

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**



**“OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE  
PROTEÍNAS DE SEMILLAS DE PAJURO (*Erythrina edulis* Triana)”**

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

**AARÓN JOSUÉ FIGUEROA GARCÍA**

**LIMA-PERÚ**

**2023**

---

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

## Document Information

Analyzed document	TESIS.pdf (D167461177)
Submitted	2023-05-18 22:01:00
Submitted by	CHRISTIAN R. ENCINA ZELADA
Submitter email	cencina@lamolina.edu.pe
Similarity	7%
Analysis address	cencina.unalm@analysis.arkund.com

## Sources included in the report

<b>W</b>	URL: <a href="https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3802/bre%C3%B1a-diaz-daniel-...">https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3802/bre%C3%B1a-diaz-daniel-...</a> Fetched: 2023-05-18 22:02:00	 <b>41</b>
<b>W</b>	URL: <a href="http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3710/mera-oyola-lizbeth.pdf?s...">http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3710/mera-oyola-lizbeth.pdf?s...</a> Fetched: 2023-05-18 22:05:00	 <b>30</b>
<b>W</b>	URL: <a href="https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/339723/TFM_Fernandez_Bao_Sheila.pdf?sequence=1...">https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/339723/TFM_Fernandez_Bao_Sheila.pdf?sequence=1...</a> Fetched: 2023-05-18 22:04:00	 <b>1</b>

## Entire Document

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS "OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE SEMILLAS DE PAJURO (*Erythrina edulis* Triana)"

73%

**MATCHING BLOCK 1/72**

**W**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS AARÓN JOSUÉ FIGUEROA GARCÍA LIMA-PERÚ 2023 La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación (Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual) UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS "

57%

**MATCHING BLOCK 3/72**

**W**

LIMA-PERÚ 2023 La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación (Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual) UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS "OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE SEMILLAS DE PAJURO (*Erythrina edulis*, Triana)" Presentado por: AARÓN JOSUÉ FIGUEROA GARCÍA TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado:

100%

**MATCHING BLOCK 2/72**

**W**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado:

Lima-Perú 2023 \_\_\_\_\_ Mg.Sc. Carlos Elías Peñafiel PRESIDENTE \_\_\_\_\_  
Dra. Indira Betalleluz Pallardel MIEMBRO \_\_\_\_\_ Dra. Marianela Inga Guevara MIEMBRO \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ Dr. Christian Encina Zelada ASESOR \_\_\_\_\_ Mg.Sc. Victor  
Delgado Soriano CO-ASESOR

DEDICATORIA A Dios, por la vida, salud y darme las fuerzas necesarias para culminar lo propuesto. A Luis Figueroa y Noemí García, mis padres por hacer de mi alguien fuerte y enseñarme a no darme por vencido, por su apoyo y constantes muestras de aliento y cariño sincero. A Daniel Figueroa, mi hermano por ser mi motivación de superar y mejorar cada día A mi mamita Filomena Ramos, que en paz descansa, por su genuina amabilidad y cuidados en a quien siempre llevaré siempre en mi corazón.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**“OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE  
SEMILLAS DE PAJURO (*Erythrina edulis* Triana)”**

Presentado por:

**AARÓN JOSUÉ FIGUEROA GARCÍA**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado:

---

Mg.Sc. Carlos Elías Peñafiel  
PRESIDENTE

---

Dra. Indira Betalleluz Pallardel  
MIEMBRO

---

Marianela Inga Guevara, PhD.  
MIEMBRO

---

Dr. Christian Encina Zelada  
ASESOR

---

Mg.Sc. Víctor Delgado Soriano  
CO-ASESOR

Lima-Perú

2023

## **DEDICATORIA**

A Dios, por la vida, salud y darme las fuerzas necesarias para culminar lo propuesto.

A Luis Figueroa y Noemí García, mis padres por hacer de mí alguien fuerte y enseñarme a no darme por vencido, por su apoyo y constantes muestras de aliento y cariño sincero.

A Daniel Figueroa, mi hermano por ser mi motivación de superar y mejorar cada día

A mi mamita Filomena Ramos, que en paz descansa, por su genuina amabilidad y cuidados en a quien siempre llevaré siempre en mi corazón.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Asesor, el profesor Christian Encina por el apoyo brindado, las recomendaciones y el permitirme ampliar mis conocimientos en estadística de la investigación.

A mi Co-asesor, el profesor Víctor Delgado por el apoyo, recomendaciones y paciencia durante todo el periodo de la investigación, de quién tuve el agrado de aprender mucho durante mi estadía en la universidad.

A los técnicos de los laboratorios de la Facultad de Industrias Alimentarias de la UNALM, Erick, Madeleine, Sandra, la Ing. Liz Ávila, el señor Juan del TAPA.

A Milagros Malca, por su apoyo, muestras de ánimo y actitud que me permitieron seguir avanzando hasta culminar lo propuesto.

A Santiago Flores, su gran amistad, apoyo e incentivos de mejora que fueron un soporte en mi desarrollo profesional.

A Katty Onofre, por el gran apoyo brindado, los gratos momentos de estudio compartidos y de quién tuve la oportunidad de aprender.

A los amigos que pude hacer en la universidad, y contribuyeron en mi desarrollo profesional.

# ÍNDICE GENERAL

## RESUMEN

## ABSTRACT

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1. PAJURO .....	3
2.1.1. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA .....	4
2.1.2. DISTRIBUCIÓN .....	5
2.1.3. CONSUMO Y USOS .....	6
2.1.4. SEMILLA .....	7
2.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS .....	8
2.2.1. MÉTODO ALCALINO CON PRECIPITACIÓN ISOELÉCTRICA .....	8
2.3. FACTORES QUE AFECTAN LA EXTRACCIÓN PROTEICA .....	9
2.3.1. TEMPERATURA .....	9
2.3.2. TIEMPO .....	9
2.3.3. pH .....	10
2.3.4. CONCENTRACIÓN DE SAL .....	10
2.3.5. TAMAÑO DE PARTÍCULA .....	10
2.3.6. VELOCIDAD DE AGITACIÓN .....	11
2.3.7. RELACIÓN MATERIA PRIMA – SOLVENTE .....	11
2.3.8. TIPO DE SOLVENTE .....	11
2.4. PROPIEDADES TECNO-FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS .....	13
2.4.1. SOLUBILIDAD .....	13
2.4.2. CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE ACEITE (CAA) .....	13
2.4.3. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA) .....	14
2.4.4. CAPACIDAD EMULSIFICANTE (CE) .....	14
2.4.5. CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE ESPUMA (CFE) Y ESTABILIDAD (EES) .....	14
2.5. DISEÑOS FACTORIALES FRACCIONADOS .....	15
2.5.1. EFECTO .....	16
2.5.2. ORTOGONALIDAD .....	17
2.5.3. RESOLUCIÓN .....	18
2.5.4. DISEÑOS FRACCIONADOS $2^{k-p}$ .....	18

2.5.5. CONSIDERACIONES A TENER EN CUENTA EN DISEÑOS FRACCIONADOS .....	19
2.6. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA (MSR) .....	20
2.6.1. COMPONENTES DE LA MSR .....	20
2.6.2. MODELOS EMPLEADOS EN LA MSR .....	21
2.6.3 ETAPAS DE OPTIMIZACIÓN .....	23
2.6.4. DISEÑOS DE SEGUNDO ORDEN .....	24
<b>III. METODOLOGÍA .....</b>	<b>25</b>
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN .....	25
3.2. MATERIA PRIMA .....	25
3.3. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS .....	25
3.3.1. EQUIPOS .....	25
3.3.2. MATERIALES .....	26
3.3.3. REACTIVOS .....	26
3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS .....	27
3.4.1. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL .....	27
3.4.2. PROTEÍNA SOLUBLE .....	27
3.4.3. PROPIEDADES TECNO-FUNCIONALES DEL AISLADO PROTEICO .....	28
3.4.4. EXTRACCIÓN .....	31
3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	31
3.5.1. OBTENCIÓN DE LA HARINA DE SEMILLAS DE PAJURO .....	31
3.5.2. EXTRACCIÓN ALCALINA .....	34
3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	36
3.6.1. ETAPA 1: CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DE SEMILLAS DE PAJURO .....	37
3.6.2. ETAPA 2: DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES Y PARÁMETROS QUE MAXIMIZAN EL PORCENTAJE DE PROTEÍNA SOLUBLE RECUPERADO .....	37
3.6.3. ETAPA 3: CARACTERIZACIÓN DEL AISLADO PROTEICO .....	39
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	39
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>40</b>
4.1. ETAPA 1: CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DE SEMILLAS DE PAJURO .....	40
4.1.1. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL .....	40

4.2. ETAPA 2: DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES Y PARÁMETROS QUE MAXIMIZAN LA RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES.....	43
4.2.1. SCREENING .....	43
4.2.2. OPTIMIZACIÓN .....	52
4.2.3. VALIDACIÓN DEL MODELO .....	58
4.3. ETAPA 3: CARACTERIZACIÓN DEL AISLADO PROTEICO .....	59
4.3.1. PROPIEDADES TECNO-FUNCIONALES .....	59
4.3.2. ÍNDICE DE BLANCURA (IB).....	70
4.3.3. COMPOSICIÓN, RECUPERACIÓN PROTEICA Y RENDIMIENTO DEL AISLADO PROTEÍCO DE SEMILLAS DE PAJURO.....	71
4.3.4. USOS RECOMENDADOS DEL AISLADO PROTEICO DE SEMILLAS DE PAJURO .....	72
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>73</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>75</b>
<b>VIII. ANEXOS.....</b>	<b>91</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición químico proximal de las semillas <sup>a</sup> y harina de pajuro <sup>b</sup> .....	7
Tabla 2: Condiciones de extracción que maximizan la extracción de proteína en diferentes fuentes vegetales.....	12
Tabla 3: Dos posibles diseños fraccionados $2^{3-1}$ .....	17
Tabla 4: Efectos en los diseños factoriales $2^k$ .....	19
Tabla 5: Factores y sus niveles utilizados en la etapa de <i>screening</i> .....	38
Tabla 6: Número y combinaciones evaluadas. ....	38
Tabla 7: Factores y sus niveles evaluados en la etapa de Optimización .....	39
Tabla 8: Análisis químico proximal de la harina de semillas de pajuro.....	40
Tabla 9: Respuesta experimental (observado) y estimado en la etapa de <i>screening</i> .....	43
Tabla 10: Resultados del Análisis de Varianza del diseño fraccionado $2^{6-3}$ utilizado en la etapa de <i>screening</i> .....	44
Tabla 11: Diseño Box-Behnken, respuesta experimental (observado) y estimado en la etapa de Optimización.....	53
Tabla 12: Resultados del Análisis de Varianza del modelo cuadrático en la etapa de Optimización .....	55
Tabla 13: Valor predicho y experimental del porcentaje de recuperación de proteínas solubles bajo condiciones óptimas .....	59
Tabla 14: Prueba T- <i>Student</i> para la etapa de Validación.....	59
Tabla 15: Composición del aislado proteico, rendimiento y recuperación proteica de extracción.....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vainas de Pajuro (A); Árbol (B) .....	3
Figura 2: Semillas de pajuro .....	4
Figura 3: Distribución geográfica de <i>Erythrina edulis</i> Triana en Sudamérica.....	5
Figura 4: Distribución geográfica de <i>Erythrina edulis</i> Triana en el Perú .....	6
Figura 5: Representación de los diseños fraccionados $2^{3-1}$ .....	16
Figura 6: Superficies de respuesta: a) descrita por un modelo de primer orden; b), c) y d) descritas por modelos de segundo orden .....	22
Figura 7: Flujograma de operación para la obtención de harina de semillas de pajuro .....	33
Figura 8: Flujograma de operación para la obtención de aislado proteico de semillas de pajuro .....	35
Figura 9: Esquema experimental desarrollado .....	36
Figura 10: Diagrama de Pareto de los efectos principales durante la extracción de proteínas solubles en la etapa de <i>screening</i> .....	45
Figura 11: Gráficos de diagnóstico para la comprobación de la adecuación del modelo. Gráfico de probabilidad normal (a), los residuos frente al número de ejecuciones (b), y la predicción frente a la realidad (c).....	54
Figura 12: Gráficos de las superficies de respuesta y contornos para los efectos de: Temperatura vs Tiempo (a); MP/S vs Tiempo (b) y Temperatura vs MP/Solvente (c) .....	57
Figura 13: Variación de la CFE del aislado de proteína de pajuro a diferentes pH .....	60
Figura 14: Variación de la EES (%) del aislado de proteína de pajuro en el tiempo (min) a diferentes pH.....	62
Figura 15: Variación de la CRA (g H <sub>2</sub> O/g aislado) a diferentes pH .....	64
Figura 16: Variación de la solubilidad del aislado de proteína pajuro a diferentes pH.....	66

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: CURVA ESTÁNDAR DE ALBÚMINA DE SUERO BOVINA.....	91
ANEXO 2: ESTABILIDAD DE ESPUMA LUEGO DE 50 min.....	91
ANEXO 3: CAPACIDAD DE EMULSIFICACIÓN.....	92
ANEXO 4: USO DEL MOLINO ROTOR PARA LA MOLIENDA DE PAJURO.....	92
ANEXO 5: EXTRACCIÓN PROTEICA DE LA HARINA DE SEMILLAS DE PAJURO .....	92
ANEXO 6: PROTEÍNA SOLUBILIZADA LISTA PARA LA PRECIPITACIÓN.....	93
ANEXO 7: SOLUCIÓN PROTEICA AJUSTADA A pH ISOELÉCTRICO .....	93
ANEXO 8: COÁGULO PROTEICO LUEGO DE SER CENTRIFUGADO.....	93
ANEXO 9: ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS A LIOFILIZAR.....	94
ANEXO 10: MUESTRA ANTES Y DESPUÉS DEL SECADO POR LIOFILIZACIÓN	94
ANEXO 11: CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE PROTEÍNA SOLUBLE RECUPERADO EN LA ETAPA DE <i>SCREENING</i> .....	95
ANEXO 12: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL DISEÑO FRACCIONADO 2 <sup>6-3</sup> UTILIZADO EN LA ETAPA DE <i>SCREENING</i> .....	96
ANEXO 13: CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE PROTEÍNA SOLUBLE RECUPERADO EN LA ETAPA DE OPTIMIZACIÓN.....	97
ANEXO 14: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL MODELO CUADRÁTICO EN LA ETAPA DE OPTIMIZACIÓN.....	100
ANEXO 15: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE ESPUMA (CFE).....	101
ANEXO 16: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA ESTABILIDAD DE ESPUMA (EES) DESPUES DE 2 h .....	101
ANEXO 17: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA CAPACIDA DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA).....	102
ANEXO 18: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA SOLUBILIDAD.....	102

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar las condiciones óptimas de extracción de proteínas de semillas de pajuro (*Erythrina edulis* Triana). La optimización fue llevada a cabo en tres etapas. La primera etapa consistió en realizar el *screening* considerando seis factores (tiempo, velocidad de agitación, temperatura, relación materia prima/solvente (MP/S), pH y concentración de NaCl) mediante un diseño fraccionado  $2^{k-3}$  (k=6) con el objetivo de evaluar los efectos de los mismos sobre la extracción de proteína expresada en g de proteína soluble/g de proteína total. Siendo tres los factores significativos: tiempo, temperatura y relación MP/S. La segunda etapa consistió en optimizar la extracción proteica mediante el uso de un diseño Box-Behnken por el cual se generó un modelo de segundo orden con un coeficiente de determinación  $R^2=0.9976$ . Las condiciones óptimas obtenidas para la relación MP/S, temperatura y tiempo fueron 1/49 g/mL, 23 °C y 16 min, respectivamente. En la tercera etapa se validó el modelo obtenido con la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR). El porcentaje de recuperación de proteína soluble fue de 92.70 por ciento no mostrando diferencias significativas respecto al valor teórico (92.87), así mismo el rendimiento proteico del proceso fue 12.22 por ciento. Finalmente, se realizaron pruebas de caracterización tecno-funcional al aislado proteico obtenido, cuyos resultados fueron: capacidad de formación de espuma, 103.33 por ciento a pH 8; estabilidad máxima de espuma, 60.88 por ciento a pH 6; capacidad de retención de agua, 3.53 g H<sub>2</sub>O/g aislado a pH 8; solubilidad máxima, 43.64 por ciento a pH 8; capacidad de absorción de aceite, 2.4 aceite/g aislado; capacidad de emulsificación, de 68.67 por ciento; estabilidad de emulsificación, 91.30 por ciento e índice de blancura, 75.35 por ciento. Las condiciones de optimización obtenidas fueron favorables obteniéndose un aislado proteico con 92.45 por ciento de pureza.

**Palabras clave:** Pajuro, proteína, optimización, extracción, rendimiento, MSR.

## ABSTRACT

The objective of the present research was to evaluate the optimal conditions for the extraction of proteins from pajuro seeds (*Erythrina edulis* Triana). The optimization was carried out in three phases. The first phase was to screen six factors (time, agitation speed, temperature, flour/solvent ratio (MP/S), pH and NaCl concentration) using a  $2^{k-3}$  fractional design (k=6) with aimed of evaluating their effects on protein extraction expressed in g soluble protein/g total protein. Being three the significant factors: time, temperature and MP/S ratio. The second phase consisted of optimizing protein extraction by using Box-Behnken design was applied which was generated by a second order model with a coefficient of determination  $R^2= 0.9976$ . The optimal conditions obtained for the MP/S ratio, temperature and time were 1/49 g/mL, 23 °C and 16 min, respectively. In the third phase, the model obtained with the Response Surface Methodology (MSR) was validated. The percentage of soluble protein recovery was 92.70, showing no significant differences with respect to the theoretical value (92.87), likewise, the protein yield of the process was 12.22 percent. Finally, characterization tests were carried out on the protein isolate obtained, whose results were: foaming capacity, 103.33 percent at pH 8; maximum foam stability, 60.88 percent at pH 6; water holding capacity, 3.53 g H<sub>2</sub>O/g isolate at pH 8; maximum solubility, 43.64 percent at pH 8; oil absorption capacity, 2.4 g oil/g isolate; emulsification capacity, 68.67 percent; emulsification stability, 91.30 percent and whiteness index, 75.35 percent. The optimization conditions obtained were favorable, obtaining a protein isolate with 92.45 percent purity.

**Keywords:** Pajuro, protein, optimization, extraction, yield, MSR

## I. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años conceptos como seguridad alimentaria, sostenibilidad ambiental y alimentación saludable han pasado a ser temas de importancia para la humanidad, y es que la población mundial ha crecido a un ritmo preocupante desde principios del presente siglo y se pronostica que la demanda de proteínas animales se cuadruplicará para el año 2050 lo que plantea preocupaciones sobre la gestión de alimentos y el desarrollo sostenible (FAO, 2017; Bessada *et al.*, 2019; Ahmed *et al.*, 2021; Delgado-Soriano *et al.*, 2022).

Por otro lado, las alternativas de origen vegetal están cobrando impulso a tal punto que actualmente cubren dos tercios de todas las proteínas dietéticas del planeta, debido a la tendencia de los consumidores a reducir o evitar el consumo de productos de origen animal en sus dietas por motivos medioambientales, éticos y/o de salud; siendo las legumbres una buena alternativa debido a su contenido de proteínas y otros nutrientes (Delgado-Soriano *et al.*, 2020; Adeva-Andany *et al.*, 2022; Baune *et al.*, 2022).

Las semillas de pajuro (*Erythrina edulis* Triana), representan, por lo tanto, una alternativa de consumo dado su alto contenido proteico (20 por ciento) y la presencia de aminoácidos esenciales (Delgado, 2018; Palma-Albino *et al.*, 2021). Sin embargo, aunque estas semillas pueden ser una fuente alimenticia importante, su consumo y comercialización se ve limitada por el desconocimiento de su existencia, siendo conocido en su mayoría por lugareños cercanos a la zona de cultivo (Escamilo, 2012).

En la literatura es posible encontrar resultados de investigaciones respecto a la extracción alcalina de proteínas de semillas de pajuro (Orihuela, 2017; Arango *et al.*, 2012) obtención de péptidos bioactivos (Guerra-Almonacid *et al.*, 2019; Palma-Albino *et al.*, 2021), hidrolizadoproteicos (Villafuerte *et al.*, 2019) y evaluación de la calidad proteica *in vivo* (Pérez, 1979; Delgado-Soriano *et al.*, 2022). Sin embargo, no existe evidencia científica sobre la optimización de los factores, parámetros idóneos y exclusivos para la extracción de

proteínas de pajuro y de su caracterización tecno-funcional proteica que pueda dar indicios de su campo de aplicación.

Por todo lo antes mencionado, el objetivo principal de la presente investigación fue:

- Optimizar el proceso de extracción de proteínas de semillas de pajuro (*Erythrina edulis* Triana).

Así también, los objetivos secundarios o específicos fueron:

- Determinar la composición químico proximal de la harina de semillas de pajuro.
- Determinar las propiedades tecno-funcionales del aislado proteico resultante.
- Determinar el índice de blancura de la harina y aislado proteico resultante.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. PAJURO

El pajuro (*Erythrina edulis* Triana) es una planta de naturaleza leñosa con presencia de vainas tal y como lo muestra la Figura 1; pertenece taxonómicamente a la familia *Fabaceae* (Escamilo, 2012; GBIF (*Global Biodiversity Information Facility*) *Backbone Taxonomy*, 2022). Entre las diferentes especies de esta planta la *Erythrina edulis* Triana es la única especie comestible (Delgado-Soriano *et al.*, 2022; Velásquez *et al.*, 2019).

En Perú recibe el nombre de basul, pajuro, antiporoto, pashuro, pashigua, poroto, anteporoto, y pisonay; en Venezuela es conocido como: frijol mompás balú, y bucaré; en Ecuador recibe el nombre de guato, sachaporoto, zapote de cerro, frijol de monte, pashullo, poroto y porotón; en Colombia como balú, baluy, chaporuto, sachafrito y en Bolivia se le dice sachahabas (Acero, 2002).



**Figura 1: Vainas de Pajuro (A); Árbol (B)**

FUENTE: GBIF *Backbone Taxonomy* (2022)

Aunque antiguamente el pajuro era muy consumido, en las últimas décadas ha sido considerado un cultivo subutilizado (término que hace referencia a aquellos cultivos con poca comercialización y consumo, con importancia en el pasado, pero que en la actualidad

no tienen el mismo impacto), debido a que el conocimiento sobre el mismo (presente en la población de antaño) se ha ido perdiendo y como consecuencia la población actual carece de información para poder darle un adecuado uso (Escamilo, 2012; Pastor *et al.*, 2006). La Figura 2 presenta las semillas de pajuro.



**Figura 2: Semillas de pajuro**

FUENTE: Delgado-Soriano *et al.* (2022)

### 2.1.1. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA

Según el GBFI *Backbone Taxonomy* (2022) el pajuro presenta la siguiente clasificación botánica:

Reino: *Plantae*

Filo: *Tracheophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Fabales*

Familia: *Fabaceae*

Género: *Erythrina* L.

Especie: *Erythrina edulis*, Triana

Nombre común: “Pajuro”, “Poroto”, “Chachafruto”.

### 2.1.2. DISTRIBUCIÓN

Es una especie originaria de la zona subandina encontrado usualmente cerca a los cafetales, es originario de Sudamérica y parte de Centroamérica tal y como lo muestra la Figura 3, comprendiendo los siguientes países: Colombia, Ecuador, Perú y Panamá a una altura comprendida entre los 1500 a 1700 m.s.n.m. (GBFI *Backbone Taxonomy*, 2022; Tapia y Fries, 2007; Velásquez *et al.*, 2019).

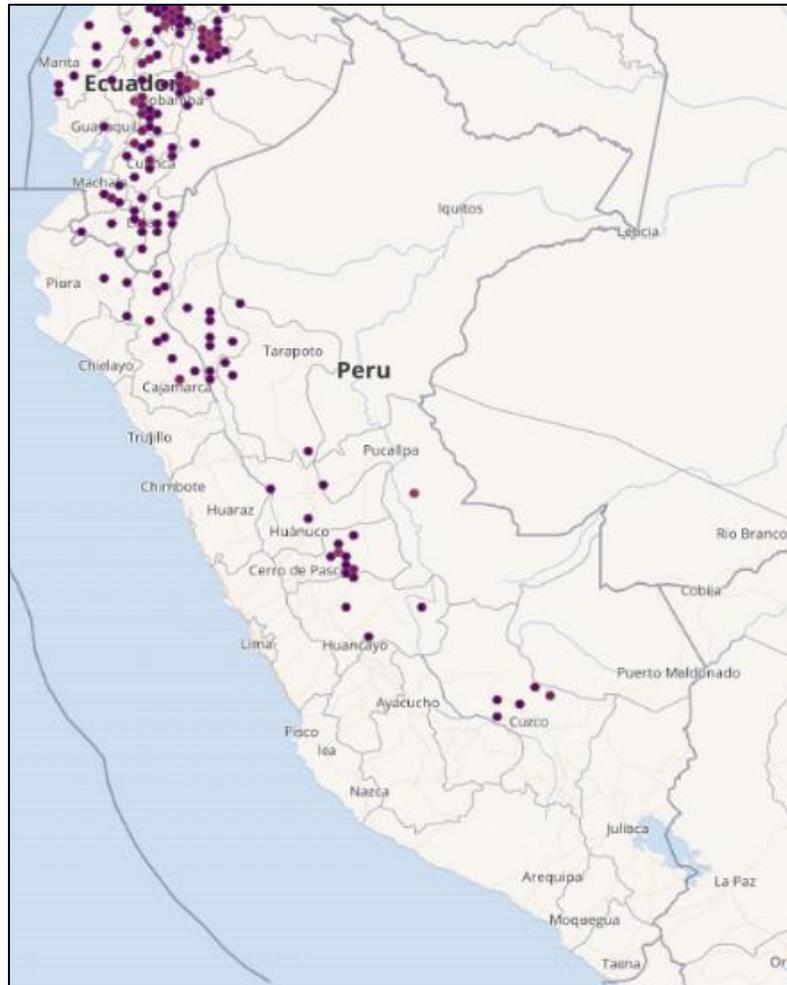


**Figura 3: Distribución geográfica de *Erythrina edulis* Triana en Sudamérica**

FUENTE: GBFI *Backbone Taxonomy* (2022)

En el Perú se han encontrado restos sembrados por los Incas en las zonas andinas, así mismo se ha reportado su cultivo en los departamentos de Amazonas, San Martín, Cajamarca, La Libertad, Ancash, Huánuco, Junín, Pasco, Apurímac, Ayacucho y Cuzco, tal y como lo

muestra la Figura 4; sin embargo, en muchos de los departamentos mencionados tanto su consumo y cultivo han disminuido debido a la pérdida de conocimiento sobre este árbol (Aredo *et al.*, 2017; GBFI *Backbone Taxonomy*, 2022; MINAGRI, 2010; Velásquez *et al.*, 2019).



**Figura 4: Distribución geográfica de *Erythrina edulis* Triana en el Perú**

FUENTE: GBIF *Backbone Taxonomy* (2022)

### 2.1.3. CONSUMO Y USOS

Barrera y Mejía (1998) mencionan que existe evidencia de preparaciones con pajuro (semilla) en Cauca (Colombia) por parte de la población adulta-anciana en platos como pajuro sancochado con sal, sopa y arepas, añaden que, la población joven por lo general desconoce de la preparación de platos en base a pajuro. En Perú se ha reportado el consumo de pajuro (semilla) entre las zonas de Huamachuco y Cajamarca en entradas (solterito, ensaladas con palta, ensaladas con brócoli y zanahoria), sopas (sopa con pajuro licuado, sopa

de pajuro con hierbas, crema de pajuro acompañado de pan tostado), platos de fondo (pajuro guisado con arroz, torreja de pajuro, croquetas de pajuro con carne molida, puré de pajuro), platos dulces (mazamorra de pajuro endulzado con chancaca, dulce de pajuro) y bebidas (refresco de pajuro y chicha de pajuro) (Escamilo, 2012).

Entre otros usos reportados se encuentran los siguientes: en la medicina tradicional, al tratar diversas afecciones, tales como: quemaduras del arco, hemorroides, abscesos, úlceras, sífilis, diarrea, hepatitis, gonorrea, lepra, dermatitis, migraña, infecciones urinarias, respiratorias, de ojos, piel y garganta; finalmente se ha reportado su uso como fuente de proteínas para los animales, proveedor de nitrógeno al suelo, barreras cortavientos y fuente de leña a partir del tronco de la planta (Delgado-Soriano *et al.*, 2022; Padilla, 1995; Velásquez *et al.*, 2019).

#### 2.1.4. SEMILLA

##### a. COMPOSICIÓN QUÍMICO PROXIMAL

Las semillas de pajuro destacan principalmente por su bajo contenido en grasas y su notable contenido de proteínas, tal y como se aprecia en la Tabla 1.

**Tabla 1: Composición químico proximal de las semillas<sup>a</sup> y harina de pajuro<sup>b</sup>**

Componente (%)	Semilla <sup>1</sup>	Harina <sup>1</sup>
Proteína cruda	21.10±0.12	21.7±0.04
Fibra	2.86±0.03	-
Ceniza	4.91±0.19	2.69±0.03
Grasa	0.54±0.02	3.01 ±0.01
Carbohidratos	70.59±0.20	72.60±0.03

<sup>1</sup>Expresado como el promedio ± desviación estándar (DS)

FUENTE: Delgado-Soriano *et al.* (2022)<sup>a</sup> y Silva *et al.* (2015)<sup>b</sup>

Otros autores destacan el valor proteico del pajuro y reportan valores que oscilan entre 18.30 a 24.2 por ciento (Delgado, 2018., 2013; Silva *et al.*, 2015).

## **2.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

Existen numerosos métodos de extracción que tienen como objetivo separar la proteína de otras sustancias que no son de interés y para llevarlo a cabo se hace uso de principios físico-químicos tales como el pH de solubilización, el tamaño de partícula (ultrafiltración), la afinidad hacia ciertas enzimas, entre otros (Castel, 2010).

Dependiendo de la pureza de la proteína extraída estas pueden denominarse concentrados o aislados; un aislado proteico es definido como aquel material caracterizado por contener entre 90-95 por ciento de proteínas; mientras que un concentrado de 25-89 por ciento (Poveda, 2013). Para llegar al contenido proteico requerido como mínimo, se suele eliminar de los concentrados proteicos los polisacáridos, los oligosacáridos residuales y algunas otras sustancias ajenas a las proteínas usualmente mediante el uso de solventes a fines a los mismos con poca afinidad a la proteína (Fennema *et al.*, 2010). Los aislados proteicos provenientes de leguminosas aún pueden contener ciertos compuestos de bajo peso molecular como saponinas, fosfolípidos, isoflavonas y algunos glucósidos (Badui, 2013); por esa razón se recomienda que para que sean incorporados como ingredientes en la alimentación humana los aislados proteínicos deben de contener una baja presencia de compuesto antinutricionales, fibra cruda, alto valor biológico, digestibilidad y una composición balanceada de aminoácidos (Bonino *et al.*, 2016; Delgado, 2018).

### **2.2.1. MÉTODO ALCALINO CON PRECIPITACIÓN ISOELÉCTRICA**

#### **a. PRIMERA ETAPA**

La extracción por este método tiene como primera etapa solubilizar las proteínas en medio alcalino a fin de favorecer su separación del resto de compuestos no solubles como es el caso de los glúcidos insolubles, posteriormente la proteína solubilizada es separada por centrifugación siendo la fracción inferior de consistencia pastosa la que se desecha (Hadnadjev *et al.*, 2017). Badui (2013) menciona que los factores que intervienen en esta etapa son: proporción entre solvente, temperatura, tiempo, y el pH del medio.

## **b. SEGUNDA ETAPA**

El extracto obtenido en la etapa anterior se acidifica a pH isoelectrico, esta acción permite que la mayor parte de la proteína precipite y se separe del suero por centrifugación, como operación posterior la proteína purificada es lavada y neutralizada con NaOH para su resolubilización (Badui, 2013). Una alternativa a la precipitación isoelectrica es la separación por ultrafiltración en la cual las moléculas solubles no proteicas de bajo peso molecular atraviesan la membrana y constituyen el permeado, mientras que las proteínas son retenidas; el principal beneficio de esta técnica es que permite recuperar no solo las proteínas insolubles en el punto isoelectrico sino también las solubles y preservar de mejor forma las propiedades tecno-funcionales de las mismas (Hadnadjev *et al.*, 2017).

Para obtener aislados proteicos en forma de polvo, se debe eliminar la mayor cantidad de agua posible siendo la liofilización y la atomización alternativas de secado (Breña, 2018; Bonino, *et al.*, 2016).

## **2.3. FACTORES QUE AFECTAN LA EXTRACCIÓN PROTEICA**

### **2.3.1. TEMPERATURA**

El incremento de temperatura durante la extracción puede mejorar las propiedades de solubilidad, emulsión y espuma, sin embargo, en muchos casos dicho incremento puede dificultar la extracción e incluso desnaturalizar la proteína si la temperatura es demasiada alta (>70 °C) (Badui, 2013; Preece *et al.*, 2017). En procesos de extracción de proteína vegetal se reportan valores óptimos de extracción en el rango de 21-50 °C (Mera, 2018; Mercado *et al.*, 2015; Molina, 2018) lo cual sugiere un comportamiento variado por parte de la proteína proveniente de diferentes fuentes.

### **2.3.2. TIEMPO**

Los tiempos de extracción proteica son variables y ejercen impacto en la cantidad de proteína extraída debido a que una mayor magnitud del mismo favorece una mayor difusión de la

proteína al solvente (Geankoplis, 2018). Generalmente se suele buscar el tiempo en el cual se pueda extraer la máxima cantidad de proteínas al menor costo posible (Badui, 2013).

### **2.3.3. pH**

Es uno de los factores más importantes pues de este depende la solubilización y precipitación; cada proteína es diferente y presenta pH de solubilidad y precipitación diferentes, sin embargo, para el caso de los vegetales los valores de solubilización oscilan entre pH alcalinos mientras que los de precipitación en pH ácidos (Fennema *et al.*, 2010). El tratamiento alcalino en proteínas vegetales busca no solo solubilizar las proteínas sino también aumentar el potencial tecnológico y mejorar las propiedades tecno-funcionales (Badui, 2013).

Si el pH es demasiado elevado puede ser negativo y se pueden generar impactos negativos como la hidrólisis de las proteínas, racemización de aminoácidos, formación de compuestos tóxicos como la lisinoalanina, pérdida de aminoácidos esenciales y disminución del valor nutritivo (Luna, 2019).

### **2.3.4. CONCENTRACIÓN DE SAL**

Son dos los efectos que pueden ejercer las sales al estar en contacto con las proteínas: producir interacciones electrostáticas con los residuos de aminoácidos cargados los cuales pueden tener un efecto positivo aumentando la solubilidad de las proteínas siempre y cuando la concentración sea baja, este efecto es denominado “*salting in*” y depende del tipo de sal y la naturaleza de la proteína; como segundo efecto se encuentra el efecto “*salting out*” que causa la precipitación de las proteínas del medio cuando la concentración de sal es alta (Fennema *et al.*, 2010).

### **2.3.5. TAMAÑO DE PARTÍCULA**

Cuando el tamaño de partícula disminuye el área de contacto incrementa y se convierte en un factor favorable de extracción, sin embargo, se tiene que considerar que un tamaño

excesivamente pequeño puede causar el apelmazamiento de los sólidos dificultando la extracción (Ramírez *et al.*, 2016; Sari *et al.*, 2015).

### **2.3.6. VELOCIDAD DE AGITACIÓN**

La velocidad de agitación tiene efecto en procesos de extracción, si esta incrementa, el coeficiente de materia en la interfase sólido-líquido también lo hará ocasionando una mayor transferencia de masa y mejores resultados de extracción; así mismo esta operación evita la sedimentación y conglomeración de las partículas sólidas presentes (Ramírez *et al.*, 2016; Vega *et al.*, 2017).

### **2.3.7. RELACIÓN MATERIA PRIMA – SOLVENTE**

La cantidad de solvente debe ser aquella que permita la solubilización de todas las proteínas presentes de tal forma que se evite la saturación, una correcta relación propiciará una transferencia de masa adecuada mejorando el rendimiento de extracción, así mismo se debe considerar también que este factor no sigue un comportamiento lineal (Badui, 2013; Fennema *et al.*, 2010).

### **2.3.8. TIPO DE SOLVENTE**

Usualmente el solvente más usado en extracción proteica es el agua con adición de NaOH para llegar a pH alcalino, entre sus beneficios se encuentran que a comparación de los alcoholes no es inflamable, explosivo o tóxico, sin embargo, existe la desventaja de que el álcali restante necesita ser lavado completamente del producto final, lo que lleva a la generación de una gran cantidad de aguas residuales por ello se está en búsqueda de solventes menos contaminantes (Tan *et al.*, 2011). Otros tipos de solventes son: tris HCl, etanol, fenol, ácido acético, ácido glacial acético y acetato de amonio (Martínez *et al.*, 2013).

La Tabla 2 presenta condiciones óptimas de extracción para proteínas de diferentes fuentes vegetales. Los rendimientos de extracción dependen de las condiciones de extracción, y llegar a la condición óptima es el objetivo buscado por diferentes investigadores, solo para el caso puntual de la harina de sacha inchi se usó una solución de 1.65 M de NaCl.

**Tabla 2: Condiciones de extracción que maximizan la extracción de proteína en diferentes fuentes vegetales**

Materia prima	Extracción						Precipitación	Recuperación de proteína Soluble (S) Proceso (P) %
	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Tamaño de partícula (µm)	Relación MP/S	Velocidad de agitación (RPM)	pH	
Pajuro <sup>(1)</sup>	9	60	90	-	1/10	-	4.5	14.73 (P)
Pajuro <sup>(2)</sup>	-	-	60	-	1/40	-	-	62.00 (S)
Cañihua <sup>(3)</sup>	11	21	5	<500	1/37	200	-	88.15 (S)
Sacha Inchi <sup>(4)</sup>	9.5	54	15	<500	1/42	250	-	30.23 (P)
Tarwi <sup>(5)</sup>	10.5	50	60	<300	1/25	-	4.6	57.80 (P)
Quinoa blanca <sup>(6)</sup>	9	50	60	<250	1/10	-	5	89.88 (S)
Quinoa Roja <sup>(7)</sup>	8	50	60	<250	1/10	-	3	83.62 (S)
Arveja <sup>(8)</sup>	8	-	60	-	1/10	400	6	-
Lenteja <sup>(9)</sup>	8	23	60	-	1/9	-	4.2	14.50 (P)
Soya <sup>(10)</sup>	10.2	Ambiente	30	850	1/9	200	-	-
Garbanzo <sup>(11)</sup>	11.5		60	-	1/10	-	4.5	-
Maní <sup>(12)</sup>	8.5	45	40	-	1/7	-	-	85.29 (S)
Pallar <sup>(13)</sup>	8	Ambiente	60	-	1/10	-	6	32.58 (P)
Haba <sup>(14)</sup>	9	50	60	200	1/10	-	4.5	13.00 (P)
Frijol mungo <sup>(15)</sup>	8.97	31.74	33.24	-	1/10	-	4.4	77.60 (S)

FUENTE: (1) Orihuela (2017); (2) Arango *et al.* (2012); (3) Mera (2018); (4) Aquino (2015); (5) Breña (2018); (6) (7) Molina (2018); (8) Vallejos (2018); (9) Jarpa-Parra *et al.* (2014); (10) Yongjae *et al.* (2015); (11) Yu-Wei *et al.* (2015); (12) Ismail *et al.* (1991); (13) Tello (2018); (14) Flores *et al.* (2016); (15) Wang *et al.* (2011).

## 2.4. PROPIEDADES TECNO-FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS

Las características tecno-funcionales de las proteínas dependen de las propiedades físicas y químicas que se afectan durante el procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo del alimento; estas propiedades son una manifestación de dos aspectos moleculares de las proteínas: propiedades hidrodinámicas y propiedades relacionadas con la superficie (Badui, 2013).

### 2.4.1. SOLUBILIDAD

Definida como la manifestación termodinámica del equilibrio entre las interacciones de proteína-proteína y proteína-disolvente (Fennema *et al.*, 2010). La solubilidad es uno de los atributos más importantes de las proteínas porque tiene impacto directo en las demás propiedades tecno-funcionales y está influenciada por el pH, fuerza iónica y naturaleza del solvente. (Badui, 2013; Chaquilla *et al.*, 2017).

Badui (2013) menciona que las proteínas pueden clasificarse por su solubilidad de la siguiente forma:

- **Albúminas:** Soluble en agua a pH 6.6 (albúmina sérica, ovoalbúmina y  $\alpha$ -lactoalbúmina).
- **Globulinas:** Soluble en soluciones salinas diluidas a pH 7.0 (glicinina, faseolina y  $\beta$ -lactoglobulina).
- **Glutelinas:** Soluble en soluciones ácidas a pH 2 y alcalinas a pH 12 (glutelinas de trigo).
- **Prolaminas:** Solubles en etanol al 70 por ciento (zeína, gluten de maíz y las gliadinas del trigo).

### 2.4.2. CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE ACEITE (CAA)

Esta propiedad está ligada principalmente al atrapamiento físico de los lípidos por parte de la proteína y es ampliamente apreciada en sustitutos de carne porque mejora la retención del sabor y como consecuencia la sensación en la boca se hace más agradable (Klupsaite *et*

*al.*, 2015). La CAA está relacionada con la unión de cadenas laterales apolares de la proteína presente con las cadenas hidrocarbonadas del aceite (Schoeneberger *et al.*, 2015).

#### **2.4.3. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA)**

Caracterizada por determinar la capacidad de la proteína de atrapar las moléculas de agua y retenerlas (Atalah y Araya, 2011). Dicha capacidad depende de factores intrínsecos (tipo de polímero, peso molecular, linealidad entre otros) y extrínsecos (pH, fuerza iónica, temperatura, presencia de ciertos cationes, etc.) (Badui, 2013).

#### **2.4.4. CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE ESPUMA (CFE) Y ESTABILIDAD (EES)**

La CFE en una proteína es definida como el área interfacial que puede ser creada por la espuma, se puede expresar de diversos modos como volumen de gas incorporado, porcentaje relativo al volumen inicial de líquido, entre otros (Badui, 2013). Así mismo, la EES es la capacidad de estabilizarla frente a esfuerzos mecánicos – gravitatorios y suele expresarse en términos del tiempo necesario para que drene el 50 por ciento del líquido contenido o para que el volumen de la espuma disminuya al 50 por ciento (Fennema *et al.*, 2010).

#### **2.4.5. CAPACIDAD EMULSIFICANTE (CE)**

La capacidad emulsificante es el volumen (mL) de aceite que puede ser emulsificado por gramo de proteína, es un ensayo en el que se añade aceite paulatinamente y se reporta el volumen adicionado antes de que ocurra la inversión de la fase, caracterizada por una inversión de la emulsión de aceite en agua hacia agua en aceite (Badui, 2013).

Las propiedades de las emulsiones estabilizadas por las proteínas se ven afectadas por diversos factores, unos intrínsecos (pH, la fuerza iónica, la temperatura, la presencia de agentes tensoactivos de bajo peso molecular y azúcares, el volumen de la fase oleosa, el tipo de proteína y el punto de fusión de la fase grasa usada) y otros extrínsecos (como el equipo, el consumo de energía por unidad de tiempo y la velocidad de deformación por cizalladura)

## 2.5. DISEÑOS FACTORIALES FRACCIONADOS

Los diseños factoriales fraccionados son diseños experimentales que permiten reducir el número de tratamientos que usualmente se realizaría en los diseños factoriales completos, los cuales suelen contener información en exceso (Gutiérrez, 2012). Ejemplificando, si fuese el caso de tener un diseño factorial completo  $2^8$  serían necesarios 256 ensayos, el número de ensayos obtenidos sumado al hecho de realizar cada ensayo por duplicado o triplicado conllevaría a que el número de corridas sea demasiado grande y en muchos casos demande mayor tiempo, materiales y dinero (Montgomery, 2004).

La teoría de los diseños fraccionados se basa en la jerarquización: son más importantes las interacciones principales, seguidas por las interacciones dobles, triples, cuádruples y, finalmente las de orden superior (Melo *et al.*, 2020). No siempre todos los factores en un experimento son significativos, por lo cual es necesario en muchos casos llevar a cabo una pre-etapa de tamizado o exploración que permita identificar los factores más significativos y prestar especial atención en las mismas (Gutiérrez, 2012). El éxito del diseño dependerá de su correcto uso, no es recomendable para experimentos en los cuales los factores son pocos, puesto que puede conllevar a la pérdida de información relevante, así mismo se recomienda este diseño como apoyo y antelación de otro más robusto (Montgomery, 2004).

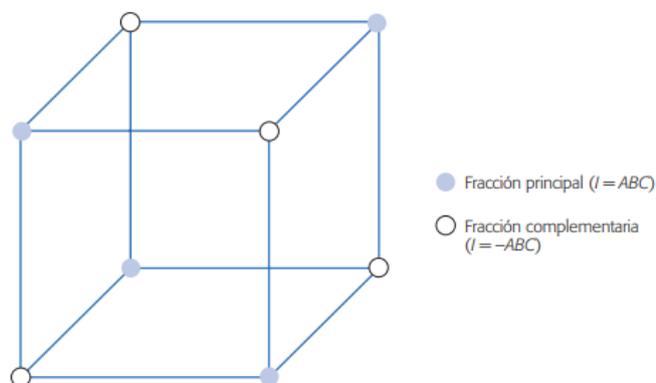
Fernández (2020) menciona que es necesario considerar los siguientes puntos al usar diseños fraccionados:

1. **Dispersión de efectos:** En un modelo con muchos factores es posible que solo algunos de los efectos principales e interacciones de bajo orden sean significativos.
2. **Proyección:** Los diseños factoriales pueden proyectarse en diseños más completos en el subconjunto de factores significativos.
3. **Experimentación secuencial:** Se puede combinar las corridas de 2 experimentos factoriales fraccionados para estimar los efectos principales y las interacciones de interés.

### 2.5.1. EFECTO

El efecto de un factor es el cambio observado en la variable respuesta debido a un cambio de nivel en dicho factor, un efecto con interés primario en el experimento se considera principal (Melo *et al.*, 2020). En particular este tipo de efectos se da si los cambios en la media del factor se deben a la acción individual de cada factor, así mismo se considera efecto de interacción cuando el efecto de un factor depende del nivel en que se encuentra el otro (Gutiérrez, 2012; Montgomery, 2004).

La reducción del número de tratamientos en un diseño fraccionados tal y como lo muestra la Figura 5 está fundamentado en parte en la existencia de efectos alias en un experimento, se considera un efecto alias a dos o más efectos con nombres diferentes que comparte el mismo contraste y como consecuencia determinan el mismo efecto (Gutiérrez, 2012). Usualmente se busca que los efectos potencialmente importantes sean alias de efectos poco importantes (Montgomery, 2004).



**Figura 5: Representación de los diseños fraccionados  $2^{3-1}$**

FUENTE: Gutiérrez (2012)

Considerando que se tiene un diseño  $2^{3-1}$  entonces el número de efectos posibles a estimar para la fracción 1 o 2 tal y como lo muestra la Tabla 3 serían 6: A, B, C (interacciones principales), AB, AC, y BC (interacciones dobles) ambos diseños fraccionados 1 y 2 son válidos y proporcionan la misma calidad de información sobre los efectos potencialmente importantes (Gutiérrez, 2012). Es importante señalar que no es posible determinar la

interacción triple ABC puesto que según su jerarquía es el efecto menos importante y más sacrificable (Melo *et al.*, 2020; Minitab, 2019).

Para determinar si dos efectos son alias en un diseño fraccionado ambos tienen que tener la misma secuencia de signos en su columna respectiva (Gutiérrez, 2012). En la Tabla 3 el efecto de A (columna) está dado por  $+ a - b - c + abc$  mientras que el efecto BC (resultado de multiplicar la columna B x C) está dado por  $+ a - b - c + abc$ ; como se observa ambos efectos coinciden, son alias y al estimar el efecto de A se estaría estimando el efecto BC (Montgomery, 2004).

**Tabla 3: Dos posibles diseños fraccionados  $2^{3-1}$**

Fracción 1 (I= + ABC)			Fracción 2 (I= - ABC)			
A	B	C	A	B	C	
1	-1	-1	a	-1	-1	(1)
-1	1	-1	b	1	-1	ab
-1	-1	1	c	1	1	ac
1	1	1	abc	-1	1	bc

FUENTE: Gutiérrez (2012)

Para interpretar un efecto alias es necesario suponer que solo uno de los efectos es el responsable del efecto observado y que los demás ejercen poco o nulo impacto, sin embargo es riesgoso suponer que las interacciones dobles no afectan, es por ello que los diseños fraccionados son recomendables para experimentos con muchos factores y que pueden presuponer un costo alto, además en experimentos con elevado número de factores se suele cumplir que solo unos pocos son responsables de la mayor parte de variaciones en la respuesta (principio de Pareto) (Gutiérrez, 2012; Melo *et al.*, 2020).

### 2.5.2. ORTOGONALIDAD

Una propiedad de un diseño fraccionado es la ortogonalidad la cual se cumple si los efectos de cualquier factor se equilibran (suman cero) con los efectos de los otros factores (Melo *et al.*, 2020). Esta propiedad garantiza que el efecto de un factor o interacción pueda estimarse

de manera independiente del efecto de cualquier otro factor o interacción presente en el experimento (Minitab, 2019). Así también, aumenta la eficiencia de los diseños fraccionados, dando una mejor interpretación de los parámetros estimados en el modelo y de la superficie de respuesta (Gutiérrez, 2012).

### **2.5.3. RESOLUCIÓN**

Indica que tan bien puede estudiarse los efectos potencialmente importantes en un determinado diseño (Gutiérrez, 2012). La resolución es también un indicador del grado de confusiones que se presentan en la estimación de efectos, usualmente una menor resolución indica que el grado de confusión es mayor y como consecuencia un efecto alias puede ser originado por un mayor número de efectos (Melo *et al.*, 2020).

La resolución de un efecto es representada con una letra en romano siendo más usual las resoluciones III, IV y V; una resolución V indica que las interacciones principales y las interacciones dobles se confunden con interacciones triples o de mayor orden; si la resolución es IV se confunden interacciones dobles entre sí y si la resolución es III se confunden interacciones principales con dobles y triples (Melo *et al.*, 2020).

### **2.5.4. DISEÑOS FRACCIONADOS $2^{k-p}$**

En la construcción de diseños fraccionados con dos niveles los valores que pueden tomar  $k$  y  $p$  dependerán del número de factores en estudio que se tengan; cuando los valores de  $k$  son moderadamente grandes se puede suponer que las interacciones como las de tercer, cuarto orden y superior son poco significativos simplificando así la estructura, así mismo lo ideal sería tener valores de  $p$  cercanos a 0 para obtener un mayor contraste y los efectos sacrificables sean los menores posibles (Montgomery, 2004). En la Tabla 4 se muestran el número total de efectos en un diseño de dos niveles con  $k$  factores, se puede resaltar que el número de efectos ignorables es mayor en proporción a los no ignorables a medida que el valor de  $k$  aumenta, lo que se traduce en que a medida que se trabaje con un mayor número de factores la información en exceso generada y que se podría no estimar es mayor (Gutiérrez, 2012).

En la práctica un mayor número de factores significa un mayor número de corridas, por tal motivo es frecuente que en las primeras etapas de una investigación se establezca una estrategia que permita reducir significativamente el número de tratamientos experimentales, pero que al mismo tiempo evite la pérdida de información valiosa (Gutiérrez, 2012). Generalmente diseños con un alto número de factores contienen exceso de información lo cual supone una ventaja para poder establecer diseños fraccionados más fáciles de trabajar (Melo *et al.*, 2020).

**Tabla 4: Efectos en los diseños factoriales  $2^k$**

Diseño $2^k$	Total de efectos	Efectos no ignorables	Efectos ignorables
$2^2$	3	3	0
$2^3$	7	6	1
$2^4$	15	10	5
$2^5$	31	15	16
$2^6$	63	21	42
$2^7$	127	28	99

FUENTE: Gutiérrez (2012)

**a. FRACCIONES SATURADAS**

Un diseño factorial fraccionado es saturado cuando el número total de grados de libertad del experimento es igual al número de factores que se estudian, como consecuencia estos diseños tienen resolución III, ya que los efectos principales se confunden con las interacciones dobles (Gutiérrez, 2012). El diseño  $2^{7-4}$  es un ejemplo de una fracción saturada en la cual se supone que los efectos principales son los causantes de la variación de la variable respuesta considerándose no importantes las interacciones dobles, triples, etc (Melo *et al.*, 2020).

**2.5.5. CONSIDERACIONES A TENER EN CUENTA EN DISEÑOS FRACCIONADOS**

A continuación, se detalla algunas consideraciones mencionadas por Gutiérrez (2012) y Montgomery (2004) que deben tenerse en cuenta al usar un diseño fraccionado.

- Es necesario incluir en el experimento a cada factor que pueda tener una influencia importante en la respuesta.
- Si el número de factores es grande (más de 10) debe descartarse con un análisis usando toda la información disponible, si a pesar de ello el número de factores sigue siendo significativo como primera instancia se puede correr un diseño factorial fraccionado saturado que permita detectar los factores con mayor influencia en la variable respuesta y como segunda etapa un análisis más exhaustivo de los factores resultantes.
- Se deben considerar todos los recursos que se emplearán en el experimento (material, energía, tiempo hombre y tiempo máquina), buscándose que el costo sea el menor posible, pero que a la vez se cumpla con los objetivos del experimento.
- Es recomendable plantear una estrategia por etapas en experimentos con demasiados factores considerando que el primer experimento no será definitivo.
- En el caso de que el número de factores sea pequeño (3) y no es fácil decidir si un efecto es significativo o no es recomendable correr una réplica adicional para potenciar el experimento.
- Es necesario dar un tiempo adecuado a la etapa de planeación del experimento para evitar volver a experimentar.

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

La MSR es una estrategia analítica y experimental que permite al investigador inspeccionar una respuesta y darle solución al encontrar las condiciones óptimas del proceso desarrollado, las condiciones óptimas pueden maximizar, minimizar o cumplir ciertas restricciones en la variable respuesta, dando como resultado valores óptimos de las características de calidad del producto (Gutiérrez, 2012; Martínez, 2019).

### **2.6.1. COMPONENTES DE LA MSR**

La MSR involucra tres elementos: diseño, modelo y técnica de optimización: el diseño y el modelo se planifican en paralelo, y dependen del comportamiento esperado en la respuesta. El modelo puede ser de primer o segundo orden (Gutiérrez, 2012).

### **a. DISEÑO**

Para optimizar un proceso es necesario llevar a cabo el diseño de experimentos, en específico aquellos que permitan ajustar un modelo de regresión lineal múltiple (Melo *et al.*, 2020). Diseñar implica determinar el experimento apropiado basado en el conocimiento actual acerca de la posible ubicación del punto óptimo y el modelo de regresión que se quiere ajustar (Gutiérrez, 2012).

### **b. MODELO**

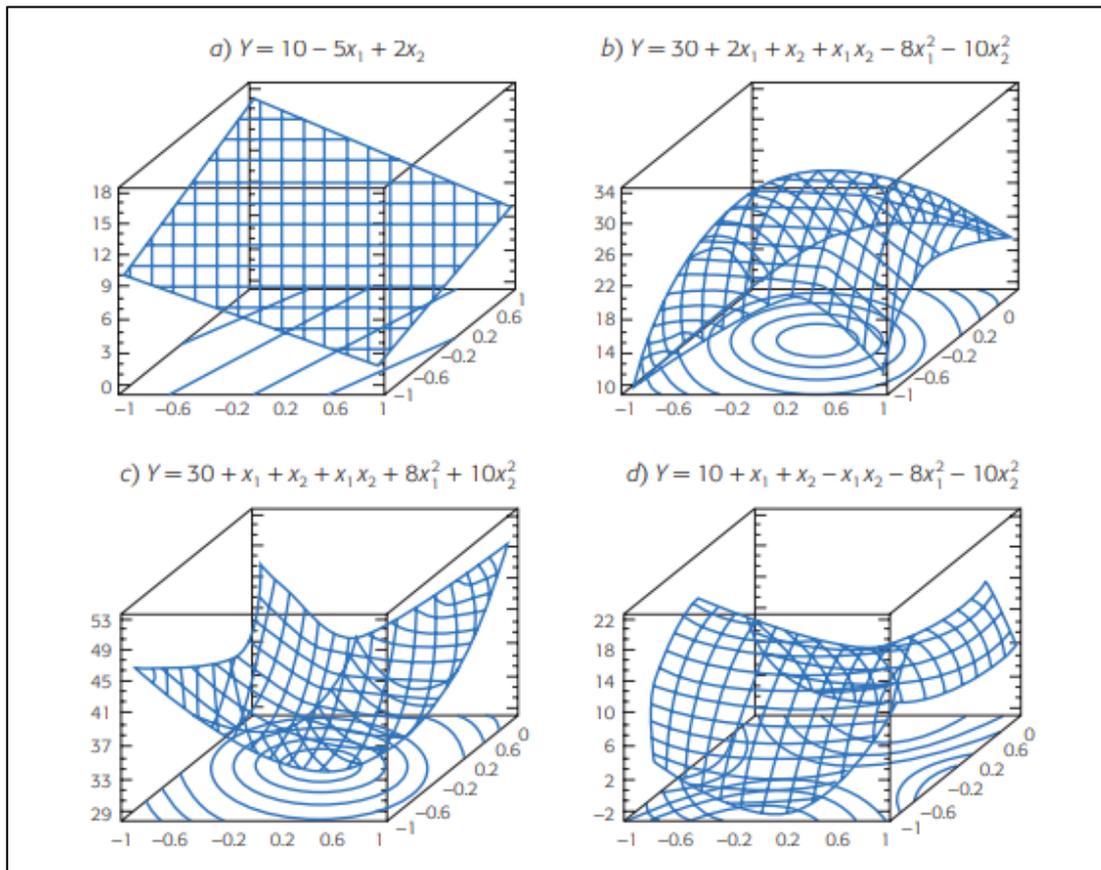
Hace uso del análisis de regresión lineal múltiple (usualmente), junto con sus componentes principales: coeficiente de determinación, intervalos de confianza para predichos, modelo ajustado, prueba de falta de ajuste, parámetros del modelo, significancia del modelo y residuos; el modelo es por lo tanto la ecuación matemática que relaciona la variable de respuesta con los factores estudiados en el diseño (Gutiérrez, 2012).

### **c. OPTIMIZACIÓN**

Constituido por algunos métodos matemáticos que sirven para que, en base a un modelo ajustado se pueda explorarlo con el objetivo de obtener información sobre el punto óptimo, esta herramienta permite extraer la información sobre el punto óptimo que tiene el modelo ajustado (Melo *et al.*, 2020).

## **2.6.2. MODELOS EMPLEADOS EN LA MSR**

La forma específica que toma la superficie depende de los signos y magnitudes de los coeficientes en el modelo, cuando los factores son superiores a dos, las gráficas resultantes se encontrarían en cuatro dimensiones o más y por lo tanto no se podrían graficarlas de forma completa de una sola vez (Melo *et al.*, 2020). La Figura 6 muestra que para factores  $k > 2$  el modelo de primer orden representa un hiperplano y el de segundo orden un hiperelipsoide. No obstante, para  $k = 3$  es factible graficar la superficie elaborando las tres gráficas con dos factores cada vez, con el tercero constante (Gutiérrez, 2012).



**Figura 6: Superficies de respuesta: a) descrita por un modelo de primer orden; b), c) y d) descritas por modelos de segundo orden**

FUENTE: Gutiérrez (2012)

Para caracterizar las superficies de respuesta se ajusta un modelo a los datos experimentales, los modelos empleados en la MSR son principalmente polinomios y pueden expresarse en forma de primer (Ecuación 1) y segundo orden (Ecuación 2) (Gutiérrez, 2012).

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

**Ecuación 1: Modelo 1<sup>er</sup> orden en la MSR**

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

**Ecuación 2: Modelo de 2<sup>do</sup> orden en la MSR**

FUENTE: Gutiérrez (2012)

### **2.6.3. ETAPAS DE OPTIMIZACIÓN**

#### **a. *SCREENING***

La optimización de un proceso inicia con esta etapa cuando se tiene muchos factores (más de 6 u 8) que influyen en la variable de interés, por lo tanto, el *screening* se utiliza para reducir un conjunto grande de factores (Gutiérrez, 2012). El objetivo es identificar aquellos factores que tienen un efecto significativo sobre la variable respuesta y descartar aquellos factores no significativos (Minitab, 2019).

#### **b. ESCALAMIENTO**

La técnica de escalamiento se aplica cuando, respecto a la valoración inicial, se cree que se está lejos de la condición óptima, por lo que será necesario explorar una región de experimentación inicial y a partir de ésta determinar una dirección en la cual experimentar fuera de la región inicial (Melo *et al.*, 2020). Así, a partir del conocimiento previo que se tiene del problema es preciso seleccionar los niveles de los factores para determinar la región de exploración (Gutiérrez, 2012).

#### **c. OPTIMIZACIÓN FINAL**

En el momento en que se detecta la presencia de curvatura, o bien, que la superficie es más complicada que un hiperplano, se corre o se completa un diseño de segundo orden para caracterizar mejor la superficie y modelar la curvatura (Gutiérrez, 2012). Con el modelo ajustado se determinan las condiciones óptimas de operación del proceso, aunque en la práctica no se conoce dónde se ubica el punto óptimo, la MSR es buena estrategia para llegar a éste (Melo *et al.*, 2020). Entre los diseños de segundo orden se encuentran el Diseño Central Compuesto (DCC) y Box Behnken.

## **2.6.4. DISEÑOS DE SEGUNDO ORDEN**

### **a. DISEÑO CENTRAL COMPUESTO**

Es el tipo de diseño más utilizado en la etapa de búsqueda de segundo orden debido a su gran flexibilidad: se puede construir a partir de un diseño factorial completo  $2^k$  o fraccionado  $2^{k-p}$  agregando puntos sobre los ejes y al centro (Martínez, 2019). Gutiérrez (2012) menciona que este diseño se compone de tres tipos de puntos:

- Una réplica de un diseño factorial en dos niveles, completo o fraccionado. A esta parte del DCC se le llama porción factorial 2.
- Número de puntos o repeticiones al centro del diseño, con  $n \geq 1$ .
- Dos puntos sobre cada eje a una distancia  $a$  del origen. Estos puntos se llaman porción axial.

### **b. DISEÑO BOX BEHNKEN**

Este diseño se forma al combinar un diseño  $2^k$  con los llamados diseños en bloques incompletos balanceados (DBIB), es importante considerar que un diseño de bloques es completo si en cada bloque se prueban todos los tratamientos y entonces será incompleto si en cada bloque se prueban sólo algunos tratamientos, y será balanceado si en cada par de tratamientos se efectúa igual número de réplicas (Martínez, 2019).

El diseño Box Behnken se aplica cuando se tienen tres o más factores, y suelen ser eficientes en cuanto al número de corridas, es un diseño rotatable o casi rotatable que se distingue porque no incluye como tratamientos a los vértices de la región experimental (Gutiérrez, 2012).

## **III. METODOLOGÍA**

### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

El presente trabajo se llevó a cabo en la Planta Piloto de Alimentos, Laboratorios de Análisis Físicoquímico de Alimentos, Biotecnología de Alimentos e Ingeniería de Alimentos pertenecientes a la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

### **3.2. MATERIA PRIMA**

Se utilizó como materia prima semillas de pajuro provenientes del distrito de Jesús (latitud 7°14'S, longitud 78°23'O, 2564 m.s.n.m.) de la provincia de Cajamarca, departamento de Cajamarca, Perú.

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

#### **3.3.1. EQUIPOS**

- Agitador magnético (HANNA, Modelo HI 200M).
- Agitador VORTEX (ARE).
- Balanza analítica (PESACON, Modelo HR250AZ).
- Balanza de humedad infrarroja (OHAUS MB35).
- Centrífuga digital (HETTICH, Modelo D-78522).
- Centrífuga digital (NEOFUGE 18R).
- Colorímetro (KONICA MINOLTA, Modelo CR400).
- Equipo para baño María con agitación (GLF, Modelo 1083).

- Espectrofotómetro (THERMO SCIENTIFIC, Modelo Genesys 20).
- Estufa (BINDER) Hornilla eléctrica (ILKO).
- Licuadora (OSTER BLENDER).
- Liofilizador (MILLROCK, Modelo ST53B4).
- Molino de rotor (RETSCH SR300).
- Mufla (SM).
- Potenciómetro (HANNA, Modelo HI 2211).
- Robot-coupe (CL50 ULTRA).
- Secador de Bandejas (RETER, Modelo DRR-200).

### **3.3.2. MATERIALES**

- Probetas 50, 100, 250 mL.
- Pipetas 1mL, 10 mL.
- Fiolas 10, 50, 150 mL.
- Bagueta.
- Erlemeyer 50 mL, 100 mL.
- Placas Petri.
- Beakers 50, 100, 250 mL.
- Embudo Büchner.
- Crisol de porcelana.
- Papel filtro Whatman N°1.
- Micropipetas (0.1-5 mL).
- Tubos falcón cónicos.
- Tamiz número 35 (500  $\mu$ m).

### **3.3.3. REACTIVOS**

- Etanol 96 °, BIOGENICS.
- Albúmina Sérica Bovina 98 % pureza (BSA), HIMEDIA INDIA.
- Hidróxido de sodio, CDH INDIA.
- Ácido clorhídrico 37%, MERCK.

- Agua destilada, NACIONAL.
- Carbonato de Sodio, HIMEDIA INDIA.
- Sulfato de cobre pentahidratado, HIMEDIA INDIA.
- Tartrato de sodio potásico, HIMEDIA INDIA.
- Reactivo de Folin Ciocalteu, CDH INDIA.
- Aceite de maíz, COMERCIAL.
- Cloruro de Sodio, CDH INDIA.

### **3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS**

#### **3.4.1. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL**

Se determinó la humedad según el método AOAC 925.10 (2016), grasa bruta según el método AOAC 922.06 (2019), fibra bruta según el método NTP 205.003: 1980 (Revisada el 2011), proteína bruta según el método AOAC 978.04 (2019) (usada también para determinar la pureza del aislado proteico), ceniza según el método AOAC 923.03 (2016), el extracto libre de nitrógeno se determinó por diferencia; finalmente el contenido energético fue calculado usando los factores de conversión de Atwater (Hussein *et al.*, 2018).

#### **3.4.2. PROTEÍNA SOLUBLE**

El contenido de proteína soluble en el sobrenadante fue determinado por el método de Lowry *et al.* (1951). Para su determinación, a 400  $\mu$ L de muestra se agregó 2 mL de reactivo de Lowry (mezcla de la solución al 2 por ciento (w/v) de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en NaOH 0.1N; solución al 0.5 por ciento (w/v) de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en agua destilada y 0.5 por ciento de tartrato de sodio potásico 2 por ciento (w/v) en agua destilada). La solución obtenida fue mezclada con 200  $\mu$ L del reactivo de Folin Ciocalteu 1N y se le dio un reposo de 30 min en oscuridad. Como medición final la muestra fue llevada a un espectrofotómetro donde se dio lectura a 550 nm.

Adicionalmente para la obtención de la curva estándar (ver Anexo 1) se utilizó una solución de albúmina bovina de 1 mg/L en agua destilada con diferentes volúmenes de solución proteica (0.1; 0.2; 0.3; 0.4 y 0.5 mL) completándose hasta 1 mL con agua destilada.

### 3.4.3. PROPIEDADES TECNO-FUNCIONALES DEL AISLADO PROTEICO

#### a. CAPACIDAD DE FORMACIÓN ESPUMA (CFE)

Se determinó según el método usado por Sathe *et al.* (1982) con algunas modificaciones. Se prepararon soluciones al 1 por ciento aislado/H<sub>2</sub>O. El pH fue ajustado en un rango de 2 a 8. Las soluciones fueron colocadas en una licuadora a temperatura ambiente a máxima velocidad durante 5 min y luego fueron trasvasadas a una probeta. El volumen total del batido fue calculado mediante la siguiente fórmula a un tiempo de 30 segundos después del batido.

$$\text{CFE (\%)} = \frac{(\text{volumen después del batido} - \text{volumen antes del batido})}{\text{volumen antes del batido}} \times 100$$

#### b. ESTABILIDAD DE LA ESPUMA (EES)

Después de la medición del volumen total de la espuma se midió el volumen del mismo en una probeta a un tiempo de 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 y 120 min (Onsaard *et al.*, 2010) (ver Anexo 2). El cálculo se hizo en función de la siguiente fórmula:

$$\text{EES (\%)} = \frac{\text{volumen de la espuma a un tiempo determinado}}{\text{volumen de la espuma a un tiempo de 0 min}} \times 100$$

#### c. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA)

Se usó la metodología empleada por Sai-Ut *et al.* (2009). Se preparó soluciones al 4 por ciento aislado/H<sub>2</sub>O. El pH de cada solución fue ajustado en un rango de 2 a 8. La solución obtenida se agitó en intervalos de 5 min durante 30 min para luego ser centrifugada por 25 min a 3000 RPM. El sobrenadante obtenido del centrifugado se decantó. Para eliminar el exceso de humedad del sedimento, este se llevó a secado por estufa por 25 min a 50 °C. Para el cálculo de la CRA se usó la siguiente fórmula:

$$\text{CRA} \left( \frac{\text{g H}_2\text{O}}{\text{g aislado}} \right) = \frac{\text{agua retenida por la muestra (g)}}{\text{muestra de aislado proteico (g)}}$$

#### **d. SOLUBILIDAD**

Se usó la metodología usada por Sai-Ut *et al.* (2009) con algunas modificaciones. El sobrenadante obtenido en la determinación de la CRA, se transfirió a una fiola de 100mL y se enrasó con agua destilada. Posteriormente las proteínas solubles fueron determinadas por el método de Lowry. Para determinar los efectos del pH se ajustaron valores de 2, 4, 6, 8. La solubilidad fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Solubilidad (\%)} = \frac{\text{proteínas solubles en el sobrenadante (g)}}{\text{muestra de aislado proteico (g)}} \times 100$$

#### **e. CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE ACEITE (CAA)**

Se usó el método descrito por Sai-Ut *et al.* (2009). Se mezcló 0.5 g de muestra en tubos centrífuga (previamente pesados) con 6 mL de aceite de maíz, para luego reposar durante 30 min a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de reposo la suspensión fue llevada a centrifugación por 25 min a 3000 RPM. El sobrenadante obtenido fue retirado cuidadosamente y los tubos con los sedimentos fueron invertidos para eliminar el aceite excedente durante 25 min.

La cantidad de aceite absorbido fue la diferencia entre el peso del sedimento obtenido y el peso inicial del aislado proteico. Se hizo uso de la siguiente fórmula para su determinación.

$$\text{CAA} \left( \frac{\text{aceite g}}{\text{aislado g}} \right) = \frac{\text{aceite absorbido por la muestra (g)}}{\text{muestra de aislado proteico (g)}}$$

#### **f. CAPACIDAD DE EMULSIÓN (CE) Y ESTABILIDAD (EE)**

Se usó el método descrito por Mercado *et al.* (2015), para ello se mezcló 1 g de aislado proteico con 20 mL de agua, la mezcla fue agitada durante 15 min para posteriormente ajustar su pH a 7 enrasándose con agua destilada a 25 mL.

Los 25 mL de la solución obtenida fueron mezclados con 25 mL de aceite de maíz en una licuadora por 3 min centrifugándose luego a 1300 RPM durante 5 min. La CE fue expresada en porcentaje como el volumen de la capa emulsificada con respecto al total del líquido (50 mL) (ver Anexo 3). La medición de la capa emulsificada se hizo en una probeta graduada.

$$CE (\%) = \frac{(\text{volumen de la capa emulsificada})}{\text{volumen antes del batido}} \times 100$$

La EE se determinó en términos del colapso de la emulsión. El volumen remanente de la capa emulsificada fue medida luego de 2 h colocándose en una probeta graduada, el cálculo se hizo con respecto al volumen inicial de la emulsión.

$$EE = \frac{\text{volumen de la emulsión luego de 2 h}}{\text{volumen de la emulsión a un tiempo de 0 min}} \times 100$$

#### **g. ÍNDICE DE BLANCURA**

El índice de blancura fue determinado con un colorímetro bajo las coordenadas de color L\*, a\* y b\* según el método usado por Fuentes *et al.* (2009). El índice de blancura fue calculado como:

$$WI (\%) = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}}$$

### 3.4.4. EXTRACCIÓN

a. **Porcentaje de recuperación de proteína soluble (R):** Este valor fue usado en las etapas de *screening* y en la MSR y expresó la cantidad de proteína soluble que se pudo extraer hasta la etapa de extracción alcalina.

$$R (\%) = \frac{\text{Proteína soluble en el sobrenadante (Lowry) (g)}}{\text{Proteína total (Kjeldahl) (g)}} \times 100$$

b. **Rendimiento de extracción del proceso:** Se hizo uso de este valor considerando el liofilizado como última operación y fue calculado respecto a la harina de semillas de pajuro con la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento de Extracción del proceso (\%)} = \frac{\text{aislado proteico en base seca (g)}}{\text{harina en base seca (g)}} \times 100$$

c. **Porcentaje de recuperación de proteína del proceso:** El porcentaje de proteína recuperada del proceso se determinó respecto a la proteína inicial contenida en la harina y fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína recuperada del proceso (\%)} = \frac{\text{proteína extraída(g)}}{\text{proteína contenida en la harina (g)}} \times 100$$

## 3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

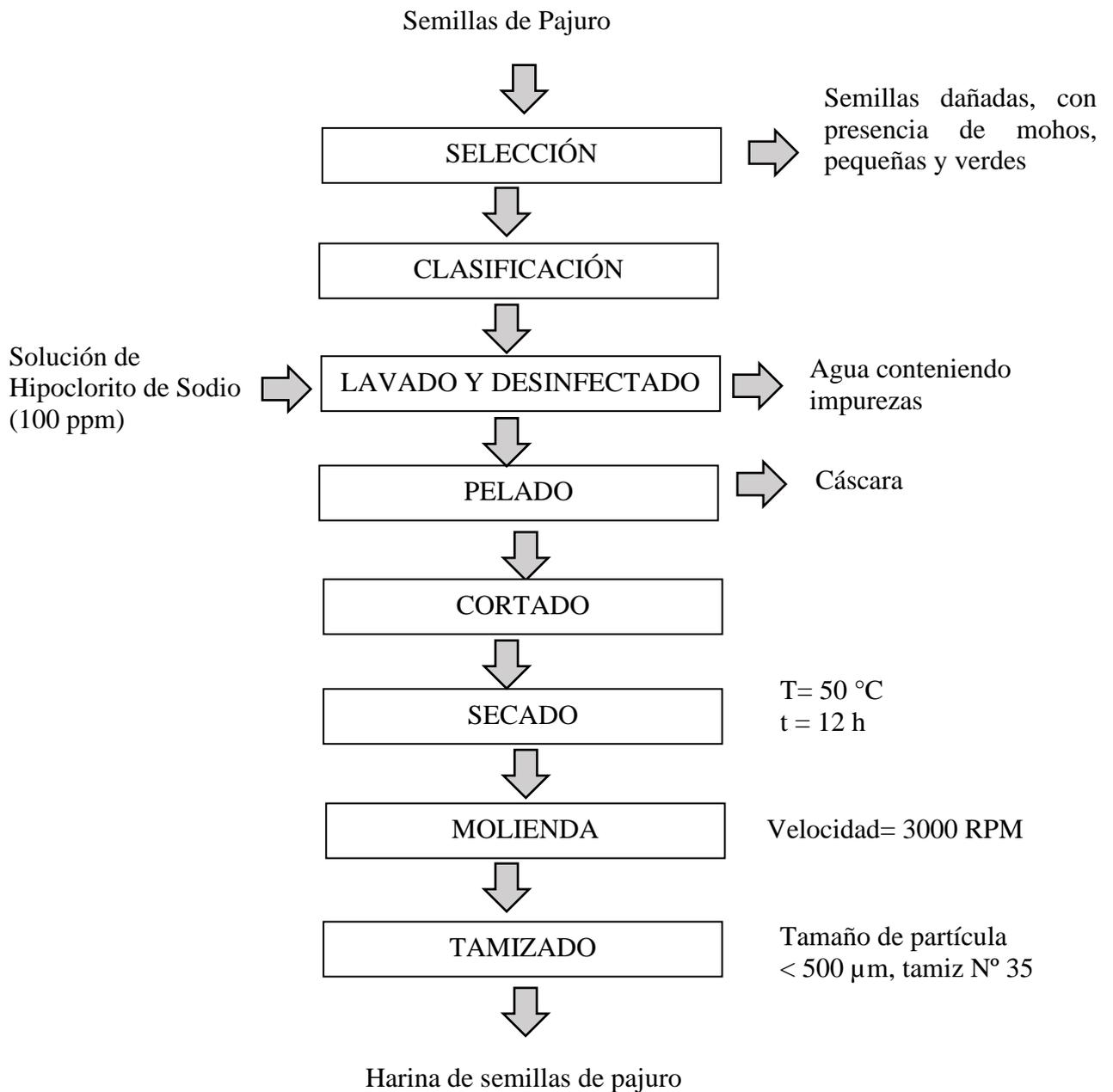
### 3.5.1. OBTENCIÓN DE LA HARINA DE SEMILLAS DE PAJURO

Se siguieron las siguientes operaciones unitarias para la obtención de harina:

1. **Selección:** Se separó manualmente todas las semillas que presentaron daños físicos, microbiológicos, con signos de deterioro.

2. **Clasificación:** Las semillas fueron clasificadas por su estado de maduración. Fueron seleccionadas semillas maduras (marrón oscuro) y de mayor tamaño.
3. **Lavado y desinfectado:** Las semillas seleccionadas fueron lavadas y desinfectadas con agua potable fría con una concentración de hipoclorito de sodio de 100 ppm.
4. **Pelado:** Mediante el uso de cuchillos la cáscara fue separada del cotiledón.
5. **Cortado:** Se cortaron las semillas libres de cáscara en láminas de 3 mm aproximadamente.
6. **Secado:** Las semillas laminadas fueron colocadas en un secador de bandejas a una temperatura de 50 °C durante 12 h a fin de eliminar el agua presente hasta una humedad de 8.27 por ciento.
7. **Molienda:** Se hizo uso de un molino de rotor a una velocidad de 3000 RPM (ver Anexo 4).
8. **Tamizado:** La harina obtenida fue separada mediante un tamiz N° 35 siendo la parte a usar para los análisis la fracción < 500 µm. Posteriormente fue almacenado en bolsas de aluminio herméticas.

La Figura 7 muestra el flujo de operación seguido y parámetros usados para la obtención de harina de semillas de pajuro.

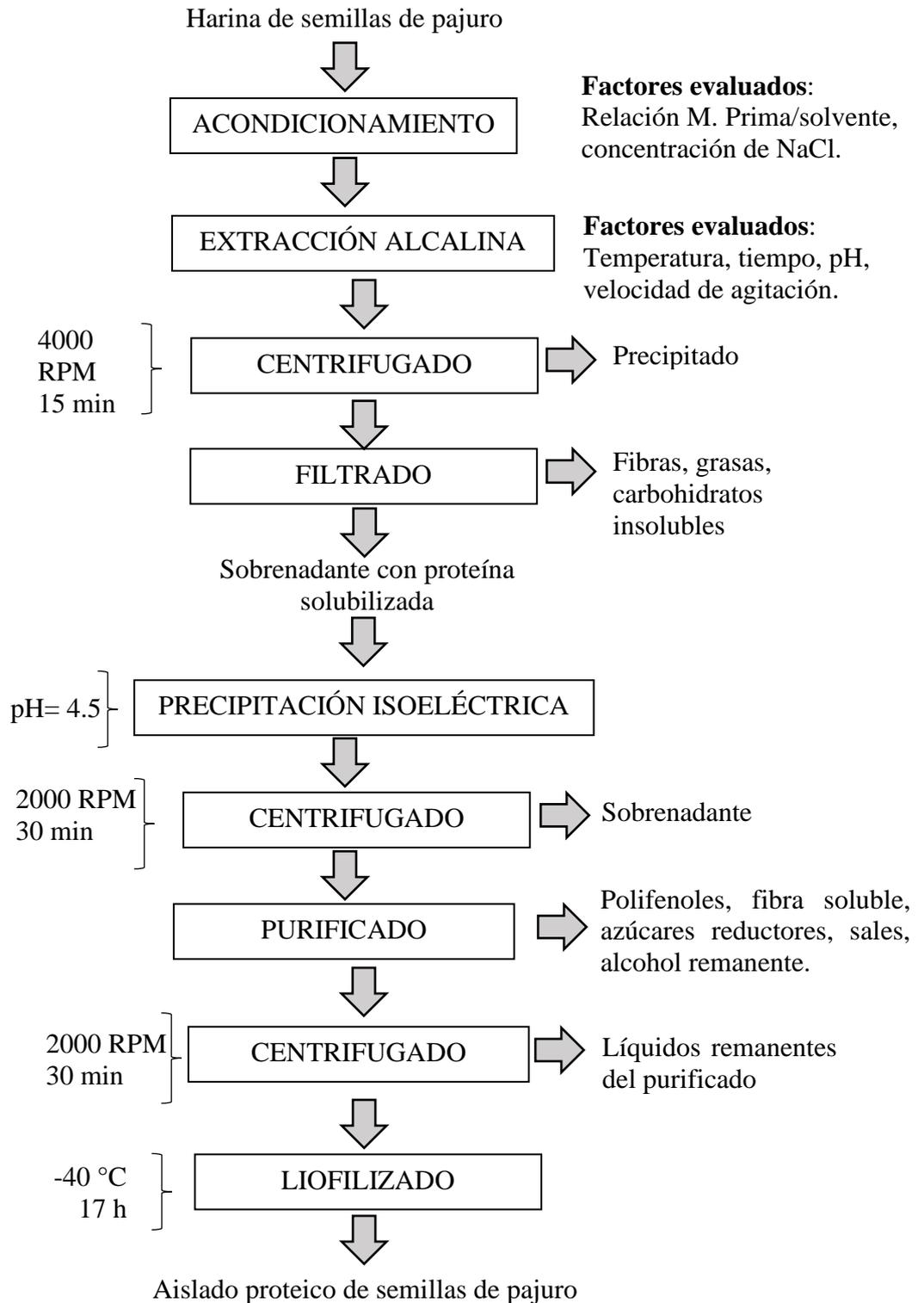


**Figura 7: Flujograma de operación para la obtención de harina de semillas de pajuro**

### 3.5.2. EXTRACCIÓN ALCALINA

La Figura 8 muestra las operaciones realizadas en la extracción alcalina, cuyo producto final fue el aislado proteico y a continuación se detallan las operaciones que comprende:

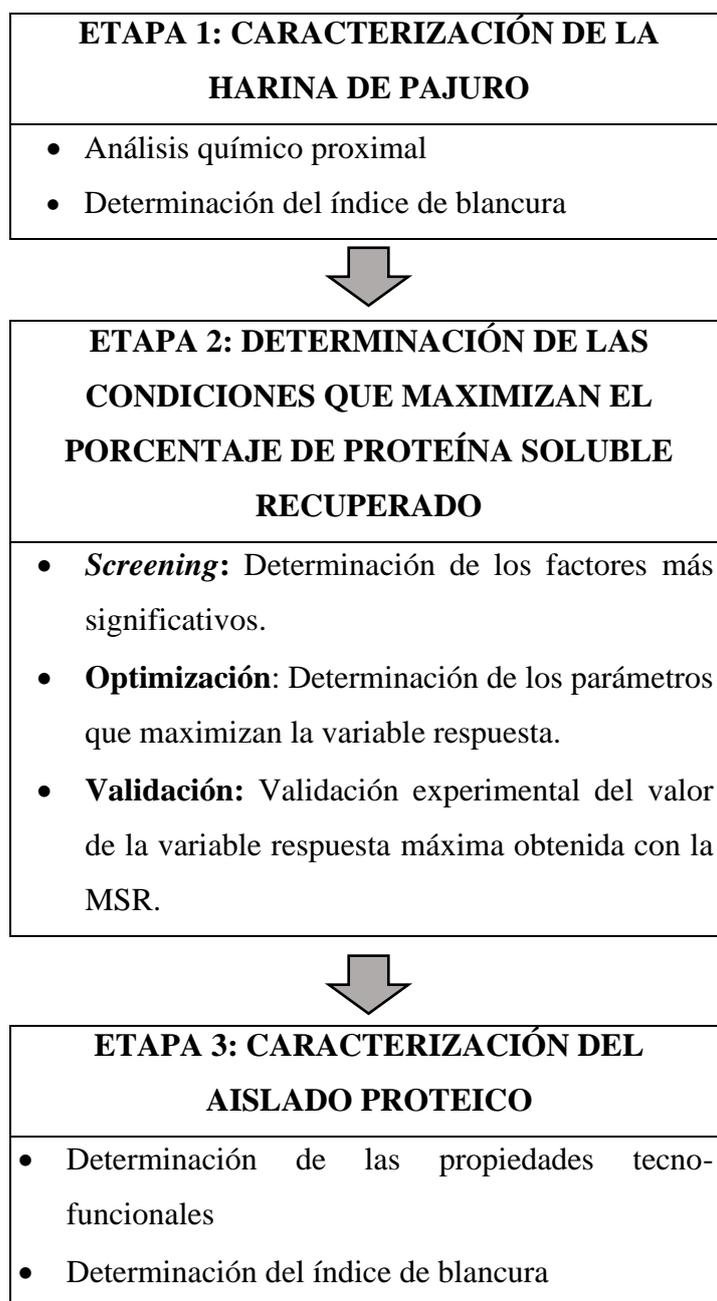
1. **Acondicionamiento:** Muestras de harina de semillas de pajuro fueron diluidas con agua destilada (1/30 ó 1/50 g/mL) en matraces Erlenmeyer y homogenizadas con una bagueta.
2. **Extracción alcalina:** Se ajustó el pH (8 ó 10) de la solución obtenida en la etapa anterior con NaOH 1N y posteriormente se llevó a agitación (95 ó 150 RPM), a un tiempo (15 ó 50 min) y temperatura (25 ó 50 °C) determinados en un equipo de Baño María con agitación (ver Anexo 5).
3. **Centrifugado:** La muestra agitada fue centrifugada a 4000 RPM durante 15 min. El sedimento fue desechado obteniéndose una solución proteica (ver Anexo 6).
4. **Filtrado:** Para obtener una solución con una mayor concentración de proteínas y eliminar fibras, grasas y carbohidratos insolubles, el sobrenadante fue filtrado con papel Whatman N°1.
5. **Precipitación isoeléctrica:** Se llevó el pH del sobrenadante a 4.5, empleando una solución de HCl 1N, con el fin de precipitar la proteína extraída (ver Anexo 7).
6. **Centrifugado:** La proteína precipitada fue centrifugada a 2000 RPM durante 30 min, resultando la parte útil esta vez el precipitado.
7. **Purificado:** Se realizaron dos lavados, el primero se realizó con etanol al 20 por ciento con una relación coágulo proteico: mezcla hidroalcohólica (1/10) con la finalidad de disminuir el contenido de polifenoles. El segundo lavado fue realizado con agua destilada en una relación coágulo proteico: destilada (1/10) con la finalidad de reducir el contenido de compuestos no deseables como fibra soluble, azúcares reductores, sales y eliminar el alcohol remanente (Goncalves *et al.*, 1997).
8. **Centrifugado:** El precipitado purificado se centrifugó a 2000 RPM durante 30 min, para retirar el excedente de líquidos de lavado, obteniéndose finalmente un coágulo proteico (ver Anexo 8).
9. **Secado:** El coágulo proteico fue llevado a secado en un liofilizador a -40 °C durante 17 h a 13.33 Pa (ver Anexos 9 y 10).



**Figura 8: Flujograma de operación para la obtención de aislado proteico de semillas de pajuro**

### 3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los experimentos se llevaron a cabo según el esquema experimental mostrado en la Figura 9.



**Figura 9: Esquema experimental desarrollado**

### **3.6.1. ETAPA 1: CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DE SEMILLAS DE PAJURO**

Se realizaron análisis físicos (humedad, ceniza; índice de blancura) y químicos (proteína bruta, grasa bruta, fibra bruta).

### **3.6.2. ETAPA 2: DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES Y PARÁMETROS QUE MAXIMIZAN EL PORCENTAJE DE PROTEÍNA SOLUBLE RECUPERADO**

#### **a. *SCREENING***

La primera subetapa consistió en realizar el *screening* de seis variables o factores (pH, concentración de NaCl, tiempo, temperatura, relación MP/S y velocidad de agitación) para determinar los efectos principales de los factores elegidos en la extracción de proteína de semillas de pajuro y determinar los factores más significativos. Se utilizó un diseño fraccionado  $2^{6-3}$  por duplicado a fin de disminuir el tiempo y costos. Gutiérrez (2012) menciona que realizar diseños completos conlleva a obtener información muchas veces no relevante y desventajosa, por tal motivo propone que una solución a investigaciones con numerosos factores es optar por diseños fraccionados, lo cuales permiten evaluar principalmente las interacciones principales de cada factor. Es a través de este primer filtro que se determinó los factores más significativos para la posterior etapa de optimización, los niveles mínimos y máximos para cada factor se presentan en la Tabla 5.

Las variables fueron elegidas tomando como referencia a los siguientes autores: pH (Orihuela, 2017), tiempo de extracción (Arango *et al.*, 2012; Orihuela 2017), temperatura de extracción (Mera, 2018; Aquino, 2015), velocidad de agitación (pruebas preliminares), relación materia prima / solvente (Arango *et al.*, 2012) y concentración de NaCl (Ahmed *et al.*, 2012).

El diseño experimental, que resulta del análisis utilizando un diseño factorial fraccionado  $2^{6-3}$ , para evaluar el efecto principal de los seis factores antes mencionados, se presenta en la Tabla 6. En base al diseño utilizado fueron necesarias 8 corridas experimentales, a un nivel de confianza del 95 por ciento ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 5: Factores y sus niveles utilizados en la etapa de *screening***

N°	Factor independiente	Codificado	No	Niveles	
			Codificado	-1	1
1	pH	x <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	8	10
2	Concentración de NaCl (M)	x <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	0	0.8
3	Tiempo (min)	x <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	15	50
4	Temperatura (°C)	x <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	25	50
5	Velocidad de agitación (RPM)	x <sub>5</sub>	X <sub>5</sub>	95	150
6	Relación MP/S (g/mL)	x <sub>6</sub>	X <sub>6</sub>	1/30	1/50

**Tabla 6: Número y combinaciones evaluadas**

Corridas	Factores					
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>
1	-1	-1	-1	1	1	1
2	1	-1	-1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1
4	1	1	-1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1	-1
7	1	1	1	-1	-1	1
8	1	1	1	1	1	1

## b. OPTIMIZACIÓN

En la segunda subetapa de investigación, se realizó la optimización de las condiciones de extracción y se consideró a los factores estadísticamente significativos y que mostraron efectos favorables (provenientes de la etapa de *screening*). Se usó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) con un diseño Box Behnken evaluándose tres niveles para cada factor significativo con dos repeticiones por cada tratamiento. La validación del modelo cuadrático fue evaluada con un ANOVA ( $p < 0.05$ ). Los factores y niveles evaluados en la etapa de optimización se presentan en la Tabla 7. Los niveles de escalamiento centrales fueron elegidos en base al nivel más favorable para cada variable elegida en la etapa de *screening*.

**Tabla 7: Factores y sus niveles evaluados en la etapa de Optimización**

N°	Factores independientes	Codificada	No	Niveles		
			Codificada	-1	0	1
1	Temperatura (°C)	x <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	20	25	30
2	Relación MP/S (g/mL)	x <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	40	50	60
3	Tiempo (min)	x <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	5	15	25

### c. VALIDACIÓN

En la tercera subetapa se realizó la extracción proteica con las condiciones óptimas obtenidas con la MSR. El análisis se realizó por triplicado a fin de poder compararlo con el valor teórico mediante una prueba *T-Student*.

### 3.6.3. ETAPA 3: CARACTERIZACIÓN DEL AISLADO PROTEICO

Los análisis que se realizaron al aislado proteico extraído con las condiciones óptimas fueron: capacidad de formación de espuma y estabilidad, capacidad de retención de agua, solubilidad, capacidad de absorción de aceite, capacidad de formación de emulsión y estabilidad, e índice de blancura.

### 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la comparación de medias se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) analizado a través de un ANOVA. A los factores que resultaron significativos ( $p < 0.05$ ) del análisis ANOVA se les realizó la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Se utilizó el paquete estadístico Minitab 17.

El *screening* fue analizado mediante un arreglo factorial fraccionado  $2^{6-3}$ , mientras que la etapa de optimización fue analizada mediante la MSR con un diseño Box Behnken, en ambos análisis se usó el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI. Para la etapa de validación se hizo la prueba *T-Student* mediante el paquete estadístico Minitab 17.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. ETAPA 1: CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DE SEMILLAS DE PAJURO

#### 4.1.1. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL

El análisis químico proximal presentado en la Tabla 8 muestra baja humedad (8.27 por ciento) con 19.6 por ciento de proteínas en base seca, usual en las leguminosas que se caracterizan como fuente de proteínas vegetales (Fundación Española de Nutrición, 2017). Se aprecia también baja cantidad de grasa y fibra cruda con valores de 0.76 y 1.53 por ciento, respectivamente. El contenido de ceniza 5.34 por ciento indica la presencia sustancias orgánicas no combustibles. Finalmente, el extracto libre de nitrógeno fue 72.7 por ciento.

**Tabla 8: Análisis químico proximal de la harina de semillas de pajuro**

Componente (%)	Base húmeda <sup>1</sup>	Base seca <sup>1</sup>
Humedad	8.27±0.58	-
Proteína total (%Nx6.25)	18.00±0.02	19.62±0.02
Grasa	0.70±0.01	0.76±0.01
Fibra cruda	1.41±0.01	1.53±0.02
Ceniza	4.90±0.47	5.34±0.51
Extracto libre de nitrógeno	66.72±0.50	72.73±0.55
Energía (kcal)	345±1.93	376 ±3.19

<sup>1</sup>Resultados expresados como el promedio ± DS

Es recomendable que el contenido de humedad de alimentos secos como la harina esté por debajo del 15 por ciento para una conservación adecuada y evitar así problemas de deterioro (Ponce *et al.*, 2016). El valor obtenido 8.27 por ciento se encuentra dentro del límite citado y supone características adecuadas para su posterior almacenamiento y uso.

Se han reportado humedades de 3.3 (Umaña *et al.*, 2013); 9.13; (Silva *et al.*, 2015) y 10.8 (Vargas, 2016) por ciento para harina de semillas de pajuro. El valor obtenido se encuentra dentro del rango citado con algunas diferencias. Al respecto Gamarra (2019) menciona que las condiciones de secado (tiempo, temperatura) influyen en la humedad final, siendo crucial el adecuado manejo de los parámetros involucrados. Los parámetros de secado son por lo tanto factores a considerar en la humedad final.

El contenido proteico en una leguminosa es el valor más destacable y su aprovechamiento suele estar relacionado con la búsqueda de productos bajos en grasas y alto contenido proteico como: aislados, concentrados, bebidas proteicas, insumos para la industria cárnica, entre otros (Astiasarán y Martínez, 2002). El contenido proteico de la harina de semillas de pajuro es variable, se han reportado valores de 17.13; 18.4; 21.7; 24.2 y 21.1 por ciento (Álzate *et al.*, 2013; Delgado, 2018; Umaña *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2015) para variedades de Colombia (Armenia), Ancash y Cajamarca (Perú), respectivamente. Aunque el valor obtenido en esta investigación (19.62 por ciento) se encuentra dentro del rango citado, las condiciones edafológicas de terreno y climáticas del lugar de cosecha influyen en las características fisicoquímicas finales de la semilla, explicación que permite comprender que aun cuando se trate de una misma zona de cultivo (Cajamarca) el valor proteico puede variar (Espinoza, 2018).

Los valores de proteínas presentados por las semillas de pajuro son superiores a los reportados (expresados en porcentaje) en granos andinos como: cañihua (17.6), quinua (14.4) y kiwicha (14.5) (Mera, 2018; Repo-Carrasco *et al.*, 2012); cereales: cebada (8.54), maíz (11.7) y trigo (12.94) (Márquez, 2007; Pérez *et al.*, 2006; Ponce *et al.*, 2016); así también valores similares se han evidenciado en leguminosas como: alubias (17-23), garbanzos (17-21) y lentejas (20-28) (Astiasarán y Martínez, 2002) y finalmente se han reportado valores superiores al pajuro en: soya (38-42) y habas (26-30) (Astiasarán y Martínez, 2002). Si bien el contenido proteico es importante, también lo es la calidad biológica que pueda tener el mismo. Al respecto Villafuerte (2019) menciona que las proteínas de semillas de pajuro, poseen un aminograma superior al del fríjol y la arveja, siendo importante tomar en cuenta este aspecto y estudiarlo con más profundidad.

El contenido graso fue 0.76 por ciento el cuál es característico en la harina de esta semilla (Espinoza, 2018). Al respecto, Silva *et al.* (2015) obtuvo valores de 2.71 y 3.01 por ciento para la variedad de Cajamarca y Ancash, respectivamente; así también, Delgado (2018) obtuvo 0.54 por ciento para la variedad Cajamarca, otros valores reportados son 0.34 y 1.52 por ciento (Umaña *et al.*, 2013; Vargas, 2016). El contenido graso de las semillas de pajuro es por consiguiente bajo y supone una ventaja al reducir los principales procesos de alteración y mejorar la conservación del producto en el tiempo (Astiasarán y Martínez, 2002); en adición, reduce operaciones previas de desgrasado usuales en semillas como el sachá inchi, tarwi y cañihua (Breña, 2018; Mera, 2018; Aquino, 2015) las cuales necesitan mencionada operación, puesto que la presencia de lípidos durante la solubilización alcalina genera la formación de emulsiones establecidas por las proteínas resistentes a la centrifugación reduciendo el rendimiento (Fennema *et al.*, 2010).

El contenido de ceniza obtenido fue 5.34 por ciento. Se ha reportado contenido de ceniza en harina de semillas de pajuro de 3.71, 4.91, 5.35 y 5.84 por ciento (Umaña *et al.*, 2013, Delgado, 2018; Delgado y Albarracín, 2014; Espinoza, 2018;). Se puede afirmar por lo tanto que el contenido de ceniza estuvo dentro del rango citado.

Respecto al contenido de fibra cruda se obtuvo 1.53 por ciento, valor semejante a los reportados en harina de semillas de pajuro 0.5, 0.94, 1.2 y 2,86 por ciento (Álzate *et al.*, 2013; Vargas, 2016; Umaña *et al.*, 2013; Delgado, 2018) encontrándose dentro de lo esperado.

El contenido de extracto libre de nitrógeno fue de 72.73 por ciento. Al respecto se han reportado valores de 61.54, 70.59 y 73.4 por ciento (Delgado, 2018; Umaña *et al.*, 2013; Vargas, 2016). El valor obtenido se encuentra dentro del rango de valores citados siendo un valor intermedio.

Finalmente, se tuvo un valor energético de 376 kcal. Se han reportado valores cercanos de 372 y 354 kcal (Delgado-Soriano *et al.*, 2022; Espinoza, 2018). En base al valor energético proveniente de la proteína respecto al total (20.9 por ciento) se puede calificar a las semillas de pajuro como “excelente fuente de proteínas” bajo el sistema empleado en la Unión

Europea, el cual exige que más del 20 por ciento de la energía provenga de la proteína cruda (Delgado-Soriano *et al.*, 2022).

## 4.2. ETAPA 2: DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES Y PARÁMETROS QUE MAXIMIZAN LA RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES

### 4.2.1. SCREENING

Los resultados experimentales para las 16 corridas realizadas se muestran en la Tabla 9, así mismo los valores de recuperación de proteínas solubles que variaron entre 72.16 y 92.23 por ciento. Adicionalmente, se presentan los cálculos realizados para la obtención de resultados en esta primera etapa (ver Anexo 11).

**Tabla 9: Respuesta experimental (observado) y estimado en la etapa de *screening***

Exp.	Tratamiento	Factor codificado						Recuperación proteica soluble (%)	
		X1	X2	X3	X4	X5	X6	Observado <sup>1</sup> , Y	Estimado, Y
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	86.49±1.29 <sup>a</sup>	86.48 <sup>a</sup>
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	92.23±1.24 <sup>b</sup>	92.25 <sup>b</sup>
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	72.29±0.62 <sup>c</sup>	72.30 <sup>c</sup>
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	72.16±1.19 <sup>d</sup>	72.17 <sup>d</sup>
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	72.56±1.18 <sup>e</sup>	72.57 <sup>e</sup>
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	76.26±0.77 <sup>f</sup>	76.25 <sup>f</sup>
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	80.60±1.26 <sup>g</sup>	80.61 <sup>g</sup>
8	1	1	1	1	1	1	1	77.14±1.26 <sup>h</sup>	77.15 <sup>h</sup>

<sup>1</sup>Expresado como el promedio ±DS

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre valores  $p < 0.05$

El análisis de varianza mostrado en la Tabla 10 indica que los 6 factores elegidos son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ). Así mismo, el valor del coeficiente de determinación ajustado  $R^2=0.9962$  por ciento muestra que el 99.62 por ciento de la

variabilidad de los resultados es explicado por el modelo. Para fines de predicción se recomienda un coeficiente de al menos 70 y mientras se tenga un valor cercano a 100 será favorable para el experimento realizado (Gutiérrez, 2012). Para más detalles del análisis de varianza ver el Anexo 12.

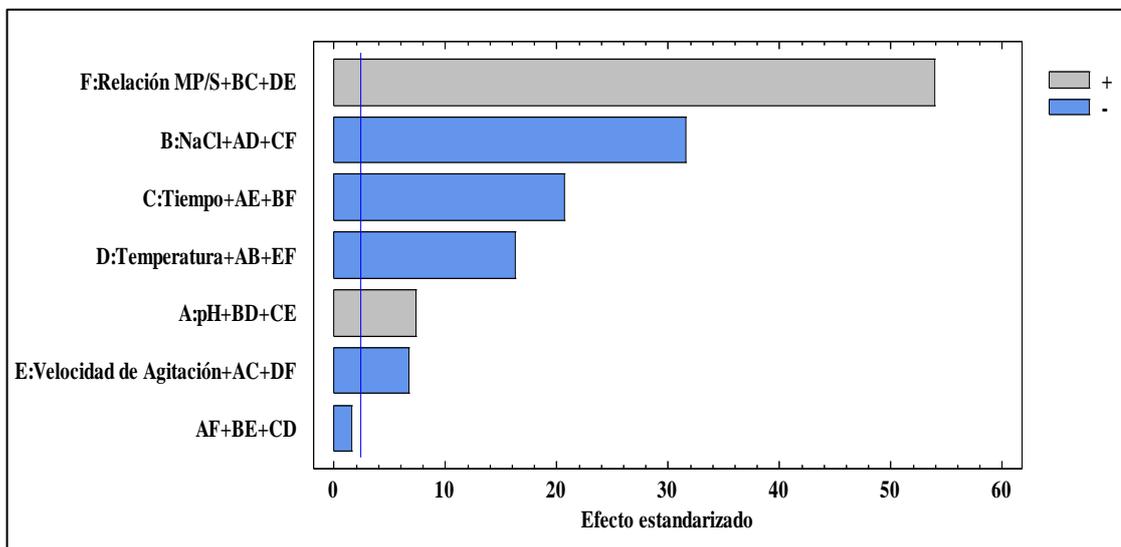
**Tabla 10: Resultados del Análisis de Varianza del diseño fraccionado  $2^{6-3}$  utilizado en la etapa de *screening***

Fuente	Grado de Libertad	Suma de Cuadrados	p
Modelo	7	754.7	0.000
Lineal	6	754.31	0.000
X <sub>1</sub>	1	8.62	0.000
X <sub>2</sub>	1	160.31	0.000
X <sub>3</sub>	1	69.04	0.000
X <sub>4</sub>	1	42.56	0.000
X <sub>5</sub>	1	7.32	0.000
X <sub>6</sub>	1	466.45	0.000
X <sub>1</sub> .X <sub>6</sub>	1	0.387	0.193
Error	8	1.53	
Total	15	756.23	
R <sup>2</sup>	0.9980		
R <sup>2</sup> ajustado	0.9962		

Los efectos de los factores se presentan en la Figura 10, así también, la secuencia en orden decreciente de relevancia fue: MP/Solvente > Concentración de NaCl > Tiempo de extracción > Temperatura > pH > Velocidad de agitación.

El factor más influyente fue la relación MP/S. Al respecto Arango *et al.* (2012) al extraer proteínas de semillas de pajuro obtuvieron mejores resultados con una relación MP/S de 1/40 g/mL y concluyeron que dicho factor influyó en la composición y porcentaje de proteína recuperada, añaden que si el solvente no es suficiente los componentes solubilizados pueden saturarse y precipitar reduciendo el porcentaje de proteína recuperada. La precipitación por saturación es por lo tanto un efecto adverso de una relación MP/S inadecuada según lo señalado por el autor citado y posible causa del comportamiento obtenido en la presente investigación en la relación 1/30 g/mL.

Shen *et al.* (2008), al extraer proteínas de hojas de té detectaron que, si bien a una mayor cantidad de solvente incrementaba la cantidad de proteínas recuperada dada una mayor diferencia de concentración entre la fase sólida y el disolvente, este efecto benéfico se vio opacado por la dificultad de tener que manejar el volumen extra de solvente. Al respecto, Qin *et al.* (2021) evidenciaron el mismo comportamiento al extraer proteína de semillas de sandía, logrando recuperar mayor cantidad de proteína con el aumento de la relación MP/S antes de los 40 g/mL, siendo el incremento del porcentaje de recuperación de proteína insignificante por encima de dicho límite. Por consiguiente, una mayor relación no necesariamente es favorable y se debe considerar que las proteínas al igual que otros materiales solubles deben seguir a la disolución y/o cinética de difusión (Geankoplis, 2018).



**Figura 10: Diagrama de Pareto de los efectos principales durante la extracción de proteínas solubles en la etapa de *screening***

Las diferentes proporciones de líquido a sólido afectan también la viscosidad de la solución, la difusión molecular y la disolución de proteínas (Zuo *et al.*, 2018). Constantina (2003) añade que la extracción sólido-líquido puede ser considerada un proceso de difusión con transferencia de moléculas de proteína de un sólido (harina de pajuro) a un solvente (agua a pH alcalino) donde la cantidad moléculas que fluirán será proporcional al gradiente de concentración y la constante de difusividad de acuerdo a la ley de Fick (Geankoplis, 2018). Todo el conjunto de factores mencionados ejerce un impacto sobre el porcentaje de proteína a recuperar durante la extracción, siendo la relación 1/50 g/L, como se mencionó anteriormente, la más adecuada de usar para esta primera etapa.

El segundo factor de mayor importancia fue la concentración de NaCl, y tuvo un efecto negativo al generar la disminución del porcentaje de proteína recuperada a medida que la concentración de NaCl incrementó. En la extracción de proteínas incluir el factor concentración de sal es habitual puesto que se busca solubilizar proteínas mediante el estado *salting in* y de esta manera incrementar la cantidad proteína extraída (Vieira *et al.*, 2006). Sin embargo, para el presente caso no se logró dicho estado.

Al respecto es importante señalar que existe relación entre la concentración de sal y la solubilidad de las proteínas, esta relación fue estudiada por Ahmed *et al.* (2012) quienes al evaluar la solubilidad proteica de cuatro tipos de semilla de frijol a diferentes concentraciones de NaCl a un pH de 7 obtuvieron mayores solubilidades a concentraciones de 0.6-0.8 M para frijol blanco y jacinto y 0.4 M para chícharo y castilla, respectivamente (valores fuera de la concentración citada presentaron disminución de la solubilidad). En adición, Lestari *et al.* (2010) explica que las sales incrementan la fuerza iónica de la solución y como consecuencia la solubilidad de las proteínas aumenta, sin embargo, cuando la concentración de sal sigue incrementando genera una competición por la solvatación entre las moléculas de agua y los iones de sal conllevando a una precipitación proteica (*salting out*) disminuyendo la cantidad de proteínas recuperadas en la extracción. Por lo tanto, se puede afirmar que concentraciones superiores o inferiores a la concentración óptima de sal pueden tener un efecto desfavorable o poco significativo en la variable respuesta en estudio.

El efecto del pH y las sales sobre la variable respuesta en estudio es también una relación a evaluar. Mune *et al.* (2010) al extraer proteínas de semilla de frijol bambara obtuvieron mejores resultados al incrementar el pH y la concentración de NaCl, además observaron que a niveles bajos de concentración de NaCl (0.07 M) variando el pH (7.58-10.42) la variación del porcentaje de proteínas recuperadas era muy sensible y oscilaba entre 20-32 por ciento, mismo comportamiento se observó cuando el pH se mantuvo en el valor más bajo (7.58) y la concentración de NaCl variaba (0.07-0.43 M). En adición, Govardhan *et al.* (2011) al extraer proteína de semillas de moringa recuperaron un mayor porcentaje de proteínas a una concentración de 0.75 M bajo un pH constante, sin embargo, dicho comportamiento cambió cuando se mantuvo constante la concentración de sal y varió el pH, obteniéndose mejores resultados en tratamientos sin NaCl y valores bajos de pH (7.58). Por último, León *et al.* (2013) en la extracción de proteínas de semillas de jatrofa (*Jatropha curcas* L) mencionan

que la recuperación de proteína disminuyó cuando se añadió NaCl a la solución de extracción en el rango probado (0,3 y 0,6 M) a pH de 9–11. Por lo expuesto según su nivel, la adición de NaCl a una suspensión de proteínas puede afectar a la densidad de carga neta de las mismas y por lo tanto modificar su solubilidad mediante la mejora o reducción de repulsiones inter-moleculares en determinados rangos de pH (Aider *et al.* 2011).

Tal y como se expuso, si bien la adición de NaCl puede favorecer el recuperación de proteínas, se dará siempre y cuando la relación pH y concentración de NaCl sea la adecuada, sin embargo, aunque la relación sea adecuada y el porcentaje de proteína recuperada incrementa no siempre es recomendable añadir dicho factor como parte del experimento tal y como lo señalan Lestari *et al.* (2010), quienes concluyeron al extraer proteínas de jatropha, que aunque la adición de NaCl incrementó la recuperación proteica, su adición en etapas posteriores resultó en desventaja al disminuir el contenido de proteína (pureza) y conllevar a operaciones de diálisis, que significaron un aumento considerable en el costo de producción. Por consiguiente, se puede inferir que el beneficio generado por la adición de sal tiene que ser mayor al costo que generará.

Finalmente, se puede deducir que la adición de NaCl para el presente experimento fue contraproducente. Al respecto Pérez (2021) al extraer proteínas de Moringa a pH 10 obtuvo porcentajes de recuperación proteica de 35.01, 27.0 y 25.85 a concentraciones de 0, 0.25 M y 0.5 M de NaCl respectivamente, (comportamiento similar al obtenido) concluyendo que en presencia de NaCl y condiciones alcalinas las proteínas altamente cargadas tienden a reducir su solubilidad debido a un enmascaramiento de cargas originado por la repulsión electrostática de la sal. En adición Mera (2018) menciona que se han reportado bajas solubilidades en garbanzos, lentejas y habas a pH por encima de 7.5 comportamiento que podría ser resultado de un incremento de las interacciones hidrofóbicas. Por lo tanto, se puede afirmar que el fenómeno *salting in* no se logró en el rango de pH de extracción propuesto, siendo la mejor elección la no adición de sal.

El tiempo al igual que la concentración de NaCl tuvo un efecto inversamente proporcional, a medida que su magnitud disminuyó se extrajo una mayor cantidad de proteínas. Al respecto, Arango *et al.* (2012) al evaluar el tiempo de extracción de proteína de semillas pajuro, tuvo como tiempo óptimo los primeros 20 min. Otros autores reportan tiempos

óptimos de 5 min al extraer proteína de cañihua (Mera, 2018), 15 min en semillas de sandía (Wani *et al.*, 2008), 18 min en semillas germinadas de calabaza (Sogi *et al.*, 2002) y 15 min en semillas de sachá inchi (Aquino, 2015). En base a lo expuesto, se puede inferir que cortos tiempos de extracción son usuales y dan resultados favorables en la extracción de proteínas de origen vegetal, adicionalmente tener cortos tiempos denota una ventaja desde el punto de vista económico, generando menores costos y menor tiempo de exposición de las proteínas a pH alcalino (Föste *et al.*, 2015).

Es importante tener en cuenta que el tiempo como factor participa de la cinética de difusión de proteínas al medio de extracción (Geankoplis, 2018), por lo cual es necesario darle al proceso el tiempo óptimo, de lo contrario tiempos prolongados a pH alcalino y temperatura ligeramente elevada pueden suponer un problema causando el deterioro, desnaturalización y reducción de la cantidad de proteína recuperada (Zhang *et al.*, 2014; Badui, 2013).

La temperatura fue el cuarto factor de mayor importancia presentando un comportamiento inversamente proporcional, a medida que este factor disminuyó se evidenció un incremento de la variable respuesta. Al respecto, Hadnadjev *et al.* (2017) manifiestan que, si bien el aumento de temperatura incrementa la difusión de partículas favoreciendo la extracción, puede ejercer también efectos negativos tales como la precipitación y desnaturalización si la exposición es prolongada y a altas temperaturas; es así, que en extracciones proteicas es recomendable el uso de temperaturas cercanas a la ambiental, dado que valores altos pueden también afectar sus propiedades tecno-funcionales.

Se han reportado parámetros óptimos de temperatura desde valores oscilantes a la ambiental como: 21 °C (Mera, 2018) y temperaturas ligeramente elevadas 54 °C (Aquino, 2015). Cada proteína puede mantener su estructura nativa solo dentro de un rango de temperatura especificado, fuera ese rango de temperatura, comienza la desnaturalización, pérdida de conformación estructural, propiedades tecno-funcionales, valor nutricional y degradación de compuestos bioactivos (Ahmad *et al.*, 2020, Franca *et al.*, 2021). Por lo tanto, la composición proteica de la materia prima usada influye en la respuesta final que tendrá frente a la magnitud del factor en mención (López, 2014).

Zhang *et al.* (2014) expone que otros factores negativos de las temperaturas altas son la reducción de la recuperación de proteínas debido a la coagulación e hidrólisis de las mismas (en el paso de recuperación) y la reducción de su calidad como resultado de la desnaturalización, hidrólisis o racemización de aminoácidos. En términos generales, la temperatura disminuye la solubilidad de la proteína debido a los cambios de conformación en la estructura, la modificación es irreversible, y depende de la temperatura y tiempo de calentamiento (Pérez 2021). Por consiguiente, para la presente investigación trabajar a una temperatura de 25 °C fue favorable y se pudo evitar los inconvenientes expuestos.

El factor pH, generó una mayor recuperación de proteínas a medida que su magnitud incrementó. Usualmente en proteínas de origen vegetal principalmente leguminosas es recomendable trabajar a pH alcalino puesto que muestran mejores resultados (Badui, 2013). El pH como factor del medio es decisivo en la solubilidad de la proteína, la carga neta de la proteína en un pH determinado depende de los valores de pKa de los grupos ionizados de la proteína (Pérez, 2021). La solubilidad de las proteínas aumenta debido a la ionización de aminoácidos ácidos y neutros a pH alcalino, si el pH del solvente de extracción se aleja más del punto isoeléctrico de la proteína, la carga neta aumenta conduciendo al aumento de la repulsión electrostática y la hidratación de residuos cargados, que promoverá la solubilización de proteínas en la extracción disolvente (Lestari *et al.*, 2010); por lo tanto, la extracción de proteína en un ambiente alcalino generará mejores rendimientos (Kumar *et al.*, 2021).

Zhang *et al.* (2015) explica que la exposición de un medio alcalino con NaOH genera grietas en las paredes celulares existentes en la harina vegetal aumentando la difusión proteica y como consecuencia la cantidad de proteínas extraídas. Extracciones a pH alcalino presentan también la ventaja del aumento de solubilidad de proteínas al hidrolizar la proteína unida con polifenoles y polisacáridos al disminuir su hidrofobicidad, en adición condiciones alcalinas alteran la conformación proteica, exponiendo grupos hidrófobos y rompiendo enlaces disulfuro que resultan en una mayor recuperación de proteínas durante la extracción (Föste *et al.*, 2015; Pérez, 2021).

Si bien el uso de pH alcalino muestra una serie de ventajas, existen también ciertos puntos en contra que se exponen a continuación. Fennema *et al.* (2010) exponen que las condiciones

altamente alcalinas pueden conllevar a la desnaturalización de proteínas, por consiguiente, se debe encontrar un compromiso entre el porcentaje de proteína recuperada y el grado de desnaturalización. En medio extraíble alcalino la serie de reacciones indeseables como la racemización de aminoácidos, la formación de lisinoalanina y la pérdida de aminoácidos esenciales suelen ocurrir (Moure *et al.*, 2006). En adición, Kumar *et al.* (2021) mencionan que la extracción basada en proteínas de fuentes vegetales mejora la biodisponibilidad y la digestibilidad de la proteína vegetal extraída mientras que también degrada la calidad de la proteína. Por lo tanto, trabajar a un mayor pH puede ser no necesariamente favorable. En base a lo expuesto, se puede afirmar que la extracción alcalina indudablemente puede mejorar la eficiencia de extracción de proteínas, sin embargo, al mismo tiempo afecta la calidad proteica desintegramiento la estructura de lisina y aminoácido cisteína, reduciendo la calidad general y la aceptabilidad de la proteína extraída. (Kumar *et al.*, 2021).

Föste *et al.* (2015) exponen que valores superiores a pH 10 pueden tener un impacto negativo sobre los aminoácidos esenciales como la lisina. Gao *et al.* (2020) añaden que los procesos de extracción proteica que emplean un pH alcalino superior a 10 generan que el aislado proteico sea más susceptible a la desnaturalización, disminuyendo su solubilidad, y funcionalidad. Ruiz *et al.* (2016) reportó también que la desnaturalización proteica de aislado de quinua aumentó a medida que el pH de extracción fue superior a 10. Tal y como mencionan los autores citados el pH 10 supone un límite entre el impacto positivo y negativo que puede tener el factor en mención. Teniendo en cuenta lo antes mencionado, en la presente investigación se eligió el pH 10 como valor adecuado para la siguiente etapa.

Finalmente, el factor con menor significancia fue la velocidad de agitación, mostrando mejores resultados la velocidad de 95 RPM respecto a la de 150 RPM. Al respecto, Ramírez *et al.* (2016) explican que un aumento en la agitación de la mezcla disolvente-soluto, favorece la transferencia de masa debido al incremento de los coeficientes de transferencia de materia en la interfase sólido-líquido, además, indican que se evita la sedimentación y apelmazamiento de las partículas sólidas. Por consiguiente, se puede inferir que el uso del factor velocidad de agitación supone una mejora al extraer proteínas.

Por lo expuesto, incrementar la velocidad de agitación resulta beneficioso, sin embargo, a determinados valores los cambios son poco significativos (Vega *et al.*, 2017). Theerakulkait

*et al.* (2006) al extraer proteínas de salvado de arroz a diferentes velocidades de agitación (400-1000 RPM) mediante el uso de un agitador de turbina obtuvieron mejores resultados a partir de los 500 RPM, valores por debajo de este valor fueron inferiores y valores superiores no mostraron diferencias significativas. En adición, Lacerda *et al.* (2014) al extraer proteínas de semillas de ricino obtuvieron mejores resultados a 400 RPM (regulando la velocidad con un agitador con asta y hélice). Se han reportado velocidades de agitación en la extracción de proteínas vegetales de 200 a 400 RPM (Aquino, 2015; Mera, 2018, Vallejos, 2018; Yongjae, 2015). Por consiguiente, se puede afirmar que la velocidad de agitación es variable y tiene un punto óptimo de trabajo. Para la presente investigación una velocidad de 95 RPM fue la más adecuada, valor muy por debajo a las mencionadas por los autores en mención. Al respecto, un punto importante a mencionar son las condiciones de agitación, la presente investigación fue realizada con un tipo de agitación mecánica de vaivén, cuya velocidad por encima de los 200 RPM generaba la salida intempestiva de la muestra contenido en matraces, así también dependía del contenedor (cuando el contenedor eran tubos de 50 mL el efecto era suave y poco notable respecto a cuándo se realizaba en matraces dado el espacio interior disponible). Si el tipo de agitación usado es comparado a la agitación usada por los autores citados, difiere considerablemente dado que agitadores de asta y hélice permiten la generación de un tipo de flujo más homogéneo y constante manteniendo los sólidos en suspensión sin vertimiento de muestra, en adición, a escala industrial los agitadores suelen ser de tipo axial o radial con variaciones, pero no de flujo lineal oscilante como el usado (Castillo, 2013). En base a lo expuesto, el factor velocidad de agitación no se consideró en la siguiente etapa dado que el tipo de movimiento generado por el equipo usado no representó una forma adecuada para simular condiciones de tipo industrial, sin embargo, se mantuvo constante el valor que permitió obtener mejores resultados siendo 95 RPM.

Un factor a mencionar, que no fue usado como variable en la etapa de *screening* fue el tamaño de partícula. Mera (2018) menciona que existe relación entre el tamaño de partícula de la harina usada y el tiempo de extracción, permitiendo reducir los tiempos al mejorar la difusión de la proteína en el medio. Al respecto, Föste *et al.* (2015) al evaluar la accesibilidad de las proteínas en función del grado de conminución en harina de salvado de quinua a tamaños de partícula de 250, 500 y 750  $\mu\text{m}$  reportaron que una reducción de partículas al tamaño de hasta 250  $\mu\text{m}$  resultó en una solubilidad de proteína significativamente mayor (67.7 por ciento), en comparación con el salvado no molido existiendo una diferencia de 13 por ciento, sin embargo, no fue diferente de 500  $\mu\text{m}$ . Así mismo, explican que reducir el

tamaño de partícula favorece la accesibilidad de las proteínas a través de la superficie, dado que el área de contacto incrementa, sin embargo, añaden que esta mejora no es una relación lineal puesto que en los tamaños de 500  $\mu\text{m}$  y 250  $\mu\text{m}$  no obtuvieron diferencias significativas. Por su parte López *et al.* (2012) exponen que la extracción de proteínas parte desde la liberación de las células que las contienen, a mayor cantidad de células rotas por el proceso de trituración (molienda) mayor será la cantidad de proteína extraída. Por lo tanto, se puede deducir que el tamaño de partícula fue un factor que favoreció en tener en la etapa de *screening* mayores porcentajes de recuperación proteica a menores tiempos.

Concluyendo la primera etapa del experimento se eligieron tres factores para la etapa de optimización: temperatura, tiempo y relación MP/S. El factor concentración de NaCl fue descartado porque su presencia fue perjudicial al disminuir el rendimiento, respecto al factor pH, se decidió trabajar con un pH de 10 como límite dado que parte de la investigación abarcó determinar las propiedades tecno-funcionales de la proteína extraída y como se expuso el valor de pH superior a 10 puede generar deterioro en la proteína. Finalmente, la velocidad de agitación no se eligió como factor para la siguiente etapa dada la naturaleza del equipo y que el tipo de movimiento no reflejó adecuadamente la velocidad a escala industrial eligiéndose el valor con mejores resultados (95 RPM).

#### **4.2.2. OPTIMIZACIÓN**

Para la etapa de optimización, se usaron los tres factores elegidos en la etapa de *screening*: relación MP/S ( $X_1$ ), tiempo ( $X_2$ ) y temperatura ( $X_3$ ), se hizo uso de un diseño Box Behnken. El criterio de optimización fue maximizar el porcentaje de proteína recuperada (objetivo).

La Tabla 11 muestra los porcentajes de proteína recuperada en la extracción obtenidos bajo las condiciones generadas por el diseño, los cuales variaron entre 77.44 y 92.82 por ciento, los cálculos para la obtención de resultados se presentan en el Anexo 13. Se han reportado porcentajes de recuperación de proteína soluble bajo la misma metodología (Lowry) para el frijol mungo con valores de 77.6 por ciento (Wang *et al.*, 2011), maní con 85.29 por ciento (Ismail *et al.*, 1991), cañihua con 88.15 por ciento (Mera, 2018) y quinua blanca con 89.88 (Molina, 2018). Por consiguiente, se puede afirmar que el máximo valor de la variable respuesta obtenida con las semillas de pajuro fue superior a los citados.

**Tabla 11: Diseño Box-Behnken, respuesta experimental (observado) y estimado en la etapa de Optimización**

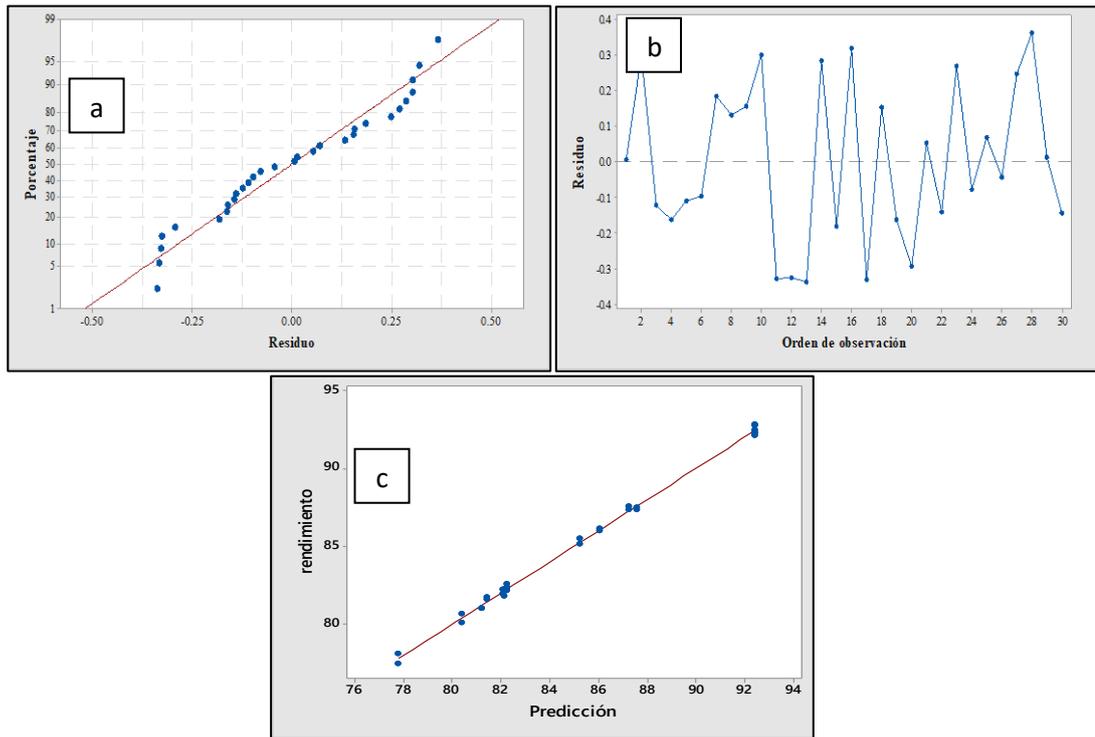
Exp.	Trat.	Factor codificado			Factor no codificado			Recuperación proteica soluble	
		X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub> (MP/S)	X <sub>2</sub> (Tiempo)	X <sub>3</sub> (Temperatura)	Observado, Y <sup>1</sup>	Estimado, Y
1	1	0	0	0	1/50	15	25	92.12±1.22	92.45
	2							92.82±0.93	
2	1	-1	-1	0	1/40	5	25	82.23±0.89	82.22
	2							82.54±0.42	
3	1	-1	1	0	1/40	25	25	81.95±0.70	82.07
	2							82.23±0.89	
4	1	1	-1	0	1/60	5	25	78.07±0.85	77.77
	2							77.44±1.10	
5	1	1	1	0	1/60	25	25	81.03±0.49	81.19
	2							81.03±1.49	
6	1	0	-1	-1	1/50	5	20	82.38±1.08	82.22
	2							82.14±1.66	
7	1	0	1	-1	1/50	25	20	87.54±0.53	87.24
	2							87.31±1.60	
8	1	0	0	0	1/50	15	25	92.74±0.88	92.45
	2							92.47±1.61	
9	1	0	-1	1	1/50	5	30	81.79±1.56	82.12
	2							82.08±0.69	
10	1	0	1	1	1/50	25	30	80.05±0.40	80.38
	2							80.63±1.42	
11	1	-1	0	-1	1/40	15	20	87.49±0.58	87.60
	2							87.31±1.11	
12	1	1	0	-1	1/60	15	20	85.99±1.07	86.09
	2							86.14±0.65	
13	1	-1	0	1	1/40	15	30	85.46±1.11	85.27
	2							85.13±0.56	
14	1	1	0	1	1/60	15	30	81.59±1.26	81.45
	2							81.72±2.32	
15	1	0	0	0	1/50	15	25	92.27±1.22	92.45
	2							92.31±1.73	

<sup>1</sup> Expresado como el promedio ±DS

### a. ANÁLISIS DE ADECUACIÓN DEL MODELO

La adecuación del modelo se comprobó mediante la representación de los tres diagnósticos. Como se muestra en la Figura 11a, todos los puntos rodean la línea recta, y los residuos de las respuestas del porcentaje de recuperación de proteína soluble se ajustan a la distribución

normal, lo que revela que el modelo desarrollado presenta una buena aproximación al valor real de proteína recuperada. Los residuos frente al número de corridas (Figura 11b) se construyeron para investigar la respuesta y su ajuste satisfactorio. El diagnóstico mostró que todos los datos eran fiables, ya que estaban totalmente dentro el rango permitido ( $\pm 3.0$ ), es decir  $\pm 0.4$  (Liu *et al.*, 2022). La Figura de los valores predichos frente a los reales se presenta en la Figura 11c para estimar la compatibilidad del modelo.



**Figura 11: Gráficos de diagnóstico para la comprobación de la adecuación del modelo. Gráfico de probabilidad normal (a), los residuos frente al número de ejecuciones (b), y la predicción frente a la realidad (c)**

Los valores predichos y los valores reales ejercieron un alto grado de ajuste, ya que todos los datos se situaron sobre la línea recta. Mientras tanto, los resultados también mostraron que el modelo poseía un buen efecto de optimización en las condiciones de extracción de proteína a partir de las semillas de pajuro.

## b. MODELO MATEMÁTICO

La Ecuación 3 presenta el modelo matemático de segundo orden obtenido, el cual muestra la relación entre la variable respuesta (porcentaje de recuperación de proteína soluble) y los tres factores evaluados (relación MP/S, tiempo, temperatura).

$$\begin{aligned} \text{Recuperación de proteínas solubles (\%)} = & -113.03 + 4.784 \text{ MP/S} + 2.5435 \text{ Tiempo} \\ & + 5.910 \text{ Temperatura} - 0.047634 \text{ MP/S} * \text{MP/S} - 0.068767 \text{ Tiempo} * \\ & \text{Tiempo} - 0.10350 \text{ Temperatura} * \text{Temperatura} + 0.008933 \text{ MP/S} * \\ & \text{Tiempo} - 0.01152 \text{ MP/S} * \text{Temperatura} - 0.03381 \text{ Tiempo} * \\ & \text{Temperatura.} \end{aligned}$$

### **Ecuación 3: Modelo matemático resultante de la etapa de optimización**

El ANOVA del modelo cuadrático presentado en la Tabla 12 indica que es significativo ( $p < 0.05$ ). Para más detalles del análisis de varianza ver el Anexo 14.

**Tabla 12: Resultados del Análisis de Varianza del modelo cuadrático en la etapa de Optimización**

Fuente	Grado de Libertad	Suma de Cuadrados	Valor P
Modelo	9	625.04	0.000
Lineal	3	213.40	0.000
Cuadrático	3	505.44	0.000
Interacción	3	31.90	0.000
Error	20	1.439	
Falta de Ajuste	3	0.415	0.114
Error Puro	17	1.02	
Total	29	626.48	
R <sup>2</sup>	0.9977		
R <sup>2</sup> ajustado	0.9976		

Respecto al modelo, este presentó una falta de ajuste no significativo ( $p > 0.05$ ), indicando que los resultados experimentales se ajustan de forma adecuada al modelo para predecir el porcentaje de proteínas solubles recuperadas y que el orden del modelo es el adecuado (Gutiérrez, 2012).

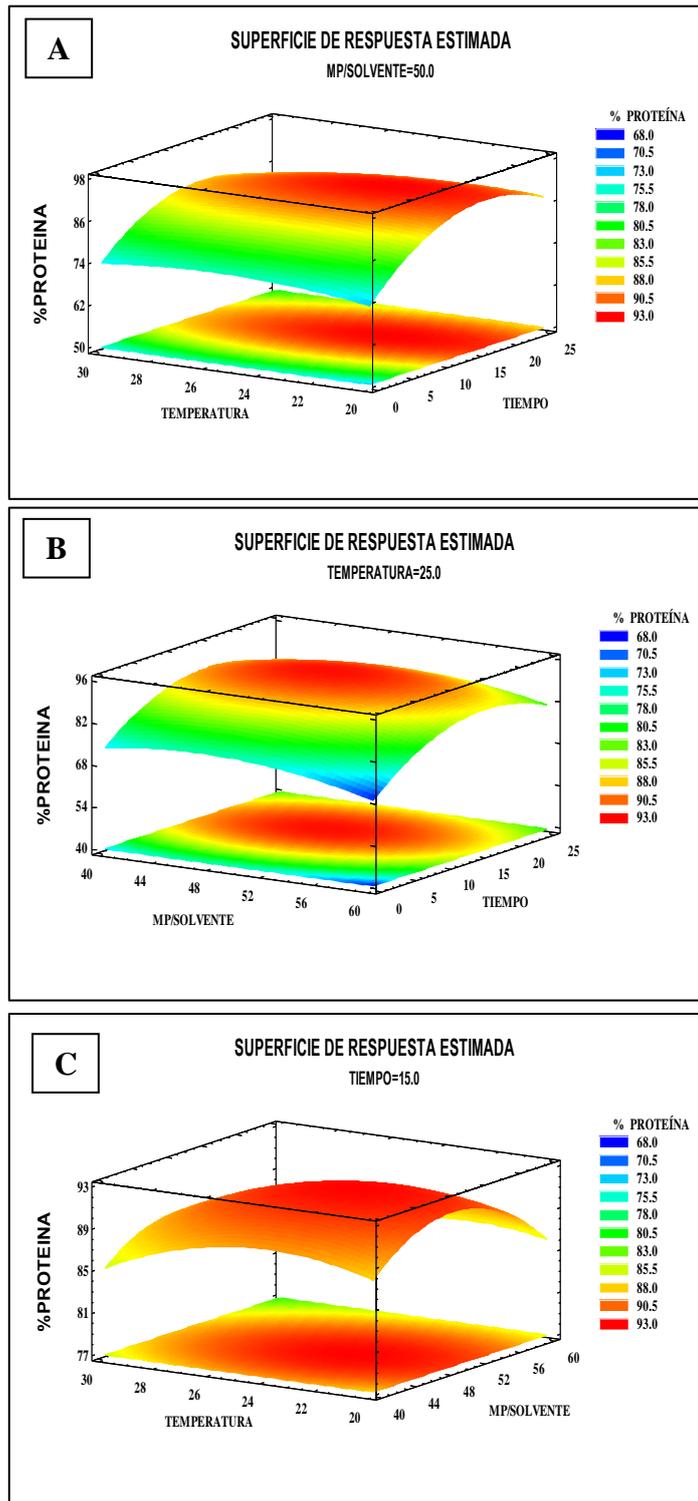
En cuanto al error puro, se aprecia que la suma de cuadrados es poco significativa si se compara al error total lo cual permite inferir que existe buena reproducibilidad en el punto central (Aquino, 2015).

El coeficiente de determinación  $R^2$  ajustado explica que el 99.76 por ciento de la variabilidad de los resultados es explicado por el modelo cuadrático. El coeficiente de determinación  $R^2$  es un buen indicador de cercanía entre los valores obtenidos por el modelo y los experimentales.

### **c. SUPERFICIE DE RESPUESTA**

La Superficie de Respuesta (tridimensional) presentada en la Figura 12, se elaboró a partir del modelo cuadrático (Ecuación 3), a fin de representar los efectos principales e interacciones de los factores independientes respecto a la variable respuesta. El objetivo fue identificar las condiciones óptimas que maximicen la variable respuesta las cuales fueron MP/S, 1/49 g/mL; tiempo de extracción, 16 min y temperatura, 23 °C con un porcentaje de recuperación de proteínas solubles estimado de 92.87 por ciento.

Los gráficos de la Figura 12 se desarrollaron manteniendo constante un factor, mientras que los dos factores restantes variaron dentro del rango experimental. De las superficies de respuestas se observa que la temperatura presentó un comportamiento cuadrático (Figura 12 a y c) al igual que el tiempo (Figura 12 a y b), así también tiempos oscilantes entre los 15 min resultaron positivos. La combinación de temperaturas cercanas a los 30°C con tiempos de extracción prolongados resultó tener efectos negativos sobre la variable respuesta (área verde), al igual que los tiempos cortos (sin embargo, estos presentaron el mismo comportamiento en todo el rango de temperatura estudiada).



**Figura 12:** Gráficos de las superficies de respuesta y contornos para los efectos de: Temperatura vs Tiempo (a); MP/S vs Tiempo (b) y Temperatura vs MP/Solvente (c)

La mayoría de las proteínas son lábiles al calor, por lo que se desnaturalizan y agregan con el mismo, por el contrario, algunas proteínas, llamadas proteínas estables al calor son

resistentes y permanecen en su estado soluble al calentarse (López, 2014). En base a lo expuesto, se puede inferir que las proteínas de semillas de pajuro son sensibles a temperaturas altas y que sumado a los tiempos de exposición largos propician una caída del porcentaje de proteína soluble recuperado como consecuencia de la desnaturalización proteica. Las condiciones óptimas de tiempo y temperatura se aproximan a las condiciones de Arango *et al.* (2012), quién extrajo la mayor proporción de proteínas de semillas de pajuro durante los primeros 20 min a temperatura ambiente.

Respecto a la relación MP/S, presentó un comportamiento cuadrático frente a los factores tiempo y temperatura (Figura 12 b y c) suponiendo un comportamiento favorable óptimo a combinaciones de temperatura y tiempo intermedios. Al respecto, Arango *et al.* (2012) en la extracción de proteína de semillas de pajuro obtuvieron una tendencia lineal creciente entre el porcentaje de proteína soluble recuperado y la relación MP/S en el rango de 1/20 - 1/40 g/mL, aunque los autores en mención no estudiaron el comportamiento más allá de la relación 1/40 g/mL, la tendencia lineal obtenida hacía suponer que aún no se había llegado al punto óptimo para este factor. Por lo tanto, en base a lo obtenido se puede inferir que la condición óptima para el factor relación MP/S se localizaría en 1/49 g/mL, guardando relación con el comportamiento encontrado por los autores en mención.

En conclusión, las superficies mostradas en la Figura 12, muestran en general resultados favorables en tiempos cortos cercanos a 16 min, temperaturas oscilantes a la ambiental y relación MP/S circundante a 1/49 g/mL.

#### **4.2.3. VALIDACIÓN DEL MODELO**

Las condiciones óptimas brindadas por el modelo matemático fueron validadas de forma experimental a fin de determinar el grado de cercanía entre el valor predicho y el experimental. La Tabla 13 muestra resultados favorables de cercanía entre los valores obtenidos de forma experimental para los tratamientos realizados y los resultados del modelo matemático (predicho).

Para determinar si ambos valores eran estadísticamente iguales se realizó la prueba T-*Student* mostrada en la Tabla 14, se observó que ambos valores no presentaron diferencias

significativas ( $p > 0.05$ ), lo que lleva a aceptar la hipótesis nula ( $\mu_o=92.87$  por ciento). Por lo tanto, se valida el modelo obtenido por la MSR el cual puede ser usado para describir adecuadamente la relación entre los factores y las respuestas, siempre y cuando se trabaje en cualquier condición que se encuentre dentro de la zona experimental analizada.

**Tabla 13: Valor predicho y experimental del porcentaje de recuperación de proteínas solubles bajo condiciones óptimas**

Factores	Condiciones óptimas <sup>1</sup>	Proteína soluble recuperada (%)	
		Predicho	Experimental <sup>2</sup>
Temperatura (°C)	23		
Relación MP/S (g/mL)	1/49	92.87	92.70±0.55
Tiempo (min)	16		

<sup>1</sup>Recomendadas por el modelo de segundo orden

<sup>2</sup> expresado como el promedio ±DS

**Tabla 14: Prueba T-Student para la etapa de Validación**

Variable	N	Media	Desviación Estándar	Error estándar de la media	T	p
Proteína soluble recuperada (%)	3.00	92.70	0.55	0.314	-0.53	0.648

### 4.3. ETAPA 3: CARACTERIZACIÓN DEL AISLADO PROTEICO

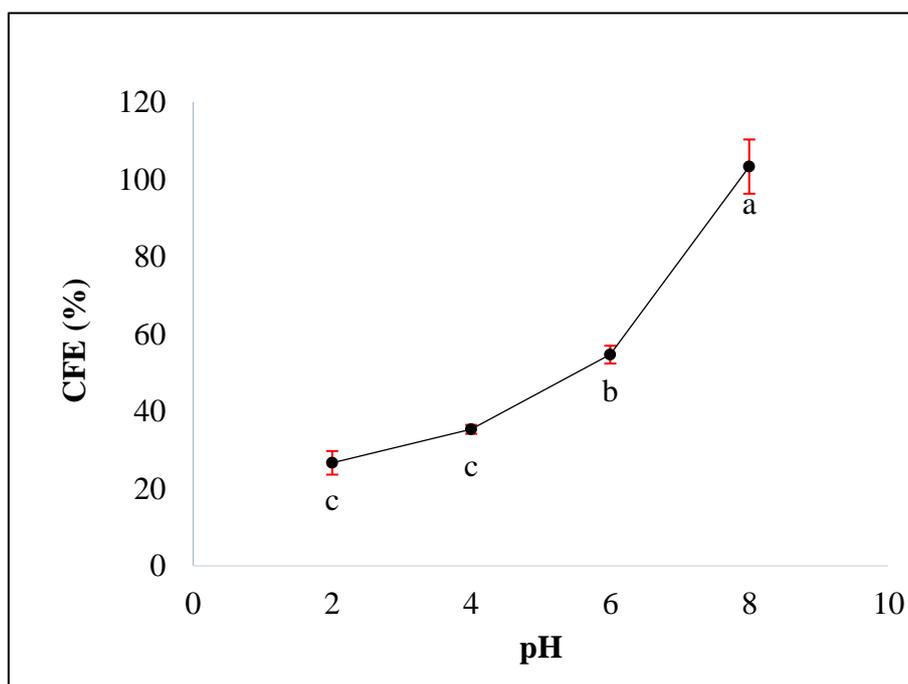
#### 4.3.1. PROPIEDADES TECNO-FUNCIONALES

##### a. CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE ESPUMA (CFE)

Se observó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos, así mismo mediante la prueba de comparación de medias no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos a pH 2 y 4 (ver Anexo 15). Los diferentes valores de la CFE presentaron un

comportamiento creciente respecto al pH tal y como lo muestra la Figura 13, presentando valores de 26.67, 35.33, 54.67 y 103.33 por ciento a pH 2, 4, 6 y 8, respectivamente, todos bajo una concentración aislado/H<sub>2</sub>O al 1 por ciento.

Orihuela (2017) al determinar la CFE de aislado proteico de semillas de pajuro obtuvo un valor máximo de 68 por ciento a pH 9, valor inferior al obtenido en esta investigación a pH 8 (103.33 por ciento). Cabe señalar que, el autor en mención trabajó con un aislado que tenía una pureza proteica de 68.97 por ciento (en la presente investigación el aislado obtenido tuvo una pureza de 92.45 por ciento). Al respecto Breña (2018) menciona que la concentración de proteína influye en el volumen de espuma a formar de manera positiva, es decir, a mayor concentración de proteína el volumen de espuma será mayor. Por lo tanto, se puede deducir que las condiciones elegidas de extracción y el grado de pureza del aislado permitieron obtener un aislado con una buena CFE.



**Figura 13: Variación de la CFE del aislado de proteína de pajuro a diferentes pH**

Se han reportado CFE máximas del aislado de semillas como: quinua con 130 por ciento a pH 9 para la variedad chupaca y 96.7 a pH 9 para la variedad jacha (Steffolani, 2016), tarwi, 51.18 por ciento a pH 8 (Breña, 2018); soya, 48.2 y sachá inchi con 55 por ciento a pH 8

(Mercado *et al.*, 2015), frijol negro y morado con 27.2 y 28 por ciento, respectivamente, a pH 8 (Teniente *et al.*, 2019) y frijol de palo con 20 por ciento a pH 8 (Aliaga, 2019). De acuerdo a lo expuesto, se puede inferir que el aislado proteico de semillas de pajuro presentó mejor CFE que todas las semillas mencionadas anteriormente, a excepción de la quinua variedad chupaca.

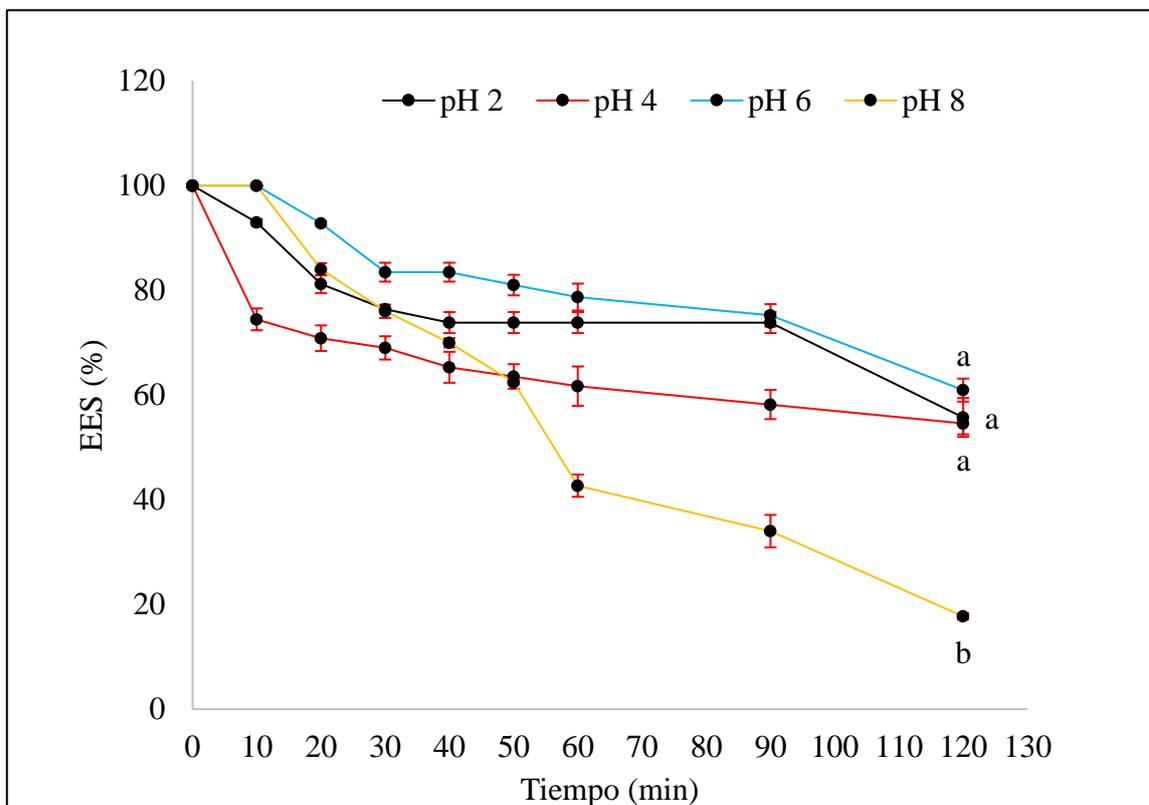
El comportamiento de la CFE respecto al pH fue creciente. Al respecto Lawal *et al.* (2005) explican que el pH alcalino genera un aumento en la carga neta de la proteína que debilita la interacción hidrófoba, incrementando la solubilidad de la proteína, permitiendo que se extienda a la interfaz aire-agua más rápidamente, encapsulando las partículas de aire y aumentando así la formación de espuma. Sin embargo, a medida que se acerca al PI (punto isoeléctrico) la carga neta en la estructura de la proteína es mínima, lo cual la hace menos soluble aumentando la tensión superficial, reduciendo la adsorción de la proteína en la interfaz aire-agua lo que lleva a una reducción de la CFE (Jayasena *et al.*, 2010). Por su parte, Badui (2013) menciona que la CFE está relacionada con la flexibilidad que pueda tener la molécula de proteína, permitiéndole realizar rápidamente cambios conformacionales que da como resultado la rápida difusión a la interfaz aire-agua para encapsular partículas de aire y mejorar la formación de espuma. De lo citado, se puede afirmar que las proteínas de semillas de pajuro poseen flexibilidad a pH alcalino permitiéndole encapsular partículas de aire y dando como resultado una mayor CFE.

#### **b. ESTABILIDAD DE ESPUMA (EES)**

Tal como se muestra en la Figura 14, existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos para la EES luego de 2 h, así también la prueba de comparación de medias no encontró diferencias significativas entre los tratamientos a pH 2, 4 y 6 (ver Anexo 16).

La EES luego de 2 h fue 55.73, 54.85, 60.88 y 17.63 por ciento a pH 2, 4, 6 y 8, respectivamente. Se aprecia así mismo que en general los tratamientos con pH 2, 4 y 6 mantuvieron poco más de la mitad de la espuma formada inicialmente y el tratamiento más alcalino a pesar haber formado una mayor cantidad de espuma inicial, fue el menos estable. Al respecto Mune y Sing (2015) obtuvieron 75.42 y 82.04 por ciento de EES en aislado proteico de semillas de frijoles cowpea y bambara, respectivamente, después de 1 h a pH 7,

valores similares a los obtenidos en la presente investigación (78.74 por ciento) a un mismo tiempo y a pH 6, lo cual indica similitudes para la ESS entre las semillas de pajuro y semillas de frijoles de otras variedades.



**Figura 14: Variación de la EES (%) del aislado de proteína de pajuro en el tiempo (min) a diferentes pH**

Se ha reportado la EES del aislado de semillas como: quinua pasankalla con 43.5 por ciento a pH 9 después de 1 h (Steffolani, 2016), sachá inchi con 30.78 por ciento a pH 8 luego de 2 h (Breña, 2018), así como, soya y sachá inchi 28 y 33.7 por ciento, respectivamente, a pH 8 después de 2 h (Mercado *et al.*, 2015). Al comparar las semillas mencionadas con el pajuro se observa resultados favorables para el pajuro respecto a otras semillas.

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento con mayor pH obtuvo una mayor CFE, sin embargo, fue el menos estable. Al respecto Jaimes *et al.* (2012) mencionan que el PI es una región en la cual las espumas estabilizadas por proteínas son más estables (mientras no se insolubilizan) puesto que en esta región o próxima, la escasa presencia de interacciones repulsivas favorece el establecimiento de interacciones proteína-proteína y la formación de

una película viscosa en la interfase soluble-insoluble, así también, aumenta la cantidad de proteína adsorbida en la interfase, debido a la ausencia de repulsiones entre la interfase y las moléculas que a ella se adsorbe. Steffolani (2016) expone que al evaluar la EES de quinua las variedades que presentaron mayores capacidades espumantes no fueron necesariamente los más estables y explica que las proteínas actúan como surfactantes en la espuma y su función es evitar el proceso de separación reteniendo las burbujas de aire finas. De acuerdo a lo manifestado, el comportamiento de EES en la presente investigación fue mejor a pH cercano a 4.5 (PI) y poco favorable cuando se alejó significativamente (pH 8) validando así expuesto por los autores en mención. Se puede afirmar por consiguiente que una alta CFE no aseguró una buena EES y aunque permitió una mejor solubilidad, aumentando la viscosidad y facilitando la formación de una película multicapa proteica cohesiva, la estabilidad se vio afectada al verse alejada del PI.

Martínez *et al.* (2011) afirman que es recomendable que la estabilidad de la espuma sea entre 50 a 70 por ciento dependiendo del producto para los sistemas alimenticios que requieren espuma como las tortas y helados. De acuerdo a lo expuesto, se puede inferir que la estabilidad a pH 2, 4 y 6 cumple estas condiciones y serían estos valores de pH los más recomendados a ser usados.

### **c. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA)**

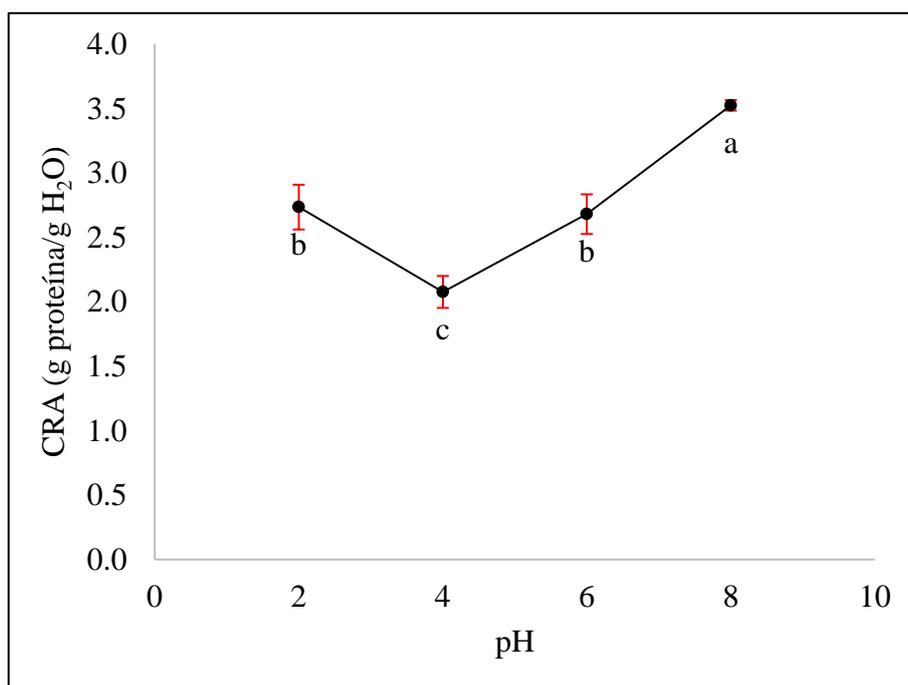
De acuerdo a lo observado en la Figura 15, se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos para la CRA, así mismo mediante la comparación de medias no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos a pH 2 y 6 (ver Anexo 17).

La CRA presentó los siguientes valores 2.73, 2.08 y 2.68 y 3.53 g H<sub>2</sub>O/g aislado a pH 2, 4, 6 y 8, respectivamente. Llegándose a encontrar que la CRA fue mínima cerca al PI e incrementó a medida que se alejó del mismo.

Asgar *et al.* (2010) mencionan que es usual que la CRA sea menor en el PI, debido a que en esta región de pH predominan las interacciones proteína-proteína desplazando así las interacciones proteína-agua, así mismo, añaden que valores lejanos del PI permiten que la carga neta del aislado se modifique y pueda hincharse reteniendo más agua. Al respecto

Glencross *et al.* (2010) afirman también que la CRA es mayor a valores lejanos del PI debido al aumento de fuerzas de repulsión entre proteínas. Se puede por lo tanto afirmar que la CRA del aislado proteico de semillas de pajuro presentó valores mínimos cerca del PI debido a la predominancia de las interacciones proteína-proteína.

Orihuela (2017) al determinar la CRA del aislado de semillas de pajuro obtuvo un valor máximo de 2.75 g H<sub>2</sub>O/g aislado, valor inferior al obtenido en la presente investigación (3.53 g H<sub>2</sub>O/g aislado); cabe mencionar que el autor en mención, trabajó bajo condiciones de extracción alcalinas (pH 11) superiores al de la presente investigación (pH 10), así también tiempos prolongados de extracción de 90 min. Como se mencionó en la etapa de *screening*, condiciones alcalinas superiores a pH 10 y tiempos prolongados de extracción pueden tener un efecto negativo sobre las propiedades tecno-funcionales de la proteína. En base a lo expuesto se puede afirmar que las condiciones de tiempo y pH elegidas favorecieron en tener una mejor CRA.



**Figura 15: Variación de la CRA (g H<sub>2</sub>O/g aislado) a diferentes pH**

Valores máximos de CRA (expresados en g H<sub>2</sub>O/g de aislado) han sido reportados por diferentes autores para aislados proteicos de: tarwi con 3.74 (Breña, 2018), quinua blanca con 6.1 (Steffolani *et al.*, 2016), sachá inchi con 4-5 (Mercado *et al.*, 2015), semillas de

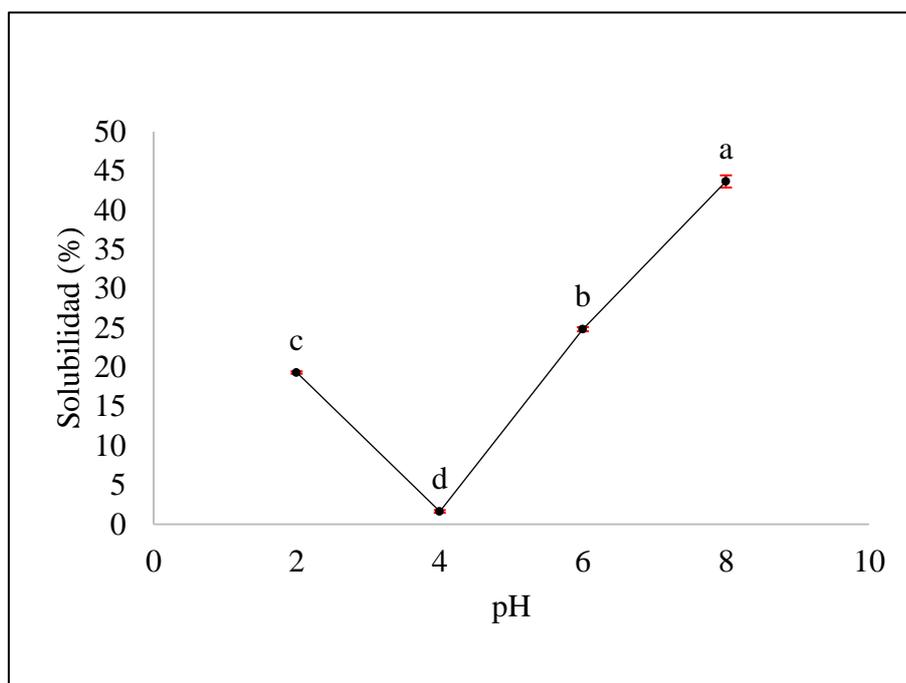
maracuyá con 2.7 (Martínez *et al.*, 2011), frijol morado y negro con 11.25 y 10.99, respectivamente, (Teniente *et al.*, 2019) y frijol de palo con 1.45 (Aliaga, 2019). La CRA máxima obtenida en esta investigación (3.53 g H<sub>2</sub>O/g de aislado) es inferior a la obtenida en quinua blanca, sachá inchi, frijol negro y morado, pero superior al tarwi, semillas de maracuyá y frijol de palo. Al respecto, Martínez *et al.* (2011) indican que una CRA mayor a 1.9 g de H<sub>2</sub>O/g aislado es lo deseable para un aislado proteico comercial, siendo así un punto a favor dado que el valor obtenido es superior al mínimo requerido.

La CRA es una propiedad que puede verse favorecida por la exposición de la proteína a temperaturas ligeramente más altas, al respecto, Akaerue y Onwuka (2010) señalan que aumentar ligeramente la temperatura de extracción mejora la CRA, puesto que, cuando la proteína se calienta los enlaces que mantienen sus estructuras secundarias y terciarias se debilitan; provocando que la mayoría de las moléculas de la proteína comiencen a desplegarse, generando un ligero aumento en la cantidad de agua retenida para interactuar con los grupos cargados, permitiendo interacciones extensas de ion-agua. Tal afirmación se puede ver reflejada en los valores reportados por Delgado-Soriano *et al.* (2020) quienes al evaluar la CRA a extruidos de harina de semillas de pajuro obtuvieron un valor de 7.57 g H<sub>2</sub>O/g extruido, mientras que Delgado y Albarracín (2014) al analizar harina de semillas de pajuro obtuvieron 3.67 g H<sub>2</sub>O/g de harina; de lo mencionado, se puede afirmar que la extrusión es una operación que añade calor y favorece por lo tanto en el incremento de la CRA del extruido respecto a la harina. Por consiguiente, es de importancia considerar la adición de calor al proceso de extracción de proteína a fin de mejorar la CRA, teniendo en cuenta también que el porcentaje de proteínas recuperadas durante la extracción puede disminuir, tal y como lo muestra la superficie de respuesta obtenida (ver Figura 12).

#### **d. SOLUBILIDAD**

Como se puede apreciar en la Figura 16, existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos para la solubilidad, así mismo mediante la prueba de comparación de medias se encontró diferencias significativas entre todos los tratamientos (ver Anexo 18).

La solubilidad obtenida fue de 19.32, 1.63, 24.84 y 43.65 por ciento a pH 2, 4, 6, y 8, respectivamente. La solubilidad fue mínima en el PI e incrementó a medida que se fue alejando del mismo.



**Figura 16: Variación de la solubilidad del aislado de proteína pajuero a diferentes pH**

Steffolani *et al.* (2016) en la determinación de la solubilidad de aislado de quinua obtuvieron valores mínimos en el PI cercanos a 10 por ciento, mientras que cuando el pH aumentó a 9 la solubilidad incrementó a 70 por ciento. El autor en mención señala que, las curvas del perfil de solubilidad de las proteínas son en forma de U y tienen un mínimo de solubilidad en la proximidad del PI y solubilidad alta a pH alcalino. Al respecto, Luyten *et al.* (2004) mencionan que la solubilidad de las proteínas depende en gran medida del pH, temperatura, fuerza iónica y concentración, añaden que cerca del PI, las proteínas son menos solubles porque la carga total neta es cerca de cero, y se produce una atracción entre proteínas. Por lo tanto, se puede inferir que la solubilidad de las proteínas de las semillas de pajuero será mínima en el PI.

Valores máximos de solubilidad han sido reportados para aislados de tarwi con 87.75 por ciento a pH 8 (Breña, 2018), quinua con 70 por ciento a pH 9 (Steffolani *et al.*, 2016), soya con 82.2 por ciento a pH 9.5, sachu inchi con 99.4 por ciento a pH 11 (Mercado *et al.*, 2015),

semilla de melón con 96.33 por ciento a pH 11 (Ogundele, 2010), frijol negro y morado con 93.37 y 88.43 por ciento a pH 12, respectivamente (Teniente *et al.*, 2019) y frijol de palo con 90 por ciento a pH 11 (Aliaga, 2019). Como se aprecia las solubilidades en mención dependen mucho del pH evaluado y son superiores al obtenido en la presente investigación (43.64 por ciento), donde el pH máximo al que se analizó fue 8 (valor por debajo de 9-11, valores citados).

Badui (2013) menciona que la solubilidad de una proteína depende del tipo de aminoácidos que contenga y la cantidad de residuos hidrofílicos presentes, además, es un indicador para considerar la incorporación de aislados proteicos a sistemas alimentarios, por lo tanto, se puede inferir que las proteínas de las semillas de pajuro serán más afines al agua a medida que el medio se alcaliniza. Sin embargo, para tener un mejor análisis es imprescindible considerar valores más extremos de pH alcalino a fin de tener una mejor comprensión y comparación de la solubilidad respecto a otras semillas y determinar también el grado de desnaturalización y precipitación durante el proceso de refinamiento. Para la presente investigación al tratarse de sistemas alimenticios no se consideró la evaluación a pH demasiado alcalinos.

Sánchez *et al.* (2017) mencionan que la solubilidad de las proteínas es requisito para lograr una mejor CFE, al aumentar la viscosidad y facilitar la formación de una película multicapa proteica cohesiva en la superficie de contacto, relación que indicaría el comportamiento que tuvo la CFE respecto al pH al verse favorecido a medida que se acercó a la alcalinidad.

#### **e. CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE ACEITE (CAA)**

La CAA obtenida fue 2.4 g aceite/g de aislado. Se han reportado aislados (expresados en g aceite/g aislado) de semillas como: tarwi con 1.76 (Breña, 2018), sachá inchi con 1.39, soya con 0.85 (Mercado *et al.*, 2015), frijol de palo con 1.2 (Aliaga, 2019), quinua jacha y pasankalla con 4.42 y 2.81, respectivamente (Steffolani *et al.*, 2016), así como, frijol negro y morado 17.79 y 15.21, respectivamente (Teniente *et al.*, 2019). Se aprecia que la CAA del aislado de las semillas de pajuro es superior al tarwi, sachá inchi, soya y frijol de palo, pero inferior al frijol morado y negro y la quinua jacha y pasankalla. Al respecto Sánchez *et al.* (2017) mencionan que las diferencias entre CAA se deben a las características

conformacionales, hidrofobicidad, presencia de grupos lipófilos y de aminoácidos no polares en las proteínas, añaden que la posible desnaturalización parcial de las proteínas durante la extracción, puede generar la exposición de grupos hidrófobos de aminoácidos. Aguilera (2010) explica que una mayor cantidad de cadenas laterales no polares en aislados proteicos incrementa la CAA. Por lo tanto, se puede atribuir la diferencia encontrada de CAA con otros alimentos a las diferentes conformaciones de las proteínas y estructura, así como, las condiciones de extracción que pudieran generar desnaturalización proteica.

Aguilera (2010) menciona que temperaturas de trabajo mayores a 45°C durante la extracción alcalina pueden ocasionar una disminución de la CAA dada la desnaturalización proteica, dicho efecto es apreciable en la comparación antes realizada dado que Breña (2018) y Mercado *et al.* (2015) utilizaron temperaturas de 50°C en la obtención del aislado respectivo, y como se aprecia sus valores de CAA obtenidos se encuentran entre los más bajos (respecto a los citados). Para la presente investigación la temperatura usada fue 23°C condición que no permitió la adición de calor favoreciendo así la CAA.

Mercado *et al.* (2015) reportan que los valores de CAA de diferentes marcas comerciales de aislados proteicos de soya van desde 1 hasta 1.95 g aceite/g aislado como mínimo, valor que al compararse con el obtenido supone estar dentro del rango citado. Schoeneberger *et al.* (2015) explican que la CAA es muy importante en la formulación de productos para freír, retención de los sabores; disminución de la rancidez oxidativa y aumento de la estabilidad durante el almacenamiento.

#### **f. CAPACIDAD DE EMULSIFICACIÓN (CE) Y ESTABILIDAD (EE)**

La CE obtenida fue 68.67 por ciento y la EE fue 91.30 por ciento después de 2 h. Se han reportado resultados de la CE y EE en aislados de las siguientes semillas: tarwi con 63.38 y 50.51 por ciento luego de 2 h (Breña, 2018), frijol negro con 33.59 y 96.15 por ciento, frijol morado con 32.54 y 89.97 por ciento luego de 30 min (Teniente *et al.*, 2019), frijol castilla con 56.06 y 99.6 por ciento, frijol bambara con 57.28 y 96.78 por ciento luego de 30 min (Mune y Singh, 2015), trigo con 67.01 y 70.28 luego de 30 min (Hassan *et al.*, 2010). Tal y como se aprecia el aislado de las semillas de pajuro presenta características similares a la CE del tarwi, trigo, y es ligeramente superior al frijol negro y morado, frijol de palo, frijol castilla

y frijol bambara. Así también la EE fue similar a los frijoles morado, negro, castilla, bambara, y superior al tarwi y trigo. En general se aprecia que las semillas de frijoles tienen una EE cercana al 100 por ciento, por lo cual la semilla de pajuro se encuentra también dentro de este rango, así mismo CE es variable aún en variedades del mismo tipo. Eltayeb *et al.* (2011) menciona que la estabilidad de emulsión depende del contenido de polielectrolitos, de lo cual se puede inferir que el aislado proteico de semillas de pajuro tiene mayor cantidad de estos polímeros que los alimentos con menor EE.

La cantidad adecuada de proteínas solubles en la solución es necesaria para promover la trampa de las gotas de aceite lo que resulta en un aumento de la CE; teóricamente, un aumento de la solubilidad de la proteína facilita la interacción entre las fases oleosa y acuosa (Chaparro *et al.*, 2014, Wu *et al.*, 2009). Al respecto Badui (2013) añade que se pueden tener buenos resultados en un rango de solubilidad desde un 25 hasta un 80 por ciento, aunque las proteínas altamente insolubles no funcionan como buenos emulsificantes. A pH 7 según la Figura 16 la solubilidad bordea el 35 por ciento estando dentro del rango citado, lo cual hace inferir que la solubilidad de las proteínas de semillas de pajuro favoreció a la CE.

El tipo de proteína tiene mucha influencia en esta capacidad, sin embargo, no solo se trata de cuán hidrófoba es una proteína dado que esta propiedad no siempre está ligada a la CAA, sino más bien de la flexibilidad molecular ya que la proteína debe ser capaz de contactar con las fases aceite y agua, modificando su conformación para quedar colocada en la interfase. Así mismo si se desnaturaliza parcialmente la proteína sin llegar a la insolubilización, se logrará una mejora de las propiedades emulsificantes pues se incrementan la flexibilidad molecular y la hidrofobicidad superficial favoreciendo la formación de películas altamente viscoelásticas en la interfase aceite-agua (Badui, 2013).

Hadnadjev *et al.* (2017) exponen que los aislados de proteínas obtenidos por procesos de la ultrafiltración son comúnmente de mejores propiedades tecno-funcionales en comparación con los aislados obtenidos por extracción alcalina, especialmente en sus propiedades emulsionantes. Sugiriendo así que el método de extracción influye sobre esta propiedad.

### 4.3.2. ÍNDICE DE BLANCURA (IB)

El color expresado en índice de blancura (IB) obtenido fue de 75.35 y 84.81 por ciento para la harina y para el aislado, respectivamente. Para llevar a cabo una adecuada comparación se calcularon los IB de los autores citados bajo la misma fórmula. Breña (2018) al evaluar harina y aislado de tarwi obtuvo 74.63 y 76.36 por ciento de IB, así mismo, Steffolani *et al.* (2016) obtuvieron 61.89 por ciento para aislado proteico de quinua blanca, y 45.79 por ciento para cañihua. El IB del aislado de semillas de pajuro fue superior a los alimentos citados, sugiriendo una mejora de estado del IB desde harina a aislado de cerca del 10 por ciento. Xu y Diosady (2002) mencionan que bajo condiciones alcalinas los polifenoles (presentes en las proteínas vegetales) tienden a oxidarse y posteriormente pueden reaccionar con la proteína dando como resultado un color verde oscuro o marrón en la solución de proteínas extraídas. En la presente investigación se llevaron a cabo dos lavados (agua y mezcla hidroalcohólica) con el objetivo de eliminar compuestos fenólicos y favorecer el IB. En base a lo obtenido se puede inferir que los lavados realizados permitieron evitar el efecto negativo de los polifenoles.

Otro factor que afecta también el IB es el contenido de pigmentos presentes, puesto que pueden extraerse de manera conjunta a las proteínas durante la etapa de extracción (Steffolani *et al.*, 2012). Estos mismos autores, al extraer proteínas de cañihua y quinua blanca obtuvieron aislados con IB de 45.79 y 60.42 por ciento, respectivamente, según explican la presencia de pigmentos en la cañihua ejerció un efecto negativo significativo respecto a la quinua. En base a lo expuesto, se puede inferir que la harina de semillas de pajuro tiene bajo contenido de pigmentos oscuros y permitió obtener un IB aceptable, a este factor se suma el método de secado usado, la liofilización, método que tiende a conservar de mejor forma las propiedades tecno-funcionales de los alimentos (Parzanese, 2012).

Múzquiz *et al.* (2011) indican que el color debe tomarse muy en cuenta al enriquecer harinas de cereales con aislados proteicos, puesto que se busca no alterar ni modificar el color de las harinas en los productos de panadería entre otros, siendo así un indicador de calidad en el producto. Montoya *et al.* (2012) al evaluar el IB de la harina comercial de trigo obtuvieron 87.36 por ciento, valor cercano al obtenido en la presente investigación (84.81 por ciento),

lo cual sugiere que el aislado de semillas pajuro puede usarse como complemento en formulaciones de productos de panadería y afines.

### 4.3.3. COMPOSICIÓN, RECUPERACIÓN PROTEICA Y RENDIMIENTO DEL AISLADO PROTEÍCO DE SEMILLAS DE PAJURO

El rendimiento de extracción respecto a la harina de semillas de pajuro fue de 12.22 por ciento, así mismo del total de proteínas contenidas en la harina, se recuperó el 57.59 por ciento obteniéndose un aislado final con una pureza de 92.45 por ciento de proteína, tal y como se puede apreciar en la Tabla 15.

**Tabla 15: Composición del aislado proteico, rendimiento y recuperación proteica de extracción**

Indicadores (%)	Valor <sup>1</sup>
Proteína	92.45±0.64
Ceniza	3.84±0.60
Rendimiento de extracción del proceso	12.22±0.59
Proteína recuperada del proceso	57.59±0.72

<sup>1</sup>Resultados expresados como el promedio ±DS

Orihuela (2017) en la extracción de proteínas de semillas de pajuro obtuvo un rendimiento y pureza (respecto a la cantidad de proteína) de 14.73 y 68.97 por ciento, respectivamente, tras 90 min de extracción a pH 9. Por su parte Arango *et al.* (2012) trabajaron con harina de semillas de pajuro de 18.4 por ciento de proteínas, extrayendo el 60 por ciento de estas a un tiempo de 60 min a una relación 1/40 MP/S. Al comparar los resultados obtenidos con los citados se observa cierta similitud respecto al rendimiento de extracción y proteína recuperada, sin embargo, existe una diferencia notable cuando se hace la comparación de pureza y tiempo extracción. La pureza obtenida está muy por encima de lo obtenido por Orihuela (2017), lo cual da a entender que el método de purificación usado en la presente investigación fue el adecuado, así mismo respecto al factor tiempo, el obtenido mediante superficie de respuesta fue de 16 min, tiempo muy por debajo a los usados por los autores citados, siendo así un punto positivo de optimización al reducir los tiempos de extracción,

así como, evitar el largo contacto de la proteína a pH alcalinos que puedan tener un impacto negativo en su tecno-funcionalidad.

El porcentaje de proteína recuperada obtenida mediante la superficie de respuesta fue de 92.7 por ciento (proteína soluble) y el obtenido tras obtener el aislado fue de 57.59 por ciento. Si se comparan ambos valores difieren considerablemente. Durante la fase experimental de superficie de respuesta la velocidad de centrifugado luego de la extracción, fue de 4000 RPM durante 15 min, mientras que en la fase de obtención de aislado proteico la velocidad usada fue de 2000 RPM durante 30 min, dado que para obtener el aislado proteico se requería manejar volúmenes más grandes y el equipo disponible tenía la limitante de trabajar como máximo a 2000 RPM lo cual representó una desventaja puesto que no permitió recuperar en su totalidad la proteína separada, así mismo, el método de Lowry solo cuantifica las proteínas solubles y no contempla las operaciones de precipitación y lavado que como toda operación unitaria generan mermas y pérdidas propias del proceso, es así que los factores velocidad de centrifugado, y mermas posteriores a la cuantificación de proteína soluble mediante Lowry tuvieron un impacto negativo en el porcentaje de proteína recuperada.

#### **4.3.4. USOS RECOMENDADOS DEL AISLADO PROTEICO DE SEMILLAS DE PAJURO**

- a. Capacidad de Formación de Espuma y Estabilidad:** Los resultados obtenidos fueron favorables y se recomienda su uso en merengues, tortas y helados.
- b. Capacidad de Retención de Agua:** Se recomienda su uso en productos cárnicos, pulpas de frutas congeladas, hamburguesas, quesos, pasteles y panes.
- c. Capacidad de Absorción de Aceite:** En base a las características favorables obtenidas para esta propiedad se recomienda su uso en productos de panadería bajos en grasa y productos para freír.
- d. Capacidad de Emulsión y Estabilidad:** Se obtuvieron resultados favorables para esta propiedad y por lo tanto se recomienda su uso en alimentos como mayonesas, aderezos y helados.

## V. CONCLUSIONES

1. Las características físico-químicas de la harina de semillas de pajuro fueron: humedad 8.27; proteína total 19.62; grasa 0.76; fibra cruda 1.53; ceniza; 5.34, extracto libre de nitrógeno 72.73 e índice de blancura 75.35 por ciento. Resultados expresados en base seca (bs).
2. Las condiciones óptimas de extracción obtenidas mediante la metodología de Superficie de Respuesta fueron: relación MP/S 1/49 g/mL; temperatura 23 °C y tiempo 16 min; recuperándose máximo de 92.70 g de proteína soluble/100 g de proteína total.
3. El modelo matemático obtenido tuvo un coeficiente de correlación ( $R^2_{\text{ajustado}} = 0.9976$ ) cercano al valor ideal (1) y sugiere que los valores estimados por el modelo son consistentes estadísticamente.
4. Se obtuvo un aislado proteico con una pureza en proteínas de 92.45 por ciento (bs), índice de blancura de 84.81 por ciento y rendimiento de extracción de 12.22 g aislado/100 g harina.
5. Las propiedades tecno-funcionales del aislado proteico de semillas de pajuro que se mostraron superiores en general a otras semillas fueron: CFE con 103.33 por ciento a pH 8, EES con 60.88 por ciento pH 6, CRA con 3.53 g H<sub>2</sub>O/g aislado a pH 8, CAA con 2.4 g aceite/g aislado, CE con 68.67 por ciento y EE con 91.30 por ciento, mientras que la Solubilidad bajo las condiciones evaluadas se mostró inferior con 43.64 por ciento a pH 8.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Determinar el perfil aminoacídico y la calidad nutricional del aislado proteico de semillas de pajuro optimizado.
- Identificar el tipo de proteínas extraídas.
- Evaluar el comportamiento del aislado proteico de semillas de pajuro en diferentes matrices alimenticias de acuerdo a sus propiedades tecno-funcionales.
- Evaluar el uso y potencial de los subproductos generados durante el proceso de extracción proteica de pajuro.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acero, C. (2002). Guía para el cultivo y aprovechamiento del Chachafruto o Balú. (*Erythrina edulis*) Triana ex Micheli. España: Convenio Andrés Bello.
- Aguilera, Y. (2010). Harinas de leguminosas deshidratadas: Caracterización nutricional y valoración de sus propiedades tecno-funcionales (Tesis de pregrado, Universidad Autónoma de Madrid). Recuperada de <http://hdl.handle.net/10486/4180>
- Adeva-Andany, M., Fernández-Fernández, C., Carneiro-Freire, N., Vila-Altesor, M., Ameneiros-Rodríguez, E. (2022). The differential effect of animal versus vegetable dietary protein on the clinical manifestations of diabetic kidney disease in humans. *Science Direct*, 48(2022), 21-25. doi: 10.1016/j.clnesp.2022.01.030
- Ahmad, M., Tahir, A., & Salman, R. (2020). Heat stability of proteins and its exploitation for purification of heat-stable proteins. *School of Life Sciences, Forman Christian College (A Chartered University)*, 1-14. Recuperado de: <https://www.preprints.org/manuscript/202008.0225/v1>
- Ahmed, S., & Babiker E., Mohamed Ahmed., Eltayeb, M., & Ahmed, S. (2012). Effect of Sodium Chloride Concentration on the Functional Properties of Selected Legumes flour. *African Journal of food*, 12 (6). Recuperado de: <https://www.ajol.info/index.php/ajfand/article/view/82786>
- Ahmed, N., Ali, A., Riaz, S., Ahmad, A., Aqib, M. (2021). Vegetable Proteins: Nutritional Value, Sustainability, and Future Perspectives. *Research Gate*, 1-14. doi: 10.5772/intechopen.100236
- Akaerue, B., & Onwuka, G. (2010). Evaluation of the yield, protein content and functional properties of Mungbean (*Vigna radiata Wilczek*) protein isolates as affected by processing. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(8), 728-735. doi: 10.3923/pjn.2010.728.735
- Aliaga, P. (2019). Optimización del proceso y caracterización físico química de aislado proteico de frijol de palo. (*Cajanus cajan l.*) (Tesis de pregrado, Universidad

- Nacional de San Martín). Recuperado de:  
<https://repositorio.unsm.edu.pe/handle/11458/3340>
- Álzate, E., Quintero, V., & Lucas, J. (2013). Determinación de las propiedades térmicas y composicionales de la harina y almidón de chachafruto (*Erythrina Edulis Triana Ex Micheli*). *Temas Agrarios*, 18 (2), 21-35. Recuperado de:  
<https://revistas.unicordoba.edu.co/index.php/temasagrarios/article/view/714/830>
- AOAC. (Asociation of Official Analytical Chemist). (2016). *Official Methods of Analysis* (20°ed.). Washington, United State.
- AOAC. (Asociation of Official Analytical Chemist). (2019). *Official Methods of Analysis*. (21°ed.). Washington, United State.
- Aquino, E. (2015). Optimización del proceso de extracción de las proteínas de la torta de sachá inchi (*Plukenetia volubilis L.*) (Tesis de maestría, Universidad Nacional Agraria la Molina). Recuperado de:  
<http://revistas.laMolina.edu.pe/index.php/acu/article/view/777>
- Arango, O., Bolaños, V., Ricaurte, D., Caicedo, M., & Guerrero, Y. (2012). Obtención de un extracto proteico a partir de harina de chachafruto (*Erythrina edulis*). *Revista universidad y salud*, 14(2), 161-167. Recuperado de:  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0124-71072012000200006](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-71072012000200006)
- Aredo, V., Carranza, J., & Siche, R. (2017). Inventario de especies vegetales de la Libertad (Perú) y análisis de su potencial agroindustrial. *Agroindustrial Science*, 7(2), 98. Recuperado de: <https://1library.co/document/y8k89pwy-inventario-especies-vegetales-libertad-peru-analisis-potencial-agroindustrial.html>
- Asgar, M., Fazilah, A., Huda, N., Bhat, R., & Karim, A. (2010). Nonmeat protein alternatives as meat extenders and meat analogs. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 513-529. doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00124.x
- Astiasarán, I., & Martínez, J. (2002). *Alimentos composición y propiedades*. España: McGrall-Hill Interamericana.
- Atalah, E., & Araya, H. (2011). Informe: Utilización de hidrolizados de subproductos de pescado en la alimentación humana. Chile. Recuperado de  
[https://www.academia.edu/9742508/INFORME\\_UTILIZACION\\_DE\\_LOS\\_HIDROLIZADOS\\_PROTEICOS\\_DE\\_SUBPRODUCTOS\\_DE\\_PESCADO\\_EN\\_LA\\_ALIMENTACION\\_HUMANA\\_Elaborado\\_para\\_Fundacion\\_B3n\\_Chile\\_por](https://www.academia.edu/9742508/INFORME_UTILIZACION_DE_LOS_HIDROLIZADOS_PROTEICOS_DE_SUBPRODUCTOS_DE_PESCADO_EN_LA_ALIMENTACION_HUMANA_Elaborado_para_Fundacion_B3n_Chile_por)

- Badui, S. (2013). *Química de los alimentos* (5°ed.). México: Pearson.
- Barrera, M., & Mejía, M. (1998). Chachafruto, balú, sachaporoto., *Erythrina edulis*, Triana: Pasado, Presente y Futuro, (3), 1-15. Recuperado de: <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/4120/1/Chachafruto%2C%20pasado%2C%20presente%20y%20futuro.pdf>
- Baune, M., Terjung, N., Tülbek, M., Boukid, F. (2022). Textured vegetable proteins (TVP): Future foods standing on their merits as meat alternatives. *Science Direct*, 6(2022). doi: 10.1016/j.fufo.2022.100181
- Bessada, S., Barreira, J., & Oliveira, B. (2019). Pulses and food security: Dietary protein, digestibility, bioactive and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 93:53–68. doi: 1016/j.tifs.2019.08.022
- Bonino, J., Cagnassi, L., Giudicci, A., Ibarra, J., Oriolani, P., Vidal, A., Molina, M. (2016). Caracterización fisicoquímica de aislados de proteínas vegetales. *Universidad Católica Argentina*, 14(14). Recuperado de: <https://repositorio.uca.edu.ar/bitstream/123456789/5739/1/caracterizacion-aislados-proteinas-vegetales.pdf>
- Breña, D. (2018). Obtención de un aislado proteico de torta de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) y evaluación de sus propiedades tecno-funcionales (Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria la Molina). Recuperado de <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3802/bre%C3%B1a-diaz-daniel-angel.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Castel., M. (2010). Estudio de las propiedades funcionales, tecnológicas y fisiológicas de las proteínas de amaranto (Tesis de maestría, Universidad Nacional del Litoral). Recuperada de <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/tesis/bitstream/handle/11185/212/tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Castillo, V. (2013). Diseño y cálculo de un agitador de fluidos (Tesis de pregrado, Universidad del Bío Bío). Recuperado de: [http://repobib.ubiobio.cl/jspui/bitstream/123456789/412/1/Castillo\\_Uribe\\_Vladimir.pdf](http://repobib.ubiobio.cl/jspui/bitstream/123456789/412/1/Castillo_Uribe_Vladimir.pdf)
- Chaparro, S., Tavera, M., Martínez, J., & Gil, J. (2014). Functional Properties of flour and protein isolates from *Annona muricata* seeds. *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica*, 17(1), 151-159. doi: 10.31910/rudca. v17.n1.2014.950

- Chaquilla, G., Balandrán, R., Mendoza, A., & Mercado, J. (2017). Propiedades y posibles aplicaciones de las proteínas de salvado de trigo. *Ciencia UAT*, (12-2), 137-147. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/322973438\\_Propiedades\\_y\\_posibles\\_aplicaciones\\_de\\_las\\_proteinas\\_de\\_salvado\\_de\\_trigo](https://www.researchgate.net/publication/322973438_Propiedades_y_posibles_aplicaciones_de_las_proteinas_de_salvado_de_trigo)
- Constantina, G. (2003). *Extraction Optimization in Food Engineering*. United States: CRC PRESS.
- Delgado, N., & Albarracín, W. (2014). Microestructura y propiedades funcionales de harinas de quinua (*Chenopodium Quinoa*, W) y chachafruto (*Erythrina edulis*): Potenciales extensores cárnicos. *Vitae*, 19(1), 430-432. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169823914135.pdf>
- Delgado, V. (2018). Calidad proteica de las semillas de pajuro (*Erythrina edulis*, Triana) sometidas a cocción tradicional y extrusión (Tesis de maestría, Universidad Nacional Agraria la Molina). Recuperada de <http://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/1370562>
- Delgado-Soriano, V., Cortés, P., Guevara, A., & Vílchez, C. (2020). Características físico-químicas de las semillas de pajuro (*Erythrina edulis*, Triana) y propiedades funcionales después de la extrusión. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 22(3), 263 – 273. doi: 10.18271/ria.2020.660
- Delgado-Soriano, V., Cortés, P., Guevara, A., & Vílchez, C. (2022). Digestibilidad proteica de semillas de Pajuro (*Erythrina edulis*, Triana) sometidas a cocción tradicional. *Journal of High Andean Research*, 24(2), 75-83. doi: 10.18271/ria.2022.333
- Eltayeb, A., Ali, A., Abou, A., & Abu, F. (2011). Chemical composition and functional properties of flour and protein isolate extracted from Bambara groundnut (*Vigna subterranean*). *African Journal of Food Science*, 5(2), 82-90. Recuperado de: <https://academicjournals.org/journal/AJFS/article-full-text-pdf/9CE9E2E2819>
- Escamilo, S. (2012). El pajuro (*Erythrina edulis*) alimento andino en extinción. *Investigaciones Sociales*, 16 (28), 97-103. doi:10.15381/is.v16i28.7389
- Espinoza, G. (2018). Análisis químico proximal de granos y harina de “Pajuro” (*Erythrina edulis*) y elaboración de una bebida proteica con sabor a chocolate (Tesis de pregrado, Universidad Peruana Cayetano Heredia). Recuperada de: [https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/3764/Analisis\\_EspinozaCordova\\_Gaby.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/3764/Analisis_EspinozaCordova_Gaby.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la alimentación). 2017. El futuro de la alimentación y la agricultura: tendencias y desafíos. Recuperado de: <https://www.fao.org/3/i6881s/i6881s.pdf>
- FEN (Fundación Española de la Nutrición). (2017). Informe sobre Legumbres, Nutrición y Salud. Recuperado de: <https://www.fen.org.es/storage/app/media/imgPublicaciones/informe-legumbres-nutricion-y-saludvw.pdf>
- Fennema, O., Parkin, K., & Samodaran, S. (2010). Química de los alimentos (3° ed.). España: Acirbia.
- Fernández, S. (2020). Diseño de Experimentos: Diseño factorial (Tesis de maestría, Universidad Politécnica de Catalunya). Recuperado de: [https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/339723/TFM\\_Fernandez\\_Ba\\_o\\_Sheila.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/339723/TFM_Fernandez_Ba_o_Sheila.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Flores, V., Chuk, C., De la Rosa, M., Orona, J., Rodríguez, W., & Salinas, A. (2016). Rendimiento de extracción de proteína y algunos análisis funcionales de concentrados y aislados de lenteja, haba y garbanzo producidos en una planta piloto. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(2), 68-72. Recuperado de: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/2/1/13.pdf>
- Föste, M., Elgeti, D., Brunner, A., Jekle, M., & Becker, T. (2015). Isolation of quinoa protein by milling fractionation and solvent extraction. *Food and Bioproducts Processing*, 96(1), 20-26. doi:10.1016/j.fbp.2015.06.003
- Franca, O., Fornari, T., & Hernandez, B. (2021). A Review on the Extraction and Processing of Natural Source-Derived Proteins through Eco-Innovative Approaches. *Processes*, 9(9), 1-24. doi: 10.3390/pr9091626
- Fuentes, E., Pérez, A., & Sánchez, E. (2009). Efecto de la concentración de aditivos e ingredientes sobre el color de pastas de merluza (*Merluccius australis*) tratadas térmicamente. *Óptica Pura y Aplicada*, 42(1), 9-21. Recuperado de: [https://www.sedoptica.es/Menu\\_Volumenes/Pdfs/323.pdf](https://www.sedoptica.es/Menu_Volumenes/Pdfs/323.pdf)
- Fuentes, O. (2018). Caracterización nutricional del porotón (*Erythrina edulis*) en dos etapas fenológicas y su potencial productivo en el cantón Rumiñahui (Tesis de maestría, Universidad de Fuerzas Armadas). Recuperada de <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/14894>

- GBIF Backbone Taxonomy. (2022). *Caryodendron orinocense* Karst. Recuperado de: [10.15468/39omei](https://doi.org/10.15468/39omei)
- Gamarra, R. (2019). Efecto de la temperatura de secado y las condiciones de almacenamiento sobre la calidad organoléptica de la harina de lúcuma (*Pouteria lucuma*) tipo seda (Tesis de pregrado, Universidad San Ignacio de Loyola). Recuperado de: <https://repositorio.usil.edu.pe/server/api/core/bitstreams/bbaa52b2-78e7-4a5d-a5d9-080b24ca0344/content>
- Gao, Z., Shen, P., Yang, L., Cui, L., Bom, J., Chen, B., & Rao, J. (2020). Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea protein isolate. *Food Research International*, 131(4). doi: [10.1016/j.foodres.2020.109045](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109045)
- Geankoplis, C., Hersel, A., & Lepek, D. (2018). *Transport Processes and Separation Process Principles* (5<sup>o</sup>ed.). Estados Unidos: Editorial Pearson. Recuperado de: [https://www.academia.edu/49073469/Transport\\_Processes\\_and\\_Separation\\_Process\\_Principles\\_Fifth\\_Edition\\_CHRISTIE\\_JOHN\\_GEANKOPLIS\\_A\\_ALLEN\\_HERSEL\\_DANIEL\\_H\\_LEPEK](https://www.academia.edu/49073469/Transport_Processes_and_Separation_Process_Principles_Fifth_Edition_CHRISTIE_JOHN_GEANKOPLIS_A_ALLEN_HERSEL_DANIEL_H_LEPEK)
- Glencross, B., Sweetingham, M., & Hawkins, W. (2010). A digestibility assessment of pearl lupin (*Lupinus mutabilis*) meals and protein concentrates when fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 303(14), 59-64. doi: [10.1016/j.aquaculture.2010.03.015](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.03.015)
- Goncalves, N., Vioque, J., Clemente, A., Sánchez-Vioque, R., Bautista, J., & Millán, F. (1997). Obtención y caracterización de aislados proteicos de colza. *Revista Grasas y Aceites*, 48(5), 282-289. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/26523743\\_Obtencion\\_y\\_aplicaciones\\_de\\_concentrados\\_y\\_aislados\\_proteicos](https://www.researchgate.net/publication/26523743_Obtencion_y_aplicaciones_de_concentrados_y_aislados_proteicos)
- Govardhan, R., Ogunsina, B., & Radha, C. (2011). Protein extractability from defatted *Moringa Oreifera* Lam. *Ife Journal of Science*, 13(01), 121-127. Recuperado de: <https://www.ajol.info/index.php/ij/s/article/view/131210>
- Guerra-Almonacid, C., Torruco-Uco, J., Murillo-Arango, W., Méndez-Arteaga, J. & Rodríguez-Miranda, J. (2019). Effect of ultrasound pretreatment on the antioxidant capacity and antihypertensive activity of bioactive peptides obtained

- from the protein hydrolysates of *Erythrina edulis*. Emirates Journal of Food and Agriculture, 31(4), 288–296. doi: 10.9755/ejfa. 2019.v31.i4.1938
- Gutiérrez, H. (2012). Análisis y diseño de experimentos (3° ed.). México: Mc Graw Hill.
- Hadnadjev, M., Dapčević Hadnađev, T., Pojić, M., Jovanov, M., & Sakač, M. (2017). Progress in vegetable proteins isolation techniques: A review. Food and Feed Research, 44 (1), 11-21. doi: 10.5937/FFR1701011H
- Hassan, H., Afify, A., Basyiony, A., Ahmed, G., & Ghada, T. (2010). Nutritional and functional properties of defatted wheat protein isolates. Australian Journal Basic and Applied Science, 4(2), 348-358. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/306409012\\_Nutritional\\_and\\_Functional\\_Properties\\_of\\_Defatted\\_Wheat\\_Protein\\_Isolates](https://www.researchgate.net/publication/306409012_Nutritional_and_Functional_Properties_of_Defatted_Wheat_Protein_Isolates)
- Hussein, A., Hussein, M., Salama, M., Hamed, I., Fouda, K. & Mohamed, R. (2018). Formulation and Evaluation of Functional Cookies for Improving Health of Primary School Children. Pakistan Journal of Biological Sciences, 21, 401–408. doi: 10.3923/pjbs.2018.401.408
- Ismail, Y.S., Lopez-Leiva, M., & Baboo, M. (1991). Optimization of Extraction of Peanut Proteins with Water by Response Surface Methodology. Journal of Food Science, 56 (6), 1660-1663. doi: 10.1111/j.1365-2621. 1991.tb08665.x-
- Jaimes, J., Retrepo, D., & Acevedo, D. (2012). Propiedades funcionales de aislados proteicos de leguminosas. Revisiones de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos, 11(2). Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/258519853\\_Propiedades\\_funcionales\\_de\\_aislados\\_proteicos\\_de\\_leguminosas](https://www.researchgate.net/publication/258519853_Propiedades_funcionales_de_aislados_proteicos_de_leguminosas)
- Jarpa-Parra, M., Bamdad, F., Wang, Y., Tian, Z., Temelli, F., Han, J., & Chen, L. (2014). Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. Food Science and Technology, 57(2), 461-469. doi: 10.1016/j.lwt.2014.02.035
- Jayasena, V., Chih, H., & Nasar, S. (2010). Functional properties of sweet lupin protein isolated and tested at various pH levels. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 6(2), 130-137. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/50427579\\_Functional\\_Properties\\_of\\_Sweet\\_Lupin\\_Protein\\_Isolated\\_and\\_Tested\\_at\\_Various\\_pH\\_Levels](https://www.researchgate.net/publication/50427579_Functional_Properties_of_Sweet_Lupin_Protein_Isolated_and_Tested_at_Various_pH_Levels)

- Klupsaite, D; Juodeikiene, & G. (2015). Legume: Composition, protein extraction and functional properties. *Kauno technologijus universitetas*, 1(66), 1231-1392. doi: 10.5755/j01.ct.66.1.12355
- Kumar, M., Tomar, M., Potkule, J., Verma, R., Punia, S., Mahapatra, A., & Kennedy, J. (2021). Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. *Food Hydrocolloids*, 115(1). doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106595
- Lacerda, R., Makishib, G., Chambib, H., Bittanteb, A., Gomidea, C., Costab, P., & Sobralb, P. (2014). Castor Bean (*Ricinus communis*) Cake Protein Extraction by Alkaline Solubilization: Definition of Process Parameters. *Chemical Engineering Transactions*, 37, 775-780. doi: 10.3303/CET1437130
- Lawal, O.S., Adebawale, K.O., Ogunsanwo, B.M., Sosanwo, O.A., & Bankole, S.A. (2005). On the functional properties of globulin and albumin protein fractions and flours of African locust bean (*Parkia biglobossa*). *Food Chemistry*, 92(4), 681–691. doi:10.1016/j.foodchem.2004.08.043
- León, L., Dávila, G., Martínez, C., & Hernández, H. (2013). Sequentially Integrated Optimization of the Conditions to Obtain a High-Protein and Low-Antinutritional Factors Protein Isolate from Edible *Jatropha curcas* Seed Cake. *ISRN Biotechnology*, 2013, 1-5. doi: 10.5402/2013/197201
- Lestari, D., Mulder, W., & Sanders, J. (2010). Improving *Jatropha curcas* seed protein recovery by using counter current multistage extraction. *Biochemistry Engineering Journal*, 50(1), 16-23. doi: 10.1016/j.bej.2010.02.011
- Liu, Z., Li, H., Zhu, Z., Huang, D., Qi, Y., & Ma, C. (2022). Cinnamomum camphora fruit peel as a source of essential oil extracted using the solvent-free microwave-assisted method compared with conventional hydrodistillation. *Food Science and Technology*, 153. doi: 10.1016/j.lwt.2021.112549
- López, E. (2014). Aminoácidos y Proteínas (Tesis de pregrado, Universidad Nacional de San Agustín. Recuperado de: <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/6553/IALomej.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- López, L. (2012). Extracción de proteínas a partir de hojas y semillas de *Pentacalia nítida* y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto proteico acuoso. (Tesis de bachiller, Pontificia Universidad Javeriana). Recuperado de:

<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/11802/LopezQuimbayoLinaDaniela2012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Lowry, O., Rosebough, N., Lewistarr, A., & Randall, R. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal Biological Chemical*, 193(1), 265-275. Recuperado de: <https://developmentalbiology.wustl.edu/wp-content/uploads/2018/10/Lowry-1951-2fwrw0a.pdf>
- Luyten, H., Vereijken, J., & Buecking, M. (2004). Using proteins as additives in foods: an introduction. Woodhead Publishing Ltd, 421-441. doi: 10.1533/9781855738379.3.421
- Luna, M. (2019). Evaluación del efecto de la adición de extracto de proteína del salvado de arroz sobre las propiedades fisicoquímicas, sensoriales, reológicas y en el almacenamiento de una galleta libre de gluten (Tesis de pregrado, Universidad de Costa Rica). Recuperado de: [https://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/86163/CITA\\_Tesis\\_AdicionExtractoProteina.pdf?sequence=1](https://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/86163/CITA_Tesis_AdicionExtractoProteina.pdf?sequence=1)
- Márquez, A. (2007). Elaboración y evaluación de un producto de panificación con harina de cebada (Tesis de pregrado, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo). Recuperado de: <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/604/Elaboracion%20y%20evaluacion%20producto%20cebada.pdf?sequence=1>
- Martínez, G. (2019). Metodología de Superficie de Respuesta (MSR). Recuperado de: <https://github.com/CristinaGil/Ciencia-de-Datos-R>
- Martínez, J., Medina, O., & Zambrano, R. (2011). Estudio fisicoquímico funcional de los aislados proteicos en semillas de maracuyá (*Passiflora edulis F*). *Bistua. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 9(1), 70-76. Recuperado de: [https://revistas.unipamplona.edu.co/ojs\\_viceinves/index.php/BISTUA/article/view/32/32](https://revistas.unipamplona.edu.co/ojs_viceinves/index.php/BISTUA/article/view/32/32)
- Martínez, D., Hernández, B., Amigo, L., Miralles, B., & Gómez, A. (2013). Extraction/Fractionation techniques for proteins and peptides and protein digestion. *Food microbiology and food safety*, 2(2), 21-50. Recuperado de: [https://www.academia.edu/70116676/Extraction\\_Fractionation\\_Techniques\\_for\\_Proteins\\_and\\_Peptides\\_and\\_Protein\\_Digestion?from\\_sitemaps=true&version=2](https://www.academia.edu/70116676/Extraction_Fractionation_Techniques_for_Proteins_and_Peptides_and_Protein_Digestion?from_sitemaps=true&version=2)

- Melo, O., López, L., & Melo, S. (2020). *Diseño de Experimentos, Métodos y Aplicaciones* (2°ed.). Colombia: Universidad Nacional de Colombia: Facultad de Ciencias.
- Mera, L. (2018). Optimización de la extracción de proteína de Cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) utilizando la metodología de superficie de respuesta (Tesis de pregrado, Universidad Nacional Agraria la Molina). Recuperado de: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3710/mera-oyola-lizbeth.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Mercado, J., Elías, C., & Pascual, G. (2015). Obtención de un aislado proteico de torta de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) y evaluación de sus propiedades tecnológicas. *Anales científicos*, 76(1), 166-167. doi: 10.21704/ac.v76i1.777
- MINAGRI (Ministerio de Agricultura y Riego, PE). (2010). Pajuro, pisonay, papus, pashuro, pashullo. Recuperado de: <https://www.agrorural.gob.pe/pajuro-pisonay-papus-pashuro-pashullo/>
- Minitab, (2019). Diseño de experimentos. Recuperado de: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/supporting-topics/factorial-and-screening-designs/factorial-and-fractional-factorial-designs/>
- Molina, K. (2018). Influencia de pH en la extracción de aislado proteico de quinua (*Chenopodium quinoa willd*) de la variedad blanca de juli y pasankalla (Tesis de pregrado, Universidad Nacional del Altiplano). Recuperado de: [http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/8652/Molina\\_Paredes\\_Ka\\_relly\\_Estefany.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/8652/Molina_Paredes_Ka_relly_Estefany.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Montgomery, D. (2004). *Diseño y análisis de experimentos* (2° ed.). México: Limusa Wiley.
- Montoya, L., Giraldo, G., & Lucas, J. (2012). Determinación del índice de blancura en harina de trigo comercial. *Vitae*, 19 (1), 415-416. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169823914130.pdf>
- Mune, M., Mbome, I., Minka, S. (2010). Optimization of protein concentrate preparation from Bambara bean using response surface methodology. *Journal of Food Process Engineering*, 33, 398-412. doi: 10.1111/j.1745-4530.2008.00281.x
- Mune, M., & Singh, D. (2015). Emulsifying and Foaming Properties of Protein Concentrates Prepared from Cowpea and Bambara Bean Using Different Drying

- Methods. *International Journal of Food Properties*, 19(2), 371–384. doi: 10.1080/10942912.2015.1023399
- Múzquiz, M., Guillamon, E., Burbano, C., Pascual, H., Cabellos, B., Cuadrado, C., & Pedrosa, M. (2011). Chemical composition of a new *Lupinus* species found in Spain, *Lupinus mariae-josephi* H. Pascual (Fabaceae). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9(4), 1233-1244. doi: 10.5424/sjar/20110904-515-10
- NTP (Norma Técnica Peruana). (2011). 205.003:1980 (Revisada el 2011).
- Ogundele, J. (2010). Proximate composition and some functional properties of three varieties of *Lagenaria siceraria* melon seeds. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 6(2), 108-112. Recuperado de: <http://www.aensiweb.net/AENSIWEB/rjabs/rjabs/2010/108-112.pdf>
- Onsaard, E., Pomsamud, P., & Audtum, P. (2010). Functional properties of sesame protein concentrate from sesame meal. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 3(4), 420-431. Recuperado de: <https://www.thaiscience.info/journals/Article/AFAI/10850274.pdf>
- Orihuela, E. (2017) Influencia del pH y tiempo en la extracción del aislado proteico de basul (*Erythrina edulis*) (Tesis de pregrado, Universidad Nacional José María Arguedas). Recuperada de [https://repositorio.unajma.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14168/251/Eufemia\\_Tesis\\_bachiller\\_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unajma.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14168/251/Eufemia_Tesis_bachiller_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Padilla, S. (1995). Manejo agroforestal andino. Recuperado de <https://docplayer.es/24166876-Manejo-agroforestal-andino.html>
- Palma-Albino, C., Intiquilla, A., Jiménez-Aliaga; Rodríguez-Arana, N., Solano, E., Flores, E., ...Hernández-Ledesma, B. (2021). Albumin from *Erythrina edulis* (Pajuro) as a Promising Source of Multifunctional Peptides. *Antioxidants*, 10: 1722. doi: 10.3390/antiox10111722
- Parzanese, M. (2012). Tecnologías para la Industria Alimentaria: Liofilización de alimentos. *Alimentos Argentinos*. Recuperado de: [https://www.academia.edu/33988471/Tecnolog%C3%ADas\\_para\\_la\\_Industria\\_Alimentaria\\_Liofilizaci%C3%B3n\\_de\\_alimentos](https://www.academia.edu/33988471/Tecnolog%C3%ADas_para_la_Industria_Alimentaria_Liofilizaci%C3%B3n_de_alimentos)
- Pastor, S., Fuentealba, B., & Ruiz, M. (2006). Cultivos subutilizados en el Perú: Análisis de las políticas públicas relativas a su conservación y uso sostenible. Recuperado de: [https://spda.org.pe/?wpfb\\_dl=62](https://spda.org.pe/?wpfb_dl=62)

- Pérez, G., Martínez, C., & Díaz, E. (1979). Evaluación de la Calidad de la proteína de la *Erythrina edulis* (BALU). Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 29(2), 197. Recuperado de: <https://www.alanrevista.org/ediciones/1979/2/>.
- Pérez, C., Cruz, R., Chel, L., & Betancur, D. (2006). Caracterización física de extruidos preparados con mezclas de harinas de maíz QPM (*Zea mays L.*) y frijol Lima (*Phaseolus lunatus L.*). Revista mexicana de Ingeniería Química. 5(2), 145-155. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/620/62050205.pdf>
- Pérez, B., Garrido, J., Endara, A., Landázuri, A., & Ramírez, L (2021). Optimization of the extraction and precipitation process of a leaf protein concentrate from *Moringa oleifera Lam.* Revista Facultad Nacional de Agronomía. 75(1). doi: 10.15446/rfnam. v75n1.95163
- Ponce, J., Málaga, J., Huamani, A., & Chuqui, S. (2016). Optimización de la concentración de la  $\alpha$ -amilasa y lactosuero en el mejoramiento de las características tecnológicas, nutricionales y sensoriales del pan francés. Agroindustrial Science, 6(2), 185-194. doi: 10.17268/agroind.science.2016.02.03
- Poveda, E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. Revista Chilena de Nutrición, 40(4), 397-403. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46929416011>
- Preece, K., Hooshyar., N., & Zuidam., N. (2017). Whole soybean protein extraction processes: A review. Science direct. 43, 163-172. doi: 10.1016/j.ifset.2017.07.024.
- Qin, D., Wang, Y., Wu, Y., Kong, X., Liu, L., Li, Z., & Xi, J. (2021). Optimization of protein extraction from watermelon seeds by liquid-phase pulsed discharge based on energy input for scale-up application. Food Science and Technology, 107, 2411-2502. doi: 10.1016/j.lwt.2021.112355
- Ramírez, D., Moreno, M., Curbelo, C., & Crespo, L. (2016) Influencia del tamaño de partícula y la velocidad de agitación sobre el rendimiento de pectina. Revista Cubana de Farmacia, 50(1), 1561-2988. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152016000100009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152016000100009)
- Ruiz, G. A., Xiao, W., Van Boekel, M., Minor, M., & Stieger, M. (2016). Effect of extraction pH on heat-induced aggregation, gelation and microstructure of protein isolate from quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*). Food Chemistry, 209, 203–210. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.052

- Sai-Ut, S., Ketnawa, S., Chaiwut, P., & Rawdkuen, S. (2009). Biochemical and functional properties of proteins from red kidney, navy and adzuki beans. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2(4), 493-504. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/242600283\\_Biochemical\\_and\\_functional\\_properties\\_of\\_proteins\\_from\\_red\\_kidney\\_navy\\_and\\_adzuki\\_beans](https://www.researchgate.net/publication/242600283_Biochemical_and_functional_properties_of_proteins_from_red_kidney_navy_and_adzuki_beans)
- Sánchez, A., Ruiz, J., Dávila, G., & Jiménez, C. (2017). Propiedades tecno-funcionales y biológicas de harina, aisladas y fracciones proteicas mayoritarias de semillas de Inga paterno. *Ciencia Tecnología y Ambiente: Journal of Food*, 15(3), 400-408. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6069796>
- Sari, Y., Mulder, W., Sanders, J., & Bruins, M. (2015). Towards plant protein refinery: Review on protein extraction using alkali and potential enzymatic assistance. *Biotechnology journal*, 10(8), 1138-1157. doi: 10.1002/biot.201400569
- Sathe, S. K., Deshpande, S. S. & Salunkhe., D. K. (1982). Functional properties of lupin seed (*Lupinus mutabilis*) proteins and protein concentrates. *Journal of Food Science*, 47(2), 491-497. Recuperado de: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301971017>
- Schoeneberger, H., Gross, R., Cremer, D., & Elmadfa, E. (2015). Composition and protein quality of Lupin Mutabilis. *Journal of Nutrition*, 112(1), 70-77. Recuperado de: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19830887727>
- Shen, L., Wang, X., Wang, Z., Wu, Y., & Chen, J. (2008). Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food Chemistry*, 107(15), 929-938. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.08.047
- Silva, S., Crisóstomo, O., Alvarez, E., Mendoza, G., Rondan, L., & Rubio, J. (2015). Evaluación de propiedades tecno-funcionales que provee la harina de pajuro (*Erythrina edulis*) a las redes estructurales de Muffins. Lima. Perú.
- Sogi, D.S., Garg, S.K., & Bawa, A.S. (2002). Functional properties of seed meals and protein concentrates from tomato-processing waste. *Journal of Food Science*, 67(8), 2997- 3001. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb08850.x
- Steffolani, L., Lares, P., Repo-Carrasco, R., & Pérez, G. (2012), Caracterización fisicoquímica y funcional de aislados proteicos de distintas variedades de Quinoa (*Chenopodium quinua*) y ecotipos de Cañihua (*Chenopodium pallidicaule*). Recuperado de:

[https://www.conicet.gov.ar/new\\_scp/detalle.php?keywords=&id=23898&inst=yes&congresos=yes&detalles=yes&congr\\_id=1745492](https://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=23898&inst=yes&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=1745492)

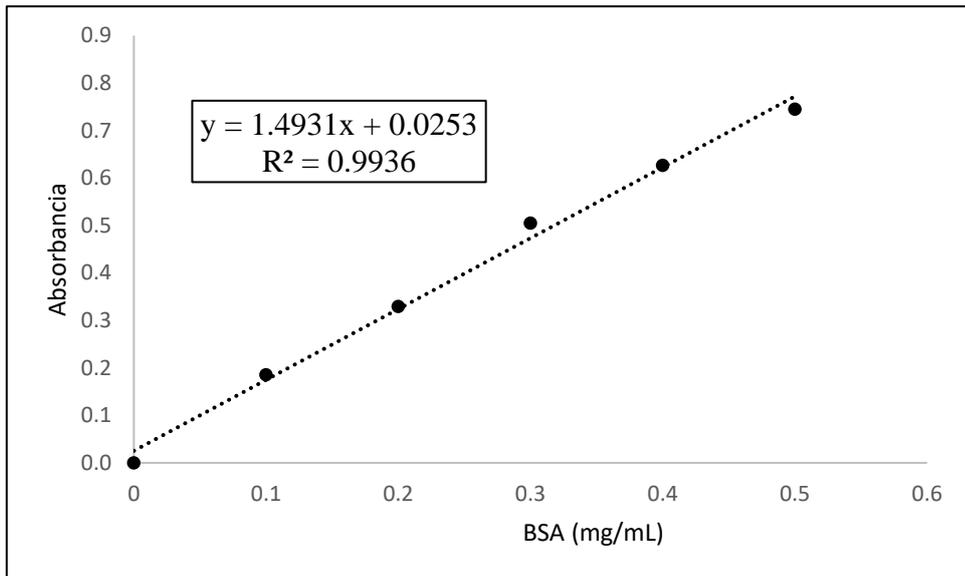
- Steffolani, M., Villacorta, P., Morales-Soriano, ER, Repo-Carrasco, R., León, AE & Pérez., GT (2016), Caracterización fisicoquímica y funcional de proteínas aisladas de diferentes variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). CCHEM, 93, 275- 281. doi: 10.1094/CCHEM-04-15-0083-R
- Tan, S., Mailer, R., Blanchard, C., & Agboola, S. (2011) Canola proteins for human consumption: extraction, profile, and functional properties. J Food Science, 76, 16–28. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01930.x
- Tapia, M., & Fries, A. (2007). Guía de campo de los cultivos andinos. Recuperado de: [https://www.academia.edu/34873981/GUpor%20cientoC3por%20ciento8DA\\_D E\\_CAMPO\\_DE\\_LOS\\_CULTIVOS\\_ANDINOS.pdf](https://www.academia.edu/34873981/GUpor%20cientoC3por%20ciento8DA_D E_CAMPO_DE_LOS_CULTIVOS_ANDINOS.pdf)
- Tello, A. (2018). Estudio de la actividad antioxidante de aislados proteicos de harina de haba pallar (*Phaseolus lunatus* L.) y su digestibilidad gástrica y duodenal (in vitro). (Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato). Recuperado de: <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/28380/3/BQ%20160.pdf>
- Teniente-Martínez, G., González-Cruz, L., Hernández-Galván, A.N., Juárez-Goiz, J.M.S., & BernardinoNicanor, A. (2019). Propiedades funcionales del aislado proteínico de dos variedades de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*). Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos, 4, 48-55. Recuperado de: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume4/4/1/7.pdf>
- Theerakulkait, C., Chaiseri, S., & Mongkolkanchanasiri, S. (2006). Extraction and Some Functional Properties of Protein Extract from Rice Bran. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, 40, 209-214. Recuperado de: <https://www.thaiscience.info/journals/Article/TKJN/10471361.pdf>
- Umaña, J, Alvarez, C., Lopera, S., Gallardo, C. (2013). Caracterización de harinas alternativas de origen vegetal con potencial aplicación en la formulación de alimentos libres de gluten. Revista Alimentos Hoy, 22(29), 33-46. Recuperado de: [https://acta.org.co/acta\\_sites/alimentoshoy/index.php/hoy/article/view/230/223](https://acta.org.co/acta_sites/alimentoshoy/index.php/hoy/article/view/230/223)
- USDA (*United States Department American*). (1987). *Erythrina Edulis* Triana. Recuperado de: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=15740>

- Vallejos, Y. (2018). Obtención de concentrados proteicos de la harina de arveja (*Pisum sativum*) y determinación de su actividad antioxidante por el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato). Recuperado de: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27136/1/AL%20657.pdf>
- Vargas, E. (2016). Caracterización fisicoquímica de pan molde blanco con sustitución parcial de harina de pajuro (*Erythrina edulis*) (Tesis de pregrado, Universidad Peruana Unión). Recuperado de: [https://repositorio.upeu.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12840/438/Emigdio\\_Tesis\\_bachiller\\_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.upeu.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12840/438/Emigdio_Tesis_bachiller_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Vega, M., Farias, F., Peraça, R., Augusto, W., & Valmor, C. (2017). Extracción optimizada y purificación parcial de invertasa aislada de *S. Cerevisiae* en puré de durazno. *Revista brasileira de fruticultura*, 40 (2). Recuperado de: <https://www.scielo.br/j/rbf/a/JmMk6sY3RbnGZvnP7xTmPYn/?lang=es>
- Velásquez, L., Montoya, D., Jiménez, A., Murillo, W. & Méndez, J. (2019). Género *Erythrina*: actualidad en la investigación y perspectivas de desarrollo científico. Universidad del Tolima. Tolima, Colombia. Recuperado de: <https://bit.ly/3eWzPYZ>
- Vieira, C., Biasutti, E., Capobianco, M, Afonso, W, & Silvestre, M. (2006). Efectos de la sal sobre la solubilidad y las propiedades emulsionantes de la caseína y sus hidrolizados trópticos. *ARS Pharm*, 47 (3), 281-292. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10481/27941>
- Villafuerte, F., Pérez, E., Mahfoud, A., Valero, Y., & Pérez, A. (2019). Obtención de hidrolizados proteicos bajos en fenilalanina a partir de suero dulce de leche y chachafruto (*Erythrina edulis* Triana). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 69(1), 22-33. doi: 10.37527/2019.69.1.004
- Wang, M., Jiang, L., Li, Y., Liu, Q., Wang, S., & Sui, X. (2011). Optimization of extraction process of protein isolated from mung bean. *Science direct*, 15, 5250-5258. doi: 10.1016/j.proeng.2011.08.973
- Wani, A.A., Kaur, D., Ahmed, I., & Sogi, D.S. (2008). Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 41 (8), 1514-1520. doi: 10.1016/j.lwt.2007.10.001

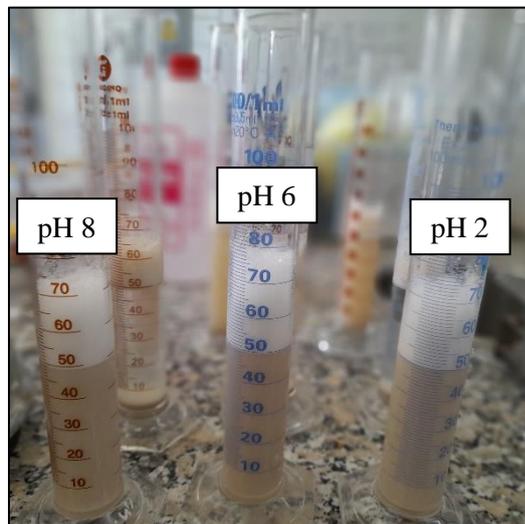
- Wu, H., Wang, Q., Ma, T., & Ren, J. (2009). Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein. *Food Research International*, 42 (3) 343–348. doi: 10.1016/j.foodres.2008.12.006
- Xu, L. & Diosady, L.L. (2002). Removal of phenolic compounds in the production of highquality canola protein isolates. *Food Research International*, 35 (1), 23-30. doi: 10.1016/S0963-9969(00)00159-9.
- Yongjae, L., Haerang, C., & Jong-Bang, E. (2015). Protein Extraction and Purification of Soybean Flakes and Meals Using a Lime Treatment Followed by Ultrafiltration. *International Journal*, 5(3), 2249-6645. Recuperado de: [http://www.ijmer.com/papers/Vol5\\_Issue3/Version-3/B0503\\_03-0715.pdf](http://www.ijmer.com/papers/Vol5_Issue3/Version-3/B0503_03-0715.pdf)
- Yu-Wei, C., Inteaz, A., Aline, T., Yasuo, K., & Joyce, I. (2012). Isolation and charecterization chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed proteins fractions. *Food Bioprocess Technol*, 5(2), 618-625. doi: .1007/s11947-009-0303-y
- Zabaleta, W., Millones, C., Torres, E., & Vásquez, E. (2010). Sustitución parcial de harina de trigo (*Triticum aestibum*. L.) con harina y pasta de pajuro (*Erythrina Edulis* Triana) para la elaboración de pan enriquecido. *SciELO*, 3(1), 75-80. doi: 10.32911/as. 2010.v3. n1.424
- Zhang, C., Sanders, J., & Bruins, M. (2014). Critical parameters in cost-effective alkaline extraction for high protein yield from leaves. *Biomass and Bioenergy*, 67, 466-472. doi: 10.1016/j.biombioe.2014.05.020
- Zhang C, Sanders J, Xiao T & Bruins M. (2015). How does alkali aid protein extraction in green tea leaf residue: a basis for integrated biorefinery of leaves *Plos Onemm*, 10(7). doi: 10.1371/ journal. pone.0133046
- Zuo, M., Liu, X., Liu, D., Zhao, H, Xuan, L., Jiang, W., & Li, W. (2018). Extraction, Characterization and Antioxidant Activity in vitro of Proteins from Semen *Allii Fistulos*. *Molecules*, 23(12), 3235. doi: 10.3390/molecules23123235

## VIII. ANEXOS

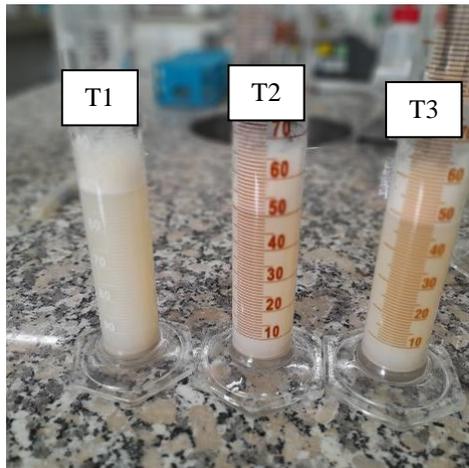
### ANEXO 1: CURVA ESTÁNDAR DE ALBÚMINA DE SUERO BOVINA



### ANEXO 2: ESTABILIDAD DE ESPUMA LUEGO DE 50 min



### **ANEXO 3: CAPACIDAD DE EMULSIFICACIÓN**



### **ANEXO 4: USO DEL MOLINO ROTOR PARA LA MOLIENDA DE PAJURO**



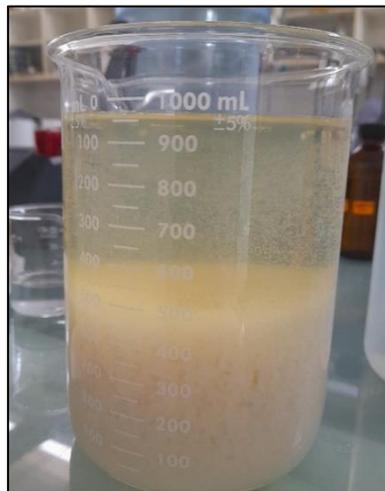
### **ANEXO 5: EXTRACCIÓN PROTEICA DE LA HARINA DE SEMILLAS DE PAJURO**



**ANEXO 6: PROTEÍNA SOLUBILIZADA LISTA PARA LA PRECIPITACIÓN**



**ANEXO 7: SOLUCIÓN PROTEICA AJUSTADA A pH ISOELÉCTRICO**



**ANEXO 8: COÁGULO PROTEICO LUEGO DE SER CENTRIFUGADO**



## ANEXO 9: ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS A LIOFILIZAR



## ANEXO 10: MUESTRA ANTES Y DESPUÉS DEL SECADO POR LIOFILIZACIÓN



**ANEXO 11: CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE PROTEÍNA SOLUBLE  
RECUPERADO EN LA ETAPA DE SCREENING**

N°	Abs.	R	Cant. usada (g)	Vol. (mL)	mg (proteína) /mL (muestra)	Proteína extraída (mg)	Proteína en cant. usada (mg)	Recuperación proteica (%)	Promedio
	0.271		1	47.2	3.291	155.34	180	86.30	
1	0.269	1	1	47.2	3.264	154.08	180	85.60	86.77
	0.277		1	47.2	3.372	159.14	180	88.41	
	0.269		1	47.2	3.264	154.08	180	85.60	
2	0.275	2	1	47.2	3.345	157.87	180	87.71	86.18
	0.268		1	47.2	3.251	153.45	180	85.25	
	0.289		1	46.9	3.532	165.66	180	92.03	
3	0.296	1	1	46.9	3.626	170.06	180	94.48	92.85
	0.289		1	46.9	3.532	165.66	180	92.03	
	0.287		1	47	3.505	164.76	180	91.53	
4	0.29	2	1	47	3.546	166.65	180	92.58	91.65
	0.285		1	47	3.479	163.50	180	90.83	
	0.402		1	26.1	5.046	131.70	180	73.17	
5	0.4	1	1	26.1	5.019	131.00	180	72.78	72.45
	0.393		1	26.1	4.925	128.55	180	71.42	
	0.399		1	26	5.006	130.15	180	72.30	
6	0.397	2	1	26	4.979	129.45	180	71.92	72.14
	0.399		1	26	4.999	129.97	180	72.21	
	0.391		1	26.2	4.899	128.34	180	71.30	
7	0.393	1	1	26.2	4.925	129.04	180	71.69	72.21
	0.403		1	26.2	5.059	132.55	180	73.64	
	0.389		1	26.6	4.872	129.59	180	71.99	
8	0.383	2	1	26.6	4.791	127.45	180	70.81	72.13
	0.397		1	26.6	4.979	132.44	180	73.58	
	0.39		1	26.3	4.885	128.48	180	71.38	
9	0.404	1	1	26.3	5.073	133.41	180	74.12	72.36
	0.391		1	26.3	4.899	128.83	180	71.57	

«Continuación»

	0.389	1	26.5	4.872	129.10	180	71.72		
10	0.395	2	1	26.5	4.952	131.23	180	72.91	72.77
	0.399	1	26.5	5.006	132.65	180	73.69		
	0.421	1	26.1	5.300	138.34	180	76.86		
11	0.416	1	1	26.1	5.233	136.59	180	75.88	76.21
	0.416	1	26.1	5.233	136.59	180	75.88		
	0.414	1	26.4	5.207	137.45	180	76.36		
12	0.419	2	1	26.4	5.274	139.22	180	77.35	76.30
	0.408	1	26.4	5.126	135.33	180	75.18		
	0.26	1	46.9	3.144	147.44	180	81.91		
13	0.257	1	1	46.9	3.104	145.56	180	80.87	81.10
	0.256	1	46.9	3.090	144.93	180	80.52		
	0.259	1	46.8	3.130	146.50	180	81.39		
14	0.257	2	1	46.8	3.104	145.25	180	80.69	80.11
	0.25	1	46.8	3.010	140.86	180	78.26		
	0.249	1	46.9	2.996	140.53	180	78.07		
15	0.242	1	1	46.9	2.896	135.82	180	75.46	77.09
	0.248	1	46.9	2.983	139.91	180	77.73		
	0.243	1	46.8	2.916	136.47	180	75.82		
16	0.247	2	1	46.8	2.970	138.98	180	77.21	77.21
	0.251	1	46.8	3.023	141.49	180	78.60		

**ANEXO 12: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL DISEÑO FRACCIONADO 2<sup>6-3</sup>  
UTILIZADO EN LA ETAPA DE SCREENING**

Fuente	Grado de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor F	p	Significancia
Modelo	7	754.7	107.81	563.89	0.000	***
Lineal	6	754.31	125.72	657.54	0.000	***
X <sub>1</sub>	1	8.62	8.62	45.08	0.000	***
X <sub>2</sub>	1	160.31	160.31	838.47	0.000	***
X <sub>3</sub>	1	69.04	69.04	361.12	0.000	***

«Continuación»

X <sub>4</sub>	1	42.56	42.56	222.61	0.000	***
X <sub>5</sub>	1	7.32	7.32	38.3	0.000	***
X <sub>6</sub>	1	466.45	466.45	2439.64	0.000	***
X <sub>1</sub> .X <sub>6</sub>	1	0.387	0.387	2.02	0.193	n.s
Error	8	1.53	0.191			
Total	15	756.23				

\*\*\*Significancia para  $\alpha = 0.001$ ; n.s = no significativo

R<sup>2</sup> 0.9980

R<sup>2</sup><sub>ajustado</sub> 0.9962

### ANEXO 13: CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE PROTEÍNA SOLUBLE RECUPERADO EN LA ETAPA DE OPTIMIZACIÓN

Nº	Abs.	R	Cant. usada (g)	Vol. (mL)	mg (proteína) /mL (muestra)	Proteína extraída (mg)	Proteína en cant. usada (mg)	Recuperación proteica (%)	Promedio
	0.283		1	47.3	3.452	163.27	180	90.71	
1	0.289	1	1	47.3	3.532	167.08	180	92.82	92.12
	0.289		1	47.3	3.532	167.08	180	92.82	
	0.286		1	47.3	3.492	165.18	180	91.76	
2	0.29	2	1	47.3	3.546	167.72	180	93.17	92.82
	0.291		1	47.3	3.559	168.34	180	93.52	
	0.321		1	37.2	3.961	147.35	180	81.86	
3	0.32	1	1	37.2	3.947	146.85	180	81.58	82.23
	0.326		1	37.2	4.028	149.84	180	83.24	
	0.321		1	37.3	3.961	147.74	180	82.08	
4	0.324	2	1	37.3	4.001	149.24	180	82.91	82.54
	0.323		1	37.3	3.988	148.74	180	82.63	
	0.319		1	37.2	3.934	146.35	180	81.30	
5	0.321	1	1	37.2	3.961	147.35	180	81.86	81.95
	0.324		1	37.2	4.001	148.84	180	82.69	
	0.321		1	37.2	3.961	147.35	180	81.86	
6	0.32	2	1	37.2	3.947	146.85	180	81.58	82.23

«Continuación»

6	0.326	2	1	37.2	4.028	149.84	180	83.24	82.23
	0.212		1	56.8	2.501	142.05	180	78.92	
7	0.208	1	1	56.8	2.447	139.00	180	77.22	78.07
	0.21		1	56.8	2.474	140.53	180	78.07	
	0.212		1	56.8	2.494	141.67	180	78.70	
8	0.207	2	1	56.8	2.434	138.24	180	76.80	77.44
	0.207		1	56.8	2.434	138.24	180	76.80	
	0.218		1	56.9	2.581	146.87	180	81.59	
9	0.216	1	1	56.9	2.554	145.35	180	80.75	81.03
	0.216		1	56.9	2.554	145.35	180	80.75	
	0.22		1	57	2.608	148.66	180	82.59	
10	0.213	2	1	57	2.514	143.31	180	79.62	81.03
	0.216		1	57	2.554	145.60	180	80.89	
	0.256		1	47.3	3.090	146.17	180	81.20	
11	0.26	1	1	47.3	3.144	148.70	180	82.61	82.38
	0.262		1	47.3	3.171	149.97	180	83.32	
	0.255		1	47.3	3.077	145.53	180	80.85	
12	0.264	2	1	47.3	3.197	151.24	180	84.02	82.14
	0.257		1	47.3	3.104	146.80	180	81.56	
	0.275		1	46.8	3.345	156.53	180	86.96	
13	0.278	1	1	46.8	3.385	158.41	180	88.01	87.54
	0.277		1	46.8	3.372	157.79	180	87.66	
	0.281		1	46.8	3.425	160.29	180	89.05	
14	0.275	2	1	46.8	3.345	156.53	180	86.96	87.31
	0.272		1	46.8	3.305	154.65	180	85.92	
	0.287		1	47.2	3.505	165.46	180	91.92	
15	0.289	1	1	47.2	3.532	166.72	180	92.62	92.74
	0.292		1	47.2	3.572	168.62	180	93.68	
	0.283		1	47.3	3.452	163.27	180	90.71	
16	0.292	2	1	47.3	3.572	168.98	180	93.88	92.47
	0.289		1	47.3	3.532	167.08	180	92.82	
17	0.257	1	1	46.5	3.104	144.32	180	80.18	81.79

«Continuación»

17	0.262	1	1	46.5	3.171	147.43	180	81.91	81.79
	0.266		1	46.5	3.224	149.92	180	83.29	
	0.263		1	46.4	3.184	147.74	180	82.08	
18	0.261	2	1	46.4	3.157	146.49	180	81.39	82.08
	0.265		1	46.4	3.211	148.98	180	82.77	
	0.256		1	46.9	3.090	144.93	180	80.52	
19	0.254	1	1	46.9	3.063	143.68	180	79.82	80.05
	0.254		1	46.9	3.063	143.68	180	79.82	
	0.251		1	47.1	3.023	142.40	180	79.11	
20	0.259	2	1	47.1	3.130	147.44	180	81.91	80.64
	0.256		1	47.1	3.090	145.55	180	80.86	
	0.342		1	37.4	4.242	158.66	180	88.14	
21	0.339	1	1	37.4	4.202	157.16	180	87.31	87.49
	0.338		1	37.4	4.189	156.65	180	87.03	
	0.335		1	37.4	4.148	155.15	180	86.19	
22	0.343	2	1	37.4	4.256	159.16	180	88.42	87.31
	0.339		1	37.4	4.202	157.16	180	87.31	
	0.228		1	57.1	2.715	155.04	180	86.13	
23	0.23	1	1	57.1	2.742	156.57	180	86.98	85.99
	0.225		1	57.1	2.675	152.74	180	84.86	
	0.228		1	57.2	2.715	155.31	180	86.28	
24	0.229	2	1	57.2	2.729	156.07	180	86.71	86.14
	0.226		1	57.2	2.688	153.78	180	85.43	
	0.334		1	37.2	4.135	153.82	180	85.46	
25	0.33	1	1	37.2	4.081	151.83	180	84.35	85.46
	0.338		1	37.2	4.189	155.82	180	86.56	
	0.332		1	37.3	4.108	153.24	180	85.13	
26	0.334	2	1	37.3	4.135	154.24	180	85.69	85.13
	0.33		1	37.3	4.081	152.24	180	84.58	
	0.222		1	56.6	2.635	149.13	180	82.85	
27	0.216	1	1	56.6	2.554	144.58	180	80.32	81.59
	0.219		1	56.6	2.595	146.85	180	81.59	

«Continuación»

	0.225	1	56.5	2.675	151.14	180	83.96		
28	0.214	2	1	56.5	2.528	142.81	180	79.34	81.72
	0.22	1	56.5	2.608	147.35	180	81.86		
	0.286	1	47.2	3.492	164.83	180	91.57		
29	0.286	1	1	47.2	3.492	164.83	180	91.57	92.27
	0.292	1	47.2	3.572	168.62	180	93.68		
	0.292	1	47.1	3.572	168.26	180	93.48		
30	0.283	2	1	47.1	3.452	162.58	180	90.32	92.31
	0.291	1	47.1	3.559	167.63	180	93.13		

#### ANEXO 14: ANÁLISIS DE VARIANZA DEL MODELO CUADRÁTICO EN LA ETAPA DE OPTIMIZACIÓN

Fuente	Grado de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor F	Valor P	Significancia
Modelo	9	625.04	69.45	965.38	0.000	***
Lineal	3	213.40	71.14	988.82	0.000	***
Cuadrático	3	505.44	168.48	2341.96	0.000	***
Interacción	3	31.90	10.63	147.79	0.000	***
Error	20	1.439	0.072			
Falta de Ajuste	3	0.415	0.138	2.30	0.114	n.s
Error Puro	17	1.02	0.060			
Total	29	626.48				

\*\*\*Significancia a un nivel de  $\alpha = 0.05$ ; ns = no significativo

R<sup>2</sup> 0.9977

R<sup>2</sup> ajustado 0.9976

**ANEXO 15: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE ESPUMA (CFE)**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	10577.30	3	3525.78	215.86	0.000
Intra grupos	130.67	8	16.33		
Total (Corr.)	10708.00	11			

Prueba Tukey ( $p < 0.05$ ) para la Capacidad de Formación de Espuma (CFE)

Factor	N	Media	Agrupación
pH 8	3	103.33	A
pH 6	3	54.67	B
pH 4	3	35.33	C
pH 2	3	26.67	C

**ANEXO 16: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA ESTABILIDAD DE ESPUMA (EES) DESPUES DE 2 h**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3578.60	3	1192.87	204.38	0.000
Intra grupos	46.69	8	5.84		
Total (Corr.)	3625.29	11			

Prueba Tukey ( $p < 0.05$ ) para la Estabilidad de Espuma (CFE) después de 2 h

Factor	N	Media	Agrupación
pH 6	3	60.88	A
pH 2	3	55.73	A
pH 4	3	54.85	A
pH 8	3	17.63	B

**ANEXO 17: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA)**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3.1766	3	1.05886	59.76	0.000
Intra grupos	0.1418	8	0.01772		
Total (Corr.)	3.3183	11			

Prueba Tukey ( $p < 0.05$ ) para la Capacidad de Retención de Agua (CRA)

Factor	N	Media	Agrupación
pH 8	3	3.53	A
pH 2	3	2.73	B
pH 6	3	2.70	B
pH 4	3	2.07	C

**ANEXO 18: ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA SOLUBILIDAD**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2695.80	3	898.60	4986.76	0.000
Intra grupos	1.47	8	0.184		
Total (Corridas)	2697.27	11			

Prueba Tukey ( $p < 0.05$ ) para la Solubilidad

Factor	N	Media	Agrupación
pH 8	3	43.64	A
pH 6	3	24.84	B
pH 4	3	1.63	C
pH 2	3	19.32	D