

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL**



**“OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO PROTÉICO Y DETERMINACIÓN DEL  
PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE DOS VARIEDADES DE TARWI (*Lupinus  
mutabilis* Sweet)”**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**YENY ROXANA LAURENTE FLORES**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**PROMOCIÓN : 2012 - I**

**PUNO - PERU**

**2016**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL**

**“OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO PROTÉICO Y DETERMINACIÓN DEL  
PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE DOS VARIEDADES DE TARWI (*Lupinus mutabilis*  
Sweet)”**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**YENY ROXANA LAURENTE FLORES**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**FECHA DE SUSTENTACIÓN: 29 DE SETIEMBRE DE 2016**

**APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:**

**PRESIDENTE**

.....

**Ph. D. Juan Marcos Aro Aro**

**PRIMER MIEMBRO**

.....

**Ing. Edgar Gallegos Rojas**

**SEGUNDO MIEMBRO**

.....

**Ing. Mg. Sc. Marienela Calsin Cutimbo**

**DIRECTOR DE TESIS**

.....

**Ing. Mg. Sc. Florentino Victor Choquehuanca Cáceres**

**ASESOR DE TESIS**

.....

**Dra. Rosario Edely Ortega Barriga**

**AREA: INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA**

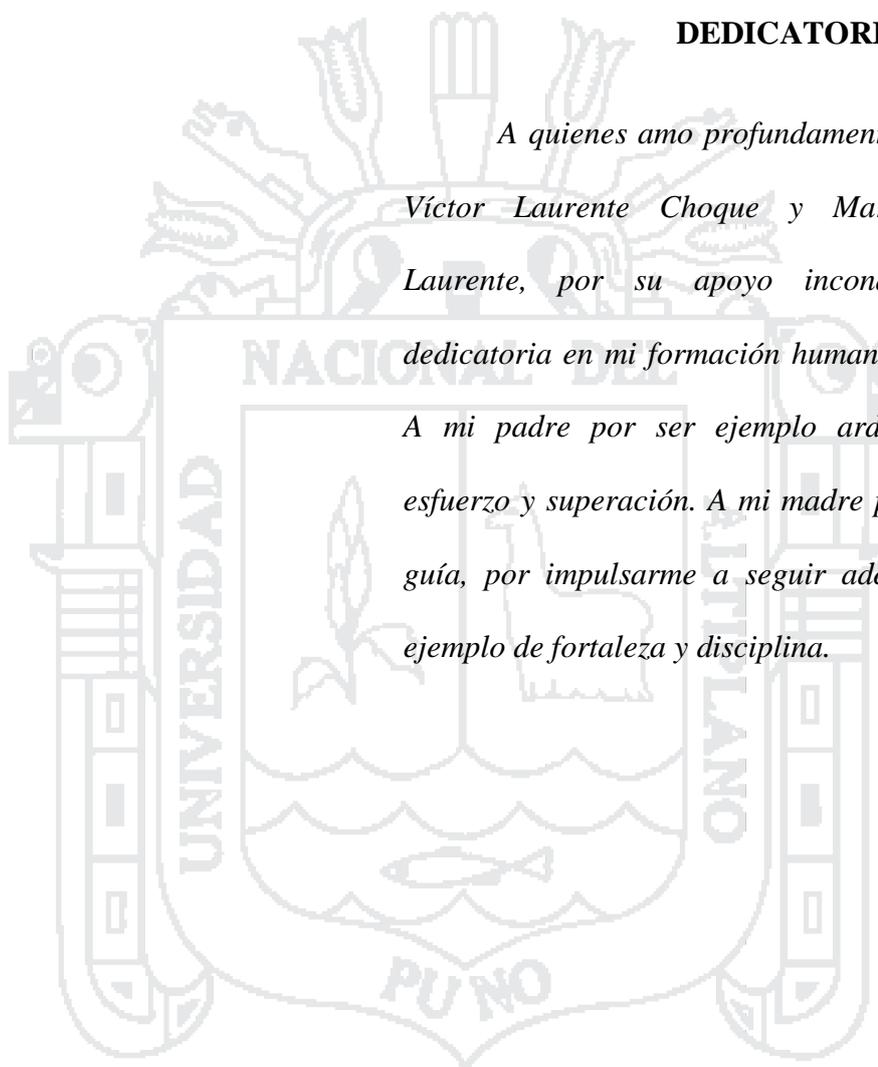
**TEMA: PROPIEDADES FÍSICAS Y ESTRUCTURALES**

**DEDICATORIA**

*A quienes amo profundamente, a mis padres*

*Víctor Laurente Choque y María Flores de  
Laurente, por su apoyo incondicional y su  
dedicatoria en mi formación humana y profesional.*

*A mi padre por ser ejemplo arduo de trabajo,  
esfuerzo y superación. A mi madre por ser amiga y  
guía, por impulsarme a seguir adelante y por su  
ejemplo de fortaleza y disciplina.*



## AGRADECIMIENTOS

- A Dios por la fortaleza, paciencia y sabiduría que puso en mí durante este tiempo.
- A nuestra Alma Mater la Universidad Nacional del Altiplano, a la Facultad de Ciencias Agrarias y a la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial.
- A los docentes de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, por sus enormes aportes en nuestra formación profesional.
- Al Ing. M. Sc. F. Victor Choquehuanca Cáceres, director de tesis por su comprensión y acertada dirección en la culminación del presente trabajo.
- A Ing. M. Sc. Rosario E. Ortega Barriga por el asesoramiento en la ejecución del presente trabajo.
- A mis jurados por sus aportes críticos en cuanto a la investigación, logrando con ello llegar a perfeccionar el presente trabajo y logrando también inspirar en mí la mayor vocación de investigadora.
- A Oscar, al que agradezco por su sincera amistad, sabios consejos, apoyo incondicional, ánimo y compañía en los momentos buenos y difíciles de mi vida.
- A mis hermanas Lic. Vilma Marleny, Sandra Rocio y Cinthya Maribel, con quienes estoy sumamente agradecida por sus consejos y su constante impulso para seguir superándome profesionalmente.
- A mis amigos que han formado parte de mi vida pre-profesional; las circunstancias de la vida hacen que algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, pero sin importar en donde estén, quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todos sus buenos deseos.

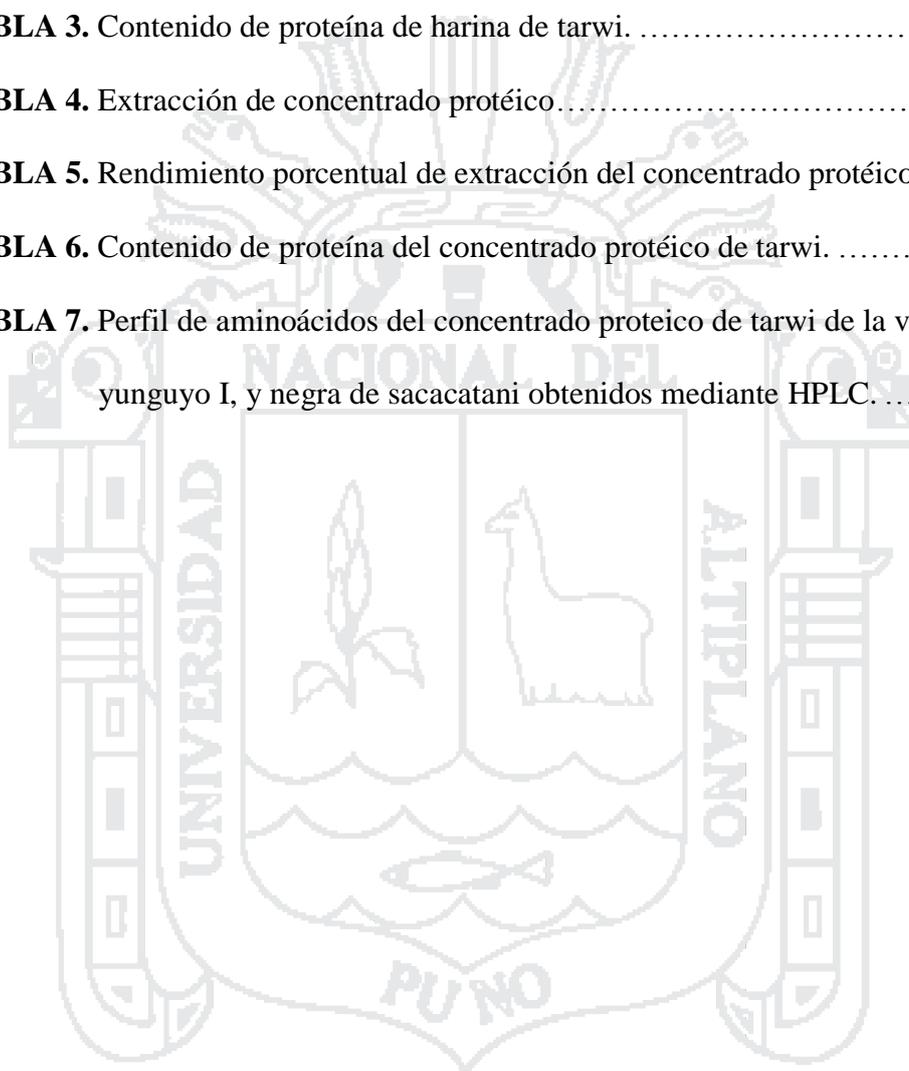
## ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE.....	5
INDICE DE TABLAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE ANEXOS.....	9
RESUMEN.....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	14
2.1.TARWI: ORIGEN E IMPORTANCIA.....	14
2.1.1. Clasificación Taxonómica.....	14
2.1.2. Morfología de la semilla de Tarwi.....	15
2.1.3. Composición Química y Valor Nutricional del Tarwi.....	16
2.1.4. Valor Nutricional.....	16
2.2.DEFINICIÓN DE LA PROTEÍNA.....	17
2.2.1. Desnaturalización de las Proteínas.....	19
2.3. CONCENTRADO PROTÉICO.....	20
2.4. AMINOÁCIDOS.....	22
2.4.1. Clasificación según su esencialidad.....	23
2.5. AMINOÁCIDOS ESENCIALES.....	23
2.6. AMINOÁCIDOS NO ESENCIALES.....	27
2.7. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.....	31
2.7.1. Instrumentación en HPLC.....	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1. Lugar de Ejecución.....	35
3.2. Materia Prima.....	35
3.3. Equipos, materiales y reactivos.....	35

3.3.1. Equipos.....	35
3.3.2. Materiales de Laboratorio.....	36
3.3.3. Reactivos.....	37
3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	38
3.4.1. Obtención del concentrado protéico de tarwi.....	38
3.4.2. Determinación del perfil de aminoácidos del concentrado proteico de dos variedades de tarwi mediante (HPLC) .....	40
3.5. METODOS DE ANÁLISIS.....	41
3.5.1. Determinación de proteína.....	41
3.6. DISEÑO DE INVESTIGACION.....	41
3.6.1. Diseño estadístico para los concentrados protéicos de tarwi.....	41
3.6.2. Diseño estadístico para el perfil de aminoácidos de tarwi.....	42
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	43
4.1. Obtención del concentrado protéico de tarwi.....	43
4.2. Determinación del perfil de aminoácidos del concentrado protéico de tarwi mediante HPLC.....	48
CONCLUSIONES.....	56
RECOMENDACIONES.....	57
BIBLIOGRAFIA.....	58
ANEXOS.....	69

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>TABLA 1.</b> Composición química del tarwi.....	16
<b>TABLA 2.</b> Cómputo de aminoácidos de <i>lupinus mutabilis</i> sweet.....	31
<b>TABLA 3.</b> Contenido de proteína de harina de tarwi. ....	43
<b>TABLA 4.</b> Extracción de concentrado protéico.....	45
<b>TABLA 5.</b> Rendimiento porcentual de extracción del concentrado protéico de tarwi..	46
<b>TABLA 6.</b> Contenido de proteína del concentrado protéico de tarwi. ....	47
<b>TABLA 7.</b> Perfil de aminoácidos del concentrado proteico de tarwi de la variedad yunguyo I, y negra de sacacatani obtenidos mediante HPLC. ....	49



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>FIGURA 1.</b> Estructura general de los aminoácidos.....	22
<b>FIGURA 2.</b> Equipo de HPLC.....	33
<b>FIGURA 3.</b> Diagrama básico de un sistema de HPLC.....	34
<b>FIGURA 4.</b> Diagrama de flujo para la obtención de concentrado de proteína por método de punto isoeléctrico. ....	38
<b>FIGURA 5.</b> Gráfica de distribución.....	84



## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
<b>Anexo I</b> Determinación de proteína	70
<b>Anexo II</b> Desviación estándar e intervalo de confianza del contenido de proteína de tarwi	72
<b>Anexo III</b> Desviación estándar e intervalo de confianza de la extracción del concentrado proteico de tarwi	73
<b>Anexo IV</b> Desviación estándar e intervalo de confianza del porcentaje de rendimiento de extracción del concentrado protéico de tarwi	74
<b>Anexo V</b> Análisis de varianza – diseño factorial $2^K$ de la extracción del concentrado protéico de tarwi	75
<b>Anexo VI</b> Desviación estándar e intervalo de confianza del contenido de proteína del concentrado protéico de tarwi	76
<b>Anexo VII</b> Desviación estándar e intervalo de confianza del perfil de aminoácidos del concentrado protéico de tarwi de la variedad Yunguyo I	77
<b>Anexo VIII</b> Certificado de determinación del perfil de aminoácidos por HPLC de tarwi variedad Yunguyo I	78
<b>Anexo IX</b> Cromatograma del perfil de aminoácidos de de tarwi variedad Yunguyo I	79
<b>Anexo X</b> Desviación estándar e intervalo de confianza del perfil de aminoácidos del concentrado protéico de tarwi de la variedad Negra de Sacacatani	80
<b>Anexo XI</b> Certificado de determinación del perfil de aminoácidos por HPLC de tarwi variedad Negra de Sacacatani	81
<b>Anexo XII</b> Cromatograma del perfil de aminoácidos de de tarwi variedad Negra de Sacacatani	82

- Anexo XIII** Prueba de distribución de t-student para la comparación del perfil de aminoácidos del concentrado proteico de dos variedades de tarwi 83
- Anexo XIV** Panel fotográfico 85



## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo la extracción del concentrado protéico y su posterior determinación del perfil de aminoácidos de dos variedades de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet): Yunguyo I y Negra de Sacacatani. La extracción del concentrado protéico se realizó por el método de punto isoeléctrico a pH de 4.5 y temperaturas de 30°C y 40°C con 3 repeticiones por tratamiento, dando mejores resultados de extracción los tratamientos realizados a la temperatura de 40°C en ambas variedades. Se utilizó el diseño factorial  $2^k$  para el análisis de datos de la extracción del concentrado protéico, el cual demostró que no existe diferencia significativa en cuanto a la variedad, los resultados también demostraron que existe diferencia altamente significativa en cuanto a la temperatura empleada para extracción, por lo cual se tomó las muestras resultantes del tratamiento realizado a 40°C para ambas variedades. La determinación del perfil de aminoácidos se realizó mediante el método HPLC (Cromatografía de líquidos de alta resolución), los resultados se sometieron a una prueba de hipótesis utilizando la distribución de t-student (nivel de significancia del 5%), el cual demostró que no existe diferencia significativa en cuanto a la composición del perfil de aminoácidos entre las dos variedades.

**Palabras clave:** Tarwi, concentrado protéico, perfil de aminoácidos.

## I. INTRODUCCIÓN

El Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet), es una leguminosa andina, cuyas raíces tienen la capacidad de fijar nitrógeno en el suelo. Su elevado contenido de proteína (44,3 %) y grasa (16,5 %) en la semilla, es útil para mejorar la nutrición de la población; sin embargo, el grano contiene algunas sustancias que limitan su uso directo en la alimentación humana y animal; estas sustancias son los alcaloides, que confieren al chocho un sabor amargo y de carácter tóxico (Acuña & Caiza, 2010).

El aprovechamiento de alimentos ricos en proteína están siendo utilizados en la elaboración de concentrados y aislados los cuales son empleados en la alimentación humana. El uso de aminoácidos y péptidos en la agricultura y alimentación presenta múltiples posibilidades de aplicación e importantes resultados como: aumentos de producción y mejora de calidad; corrección y prevención de deficiencias de macro y micronutrientes, acción anti estrés, bioestimulante de los sistemas hormonales y enzimáticos. El género *Lupinus* presenta alto contenido de proteínas, las cuales lo constituyen como una fuente potencial; recientemente, se ha descrito que las proteínas de *Lupinus* pueden ser una alternativa de sustitución a la soya (Lampart *et al.*, 2003).

En la elaboración de aislados y concentrados de proteínas se emplean materias primas con bajo nivel de grasa para evitar interferencias que disminuyan el grado de extracción (Vioque, 2000); por tal razón, el presente trabajo de investigación mantiene su enfoque de estudio, en la importancia del contenido nutricional del Tarwi, específicamente en el perfil de aminoácidos que este posee, para que posteriormente sea empleado en investigaciones relacionadas al producto de esta investigación. Para materializar la presente investigación, se planteó los siguientes objetivos:

- Obtener el concentrado protéico de dos variedades de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) mediante el método de punto isoeléctrico.
- Determinar el perfil de aminoácidos obtenidos del concentrado protéico de dos variedades de tarwi mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).



## II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### 2.1. TARWI: ORIGEN E IMPORTANCIA

El tarwi o lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) es una leguminosa reconocida como una de las más ricas en nutrientes (Villacrés *et al*, 2006). Se caracteriza por tener un elevado contenido de proteínas y ácidos grasos lo que la constituyen como una excelente alternativa para la nutrición humana y animal. Se originó a lo largo de los Andes, actualmente se encuentra únicamente en Ecuador, Perú y Bolivia, con cierto desarrollo agronómico y agroindustrial. Se destaca por ser resistente a condiciones adversas, como plagas, enfermedades, sequías y heladas (Ortega, Rodríguez & Zamora, 2010).

Un estudio descriptivo de la flora Peruana otorga una amplia distribución ecológica del género *Lupinus*, considerando alrededor de 20 especies que crece en condiciones ambientales diferentes existiendo una gran diversidad de biotipos que se encuentran mayormente en la vertiente occidental del Perú (Matucana) ubicado a una altitud de 1800 a 2400 m.s.n.m., de este piso ecológico hasta los 3900 m.s.n.m. se desarrollan la variedad *Lupinus mutabilis* Sweet y *Lupinus microphylus*, este último caracterizado por ser una especie de tallos cortos con racimos capituliformes, constituidos por pocas flores y en estas estribaciones de la vertiente Oriental de los andes a 4900 m.s.n.m. (Lescano, 1999).

#### 2.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 1998), clasificó esta especie de la siguiente manera:

Reino : Vegetal

Sub reino : Fanerógama

División : Espermatofitas

Sub división : Angiospermas

Clase : Dicotiledóneas

Sub clase : Arquiclamídeas

Orden : Rosales

Familia : Leguminosas

Género : Lupinus

Especie : Mutabilis

Nombre científico : *Lupinus mutabilis* Sweet

Nombre común : Tarwi, tahuri, chocho.

### 2.1.2. MORFOLOGÍA DE LA SEMILLA DE TARWI

Palacios *et al.* (2003) mencionan que en estudios realizados las semillas de tarwi tiene las siguientes características:

Semillas : 0.5 cm de diámetro

Peso : 0.2 – 0.3 g

Forma : Variada, redonda, ovalada y ligeramente cuadrada.

Color : Blanco, negro, amarillo, gris, pardo y marrón.

### 2.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y VALOR NUTRICIONAL DEL TARWI

Es conocido que el tarwi es rico en proteínas y grasas, motivo por el cual se debería promover un mayor consumo de esta leguminosa (Miano & Garcia, 2015). Los estudios realizados en más de 300 diferentes genotipos, muestran que la proteína varía de 41- 51% y la grasa de 14-24%. Por lo tanto la proteína es inversamente proporcional al contenido de grasa. El contenido de ácidos grasos del grano de chocho se destaca la presencia de ácidos grasos insaturados como el ácido linoléico (omega 6), el oléico (omega 9) en cantidades significativas y el ácido linolénico (omega 3) en bajas concentraciones. Con relación a los carbohidratos, el contenido de almidón y sacarosa es bajo comparado con los oligosacáridos como la rafinosa y verbascosa, los cuales son eliminados durante el desamargado o eliminación de alcaloides (Caiza, 2011; Urrutia, 2010).

**Tabla 1.** Composición química del tarwi (100g).

Componentes (%)	Tarwi
Proteína	44,3
Grasa	16,5
Carbohidrato	28,2
Fibra	7,1
Ceniza	3,3
Humedad	7,7

Fuente: Caiza (2011).

### 2.1.4. VALOR NUTRICIONAL

La proteína del chocho contiene cantidades adecuadas de lisina y leucina que son aminoácidos esenciales, por lo que se considera apropiado para los niños en etapa de crecimiento, mujeres embarazadas y durante la lactancia. Al combinar este alimento con algunos cereales se logra una excelente complementación de aminoácidos, cuyo

valor protéico es comparable al de los alimentos de origen animal como la leche, la carne, el queso y el huevo (Navarrete, 2011; Erazo & Terán, 2011).

Las grasas presentes en el grano de chocho poseen ácidos grasos esenciales como el linolénico y linoléico que son importantes para el desarrollo del sistema nervioso central, la función inmunológica y el crecimiento corporal. (Baldeón, 2012). La fibra alimentaria ubicada en la cáscara del grano, en promedio asciende a 10,4% y reviste importancia debido a su efecto de saciedad lo que es beneficioso para prevenir la obesidad, combatir el estreñimiento y compresión en el tracto intestinal. El calcio y el fósforo presentes en el grano de chocho contribuyen en el mantenimiento del sistema óseo, actividad del músculo cardíaco y producción de energía. Entre los microelementos del grano chocho sobresale el hierro, este es un mineral básico para la producción de hemoglobina, transporte de oxígeno e incremento de la resistencia a las enfermedades. El grano de chocho también es una valiosa fuente de vitamina B en sus formas como la Tiamina (B1) fundamental para el proceso de transformación de azúcares, conducción de impulsos nerviosos y metabolismo del oxígeno, la Riboflavina (B2) que favorece a la absorción de proteínas, grasas y carbohidratos. La Niacina (B3) que favorece la eliminación de químicos tóxicos del cuerpo, la participación en la producción de las hormonas sexuales y las hormonas relacionadas con el estrés (Villacrés *et al.*, 2006; Carbajal *et al.*, 2013; Guemes *et al.*, 2008).

## 2.2. DEFINICIÓN DE LA PROTEÍNA

Para Mckee (2014) las proteínas son moléculas complejas que desempeñan muchas funciones en los seres vivos. Además, están compuestos de uno o más polipéptidos llamados aminoácidos que se encuentran tanto en células animales como en vegetales.

Por otra parte en la nutrición, las proteínas poseen un papel fundamental ya que proporcionan nitrógeno y aminoácidos que podrían ser utilizados para las síntesis de las proteínas y otras sustancias nitrogenadas (Gálvez, Flores & González, 2013).

Las proteínas son moléculas complejas. Con la posibilidad de que los 20 aminoácidos puedan ser agrupados en orden aleatorio para conformar polipéptidos de cientos de aminoácidos que tienen el extraordinario potencial de producir una gran cantidad de variantes en su conformación (Berge *et al.*, 2004). Estas múltiples características, muchas de las cuales están interrelacionadas, son las responsables de la gran variedad de funciones, estructuras y demás características de las proteínas, todas las proteínas son cadenas lineales compuestas de algunos de los veinte aminoácidos (Stryer, 2001). Es decir, son muy necesarias para la vida por que desempeñan la mayor parte de funciones en las células de todos los seres vivos y son fundamentales para el crecimiento, desarrollo, reparación y para el buen funcionamiento del organismo.

La calidad de una proteína depende en gran parte de la concentración de sus aminoácidos y su digestibilidad. Es decir si una proteína es incompleta en uno o más aminoácidos esenciales, se denomina “aminoácido limitante” cuyas concentraciones de aminoácidos se hallan por debajo de los niveles de proteína de referencia (Padrón, Oropeza & Montes, 2015). Por lo tanto, las proteínas al poseer uno o más aminoácidos limitantes restringen la síntesis proteica en el organismo y no pueden ser utilizadas completamente. Sin embargo, al presentar baja calidad y ser deficiente en aminoácidos puede mejorarse nutricionalmente, suplementarse con otra proteína rica en ese aminoácido esencial. Por ejemplo, la mezcla de proteínas de cereales con proteínas de leguminosas que proporciona un contenido en aminoácidos esenciales completo y bien equilibrado (Fennema, 2010).

### 2.2.1. DESNATURALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

La palabra desnaturalización indica que la estructura se aleja de la forma nativa debido a un importante cambio en su conformación tridimensional, producida por movimientos de los diferentes dominios que presenta la proteína. Sin embargo, este cambio conformacional trae como consecuencia pérdidas de estructura secundaria, terciaria, cuaternaria pero no cambios de la estructura primaria, es decir que la desnaturalización no implica una hidrólisis del enlace peptídico. Por lo tanto, las bajas estabilidades conformacionales de las proteínas nativas lo hacen fácilmente susceptibles a la desnaturalización; todas las proteínas desnaturalizadas tienen la misma conformación, muy abierta y con una interacción máxima con el disolvente, por lo que una proteína soluble en agua cuando se desnaturaliza se hace insoluble y precipita. La desnaturalización de la proteína se produce por cambios de temperatura o variaciones de pH (Blanco, 2010; Badui, 2013).

#### a) Cambios de temperatura

Para Fennema (2010) las proteínas sufren diversos grados de desnaturalización que pueden afectar las propiedades funcionales y nutricionales en los alimentos. Es decir, la desnaturalización es un mecanismo que implica las desestabilizaciones de sus interacciones no covalentes, los enlaces de hidrogeno, las interacciones electrostáticas, que se desequilibran a temperaturas altas y ganan estabilidad a temperaturas bajas.

En otras palabras, la aplicación de calor es uno de los agentes desnaturalizantes que se utilizan con mayor frecuencia, afecta la estabilidad de las interacciones no covalentes de la estructura tridimensional de las proteínas, pues a medida que se eleva la temperatura la molécula pierde su delicado balance de los enlaces que mantienen su equilibrio y por consiguiente sus propiedades funcionales (Zhun & Damodaran, 2011).

## b) Variaciones de pH

El cambio de pH del ambiente natural o fisiológico de las proteínas puede acarrear modificaciones importantes en su conformación, debido a cambios de ionización de las cadenas laterales cargadas, que afectan el número de puentes salinos que estabilizan la estructura nativa de la proteína. Es decir, las proteínas son desnaturalizadas, a pH extremos alcalinos que a pH extremos ácidos, esto debido a la ionización de los grupos sulfhidrido, fenólicos y carboxilos, que ocasionan el despliegamiento de las cadenas polipeptídicas al intentar de exponerse al ambiente acuoso. Por lo tanto, en la hidrólisis de las proteínas, a medida que aumenta el pH, la temperatura, la enzima pierde su actividad enzimática con el sustrato; cómo se muestra en la figura 8 (Badui, 2013; Voet, Voet & Pratt, 2010).

### 2.3. CONCENTRADO PROTÉICO

Un concentrado proteico es aquel cuyo contenido de proteínas es mayor al 70% y que las proteínas constituyentes deben ser exactamente las que se encontraban en la fuente orgánica inicial, sin haber sufrido proceso de degradación o hidrólisis no deseables. Su proceso de elaboración supone una serie de etapas encaminadas a eliminar o disminuir los componentes no proteicos, para lograr un producto final con el 70-80% de proteína. Para la obtención de un concentrado proteico los procedimientos más utilizados son el método precipitación isoeléctrica y el método enzimático por la facilidad de su implementación, por los altos rendimientos obtenidos; además permiten la fácil separación de sustancias no proteicas tales como: azúcares, fibra, lípidos y otros componentes no deseables en el producto final (Caiza, 2011; Martínez, Medina & Zambrano, 2011).

Los métodos aplicados en la extracción de concentrados proteicos son:

- a) Extracción de compuestos no protéicos mediante el uso de agua ajustada al punto isoelectrico (pI) de las proteínas.
- b) Extracción de compuestos no protéicos con agua después de un tratamiento térmico.
- c) Extracción de compuestos no protéicos mediante el empleo de soluciones hidroalcohólicas.

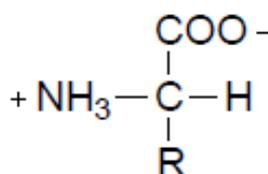
La precipitación isoelectrica es el pH en donde la proteína presenta carga neta compensada (igual número de cargas positivas que negativas), es decir carga eléctrica cero. En este pH la proteína presenta su mínima solubilidad que permite que precipite y sea incapaz de desplazarse a otro campo eléctrico (Peinado & Meléndez, 2010).

La metodología más utilizada para obtener aislados proteicos vegetales es por solubilización alcalina, seguido de la precipitación isoelectrica; por ofrecer alto contenido de proteína este método comprende dos fases que a continuación se detallan.

Las proteínas en el proceso de solubilización a pH alcalino, tienen una predominancia de especies cargadas negativamente, debido a la ionización de los grupos carboxilo y la desprotonación de los grupos amina, fenómeno que provoca el aumento de la interacción con el disolvente, permitiendo de este modo la solubilidad de la proteína (Valenzuela, Abugoch, Tapia & Gamboa, 2013). Otro factor importante en la solubilización alcalina de las proteínas, es no trabajar a pH alcalinos mayores a 9. Esto debido a que, afectan negativamente a los aminoácidos azufrados y a otros esenciales, como a la lisina, generando lisinoalanina, asimismo de causar desnaturalización y la extracción de componentes no proteicos, los cuales coprecipitan con las proteínas bajando así la calidad del concentrado proteico (Callisaya & Alvarado, 2009; Serpa, Hincapié & Álvarez, 2014).

## 2.4. AMINOÁCIDOS

Las proteínas son macromoléculas constituidas a partir de aminoácidos (AA) que desempeñan funciones diversas, todas ellas de extraordinaria importancia en los seres vivos. Los aminoácidos son las unidades estructurales básicas de las proteínas. Químicamente, son compuestos orgánicos caracterizados por poseer un grupo amino y un grupo carboxílico. Según la posición relativa a la que se une el grupo amino con respecto al carboxilo, los aminoácidos pueden ser  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, o  $\delta$ -aminoácidos. Los aminoácidos que forman parte de las proteínas son  $\alpha$ -aminoácidos, es decir los que su grupo amino permanece unido al llamado carbono- $\alpha$ , denominado así por ser adyacente al grupo carboxilo (Adeva *et al.*, 2012; Badui, 2006).



**Figura 1.** Estructura general de los aminoácidos

En la naturaleza se han descubierto más de 700 aminoácidos, siendo la mayoría de ellos  $\alpha$ -aminoácidos sintetizados por bacterias, hongos y algas. Únicamente, 20  $\alpha$ -aminoácidos (*19 aminoácidos y 1 iminoácido*) son utilizados por las células para la síntesis protéica, diferenciándose entre sí en el tamaño, forma, carga, capacidad de formar enlaces de hidrógeno, carácter hidrofóbico y reactividad de la cadena lateral. Los  $\alpha$ -aminoácidos que forman parte de las proteínas se unirán entre sí mediante un enlace covalente entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente denominado enlace peptídico (Fennema, 2000).

### 2.4.1. CLASIFICACIÓN SEGÚN SU ESENCIALIDAD

Los términos *esencial* y *no esencial* originalmente se definieron en relación con el papel de los aminoácidos en la formación de proteínas y el crecimiento del organismo. Pero tal y como se ha reseñado anteriormente, los veinte aminoácidos expuestos son absolutamente necesarios para conseguir un buen estado de salud. Nuestro organismo posee la capacidad de sintetizar el 80% del total de aminoácidos, mientras que el 20% restante se deben obtener mediante la ingesta directa a través de la dieta; por esta razón los aminoácidos se clasifican en no esenciales o de síntesis endógenas y esenciales u obtenidas mediante fuentes externas; El aporte dietético deficitario de aminoácidos provoca alteraciones tanto físicas como mentales, entre ellas: reducción del metabolismo energético, alteraciones en el sueño, fatiga crónica, alteraciones digestivas, defectos cutáneos, ansiedad y afectación emocional, obesidad, malnutrición y retención sanguínea de residuos tóxicos. Día a día, expertos en el área de alimentos buscan nuevas alternativas para los compuestos naturales, incluidos los aminoácidos libres; de los cuales sus beneficios potenciales pueden ser destinados a usarse en la industria alimenticia (García *et al.*, 2016; Lehninger, Cox & Nelson, 2008).

### 2.5. AMINOÁCIDOS ESENCIALES

Los aminoácidos isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, triptófano, treonina, valina e histidina se obtienen únicamente a través de la dieta y es por eso se denominan aminoácidos esenciales, o indispensables. Teniendo en cuenta que la metionina es el precursor directo de la cisteína y la fenilalanina de la tirosina, muchos autores consideran que estos últimos aminoácidos también pueden incluirse dentro del grupo de esenciales, ya que la falta de alguno de ellos implica la imposibilidad de síntesis del resto. La ausencia de aminoácidos esenciales en la dieta puede dar lugar a diferentes problemas nutricionales o de salud (Lehninger, Cox & Nelson, 2008).

**a) Treonina**

La treonina es uno de los nueve aminoácidos que parecen ser estrictamente esenciales para los animales superiores. La treonina es frecuentemente el tercer aminoácido limitante en los humanos (después de lisina y metionina). Las situaciones más deficitarias se plantean en el caso de dietas de bajo contenido en proteína suplementadas con otros aminoácidos industriales. Sus concentraciones plasmáticas son particularmente elevadas en los recién nacidos. Es imprescindible para la correcta función digestiva e intestinal ya que interviene en los procesos de asimilación y absorción de los diferentes nutrientes. Adicionalmente posee un efecto estimulante sobre el timo, glándula relacionada con el control de la depresión, con el consecuente efecto terapéutico sobre la misma (Blas, García & Carabaño, 2005).

**b) Lisina**

La lisina es responsable de muchas funciones en el cuerpo. Se concentra en el tejido muscular, ayuda en la absorción de calcio del tracto gastrointestinal, promueve la producción de hueso y la formación de colágeno. El efecto más notable de L-lisina es su efecto contra las infecciones virales. También se necesita lisina para la formación de anticuerpos. Los síntomas de una deficiencia de lisina son (entre otros) la reducción de la capacidad de concentración, fatiga crónica, mareos, inhibición del crecimiento y reducción de la inmunidad (Zhang, Wen & Shi, 2012).

**c) Metionina**

La metionina es uno de los aminoácidos ("eslabones" de las cadenas de proteínas) esenciales, lo que significa que no se puede sintetizar en el organismo y debe obtenerse a través de la dieta. Aporta azufre y otros compuestos que necesita el organismo para un

metabolismo y un crecimiento normales. La metionina pertenece también a un grupo de compuestos llamados lipotrópicos, o sustancias químicas que ayudan al hígado a procesar las grasas (Mendoza, 2010).

#### **d) Valina**

La valina es un aminoácido no cargado a pH neutro, apolar y ramificado. Forma parte integral del tejido muscular, pudiendo ser usado para poder conseguir energía por los músculos ya que posibilita un balance de nitrógeno positivo e interviene en el metabolismo muscular y en la reparación de los tejidos. La enfermedad de la orina de jarabe de arce es un déficit de este complejo, que conduce a la acumulación de estos derivados cetoácidos en la orina, suero y líquido cefalorraquídeo. Por otra parte, niveles muy bajos de estos aminoácidos también se relacionan con patologías neurológicas, como epilepsia, y con pérdida de peso ocurrida en la enfermedad de Huntington o en caquexia inducida por cáncer (Lehninger, Nelson & Cox, 2000).

#### **e) Isoleucina**

Es un aminoácido esencial ramificado, junto con la leucina y la valina. Es esencial e imprescindible para la síntesis de hemoglobina y para la regulación de los niveles sanguíneos de glucosa (energía). Tras su metabolismo, la L-isoleucina puede ser convertida tanto en hidratos de carbono como en lípidos (Mathews, Holde & Ahern, 2003).

#### **f) Leucina**

La leucina es un aminoácido considerado esencial, que interactúa con los aminoácidos isoleucina y valina. Se utiliza en el hígado, tejido adiposo y tejido muscular; en estos dos últimos se utiliza para la formación de esteroides que cumplen

funciones reguladoras, estructurales y hormonales. Tiene la capacidad de imitar a la insulina y ayudar al azúcar a entrar en las células. También puede sustituir a la glucosa durante períodos de ayuno, una propiedad que no es compartida por sus demás compañeros de aminoácidos. Se altera durante el envejecimiento, lo que provoca un desequilibrio en la descomposición y producción de las proteínas musculares; razón por la cual se origina una pérdida de masa muscular en los ancianos (Combaret, 2008).

#### **g) Fenilalanina**

Aminoácido esencial con acción antidepresiva y analgésica. Además de su eficacia frente a la depresión, la fenilalanina mejora la memoria y posee efecto antimigrañoso. La fenilalanina se encuentra principalmente en alimentos ricos en proteínas, como la carne, huevo, pescado y productos lácteos. Así mismo se encuentra en muchas drogas psicotrópicas usadas habitualmente (Lopez, 2007).

#### **h) Histidina**

La histidina, ayuda a combatir algunos de los efectos negativos de la artritis reumatoide, por ejemplo la inflamación y la falta de movilidad, en la desintoxicación de metales pesados, en el tratamiento de la impotencia y la frigidez, ayuda a mejorar la respuesta inmunitaria, a evitar los vómitos en el embarazo, también es importante para el mantenimiento de las vainas de mielina que protegen las células nerviosas. Es necesario para la producción tanto de glóbulos rojos y blancos en la sangre, protege al organismo de los daños por radiación, reduce la presión arterial, participa en el desarrollo y manutención de los tejidos sanos, particularmente en la mielina que cubre las neuronas, en el sistema nervioso central es sintetizada y liberada por las neuronas y utilizada como neuromodulador (Asencio & Aguilar, 2010).

### **i) Arginina**

La arginina es un aminoácido semiesencial con importantes funciones fisiológicas. Entre ellas destaca su papel como precursora del óxido nítrico, una molécula producida a partir de la arginina por la enzima óxido nítrico sintasa en muchos tejidos y que en el endotelio vascular se comporta como vasodilatadora, antiaterogénica y antiagregante plaquetaria (Martínez & Sánchez, 2004)

## **2.6. AMINOÁCIDOS NO ESENCIALES**

Los aminoácidos no esenciales, también denominados en ocasiones prescindibles, son aquellos que un organismo puede sintetizar. Dentro de este grupo se encuentran la alanina, arginina, ácido aspártico y cisteína, ácido glutámico y glutamina, glicina, prolina, serina, histidina y tirosina. Todos los tejidos presentan cierta capacidad de síntesis, remodelación e interconversión de aminoácidos, aunque es el hígado el sitio principal de metabolismo del nitrógeno en el cuerpo (Latham, 2002).

### **a) Acido Aspártico**

El ácido aspártico es un aminoácido ácido no esencial ya que puede ser sintetizado por el organismo humano. Es un neurotransmisor y uno de los aminoácidos con los que las células forman las proteínas. Su biosíntesis tiene lugar por transaminación del ácido oxalacético, un metabolito intermediario del ciclo de Krebs. El ácido aspártico juega un papel importante en la producción y secreción de hormonas, así como en el correcto funcionamiento del sistema nervioso. Es muy importante para la desintoxicación del hígado y su correcto funcionamiento ya que al combinarse con otros aminoácidos forma moléculas capaces de absorber toxinas del torrente sanguíneo (Tomé, 2009).

**b) Serina**

La serina es un aminoácido no esencial que es bastante importante en la creación de varios neurotransmisores por lo que es un valioso nutriente en el cerebro, metabolizar grasas y ácidos grasos, contribuye en la desintoxicación del organismo, mantiene un buen funcionamiento del sistema inmunológico y se da en el crecimiento muscular. La serina es uno de los nutrientes que se emplean para reconstruir el cerebro y el sistema nervioso para que funcionen sin ningún tipo de sobresalto (Martin, Garcia & Bustos, 2006).

**c) Acido Glutámico**

El ácido glutámico es el neurotransmisor más abundante del sistema nervioso. Las neuronas glutamatérgicas extienden su acción a lo largo del eje encefalomedular. El papel del ácido glutámico y su disfunción ha ganado importancia en neurología y en psiquiatría, en la medida en que se ha profundizado en el conocimiento sobre su metabolismo, tipos de receptores, transportadores y mecanismos de homeostasis, cuya disfunción puede llevar a muerte neuronal (Medina & Escobar, 2002).

**d) Prolina**

Su principal función es la producir colágeno en el organismo. La prolina puede sufrir hidroxilación, formándose la hidroxiprolina, en cuyo proceso de formación es necesario el ácido ascórbico o vitamina C. También se relaciona con ciertos tipos de esquizofrenia, desorden esquizoafectivo, retraso mental y características autistas. La prolina, junto con la glutamina, forma parte mayoritaria del gluten, responsable de la respuesta inflamatoria ocurrida en el intestino que sufren los enfermos celíacos. El catabolismo de la prolina da lugar a la producción de nitrógeno, el cual es eliminado por

la orina a en forma de urea, al cual también están relacionados el estrés catabólico severo o disfunción metabólica intestinal (Martínez & Martínez, 2006).

#### e) Glicina

La Glicina es un aminoácido no esencial, protege al organismo frente a shock tanto por pérdida sanguínea como por endotoxinas, reduce la concentración de alcohol en el estómago y aumenta la recuperación de la hepatitis producida por alcohol, disminuye el daño hepático inducido por fármacos hepatotóxicos y bloquea la apoptosis y en el riñón disminuye la nefrotoxicidad originada por el fármaco inmunosupresor ciclosporina A y previene la hipoxia y la formación de radicales libres. Además puede ser útil en otras enfermedades con procesos inflamatorios ya que disminuye la formación de citoquinas (Martilla *et al.*, 2002).

#### f) Alanina

Aminoácido no esencial que puede ser considerado esencial en ciertas circunstancias. Se encuentra en altas concentraciones en el tejido muscular; es uno de los aminoácidos más usados en la construcción de proteína. La administración de alanina como suplemento fue bien tolerada en un estudio de pacientes con hiperplasia prostática benigna. El exceso puede ser degradado en glucosa y usado como fuente de energía para los músculos, el cerebro y el sistema nervioso central. Está involucrada en el metabolismo del triptófano y de la vitamina piridoxina; ayuda a metabolizar los azúcares y ácidos orgánicos. Puede inhibir o reducir la neurotransmisión en el cerebro. Ha mostrado ser capaz de estimular la producción de anticuerpos. Puede ayudar a estabilizar el nivel de glucosa en sangre en personas con hipoglucemia (Mora, 2010).

**g) Cisteína**

La cisteína es molécula precursora de numerosos metabolitos azufrados necesarios para el desarrollo de la vida. Es, además, precursor de vitaminas como la tiamina B1 y la biotina B7. La cisteína, a parte de su intervención en el metabolismo energético, forma parte de la estructura de numerosos tejidos y moléculas hormonales. La acción combinada de cisteína y glutatión resulta en un intenso efecto detoxificante (Gotor, 2010).

**h) Tirosina**

Es precursor de ciertos neurotransmisores, de las hormonas tiroideas y de las melaninas. Es precursor de importantes neurotransmisores como dopamina, norepinefrina, epinefrina y L-dopa, que regulan diversas funciones dependientes de tirosina como la seguridad, el humor o la función mental, la respuesta sexual y el estrés. Importante componente de hormonas producidas por la tiroides, vitales para la gestión del metabolismo. Es también necesaria para la formación de melanina, pigmento oscuro que protege de los efectos dañinos de la luz ultravioleta (Delvin, 2006).

En caso del tarwi la presencia de aminoácidos es de suma importancia, puesto que afecta sus propiedades funcionales e influye en la calidad protéica, dichos valores se muestran en la Tabla 2. Todas las proteínas están básicamente constituidas por aminoácidos, comprendiendo entre los 20 aminoácidos, sin embargo, algunas proteínas pueden carecer de uno o varios aminoácidos. Las diferencias estructurales y funcionales de los miles de proteínas se deben a su composición aminoacídica de las mismas. Uno de los principales factores que afectan a las propiedades físico-químicas, como la estructura, la solubilidad, fijación de grasa, etc., de proteínas y péptidos es la hidrofobia de sus aminoácidos constitutivos (Fennema, 2000).

**Tabla 2.** Cómputo de aminoácidos de *Lupinus mutabilis* Sweet en 100 gramos.

Aminoácidos	g de aminoácidos/ 100 g
Treonina	3,00
Valina	3,90
Metionina	0,50
Leucina	14,20
Fenilalanina	3,90
Histidina	2,50
Lisina	4,90
Arginina	9,90
Triptófano	0,80

**Fuente:** Acuña (2001)

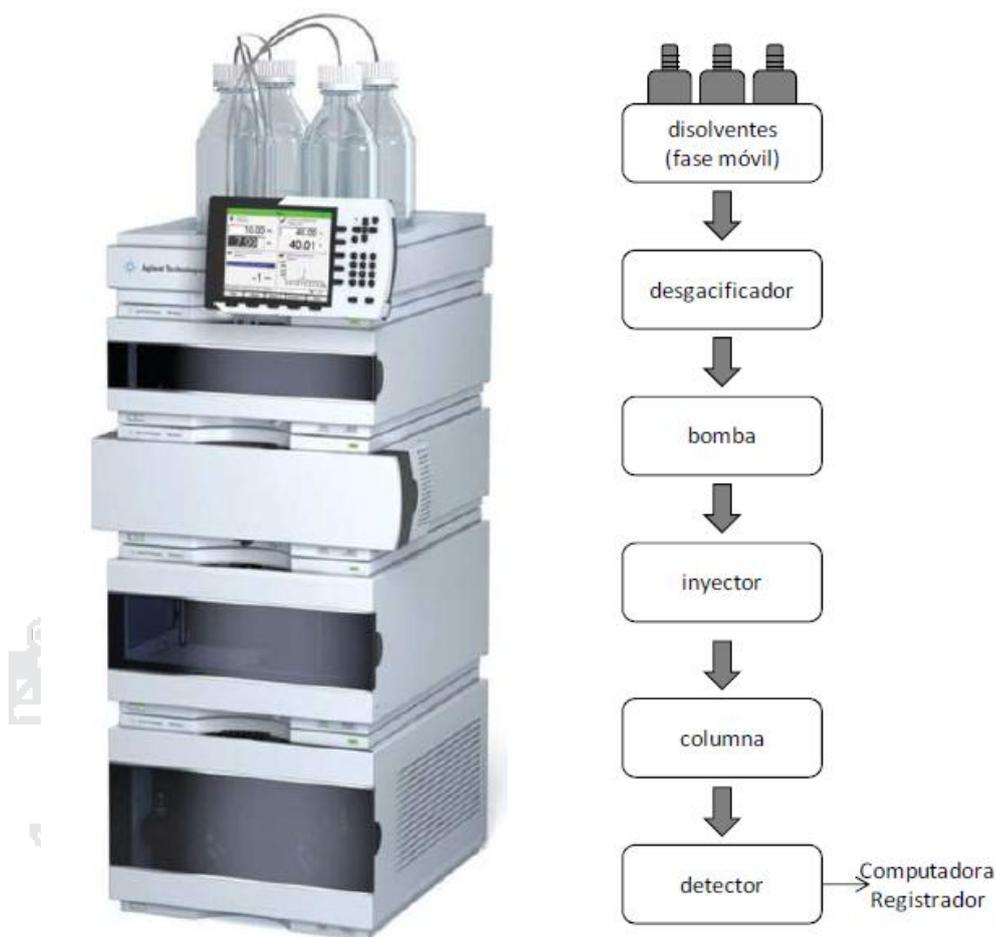
## 2.7. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es dentro de las técnicas cromatográficas, la más utilizada. El proceso de separación cromatográfica puede definirse como la transferencia de masas entre una fase estacionaria y una móvil. La mezcla que contiene los compuestos a separar es disuelta e inyectada en una columna rellena de fase estacionaria a través de la cual es forzada a pasar por una fase móvil impulsada por la bomba de alta presión (Alaiz *et al.*, 2000).

Dentro de la columna la mezcla se separa en sus componentes en función de su interacción entre las dos fases. Esta separación puede ser modificada eligiendo adecuadamente tanto la fase móvil como la estacionaria, el flujo de la fase móvil o la temperatura de la separación. De esta forma la técnica de HPLC adquiere un alto grado de versatilidad difícil de encontrar en otras técnicas, siendo capaz de separar los componentes de una gran variedad de mezclas. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser

eluido de la columna se denomina “tiempo de retención” y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos (Chicharro, 2007).

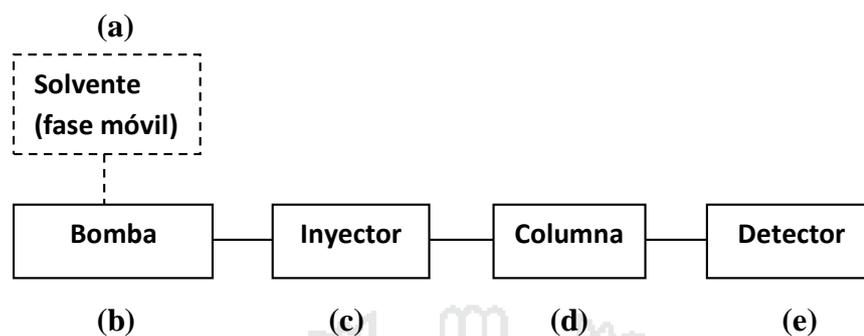
En la actualidad existen una gran cantidad de cromatógrafos en el mercado, existen dos grandes opciones según la concepción instrumental, la más económica y versátil responde a un diseño modular como el ejemplo de la Figura 2, de tal manera que sobre el diseño básico puedan ir acoplándose o sustituyéndose, diversos módulos o sustituir los detectores, cada vez es más frecuente en el mercado la opción integral que tiene la ventaja de control único a través de un microprocesador, lo que sin duda reduce la intervención humana y eleva la seguridad del proceso analítico, pero tiene los inconvenientes de la falta de flexibilidad (los módulos no pueden operar independientemente) y su elevado costo (Harris, 2007).



**Figura 2.** Equipo de HPLC (Harris, 2007).

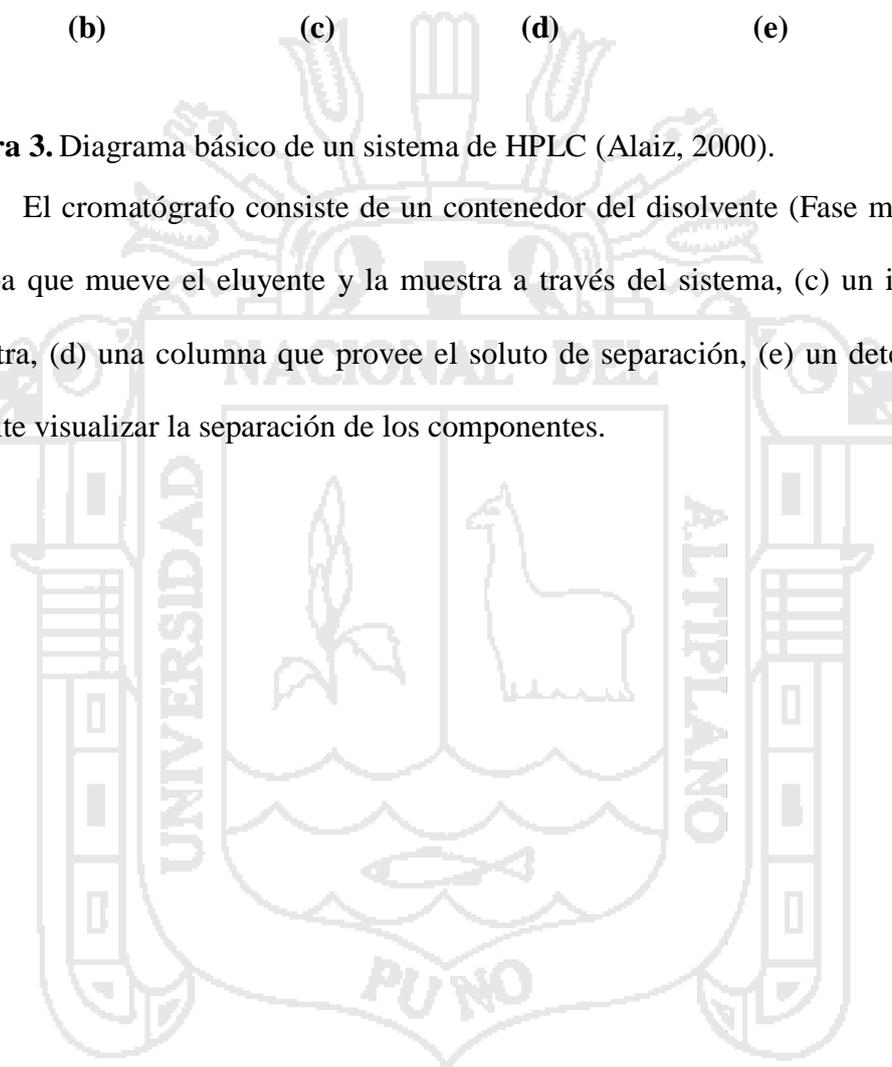
### 2.7.1. INSTRUMENTACIÓN EN HPLC

La cromatografía líquida en columna, se desarrolla en instrumentos llamados cromatógrafos, el cual proporciona información sobre la composición al tener un detector continuo integrado en el sistema hidrodinámico cromatográfico. En la Figura 3 se muestra un diagrama esquemático de los componentes de un cromatógrafo de líquidos.



**Figura 3.** Diagrama básico de un sistema de HPLC (Alaiz, 2000).

El cromatógrafo consiste de un contenedor del disolvente (Fase móvil), (b) una bomba que mueve el eluyente y la muestra a través del sistema, (c) un inyector de la muestra, (d) una columna que provee el soluto de separación, (e) un detector que nos permite visualizar la separación de los componentes.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente proyecto de investigación se llevó a cabo en dos etapas, la primera etapa de extracción de concentrado de proteína de tarwi, se realizó en los laboratorios de Post Cosecha, Microbiología y Nutrición de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno. La segunda etapa de determinación del perfil de aminoácidos del concentrado proteico de tarwi por HPLC, se realizó en el laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica Santa María – Arequipa.

#### 3.2. MATERIA PRIMA

Se utilizó tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) de variedades: Yunguyo I y Negra de Sacacatani, adquiridas del Instituto Nacional de Innovación Agraria del Anexo Tahuaco de la provincia de Yunguyo.

#### 3.3. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

##### 3.3.1. EQUIPOS

- Agitadores magnéticos Micro Mix Potencia 12W de velocidad 200-1500 rpm
- Balanza electrónica Henkel Serie KG 25550
- Balanza analítica, marca SARTORIUS BP3020
- Centrifugadora DYNAC 420101, USA
- Cocina eléctrica PREMIER
- Estufa marca MEMMET

- Termómetro IR FLUKE MINI 62
- pH – metro, marca JENWZY 3510
- Equipo de HPLC ELITE La Chrom versión Pump L-2130 con bomba cuaternaria de baja presión con auto inyector SIL-10AD VP con un sistema controlador SCL-10 AD VP y un detector UV SPD-10A.
- Columna: Purospher RP-18, 5  $\mu\text{m}$  (Merck) con detección por UV a 338 nm a temperatura entre 30 y 35  $^{\circ}\text{C}$  aun flujo de 1 mL/min, con un volumen de inyección de 20  $\mu\text{l}$ , utilizando un programa de gradiente binario.

### 3.3.2. MATERIALES DE LABORATORIO

- Cronómetro
- Erlenmeyer de 250 ml.
- Vasos de precipitados (1000 ml, 600 ml, 250 ml, 100 ml, 50 ml.)
- Embudo de vidrio
- Matraz (250 ml, 100 ml)
- Tubos de ensayo (vidrio, plástico)
- Lunas de reloj
- Mortero de porcelana
- Botellas de vidrio
- Agua destilada

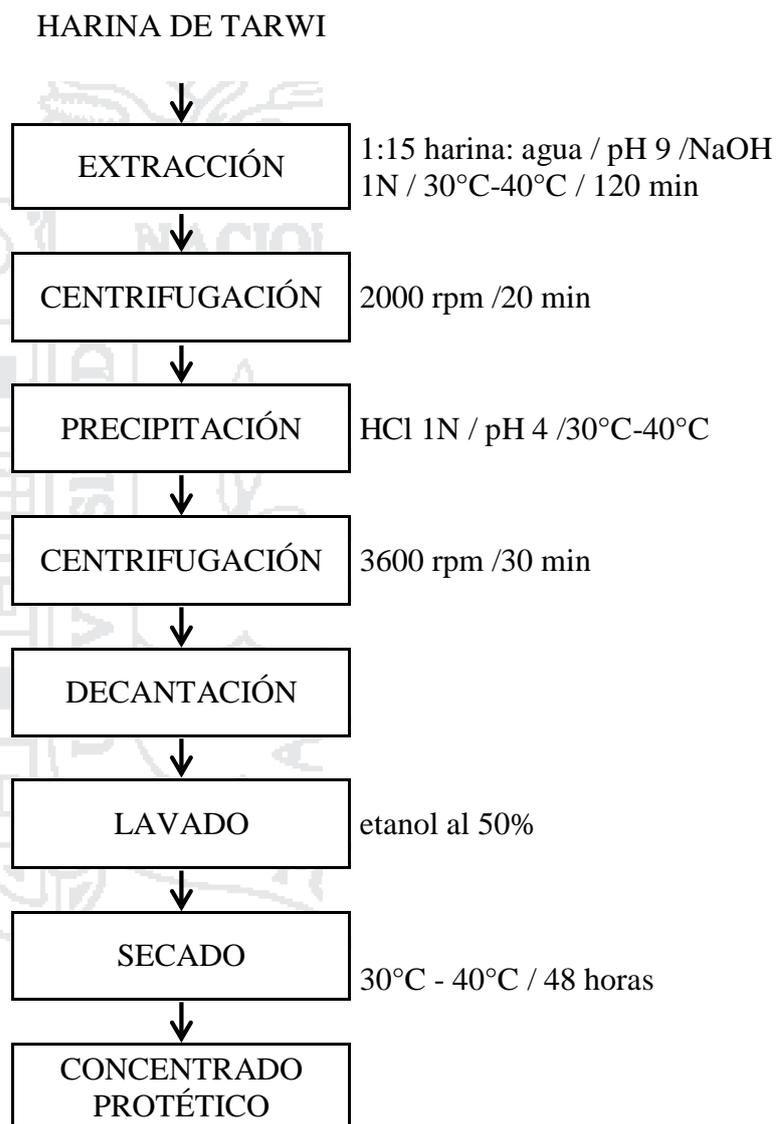
### 3.3.3. REACTIVOS

- Ácido clorhídrico 1 N EMSURE
- Alcohol etílico al 50 %
- Hidróxido de sodio 1 N EMSURE
- Hidróxido de sodio 0.01 N EMSURE
- Ácido clorhídrico 0.1 N EMSURE
- Fenilisotiocianato (grado cromatográfico)
- Acetonitrilo 40% (grado cromatográfico)
- Trietilamina 0,018%
- Tetrahidrofurano 0,03%
- Ácido sulfúrico 37% de pureza
- Metanol 40% (grado cromatográfico)
- Acetato sódico 20%
- Ácido acético

### 3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 3.4.1. OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO PROTÉICO DE TARWI

En la Figura 4, se muestra como se realizó la extracción y precipitación de la proteína usando el método de punto isoelectrico (Carranco, 2002).



**Figura 4.** Diagrama de flujo para la obtención de concentrado de proteína por método de punto isoelectrico.

**Extracción:** La extracción se realizó suspendiendo la harina de tarwi en agua con una relación de harina: agua de 1:15, el pH se ajustó a 9 con NaOH 1N; el cual posteriormente se llevó a una agitación constante a temperaturas de 30 °C y 40 °C por tratamiento por un tiempo de 2 horas, ajustando el pH a 9 cada 15 minutos.

**Centrifugación:** Con el fin de separar la proteína de la harina se centrifugó a 2000 rpm por 20 minutos.

**Precipitación:** Se adicionó HCl 1N regulando el pH al valor de estudio 4.5, ya que sobre estas proteínas se degradan, a temperatura máxima de 30°C y 40 °C por el mismo motivo.

**Centrifugación:** Después de la precipitación las muestras fueron colocadas en los tubos de ensayo y posteriormente centrifugados a 3600 rpm por 30 minutos para acelerar la precipitación.

**Decantación:** Una vez centrifugado el contenido de los tubos se decantó el líquido.

**Lavado:** El sólido obtenido fue lavado repetidamente con una solución de agua y alcohol etílico (50%), para eliminar el HCl que pudo haber quedado.

**Secado:** La proteína lavada se traspasó a placas petri y se secó en estufa de 30 a 40 °C por 48 horas.

### 3.4.2. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE AMINOÁCIDOS DEL CONCENTRADO PROTEICO DE DOS VARIEDADES DE TARWI MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Se tomó como modelo la metodología descrita por (Alaiz *et al.*, 2000) en la cual la muestra 0,1 g de concentrado de proteína de cada variedad se hidrolizó con 4 ml de HCl 6 N a 110 °C por 24 horas. Posteriormente el hidrolizado se filtró mediante un filtro Drummond de 8  $\mu$ m y una jeringa. En cada vial se colocó 757  $\mu$ l de o-ftalaldehido (OPA), 153  $\mu$ l de agua ultra pura y 90  $\mu$ l de concentrado proteico de tarwi variedad (Yunguyo I y Negra de Sacacatani).

Se colocó los viales en el equipo y se procede a programar las secuencias para la identificación de 17 aminoácidos de los concentrados proteicos de cada variedad de tarwi. Se inyectaron 20  $\mu$ l en el cromatógrafo HPLC. Se utilizó el equipo HPLC ELITE La Chrom versión Pump L-2130 con bomba cuaternaria de baja presión con auto inyector SIL-10AD VP con un sistema controlador SCL-10 AD VP y un detector UV SPD-10A. Se utilizó una columna: Puro spher RP-C18, 5  $\mu$ m (Merck) con detección por UV a 338 nm a temperatura entre 30 y 35 °C aun flujo de 1 ml/min, con un volumen de inyección de 20  $\mu$ l. Con software Clarity Chromatography Station para Windows La resolución de los derivados de aminoácidos se logró usando un sistema de gradiente binario con flujo de 0,9 ml/min a temperatura ambiente empleando como fase móvil buffer acetato de sodio pH 6 y acetonitrilo.

### 3.5. METODOS DE ANÁLISIS

#### 3.5.1. Determinación de proteína

El contenido de proteína de harina y concentrados protéicos de tarwi de variedades (Yunguyo I y Negra de Sacacatani) se evaluó mediante la determinación de nitrógeno por el método de Kjeldahl (AOAC, 1995) utilizando el factor 6.25 como se describe en el Anexo I.

### 3.6. DISEÑO DE INVESTIGACION

#### 3.6.1. Diseño estadístico para los concentrados protéicos de tarwi de variedades (Yunguyo I y Negra de Sacacatani)

Para determinar el concentrado protéico se emplea el Diseño factorial  $2^k$  propuesto por (Gutierrez, 2012), este diseño nos permitirá determinar la efectividad de la concentración de proteína de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet).

Diseño factorial  $2^k$  con réplica en todos los puntos: Por diseño factorial se entiende a aquel donde se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores en cada ensayo completo o réplica. Entendiéndose por niveles a los diferentes valores que pueden tomar los factores o variables. Si se consideran dos niveles el diseño se denomina Diseño factorial  $2^k$  (Montgomery, 2006).

Entonces el número total de experimentos está definido por:

$$N = 2^k$$

Dónde:

K = número de variables

N = número de experimentos

### 3.6.2. Diseño estadístico para el perfil de aminoácidos de tarwi de variedades (Yunguyo I y Negra de Sacacatani)

El análisis estadístico que se utilizará para la determinación del perfil de aminoácidos es la Prueba de t-Student. La prueba t-Student se utiliza para contrastar hipótesis sobre medias en poblaciones con distribución normal. También proporciona resultados aproximados para los contrastes de medias en muestras suficientemente grandes cuando estas poblaciones no se distribuyen normalmente (aunque en este último caso es preferible realizar una prueba no paramétrica). Para conocer si se puede suponer que los datos siguen una distribución normal, se pueden realizar diversos contrastes llamados de bondad de ajuste, de los cuales el más usado es la prueba de Kolmogorov. A menudo, la prueba de Kolmogorov es referida erróneamente como prueba de Kolmogorov-Smirnov, ya que en realidad esta última, sirve para contrastar si dos poblaciones tienen la misma distribución. Para aceptar o rechazar la hipótesis nula se hizo una prueba de hipótesis, utilizando la distribución t-student, por ser muestras pequeñas.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

##### 4.1. OBTENCIÓN DEL CONCENTRADO PROTÉICO DE TARWI

Se realizó preliminarmente, el análisis de proteína de la harina de Tarwi, el cual se muestra en la Tabla 3 conjuntamente con los intervalos de confianza (margen de error descritos en el Anexo II) de las muestras realizadas por triplicado (n=3), obtenidos en el Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial – Facultad de Ciencias Agrarias – UNA Puno.

**Tabla 3.** Contenido de proteína de harina de tarwi.

ENSAYO	MUESTRAS	
	VARIEDAD NEGRA DE SACACATANI	VARIEDAD YUNGUYO I
% PROTEINA	48.71 ± 0.049 b	49.65 ± 0.107 a

(n=3)

Fuente: Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos EPIA – FCA UNA PUNO

En la Tabla 3 se observa que el porcentaje de proteína es de 48.71% para la variedad Negra de Sacacatani y de 49.65% para la variedad Yunguyo I; Mayta (2000), reporta como valor porcentual de contenido de proteína de tarwi: 47.84 %, con el que se puede contrastar los valores mencionados (Tabla 3), los cuales son próximos a este valor. De la misma manera con los valores reportados por la FAO (1985), que menciona que la proteína de tarwi puede variar de 41 a 51%, por lo que los valores de la Tabla 3, se encuentran dentro del rango mencionado.

Urrutia (2010), en su proyecto de investigación reporta que la harina de tarwi desamargada posee un contenido de proteína de 49.87%, el cual se asemeja a los resultados reportados en la Tabla 3 especialmente en a la variedad Yunguyo I. Del mismo modo en la investigación que realizaron Cerezal *et al.* (2007), reportan un

contenido de proteína de 49.77% en harina de lupino, el cual también se aproxima a los resultados obtenidos en la presente investigación. De la misma manera, en un estudio de “Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia” se realizó un análisis proximal de semillas, cotiledón y tegumento de Lupino, reportando contenidos de proteína de: semilla 44.86%, cotiledón 49.22% y tegumento 9.39%. (Eduar *et al.*, 2010). En el que el cotiledón representa al tarwi sin cascara, el que se utilizó también para la presente investigación, con los valores de 48.71% para la variedad Negra de Sacacatani y de 49.65% para la variedad Yunguyo I (Tabla 3), teniendo una proximidad con el contenido de proteína del cotiledón 49.22%.

La extracción del concentrado proteico de Tarwi se realizó mediante el método de punto isoeléctrico, considerando como parámetros de extracción un pH de 4.5, también los factores de variedad (Yunguyo I y Negra de Sacacatani) y temperatura (30°C y 40° C), con 3 repeticiones por tratamiento, empleándose 33.33 g de harina de tarwi para cada repetición. Los parámetros utilizados en la extracción se relacionan con lo descrito por Hicks (2001), el cual afirma que, en la extracción de concentrados y aislados, el pH tiene un efecto muy marcado que afecta la configuración de la proteína, la mayoría de las enzimas presentan una actividad catalítica máxima a un determinado valor óptimo de pH, la mayoría tiene un pH óptimo entre 4 a 8, sobre o de bajo de este la actividad disminuye, en general, los pH extremos inactivan las enzimas debido a la desnaturalización. La velocidad de reacción enzimática aumenta con la temperatura alta y retiene su capacidad catalítica. Cuando se aumenta la temperatura por encima de este intervalo la actividad enzimática se modifica y se produce la inactivación de la enzima por un proceso de desnaturalización, con la pérdida de la estructura terciaria de la proteína. La mayoría de las enzimas tienen su óptimo en el intervalo de 30°C a 50°C, inactivándose a más de 75°C.

En la Tabla 4, se muestra los resultados obtenidos  $\pm$  el intervalo de confianza (margen de error – Anexo III) de tres repeticiones con tres replicas cada una (n=3) por el método de punto isoeléctrico, ya que este método según Vioque *et al.* (2000) indica que la extracción mediante el punto isoeléctrico, permite la eliminación de la mayor parte de los compuestos antinutricionales, parte de las sales y de los compuestos nitrogenados no proteicos, aunque también son solubilizadas una fracción de las proteínas, principalmente albúminas. El método consiste en sucesivas extracciones con agua y centrifugación es para separar la materia insoluble del sobrenadante en el que van disueltos los compuestos que se quieren eliminar. La extracción acuosa a pH controlado es poco desnaturalizante para las proteínas, lo cual permite mantener las propiedades funcionales del producto, aunque algunos compuestos responsables de olores y sabores desagradables no son eliminados.

**Tabla 4.** Extracción de concentrado protéico de 33.33g de harina de Tarwi.

REPLICA	VARIEDAD YUNGUYO I		VARIEDAD NEGRA DE SACACATANI	
	30°C	40°C	30°C	40°C
<b>PROMEDIO</b>	3.73 $\pm$ 0.059 b	4.01 $\pm$ 0.028 a	3.67 $\pm$ 0.062 b	3.96 $\pm$ 0.039 a
(n=3)				

Los resultados obtenidos en la Tabla 4, presentan a 3.67 g como la menor cantidad y 4.01 g como la mayor cantidad en cuanto a las medias de extracción del concentrado protéico por cada 33.33 g de harina de Tarwi, resaltando como una mayor extracción a la variedad Yunguyo I. Los rendimientos porcentuales de la extracción de concentrado protéico de tarwi dan una mejor visión de la cantidad extraída, el cual se muestra en la Tabla 5 (Describiendo el intervalo de confianza del promedio de porcentaje en el Anexo IV).

**Tabla 5.** Rendimiento porcentual de extracción del concentrado protéico de Tarwi (%).

REPLICA	VARIEDAD YUNGUYO I		VARIEDAD NEGRA DE SACACATANI	
	30°C	40°C	30°C	40°C
(%)Promedio	11.20 ± 0.278 b	11.94 ± 0.090 a	11.02 ± 0.252 b	11.88 ± 0.296 a

(n=3)

En la Tabla 5, se observa claramente que los tratamientos realizados a 40°C en ambas variedades de Tarwi (Yunguyo I y Negra de Sacacatani), tiene mejores porcentajes de extracción, siendo lo contrario en los tratamientos realizados a 30°C, para demostrar la mejoría de los resultados mostrados de la Tabla 4, se realizó el análisis de datos mediante el Diseño factorial  $2^k$ , para validar cuál de los tratamientos resultó mejor. Montgomery (2006) afirma que, el diseño  $2^k$ , es de particular utilidad en las etapas iniciales del trabajo experimental, cuando probablemente se estén investigando varios factores. Este diseño proporciona el menor número de corridas con las que pueden estudiarse  $k$  factores en un diseño factorial completo.

El Análisis de Varianza realizado en cuanto a la extracción del concentrado protéico de tarwi (Anexo V), demuestra que no existe diferencia significativa en cuanto al efecto principal de variedad del tarwi, por otro lado, este análisis también demuestra que existe diferencia altamente significativa ( $P \leq 0.01$ ) para el efecto principal de temperatura y por último, para el efecto de la interacción de variedad y temperatura, no existe diferencia significativa. De lo mencionado anteriormente demostramos lo establecido en la Tabla 5, en el que los mejores promedios de porcentaje de extracción son los tratamientos realizados a 40°C para ambas variedades, debido a que este factor en el Análisis de Varianza, demuestra una diferencia altamente significativa. El cual también se encuentra en el intervalo óptimo de extracción que es entre 30°C y 50°C mencionados por Hicks (2001).

Para la determinación del perfil de aminoácidos del concentrado protéico de tarwi mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), se eligió los mejores tratamientos sometidos a 40°C para la variedad Negra de Sacacatani y a 40°C para la variedad Yunguyo I.

En la Tabla 6, se muestran los resultados del análisis del contenido de porcentual de proteína del concentrado protéico de Tarwi ± los intervalos de confianza (por triplicado n=3) (Anexo VI) de la presente investigación, cuyos valores fueron obtenidos en el Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos – Facultad de Ciencias Agrarias – UNA Puno.

**Tabla 6.** Contenido de proteína del concentrado protéico de tarwi.

ENSAYO	MUESTRAS	
	VARIEDAD NEGRA DE SACACATANI	VARIEDAD YUNGUYO I
% PROTEINA	70.20 ± 0.065 a	73.45 ± 0.230 a

(n=3)

Fuente: Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos -EPIA- FCA UNA PUNO

El contenido de proteína obtenido fue de 70.20% para la variedad Negra de Sacacatani y de 73.45% para la variedad Yunguyo I, como se puede apreciar en la Tabla 6, resultando en la variedad Yunguyo I con un contenido levemente superior respecto de la variedad Negra de Sacacatani. Según Chew, Casey & Johnson (2003), en su investigación, indican que la extracción de los granos de Lupino, permite la solubilización del 87% de las proteínas del núcleo y la recuperación de proteínas se encuentra entre 70% - 85% debido a la utilización de este método. Por lo que ambos valores, tanto en la variedad Yunguyo I y Negra de Sacacatani se encuentran en el intervalo mencionado. Por otro lado Villacrés (2001), reporta en su informe de

investigación en tarwi, que el contenido de proteína es de: 47.8% en harina, 72.8% en concentrado y 99.3% en aislado; contrastando con los resultados de la Tabla 6, que fueron de 70.20% en variedad Negra de Sacacatani y 73.45% en variedad Yunguyo I, los cuales son próximos al valor mencionado por el autor en cuanto al concentrado protéico de tarwi. Del mismo modo Sosa (2000) obtiene un aislado protéico de tarwi con la siguiente composición química: 93.50% de proteína, 0.97% de grasa, 8.76% de otros componentes. El porcentaje de proteína del presente trabajo es de 70.20% en variedad Negra de Sacacatani y de 73.45% en variedad Yunguyo I, diferenciándose del trabajo citado debido a que este se trata de un aislado protéico y no de un concentrado. Del mismo modo, Urrutia (2010) reporta un contenido de proteína de aislado protéico de tarwi de 92.83%, el cual nos confirma la diferencia de contenido de proteína entre el concentrado y el aislado protéico. Realizando una comparación con otra especie de leguminosa, Jaimes, Restrepo & Acevedo (2014), en su investigación sobre la leguminosa trupillo (*Prosopis juliflora*), extrajeron el concentrado protéico del producto mencionado, en el que se reporta un contenido de proteína del 75%, el cual se asemeja a los resultados de la presente investigación al pertenecer a la familia de leguminosas.

#### **4.2. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE AMINOÁCIDOS DEL CONCENTRADO PROTÉICO DE TARWI MEDIANTE HPLC**

La determinación del perfil de aminoácidos del concentrado proteico de Tarwi mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), se realizó en el laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María – Arequipa, con el equipo HPLC ELITE La Chrom versión Pump L-2130; las muestras utilizadas en el análisis fueron los tratamientos realizados a 40°C para la variedad Negra de Sacacatani y 40°C para la variedad Yunguyo I. Las muestras se sometieron a previa

hidrólisis ácida para eliminar los compuestos orgánicos no nitrogenados. Cervilla *et al.* (2012) menciona que la hidrólisis ácida es el método empleado comúnmente en la determinación de aminoácidos ya que permite liberar la mayoría de ellos durante el proceso. Sin embargo, bajo esas condiciones se produce destrucción total de los residuos de triptofano; mientras que la cisteína, la metionina, la serina y la treonina se degradan parcialmente. Los valores obtenidos para el ácido aspártico y glutámico comprenden tanto a estos como a sus derivados aminados, asparragina y glutamina, ya que la hidrólisis ácida convierte a estos últimos en los primeros.

**Tabla 7.** Perfil de aminoácidos del concentrado proteico de tarwi de la variedad Yunguyo I, y Negra de Sacacatani obtenidos mediante HPLC.

Nº	Aminoácido	Variedad Yunguyo I (µg/g)	Variedad Negra de Sacacatani (µg/g)
1	Ácido aspártico	1.915 ± 0.041 b	4.055 ± 0.033 a
2	Treonina*	1.000 ± 0.071 a	1.030 ± 0.060 a
3	Serina	2.385 ± 0.027 b	2.542 ± 0.053 a
4	Ácido Glutámico	37.516 ± 0.147 a	37.602 ± 0.054 a
5	Prolina	2.018 ± 0.081 a	0.459 ± 0.021 b
6	Glicina	12.000 ± 0.098 b	15.000 ± 0.052 a
7	Alanina	7.000 ± 0.098 b	8.000 ± 0.058 a
8	Cisteína	31.758 ± 0.037 a	29.179 ± 0.030 b
9	Valina*	9.000 ± 0.110 a	7.500 ± 0.052 b
10	Metionina*	0.458 ± 0.041 a	0.500 ± 0.030 a
11	Isoleucina*	7.400 ± 0.105 b	9.600 ± 0.049 a
12	Leucina*	2.835 ± 0.075 a	1.349 ± 0.111 b
13	Tirosina	5.000 ± 0.104 b	7.500 ± 0.061 a
14	Fenilalanina*	8.000 ± 0.160 b	9.300 ± 0.097 a
15	Histidina*	5.100 ± 0.049 b	6.500 ± 0.011 a
16	Lisina*	1.200 ± 0.071 b	1.400 ± 0.041 a
17	Arginina*	1.600 ± 0.020 b	1.800 ± 0.104 a

(n=3)

Fuente: Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad, UCSM.

\* Aminoácidos Esenciales

La Tabla 7 nos muestra los resultados obtenidos del perfil de aminoácidos del concentrado proteico de tarwi de la variedad Yunguyo I y Negra de Sacacatani ± el

intervalo de confianza de los valores determinados por triplicado ( $n=3$ ) (Anexos VII, VIII, X y XI). Los valores presentados fueron respuestas numéricas obtenidas del detector en cuanto a la concentración de cada analito (en la presente investigación un analito representa a un aminoácido), valores detectados a partir de los cromatogramas obtenidos (ANEXO IX y XII) representa la concentración frente al volumen del efluente (concentrado protéico) en un determinado intervalo de tiempo.

El concentrado protéico de tarwi de variedades (Yunguyo I y Negra de Sacacatani) contiene 17 aminoácidos, de los cuales 9 son esenciales: histidina, treonina, arginina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina y lisina. Rangel *et al.* (2003), nos indica que los aminoácidos esenciales no pueden ser sintetizados por el organismo y deben ser aportados por la dieta o caso contrario pueden producir trastornos en la salud. La lisina, uno de los aminoácidos más escasos en los alimentos de origen vegetal, se muestra en el concentrado de trawi de variedades (Yunguyo I y Negra de Sacacatani) en una proporción que al menos duplica la contenida en otras leguminosas. La importancia de la lisina se debe a que tiene funciones claves en el desarrollo de las células del cerebro humano y en el crecimiento. De hecho, se la asocia con el desarrollo de la inteligencia, la memoria y el aprendizaje. Se puede apreciar el perfil de aminoácidos del concentrado proteico de tarwi (Tabla 7) (*Lupinus mutabilis* Sweet), en cual se observa que para la variedad Yunguyo I la metionina se presenta en menor cantidad ( $0.458 \pm 0.041 \mu\text{g/g}$  de concentrado) y el ácido glutámico en mayor cantidad ( $37.516 \pm 0.147 \mu\text{g/g}$  de concentrado); en cuanto a la variedad Negra de Sacacatani, la metionina y prolina se presenta en menor cantidad ( $0.500 \pm 0.030 \mu\text{g/g}$  y  $0.459 \pm 0.021 \mu\text{g/g}$  de concentrado respectivamente) y como en el caso anterior el ácido glutámico se presenta también en mayor cantidad ( $37.602 \pm 0.054 \mu\text{g/g}$  de concentrado). Respecto al perfil determinado en ambas variedades, tanto en la variedad Negra de

Sacacatani y Yunguyo I, el aminoácido esencial que se presenta como limitante es la metionina ( $0.458 \pm 0.041$  y  $0.500 \pm 0.030$   $\mu\text{g/g}$  de concentrado respectivamente), y a los aminoácidos de mayor contenido, al ácido aspártico y ácido glutámico. Acuña & Caiza (2010) en su investigación: “Obtención de hidrolizado enzimático de proteína de chocho (*Lupinus mutabilis*)”, reporta el contenido de aminoácidos en porcentaje (%) de ácido aspártico 6.12, treonina 1.43, serina 2.27, ácido glutámico 13.39, prolina 1.32, Glicina 2.99, alanina 3.56, cistina 0.48, valina 1.46, metionina 0.22, isoleucina 1.83, leucina 3.04, tirosina 1.64, fenilalanina 1.84, histidina 1.25, lisina 1.40 y arginina 1.83. En este perfil se identifica al ácido glutámico y ácido aspártico como las de mayor cantidad, y a la metionina como el aminoácido limitante; en el presente trabajo de investigación tanto la variedad Negra de Sacacatani como la variedad Yunguyo I, presentan al aminoácido esencial limitante en ambos casos a la metionina. De la misma manera, Borja (2014) reporta en su trabajo de investigación el contenido de aminoácidos del lupino ( $\text{mg/g}$  de proteína de lupino) con: arginina 98, histidina 27, isoleucina 45, leucina 74, lisina 55, metionina 8, cistina 14, fenilalanina 38, tirosina 37, treonina 38, valina 42, alanina 37, ácido aspártico 113, ácido glutámico 227, glicina 43, prolina 42 y serina 52. Se correlaciona así de esta manera con el presente trabajo de investigación, teniendo a la metionina como aminoácido limitante y al ácido aspártico y ácido glutámico como los de mayor contenido en el perfil de aminoácidos.

El contenido de metionina en la variedad Negra de Sacacatani representa al  $0.500(\mu\text{g/g}$  de concentrado) y de  $0.458$  ( $\mu\text{g/g}$  de concentrado) a la variedad Yunguyo I. Navarrete (2010) menciona el contenido de algunos aminoácidos del *Lupinus mutabilis* Sweet ( $\text{g}/16$  g de Proteína) es de: isoleucina 4.3, leucina 7.4, lisina 5.3, metionina 0.4, fenilalanina 3.4, treonina 3.5, valina 3.5, Histidina 2.2 y tirosina 3.5. En el caso citado, la metionina se presenta como el de menor concentración, dándole el papel de

aminoácido limitante (siendo este también un aminoácido esencial). Chirinos (2015) en la revista Bio Ciencias, menciona la importancia de los aminoácidos esenciales de la semilla cruda de *Lupinus mutabilis* Sweet (g/16g de proteína), siendo: isoleucina 4.8, leucina 7.0, lisina 5.9, lisina 5.9, metionina 0.4, cistina 1.2, metionina+cistina 1.6, fenilalanina 4.3, tirosina 3.6, treonina 3.8 y valina 4.2. La presente investigación reporta un contenido de metionina de 0.458(μg/g) en la variedad Yunguyo I y de 0.500 en la variedad Negra de Sacacatani, los cuales se relacionan como aminoácidos limitantes en el tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet).

La composición de los aminoácidos tiene un papel fundamental en la elaboración de alimentos y mezclas de estos, es por eso que López (2007) resalta la importancia del contenido en la composición de aminoácidos indispensable en las leguminosas siendo en tarwi (mg/g de proteína): isoleucina 4.8, leucina 7.8, lisina 6.6, metionina+cisteína 1.4, fenilalanina+tirosina 7.2, treonina 2.9, valina 4.9, del mismo modo en la metionina en conjunto con la cisteina representan al aminoácido esencial de menor cantidad (aminoácido limitante) que también se representa en el presente trabajo de investigación. Comparando el perfil de aminoácidos del tarwi (*Lupinus mutabilis* Swet) con otra leguminosa tal es el caso del Chachafruto, Arango *et al.* (2012) menciona en su artículo de investigación sobre este producto, que a diferencia de otras leguminosas como el *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus lunatus* y *Lupinus mutabilis*, considera que el contenido de aminoácidos del chachafruto es igual o mayor a otras leguminosas o menor en el caso de comparación al *lupinus mutabilis*, siendo deficitaria en aminoácidos azufrados como la metionina y el triptófano, como el caso del *lupinus mutabilis* en la presente investigación, en el que se presenta contenido deficitario en cuanto a metionina y no presenta contenido de triptófano (esto debido a la hidrólisis inicial de la muestra), razón por la cual su combinación con harinas de cereales se

convierte en una buena alternativa para lograr un adecuado balance de aminoácidos esenciales.

El *Lupinus mutabilis* al igual que la quinua, sufren de deficiencias en cuanto a aminoácidos azufrados, Cervilla *et al.* (2012) menciona en su investigación sobre la quinua, que las harinas analizadas en su trabajo presentan proteínas biológicamente incompletas para satisfacer los requerimientos de los aminoácidos destinados a la alimentación, por lo cual, la calidad de un alimento dependerá de las combinaciones de alimentos que se realicen. En este sentido la quinua puede complementarse de manera óptima con maíz, arroz y trigo, que son ricos en aminoácidos azufrados, lo cual es contrario a las leguminosas como el caso del presente trabajo, en el que el *Lupinus mutabilis* carece y es deficitario en cuanto al contenido de aminoácidos azufrados así como la quinua.

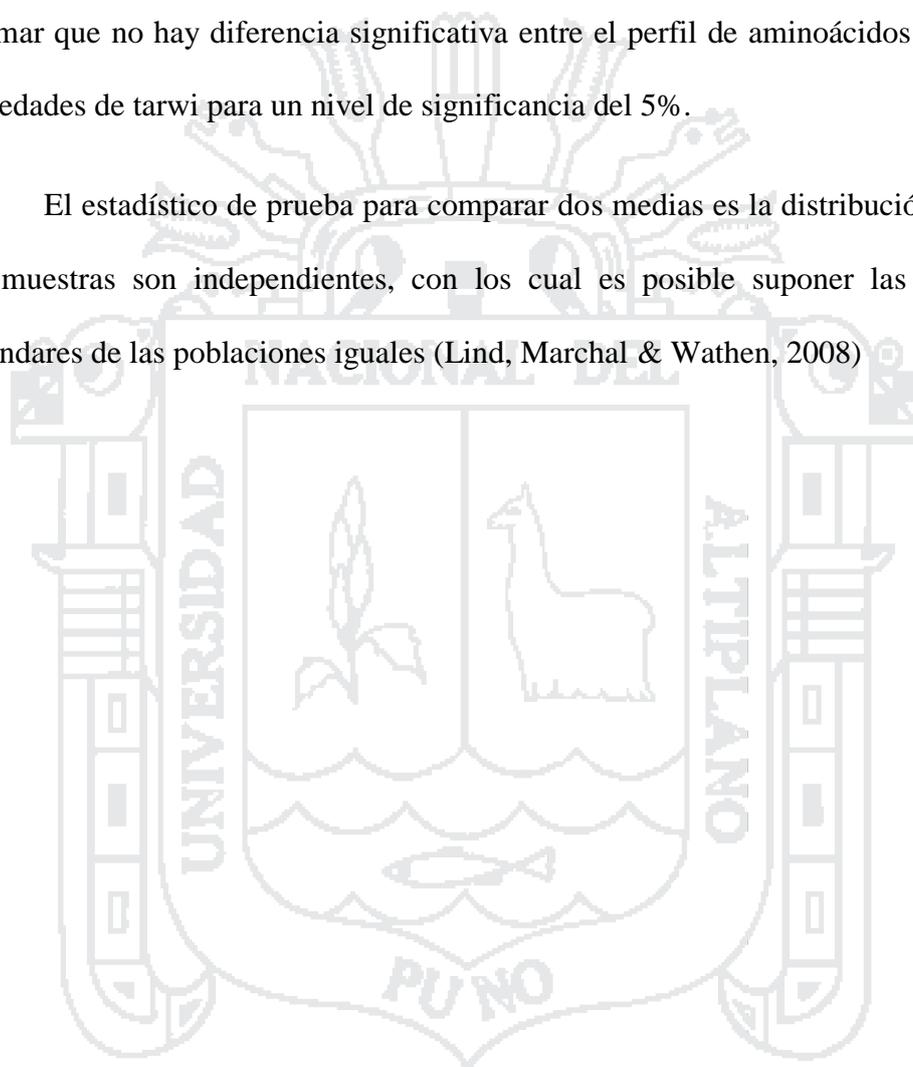
La metionina en conjunto con otros aminoácidos representan un factor muy importante, al ser la metionina un aminoácido limitante, tal como se dio a conocer en la presente investigación, respecto a este aspecto, Chew, Casey & Johnson (2003) indica que la suma de cisteína y metionina en el *Lupinus angustifolius* (altramuz) sufren de deficiencia de azufre, que ha sido encontrado con frecuencia en otras especies de leguminosas, incluyéndose los aislados de otras especies de *lupinus*. Pastor *et al.* (2014) aporta que, al igual que en otras legumbres, la única limitación detectada en las semillas de los cuatro géneros examinados es tanto en aminoácidos cisteína, metionina y triptófano, cuyos niveles no llegan a las recomendaciones de las organizaciones internacionales en cuanto al contenido de azufre. Los bajos niveles de aminoácidos que contienen azufre en las semillas se pueden compensar mezclándolos con los cereales que tienen un rico contenido de metionina y la cisteína, al igual que otras leguminosas. Por lo tanto, las legumbres proporcionan la lisina, que carecen los cereales. Por otro

lado, la reducción del contenido de triptófano se pueden mejorar mediante la mezcla de con semillas de *Amaranthus*, ya que las especies de este género exceden la cantidad mínima (Juan *et al.*, 2007). En tal efecto, al complementar el contenido de aminoácidos generales en plantas leguminosas con cereales y *Amaranthus*, se puede obtener una fuente bastante equilibrada de aminoácidos.

La cromatografía de líquidos de alta resolución, es un poderoso método de separación y análisis de proteínas, sin embargo, debemos de considerar la versatilidad de esta técnica, ya que está sometida a un sin número de factores y condiciones experimentales, que pueden depender de la composición y características de cada proteína, es por ello que en la presente investigación se pudo localizar 17 de los 20 aminoácidos establecidos, este resultado nos indica los analitos que fueron identificados en el proceso del análisis de componentes en la fase móvil de la técnica, no descartando algún componente aminoácido que pudo ser eliminado debido a la intervención de los solventes empleados en el proceso, que principalmente afectan a los componentes azufrados, sin descartar que estos, debido a su muy baja concentración, no tendrían un papel representativo como lo da en este caso la metionina siendo un analito detectado con el papel fundamental de aminoácido limitante. Los cromatogramas se generan en una columna de intercambio iónico y con detección fotométrica basada en una reacción post columna de los aminoácidos con un reactivo calorimétrico, los cuales se obtienen mediante un procedimiento automático de formación de derivados de pre columna (Skoog, Holler & Crouch, 2008), y que debido a la intervención de la hidrólisis ácida durante el proceso cromatográfico como lo menciona Cervilla *et al.* (2012), se elimina los componentes del triptófano, de no ser por este proceso se podría haber identificado algún rastro de la existencia de este aminoácido.

Para validar la diferencia entre el perfil de aminoácidos del concentrado protéico de tarwi de las dos variedades estudiadas se realizó una prueba de hipótesis utilizando la distribución de t-student (Anexo XIII), se puede apreciar que el valor de  $T_c < t_{0.95;32} 0.1754 < 2.037$ , se encuentra en la zona de aceptación, el cual nos permite afirmar que no hay diferencia significativa entre el perfil de aminoácidos entre las dos variedades de tarwi para un nivel de significancia del 5%.

El estadístico de prueba para comparar dos medias es la distribución t, en el que las muestras son independientes, con los cual es posible suponer las desviaciones estándares de las poblaciones iguales (Lind, Marchal & Wathen, 2008)



## CONCLUSIONES

- La extracción del concentrado proteico de Tarwi por el método de punto isoelectrico, tuvo mejores condiciones de rendimiento con el tratamiento realizado a la temperatura de 40°C para ambas variedades (Yunguyo I y Negra de Sacacatani), teniendo una composición (%) de proteína de  $73.45 \pm 0.230$  y  $70.20 \pm 0.065$  respectivamente.
- En la determinación del perfil de aminoácidos del concentrado protéico de tarwi de la variedad Yunguyo I y Negra de Sacactani se identificó a 17 aminoácidos, de los cuales 9 aminoácidos son esenciales (histidina, treonina, arginina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina y lisina), dentro de este resultado se identificó a la metionina como el aminoácido limitante representativo del perfil de ambas variedades de estudio. Luego de ser analizados se demostró que no presentan diferencia estadística significativa entre el perfil de aminoácidos de ambas variedades.

## RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de determinación de parámetros de extracción del concentrado protéico por el método de punto isoeléctrico en distintas leguminosas, puesto que los factores influyen en la cantidad de extracción de concentrado proteico empleado en la presente investigación, esto con el fin de optimizar y rescatar al máximo el componente de estudio (concentrado protéico).
- Aplicar los concentrados proteicos como ingredientes en la elaboración de múltiples productos tales como: cárnicos, bebidas, panadería, entre otros ofertando nuevas fuentes nutricionales al consumidor.
- Efectuar trabajos de investigación de perfil de aminoácidos de alimentos que complementen deficiencias en cuanto al presente trabajo de investigación y los relacionados a este, con el fin de crear perfiles de proteínas apropiadas en combinación con otros productos y así generar alimentos equilibrados para la nutrición de los consumidores. Por otro lado, tener mucha precisión al realizar los ensayos en cuanto al método empleado (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución – HPLC), para así no afectar a los componentes que se desean analizar.

**BIBLIOGRAFIA**

- Acuña, P. (2001). Estudio de pre factibilidad técnico económico para la obtención de hidrolizado de proteína vegetal a partir de lupino, proyecto de Titulación previo a la obtención de Título de Ingeniero Civil mención Agroindustrial, Universidad de la Frontera, Chile, pp. 10 -14.
- Acuña, O. & Caiza, J. (2010). Obtención de hidrolizado enzimático de proteína de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) a partir de harina integral. Departamento de Ciencia de los alimentos y biotecnología (DECAB). Revista Politécnica. Vol. 29; pág. 70-77. España.
- Adeva, M., Calviño, J., Souto, G. & Donapetry C. (2012). Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids in humans. *Amino Acids*; 43(1):171-81.
- Alaiz, M., Navarro, J., Girón, J. & Vioque, E. (2000). Amino acid analysis by high performance liquid chromatography after derivatization with *Journal Chromatography* 591; 181-186.
- AOAC. (1995). International Official Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemist. 16th Edition, 5th Revision, Gaithersburg, USA.
- Arango, O., Bolaños, V., Ricaurte, D., Caicedo, M. & Guerrero, Y. (2012). Obtaining a protein extract from chachafruto flour (*Erythrinaedulis*). *Agroindustrial Engineering. University and health – University Nariño. Colombia.*
- Asencio, G. & Aguilar, J. (2010). Importancia de las Propiedades Físico-Químicas de los Aminoácidos en la Predicción de Estructuras de Proteínas. Universidad Pablo de Olavide, España.

- Badui, S. (2006). Química de los alimentos, 4ta edición, Editorial Pearson Education, México, pp. 203 – 210.
- Badui, S. (2013). Enzimas. En P. Educación (Ed.), Química de los alimentos (8 ed., pp. 286). México.
- Baldeón, P. E. (2012). Procesamiento del Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) para la obtención de leche y yogurt como alimentos alternativos de consumo humano. Universidad de Guayaquil. pp. 45–48.
- Berge, J., Tymoczko, J. & Stryer L. (2004). Bioquímica, Editorial Reverté S.A. Barcelona, España, pp. 43, 79, 91.
- Blanco, A. (2010). Química Biológica, 8va edición, Editorial El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, pp. 22 – 26.
- Blas, C., García, A. & Carabaño, R. (2005). Necesidad de Treonina en Animales Monogástricos. XVI Concurso de Especialización. Departamento de Producción Animal. Universidad Politécnica de Madrid. España.
- Borja, J. (2014). Obtención de péptidos bioactivos de *Lupinus mutabilis* (tarwi) mediante proteasas de *Bacillus* sp. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú.
- Caiza, J. E. (2011). Obtención de hidrolizado de proteína de chocho (*Lupinus mutabilis*) a partir de harina integral (Doctoral dissertation, QUITO/EPN).
- Caiza, A. J. (2011). Obtención de hidrolizado enzimático de proteína de chocho (*Lupinus mutabilis*) a partir de harina integral. Trabajo de pregrado, Escuela Politécnica Nacional, Quito.

- Callisaya, C. & Alvarado, A. (2009). Aislados proteínicos de granos Altoandinos *Chenopodiaceas*; Quinoa "*Chenopodium quinoa*"- Cañahua "*Chenopodium Pallicaule*" por precipitación isoelectrónica. *Revista Boliviana de Química*, 26(1), 12-20.
- Carvajal F.E., Nout M.R., Boekel M., Koziol M. & Linnemann A. (2013). Modeling of the aqueous debittering process of *Lupinus mutabilis* Sweet. *Food Science and Technology* 53 (2): 507 - 16.
- Carranco, M. (2002). Composición química, extracción de proteína y perfil de aminoácidos de siete plantas acuáticas, *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Instituto de Ciencia, Cuba.
- Cerezal, P., Carrasco, A., Pinto, K., Romero, N. & Arcos, R. (2007). Suplemento Alimenticio de alto contenido proteico para niños de 2 a 5 años. Desarrollo de la formulación y aceptabilidad. Universidad de Antofagasta – Ingeniería en Alimentos. Chile.
- Cela, R. & Lorenzo, R. (2002). Técnicas de separación en química analítica. Madrid, Editorial Síntesis.
- Cervilla, N., Mufari, J., Calandri, E. & Guzman, C. (2012). Amino acid content estimation in quinoa flour made in Argentina. Evaluation of its proteic quality. Institute of science and food technology. Córdoba, Argentina.
- Chew, P., Casey, A. & Johnson, S. (2003). Protein quality and physico-functionality of Australian sweet lupin (*Lupinus angustifolius* cv. *Gungurru*) protein concentrates prepared by isoelectric precipitation or ultrafiltration. School of Health Sciences, Faculty of Health and Behavioural Science, Deakin University. Australia.

- Chicharro, M. (2007). Cromatografía Principios y Aplicaciones. Análisis Químico, Ciencia y Tecnología de los Alimentos.
- Chirinos, M. (2015). Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) una planta con potencial nutritivo y medicinal. Revista Bio Ciencias. Universidad Nacional Agraria la Molina. Centro de diagnóstico molecular S.A.C. Lima, Perú.
- Combaret, L. (2008). Human Nutrition Research Centre of Clermont-Ferrand. A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. *Journal of Physiology*. 569; 92-98.
- Delvin, T. (2006). Bioquímica, libro de texto con aplicaciones clínicas. Editorial Reverte. 4ta edición. Barcelona. España.
- Eduar, D., Rodriguez, A., Arturo, D. & Zamora, A. (2010). Caracterización de Semillas de Lupino (*Lupinus mutabilis*) Sembrado en los Andes de Colombia. Escuela de Ingeniería de Alimentos. Universidad del Valle. Cali, Colombia.
- FAO. (1998). Cultivos Marginados Granos y leguminosas andinas.
- FAO. (1985). Expert Consultation, Energy and protein requirements. World Health Organization, Technical Geneva.
- Fennema, O. (2010). Aminoácidos, péptidos y proteínas. En Química de los alimentos pp. 472-473. Acribia editorial.
- Gálvez, A., Flores, I. & González, A. (2013). Propiedades funcionales de las proteínas. En D. S. Badui, & P. Educación (Ed.), Química de los alimentos (8 ed., pp. 286). México.

- García, C., Morales, S., Rosales, A. & Ramirez, H. (2016). Inducción de Aminoácidos en Germinados de Amaranto por Efecto de Tratamientos de Electro Inducción. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Guanajuato, Mexico.
- García, M. (2008.) HPLC fundamental, Valencia, Universidad politécnica de Valencia.
- Ghavidel, R. & Prakash, J. (2006). Effect of germination and dehulling on functional properties of legume flour. *Journal Science Food Agriculture* 86: 1189-1195.
- Guemes N., Peña R.J., Jiménez C., Dávila G. & Calderón G. (2008). Effective detoxification and decoloration of *Lupinus mutabilis* seed derivatives, and effect of these derivatives on bread quality and acceptance. *Science of Food and Agriculture*. 88: 1135 - 43
- Gotor, C. (2010). Power Cysteine. *Journal of Biological Chemistry* 276:168-175
- Gutierrez, H. (2012). Análisis y Diseño de Experimentos editorial Mc Graw-Hil, México.
- Harris, C. (2007). Análisis químico cuantitativo. Cromatografía: Fundamentos y práctica. Barcelona, Editorial Reverte.
- Hicks, J. (2001). Bioquímica Mc Graw Hill Interamericana editores. México, D.F. pp. 107, 109, 117.
- Huag, T., Nicodemus, J., Zarka D., Thomashow, M., Winiewski, M. & Duman, G. (2002). Expression of an insect (*Dendroides Canadensis*) antifreeze protein in *Arabidopsis thaliana* result in a decrease in plant freezing temperature, *Plant Mol Biol*, pp. 333.

- Jaimes, J., Restrepo, D. & Acevedo, D. (2014). Preparación y determinación de las propiedades funcionales del concentrado proteico de Trupillo (*Prosopis Juliflora*). Biotecnología del sector agropecuario y agroindustrial. Cartagena, Colombia.
- Juan, R., Pastor, J., Alaiz, M., & Vioque, J. (2007). Electrophoretic characterization of *Amaranthus L.* seed proteins and its systematic implications. *Botanical Journal of the Linnean Society*.
- Lampart, E., Korczak, J., Nogala, M. & Zawirska R. (2003). Propiedades antioxidantes de los productos de semillas de altramuz. *Química de los Alimentos*. pp. 279–285.
- Latham, M. C. (2002). Nutrición humana en el mundo en desarrollo. Depósito de documentos de la FAO: Alimentación y nutrición N° 29 (1°Ed), Roma pp. 9, 17.
- Lehninger, A., Cox, M., & Nelson, D. (2000). Principios de Bioquímica. Ed. Omega (3° Ed.), W. H. Freeman. Nueva York.
- Lehninger, A., Cox, M., & Nelson, D. (2008). Principios de Bioquímica. Ed. Omega (4° Ed.), Barcelona.
- Lescano, R. (1999). Genética y mejoramiento de cultivos andinos, quinua, kañihua, tarwi y kiwicha. INADE/PELT.COTESU, Puno, Perú.
- Lind, D., Marchal, W. & Wathen, S. (2008). Estadística aplicada a los negocios y la economía. 13 Ed. Mc GRAW-HILL/Interamericana Editores S. A. México.
- Lopez, R. (2007). Efectos de la Fenilalanina sobre los seres vivos. Centro Educativo Anglo Mexicano. Mexico.

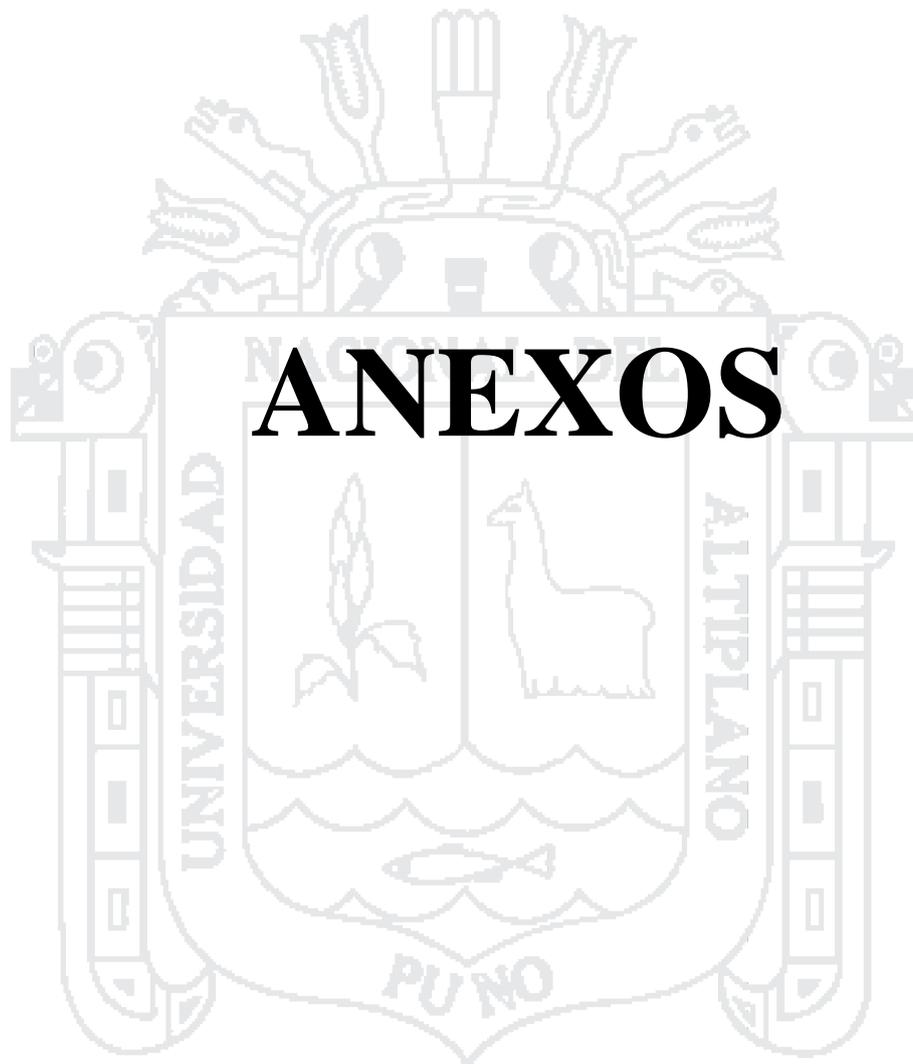
- López, H. (2007). Elaboración de galletas de trigo fortificadas con harina, aislado y concentrado de *Lupinus mutabilis*. Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Hidalgo. México.
- Martilla, B., Mauriz, J., Culebras, J., Gonzales, J. & Gonzales, P. (2002). La Glicina: un nutriente antioxidante protector celular. Departamento de Fisiología. Universidad de León. España.
- Martin, E., Garcia, M. & Bustos, G. (2006). Nutrición Infantil. Facultad de Medicina y Cirugía. Universidad Internacional de las Américas.
- Martínez, O. & Sanchez, F. (2004). Arginina, óxido nítrico y función endotelial. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Granada. Granada. España.
- Martínez, J., Medina, O. & Zambrano, R. (2011). Estudio fisicoquímico funcional de los aislados proteicos en semillas de maracuya (*Passiflora edulis*). Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, 9(1), 70-76.
- Martínez, O. & Martínez, E. (2006). Proteínas y Péptidos en Nutrición Enteral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Granada, España.
- Mathews, C., Holde, K. & Ahern, K. (2003). Bioquímica, 3a Edición, Pearson Educación; Madrid, España.
- Mckee, T. (2014). Aminoácidos, péptidos y proteínas. En Bioquímica las bases moleculares de la vida (pp. 110). México.

- Mayta, J. (2000). Desamargado de tarwi *Lupinus mutabilis* en un reactor air-lift. Tesis Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial Universidad Nacional del Altiplano Puno.
- Medina, A. & Escobar, M. (2002). Sistema glutamatérgico, primera parte: Sinaptología, homeostasis y muerte celular. Facultad de Salud. Universidad del Valle. Colombia.
- Mendoza, J. (2010). Restricción de la Metionina en la Dieta y Aumento de la Longevidad. Encuentros en la Biología pp. 3.
- Miano A.C. & García J.A. (2015). Correlation between morphology, hydration kinetics and mathematical models on Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet). *LWT - Food Science and Technology* 61 (2): 290 - 98.
- Montgomery, D. (2006). Diseño y Análisis de Experimentos. 2da ed. Editorial Limusa Wiley. México.
- Mora, C. (2010). Función de aminoácidos no esenciales. Facultad de Medicina y Cirugía. Universidad Internacional de las Americas.
- Navarrete, M. V. (2011). Extracción, Refinación, y Caracterización Físico-Química y Nutracéutica del Aceite de Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Tesis previa a la obtención del título de Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias, Riobamba.
- Ortega, E., Rodríguez, A. & Zamora, Á. (2010). Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis* Sweet) sembrado en los Andes de Colombia. *Acta Agronómica*, 59(1), 111-118

- Padrón, C., Oropeza, R. & Montes, A. (2015). Semillas de quinua *chenopodium quinoa*: composición química y procesamiento. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 166-218.
- Palacios V., Demetrio S., Espinoza C., Herrera M. y Huamancaja C. (2003). Obtención de alcohol a partir de la malta de *Lupinus mutabilis* (tarwi). Universidad Nacional del Centro del Perú. Junin- Perú.
- Pastor, E., Juan, R., Pastor, J., Alaiz, M. & Vioque, J. (2014). Protein and amino acid composition of select wild legume species of tribe Fabae. University of Sevilla. Spain.
- Peinado, J. & Meléndez, F. (2010). Medida del pH: disoluciones reguladoras. Precipitación isoelectrica de la caseína. *Bioquímica- Biología molecular*, 1, 1-2.
- Quirasco, B. M., & López, M. A. (2012). Proteins as Ingredients: Types, Funtions, Applications. En J. Giese, *Food Technology* 1: 50-60.
- Rangel, A.; Domont, G.; Pedrosa, C. & Ferreira, S. (2003). Functional properties of purified vicilins from cowpea (*Vigna unguiculata*) and pea (*Pisum sativum*) and cowpea protein isolate. *Journal Agriculture Food Chemycal* 51: 572 – 579.
- Rouessac, F. (2003). Análisis químico: métodos y técnicas instrumentales modernas. Madrid, Mc Graw-Hill.
- Scragg, A. (1999). Biotecnología para ingenieros, Editorial Limusa.
- Serpa, G. A., Hincapié, L. G., & Álvarez, L. C. (2014). Determinación del punto isoelectrico de las proteínas presentes en cuatro fuentes foliares: yuca (*Manihot esculenta Crantz*) variedades verónica y tai, jatropha (*Jatropha curcas* L.) y

- gmelina (*Gmelina arborea*). *Investigaciones Agroindustriales prospect*, 12(1), 30-39.
- Skoog, D., Holler, F. & Crouch, S. (2008). *Principios de Análisis Instrumental*. Cengage Learning Editores. Universidad Nacional Autónoma de Mexico, Mexico.
- Stryer, L. (2001). *Bioquímica*. Editorial Reverté (4<sup>o</sup> Ed.), Barcelona pp. 25.
- Sosa, C. (2000). Influencia de dos métodos de extracción de un aislado proteico de lupino (*Lupinus mutabilis*) en sus propiedades funcionales. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, Perú.
- Tomé, D. (2009). Proteínas y Aminoácidos: Necesidades y Funciones. YSONEWS, Boletín Trimestral de Laboratorios YSONUT N° 3, Barcelona, España.
- Urrutia, W. (2010). Determinación de parámetros óptimos de extracción alcalina para la obtención de aislado proteico a partir de tarwi, Abancay, Perú.
- Valenzuela, C., Abugoch, L., Tapia, C. & Gamboa, A. (2013). Effect of alkaline extraction on the structure of the protein of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and its influence on film formation. *International Journal of Food Science and Technology*, 843-849.
- Vieira, R. (2003). *Fundamentos de bioquímica*. Edición electrónica. Belém Pará.
- Villacrés, E. (2001). Obtención de un hidrolizado enzimático de alta funcionalidad a partir del Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Escuela Politécnica Nacional, Departamento de Ciencia de Alimentos y Biotecnología. Quito, Ecuador.

- Villacrés, E., Rubio, A., Egas, L., & Segovia, G. (2006). Usos alternativos del Chocho. Boletín Divulgativo N° 333, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, Departamento de Nutrición y Calidad de los alimentos.
- Vioque, J. (2000). Jornada internacional sobre proteínas alimentarias. Universidad de Sevilla, España.
- Vioque, J., Sánchez, R., Pedroche, J., Del Mar, M. & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de concentrados y aislados proteicos. Instituto de la grasa. Sevilla, España.
- Voet, D., Voet, J. G. & Pratt, C. W. (2010). Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular (2 ed.). España: medica panamericana.
- Zhang, X., Wen, H. & Shi, X. (2012). Lysine methylation: beyond histones. *Acta Biochim. Biophys. Sin. Shanghai*.
- Zhun, H. & Damodaran, S. (1994). Heat – induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties, *Journal Agriculture Food Chemycal* 846.
- Zhun, H., & Damodaran, s. (2011). Heat- induced conformational changes in whey protein isolateand its relation fo foaming properties. *Agric. Food chem*, 1; 41.



## ANEXO I

## 1. DETERMINACION DE PROTEINA (Método Kjeldalh AOAC 1990)

El método está compuesto por tres etapas:

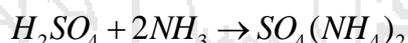
a. Digestión:

Esta etapa tiene como objeto mineralizar la muestra para formar el sulfato de amonio. Este sistema utiliza ácido sulfúrico concentrado y el peróxido de hidrogeno al 50%, donde el ácido va a deshidratar y quemar la muestra y el peróxido es agregado para completar la digestión de la muestra.

El ácido sulfúrico reacciona en presencia de carbono oxidable para producir dióxido de azufre, el cual viene a ser agente reductor:



El nitrógeno transformado en amoníaco se combina con la parte restante del ácido sulfúrico para formar sulfato de amonio:

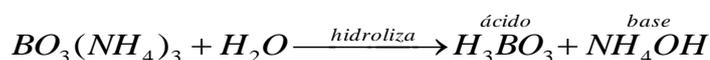
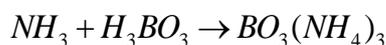
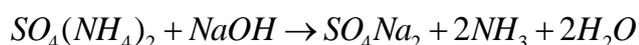


Se evapora el exceso de peróxido de hidrogeno calentado un minuto adicional después de terminar el añadido. Para asegurar que la digestión este completa, se observa que la muestra este completamente clara.

b. Destilación:

En esta etapa el nitrógeno que está en forma de sulfato de amonio, se ataca con un álcali fuerte como el hidróxido de sodio para liberar el amoníaco.

El vapor de agua arrastra al amoníaco y después de la condensación lograda con la ayuda de un refrigerante se recibe el hidrato de amonio en un vaso de precipitado, contenido ácido bórico e indicadores azul de metileno y rojo de metilo, formándose borato de amonio:



**c. Titulación:**

En esta etapa el ácido sulfúrico reacciona con el borato de amonio y solo un pequeño exceso de este ácido provoca un cambio de pH y el consiguiente viraje de mezcla (de verde a violeta).

**PROCEDIMIENTO:**

- Pesar 0.25 gr de muestra seca y molida, luego agregar 1g de catalizador de oxidación (mezcla de sulfato de potasio y sulfato de cobre) para acelerar la reacción. Limpiar con un poco de agua el cuello del balón de digestión, agregar 2.5 ml de ácido sulfúrico concentrado y colocar el balón en una cocina de digestión. La digestión termina cuando el contenido del balón es completamente cristalino.
- Colocar la muestra digerida en un aparato de destilación agregar 5ml de NaOH concentrado e inmediatamente conectado el vapor para que se produzca la destilación. Conectar el refrigerante y recibir el destilado en un erlenmeyer conteniendo 5ml de la mezcla de ácido bórico más indicador de pH la destilación termina cuando ya no pasa más amoníaco y hay viraje del indicador
- Luego se procede a la titulación con HCl valorado 0.05 N anotar el gasto.

**CALCULOS:**

El porcentaje de proteínas se obtiene calculando el porcentaje de nitrógeno de acuerdo al gasto en la titulación, y a partir de este se multiplica a un factor dependiendo del tipo de alimento para obtener el porcentaje de proteínas presentes en el alimento en estudio, en este caso utilizamos es el factor 6.25.

$$\% \text{Nitrógeno} = \frac{(\text{gasto})(N)(f_c)(m_{eq})(100)}{\text{peso\_de\_muestra}}$$

Dónde:

Gasto: gasto de la titulación

N: Normalidad de ácido sulfúrico (0.1)

$f_c$ : Factor de corrección del ácido sulfúrico

$m_{eq}$ : Mili equivalente gramo del nitrógeno (0.014)

$$\% \text{proteína} = (\% \text{Nitrógeno})(6.25)$$

## ANEXO II

**DESVIACIÓN ESTANDAR E INTERVALO DE CONFIANZA DEL  
CONTENIDO DE PROTEINA DE TARWI**

<b>VARIEDAD</b>	<b>Repet. 1</b>	<b>Repet. 2</b>	<b>Repet. 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Intervalo de Confianza</b>
Negra de Sacacatani	48.65	48.73	48.75	<b>48.71</b>	0.043	± 0.049
Yunguyo I	49.53	49.76	49.66	<b>49.65</b>	0.094	± 0.107



ANEXO III

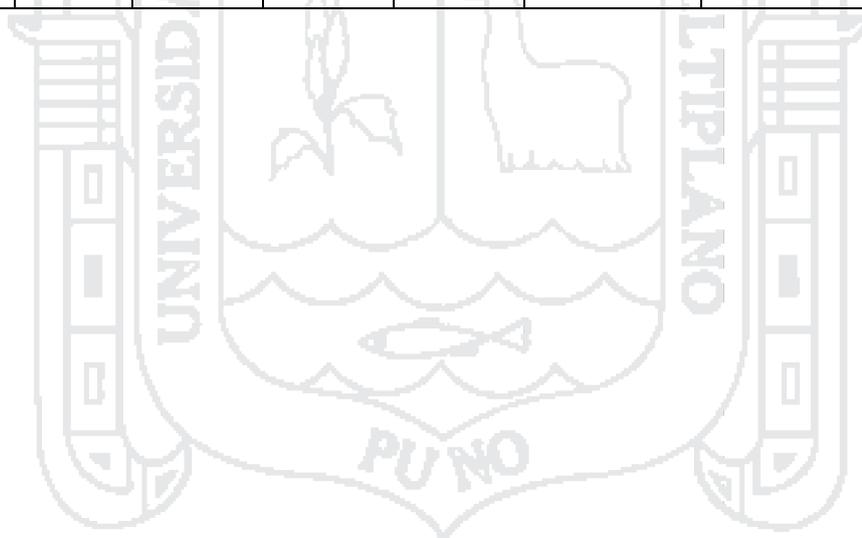
**DESVIACIÓN ESTANDAR E INTERVALO DE CONFIANZA DE LA  
EXTRACCION DEL CONCENTRADO PROTEICO DE TARWI**

Variedad	Temperatura	Replica	Repet. 1	Repet. 2	Repet. 3	Promedio	Desviación estándar	Intervalo de Confianza
Yunguyo I	30°C	1	3.69	3.82	3.83	3.78	0.078	± 0.088
	30°C	2	3.77	3.84	3.82	3.81	0.036	± 0.041
	30°C	3	3.66	3.59	3.58	3.61	0.044	± 0.049
	40°C	1	3.98	4.05	4.00	4.01	0.029	± 0.033
	40°C	2	4.00	3.95	3.93	3.96	0.029	± 0.033
	40°C	3	3.99	3.96	3.96	3.97	0.017	± 0.020
Negra de Sacacatani	30°C	1	3.51	3.62	3.64	3.59	0.070	± 0.079
	30°C	2	3.60	3.68	3.70	3.66	0.053	± 0.060
	30°C	3	3.71	3.80	3.80	3.77	0.042	± 0.048
	40°C	1	3.90	3.98	3.88	3.92	0.043	± 0.049
	40°C	2	3.92	3.88	3.90	3.90	0.020	± 0.023
	40°C	3	4.06	4.10	4.02	4.06	0.040	± 0.045

ANEXO IV

**DESVIACIÓN ESTANDAR E INTERVALO DE CONFIANZA DEL  
PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DEL CONCENTRADO  
PROTÉICO DE TARWI**

<b>Variedad</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Repet. 1</b>	<b>Repet. 2</b>	<b>Repet. 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Intervalo de Confianza</b>
Yun.	30°C	11.34	11.43	10.87	11.20	0.246	± 0.278
	40°C	12.03	11.88	11.91	11.94	0.079	± 0.090
N.S.	30°C	10.77	10.98	11.31	11.02	0.222	± 0.252
	40°C	11.76	11.70	12.18	11.88	0.262	± 0.296



ANEXO V

ANALISIS DE VARIANZA – DISEÑO FACTORIAL  $2^k$  DE LA EXTRACCIÓN DEL CONCENTRADO PROTÉICO DE TARWI

REPLICA	VARIEDAD YUNGUYO I		VARIEDAD NEGRA DE SACACATANI	
	30°C	40°C	30°C	40°C
1	3.78	4.01	3.59	3.92
2	3.81	3.96	3.66	3.90
3	3.61	3.97	3.77	4.06
<b>Y<sub>ij</sub></b>	11.20	11.94	11.02	11.88
<b>Y<sub>i.</sub></b>	23.14		22.90	
<b>Y<sub>.j</sub></b>	22.22		23.82	
<b>Y...</b>	46.04			

ANALISIS DE VARIANZA

F. de V.	G. L.	S. C.	C. M.	Fc.	Signif.
Variedad (A)	1	0.00480033	0.00480033	0.68	n.s.
Temperatura (B)	1	0.21333367	0.21333367	30.30	**
A x B	1	0.00119967	0.00119967	0.17	n.s.
Error Exp.	8	0.05633333	0.00704167		
Total	11	0.27566667			

## ANEXO VI

**DESVIACIÓN ESTANDAR E INTERVALO DE CONFIANZA DEL  
CONTENIDO DE PROTEINA DEL CONCENTRADO PROTÉICO DE TARWI**

<b>VARIEDAD</b>	<b>Repet. 1</b>	<b>Repet. 2</b>	<b>Repet. 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Intervalo de Confianza</b>
Negra de Sacacatani	70.12	70.25	70.23	70.2	0.057	± 0.065
Yunguyo I	73.27	73.41	73.67	73.45	0.203	± 0.230



## ANEXO VII

**DESVIACIÓN ESTANDAR E INTERVALO DE CONFIANZA DEL PERFIL DE  
AMINOÁCIDOS DEL CONCENTRADO PROTÉICO DE TARWI DE LA  
VARIEDAD YUNGUYO I**

<b>VARIEDAD</b>	<b>Repet. 1</b>	<b>Repet. 2</b>	<b>Repet. 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Intervalo de Confianza</b>
Acido Aspártico	1.925	1.875	1.945	1.915	0.036	± 0.041
Treonina	0.950	0.980	1.070	1.000	0.062	± 0.071
Serina	2.358	2.402	2.395	2.385	0.024	± 0.027
Acido Glutámico	37.635	37.377	37.536	37.516	0.130	± 0.147
Prolina	1.936	2.070	2.048	2.018	0.072	± 0.081
Glicina	12.050	11.900	12.050	12.000	0.087	± 0.098
Alanina	6.900	7.050	7.050	7.000	0.087	± 0.098
Cisteina	31.753	31.793	31.728	31.758	0.033	± 0.037
Valina	9.005	8.900	9.095	9.000	0.098	± 0.110
Metionina	0.427	0.449	0.498	0.458	0.036	± 0.041
Isoleucina	7.480	7.298	7.422	7.400	0.093	± 0.105
Leucina	2.896	2.765	2.844	2.835	0.066	± 0.075
Tirosina	4.980	5.100	4.920	5.000	0.092	± 0.104
Fenilalanina	7.980	8.150	7.870	8.000	0.141	± 0.160
Histidina	5.070	5.150	5.080	5.100	0.044	± 0.049
Lisina	1.250	1.220	1.130	1.200	0.062	± 0.071
Arginina	1.610	1.580	1.610	1.600	0.017	± 0.020

ANEXO VIII



**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS**  
**LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD**

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166  
 ✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📍 Aptdo. 1350  
 AREQUIPA - PERU



**INFORME DE ENSAYO**  
**Nº DE INFORME: ANA16K15.001981C**

<b>Nombre del Cliente</b>	: YENY ROXANA LAURENTE FLORES
<b>Dirección del Cliente</b>	: URB SIMON BOLIVAR MZ H LOTE 12 PUNO
<b>RUC</b>	: NO DECLARA
<b>Condición del Muestreado</b>	: POR EL CLIENTE
<b>Descripción</b>	: CONCENTRADO PROTEICO DE TARWI VAR YUNGUYO I
<b>Tamaño de muestra</b>	: 22 g
<b>Fecha de Recepción</b>	: 16/11/2015
<b>Fecha de Inicio del Ensayo</b>	: 16/11/2015
<b>Fecha de Emisión de Informe</b>	: 19/11/2015
<b>Página</b>	: 1 de 1

**I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:**

ANÁLISIS	RESULTADO
*DETERMINACIÓN DE PERFIL DE AMINOÁCIDOS (ug/g)	
Método Cromatográfico HPLC UV DAD	
Ácido Aspártico	1,915
Treonina	1,000
Serina	2,385
Ácido Glutámico	37,516
Prolina	2,018
Glicina	12,000
Alanina	7,000
Cisteina	31,758
Valina	9,000
Metionina	0,458
Isoleucina	7,400
Leucina	2,835
Tirosina	5,000
Fenilalanina	8,000
Histidina	5,100
Lisina	1,200
Arginina	1,600

**OBSERVACIONES:**

Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL -DA

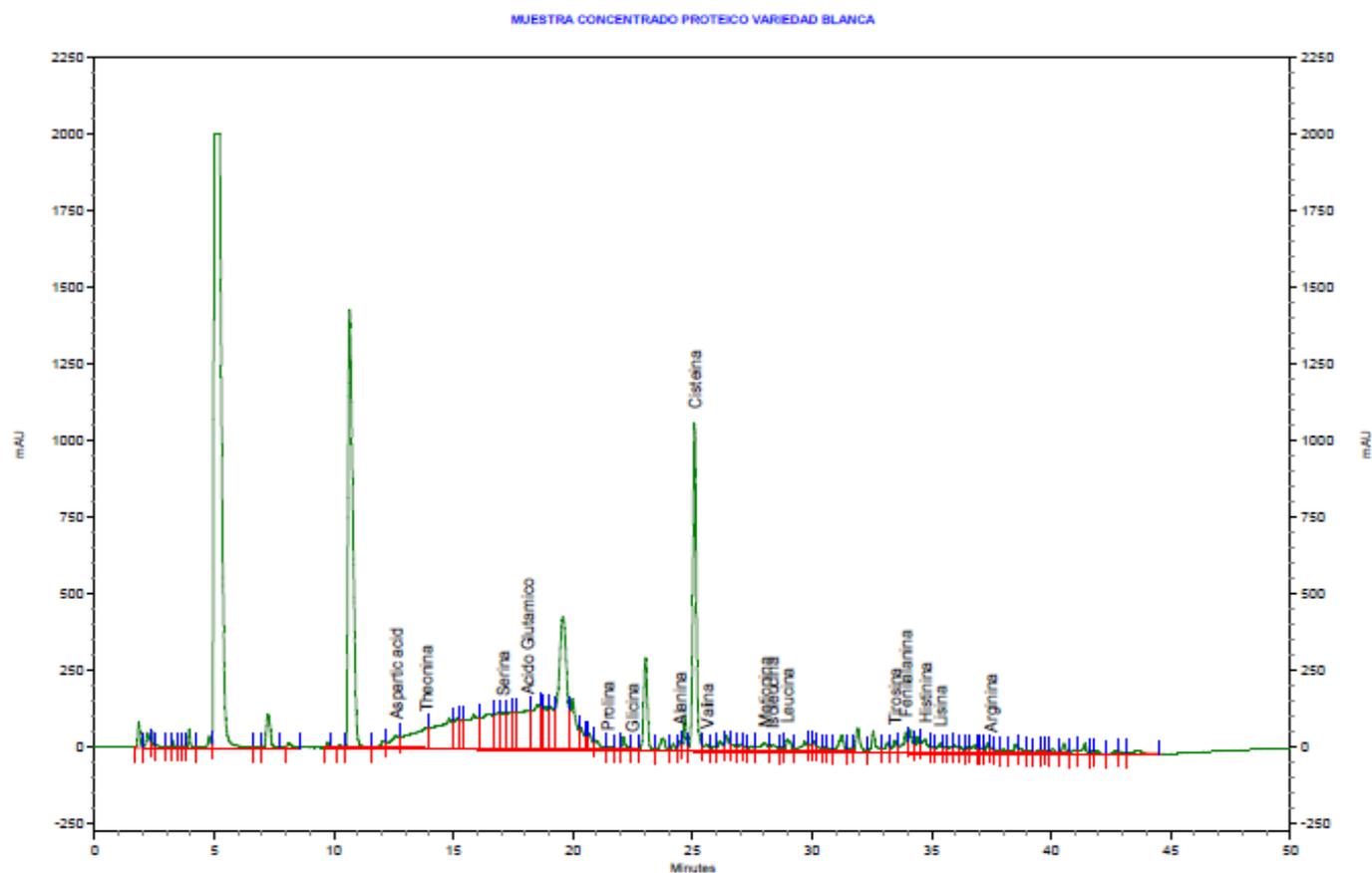
Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez  
 CQFDA 00624  
 JEFE DE LABORATORIO LECC



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

ANEXO IX

CROMATOGRAMA DEL PERFIL DE AMINOACIDOS DEL CONCENTRADO  
PROTÉICO DE TARWI DE LA VARIEDAD YUNGUYO I



## ANEXO X

**DESVIACIÓN ESTANDAR E INTERVALO DE CONFIANZA DEL PERFIL DE AMINOÁCIDOS DEL CONCENTRADO PROTÉICO DE TARWI DE LA VARIEDAD NEGRA DE SACACATANI**

<b>VARIEDAD</b>	<b>Repet. 1</b>	<b>Repet. 2</b>	<b>Repet. 3</b>	<b>Promedio</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Intervalo de Confianza</b>
Acido Aspártico	4.062	4.023	4.080	4.055	0.029	± 0.033
Treonina	0.970	1.050	1.070	1.030	0.053	± 0.060
Serina	2.500	2.592	2.534	2.542	0.047	± 0.053
Acido Glutámico	37.550	37.612	37.644	37.602	0.048	± 0.054
Prolina	0.479	0.442	0.456	0.459	0.019	± 0.021
Glicina	16.040	16.010	15.950	16.000	0.046	± 0.052
Alanina	8.050	8.002	7.948	8.000	0.051	± 0.058
Cisteina	29.209	29.170	29.158	29.179	0.027	± 0.030
Valina	7.540	7.450	7.510	7.500	0.046	± 0.052
Metionina	0.470	0.520	0.510	0.500	0.026	± 0.030
Isoleucina	9.550	9.630	9.620	9.600	0.044	± 0.049
Leucina	1.246	1.359	1.442	1.349	0.098	± 0.111
Tirosina	7.510	7.442	7.548	7.500	0.054	± 0.061
Fenilalanina	9.210	9.380	9.310	9.300	0.085	± 0.097
Histidina	6.490	6.500	6.510	6.500	0.010	± 0.011
Lisina	1.430	1.360	1.410	1.400	0.036	± 0.041
Arginina	1.820	1.880	1.700	1.800	0.092	± 0.104

## ANEXO XI



**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS**  
**LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD**

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166  
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1350  
AREQUIPA - PERU



**INFORME DE ENSAYO**  
**Nº DE INFORME: ANA16K15.001981D**

<b>Nombre del Cliente</b>	: YENY ROXANA LAURENTE FLORES
<b>Dirección del Cliente</b>	: URB SIMON BOLIVAR MZ H LOTE 12 PUNO
<b>RUC</b>	: NO DECLARA
<b>Condición del Muestreado</b>	: POR EL CLIENTE
<b>Descripción</b>	: CONCENTRADO PROTEICO DE TARWI VAR NEGRA DE SACACATANI
<b>Tamaño de muestra</b>	: 22 g
<b>Fecha de Recepción</b>	: 16/11/2015
<b>Fecha de Inicio del Ensayo</b>	: 16/11/2015
<b>Fecha de Emisión de Informe</b>	: 19/11/2015
<b>Página</b>	: 1 de 1

## I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE PERFIL DE AMINOÁCIDOS (ug/g)	
Método Cromatográfico HPLC UV DAD	
Ácido Aspártico	4,055
Treonina	1,030
Serina	2,542
Ácido Glutámico	37,602
Prolina	0,459
Glicina	16,000
Alanina	8,000
Cisteína	29,179
Valina	7,500
Metionina	0,500
Isoleucina	9,600
Leucina	1,349
Tirosina	7,500
Fenilalanina	9,300
Histidina	6,500
Lisina	1,400
Arginina	1,800

## OBSERVACIONES:

Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL - DA

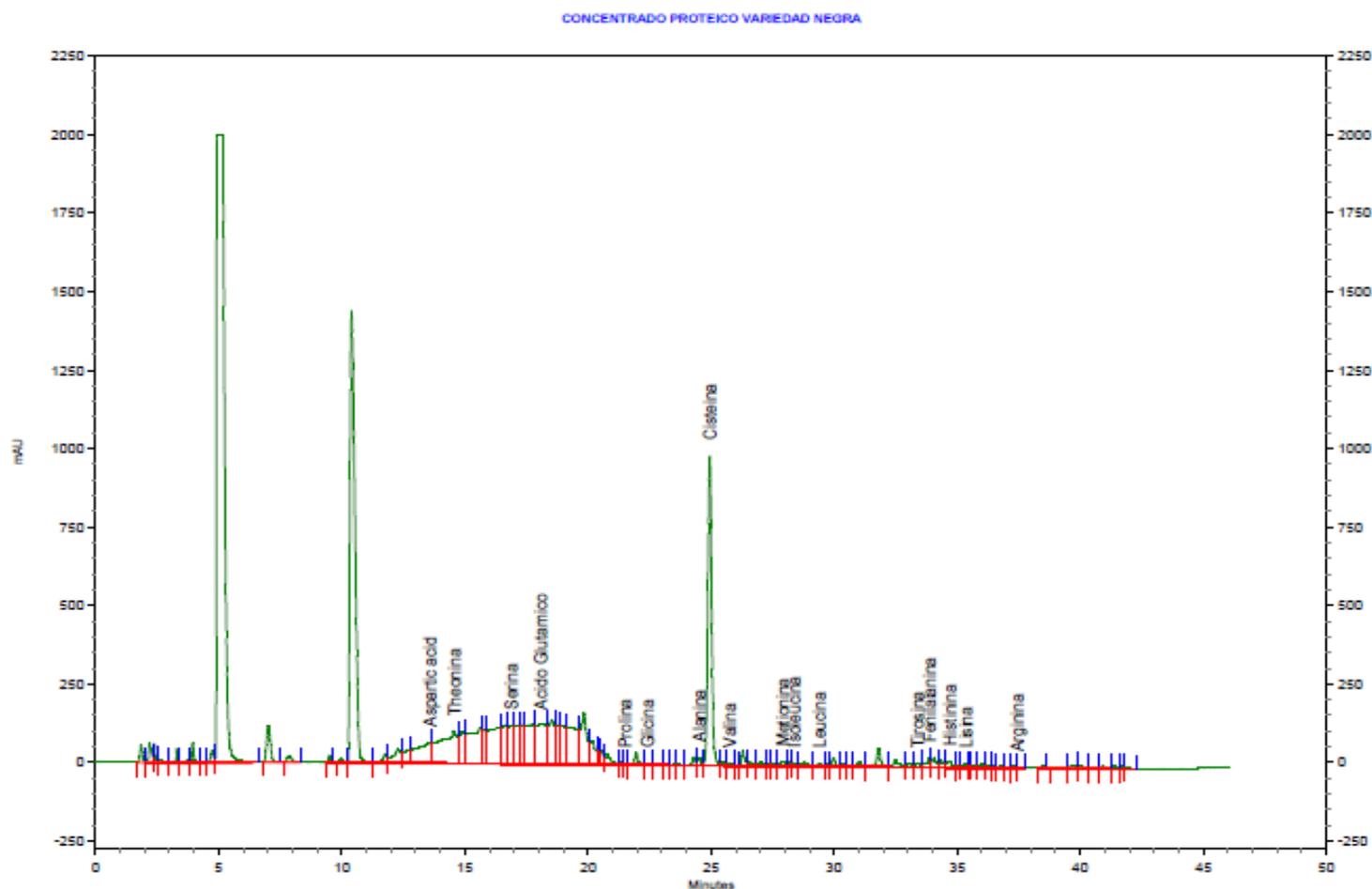
Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez  
CQFDA 00624  
JEFE DE LABORATORIO LECC



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

ANEXO XII

CROMATOGRAMA DEL PERFIL DE AMINOACIDOS DEL CONCENTRADO  
PROTÉICO DE TARWI DE LA VARIEDAD  
NEGRA DE SACACATANI



## ANEXO XIII

**PRUEBA DE DISTRIBUCION DE T-STUDENT PARA LA COMPARACION DEL PERFIL DE AMINOÁCIDOS DEL CONCENTRADO PROTEICO DE DOS VARIEDADES DE TARWI**

1) Agrupación de datos: Número de muestra, promedio y desviación estándar

(1) Negra de Sacacatani

(2) Yunguyo I

$$n_1 = 17 \quad n_2 = 17$$

$$\bar{x}_1 = 8.4892 \quad \bar{x}_2 = 8.0109$$

$$\sigma_1 = 10.3834 \quad \sigma_2 = 10.5933$$

2) Definición de la Hipótesis

**Hipótesis Nula ( $H_0$ ):** No existe diferencia significativa entre el perfil de aminoácidos entre las dos variedades de tarwi.

**Hipótesis Alternativa ( $H_1$ ):** Existe diferencia significativa entre el perfil de aminoácidos entre las dos variedades de tarwi.

Según esto, podemos plantear:

$$\left\{ \begin{array}{l} H_0 : \mu_1 = \mu_2 \\ H_1 : \mu_1 \neq \mu_2 \end{array} \right.$$

Hipótesis a probar:  $\mu_1 \neq \mu_2$

3) La prueba adecuada es la distribución t-student, utilizando la formula siguiente:

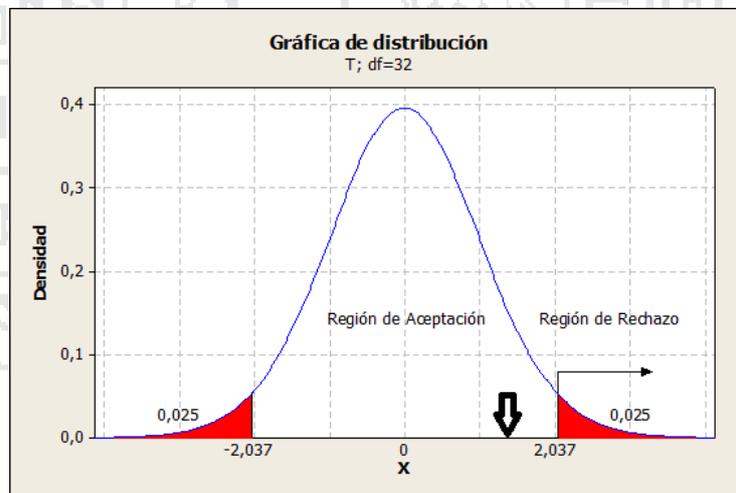
$$T_c = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1)\sigma_1^2 + (n_2 - 1)\sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

$$T_c = \frac{8.4892 - 8.0109}{\sqrt{\frac{(17 - 1)(10.3834)^2 + (17 - 1)(10.5933)^2}{17 + 17 - 2} \left( \frac{1}{17} + \frac{1}{17} \right)}} = 0.13295$$

- 4) El nivel de confianza es del 95%, donde su nivel de significancia será de  $\alpha = 5\% = 0.05$  y  $n_1 = 17$ ;  $n_2 = 17$ .
- 5) El valor de la tabla estadística, para un nivel de significancia  $\alpha = 5\% = 0.05$  y grados de libertad  $\nu = n_1 + n_2 - 2 = 17 + 17 - 2 = 32$ , se tiene:

$$t_{0.95,32} = 2.037$$

**Figura 5:** Gráfica de Distribución



Fuente: Minitab

- 6) Como  $T_c < t_{0.95;32}$   $0.13295 < 2.037$ , se encuentra en la zona de aceptación, por lo que aceptamos la Hipótesis Nula (**H<sub>0</sub>**), y rechazamos la **Hipótesis Alternativa (H<sub>1</sub>)** lo cual nos dice, que no hay diferencia significativa entre el perfil de aminoácidos entre las dos variedades de tarwi para un nivel de significancia del 5%.

ANEXO XIV

PANEL FOTOGRAFICO



**Tarwi variedad Yunguyo I**



**Tarwi variedad Negra de Sacacatani**



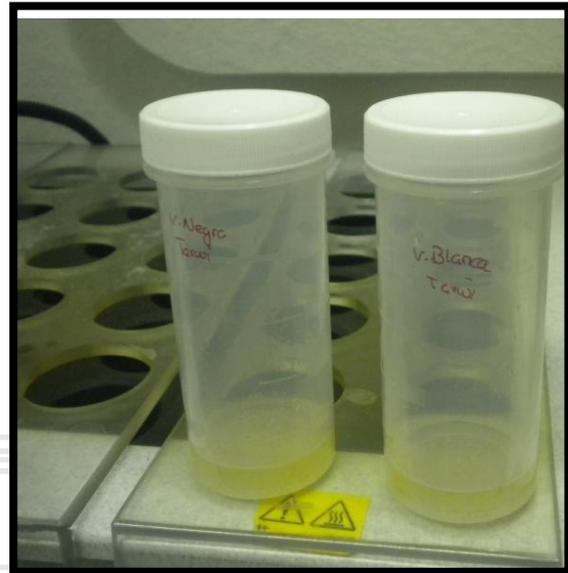
**Precipitación de proteína**



**Separación de la proteína**



**Concentrado de proteína de tarwi**



**Digestión de concentrado de proteína**



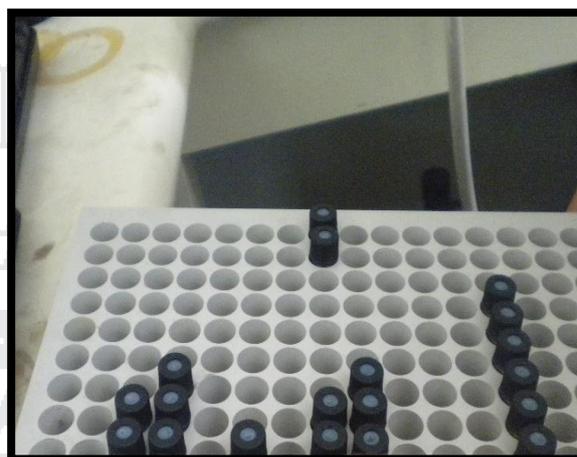
**Filtración de muestras para HPLC**



**Muestras para HPLC**



**Columna RP 18**



**Colocación de muestras en viales**



**Equipo de HPLC ELITE La Chrom versión Pump L-2130 con bomba cuaternaria de baja presión con auto inyector SIL-10AD VP con un sistema controlador SCL-10 AD VP y un detector UV SPD-10A.**