

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



Efecto del pH de extracción y la relación sólido/solvente sobre el rendimiento de extracción de proteínas, absorción de agua y formación de espuma de concentrado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.)

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

TANIA ALEJANDRA VARGAS SALAZAR

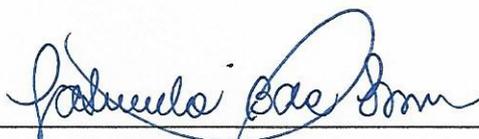
TRUJILLO, PERÚ

2019

La presente tesis ha sido revisado y aprobado por el siguiente Jurado:



Ing. Dr. Fernando Rodríguez Avalos
PRESIDENTE



Ing. Ms. Gabriela Barraza Jáuregui
SECRETARIO



Ing. Ms. Ana Cecilia Ferradas Horna
VOCAL



Ing. Dr. Antonio Rodríguez Zevallos
ASESOR

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por brindarme salud, inteligencia, paciencia y fortaleza durante la realización de esta investigación. Eres quien guía el destino de mi vida.

A mi padre Julio, por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por su valor de sacrificio en el trabajo he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

A mi madre Gloria, que siempre ha estado brindándome su apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida, muchas gracias a ustedes, por siempre mi corazón y mi agradecimiento por el logro de este objetivo.

A mis hermanos Carlos, Roxana y Carim, que siempre han estado junto a mí, brindándome su apoyo incondicional y su tiempo y saber que puedo contar con ellos en cualquier momento.

Al Sr. Manuel y su esposa Fanny, abuelos de mi hijo, les agradezco por la ayuda incondicional brindada y aportes en mi tesis, así mismo al padre de mi hijo, Jean Paul; por todos los buenos momentos en los que convivimos.

A mi hijo Dylan, por ser lo más grande y valioso que Dios me ha regalado, fuente de mi inspiración y la razón de mi vida que me impulsa a salir adelante y llegar a ser un ejemplo para él.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi asesor el Dr. Ricardo Rodríguez Zevallos por su invaluable apoyo, gracias a su orientación, dirección y supervisión permanente, es que se ha logrado cumplir el objetivo de la investigación.

A los señores miembros del jurado: Dr. Fernando Rodríguez Ávalos, Ms. Gabriela Barraza Jáuregui e Ing. Ana Cecilia Ferradas Horna, por sus enseñanzas, acertados consejos y recomendaciones en la realización de esta investigación.

Al Ing. Jesús Obregón Domínguez por su apoyo en la parte estadística de esta investigación y por su amistad, paciencia recibida en todo momento.

Al Ing. Víctor Herrera Mestanza, por apoyarme en la parte experimental y por su tiempo en la supervisión en todo el proceso.

ÍNDICE GENERAL

	Página
CARÁTULA	i
APROBACIÓN DEL JURADO DE TESIS	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA	4
2.1. Frijol ñuña.....	4
2.2. Generalidades de las proteínas.....	6
2.3. Productos de las proteínas	9
2.3.1. Concentrado proteico	9
2.3.2. Aislado proteico	9
2.4 Métodos de obtención de concentrado proteico	10
2.4.1 Obtención de concentración a pH alcalino y precipitación isoelectrica	10
2.4.2 Solubilización y precipitación por salado de proteína	11

2.4.3 Extracción de cloruro de sodio y precipitación por micelización	11
2.5 Aplicaciones de concentrados y aislados proteicos	11
2.6 Optimización por diseños experimentales	12
2.6.1 Superficie de respuesta	13
2.6.2 Diseño compuesto central	14
2.6.3 Ventajas de la optimización de procesos	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Lugar de ejecución	15
3.2 Materiales y equipos	15
3.2.1 Materia prima	15
3.2.2 Equipos e instrumentos	15
3.2.3 Material de vidrio	16
3.2.4 Reactivos	16
3.3 Esquema experimental	17
3.4 Elaboración de harina de frijol ñuña	19
3.5 Obtención de concentrado proteico a partir del frijol ñuña	20
3.6 Análisis fisicoquímicos	26
3.6.1 Determinación de proteínas del frijol ñuña	26
3.6.2 Rendimiento de extracción de concentrado proteico	24
3.6.3 Capacidad de absorción de agua de concentrado proteico	25
3.6.4 Capacidad de formación de espuma de concentrado proteico	25

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1 Efecto del pH de extracción y la relación sólido /solvente sobre el contenido de proteínas del concentrado proteico de ñuña.....	27
4.2 Efecto del pH de extracción y la relación sólido/solvente en el rendimiento proteico.....	32
4.3 Efecto del pH de extracción y relación sólido/solvente para la absorción de agua del concentrado proteico.....	39
4.4. Efecto del pH de extracción y relación sólido/solvente de la formación de espuma del concentrado proteico.....	43
V. CONCLUSIONES	47
VI. RECOMENDACIONES	48
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	49
VII. ANEXOS	54

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Composición química del frijol ñuña	6
Cuadro 2. Diseño de superficie de respuesta central compuesto rotacional	17
Cuadro 3. Resultados experimentales del efecto de pH de extracción y relación sólido/solvente sobre el contenido de proteínas del concentrado proteico de ñuña	27
Cuadro 4. Análisis de varianza del contenido de proteínas de concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente	28
Cuadro 5. Coeficientes estimados del contenido de proteínas de concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente	29
Cuadro 6. Valores observados y predichos para el contenido de proteínas de concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente	30
Cuadro 7. Resultados experimentales del efecto de pH de extracción y relación sólido/solvente sobre el rendimiento proteico de ñuña	33
Cuadro 8. Análisis de varianza en rendimiento proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente	35
Cuadro 9. Coeficientes estimados en rendimiento proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente	35

Cuadro 10. Valores observados y predichos para rendimiento proteico en función al pH de extracción y relación sólido/solvente	36
Cuadro 11. Resultados experimentales del efecto de pH de extracción y relación sólido/solvente para la absorción de agua en concentrado proteico de ñuña	39
Cuadro 12. Análisis de varianza para la absorción de agua en concentrado proteico en función al pH de extracción y relación sólido/solvente	40
Cuadro 13. Coeficientes estimados para absorción de agua en concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente	41
Cuadro 14. Valores observados y predichos para absorción de agua en concentrado proteico en función al pH de extracción y relación sólido/solvente	41
Cuadro 15. Resultados experimentales del efecto de pH de extracción y relación sólido/solvente para la formación de espuma del concentrado proteico de ñuña.	42
Cuadro 16. Análisis de varianza para la formación de espuma para concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente	44

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema experimental para la obtención de concentrado proteico de nuña en función del pH de extracción y la relación sólido/solvente	18
Figura 2. Diagrama de flujo para la preparación de la harina de frijol ñuña	19
Figura 3. Diagrama de flujo de obtención de concentrado proteico de frijol Ñuña	21
Figura 4. Superficie de respuesta y de contorno para el contenido de proteínas del concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente	34
Figura 5. Superficie de respuesta y de contornos para rendimiento de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente	38
Figura 6. Superficie de respuesta y de contornos para absorción de agua en concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente	46

INDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Resultados experimentales del efecto de pH de extracción y la relación sólido/solvente sobre el contenido de proteínas del concentrado proteico, rendimiento y absorción de agua en frijol ñuña.	54

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó el efecto del pH de extracción y la relación sólido/solvente sobre el rendimiento de extracción de proteínas, absorción de agua y formación de espuma de concentrado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.), aprovechando así el elevado contenido proteico de la leguminosa como fuente potencial de ingrediente para la industria alimenticia. Se aplicó la metodología de diseño de superficie de respuesta central compuesto rotacional para obtener el mayor rendimiento y capacidad de absorción de agua en concentrado proteico de frijol de ñuña, siendo el modelo cuadrático significativo ($p < 0.05$) y los coeficientes de determinación R^2 y R^2 -ajustado fueron 0.959 y 0.910 para el concentrado proteico y 0.976 y 0.956 para la absorción de agua, sin embargo la formación de espuma el modelo cuadrático no fue significativo ($p > 0.05$), además, los valores de los coeficientes de determinación R^2 y R^2 -ajustado fueron 0.138 y 0.00. El mejor tratamiento para rendimiento de extracción (79.29%) y absorción de agua (3.65 g/g), se obtuvieron con pH de 10.91 y la relación sólido/solvente de 1/10, cuyo contenido de proteínas fue 81.92%.

ABSTRACT

In the present investigation the effect of extraction pH and the solid/solvent ratio on the yield of protein extraction, water absorption and foaming of protein concentrate of ñuña bean (*Phaseolus vulgaris* L.) was evaluated, taking advantage of the the protein content of the legume as a potential source of ingredient for the food industry. The rotational composite response surface design methodology was applied to obtain the highest yield and water absorption capacity in Ñuña bean protein concentrate, being the quadratic model significant ($p < 0.05$) and the coefficients of determination R^2 and R^2 -adjusted were 0.959 and 0.910 for the protein concentrate and 0.976 and 0.956 for the absorption of water, however the foam formation of the quadratic model was not significant ($p > 0.05$), in addition, the values of the coefficients of determination R^2 and R^2 -adjusted were 0.138 and 0.00. The best treatment for extraction performance (79.29%) and water absorption (3.65 g / g), were obtained with pH of 10.91 and the solid / solvent ratio of 1/10, whose protein content was 81.92%.

I. INTRODUCCIÓN

La industria de procesamiento de alimentos está haciendo énfasis en la producción y utilización de proteínas vegetales (leguminosas, cereales, pseudocereales, algas y hojas) como ingredientes funcionales para mejorar las propiedades de procesamiento de alimentos y nutricionales en una variedad de productos formulados, debido al incremento de la demanda proteínica en la dieta. Son una nueva alternativa en este contexto las proteínas aisladas de los vegetales en la industria alimenticia, ya que contienen cantidades relativamente altas de lisina y otros aminoácidos esenciales. Las tecnologías de preparación de materiales proteicos han sido bastantes estudiadas en el caso de la soya, pero recientemente es el caso de otras leguminosas (Ventura, 2003).

Además de sus propiedades nutricionales, las proteínas poseen propiedades físico-químicas que otorgan unas propiedades funcionales muy específicas al ser adicionadas a ciertos alimentos. Por esta razón el desarrollo tecnológico de la industria alimenticia ha recurrido en forma habitual a la utilización de productos proteicos con fines funcionales-tecnológicos, encaminado a dotar de propiedades físico-químicas y organolépticas a los alimentos donde son incorporadas. Se obtienen así los aislados proteicos, que constituyen un purificado proteico a partir del alimento. De esta manera, se ha llegado a obtener un macronutriente purificado con papel nutricional en la alimentación y funcional en la elaboración tecnológica de alimentos (Vega, 2015).

Dentro de este contexto, en la búsqueda de alimentos ricos en proteínas, el frijol ñuña representa una alternativa por sus atributos nutritivos. El frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) constituye uno de los legados valiosos de la agricultura andina, teniendo su centro de origen en la sierra del Perú, donde existe gran diversidad genética como resultado de miles de años de domesticación. Esta leguminosa es muy nutritiva por su alto contenido de proteínas (23%) y es un

importante alimento para las comunidades campesinas de los andes (Alfonzo, 2000).

Sus preparaciones para consumo humano son diversas: granos tostados o fritos, harinas instantáneas, en mezclas con frutas secas, como manjar, mote, sopas, etc. Además esta leguminosa por su alto valor nutritivo en cuanto al contenido proteico, tiene muchas posibilidades para la agroindustria como suplemento alimenticio y amplio potencial para la exportación ya que en la actualidad existen muchos problemas de desnutrición y malnutrición, deficiencia proteica en los alimentos, elevado crecimiento demográfico, la escasez y alto costo de las fuentes proteicas de origen animal. Esta problemática demanda producir fuentes proteicas de origen vegetal que sean económicas y accesibles, una alternativa es la producción de aislado proteico (Gamarra y otros, 1997 y Urrutia, 2010).

Según antecedentes de estudio, se han hecho extracciones de proteínas de la lenteja, de la soja, del chocho, nuez de marañón, etc., para ser utilizadas como ingredientes funcionales en diversas formulaciones de alimentos aprovechando sus propiedades funcionales, éstas extracciones se presentan en concentrados y aislados proteicos con un alto contenido en proteínas. En el campo tecnológico, los aislados se usan para aclarar el color, mejorar la textura de carne deshuesada de aves, para unir piezas intactas de músculos, proporcionar textura a las salchichas, mejoran la funcionalidad de pates y la textura de los productos de panadería, pastas e incluso en tecnología de quesos, así mismo es un insumo potencial para la formulación de alimentos (Urrutia, 2010).

El problema de la presente investigación fue:

¿Cuál será el efecto del pH de extracción (8.50 -10.50) y relación sólido/solvente (1/7 – 1/15) sobre el rendimiento de extracción de proteínas, absorción de agua y

formación de espuma de concentrado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando la metodología de superficie de respuesta?

Los objetivos de la presente investigación fueron:

Evaluar el efecto del pH de extracción y relación sólido/solvente sobre el rendimiento de extracción de proteínas, absorción de agua y formación de espuma utilizando la metodología de superficie de respuesta.

Determinar el pH de extracción y la relación sólido/solvente para mejorar el rendimiento de extracción de proteínas, absorción de agua y formación de espuma utilizando la metodología de superficie de respuesta.

II. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA

2.1 Frijol ñuña

La ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo originario de los Andes peruanos y tiene importancia en la dieta nutricional del poblador rural andino. Es una planta trepadora, cuya existencia data de hace unos 11,000 años según muestras halladas en la Cueva de Guitarrero, Yungay, Ancash (National Academy Press, Estados Unidos, 1990 citado por Camarena, 2006).

Actualmente, esta leguminosa crece en casi todos los valles interandinos, aunque principalmente en los departamentos de Cajamarca, La Libertad, Ancash, Huánuco, Ayacucho y Cuzco. Su principal utilidad reside en los granos que son muy similares a los del frijol común, pero difieren en la variedad de colores y jaspeados. Además, tiene la propiedad de reventar y aumentar al ser tostados solo o con aceite, para consumo como cancha, bocadito o harina y derivados, por lo que sus posibilidades de uso culinario e industrial son altas. Aunque su principal papel es alimentario, la planta de la ñuña es también utilizable como mejorador nutricional de los suelos, dado que como toda leguminosa capta el nitrógeno del aire, para fijarlo en sus raíces (Camarena, 2006).

Científicamente catalogada como *Phaseolus vulgaris* L., la ñuña comparte este nombre común según etnias y lugares con otros nombres eufónicos: numia, nambia, nudia, kopuro, pushpu, poroto, frijol de tostar, frijol reventón, chuvi, purutu, porotillo (Camarena, 2006).

Brack (1999) manifiesta que la ñuña de los Andes Peruanos es una forma primitiva, con muchas variedades locales reconocidas por los productores, como son:

- Ñuña pava o coneja: gris con pintas blancas, muy apreciada en Cajamarca.
- Ñuña maní: ligeramente roja.

- Ñuña azul: de color azul oscuro.
- Ñuña ploma: de color plomo.
- Ñuña huevo de paloma: muy apreciada en Cajabamba, Cajamarca.
- Ñuña parcollana: de color rojo y blanco.
- Ñuña poroto de Puno: variedad existente en algunos valles de Puno.

En cuanto a su cultivo, se realiza igual que el frijol, generalmente junto con el maíz. El fruto es una legumbre recta de color verde y uniforme con jaspes morados, pueden ser grandes o pequeños fluctuando su tamaño entre 8 y 12 cm de largo, conteniendo de 4 a 8 semillas por vaina. Existe una gran diversidad de semillas tanto en forma, color y tamaño, pudiendo ser clasificadas en base a su forma en:

- Ssp. Sphaericas, son semillas aproximadamente esféricas y son las más abundantes.
- Ssp. Ellipticus Mart, cuya longitud de semilla es una vez y media mayor que la anchura; y
- Ssp. Oblogus savi, cuya semilla es muy alargada siendo la forma que menos abunda resultando así casi rara.

Los problemas principales de este tipo de frijol son su susceptibilidad a las enfermedades foliares como antracnosis, su largo ciclo vegetativo de 8 a 10 meses, es susceptible a las heladas y no soporta las sequías, tiene un hábito de crecimiento agresivo. El rendimiento de este cultivo es aproximadamente 800 kg/ha, pero se tiene reportado rendimientos de más de 1300 kg/ha (Gamarra y otros, 1997).

Este tipo de frejol, se consume mayormente tostado o frito teniendo la propiedad de reventar, pues la testa en contacto con el calor se rompe y deja visibles los cotiledones, resulta así un plato exquisito rico en proteínas, como lo demuestra en el cuadro 1, la composición química del frijol ñuña.

Cuadro 1. Composición química del frijol ñuña

Factor	Crudo	Tostado	Harina
Humedad (%)	12.5	9.0	10.0
Proteínas (%)	20.0	20.8	20.5
Carbohidratos (%)	62.1	N.D	N.D
Fibra (%)	4.4	N.D	N.D
Cenizas (%)	3.5	N.D	N.D

N.D: No determinado

Fuente: Camarena (2006)

2.2 Generalidades de las proteínas

Las proteínas son biomoléculas formadas básicamente por carbono, hidrogeno, oxígeno y nitrógeno. Pueden además contener azufre y en algunos tipos de proteínas, fosforo, hierro, magnesio y cobre entre otros elementos. Están formadas por aminoácidos unidos mediante puente peptídicos. A nivel elemental, las proteínas están compuestas por 50-55% de carbono, 6-7% de hidrogeno, 20-23 de oxígeno, 12-19% de nitrógeno y 0.2-3% de azufre (Fennema, 2000).

Las proteínas son moléculas complejas (agregaciones de aminoácidos). Los 20 aminoácidos difieren considerablemente en sus propiedades fisicoquímicas así como en su polaridad, acidez, basicidad, aromaticidad, volumen, flexibilidad conformacional, en su habilidad para formar puentes de hidrogeno y reactividad química (Simbaña, 2011).

Los aminoácidos son las unidades básicas que forman las proteínas. Su denominación responde a la composición química general que presentan, en la que un grupo amino (-NH₂) y otro carboxilo o ácido (-COOH) se unen a un carbono. Las otras dos valencias de ese carbono quedan saturadas con un átomo de hidrógeno

(-H) y con un grupo químico variable al que generalmente se denomina radical (-R), el cual está disponible para que pueda unirse otro elemento o grupo químico (Badui, 1990).

Las proteínas de reserva de los granos y semillas representan un potencial interesante para valorizar por su diversidad y su diferencia a nivel de las propiedades fisicoquímicas y de la composición en aminoácidos. Semillas leguminosas, principalmente de soja, se utilizan como materias primas para la producción de concentrados de proteínas y aislados. Estos productos están jugando un papel importante en la nutrición humana y como ingredientes funcionales para mejorar las propiedades de procesamiento de alimentos. Proteínas de leguminosas son ricas en albúminas, glutelina y globulinas y generalmente tienen puntos isoeléctricos de 4.2 a 4.4. Estas fracciones de proteínas son ricas en lisina y otros aminoácidos esenciales, pero generalmente bajo en aminoácidos que contienen azufre (Ventura, 2003). El frejol (poroto) contiene las proteínas Vicina y Faseolina, ambas son globulinas, además, contiene una albúmina conocida como Fasina, que corresponde a una hemoaglutinina (Robinson, 1991).

Sus propiedades funcionales se clasifican según la naturaleza de las interacciones, pero con frecuencia varios tipos de reacciones son responsables de un solo tipo de estructura (Sosa, 2000).

Las propiedades funcionales se definen como cualquier propiedad fisicoquímica de los polímeros que afecta y modifica alguna característica de un alimento y que contribuye a la calidad final del producto, lo cual determinará su campo de aplicación en la industria de alimentos. Así tenemos la absorción de agua y grasa, gelificación, emulsificación, solubilidad, etc. (González-Quijada y otros, 2003).

La solubilidad de una proteína está influenciada por los siguientes factores: Su composición en aminoácidos (una proteína rica en aminoácidos polares es en

general más soluble que una rica en aminoácidos hidrofóbicos); su estructura tridimensional (las proteínas fibrosas son en general menos solubles que las globulares) y el *entorno* de la propia proteína. Los principales factores ambientales que influyen en la solubilidad de una proteína son los siguientes: la temperatura; la constante dieléctrica del medio, el pH del mismo, tipo de disolvente y la fuerza iónica (Fennema, 2000 y Sosa, 2000).

Las pruebas más utilizadas para determinar el grado de solubilidad proteica son la proporción de solubilidad de nitrógeno (NSI) y el perfil de solubilidad en función del pH, de la fuerza iónica o de un tratamiento térmico. Los datos sobre las características de solubilidad son muy útiles para determinar las condiciones óptimas de extracción y purificación de la proteína, así como para la separación de las fracciones proteicas (Fennema, 2000).

2.3 Productos de las proteínas

Los productos que se conocen de la extracción de proteínas son los concentrados proteicos y los aislados, los que se describen a continuación:

2.3.1. Concentrados proteicos

El proceso de fabricación de los concentrados proteicos, persigue reducir o eliminar factores antinutritivos presentes en las leguminosas, en especial los oligosacáridos (rafinosa y estaquiosa). Los concentrados de proteínas se obtienen mediante procesos basados en la extracción o fermentación. La extracción de la proteína se realiza con agua y etanol, reduciéndose su contenido en oligosacáridos (rafinosa 0.5%, estaquiosa 0.7%) y otros factores antinutritivos, por lo que aumenta el contenido proteico y energético. En función del proceso utilizado, el contenido de proteínas del producto final alcanza un 70-85% de concentrado de proteínas por extracción y un 52-55% (caso de los concentrados por fermentación) (Urrutia, 2010 y Girón-Calle y otros, 2005).

2.3.2. Aislados proteicos

Los aislados proteicos son la forma comercial más purificada de proteínas, puesto que contienen 90% o más de este nutriente. Los de leguminosas se obtienen al eliminar los polisacáridos, oligosacáridos y otros componentes indeseables de las semillas de estos vegetales.

El proceso de aislamiento se basa en las diferencias de solubilidades y en el punto isoeléctrico de las distintas fracciones proteicas que componen a la semilla. Para la obtención de los aislados se parte de harinas desgrasadas que hayan recibido un tratamiento térmico mínimo. Aislados y concentrados proteicos provenientes de fuentes vegetales juegan un papel importante en muchas formulaciones de nuevos productos alimenticios. La aceptabilidad de tales preparaciones proteicas depende de su calidad sensorial, valor nutricional y de sus propiedades funcionales, todas las cuales son afectadas por el método de obtención (González-Quijada y otros, 2003).

2.4 Métodos de obtención de concentrado proteico

Según niveles crecientes de pureza se distinguen harinas con contenidos de proteínas menores a 70%, concentrados con 70% a 85% y aislados con porcentajes mayores a 90%, esta distinción involucra diferencias de orden tecnológico. Los procedimientos de separación basados en diferencia de solubilidad, las proteínas en disolución, muestran cambios significativos de su solubilidad en función del pH, fuerza iónica, propiedades dieléctricas del disolvente y la temperatura. Estas variables que son reflejo del hecho de que las proteínas son electrolitos de peso molecular muy grande, pueden utilizarse para separar mezclas de proteínas, ya que cada proteína posee una composición en aminoácidos característica que determina su comportamiento como electrolito y propiedades (Urrutia, 2010). En el caso de los concentrados estos se pueden obtener por los siguientes métodos:

2.4.1. Obtención de concentrados con extracción a pH alcalino y precipitación isoeléctrica

Este método consiste en el uso de una base para solubilizar las proteínas, comúnmente se utiliza hidróxido de sodio (NaOH) para la extracción alcalina, luego se procede a la precipitación isoeléctrica (solubilidad mínima de las proteínas a pH alrededor de 4.5). El procedimiento consiste en mezclar harina con agua destilada en relación 1/10, ajustando el pH con NaOH 0.1N a 9.0. La extracción se realiza agitando la suspensión por 45 min a temperatura ambiente. Para separar la proteína del residuo, el extracto se centrifuga a 10000 rpm. La precipitación de las proteínas aisladas se realiza ajustando el pH con HCl 0.1N. El aislado proteico precipitado se recupera por centrifugación a 10 000 rpm (30min, 4 °C), posteriormente se procede a lavar dos veces con agua destilada (Urrutia, 2010).

2.4.2. Solubilización y precipitación por salado de proteína

Las sales neutras ejercen efectos pronunciados sobre la solubilidad de las proteínas globulares. A baja concentración, las sales incrementan la solubilidad de muchas proteínas, fenómeno que recibe el nombre de solubilización por salado. Las capacidades de las sales neutras que influyen en la solubilidad de las proteínas dependen de la concentración y las cargas eléctricas existentes en los cationes y aniones presentes en la sal. Por otra parte, a medida que aumenta la fuerza iónica, la solubilidad de una proteína comienza a disminuir, a una fuerza iónica suficientemente elevada, una proteína puede ser casi completamente precipitada de su disolución efecto llamado insolubilización por salado (Nelson y Cox, 2001).

2.4.3. Extracción con cloruro de sodio y precipitación por micelización

En este método se utiliza una sal para la solubilización proteica, utilizando solución de NaCl 0.8M a pH 7, en una proporción harina: solvente de 1/10. Después de la extracción, la suspensión se centrifuga a 10000 rpm durante 30 min. Para lograr la micelización de las proteínas el extracto proteínico se diluye con agua destilada fría (4 °C) y posteriormente se precipita a pH 4.5, luego se procede a lavar dos veces con agua destilada (Urrutia, 2010).

2.5 Aplicaciones de concentrados y aislados proteicos

Aislados y concentrados proteicos, provenientes de fuentes vegetales juegan un papel importante en muchas formulaciones de nuevos productos alimenticios. La aceptabilidad de tales preparaciones proteicas depende de su calidad sensorial, valor nutricional y de sus propiedades funcionales, todas las cuales son afectadas por el método de obtención (González-Quijada y otros, 2003).

Actualmente, los aislados proteicos más extendidos son los de soja, ya que ofrecen ventajas económicas, nutricionales y funcionales manteniendo las cualidades sensoriales deseables necesarias para la aceptación por el consumidor. La mejora de la nutrición es la razón primera para el uso de los aislados en carnes magras, fórmulas infantiles, bebidas nutritivas para adultos y suplementos proteicos. Así, en productos de carne magra proporcionan beneficios a personas con un alto nivel de colesterol y triglicéridos en sangre, ya que, además de disminuir el contenido en grasas del producto, las proteínas vegetales tienen efectos beneficiosos en la reducción de los niveles de colesterol. Las fórmulas infantiles basadas en los aislados se elaboran para proporcionar una nutrición completa y las calorías especificadas a los niños alérgicos o que no pueden tomar leche de vaca, así como al resto de los niños (Urrutia, 2010).

La disponibilidad en grandes cantidades de fuentes proteicas vegetales como la harina desengrasada de oleaginosas, junto con la tendencia a reducir la ingesta de proteínas animales, hace que en los últimos años se esté produciendo un gran desarrollo en los procesos de extracción y mejora de estas proteínas vegetales para su uso en alimentación humana (Urrutia, 2010).

2.6 Optimización por diseños experimentales

Los procedimientos experimentales clásicos para el mejoramiento de un proceso y/o producto prueban una variable a la vez modificando cada una de ellas, hasta tener el mejor producto medido por una variable control. Estos métodos son ineficientes porque requieren de un gran número de experimentos, lo que puede ser costoso y consumir mucho tiempo. La Metodología de la Superficie de Respuesta es más eficiente que estas metodologías clásicas para la optimización del proceso

o producto, minimizando costos y tiempos, maximizando rendimientos, productividad y calidad de productos (Pinto y Lescano, 2002 y Mantilla, 2014).

La optimización de un proceso por medio de diseños experimentales requiere del uso de una metodología adecuada que nos lleve por el camino seguro y rápido para encontrar los valores óptimos de un proceso bajo estudio (Mantilla, 2014).

Un diseño experimental para ajustar un modelo de segundo orden debe tener tres niveles de cada factor (-1, 0,+1). Así como en el diseño de primer orden se desea la ortogonalidad, en éste se desea que sea un diseño rotatable. Se dice que un diseño es rotatable cuando la varianza de la respuesta predicha en algún punto es función sólo de la distancia del punto al centro y no es una función de la dirección (Ninaquispe, 2010).

La rotabilidad es una propiedad importante, dado que la finalidad de la Metodología de Superficie de Respuesta es optimizar, desconociéndose la localización del óptimo, así tiene sentido utilizar un diseño que proporcione estimaciones precisas en todas direcciones (Mantilla, 2014).

Dentro de los diseños rotatables de segundo orden se incluyen los Diseños Central Compuesto.

2.6.1. Superficie de respuesta

La superficie de respuesta se define como la representación geométrica de la función objetivo (relación entre la variable dependiente y las independientes consideradas en la investigación) o más propiamente dicho del modelo matemático obtenido. Debe distinguirse claramente una superficie respuesta estimada de una superficie real. Una superficie respuesta estimada, es la representación geométrica del modelo matemático obtenido (Mantilla, 2014).

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés es influenciada por otras. El objetivo es optimizar la variable

de interés. Esto se logra al determinar las condiciones óptimas de operación del sistema (Mantilla, 2014).

Jarpa-Parra y otros (2014) aplicaron la metodología MSR para optimizar la extracción alcalina de proteína a partir de harina de lentejas y para maximizar tanto el contenido de proteína como el rendimiento.

Tan y otros (2014) realizaron un estudio comparativo de las características fisicoquímicas y funcionales de aislado de proteína de frijol pinto (PBPI) contra el aislado de proteína de soja (SPI) después de la optimización de la extracción, en la cual se usó el método de superficie de respuesta.

2.6.2. Diseño compuesto central

Los diseños centrales compuestos son un diseño factorial o factorial fraccionado con puntos centrales, ampliado con un grupo de puntos axiales (también denominados puntos de estrella) que permiten estimar la curvatura. Puede utilizar un diseño central compuesto para estimar eficientemente los términos de primer orden y segundo orden y modelar una variable de respuesta con curvatura al agregar puntos centrales y axiales a un diseño factorial previamente ejecutado. Otra propiedad útil del diseño es que puede “crecer” a partir de un diseño 2^k de primer orden, agregando puntos axiales y quizá algunos puntos centrales. Con la elección del número de puntos centrales (n), el diseño puede hacerse ortogonal o se puede transformar en uno de precisión uniforme (Mantilla, 2014).

2.6.3. Ventajas de la optimización de procesos

Las ventajas para la utilización de la optimización de procesos es que se utilizan operaciones matemáticas relativamente simples de 1° y 2° grado, es posible detectar el error experimental y evaluarlo, y se necesitan poco conocimiento de la estadística (Mantilla, 2014).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución

Las pruebas experimentales y los análisis se realizaron en el Laboratorio de Ciencias de los Alimentos de la Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Privada Antenor Orrego.

3.2 Materiales

3.2.1 Materia prima

- Frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Pava procedente de la región de Cajamarca.
- Agua destilada.

3.2.2 Equipos e instrumentos

- Balanza electrónica. Marca Sartorius, Type 2403. Rango (0-2300 g; sensibilidad 0.1 mg).
- Balanza Analítica. Marca Mettler Toledo (capacidad de 210 g; sensibilidad 0.0001 g).
- Centrífuga. Marca Sartorius, Type 2403. Rango (0-2300 g)
- Estufa. Marca Memmert. Modelo UF 30 (temperatura 0-300 °C)
- Licuadora Osterizer 3 velocidades. Marca OSTER.
- Refrigeradora automática. Marca Bosch.
- Agitador magnético. Marca Boeco.
- Equipo digestor de proteína, Manta calefactora P. Selecta - Kjeldahl. Modelo "UNIPLAC 6002316".
- pH-metro. Marca Boeco Germany. Rango 1 a 14 (sensibilidad 0.01)
- Horno de Mufla, marca Barnstead - modelo "FB1410M-23".
- Equipo destilador de proteínas pyrex wertheim 29/32.

- Tamiz Tyler (#40, #60 y #80).
- Termómetro. Marca Boeco Germany. Rango -10 a 200 °C, sensibilidad 1 °C.
- Estufa. Marca Mermmet. Modelo UF 30 (temperatura 0 – 300 °C)

3.2.3 Material de vidrio

- Vasos de precipitación (50, 250 y 500 mL)
- Probeta. Marca LMS, de 50, 100, 250 y 1000 mL, calibrado de 2 a 8 °C.
- Pipeta. Marca DIN, de 1, 2, 5 y 10 mL, calibrado a 20 °C (sensibilidad 0.05).
- Tubos de ensayo de 5 y 10 mL
- Luna de reloj
- Placas Petri
- Crisol

3.2.4 Reactivos

- Ácido fosfórico (H_3PO_4) al 10%.
- Sulfato cúprico pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).
- Sulfato de potasio (K_2SO_4).
- Solución de ácido sulfúrico 0.1 N.
- Solución ácido clorhídrico 0.1 N.
- Solución hidróxido de sodio 1 N.

3.3 Esquema experimental

El esquema experimental para la obtención de proteínas de ñuña tiene como variables independientes al pH de extracción y la relación sólido/solvente, y como variables dependientes al rendimiento de extracción de proteínas, absorción de agua y formación de espuma.

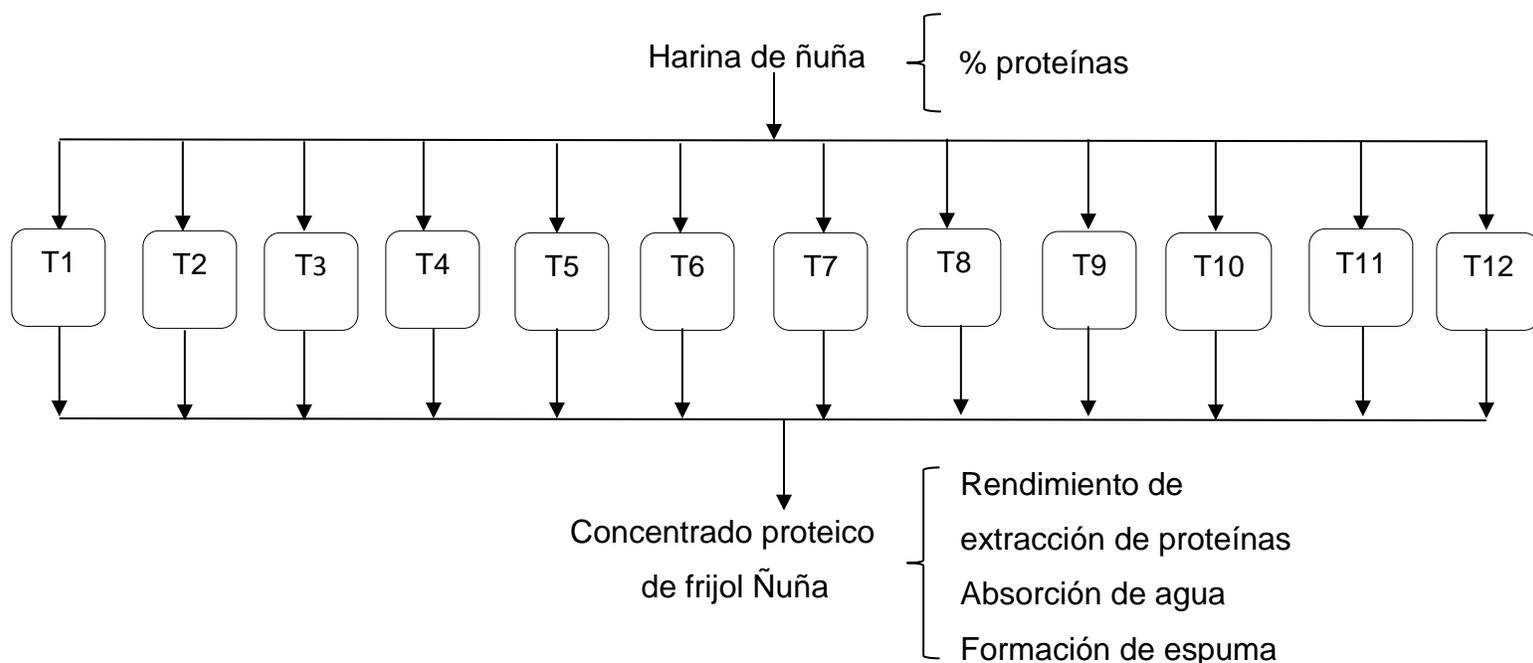
En la Figura 1, se presenta el esquema experimental para la obtención de concentrado proteico de ñuña en función de pH de extracción y relación

sólido/solvente. Los valores de referencia para construir el diseño, fueron tres pH de extracción (8.50, 9.50 y 10.50) y tres relaciones de sólido/solvente (1/7, 1/10 y 1/15).

En el Cuadro 2, se presenta el diseño de superficie de respuesta central compuesto rotacional para variables independientes (pH de extracción y relación sólido/solvente), variables codificadas con 4 repeticiones.

Cuadro 2. Diseño de superficie de respuesta central compuesto rotacional para extracción de proteínas de frijol ñuña.

pH extracción	Sólido/ solvente	pH extracción	Sólido/ solvente
-1.00	-1.00	8.50	1/15
1.00	-1.00	10.50	1/15
-1.00	1.00	8.50	1/7
1.00	1.00	10.50	1/7
-1.41	0.00	8.09	1/10
1.41	0.00	10.91	1/10
0.00	-1.41	9.50	1/20
0.00	1.41	9.50	1/6
0.00	0.00	9.50	1/10
0.00	0.00	9.50	1/10
0.00	0.00	9.50	1/10
0.00	0.00	9.50	1/10



De los tratamientos:

T1: 8.50 pH y 1/15 relación sólido/solvente g/mL.

T2: 10.50 pH y 1/15 relación sólido/solvente g/mL

T3: 8.50 pH y 1/7 relación sólido/solvente g/mL

T4: 10.50 pH y 1/7 relación sólido/solvente g/mL

T5: 8.09 pH y 1/10 relación sólido/solvente g/mL

T6: 10.91 pH y 1/10 relación sólido/solvente g/mL

T7: 9.50 pH y 1/20 relación sólido/solvente g/mL

T8: 9.50 pH y 1/6 relación sólido/solvente g/mL

T9: 9.50 pH y 1/10 relación sólido/solvente g/mL

T10: 9.50 pH y 1/10 relación sólido/solvente g/mL

T11: 9.50 pH y 1/10 relación sólido/solvente g/mL

T12: 9.50 pH y 1/10 relación sólido/solvente g/mL

Figura 1. Esquema experimental para la obtención de concentrado proteico de ñuña en función de los pH de extracción y relación sólido/solvente.

3.4 Elaboración de harina del frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.)

En la Figura 2, se muestra el diagrama de flujo del proceso para la elaboración de harina de ñuña.

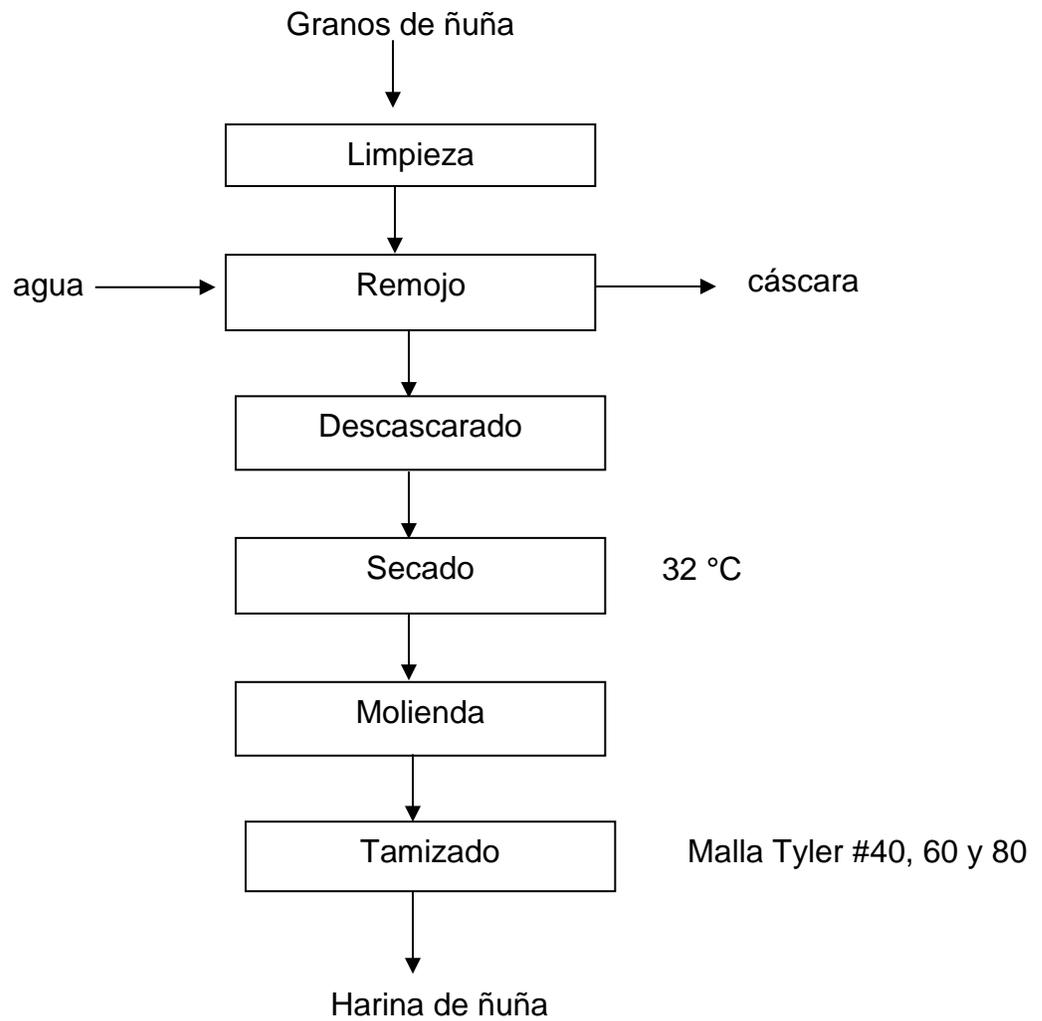


Figura 2. Diagrama de flujo para la obtención de la harina de frijol ñuña

Descripción del diagrama de flujo

- **Limpieza.** La limpieza de los granos se realizó manualmente retirando todo material extraño, granos pequeños o rotos.
- **Remojo.** La operación se realizó con agua potable, en un tiempo de 10 min y una relación de 1/3 de (pp/vv), con la finalidad de ablandar la estructura del grano.
- **Descascarado.** Se realizó de forma manual con la finalidad de eliminar la cáscara de los granos, las cuales se ablandan con el remojo.
- **Secado.** Se realizó el secado en estufa a 32 °C por 12 h.
- **Molienda.** Posteriormente se procedió a moler los granos en molino manual, obteniendo harina de partículas pequeñas, cuya finalidad es facilitar el proceso de extracción proteica y separación de componentes no proteicos, por tanto incrementar el contenido de proteínas.
- **Tamizado.** Los granos molidos luego pasaron por mallas número 40, 60 y 80 Tyler. La harina obtenida se almacenó en bolsas de polietileno de baja densidad (12 x 18 cm) para su conservación.

3.5 Obtención de concentrado proteico a partir del frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.)

En la Figura 3, se muestra el diagrama de flujo del proceso de obtención de concentrado proteico de ñuña, se utilizaron 50 g de harina de frijol ñuña por cada tratamiento.

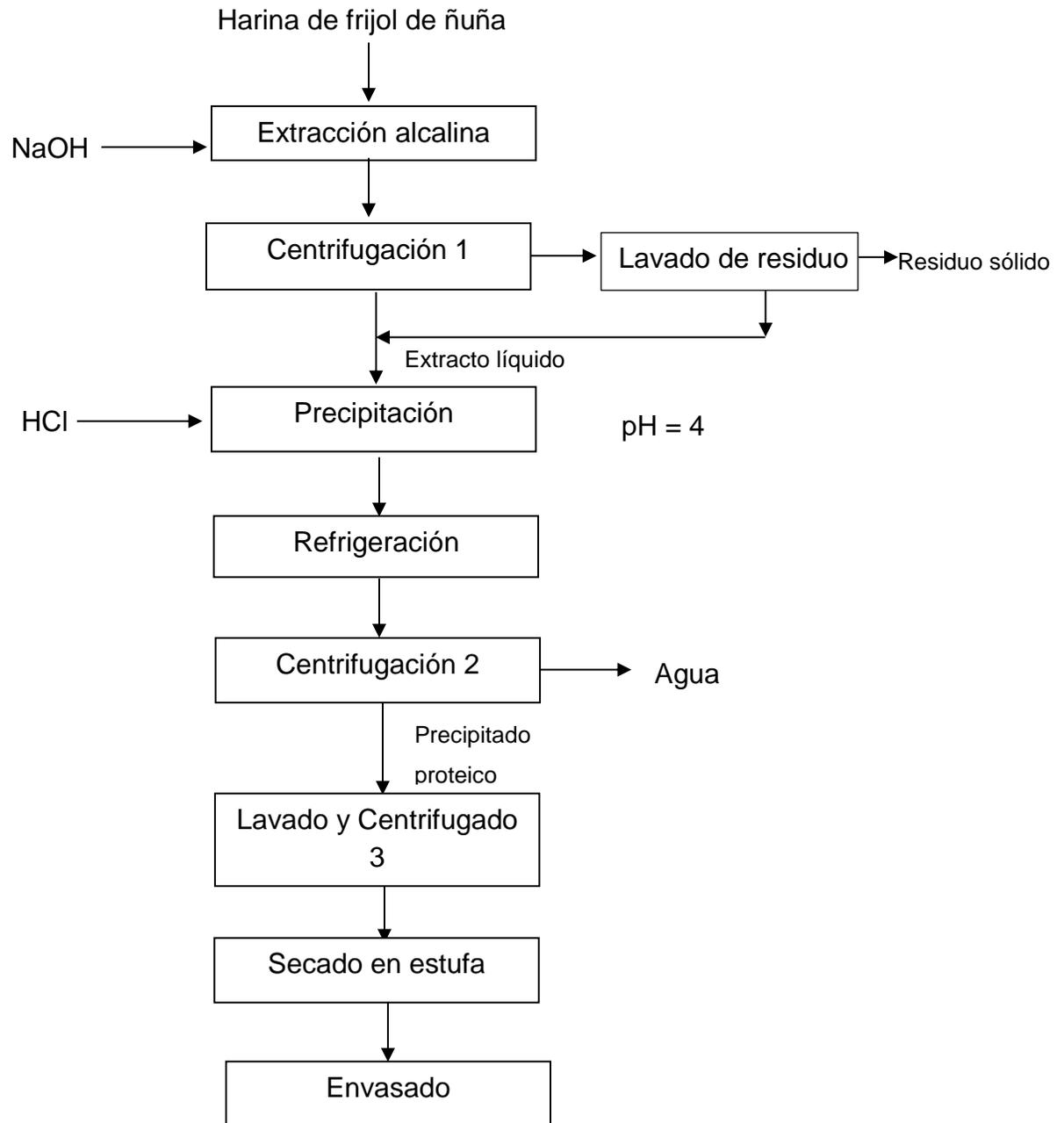


Figura 3. Diagrama de flujo de obtención de concentrado proteico de frijol ñuña.

Fuente: Jarpa-Parra y otros (2014) y Vega (2015)

Descripción del diagrama de flujo

- **Extracción alcalina.** La extracción de las proteínas de la harina de frijol ñuña se llevó a cabo por tratamiento de la harina a pH alcalino. Los factores relación sólido/solvente, pH de extracción, se trabajaron según el diseño indicado en el cuadro 2. Se agitó la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente.
- **Centrifugación 1.** Los residuos insolubles (polisacáridos básicamente) se separaron del extracto líquido por centrifugación a 9000 rpm por 20 min a 20 °C. Se recogió el extracto líquido.
- **Lavado de residuo sólido.** Al residuo sólido se le añadió agua destilada en una relación sólido/agua de 1/5(v/v), se ajustó a los pHs presentes en el Cuadro 3, se aplicó dos lavados de 10 min. Finalmente se recogió toda la porción líquida y se eliminó el residuo sólido.
- **Precipitación.** El extracto líquido con la proteína en suspensión se ajustó a pH 4 con HCl 1N.
- **Refrigeración.** Seguidamente la proteína en suspensión se almacenó en refrigeración en suspensión por 15 min.
- **Centrifugación 2.** Se procedió a centrifugar el extracto a 9000 rpm por 20 min a 10 °C. Se recogió el precipitado proteico.
- **Lavado y Centrifugado 3.** Se procedió a lavar el precipitado proteico por una vez con agua destilada en relación 1/5 (v/v) y se centrifugó a 9000 rpm por 20 min a 10 °C.
- **Secado en estufa.** Una vez recogido el precipitado proteico, se procedió a secar en la estufa a una temperatura de 33 °C por 14 h.
- **Envasado.** Se pesó las muestras y se guardó en bolsas de polietileno en refrigeración a 4 °C.

3.6 Análisis fisicoquímicos

3.6.1. Determinación de proteínas del frijol ñuña

La metodología que se empleó fue el método 960.52- Micro- Kjeldahl (N x 5.7) (AOAC, 1990).

Procedimiento

- Se pesó 0.2 - 0.3g de muestra y se colocó en el balón de digestión.
- Se agregó 1.5 g de catalizador ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) para acelerar la reacción y 3.5 mL de H_2SO_4 concentrado.
- Se colocó el balón en la cocina de digestión, iniciando a temperatura baja por 5 min.
- Se aumentó a la máxima temperatura hasta que el color del contenido del balón sea verde cristalino transparente. La digestión se realizó hasta que el contenido del balón se torneó cristalino.
- Se dejó enfriar las muestras digeridas evitando la contaminación.
- Se diluyó las muestras digeridas con agua destilada (30mL) y se colocó en el equipo de destilación.
- Se colocó en un Erlenmeyer conteniendo 50 ml de mezcla de ácido bórico con indicador de pH en la salida del destilador para recibir el destilado.
- Se agregó 40mL de hidróxido de sodio al 40% sobre la muestra digerida y diluida, éste se agregó cuando la muestra empezó a hervir por un tiempo de 30min. Para verificar el pase de todo el nitrógeno se realizó la prueba de papel de tornasol, seguidamente, se destiló por 5 min. más después del viraje de color.
- Finalmente se tituló con HCl 0.1N y se anotó el gasto.
- El porcentaje de proteína se calculó por la fórmula que se muestra (se consideró 5.71 como factor de conversión de nitrógeno a proteína).

$$\% P = \frac{G \times N \times 14 \times f \times 100}{m}$$

Donde:

%P: Porcentaje de proteína

G: Gasto en la muestra analizada (mL)

f: Factor de conversión (5.71)

N: Normalidad del hidróxido de titulación

m: Muestra (mg)

3.6.2. Rendimiento de extracción de proteína del concentrado proteico

El rendimiento de extracción se determinó mediante la siguiente fórmula (Vega, 2015):

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{A_p \text{ (g)} \times P_a \text{ (\%)}}{\tilde{N} \text{ (g)} \times P_{\tilde{n}} \text{ (\%)}} \times 100$$

Donde:

A_p: Concentrado proteico obtenido (g)

P_a: Proteína del aislado proteico obtenido (%)

Ñ: Peso de la harina de ñuña (g)

P_ñ: Porcentaje de la proteína de ñuña en la harina (%)

3.6.3. Capacidad de absorción de agua del concentrado proteico

La capacidad para absorber agua es considerada una propiedad funcional de las proteínas, fundamental en alimentos viscosos tales como sopas, salsas, masas y alimentos horneados, productos donde se requiere una buena interacción proteína agua. Método de centrifugación de Janicki y Walczac (1954) citado por Fleming (1974). El método consistió en preparar una dispersión al 10% (en base seca) en agua y centrifugando a 2500 rpm por 15 minutos. Se midió el volumen de

agua suelta, entonces la retención de agua se traduce como agua absorbida (g de agua absorbida/g. de concentrado proteico).

$$\text{Absorción de agua (\%)} = \frac{\text{Peso agua absorbida (g)}}{\text{Peso muestra seca (g)}} \times 100$$

3.6.4. Capacidad de formación de espuma del concentrado proteico

La capacidad de formación de espuma, se relaciona con el aumento en la carga neta de las proteínas lo cual debilita las interacciones hidrofóbicas e incrementa la flexibilidad de las proteínas, esto conduce que estas se difundan más rápido que la interfase agua-aire y encapsule el aire aumentando la capacidad espumante (Vega, 2015). Wu y otros (2009) citado por Vega (2015), recomiendan que la estabilidad de espuma deben ser las adecuadas (entre 50 y 70%) dependiendo del producto para los sistemas alimentarios que requieren espuma como tortas y el helado.

El procedimiento consistió en pesar 6 g de muestra en un recipiente con 200 mL de agua destilada; en seguida, se procedió a agitarlo con una batidora velocidad 2 por 6 min, se registraron datos antes y después del batido. El porcentaje del volumen debido al batido se calculó por la fórmula que se muestra. Luego de medir el volumen total del batido, se tomó nota del volumen inicial (representa el 100%) de la espuma y se midió la disminución del volumen que representa la estabilidad de espuma a los tiempos de 1, 10, 20 y 60 min (Lin y otros, 1974).

$$\text{Incremento Vol. (\%)} = \frac{\text{VDB} - \text{VAB}}{\text{VAB}} \times 100$$

Donde:

VDB: Volumen después del batido

VAB: Volumen antes del batido

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto del pH de extracción y relación sólido/solvente sobre el contenido de proteínas del concentrado proteico de ñuña

En el Anexo 1, se presenta los resultados experimentales del efecto de pH de extracción y la relación sólido/solvente sobre el contenido de proteínas del concentrado proteico, rendimiento y absorción de agua de frijol ñuña.

En el Cuadro 3, se presenta los resultados experimentales del efecto de pH de extracción y la relación sólido/solvente sobre el contenido de proteínas del concentrado proteico de ñuña.

Cuadro 3. Resultados experimentales del efecto de pH de extracción y la relación sólido/solvente sobre el contenido de proteínas del concentrado proteico de ñuña

Variable independiente		Variable dependiente
pH extracción	Sólido/ solvente	Contenido de proteínas (%)
8.5	1/15	66.69
10.5	1/15	79.17
8.5	1/7	69.17
10.5	1/7	76.24
8.09	1/10	68.93
10.91	1/10	81.92
9.5	1/20	76.22
9.5	1/6	72.2
9.5	1/10	70.5
9.5	1/10	70.35
9.5	1/10	70.01

El menor contenido de proteínas del concentrado proteico (66.69%) se obtuvo con pH 8.50 y relación sólido/solvente de 1/15 y el mayor contenido de proteínas del concentrado proteico (81.92%) se obtuvo con pH 10.91 y relación sólido/solvente de 1/10.

En el Cuadro 4, se presenta el análisis de varianza del contenido de proteínas del concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación solido/solvente, donde se observa que el modelo cuadrático fue significativo ($p < 0.05$), el efecto lineal de pH de extracción, efectos cuadráticos de pH y relación solido/solvente fueron significativos, además, los valores de los coeficientes de determinación R^2 Y R^2 ajustado fueron 0.959 y 0.910 respectivamente (superiores al 0.85 y 0.75).

Cuadro 4. Análisis de varianza del contenido de proteínas del concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p
Model	227.14	5	45.427	23.217	0.001
A-pH extracción	179.75	1	179.747	91.866	0
B-Sólido/ solvente	4.7	1	4.705	2.405	0.172
AB	7.32	1	7.317	3.74	0.101
A ²	27.86	1	27.856	14.237	0.009
B ²	13.99	1	13.995	7.153	0.037
Residual	11.74	6	1.957		
Lack of Fit	11.6	3	3.867	82.811	0.002
Pure Error	0.14	3	0.047		
Cor Total	238.88	11			
R^2	0.959		R^2 -ajustado		0.91

En el Cuadro 5, se presenta los coeficientes estimados del contenido de proteínas del concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente, donde se observa que fueron significativos ($p < 0.05$) el intercepto, pH de extracción lineal, pH de extracción cuadrático y relación sólido/solvente cuadrático.

Cuadro 5. Coeficientes estimados del contenido de proteínas del concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación solido/solvente

Factor	Coeficiente estimado	p	VIF (factor inflacionario de varianza)
Intercepto	191.399	0.009	
A-pH extracción	-31.157	0.021	1.00
B-Sólido/solvente	102.825	0.600	1.00
AB	-35.659	0.099	1.00
A ²	2.086	0.007	1.04
B ²	1027.930	0.026	1.04

A partir de estos coeficientes se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de proteínas(\%)} = 191.464 - 31.179 * \text{pH} + 102.825 \text{ sólido/solvente} - 35.659 * \text{pH} * \text{sólido/solvente} + 2.086 * \text{pH}^2 + 1027.930 * \text{sólido/solvente}^2$$

En el Cuadro 6, se presenta los valores observados y predichos para el contenido de proteínas del concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente, donde se observa que el coeficiente de variación fue menor al 10% lo que indica una cercanía entre los valores observados y predichos (buena estimación del modelo cuadrático) (Firatligil-Durmus y Evranuz, 2010).

Cuadro 6. Valores observados y predichos para el contenido de proteínas del concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y la relación sólido/solvente

pH extracción	Sólido/ solvente	Contenido de proteínas (%)			
		Observados	Predichos	Residual	Variación
8.50	1/15	66.69	68.49	-1.80	2.70
10.50	1/15	79.17	80.68	-1.51	1.90
8.50	1/7	69.17	69.66	-0.49	0.71
10.50	1/7	76.24	76.44	-0.20	0.26
8.09	1/10	68.93	67.72	1.21	1.75
10.91	1/10	81.92	81.13	0.79	0.97
9.50	1/20	76.22	74.29	1.93	2.53
9.50	1/6	72.20	72.13	0.07	0.10
9.50	1/10	70.50	70.25	0.25	0.35
9.50	1/10	70.35	70.25	0.10	0.14
9.50	1/10	70.01	70.25	-0.24	0.35
9.50	1/10	70.15	70.25	-0.10	0.15

En la Figura 4, se presenta la superficie de respuesta y de contornos para el contenido de proteínas del concentrado proteico de ñuña en función del pH de extracción y relación sólido/solvente, donde se observa que a mayor pH en el rango de 10.21 a 10.92 y a menor relación sólido/solvente en el rango de 1/13 a 1/20 se obtuvo los valores más altos de contenido de proteínas del concentrado proteico 81.22 a 85.81%.

El mayor contenido de proteínas del concentrado proteico a mayor pH se debe a que la solubilidad de las proteínas aumenta a pH alcalino, pues las proteínas exhiben una solubilidad mínima de pH 4 – 5 (pH isoelectrico) y máxima a pH alcalino (Badui, 1990 y Ventura, 2003); además, Fennema (2000) indica que la extracción de las proteínas vegetales de sus fuentes vegetales se lleva a cabo a pH alcalino y la acidificación del extracto proteico al punto isoelectrico, precipita la mayor fracción proteica. Según Jarpa-Parra y otros (2014) el aumento de la carga superficial sobre

las moléculas de proteína conduce a una mayor solubilidad en el sistema de disolventes a pHs altos.

Vega (2015) evaluó el efecto del pH de extracción y de precipitación sobre el rendimiento y propiedades funcionales en aislado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pavita, encontró que la proteína de ñuña precipitó a pH 3.5; la proteína se obtuvo por extracción a pH 10.5 y relación sólido/solvente 1/3, obteniendo un contenido de proteínas del 69.75%.

Ventura (2003) obtuvo aislados proteicos a partir de la nuez de marañón, encontró que la solubilidad de las proteínas aumentó al incrementar el pH, utilizó el método de extracción alcalina a pH (9 – 11) obteniendo un concentrado de proteínas de 90 – 91.3 %.

Urrutia (2010) optimizó los parámetros de extracción proteica en medio alcalino a partir del tarwi, los valores de pH de los tratamientos osciló de 8.5 a 10.5; con un pH de precipitación de 4.5 y relación sólido/solvente 1/3, obteniendo concentrado de proteínas del 78.96%.

A menor relación sólido/solvente hay menor contenido de proteínas del concentrado proteico, se debe a que, según Urrutia (2010), la cantidad de harina y agua añadida a la solución es muy influyente, incluso también depende del porcentaje y tipo de proteínas de la harina. El agua permite la eliminación de la mayor parte de los compuestos antinutricionales, parte de las sales y de los compuestos no proteicos que quedan en el sobrenadante (agua) después de las sucesivas centrifugaciones para separar la materia insoluble (extracto proteico) del sobrenadante, se obtiene un concentrado o extracto proteico más puro. La cantidad de harina a solubilizar en el sistema harina y solvente, influye en la composición y cantidad porcentual de la proteína recuperada en la precipitación isoeléctrica, sin embargo, el solvente (solución extrayente que es ajustada a pH de extracción) debe ser adecuada para que no se sature los componentes solubilizados, lo que indica que es de vital importancia determinar la relación apropiada para que sea adecuado entre la cantidad de disolvente y la cantidad de proteínas a solubilizar.

Ventura (2003) determinó que se logra buena solubilidad proteica a relaciones harina: solvente de 1/15 que permite la máxima extracción de proteínas a partir de nuez de marañón. Sin embargo para la obtención de aislado proteico de tarwi (*Lupinus mutabilis*), Urrutia (2010) determinó que la relación de harina: solvente 1/10 fue lo adecuado; este valor difiere de datos obtenidos por Pedroche y otros (2004), quienes concluyeron que la relación 1/20 permite la máxima solubilidad proteica en colza (*Brassica napus*), en la presente investigación de extracción de proteínas de ñuña se logró máxima extracción relación sólido/solvente 1/10.

4.2. Efecto del pH de extracción y relación sólido/solvente en el rendimiento proteico de ñuña

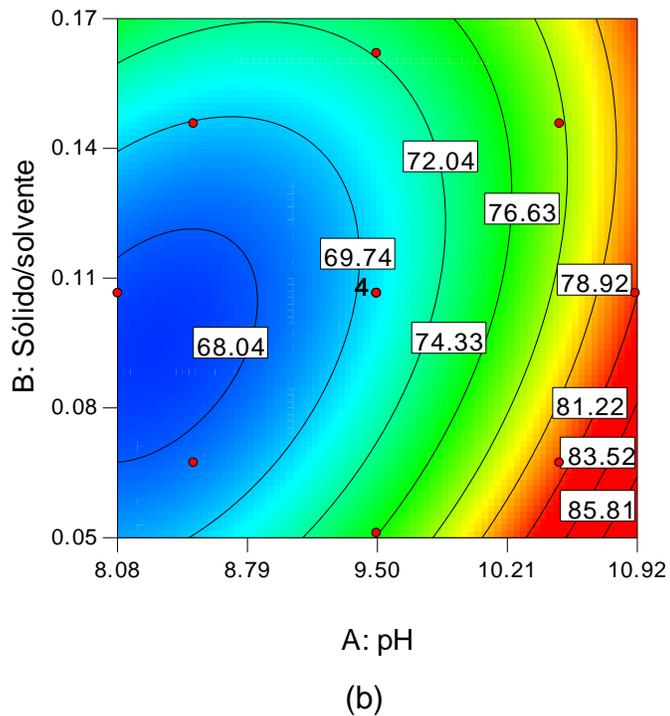
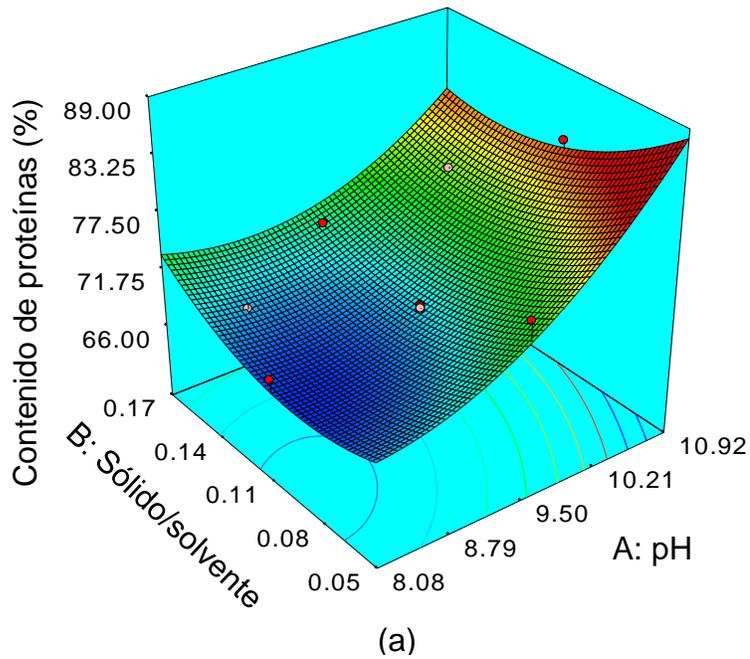
En el Cuadro 7, se presenta los resultados experimentales del efecto de pH de extracción y la relación sólido/solvente sobre el rendimiento proteico de ñuña

Cuadro 7. Resultados experimentales del efecto de pH de extracción y la relación sólido/solvente sobre el rendimiento proteico de ñuña

Variable independiente		Variable dependiente
pH extracción	Sólido/ solvente	Rendimiento (%)
8.5	1/15	51.73
10.5	1/15	75.01
8.5	1/7	47.37
10.5	1/7	65.04
8.09	1/10	56.59
10.91	1/10	79.29
9.5	1/20	66.55
9.5	1/6	45.73
9.5	1/10	55.92
9.5	1/10	56.24
9.5	1/10	58.46

El menor rendimiento (47.37%) se obtuvo con pH 8.50 y relación sólido/solvente de 1/7 y el mayor rendimiento (79.29%) se obtuvo con pH 10.91 y relación sólido/solvente de 1/10.

En el Cuadro 8, se presenta el análisis de varianza para rendimiento de extracción proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente, donde se observa que el modelo cuadrático fue significativo ($p < 0.05$); el efecto lineal de pH de extracción y relación sólido/solvente, efecto cuadrático de pH fueron significativos; además, los valores de los coeficientes de determinación R^2 y R^2 ajustado fueron 0.955 y 0.917 respectivamente (superiores al 0.85 y 0.75).



Design-Expert® Software
 Contenido de proteínas (%)

● Design Points
 81.92
 66.69

X1 = A: pH
 X2 = B: Sólido/solvente

Figura 4. Superficie de respuesta(a) y de contornos (b) para el contenido de proteínas del concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y la relación sólido/solvente.

Cuadro 8. Análisis de varianza en rendimiento proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p
Modelo	1100.417	5	220.083	25.161	0.001
A-pH extracción	667.389	1	667.389	76.298	0.000
B-Sólido/ solvente	239.609	1	239.609	27.393	0.002
AB	7.863	1	7.863	0.899	0.380
A ²	162.149	1	162.149	18.537	0.005
B ²	4.811	1	4.811	0.550	0.486
Residual	52.483	6	8.747		
Falta de ajuste	48.452	3	16.151	12.020	0.035
Error puro	4.031	3	1.344		
Total	1152.900	11			

En el Cuadro 9, se presenta los coeficientes estimados en rendimiento proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente, donde se observa que fueron significativos ($p < 0.05$) el intercepto, pH de extracción lineal, relación sólido/solvente lineal y pH de extracción cuadrático.

Cuadro 9. Coeficientes estimados en rendimiento proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente.

Factor	Coefficiente estimado	p	VIF
Intercepto	396.112	0.000	
A-pH extracción	-82.647	0.000	1.00
B-Sólido/solvente	331.162	0.002	1.00
AB	-36.804	0.380	1.00
A ²	5.033	0.005	1.04
B ²	-597.454	0.486	1.04

A partir de estos coeficientes se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento (\%)} = & 396.112 - 82.647 * \text{pH} + 331.162 * \text{sólido/solvente} \\ & -36.804 * \text{pH} * \text{sólido/solvente} + 5.033 * \text{pH}^2 - \\ & 597.454 * \text{sólido/solvente}^2 \end{aligned}$$

En el Cuadro 10, se presenta los valores observados y predichos para rendimiento de extracción proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente, donde se observa que el coeficiente de variación fue menor al 10% lo que indica una cercanía entre los valores observados y predichos (buena estimación del modelo cuadrático) (Firatligil-Durmus y Evranuz, 2010).

Cuadro 10. Valores observados y predichos para rendimiento proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente.

pH extracción	Sólido/ solvente	Rendimiento (%)			Variación (%)
		Observados	Predichos	Residual	
8.50	1/15	51.73	55.85	-4.12	7.96
10.50	1/15	75.01	76.92	-1.91	2.54
8.50	1/7	47.37	47.71	-0.34	0.72
10.50	1/7	65.04	63.17	1.87	2.87
8.09	1/10	56.59	53.90	2.69	4.75
10.91	1/10	79.29	79.73	-0.44	0.55
9.50	1/20	66.55	62.75	3.80	5.70
9.50	1/6	45.73	47.27	-1.55	3.38
9.50	1/10	55.92	56.75	-0.83	1.48
9.50	1/10	56.24	56.75	-0.50	0.89
9.50	1/10	58.46	56.75	1.72	2.93
9.50	1/10	56.36	56.75	-0.38	0.68

En la Figura 5, se presenta la superficie de respuesta y de contornos para rendimiento proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente, donde se observa que a mayor pH en el rango de 10.21 a 10.92 y

a menor relación sólido/solvente en el rango de 1/13 a 1/20 se obtuvo los valores más altos de concentrado proteico oscilando de 73.62 a 81.21%.

Las proteínas generalmente tienen carga neta negativa, por lo que cuando se incrementa el pH, los iones OH⁻ son incorporados al sistema haciendo que la carga neta sea aún más negativa, este fenómeno ocasiona que las moléculas de las proteínas se repelan y se solubilizan, paralelamente las moléculas de agua son incorporadas mediante puentes de hidrógeno incrementando la solubilidad. Ha sido reportado que altas concentraciones de álcalis ayuda al rompimiento de puentes de hidrógeno y a la disociación del hidrógeno de los grupos carbonilos, fenólicos y sulfatos del interior de la molécula, se despliega parcialmente la cadena polipeptídica (Shen y otros, 2008). La carga superficial aumentada sobre las moléculas de proteína conduce entonces a una mayor solubilidad en el sistema disolvente (Jarpa-Parra y otros, 2014). Las mejores condiciones de operación para alcanzar el máximo rendimiento están representadas por las zonas más rojizas (Figura 5).

Jyothirmayi y otros (2005) han reportado mayor extracción de proteínas de harina de pajuro desgrasada (*Erythrina variegata*) a pH alcalinos, llegando a un máximo de 94.8 % de extracción a pH 12. Los autores mencionan que han adicionado además cloruro de sodio a concentraciones de 0.1M y 0.5 M, que contribuyeron a incrementar la extracción de proteína. De otro lado, Tan y otros (2014) mediante optimización de la temperatura, tiempo de extracción y relación sólido/solvente, extrajeron proteína de frijol pinto (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto) a pH 8 obteniendo 54.8 % de rendimiento, valores mucho menores a los obtenidos en esta investigación.

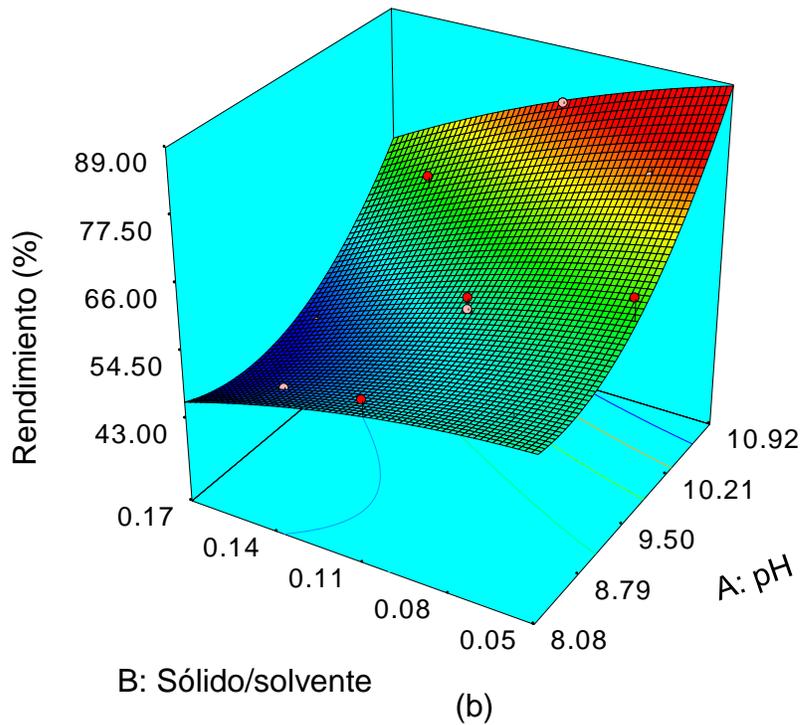
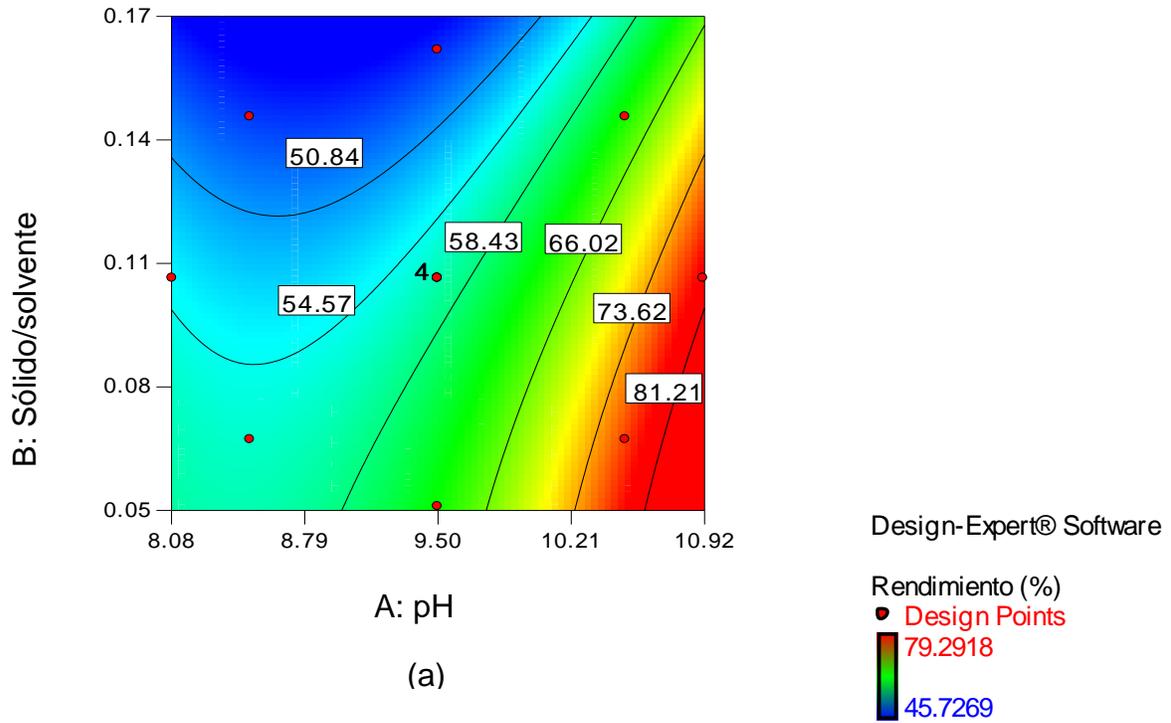


Figura 5. Superficie de respuesta(a) y de contornos (b) para rendimiento proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente.

Jarpa-Parra y otros (2014) reportaron rendimientos similares a la investigación (82%) en la extracción de proteína de lentejas, donde el rendimiento aumentó con el incremento del pH y nivel de relación sólido/solvente entre 1/20 y 1/10, lo que se explica por la mayor solubilidad de la proteína de lentejas a pH alto.

Vega (2015) evaluó el efecto del pH de extracción (8.5, 9.5 y 10.5) y de precipitación (3.5, 4.5 y 5.5) sobre el rendimiento y propiedades funcionales en aislado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.), siendo el de mayor rendimiento (74.78%) a un pH de extracción 10.5 y pH de precipitación 3.5.

4.3. Efecto del pH de extracción y relación sólido/solvente para absorción de agua del concentrado proteico

En el Cuadro 11, se presenta los resultados experimentales del efecto de pH de extracción y la relación sólido/solvente para absorción de agua del concentrado proteico.

Cuadro 11. Resultados experimentales del efecto de pH de extracción y la relación sólido/solvente para absorción de agua del concentrado proteico

Variable independiente		Variable dependiente
pH extracción	Sólido/solvente	Absorción de agua (g/g)
8.5	1/15	2.6
10.5	1/15	3.4
8.5	1/7	2.67
10.5	1/7	3.09
8.09	1/10	2.63
10.91	1/10	3.65
9.5	1/20	2.79
9.5	1/6	2.87
9.5	1/10	2.8
9.5	1/10	2.8
9.5	1/10	2.73

La menor absorción de agua (2.60 g/g) se obtuvo con pH 8.50 y relación sólido/solvente de 1/15.

En el cuadro 12, se presenta el análisis de varianza para la absorción de agua en concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente, donde se observa que el modelo cuadrático fue significativo ($p < 0.05$), el efecto lineal de pH de extracción, efecto cuadrático de pH y la interacción pH-relación solido/solvente fueron significativos, además, los valores de los coeficientes de determinación R^2 Y R^2 ajustado fueron 0.976 y 0.956 respectivamente (superiores al 0.85 y 0.75).

Cuadro 12. Análisis de varianza para la absorción de agua en concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p
Model	1.113	5	0.223	48.628	0.000
A-pH extracción	0.887	1	0.887	193.848	0.000
B-Sólido/ solvente	0.002	1	0.002	0.473	0.517
AB	0.035	1	0.035	7.687	0.032
A ²	0.185	1	0.185	40.502	0.001
B ²	0.001	1	0.001	0.246	0.637
Residual	0.027	6	0.005		
Falta de ajuste	0.025	3	0.008	8.845	0.053
Error puro	0.003	3	0.001		
Total	1.140	11			

sólido/solvente.

En el Cuadro 13, se presenta los coeficientes estimados para la absorción de agua en concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente, donde se observa que fueron significativos ($p < 0.05$) el intercepto,

pH de extracción lineal, pH de extracción cuadrático e interacción pH-relación sólido/solvente.

Cuadro 13. Coeficientes estimados para absorción de agua en concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente.

Factor	Coeficiente estimado	p	VIF
Intercepto	12.669	0.000	
A-pH extracción	-2.642	0.000	1.00
B-Sólido/solvente	21.038	0.517	1.00
AB	-2.462	0.032	1.00
A ²	0.170	0.001	1.04
B ²	9.143	0.637	1.04

A partir de estos coeficientes se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Absorción de agua (\%)} = & 12.669 - 2.642 * \text{pH} + 21.038 * \text{sólido/solvente} \\ & - 2.462 * \text{pH} * \text{sólido/solvente} + 0.170 * \text{pH}^2 + \\ & 9.143 * \text{sólido/solvente}^2 \end{aligned}$$

En el Cuadro 14, se presenta los valores observados y predichos para absorción de agua en concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente, donde se observa que el coeficiente de variación fue menor al 10% lo que indica una cercanía entre los valores observados y predichos (buena estimación del modelo cuadrático) (Firatligil-Durmus y Evranuz, 2010).

Cuadro 14. Valores observados y predichos para absorción de agua en concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente.

pH extracción	Sólido/solvente	Absorción de agua (g/g)			
		Observados	Predichos	Residual	Variación (%)
8.50	1/15	2.60	2.55	0.05	1.77
10.50	1/15	3.40	3.41	-0.01	0.18
8.50	1/7	2.67	2.71	-0.04	1.51
10.50	1/7	3.09	3.18	-0.09	2.99
8.09	1/10	2.63	2.65	-0.01	0.52
10.91	1/10	3.65	3.59	0.06	1.64
9.50	1/20	2.79	2.83	-0.04	1.36
9.50	1/6	2.87	2.78	0.08	2.94
9.50	1/10	2.80	2.78	0.02	0.61
9.50	1/10	2.80	2.78	0.02	0.76
9.50	1/10	2.73	2.78	-0.04	1.64
9.50	1/10	2.79	2.78	0.01	0.23

En la Figura 6, se presenta la superficie de respuesta y de contornos para absorción de agua en concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente, donde se observa que a mayor pH en el rango de 10.21 a 10.92 y a menor relación sólido/solvente en el rango de 1/13 a 1/20 se obtuvo los valores más altos de absorción de agua en concentrado proteico oscilando de 3.39 a 3.62%.

Una mayor capacidad de absorción de agua (de 3.39 a 3.62 g/g) fue observado (Figura 6) cuando las muestras de concentrado proteico de frijol de ñuña fueron extraídas con valores altos de pH en el rango de 10.5 – 10.9 y relación sólido/solvente de 1/20 – 1/10. Al presentar la superficie de la proteína mayor número de iones, estos formaran más puentes de hidrógeno con el agua. También se ha observado mayor solubilidad de las proteínas a pH alcalinos que a valores de

pH ácidos (Susmann y otros, 2013). Las mejores condiciones de operación para alcanzar la máxima absorción de agua están representadas por las zonas más rojizas (Figura 6).

Silva (2006) obtuvo un aislado proteico a partir de quinua orgánica, donde reporto un aumento de capacidad de absorción de agua a medida que aumentaron los valores de pH de extracción (7, 9 y 11) encontrando valores de capacidad de absorción de agua de 3, 3.9 y 4 (g de agua/g de muestra) respectivamente.

Chel-Guerrero y otros (2011) obtuvieron un aislado proteico a partir de frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.), encontrando una capacidad de absorción de agua de 1.5 (g de agua/g de muestra) a pH de extracción 7 y 3.3 (g de agua/g de muestra) a pH de extracción 9, a mayor pH de extracción se consiguió mayor absorción de agua, similar a lo obtenido con el concentrado proteico de ñuña. El valor de capacidad de absorción de agua del concentrado proteico de ñuña fue menor que los concentrados proteicos de soya (5.45 g de agua/g de muestra) reportado por Elizalde y otros (1995), posiblemente tenga menor número de grupos polares en la superficie de la proteína ya que los grupos polares son los responsables de las interacciones proteína – agua.

4.4. Efecto del pH de extracción y relación sólido/solvente de la formación de espuma en concentrado proteico

En el Cuadro 15, se presenta los resultados experimentales del efecto de pH de extracción y la relación sólido/solvente de la formación de espuma en concentrado proteico.

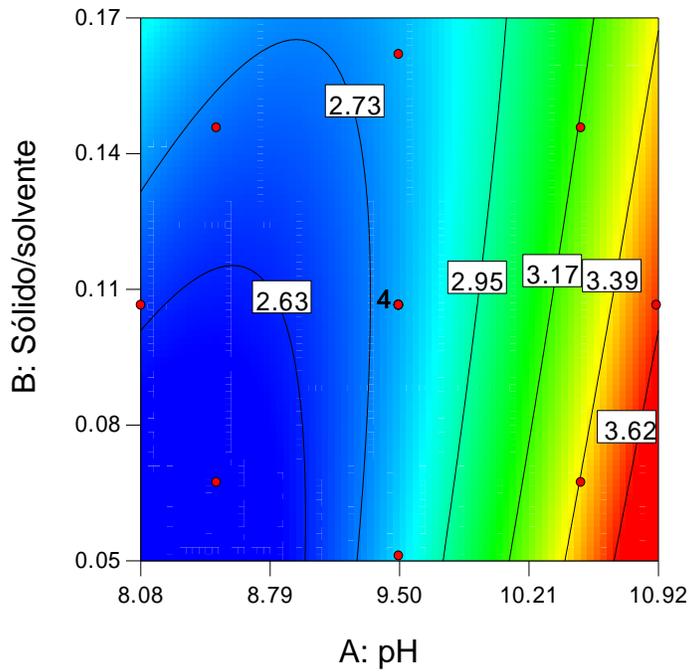
Cuadro 15. Resultados experimentales del efecto de pH de extracción y la relación sólido/solvente de la formación de espuma en concentrado proteico.

Variables independientes		Variable dependiente
pH extracción	Sólido/ solvente	Formación de espuma (%)
8.5	1/15	22.14
10.5	1/15	20
8.5	1/7	29
10.5	1/7	50
8.09	1/10	46
10.91	1/10	24
9.5	1/20	46
9.5	1/6	20
9.5	1/10	37
9.5	1/10	32
9.5	1/10	35

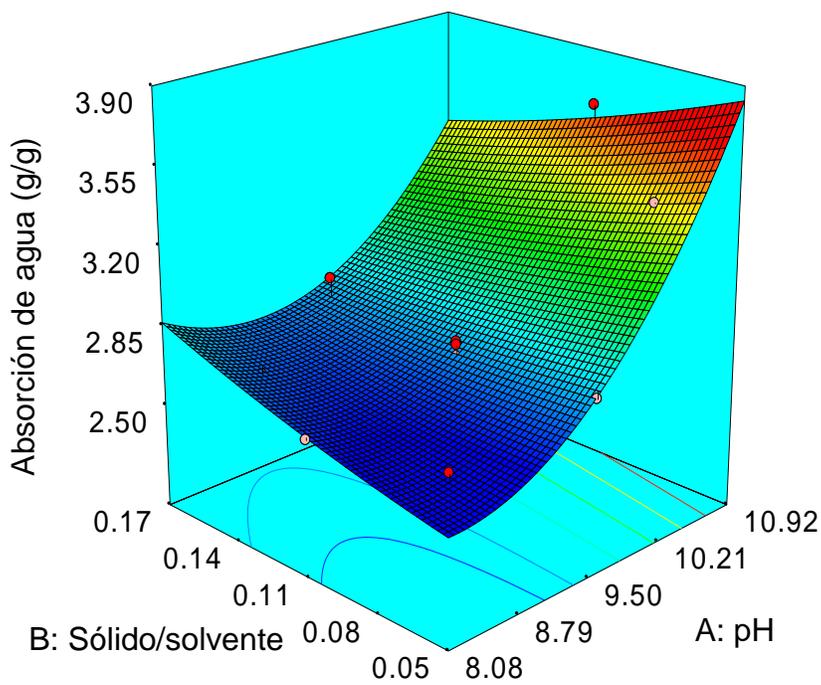
En el Cuadro 16, se presenta el análisis de varianza en la formación de espuma de concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente, donde se observa que el modelo cuadrático no fue significativo ($p > 0.05$), además, los valores de los coeficientes de determinación R^2 Y R^2 ajustado fueron 0.138 y 0.00 respectivamente (inferiores al 0.85 y 0.75).

Cuadro 16. Análisis de varianza para la formación de espuma del concentrado proteico de ñuña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p
Model	165.83	5	33.167	0.192	0.955
A-pH extracción	18.77	1	18.766	0.109	0.753
B-Sólido/ solvente	0.00	1	0.001	0.000	0.998
AB	133.86	1	133.865	0.776	0.412
A ²	1.18	1	1.176	0.007	0.937
B ²	13.06	1	13.064	0.076	0.792
Residual	1035.43	6	172.571		
Falta de ajuste	1017.43	3	339.142	56.524	0.004
Error puro	18.00	3	6.000		
Total	1201.26	11			



(a)



(b)

Figura 6. Superficie de respuesta(a) y de contornos (b) para absorción de agua en concentrado proteico de ñaña en función al pH de extracción y relación sólido/solvente.

V. CONCLUSIONES

El pH de extracción y la relación sólido/solvente influyó significativamente en el rendimiento proteico y absorción de agua, sin embargo no fue significativo en la formación de espuma.

El mejor tratamiento se obtuvo con pH 10.91 y la relación sólido/solvente 1/10, que permitieron lograr mayor rendimiento de extracción (79.29%) y absorción de agua (3.65 g/g) en concentrado proteico de frijol de ñuña, cuyo contenido de proteínas fue 81.92%.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar el Diseño compuesto central rotacional teniendo como punto central la combinación de pH altos comprendido entre 10.78 – 10.92 y la relación sólido/solvente 1/15 para obtener mayor contenido de proteínas del concentrado proteico.

Investigar las propiedades funcionales (hidrodinámicas, texturales y superficiales) y nutricionales del concentrado proteico obtenido.

Realizar una investigación de la aplicación del concentrado proteico en la industria cárnica, industria láctea o industria de panificación.

VII. BIBLIOGRAFÍA

AOAC.1990. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. Vol. 15th ed. Washington D.C. USA.

Alfonzo, G. 2000. Efecto del tratamiento térmico sobre el contenido de fibra dietética total, soluble e insoluble en algunas leguminosas. Archivos latinoamericanos de nutrición, 50(3): 281-285.

Badui, D. S. 1990. Química de alimentos. Editorial Alhambra Mexicana, segunda edición. México DF, México.

Brack, A. 1999. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. Ed. Centro Bartolomé de las Casas. Cusco, Perú.

Camarena, F. 2006. La ñuña. Revista Agronoticias N° 311. Universidad Agraria la Molina. Pág. 41 - 44.

Chel- Guerrero L., Gallegos, S., Martínez, A., Castellanos, A. y Betancur, D. 2011. Functional Properties of Proteins from Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) Seeds. Food Science and Technology International, 17: 119-126.

Elizalde, B.E, Kanterewicz, R.J, Pilosof, A.M.R, Bartholomai, G.B. 1988. Physicochemical properties of food proteins related to their ability to stabilize oil-in-water emulsions. Journal of Food Science, 53 (3): 845-848.

Fennema, O. 2000. Química de los Alimentos. Editorial Acribia S. A. Segunda Edición. Zaragoza, España.

Firatligil-Durmus, E., y Evranuz, O. 2010. Response surface methodology for protein extraction optimization of red pepper seed (*Capsicum frutescens*. Food Science and Technology, 43: 226-231.

Fleming S. E., Sosulski F.W, Kilara, A. y Humbert E.S. 1974. Viscosity and water absorption characteristics of slurries of sunflower and soybean flours, concentrates and isolates. *Journal of Food Science*; 39 (1): 188-192.

Gamarra, F., Puma, J. y Arana, J. 1997. Q'osco Poroto INIA- primera variedad de frijol reventón para los Valles Interandinos de la Sierra - Cuzco. *Agro Enfoque*. 81^a ed. Lima, Perú.

Girón-Calle, J., Pedroche, J., Patino, J. y Millán, F. 2005. Proteínas alimentarias y coloides de interés industrial. Universidad de Sevilla. Pág. 20 – 24. Recuperado de:

https://books.google.com.pe/books?id=LRfw2HTVzOwC&pg=PA459&lpg=PA459&dq=giron+calle+2005+proteinas&source=bl&ots=NjrOyRpv_Q&sig=67QKDx1qHROJrPsIldFDMUGopg&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwj5mPf6hZ_WAhXD5CYKHYDuDrsQ6AEINjAG#v=onepage&q=giron%20calle%202005%20proteinas&f=false

González-Quijada, M., Alanís-Guzman, M. y Serna-Saldivar, S. 2003. Ebony (*Phitecellobium flexicaule Benth*) and proteins fractionation, solubilization, characterization and production of an isolate. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.*, 53(1): 84-88.

Jarpa-Parra, M., Bamdad, F., Wang, Y., Tian, Z., Temelli, F., Han Jay y Chen, L. 2014. Optimization of lentin protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality. *Department of Agricultural, Food Science and Technology*, 57(1): 461 - 469.

Jyothirmayi, T., Prabhakara, P. y Walde, S. 2005. Nitrogen extractability and functional properties of defatted *Erythrina variegata* flour. *Food Chemistry*, 96: 242 - 247.

Lin, M., Humbert, E. y Sosulski, F. 1974. Certain functional properties of sunflower meal (*Helianthus annus*). *Journal of Food Science*, 39(2): 368-370.

Mantilla, F. 2014. Efecto de la proporción de (*Chenopodium quinoa*) quinua y jugo de (*Passiflora edulis*) maracuyá en las características fisicoquímicas y aceptabilidad

general de una bebida nutritiva. Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Universidad César Vallejo.

Nelson, D y Cox, M. 2001. Principios de bioquímica. Lehninger. Cuarta edición. España.

Ninaquispe, P. 2010. Efecto de la proporción de papaya (*Carica papaya*) y carambola (*Averrhoa carambola*) y la dilución en el sabor y apariencia del néctar mixto utilizando el método de superficie de respuesta. *Agroindustrial Science*, 1:15 – 21.

Pedroche, J., María M., Megías, C. y Lqari, H. 2004. Utilisation of rapeseed protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Instituto de la Grasa. Sevilla- España*, 55: 354 - 358.

Pinto, C. y Lescano, C. 2002. Aplicación de la metodología de superficie de respuesta en la optimización del proceso de clarificación de jugo de manzana. Universidad Agraria la Molina. *Anales Científicos UNALM*.

Robinson, D.S. 1991. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza.

Shen, L., Wang, X., Wang, Z., Wu, Y., y Chen, J. 2008. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. *Food Chemistry*, 107:929-938.

Simbaña, C. 2011. Estudio de las propiedades físicas y funcionales de un hidrolizado enzimático de proteína de chocho a escala piloto y su aplicación como fertilizante. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Universidad de la frontera. Chile.

Silva, J. 2006. Obtención, caracterización y relación estructura – funcionalidad de un aislado proteico de quinua (*Chenopodium quinoa*) orgánica proveniente de la VI región de Chile. Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química- Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Sosa, C. 2000. Influencia de dos métodos de extracción de un aislado proteico de Lupino (*Lupinus mutabilis*) en sus propiedades funcionales. Tesis para optar en Grado de Magister Scientiae. Universidad Nacional Agraria la Molina.

Sussman, D., Pickard, C., Schweiggert, U. y Eisner, P. 2013. Influence of different processing parameters on the isolation of lupin (*Lupinus angustifolius* L.) protein isolates: a preliminary study. *Journal of Food Process Engineering*, 36:18 – 28.

Tan, E; Ngoh, Y y Gan, C. 2014. A comparative study of physicochemical characteristics and functionalities of pinto bean protein isolate (PBPI) against the soybean protein isolate (SPI) after the extraction optimization. *LWT – Food Science and Technology*, 152: 447 – 455.

Urrutia, W. 2010. Determinación de parámetros óptimos de extracción alcalina para la obtención de aislado proteico a partir de tarwi. Trabajo de tesis en Ingeniería Agroindustrial. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac. Apurímac, Perú.

Vega, B. 2015. Efecto del pH de extracción y de precipitación sobre el rendimiento y propiedades funcionales de aislado proteico de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad pavita. Tesis para optar el título profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Facultad de ciencias agrarias. Universidad Privada Antenor Orrego, Perú.

Ventura, M. 2003. Obtención de aislado proteico de la Nuez de Marañón (*Anacardium occidentale* L.). Tesis para optar el título profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria la Molina.

VIII. ANEXOS

Anexo1. Resultados experimentales del efecto de pH de extracción y la relación sólido/solvente sobre el contenido de proteína del concentrado proteico, rendimiento y absorción de agua en frijol nuña.

Variables independientes				Variables dependientes			
pH extracción	Sólido/solvente	pH extracción	Sólido/solvente	Concentrado proteico (%)	Rendimiento (%)	Absorción de agua (g/g)	Formación de espuma (%)
-1.00	-1.00	8.50	1/15	66.69	51.73	2.60	22.14
1.00	-1.00	10.50	1/15	79.17	75.01	3.40	20.00
-1.00	1.00	8.50	1/7	69.17	47.37	2.67	29.00
1.00	1.00	10.50	1/7	76.24	65.04	3.09	50.00
-1.41	0.00	8.09	1/10	68.93	56.59	2.63	46.00
1.41	0.00	10.91	1/10	81.92	79.29	3.65	24.00
0.00	-1.41	9.50	1/20	76.22	66.55	2.79	46.00
0.00	1.41	9.50	1/6	72.20	45.73	2.87	20.00
0.00	0.00	9.50	1/10	70.50	55.92	2.80	37.00
0.00	0.00	9.50	1/10	70.35	56.24	2.80	32.00
0.00	0.00	9.50	1/10	70.01	58.46	2.73	35.00