.30	66.55	
<b>30</b>	0.110	2.06	36.0	74.14	7.41	47.92	46.79
	0.108	2.00	36.0	72.03	7.20	46.56	
	0.107	1.97	36.0	70.97	7.10	45.88	
<b>31</b>	0.145	3.08	35.5	109.51	10.95	70.79	71.24
	0.146	3.11	35.5	110.55	11.05	71.46	
	0.146	3.11	35.5	110.55	11.05	71.46	
<b>32</b>	0.447	11.93	25.0	298.29	9.94	64.27	64.54
	0.450	12.02	25.0	300.49	10.02	64.75	
	0.449	11.99	25.0	299.76	9.99	64.59	
<b>33</b>	0.446	11.90	18.5	220.19	7.34	47.45	47.64
	0.449	11.99	18.5	221.82	7.39	47.80	
	0.448	11.96	18.5	221.28	7.38	47.68	
<b>34</b>	0.448	11.96	24.0	287.06	9.57	61.85	62.71
	0.458	12.25	24.0	294.09	9.80	63.37	
	0.455	12.17	24.0	291.99	9.73	62.91	
<b>35</b>	0.119	2.32	37.0	85.95	8.60	55.56	55.09
	0.119	2.32	37.0	85.95	8.60	55.56	
	0.117	2.26	37.0	83.79	8.38	54.16	

**ANEXO 5. CALCULO DE RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE LA OPTIMIZACIÓN**

<b>N°</b>	<b>Abs (Neto)</b>	<b>mg proteína/ml</b>	<b>Volumen recuperado (ml)</b>	<b>proteína (mg)</b>	<b>g. proteína /100 g. de muestra</b>	<b>% (g ps./100 g pt Kjeldahl)</b>	<b>Promedio</b>
<b>1</b>	0.273	6.83	17.0	116.19	11.62	75.10	74.14
	0.263	6.54	17.0	111.21	11.12	71.88	
	0.274	6.86	17.0	116.68	11.67	75.43	
<b>2</b>	0.198	4.64	27.0	125.21	12.52	80.94	78.21
	0.190	4.40	27.0	118.88	11.89	76.85	
	0.190	4.40	27.0	118.88	11.89	76.85	
<b>3</b>	0.138	2.88	36.5	105.11	10.51	67.94	67.02
	0.136	2.82	36.5	102.97	10.30	66.56	
	0.136	2.82	36.5	102.97	10.30	66.56	
<b>4</b>	0.167	3.73	27.0	100.69	10.07	65.09	67.81
	0.175	3.96	27.0	107.02	10.70	69.18	
	0.175	3.96	27.0	107.02	10.70	69.18	
<b>5</b>	0.130	2.65	37.0	97.88	9.79	63.27	63.03
	0.131	2.67	37.0	98.96	9.90	63.97	
	0.128	2.59	37.0	95.71	9.57	61.87	
<b>6</b>	0.121	2.38	44.0	104.79	10.48	67.74	66.35
	0.118	2.29	44.0	100.93	10.09	65.24	
	0.119	2.32	44.0	102.21	10.22	66.07	
<b>7</b>	0.271	6.78	17.0	115.19	11.52	74.46	74.67
	0.272	6.81	17.0	115.69	11.57	74.78	
	0.272	6.81	17.0	115.69	11.57	74.78	
<b>8</b>	0.284	7.16	17.5	125.24	12.52	80.96	81.62
	0.287	7.24	17.5	126.78	12.68	81.95	
	0.287	7.24	17.5	126.78	12.68	81.95	
<b>9</b>	0.147	3.14	37.0	116.30	11.63	75.18	74.01
	0.145	3.08	37.0	114.13	11.41	73.78	
	0.144	3.06	37.0	113.05	11.31	73.08	
<b>10</b>	0.184	4.23	27.5	116.25	11.62	75.14	75.14
	0.182	4.17	27.5	114.64	11.46	74.10	
	0.186	4.29	27.5	117.86	11.79	76.19	
<b>11</b>	0.279	7.01	16.5	115.67	11.57	74.77	74.46
	0.278	6.98	16.5	115.18	11.52	74.46	
	0.277	6.95	16.5	114.70	11.47	74.14	
<b>12</b>	0.196	4.58	27.0	123.63	12.36	79.91	79.74
	0.197	4.61	27.0	124.42	12.44	80.42	
	0.194	4.52	27.0	122.04	12.20	78.89	



*Continuación*

<b>13</b>	0.273	6.83	17.0	116.19	11.62	75.10	74.89
	0.273	6.83	17.0	116.19	11.62	75.10	
	0.271	6.78	17.0	115.19	11.52	74.46	
<b>14</b>	0.190	4.40	27.0	118.88	11.89	76.85	77.70
	0.193	4.49	27.0	121.25	12.13	78.38	
	0.192	4.46	27.0	120.46	12.05	77.87	
<b>15</b>	0.142	3.00	36.5	109.38	10.94	70.71	71.40
	0.147	3.14	36.5	114.73	11.47	74.16	
	0.140	2.94	36.5	107.25	10.72	69.33	
<b>16</b>	0.150	3.23	37.0	119.55	11.96	77.28	76.81
	0.149	3.20	37.0	118.47	11.85	76.58	
	0.149	3.20	37.0	118.47	11.85	76.58	
<b>17</b>	0.167	3.73	27.0	100.69	10.07	65.09	65.60
	0.167	3.73	27.0	100.69	10.07	65.09	
	0.170	3.82	27.0	103.06	10.31	66.62	
<b>18</b>	0.269	6.72	17.0	114.19	11.42	73.82	73.92
	0.269	6.72	17.0	114.19	11.42	73.82	
	0.270	6.75	17.0	114.69	11.47	74.14	
<b>19</b>	0.194	4.52	27.0	122.04	12.20	78.89	77.36
	0.191	4.43	27.0	119.67	11.97	77.36	
	0.188	4.34	27.0	117.30	11.73	75.82	
<b>20</b>	0.200	4.70	27.5	129.14	12.91	83.48	81.91
	0.197	4.61	27.5	126.72	12.67	81.91	
	0.194	4.52	27.5	124.30	12.43	80.35	
<b>21</b>	0.251	6.19	17.0	105.23	10.52	68.02	68.24
	0.254	6.28	17.0	106.72	10.67	68.99	
	0.250	6.16	17.0	104.73	10.47	67.70	
<b>22</b>	0.136	2.82	36.5	102.97	10.30	66.56	68.40
	0.138	2.88	36.5	105.11	10.51	67.94	
	0.142	3.00	36.5	109.38	10.94	70.71	
<b>23</b>	0.186	4.29	25.0	107.14	10.71	69.26	68.16
	0.182	4.17	25.0	104.22	10.42	67.37	
	0.183	4.20	25.0	104.95	10.49	67.84	
<b>24</b>	0.132	2.70	37.0	100.04	10.00	64.67	67.24
	0.136	2.82	37.0	104.38	10.44	67.47	
	0.139	2.91	37.0	107.63	10.76	69.57	
<b>25</b>	0.284	7.16	17.5	125.24	12.52	80.96	80.52
	0.280	7.04	17.5	123.19	12.32	79.63	
	0.284	7.16	17.5	125.24	12.52	80.96	
<b>26</b>	0.205	4.84	27.0	130.74	13.07	84.51	84.00
	0.203	4.78	27.0	129.16	12.92	83.49	
	0.204	4.81	27.0	129.95	13.00	84.00	
<b>27</b>	0.484	13.02	24.0	312.37	10.41	67.31	67.51
	0.496	13.37	24.0	320.81	10.69	69.13	

*Continuación*

	0.476	12.78	24.0	306.75	10.22	66.10	
<b>28</b>	0.185	4.26	27.0	114.93	11.49	74.29	73.10
	0.182	4.17	27.0	112.55	11.26	72.76	
	0.181	4.14	27.0	111.76	11.18	72.24	
<b>29</b>	0.155	3.38	37.0	124.97	12.50	80.78	80.55
	0.155	3.38	37.0	124.97	12.50	80.78	
	0.154	3.35	37.0	123.89	12.39	80.08	

**ANEXO 6. CALCULO DE RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE LA ETAPA DE OPTIMIZACIÓN – REPETICIÓN 1**

<b>Nº</b>	<b>Abs Neto</b>	<b>mg proteína /ml</b>	<b>Volumen recuperado (ml)</b>	<b>proteína (mg)</b>	<b>g. proteína /100 g. de muestra</b>	<b>% (g ps./100 g pt Kjeldahl)</b>	<b>Promedio</b>
<b>1</b>	0.263	6.54	17.5	114.48	11.45	74.00	73.23
	0.261	6.48	17.5	113.45	11.35	73.34	
	0.258	6.40	17.5	111.91	11.19	72.34	
<b>2</b>	0.184	4.23	26.5	112.02	11.20	72.41	73.42
	0.189	4.37	26.5	115.90	11.59	74.92	
	0.185	4.26	26.5	112.80	11.28	72.91	
<b>3</b>	0.141	2.97	37.0	109.80	10.98	70.98	70.51
	0.139	2.91	37.0	107.63	10.76	69.57	
	0.141	2.97	37.0	109.80	10.98	70.98	
<b>4</b>	0.186	4.29	26.5	113.57	11.36	73.42	73.58
	0.189	4.37	26.5	115.90	11.59	74.92	
	0.184	4.23	26.5	112.02	11.20	72.41	
<b>5</b>	0.130	2.65	37.5	99.20	9.92	64.12	66.02
	0.133	2.73	37.5	102.49	10.25	66.25	
	0.135	2.79	37.5	104.69	10.47	67.67	
<b>6</b>	0.109	2.03	46.5	94.40	9.44	61.02	61.02
	0.108	2.00	46.5	93.04	9.30	60.14	
	0.110	2.06	46.5	95.76	9.58	61.90	
<b>7</b>	0.248	6.10	17.5	106.79	10.68	69.03	70.46
	0.258	6.40	17.5	111.91	11.19	72.34	
	0.251	6.19	17.5	108.32	10.83	70.02	
<b>8</b>	0.287	7.24	17.0	123.16	12.32	79.61	81.11
	0.299	7.60	17.0	129.13	12.91	83.47	
	0.289	7.30	17.0	124.15	12.42	80.25	
<b>9</b>	0.149	3.20	37.5	120.07	12.01	77.62	78.56
	0.150	3.23	37.5	121.17	12.12	78.33	

Continuación

	0.152	3.29	37.5	123.37	12.34	79.75	
<b>10</b>	0.191	4.43	27.5	121.89	12.19	78.79	78.27
	0.188	4.34	27.5	119.47	11.95	77.23	
	0.191	4.43	27.5	121.89	12.19	78.79	
<b>11</b>	0.293	7.42	17.0	126.15	12.61	81.54	81.22
	0.291	7.36	17.0	125.15	12.51	80.90	
	0.292	7.39	17.0	125.65	12.56	81.22	
<b>12</b>	0.198	4.64	26.5	122.89	12.29	79.44	79.44
	0.199	4.67	26.5	123.67	12.37	79.94	
	0.197	4.61	26.5	122.11	12.21	78.94	
<b>13</b>	0.274	6.86	17.0	116.68	11.67	75.43	75.43
	0.276	6.92	17.0	117.68	11.77	76.07	
	0.272	6.81	17.0	115.69	11.57	74.78	
<b>14</b>	0.184	4.23	27.5	116.25	11.62	75.14	74.10
	0.183	4.20	27.5	115.44	11.54	74.62	
	0.179	4.08	27.5	112.22	11.22	72.54	
<b>15</b>	0.151	3.26	37.0	120.64	12.06	77.98	78.92
	0.155	3.38	37.0	124.97	12.50	80.78	
	0.151	3.26	37.0	120.64	12.06	77.98	
<b>16</b>	0.153	3.32	37.0	122.81	12.28	79.38	80.08
	0.155	3.38	37.0	124.97	12.50	80.78	
	0.154	3.35	37.0	123.89	12.39	80.08	
<b>17</b>	0.162	3.58	27.0	96.73	9.67	62.53	63.04
	0.165	3.67	27.0	99.11	9.91	64.06	
	0.162	3.58	27.0	96.73	9.67	62.53	
<b>18</b>	0.270	6.75	17.0	114.69	11.47	74.14	72.96
	0.264	6.57	17.0	111.70	11.17	72.21	
	0.265	6.60	17.0	112.20	11.22	72.53	
<b>19</b>	0.184	4.23	28.0	118.36	11.84	76.51	76.51
	0.182	4.17	28.0	116.72	11.67	75.45	
	0.186	4.29	28.0	120.00	12.00	77.57	
<b>20</b>	0.175	3.96	27.5	109.00	10.90	70.46	73.76
	0.188	4.34	27.5	119.47	11.95	77.23	
	0.181	4.14	27.5	113.83	11.38	73.58	
<b>21</b>	0.262	6.51	16.5	107.45	10.75	69.46	70.08
	0.267	6.66	16.5	109.87	10.99	71.02	
	0.263	6.54	16.5	107.93	10.79	69.77	
<b>22</b>	0.137	2.85	37.0	105.46	10.55	68.17	67.01
	0.134	2.76	37.0	102.21	10.22	66.07	
	0.135	2.79	37.0	103.30	10.33	66.77	
<b>23</b>	0.188	4.34	25.0	108.61	10.86	70.21	72.73
	0.195	4.55	25.0	113.74	11.37	73.52	
	0.197	4.61	25.0	115.20	11.52	74.47	

Continuación

24	0.140	2.94	37.0	108.72	10.87	70.27	70.98
	0.141	2.97	37.0	109.80	10.98	70.98	
	0.142	3.00	37.0	110.88	11.09	71.68	
25	0.286	7.22	17.0	122.66	12.27	79.29	81.11
	0.293	7.42	17.0	126.15	12.61	81.54	
	0.296	7.51	17.0	127.64	12.76	82.51	
26	0.206	4.87	27.0	131.54	13.15	85.03	87.92
	0.215	5.14	27.0	138.65	13.87	89.63	
	0.214	5.11	27.0	137.86	13.79	89.12	
27	0.470	12.61	25.0	315.14	10.50	67.90	69.27
	0.491	13.22	25.0	330.52	11.02	71.22	
	0.475	12.75	25.0	318.80	10.63	68.69	
28	0.196	4.58	27.0	123.63	12.36	79.91	79.57
	0.198	4.64	27.0	125.21	12.52	80.94	
	0.192	4.46	27.0	120.46	12.05	77.87	
29	0.159	3.49	37.0	129.31	12.93	83.59	80.32
	0.151	3.26	37.0	120.64	12.06	77.98	
	0.153	3.32	37.0	122.81	12.28	79.38	

**ANEXO 7. CALCULO DE RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE LA ETAPA DE OPTIMIZACIÓN – REPETICIÓN 2**

Nº	Abs Neto	mg proteína /ml	Volumen recuperado (ml)	proteína (mg)	g. proteína /100 g. de muestra	% (g ps./100 g pt Kjeldahl)	Promedio
1	0.263	6.54	17.5	114.48	11.45	74.00	73.23
	0.261	6.48	17.5	113.45	11.35	73.34	
	0.258	6.40	17.5	111.91	11.19	72.34	
2	0.184	4.23	26.5	112.02	11.20	72.41	73.42
	0.189	4.37	26.5	115.90	11.59	74.92	
	0.185	4.26	26.5	112.80	11.28	72.91	
3	0.141	2.97	37.0	109.80	10.98	70.98	70.51
	0.139	2.91	37.0	107.63	10.76	69.57	
	0.141	2.97	37.0	109.80	10.98	70.98	
4	0.186	4.29	26.5	113.57	11.36	73.42	73.58
	0.189	4.37	26.5	115.90	11.59	74.92	
	0.184	4.23	26.5	112.02	11.20	72.41	

Continuación

<b>5</b>	0.130	2.65	37.5	99.20	9.92	64.12	66.02
	0.133	2.73	37.5	102.49	10.25	66.25	
	0.135	2.79	37.5	104.69	10.47	67.67	
<b>6</b>	0.109	2.03	46.5	94.40	9.44	61.02	61.02
	0.108	2.00	46.5	93.04	9.30	60.14	
	0.110	2.06	46.5	95.76	9.58	61.90	
<b>7</b>	0.248	6.10	17.5	106.79	10.68	69.03	70.46
	0.258	6.40	17.5	111.91	11.19	72.34	
	0.251	6.19	17.5	108.32	10.83	70.02	
<b>8</b>	0.287	7.24	17.0	123.16	12.32	79.61	81.11
	0.299	7.60	17.0	129.13	12.91	83.47	
	0.289	7.30	17.0	124.15	12.42	80.25	
<b>9</b>	0.149	3.20	37.5	120.07	12.01	77.62	78.56
	0.150	3.23	37.5	121.17	12.12	78.33	
	0.152	3.29	37.5	123.37	12.34	79.75	
<b>10</b>	0.191	4.43	27.5	121.89	12.19	78.79	78.27
	0.188	4.34	27.5	119.47	11.95	77.23	
	0.191	4.43	27.5	121.89	12.19	78.79	
<b>11</b>	0.293	7.42	17.0	126.15	12.61	81.54	81.22
	0.291	7.36	17.0	125.15	12.51	80.90	
	0.292	7.39	17.0	125.65	12.56	81.22	
<b>12</b>	0.198	4.64	26.5	122.89	12.29	79.44	79.44
	0.199	4.67	26.5	123.67	12.37	79.94	
	0.197	4.61	26.5	122.11	12.21	78.94	
<b>13</b>	0.274	6.86	17.0	116.68	11.67	75.43	75.43
	0.276	6.92	17.0	117.68	11.77	76.07	
	0.272	6.81	17.0	115.69	11.57	74.78	
<b>14</b>	0.184	4.23	27.5	116.25	11.62	75.14	74.10
	0.183	4.20	27.5	115.44	11.54	74.62	
	0.179	4.08	27.5	112.22	11.22	72.54	
<b>15</b>	0.151	3.26	37.0	120.64	12.06	77.98	78.92
	0.155	3.38	37.0	124.97	12.50	80.78	
	0.151	3.26	37.0	120.64	12.06	77.98	
<b>16</b>	0.153	3.32	37.0	122.81	12.28	79.38	80.08
	0.155	3.38	37.0	124.97	12.50	80.78	
	0.154	3.35	37.0	123.89	12.39	80.08	
<b>17</b>	0.162	3.58	27.0	96.73	9.67	62.53	63.04
	0.165	3.67	27.0	99.11	9.91	64.06	
	0.162	3.58	27.0	96.73	9.67	62.53	
<b>18</b>	0.270	6.75	17.0	114.69	11.47	74.14	72.96
	0.264	6.57	17.0	111.70	11.17	72.21	
	0.265	6.60	17.0	112.20	11.22	72.53	

*Continuación*

<b>19</b>	0.184	4.23	28.0	118.36	11.84	76.51	76.51
	0.182	4.17	28.0	116.72	11.67	75.45	
	0.186	4.29	28.0	120.00	12.00	77.57	
<b>20</b>	0.175	3.96	27.5	109.00	10.90	70.46	73.76
	0.188	4.34	27.5	119.47	11.95	77.23	
	0.181	4.14	27.5	113.83	11.38	73.58	
<b>21</b>	0.262	6.51	16.5	107.45	10.75	69.46	70.08
	0.267	6.66	16.5	109.87	10.99	71.02	
	0.263	6.54	16.5	107.93	10.79	69.77	
<b>22</b>	0.137	2.85	37.0	105.46	10.55	68.17	67.01
	0.134	2.76	37.0	102.21	10.22	66.07	
	0.135	2.79	37.0	103.30	10.33	66.77	
<b>23</b>	0.188	4.34	25.0	108.61	10.86	70.21	72.73
	0.195	4.55	25.0	113.74	11.37	73.52	
	0.197	4.61	25.0	115.20	11.52	74.47	
<b>24</b>	0.140	2.94	37.0	108.72	10.87	70.27	70.98
	0.141	2.97	37.0	109.80	10.98	70.98	
	0.142	3.00	37.0	110.88	11.09	71.68	
<b>25</b>	0.286	7.22	17.0	122.66	12.27	79.29	81.11
	0.293	7.42	17.0	126.15	12.61	81.54	
	0.296	7.51	17.0	127.64	12.76	82.51	
<b>26</b>	0.206	4.87	27.0	131.54	13.15	85.03	87.92
	0.215	5.14	27.0	138.65	13.87	89.63	
	0.214	5.11	27.0	137.86	13.79	89.12	
<b>27</b>	0.470	12.61	25.0	315.14	10.50	67.90	69.27
	0.491	13.22	25.0	330.52	11.02	71.22	
	0.475	12.75	25.0	318.80	10.63	68.69	
<b>28</b>	0.196	4.58	27.0	123.63	12.36	79.91	79.57
	0.198	4.64	27.0	125.21	12.52	80.94	
	0.192	4.46	27.0	120.46	12.05	77.87	
<b>29</b>	0.159	3.49	37.0	129.31	12.93	83.59	80.32
	0.151	3.26	37.0	120.64	12.06	77.98	
	0.153	3.32	37.0	122.81	12.28	79.38	