

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Análisis comparativo de dos metodologías de extracción de proteínas de chocho (*Lupinus sp.*) con valor agregado y la caracterización de los residuos del proceso.

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Licenciado en Biología

Presentado por:

Erika Viviana López Pincay

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2020

DEDICATORIA

A mi familia...

AGRADECIMIENTOS

A mis amados padres Teresa y Erick por aportar en mi bienestar y apoyo durante todos estos años fuera de mi ciudad natal. Gracias a ESPOL y a los docentes que me guiaron durante el desarrollo integral de mis conocimientos y habilidades formativas de mi carrera universitaria; también a CIBE por brindarme la oportunidad de desarrollar mi proyecto de titulación en sus instalaciones y a la guía fundamental que recibí de la PhD Nardy Diez y el Ing. Jeffrey Vargas por lo enseñado y aprendido durante estos meses.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me(nos) corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *(nombre de los participantes)* y doy(damos) mi(nuestro) consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

Erika López Pincay

EVALUADORES

Diego Gallardo Polit

PROFESOR DE LA MATERIA

Nardy Diez García

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

El chocho (*Lupinus sp*) se caracteriza por tener altos porcentajes de proteínas, grasas y fibras, es un cultivo tradicional andino y es libre de modificaciones genéticas. Ecuador busca incrementar la producción para exportar este grano, pero la búsqueda de estrategias para una adecuada valorización del cultivo es lo que puede otorgar un crecimiento económico al sector agroindustrial del país. Protocolos previos de extracción de proteínas de chocho desarrollado en CIBE-ESPOL, mantenían gran cantidad de proteína insoluble. En este proyecto se desarrollaron dos metodologías de extracción para incrementar el porcentaje de solubilidad en las proteínas y caracterizar los residuos del proceso para evaluar futuras aplicaciones e incrementar su atractivo para la industria.

Se uso el protocolo de extracción por agitación orbital, con un buffer salino por triplicado, tres grupos experimentales: cocción leve (A), cocción alta (B) y sin cocción (C). Se realizo una prueba de solubilidad de las proteínas obtenidas. La prueba de concentración de proteínas del producto final y residuos 1 y 2, se hizo mediante el método de Bradford. Los resultados se analizaron en el programa estadístico MetaboAnalyst 4.0.

Los resultados de solubilidad de proteínas mostraron que el grupo B obtuvo más del 80% de solubilidad y el grupo A el 59%, ambos con altas concentraciones de proteínas, el grupo C y H tuvieron menos del 16%; así mismo estos grupos mostraron menores concentraciones de proteínas.

La metodología del grupo B alcanzo la mayor solubilidad y contenido total proteico. Los residuos son potenciales para seguir extrayendo proteínas o darle otra aplicación comercial.

Palabras Clave: Extracción de proteínas, *Lupinus sp*, agitación orbital, solubilidad de proteínas, agroindustria.

ABSTRACT

The chocho (Lupinus sp) is characterized by having high percentages of proteins, fats and fibers, is a traditional Andean crop and is free of genetic modifications. Ecuador seeks to increase production to export this grain, but the search for strategies for an adequate valuation of the crop is what can give economic growth to the agro-industrial sector of the country. Previous protocols for the extraction of proteins from chocho developed in CIBE-ESPOL, maintained a large amount of insoluble protein. In this project, two extraction methodologies were developed to increase the percentage of protein solubility and characterize the process residues to evaluate future applications and increase their attractiveness to the industry.

The orbital agitation extraction protocol was used, with a triplicate saline buffer, three experimental groups: mild cooking (A), high cooking (B) and no cooking (C). A solubility test of the obtained proteins was performed. The protein concentration test of the final product and residues 1 and 2 was done using the Bradford method. The results were analyzed in the statistical program MetaboAnalyst 4.0.

The protein solubility results showed that group B obtained more than 80% solubility and group A 59%, both with high protein concentrations, group C and H had less than 16%; Likewise, these groups showed lower protein concentrations.

The B group methodology achieved the highest solubility and total protein content. Residues are potential to continue extracting proteins or give it another commercial application.

Keywords: *Protein extraction, Lupinus sp, orbital agitation, protein solubility, agribusiness.*

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES	I
RESUMEN	II
<i>ABSTRACT</i>	III
ÍNDICE GENERAL.....	IV
ABREVIATURAS	VI
SIMBOLOGÍA.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
CAPÍTULO 1	10
1. Introducción.....	10
1.1 Descripción del problema	11
1.2 Justificación del problema	12
1.3 Objetivos	12
1.3.1 Objetivo General.....	12
1.3.2 Objetivos Específicos.....	12
1.4 Marco teórico	13
1.4.1 Proteínas solubles	13
1.4.2 Materia prima.....	13
1.4.3 Importancia	13
1.4.4 Propiedades químicas y valor nutricional.	14
1.4.5 Metodologías de aislamiento de proteínas.....	14
1.4.6 Productos de cocho	15
CAPÍTULO 2	17
2. Metodología.....	17
2.1 Materiales	17

2.2	Proceso de desamargado y molienda	18
2.3	Extracción de proteínas.....	18
2.3.1	Lavados de alcoholes	18
2.3.2	Extracción por agitación orbital	19
2.4	Análisis de solubilidad	21
2.5	Análisis de concentración de proteínas	21
2.6	Análisis estadístico y comparación de productos	21
CAPÍTULO 3		22
3.	Resultados Y ANÁLISIS	22
3.1	Resultados del análisis de solubilidad	22
3.2	Resultados del análisis de concentraciones de proteínas.	24
3.3	Resultados de caracterización de residuos	27
CAPÍTULO 4		29
4.	Conclusiones Y Recomendaciones	29
4.1	Conclusiones.....	29
4.2	Recomendaciones	29
BIBLIOGRAFÍA		30
APÉNDICES		34

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
PCA	Análisis de Componentes Principales
ANOVA	Análisis de Varianza

SIMBOLOGÍA

ul	Microgramo
mg	Miligramo
pH	Potencial de hidrógeno
g	gramo
NaCl	Cloruro de sodio
C6H8O7	Ácido cítrico

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1, Pasos ilustrados para el lavado de alcoholes respectivos para el grano triturado de chocho.....	19
Figura 2.2, Procesos de la segunda fase de la extracción de proteínas por el método convencional de agitación orbital.....	20
Figura 2.3, Último proceso de la extracción luego del lavado de alcohol del paso 5.....	20
Figura 3.4, Se visualiza con facilidad las proteínas del producto final que no se lograron disolver, los cuatro tubos corresponden al 1% de concentración de muestra por cada grupo experimental.....	23
Figura 3.5, la gráfica de barra visualiza los resultados de solubilidad en porcentajes para cada grupo experimental.....	23
Figura 3.6, los grupos A, B, C y H después de ser disueltos a las siguientes concentraciones 5%, 10% y 20% de saturación.....	24
Figura 3.7, PCA gráfica de puntajes en 2D entre las PC (componentes principales) seleccionadas	25
Figura 3.8, muestra la gráfica de biplot entre las PC seleccionadas.....	26
Figura 3. 9, mapa de calor de todos los grupos experimentales para visualizar las concentraciones de proteínas.	27
Figura 3.10, mapa de calor de concentraciones de proteínas en los residuos del proceso.	28
Figura A.11, Procesos de lavados, cocción y trituración de muestras.	35
Figura A,12, Recuperación de alcohol y obtención de grasas	35
Figura A.13, el primer lavado y destilado de muestra con alcohol grado alimenticio	36
Figura A.14,, Muestras del grupo B con el buffer salino	36
Figura A.15, residuos de almidones con proteínas. Arriba residuo 1 y abajo residuo 2.	37
Figura A.16, Placa con muestras para detectar y cuantificar proteínas	37
Figura A.17, Producto final de proteínas aisladas	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1, descripción de los grupos experimentales	17
---	----

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

El chocho (*Lupinus sp.*) es un grano con alto contenido nutricional, rico en proteínas, fibras y grasas saludables (Erbas et al., 2005) por eso es considerado como una fuente potencial alimenticia para humanos y animales (Mikić et al., 2013); además es un cultivo andino tradicional del Ecuador (Berti et al., 2013) con salida comercial viable por sus varias aplicaciones en la industria alimenticia (Ortega et al., 2010) y nutracéutica (Cabello-Hurtado et al., 2016) (Duranti et al., 2008).

En Ecuador se han desarrollados diversos productos en base del lupino, como son las semillas procesadas y lavadas, que se venden para ensaladas, bocadillos de media tarde y para el conocido cevi-chocho (Jacobsen & Mujica, 2008); chocho tostado, leche de chocho, helado de chocho, carne de chocho, ají y harina de chocho según (Mejía, 2018) que es profesional de cocina de la Asociación de Chef del Ecuador.

En el mercado no existe una harina ni botes de proteínas que en su integridad sea netamente proteica, o que tengan procesos de separación de sus componentes proteicos, almidón y lípidos; enfocándose en el objetivo 12 de desarrollo (ODS) de la ONU se basa en la producción y consumo responsable; el cual describe garantizar las modalidades de dispendio con producción sostenible (Organización de las Naciones Unidas, 2015).

En la obtención de proteínas de los granos del lupino, durante el proceso queda residuos que no logran disolverse en su totalidad debido a que se obtienen proteínas insolubles en la extracción (Lqari et al., 2002). Esto provoca que no se logre aprovechar al máximo el producto y sea poco atractivo para el mercado alimenticio.

Ecuador siendo productor del lupino pretende exportarlo para esto se necesita incrementar 10 veces más la producción del grano. (A.N.P.E, 2015).

En el 2015 la Secretaria de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (Senescyt) otorgo \$ 697.200 al proyecto “Mejora de la cadena productiva del chocho en Ecuador” a la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE) (Ortiz Tirado, 2015); además el 18 de mayo de 2019 la Senescyt firma convenios con la Universidad San Francisco de Quito (USFQ) para potenciar la investigación, desarrollo tecnológico y entrada de conocimiento del área agropecuaria. (Senescyt, 2019)

El presente trabajo tiene como objetivo mejorar los protocolos de obtención de proteínas del chocho; evaluando dos metodologías con una variante entre ellas para garantizar un alto porcentaje de solubilidad de las proteínas obtenidas en el producto final y además permitir caracterizar sus residuos para potenciarlos como subproductos. Los resultados pueden proveer a la industria de alimentos un proceso de aprovechamiento óptimo del producto con un enfoque sustentable, permitiendo una comercialización de mayor alcance e incremento en la economía de la empresa que tendría como ventaja ofertarlo.

1.1 Descripción del problema

Ecuador es el país que más ha aprovechado el potencial de cultivo del lupino de los Andes de América del Sur, donde es posible aumentar la producción y desarrollo de mercado del chocho (Jacobsen & Mujica, 2008).

Pero durante el proceso de extracción de proteínas de *Lupinus sp.* persisten gran cantidad de proteínas que son hidrofóbicas y permanecen en los precipitados del producto final de chocho. Pero son las proteínas solubles las que tienen mayor biodisponibilidad a la hora de la digestión (Ramírez Pimentel et al., 2016). Existe una pérdida en el producto por la falta de solubilidad que aun presentan las proteínas (Lqari et al., 2002), , los residuos de la extracción además aun no son aprovechados; lo cual provocaría fugas económicas, por lo que se necesita mejorar las características proteicas en la obtención de proteínas de chocho para que sea atractivo en el mercado de proteínas vegetales.

1.2 Justificación del problema

El presente trabajo está dirigido a la importancia y reto del área agroindustrial o alimenticia como describe el objetivo 12 de desarrollo (ODS) de la ONU, que se basa en la producción y consumo responsable que determina garantizar las modalidades de dispendio con producción sostenible (Organización de las Naciones Unidas, 2015). Se debe lograr optimizar las proteínas presentes en los granos de lupino que es fuente nutricional de primera mano y necesarias para la buena salud. (Organización de las Naciones Unidas, 2015)

En los andes del Ecuador, el lupino crece sin dificultad (Berti et al., 2013), este grano tiene varias aplicaciones que puede potenciar o reforzar la economía de pequeñas y medianas empresas que están incursando en la comercialización de productos de chocho.

Es grato presentar este proyecto integrador que ha permitido evaluar y desarrollar mis habilidades adquiridas durante la carrera de pregrado y así mismo que sea la oportunidad de presentar una alternativa para obtener proteínas con valor agregado.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Comparar tres metodologías de extracción proteica mediante el análisis de resultados para potenciar las propiedades hidrofílicas de las proteínas obtenidas y caracterizar los residuos del proceso para que puedan ser aprovechados.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Analizar los porcentajes de proteínas y residuos resultantes de ambas metodologías de extracción con cocción leve y con cocción alta del grano de chocho.
2. Caracterizar los residuos del proceso para idear un aprovechamiento productivo de los residuos restantes.
3. Comparar nuestro producto obtenido versus una marca de harina de chocho que se comercializan en los supermercados del Ecuador.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Proteínas solubles

Las proteínas solubles se caracterizan por tener una mayor biodisponibilidad al momento de ser digeridas por nuestro organismo.(Ramírez Pimentel et al., 2016). Además han demostrado habilidades como agentes promotores de la buena salud alejando afecciones como enfermedades cardiovasculares, inflamaciones y cáncer (Udenigwe & Aluko, 2012) (Tkatch et al., 1992)

1.4.2 Materia prima.

Lupinus sp, es el nombre científico de una planta de la familia leguminosa (Watson et al., 1875) perteneciente a uno de los cultivos perdidos de los incas llamado “tarwi” en quechua y chocho en español (Atchison et al., 2016); *Lupinus mutabilis Sweet* es una leguminosa originaria de la zona andina de Sur América, es cultivado desde Colombia hasta el norte de Argentina, pero tiene mayor relevancia en Perú, Ecuador y Bolivia. (Jacobsen & Mujica, 2008).

En Ecuador, el cultivo de lupino crece a la altura de 2 500 metros sobre el nivel del mar (m s. n. m) hasta los 3 600 m s. n. m, con riesgos de las más bajas temperaturas que son soportadas solo por *Lupinus mutabilis Sweet* en estado adulto.

Los lugares potenciales para el cultivo de lupino son ocho zonas: Quito – Latacunga, Cuenca - Loja, Tulcán - Ibarra y Riobamba – Cañar, por sus características agroclimáticas y geoecológicas (Caicedo V. & Peralta I., 2000).

1.4.3 Importancia

Es un cultivo tradicional y de fácil acceso en Ecuador (Berti et al., 2013; Caicedo V. & Peralta I., 2000; Chamba et al., 2016). El chocho (*Lupinus sp*) posee propiedades hepatoprotector (Fontanari et al., 2012) y sus aislados tienen efectos endógenos sobre el metabolismo del colesterol, además de ser un grano con alto potencial para servir como alimento funcional.

El lupino presenta un alto contenido de lisina y baja cantidad de aminoácidos con azufre en los aislados de proteína a diferencia de los cereales, esto lo convierte en buen suplemento alimenticio. (Dervas et al., 1999; El-Adawy et al., 2001).

En estudios epidemiológicos informan que algunos factores anti nutricionales pueden ser beneficiosos como los taninos e inhibidores de tripsina que tienen efecto antioxidante y podrían prevenir el desarrollo del cáncer. (Porrás- Saavedra et al., s. f.)

1.4.4 Propiedades químicas y valor nutricional.

Las semillas de chocho contienen un alto potencial nutricional de (41-51) % de proteínas y (14-24) % de aceites por lo que en Europa aumenta el interés de consumo del grano. (Jacobsen & Mujica, 2008); la semilla de *Lupinus mutabilis* Sweet reporto tener 44,86% presentando valores similares al grano de soya que tiene 40%- 50% aproximadamente (Ströher et al., 2011), grasa 13,91% y fibra 8,58% (Ortega et al., 2010).

Los aislados de proteína de lupino dulce y amargo contienen valores altos en los siguientes aminoácidos esenciales tirosina, fenilalanina, treonina y valina; y los aminoácidos no esenciales como ácido glutámico (25-26) %, el ácido aspártico (9,70-10,73) % y la arginina (8,29- 8,95) % (El-Adawy et al., 2001).

Entre los factores antinutricionales tenemos rafinosa, estaquiosa y alcaloides que les da el sabor amargo. (Chávez & Verónica, 2005). Aunque la presencia de alcaloides no es toxico en concentraciones bajas, normalmente están 0,5- 4 % y bajan al 0,04% al sumergirse en agua corriente o lavados. (Erbas et al., 2005).

1.4.5 Metodologías de aislamiento de proteínas

Antes de la preparación del grano para el aislamiento varios autores realizan procesos de desamargado y molienda. El desamargado varía de acuerdo con el tiempo de remojo, número de lavados e intervalos de tiempo entre cada uno, también puede ser lavados con agua corriente, la temperatura y tiempo de cocción son otras variantes.

La extracción de lípidos comúnmente lo hacen con lavado de hexano (Chiofalo et al., 2012; Lqari et al., 2002; Wäsche et al., 2001) y otros utilizan etanol ha grado alimenticio (Torres et al., 2005).

Cuatro tipos de extracción de proteínas que han usado en varios estudios de análisis del grano de chocho:

- Extracción en condiciones ácidas, luego es clarificado y concentrado usando filtración por membrana de flujo cruzado. (Wäsche et al., 2001).
- Extracción alcalina en punto isoeléctrico, inician usando NaOH al 0,2% en pH 12 o Na₂SO₃ al 0,25% a pH 10,5, centrifugación a 8000 g por 20 min y el sobrenadante se valoraron con HCL 0,5 molar a varios valores de pH (2 a 6.5). (Lqari et al., 2002; Muranyi et al., 2013).
- Aislado de proteínas micelar (MLP) inducida por sal seguida de precipitación con agua fría desmineralizada (NaCl en determinado pH). (Muranyi et al., 2013; Sussmann et al., 2013).
- Para precipitados de proteínas híbridas, usan la extracción alcalina acuosa o inducida por sal seguida por precipitación isoeléctrica o precipitación diluida (Muranyi et al., 2013)
- Agitación orbital es otro método, donde diferentes buffers salinos y compuestos ácidos a diferentes estándares según la solución que se emplee (Navarro et al., 2017)

En cada estudio hay variaciones en porcentajes, sustancias y pH, pero el objetivo es lograr la extracción en el punto isoeléctrico que consiste equilibrar la carga neta total de proteínas con la solución en un determinado pH logrando que la carga final sea cero.

1.4.6 Productos de chocho

El aislado de proteínas del grano de chocho se puede agregar a la pasta, papas fritas y productos cárnicos disgregados para agrandar el valor nutricional, modificar texturas y mejorar aromas (Erbas et al., 2005); es utilizado también para productos lácteos (Cheng et al., 1990), abono para ayudar a la composición del suelo, alimento de

rumiantes (Porras- Saavedra et al., s. f.) y alimento balanceado para peces y camarones (Molina-Poveda et al., 2013; Petterson & Fairbrother, 1996)

Los aislados de lupino dulce tiene la capacidad de producir mayor espuma en comparación del lupino amargo, esto puede ser por el contenido alto de globulina (El-Adawy et al., 2001) y así puede brindar una oportunidad para ser usado en bebidas o refrescos como fuente proteica y podría acoplarse bien en productos de panadería como galletas, panes y otros productos de repostería (Guemes-Vera, Peña-Bautista, Jimenez-Martinez, Davila-Ortiz, & Calderon-Dominguez, 2008; López- López, 2013)

Varios estudios informan de una correlación positiva entre la solubilidad y la capacidad de proteína para emulsionar el aceite estos datos de grano son comparables al de soya (El-Adawy & Khalil, 1994) lo cual lo hace ideal para agregar a productos cárnicos o derivados como embutidos (Alvarado & Guadalupe, 2006; El-Adawy et al., 2001).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

Se definieron tres grupos experimentales descritos en la tabla 1. Para cada grupo se pesó 100 g de grano de chocho. Posteriormente fueron tratados para el desamargado, molienda, extracción de lípidos, aislados de proteínas, evaluación de producto y residuos obtenidos durante el proceso.

Grupo experimental	Descripción
A	Cocción leve
B	Cocción alta
C	Sin cocción

Tabla 1, descripción de los grupos experimentales

Se agrego un grupo H, que representa a la harina comercial, se analizo al final para la prueba de solubilidad y contenido proteico total.

2.1 Materiales

Se inicio con 100 g del grano por cada grupo experimental y tres replicas por cada uno de los grupos.

Se describen los materiales utilizados para la experimentación:

- Objeto de estudio (*Lupinus sp.*)
- Alcohol en grado alimenticio
- Agua destilada
- Buffer de cloruro de sodio y ácido cítrico
- Recipientes de aluminio
- Balanza analítica
- Tubos eppendorf
- Estufa
- Agitador
- Micropipeta
- Fiolas
- pH-metro

- placas de 90 pocillos
- Centrifuga
- Equipo de destilación
- Reactivo de Bradford

2.2 Proceso de desamargado y molienda

Las semillas se lavaron e hirvieron para eliminar los alcaloides (Jacobsen & Mujica, 2008), este proceso solo lo llevo el grupo A. El proceso usado en los lavados se sacó del estudio de (Molina-Poveda et al., 2013) y de los productores de chocho (Caicedo V. & Peralta I., 2000; Mejía, 2018) con modificaciones respectivos en el tiempo de remojo. Los granos del grupo B se lavaron con menor tiempo y se paso directamente a hervir ha altas temperaturas. El grupo C, siguió el protocolo previo, es decir sin lavados y sin cocción.

Para la molienda se trituraron con licuadora, para ello se debe tener muy secos los granos, que se tienen secando en la estufa a 65°C por varias horas.

2.3 Extracción de proteínas

2.3.1 Lavados de alcoholes

Antes de iniciar con la extracción de proteínas se realizan lavados con alcohol en grado alimenticio para eliminar un poco de grasas, estos lavados seguirán durante el proceso ver (Figura 2.1).

Lavado con alcohol ° alimenticio

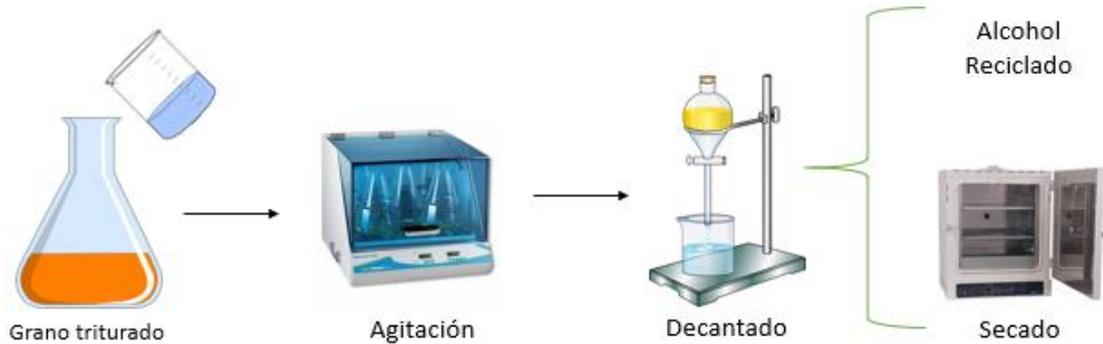


Figura 2.1, Pasos ilustrados para el lavado de alcoholes respectivos para el grano triturado de chocho.

2.3.2 Extracción por agitación orbital

Se hace el lavado con el buffer salino que se encarga de precipitar las proteínas por atracción iónica, la cual depende del pH de la solución para atraer proteínas de mayor peso o menor peso molecular que son las que queremos obtener por su mayor eficiencia en la absorción metabólica (Navarro et al., 2017) Pasa por procesos de agitación orbital con el buffer salino, luego es cernido por un filtro donde tendremos el primer residuo, la decantación y centrifugación vienen después donde separa al segundo residuo, ver (Figura 2.2).

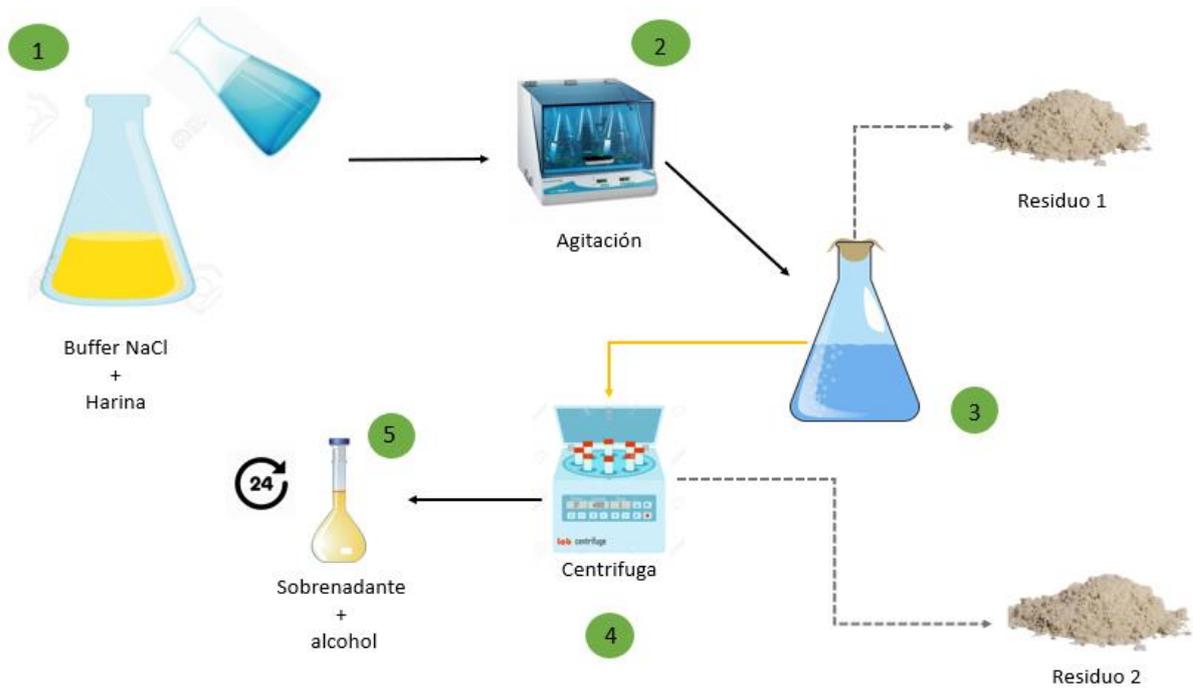


Figura 2.2, Procesos de la segunda fase de la extracción de proteínas por el método convencional de agitación orbital.

En el paso cinco se hace un nuevo lavado de alcohol donde liberara los residuos restantes y precipitarán las proteínas como producto final que se obtendrán centrifugando el precipitado más pequeños lavados de alcoholes, ver (Figura 2.3).



Figura 2.3, Último proceso de la extracción luego del lavado de alcohol del paso 5.

2.4 Análisis de solubilidad

Consistió en llevar a diferentes porcentajes de concentración de la muestra en cierto volumen final para completar a la concentración final que fueron al 1%, 5%, 10% y 20%. A todos los grupos de cada tratamiento, entre ellos el grupo H se agitaron por vortex.

Luego de que pasen por el análisis de proteínas se eliminara el sobrenadante para pesar cada tubo y calcular el peso que se perdió durante la prueba de solubilidad

2.5 Análisis de concentración de proteínas

Para el análisis de proteínas se llevó a cabo el protocolo de reacción por Bradford 2.0. Este describe utilizar 10 ul de muestra (sobrenadantes) en 200 ul del reactivo (Fanglian He, 2011).

Se realizaron dos grupos para el análisis, los cuales se rotularon como (Setcon) set con centrifugación y (Setsin) set sin centrifugación. Los datos se deben ajustar a una curva de calibración siguiendo la siguiente ecuación 1, por lo que es necesario realizar pruebas de sensibilidad previas con la muestra para que los valores no se salgan del rango de lectura; por esto se hicieron diluciones para cada grupo y set experimental.

Ecuación 1, ecuación de la curva de calibración

$$y = 0,0008x + 0,4148$$

2.6 Análisis estadístico y comparación de productos

Para todas las pruebas se analizaron por triplicado.

Se realizó una cuantificación de proteínas mediante el lector de masas usando el protocolo por reacción de Bradford que luego se analizó en el software Gene; el mismo análisis se aplicó a los residuos del proceso y el análisis del grupo H.

El análisis de componentes principales (PCA) entre los grupos experimentales y la comparación con una harina comercial en MetaboAnalyst versión 4.0 un software online. Se crearon imágenes de PCA, biplot de pca y mapas de calor, el programa lo analizó con un ANOVA de 95% de confianza.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Resultados del análisis de solubilidad

La prueba de solubilidad consistió en disolver el producto final en tubos con un volumen determinado para llevar a diferentes concentraciones (1%, 5%, 10% y 20%) de saturación, con esta prueba se disponía a construir una gráfica donde se visualice los porcentajes de soluto disuelto a las diferentes concentraciones.

El grupo B fue el protocolo que más éxito tuvo, alcanzando más del 80% de proteínas solubles obtenidas en el producto final a 1% de concentración de la muestra, ver (Figura 3.4); sin embargo, este grupo mantiene la tendencia de mayor solubilidad en todas las concentraciones versus los demás grupos experimentales, ver (Figura 3.6). El segundo grupo fue el A, con casi el 60% en la concentración 1 y manteniéndose por arriba del 40% en las otras concentraciones de muestra. Ver (Figura 3.5).

El grupo C fue el protocolo previo que se realizó en CIBE (Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador) sirvió como control, este grupo se mantuvo entre el 9% y 12% en todas las concentraciones, llevando una relación con el comportamiento de las barras grises que corresponden al grupo de la harina comercial. Ver (Figura 3.5). Esta comparación también se logra observar en la Figura 3.4.

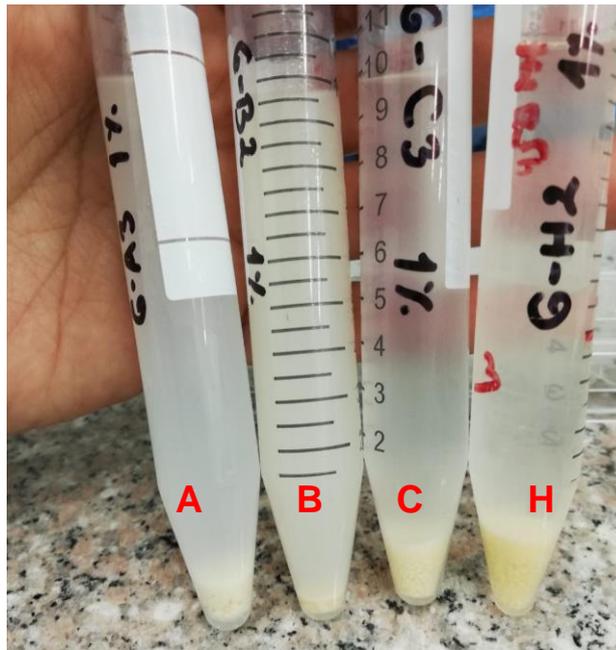


Figura 3.4, Se visualiza con facilidad las proteínas del producto final que no se lograron disolver, los cuatro tubos corresponden al 1% de concentración de muestra por cada grupo experimental.

Porcentajes de solubilidad a diferentes concentraciones de muestra del producto final

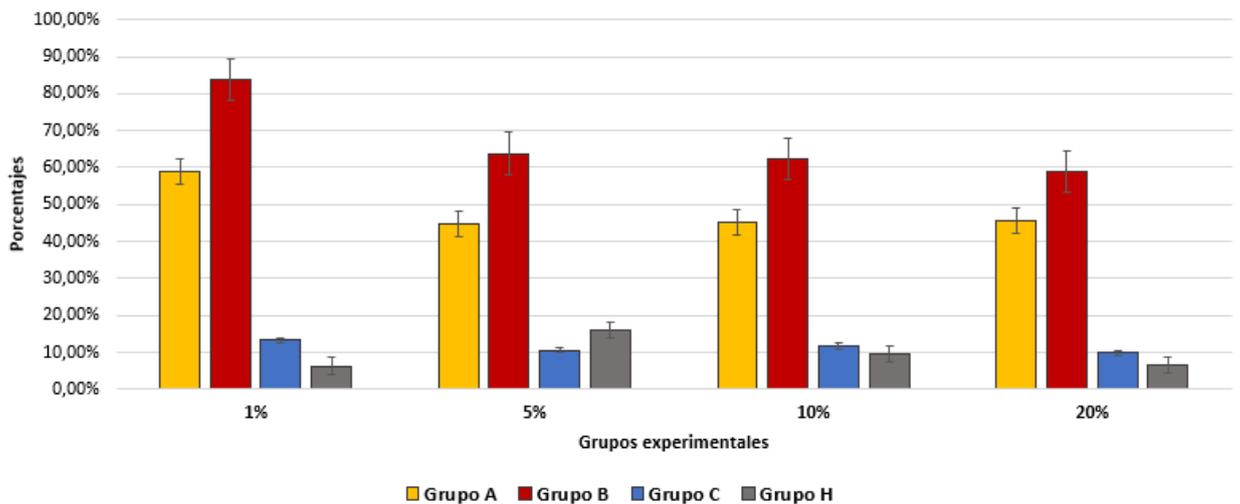


Figura 3.5, la gráfica de barra visualiza los resultados de solubilidad en porcentajes para cada grupo experimental.

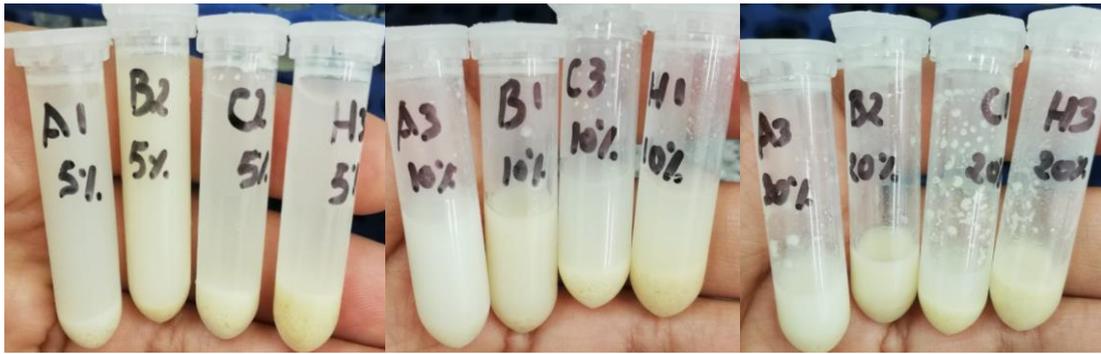


Figura 3.6, los grupos A, B, C y H después de ser disueltos a las siguientes concentraciones 5%, 10% y 20% de saturación.

3.2 Resultados del análisis de concentraciones de proteínas.

La prueba de concentración se dividió en dos grupos llamados setcon, que corresponde al grupo que fue centrifugado y el setsin, es el grupo sin centrifugar.

El setsin reveló valores más altos de concentración proteica en comparación del setcon porque en este grupo era evidente que todo se precipita por la fuerza de velocidad, esto se realizó para comparar si había alguna variación en las concentraciones de cada grupo experimental, así determinar si se muestran las diferencias entre los grupos de cada protocolo respecto al contenido proteico total en los productos finales.

Las gráficas de PCA (Análisis de componentes principales) se usó para encontrar las mejores direcciones que expliquen la varianza en un conjunto de datos (X) sin hacer referencia a las etiquetas de clase (Y). Ver (Figura 3.7).

Se visualiza la separación de los grupos experimentales, donde el grupo A (rojo) y B (verde) se parecen, pero se logra observar que son diferentes y no se relacionan. En el grupo C (azul) y H (celeste) se encuentran relacionados.

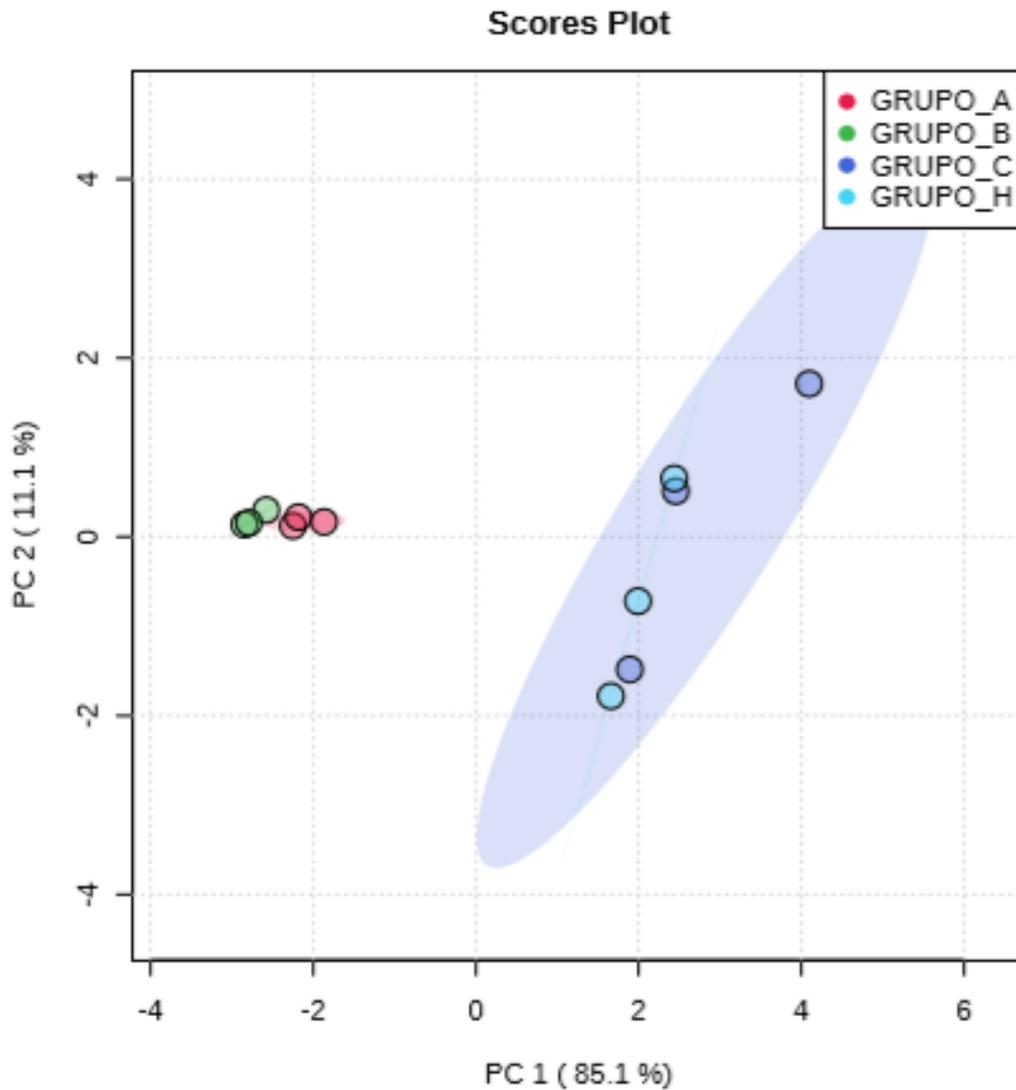


Figura 3.7, PCA gráfica de puntajes en 2D entre las PC (componentes principales) seleccionadas

La gráfica de biplot del PCA aproxima la distribución de una muestra multivariante en un espacio de dos dimensiones con variables que miden la muestra. El grupo H y C fueron alejados de los puntos cercanos de referencia a los extremos del sesin al 20%. El grupo B se asocia mas al setsin al 1% junto al grupo A que muestra agruparse en los setsin al 5% y 10%. Ver Figura 3.8

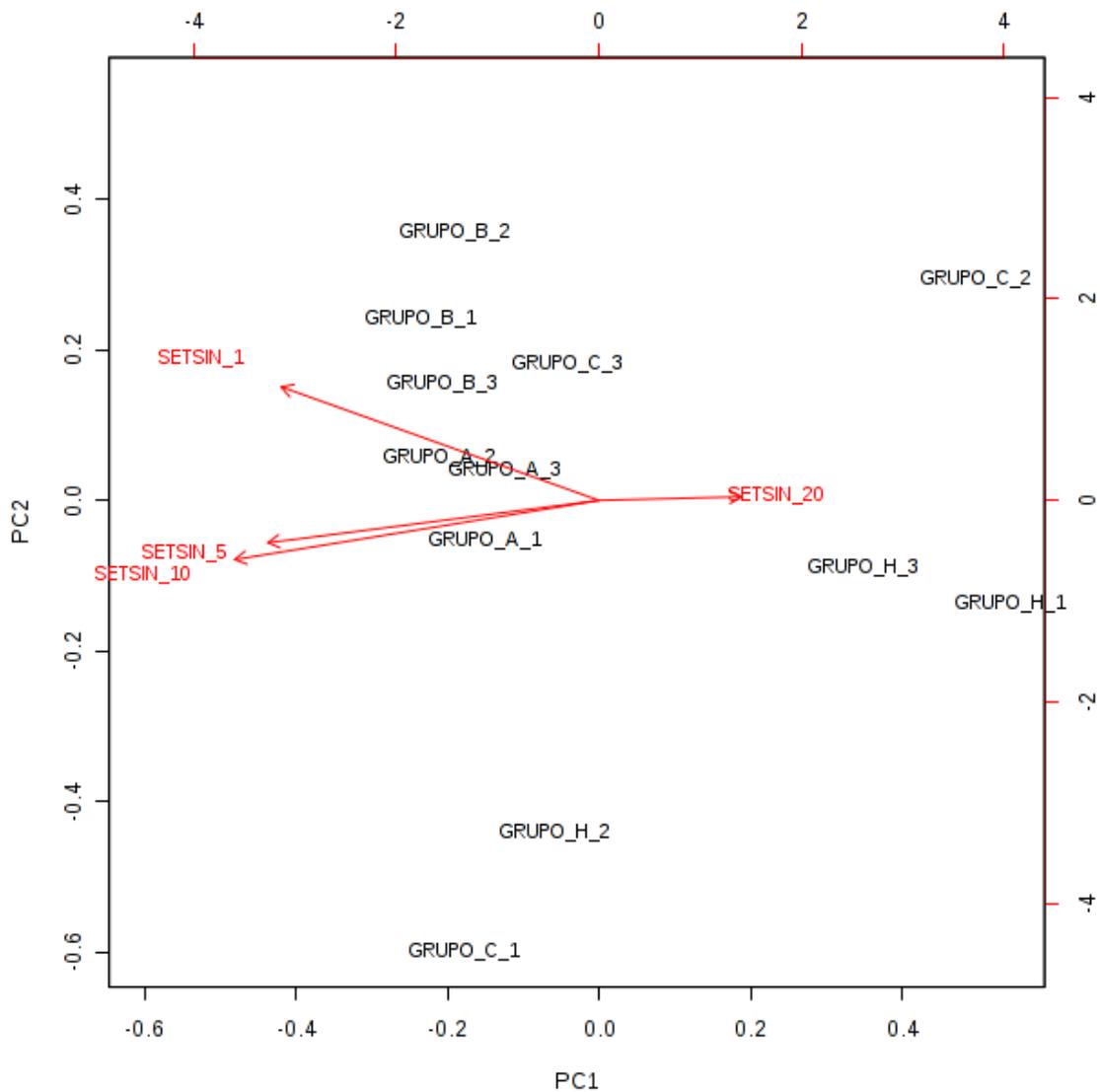


Figura 3.8, muestra la gráfica de biplot entre las PC seleccionadas.

Los resultados de agrupación jerárquica se muestran con los mapas de calor para una mejor visualización de los grupos con los niveles de concentraciones encontrados durante el análisis de concentración proteica.

En el mapa de la figura 3.9, se observan la escala de colores que va de menor concentración (azul oscuro) hasta un rojo vino que representa mayor concentración, el grupo B muestra mayores concentraciones de proteínas versus al resto de los grupos seguido por el A. El grupo H se muestra uniforme en los colores por cada

concentración y grupos de set, menos en el set sin centrifugar al 20%, que puede ser un error al tomar la muestra del tubo eppendorf y de tal forma para el grupo C.

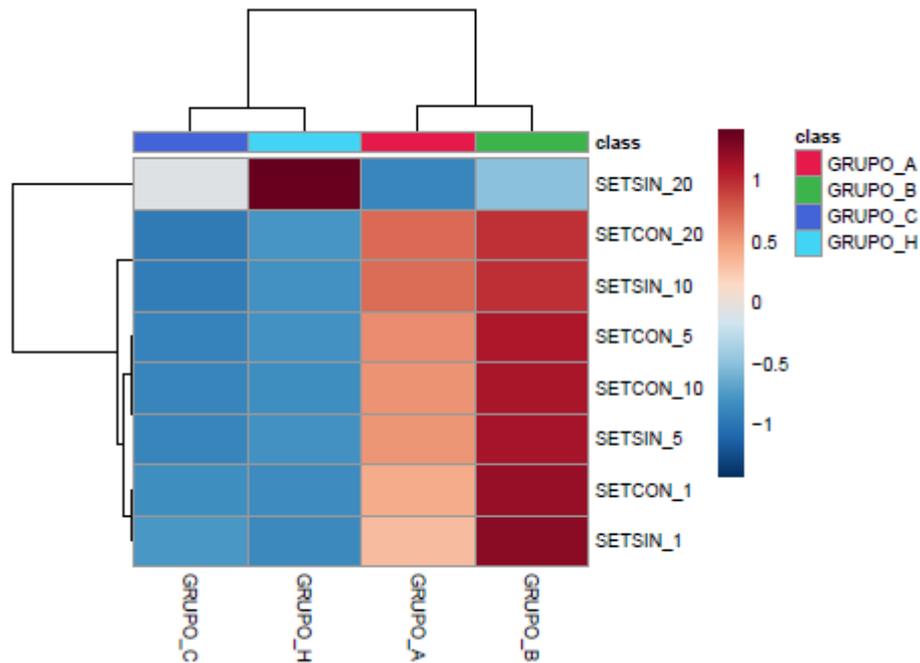


Figura 3. 9, mapa de calor de todos los grupos experimentales para visualizar las concentraciones de proteínas.

3.3 Resultados de caracterización de residuos

- **Alcaloides**
Obtenemos alcaloides de los lavados de desamargado, tienen propiedades potenciales antiinflamatorias y usados para aliviar dolencias (Badmus et al., 2019) (Rocha et al., 2019).
- **Grasas**
El lupino es rico en ácidos grasos esenciales (Khalid & Elhardallou, 2019) y tiene propiedades de contrarrestar enfermedades del hígado graso no alcohólico según en un estudio con ratones obesos de (Lemus-Conejo et al., 2019). En los lavados de alcoholes se extraen las grasas del grano.
- **Almidones más proteínas**

Los almidones obtenidos durante la extracción se nombraron residuo 1 y 2, son masas de diferentes tamaños, los cuales fueron sometidos a la prueba de Bradford para evaluar si aun contenían proteínas.

En la figura 3.10 podremos observar los resultados de caracterización de proteínas de los residuos 1 y 2, el grupo B y C contienen proteínas en los residuos que van quedando de la extracción, el grupo A no retuvo proteínas en los residuos. El residuo 3 es el producto final, se uso para contrarrestar los perfiles de proteínas en cada masa. Ver (Figura 3.10)

El residuo 3 del grupo C mostro baja concentración frente a sus dos primero residuos.

El residuo 3 del grupo B mostros baja concentraciones frente a los dos primeros residuos, las altas temperaturas desprendieron mas proteínas, es necesario seguir extrayendo las proteínas de sus dos primero residuos.

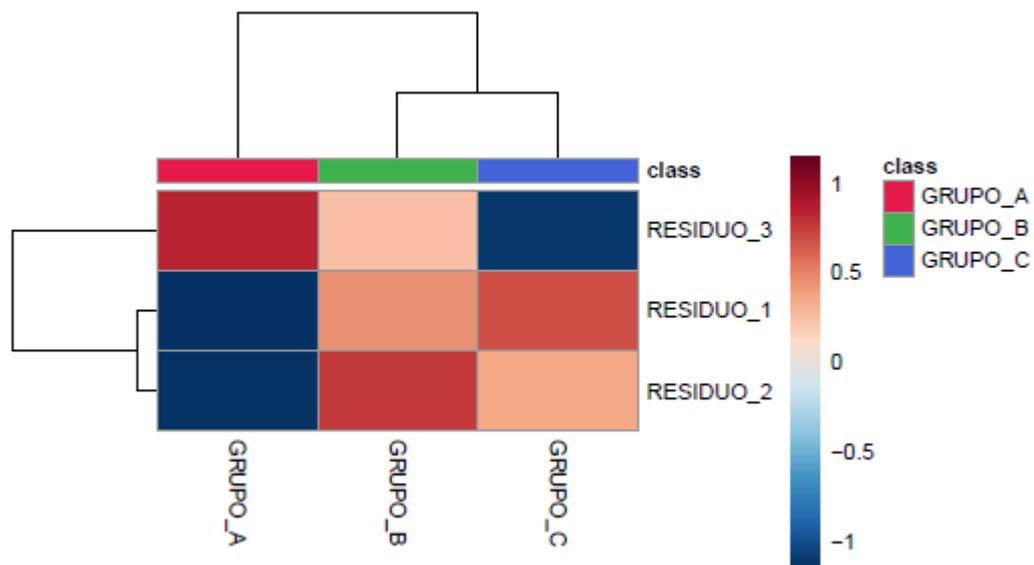


Figura 3.10, mapa de calor de concentraciones de proteínas en los residuos del proceso.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se compararon las metodologías de extracción y se estableció un nuevo protocolo de extracción caracterizado por el uso de altas temperaturas, el incremento en el porcentaje de solubilidad llevo hasta un 84% comparado con la harina comercial de chocho cuya máxima solubilidad es del 16%
- Nuestros resultados también evidencian que los residuos como alcaloides y grasas pueden ser aprovechados por sus propiedades antiinflamatorias y contenido de ácidos grasos saludables, al igual que las proteínas asociadas a almidones que quedan durante el proceso.
- El protocolo del grupo C fue la metodología menos eficiente versus a los dos primeros grupos que se sometieron al tratamiento de la variable temperatura. Pero no mostro mayores diferencias con la comparación que se realizó frente al grupo H, la harina comercial, evaluando la prueba de solubilidad y concentración de proteínas.
- El costo de producción puede reducirse al momento que se industrializado.

4.2 Recomendaciones

- Seguir con la recuperación del alcohol de los lavados mediante la destilación, para no tener desperdicios de recursos.
- Se puede obtener más de 14 g de proteínas en nuestro producto final, realizando más extracciones de los residuos 1 y 2 de los almidones.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, R., & Guadalupe, M. (2006). Efecto de la adición de los derivados de *Lupinus spp* (aislado, harina y concentrado proteico) sobre las características de textura de salchichas [Tesis de licenciatura, ICAp-BD-UAEH]. <http://200.57.56.70:8080/xmlui/handle/231104/296>
- A.N.P.E, A. (2015, diciembre). Ecuador potencia la producción del chocho, un grano andino con fuerte carga nutricional. <https://www.americaeconomia.com/negocios-industrias/ecuador-potencia-la-produccion-del-chocho-un-grano-andino-con-fuerte-carga-nutri>
- Atchison, G. W., Nevado, B., Eastwood, R. J., Contreras-Ortiz, N., Reynel, C., Madriñán, S., Filatov, D. A., & Hughes, C. E. (2016). Lost crops of the Incas: Origins of domestication of the Andean pulse crop tarwi, *Lupinus mutabilis*. *American Journal of Botany*, 103(9), 1592-1606. <https://doi.org/10.3732/ajb.1600171>
- Badmus, J. A., Ekpo, O. E., Hussein, A. A., Meyer, M., & Hiss, D. C. (2019). Cytotoxic and cell cycle arrest properties of two steroidal alkaloids isolated from *Holarrhena floribunda* (G. Don) T. Durand & Schinz leaves. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 112. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2521-9>
- Berti, P. R., Villacrés, E., Segovia, G., Mazón, N., & Peralta I., E. (2013). *Lupinus mutabilis* Sweet, a traditional Ecuadorian grain: Fatty acid composition, use in the Ecuadorian food system, and potential for reducing malnutrition. *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*, 2(6), 153-159.
- Cabello-Hurtado, F., Keller, J., Ley, J., Sanchez-Lucas, R., Jorrín-Novo, J. V., & Aïnouche, A. (2016). Proteomics for exploiting diversity of lupin seed storage proteins and their use as nutraceuticals for health and welfare. *Journal of Proteomics*, 143, 57-68. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.03.026>
- Caicedo V., C., & Peralta I., E. (2000). Zonificación potencial, sistemas de producción y procesamiento artesanal del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) en Ecuador (*Boletín técnico N.º 89*; p. 45). <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/441>
- Chamba, M., Suquilanda, F., & Vásquez, E. (2016). Producción y comercialización de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) en el cantón Saraguro de la provincia de Loja | Centro de Biotecnología. *Centro de Biotecnología*, 5(1), 92-102.
- Chávez, A., & Verónica, V. (2005). Desarrollo de la tecnología de elaboración de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) germinado fresco para aumentar el valor nutritivo del grano [Tesis de grado, *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*]. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/1424>
- Cheng, Y. J., Thompson, L. D., & Brittin, H. C. (1990). Sogurt, a Yogurt-like Soybean Product: Development and Properties. *Journal of Food Science*, 55(4), 1178-1179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb01631.x>

- Chiofalo, B., Lo Presti, V., Chiofalo, V., & Gresta, F. (2012). The productive traits, fatty acid profile and nutritional indices of three lupin (*Lupinus spp.*) species cultivated in a Mediterranean environment for the livestock. *Animal Feed Science and Technology*, 171, 230-239. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.11.005>
- Dervas, G., Doxastakis, G., Hadjisavva-Zinoviadi, S., & Triantafillakos, N. (1999). Lupin flour addition to wheat flour doughs and effect on rheological properties. *Food Chemistry*, 66(1), 67-73. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00234-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00234-9)
- Duranti, M., Consonni, A., Magni, C., Sessa, F., & Scarafoni, A. (2008). The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 19(12), 624-633. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.07.002>
- El-Adawy, T. A., & Khalil, A. H. (Monoufeyah U. (1994). Factors affecting the emulsification capacity of some legume flours. *Egyptian Journal of Food Science (Egypt)*, 22, 249-259.
- El-Adawy, T. A., Rahma, E. H., El-Bedawey, A. A., & Gafar, A. F. (2001). Nutritional potential and functional properties of sweet and bitter lupin seed protein isolates. *Food Chemistry*, 74(4), 455-462. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00163-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00163-7)
- Erbas, M., Certel, M., & Uslu, M. K. (2005). Some chemical properties of white lupin seeds (*Lupinus albus L.*). *Food Chemistry*, 89(3), 341-345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.040>
- Fanglian He. (2011). BCA (Bicinchoninc Acid) Protein Assay (Bio- Protocol vol 101; Bio-Protocol, p. 44). *Departament of Biology, University of Pennsylvania*.
- Fontanari, G. G., Batistuti, J. P., Cruz, R. J. da, Saldiva, P. H. N., & Arêas, J. A. G. (2012). Cholesterol-lowering effect of whole lupin (*Lupinus albus*) seed and its protein isolate. *Food Chemistry*, 132(3), 1521-1526. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.145>
- Guemes-Vera, N., Peña Bautista, R. J., Jimenez-Martinez, C., Davila-Ortiz, G., & Calderon-Dominguez, G. (2008). Effective detoxification and decoloration of *Lupinus mutabilis* seed derivatives, and effect of these derivatives on bread quality and acceptance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(7), 1135-1143.
- Jacobsen, S.-E., & Mujica, A. (2008). Geographical distribution of the Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweert). *Plant Genetic Resouces Newsletter*, 155, 1-8.
- Khalid, I. I., & Elhardallou, S. B. (2019). Physico-Chemical Properties and Fatty Acids Composition of Bitter and Sweet Lupine Seed. *Oriental Journal of Chemistry*, 35(3), 1148-1153.
- Lemus-Conejo, A., Grao-Cruces, E., Toscano, R., Varela, L. M., Claro, C., Pedroche, J., Millan, F., Millan-Linares, M. C., & Paz, S. M. la. (2019). Lupine (*Lupinus angustifolius L.*) Peptide Prevents Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. <https://doi.org/10.20944/preprints201907.0180.v1>
- López López, H. (2013). Elaboración de galletas de trigo fortificadas con harina, aislado y concentrado de *Lupinus mutabilis* [Tesis de licenciatura, Universidad

- Autónomas del Estado de Hidalgo].
<https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/handle/123456789/10957>
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00285-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00285-0)
- Mejía, W. (2018, mayo). El Chocho. Asociación de Chefs del Ecuador. <https://chefs.ec/el-chocho/>
- Molina-Poveda, C., Lucas, M., & Jover, M. (2013). Evaluation of the potential of Andean lupin meal (*Lupinus mutabilis* Sweet) as an alternative to fish meal in juvenile *Litopenaeus vannamei* diets. *Aquaculture*, 410-411, 148-156. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.06.007>
- Muranyi, I. S., Otto, C., Pickardt, C., Koehler, P., & Schweiggert-Weisz, U. (2013). Microscopic characterisation and composition of proteins from lupin seed (*Lupinus angustifolius* L.) as affected by the isolation procedure. *Food Research International*, 54(2), 1419-1429. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.004>
- Navarro, Y. M. C., Salazar, L. M. B., Giraldo, J. D. R., González, J. P. P., & Osorio, J. I. T. (2017). Optimización del Protocolo para la Extracción y la Cuantificación de Proteínas Totales en Semillas Germinadas de Maíz (*Zea mays* L.). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 13(1), 65-68. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2756>
- Organización de las Naciones Unidas. (2015, noviembre 17). Objetivos de Desarrollo. ONU. <https://onu.org.gt/objetivos-de-desarrollo/>
- Ortega, D., Zamora Burbano, E., & Rodríguez, Á. (2010). Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. *Acta Agronómica*, 59(1), 111-118.
- Ortiz Tirado, J. (2015, septiembre). INFORME DE GESTION DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA DURANTE EL PERIODO SEPTIEMBRE 2014 SEPTIEMBRE 2015. [pdfslide.net. https://pdfslide.net/documents/gestion-2014-2015.html](https://pdfslide.net/documents/gestion-2014-2015.html)
- Petterson, D. S., & Fairbrother, A. H. (1996). Lupins as a Raw Material for Human Foods and Animal Feeds. *Indonesian Food and Nutrition Progress*, 3(2), 35-41. <https://doi.org/10.22146/jifnp.52>
- Porras- Saavedra, J., López- López, H., Soto- Simental, S., Dávila- Ortiz, G., Hernández- Fuentes, D., & Guemes-Vera, N. (s. f.). Clave: 33291 Evaluación química y digestibilidad in vitro de *Lupinus spp* del Estado de Hidalgo (Mineral del Chico). 5.
- Ramírez Pimentel, J., Herrera Herrera, A., Aguirre Mancilla, C., Covarrubias Prieto, J., Iturriaga de la Fuente, G., & Raya Pérez, J. (2016). Caracterización de las proteínas de reserva y contenido mineral de semilla de melón (*Cucumis melo* L.). *Revistas mexicanas de ciencias agrícolas*, 7(7). http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342016000701667&script=sci_arttext

- Rocha, T. M., Machado, N. J., Sousa, J. A. C. de, Araujo, E. V. O., Guimaraes, M. A., Lima, D. F., Leite, J. R. de S. de A., & Leal, L. K. A. M. (2019). Imidazole alkaloids inhibit the pro-inflammatory mechanisms of human neutrophil and exhibit anti-inflammatory properties in vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(5), 849-859. <https://doi.org/10.1111/jphp.13068>
- Senescyt. (2019, mayo). Senescyt y la Universidad San Francisco de Quito firman convenios para potenciar la investigación en Ecuador – Senescyt – Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación. <https://www.educacionsuperior.gob.ec/senescyt-y-la-universidad-san-francisco-de-quito-firman-convenios-para-potenciar-la-investigacion-en-ecuador/>
- Ströher, R., Stenzel, M., Pereira, N. C., & Zanin, G. M. (2011). Enzymatic extraction of protein from toasted and not toasted soybean meal. *Procedia Food Science*, 1, 463-469. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.071>
- Sussmann, D., Pickardt, C., Schweiggert, U., & Eisner, P. (2013). Influence of Different Processing Parameters on the Isolation of Lupin (*Lupinus Angustifolius* L.) Protein Isolates: A Preliminary Study. *Journal of Food Process Engineering*, 36(1), 18-28. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2011.00647.x>
- Tkatch, L., Rapin, C. H., Rizzoli, R., Slosman, D., Nydegger, V., Vasey, H., & Bonjour, J. P. (1992). Benefits of oral protein supplementation in elderly patients with fracture of the proximal femur. *Journal of the American College of Nutrition*, 11(5), 519-525. <https://doi.org/10.1080/07315724.1992.10718256>
- Torres, A., Frias, J., & Vidal-Valverde, C. (2005). Changes in chemical composition of lupin seeds (*Lupinus angustifolius*) after selective α -galactoside extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(14), 2468-2474. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2278>
- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2012). Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. *Journal of Food Science*, 77(1), R11-R24. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x>
- Wäsche, A., Müller, K., & Knäuf, U. (2001). New processing of lupin protein isolates and functional properties. *Food / Nahrung*, 45(6), 393-395. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20011001\)45:6<393::AID-FOOD393>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20011001)45:6<393::AID-FOOD393>3.0.CO;2-O)
- Watson, S. (1875). Botanical contributions: On the flora of Guadalupe Island, Lower California; list of a collection of plants from Guadalupe Island, made by Dr. Edward Palmer, with his notes upon them; descriptions of new species of plants, chiefly Californian, with revisions of certain genera. *American Academy of Arts & Science*, 1-85(4), 126-128. <https://doi.org/10.2307/20021459>

APÉNDICES

1. Fotografías

Pretratamiento



Figura A.11, Procesos de lavados, cocción y trituration de muestras.

Destilación



Figura A,12, Recuperación de alcohol y obtención de grasas

Lavado de alcoholes



Figura A.13, el primer lavado y destilado de muestra con alcohol grado alimenticio

Separación por sales



Figura A.14,, Muestras del grupo B con el buffer salino

Residuos



Figura A.15, residuos de almidones con proteínas. Arriba residuo 1 y abajo residuo 2.

Método Bradford

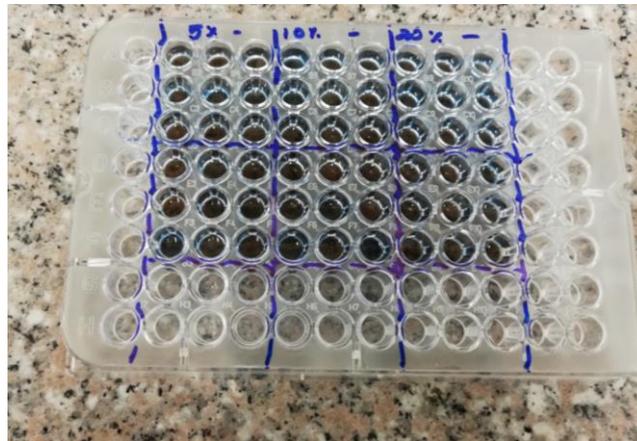


Figura A.16, Placa con muestras para detectar y cuantificar proteínas

Proteínas



Figura A.17, Producto final de proteínas aisladas