

**ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES OPTIMAS
A NIVEL DE LABORATORIO Y DE PLANTA PILOTO
PARA LA PREPARACION DE UN AISLADO PROTEINICO
DE *Lupinus mutabilis*¹**

*Teresa Rodríguez Pacheco,² Teófilo Aliaga,²
Hans Schoeneberger³ y Rainer Gross³*

**Instituto de Nutrición, Institutos Nacionales de Salud y
Ministerio de Salud, Lima, Perú**

RESUMEN

Se investigaron inicialmente las condiciones de laboratorio para determinar los parámetros óptimos de procesamiento necesarios para la elaboración de un aislado de proteína a partir de hojuelas comerciales, molidas y desgrasadas, de *Lupinus mutabilis*. Las variables de extracción fueron: pH (2—10); razón lupino:solvente (1:5—1:40), temperatura (28°C—60°C) y tiempo (10—50 min). Se encontró que el punto isoelectrico de la proteína de lupino es de pH 4.5, con una solubilidad proteínica mayor de 80% sobre el pH de 8.0. Usando hojuelas desgrasadas molidas, con un tamiz de malla No. 70—100, y extrayendo a pH 8.7 por 60 min, se obtuvo un aislado proteí-

Manuscrito modificado recibido: 29—7—81.

- 1 Parte de este trabajo fue presentado en: *The First International Lupine Workshop*, celebrado en Lima, Perú, del 12 al 21 de abril de 1980.
- 2 Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- 3 Justus Liebig Universitaet, Giessen, R. F. Alemania. Agencia Alemana de Cooperación Técnica, c/o Instituto de Nutrición, Proyecto Lupino, Lima 11, Perú.

nico por acidificación a pH 4.5, con 99.8% de proteína (en base seca), comparado con 55.25% de proteína de la materia prima original. Este aislado de proteína representó el 32% de la materia prima y 57.6% del nitrógeno inicial. En los ensayos a nivel de planta piloto se encontró que el rendimiento del aislado proteínico disminuyó a 20.4% de la materia prima y a 36.4% del nitrógeno inicial. La relación de eficiencia proteínica para el aislado de proteína al ser suplementado con metionina, fue de 2.15, acusando una digestibilidad de 89.33.

INTRODUCCION

El lupino (*Lupinus mutabilis*) está siendo investigado en diversos países como una semilla potencialmente productora de proteína. Sus posibilidades tienen particular demanda en áreas del mundo donde no crece la soya, ya que es tolerante hacia una amplia variedad de suelos y condiciones climáticas.

Aunque el lupino es un cultivo comercial relativamente nuevo, se le conoce desde antaño como fuente alimenticia (1).

La semilla de *Lupinus mutabilis* tiene un alto contenido de proteína y aceite que varía de 37.7 a 45.9% en proteína y de 17.1 a 21.3%, en aceite (1). Esto la hace muy importante, ya que puede desempeñar un papel considerable como fuente de calorías y proteína en la alimentación humana.

El alto contenido de aceite y proteína de esta leguminosa la hace valiosa en la industria, puesto que se obtiene como producto principal el aceite, y como subproducto, una torta desgrasada con alto contenido de proteína.

El presente trabajo tuvo por finalidad buscar la utilización de esta torta desgrasada para obtener un producto de alto contenido proteínico (aislado proteínico) libre de sustancias antinutricionales y tóxicas.

El aislado proteínico constituye la forma más refinada de proteína. Por definición, este aislado debe contener un mínimo de 90% de proteína (N x 6.25) en base seca (2). Además de su alto contenido en proteína, tiene otras ventajas (3), debido a que elimina la fracción insoluble y en parte no digerible de los carbohidratos, y separa las sustancias odoríficas, principios amargos, y sustancias dañinas como alcaloides (4) y hemaglutininas (5), que perjudican la digestibilidad y utilización de las proteínas.

Primero se determinaron las condiciones óptimas de extracción a nivel de laboratorio. Una vez establecidos estos parámetros,

se hicieron ensayos a nivel de planta piloto para determinar rendimientos y optimización del proceso.

La utilización del aislado proteínico de lupino libre de alcaloides y sustancias no deseables en diversos productos alimenticios, será motivo de otro estudio, considerando que, al igual que el aislado de soya, éste puede ser usado como ingrediente básico en la elaboración de alimentos para infantes, dietéticos, productos cárnicos y otros.

MATERIALES Y METODOS

Materia Prima

Se utilizó torta molida de *Lupinus mutabilis* de extracción por prensa-solvente procedente de la fábrica "La Unión S.A.", tanto para los ensayos a nivel de laboratorio como para los de planta piloto, con un contenido de proteína de 54.7% base seca, humedad 11.8%, grasa 3.2% base seca, alcaloides 4.2%, y un PDI de 18.6. Tamaño de partícula: malla No. 70-100.

Todos los análisis de la materia prima y del producto final fueron realizados según los métodos de la AOAC (6). La determinación de alcaloides se hizo según el método de von Baer (7). El análisis de aminoácidos fue realizado por Degussa AG, por el método de Beck *et. al.* (8). El PER y la digestibilidad *in vivo* se llevaron a cabo según la AOAC, 1970 (6).

Metodología Seguida a Nivel de Laboratorio

Los primeros ensayos realizados fueron orientados a determinar las condiciones óptimas para la extracción de la proteína, tomando como variables los principales factores que afectan su extracción y aislamiento. Estos son el pH de la solución, la relación lupino:solvente, el tiempo, la temperatura de extracción y la coagulación (9).

1. *pH de la solución.* Obtención de la curva de solubilidad de la proteína. Se dispersaron 3 g de muestra en 120 ml de agua destilada, ajustando el pH entre 2 y 10 con HCl 1 N ó NaOH 1 N según lo requerido. Luego se agitó durante 40 minutos por medio de un agitador magnético. El pH de la dispersión se reajustó en el transcurso de la prueba de conformidad con lo requerido. Entonces se centrifugó a 3,000 RPM durante 15 minutos, obtenién-

dose un precipitado y un sobrenadante; este último se analizó tomando por duplicado muestras de 10 ml y se determinó nitrógeno por el método de macro-Kjeldahl (6).

2. *Relación lupino:solvente.* En este ensayo y para los subsiguientes se procedió en la misma forma que en el caso anterior, con la diferencia de que el pH de la solución (pH 9) se mantuvo constante, variándose el factor en estudio, en este caso la relación lupino:solvente, en 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30 y 1:40.

3. *Tiempo de extracción.* Este se varió en 10, 20, 30, 40 y 50 minutos.

4. *Temperatura y extracción.* Se varió la temperatura del extracto a 28°, 40°, 50°, y 60°C.

5. *Curva de coagulación.* Para verificar la evolución de la coagulación ácida se procedió primero a realizar una extracción de la proteína con los siguientes parámetros, que se consideraron como los más adecuados y óptimos a nivel de laboratorio: pH de la solución (pH 9), tiempo de extracción (30 min), relación 1:30, y temperatura de la solución (25°C). Luego de centrifugar esta solución a 3,000 RPM por 15 minutos, se tomaron de la parte alícuota varias muestras de 70 ml c/u, y se ajustó el pH según lo requerido, con HCl 1 N. Después de la coagulación se centrifugó nuevamente a 3,000 RPM por 15 minutos, se tomaron muestras de 10 ml de la alícuota, y se analizó por duplicado el por ciento de nitrógeno.

6. *Temperatura de coagulación.* Para verificar si el aumento de la temperatura incrementaba el % de coagulación, se calentó a "baño de maría" agitando constantemente durante 5 minutos muestras del extracto proteínico que habían sido llevadas a su punto isoeléctrico.

Metodología Seguida a Nivel de Planta Piloto

Antes de establecer el flujo definitivo a nivel de planta piloto, se llevó a cabo una serie de ensayos preliminares, variándose en éstos la relación lupino:solvente (1:40, 1:30, 1:20, 1:15), el tiempo de extracción (40-60 min), el número de centrifugaciones necesarias para separar por completo los constituyentes no deseados, y el tipo de secado (liofilización, atomización).

Se redujo la relación 1:40 obtenida como óptima en los ensayos a nivel de laboratorio a 1:15, considerando la dificultad que implicaba la manipulación de grandes volúmenes de líquido. Debido a este cambio en la relación, se aumentó el tiempo de extracción

de 40 a 60 minutos. Además, se estimó necesario hacer una doble centrifugación en la primera etapa del proceso para lograr una buena separación de la fracción insoluble y no digerible de los carbohidratos.

En la Figura 1 se indica el procedimiento seguido para la obtención del aislado proteínico de lupino.

Descripción del Proceso

Se llena el tanque con la cantidad requerida de agua y harina desgrasada de lupino, de tal manera que siempre se mantiene constante la relación 1:15. Se agita el sistema a fin de lograr una buena dispersión de lupino en el agua, verificando el pH de la solución, y se adiciona NaOH 1 N hasta que ésta alcance un pH de 8.7.

El proceso de extracción dura 60 minutos. Luego se centrifuga a 2,000 RPM y el extracto 1 obtenido se vuelve a centrifugar para eliminar por completo cualquier residuo indeseable que haya podido quedar. Al extracto 2 se le adiciona HCl 1 N hasta llegar al pH del punto isoeléctrico de la proteína (pH de 4.5). Se agita el sistema durante 15 minutos y se deja sedimentar por varias horas para disminuir la dispersión de proteína en la solución. Luego, por decantación, se separa el suero 1, y el precipitado que queda en el tanque se centrifuga, obteniéndose el precipitado de proteína deseado.

Este precipitado se lava con agua destilada y se centrifuga tres veces para eliminar el sabor amargo del ácido y residuos de alcaloides. Luego, en función al producto final requerido se seca el producto, ya sea por liofilización obteniéndose proteína de lupino al pH de 4.5, o bien se neutraliza al pH de 7 y se seca por atomización para obtener un proteinato de lupino.

RESULTADOS Y DISCUSION

Ensayos a Nivel de Laboratorio

1. *Curva de solubilidad de la proteína de lupino a distintos pH.* La Figura 2 muestra un máximo rendimiento en la solubilidad de la proteína a un pH de 10, pero a pesar de ello, se recomienda hacer la extracción a un pH que oscila entre 8.5 y 9.0 para evitar hidrólisis de la proteína y la consecuente pérdida en el aislado proteínico. Además, las propiedades funcionales y el valor nutricional

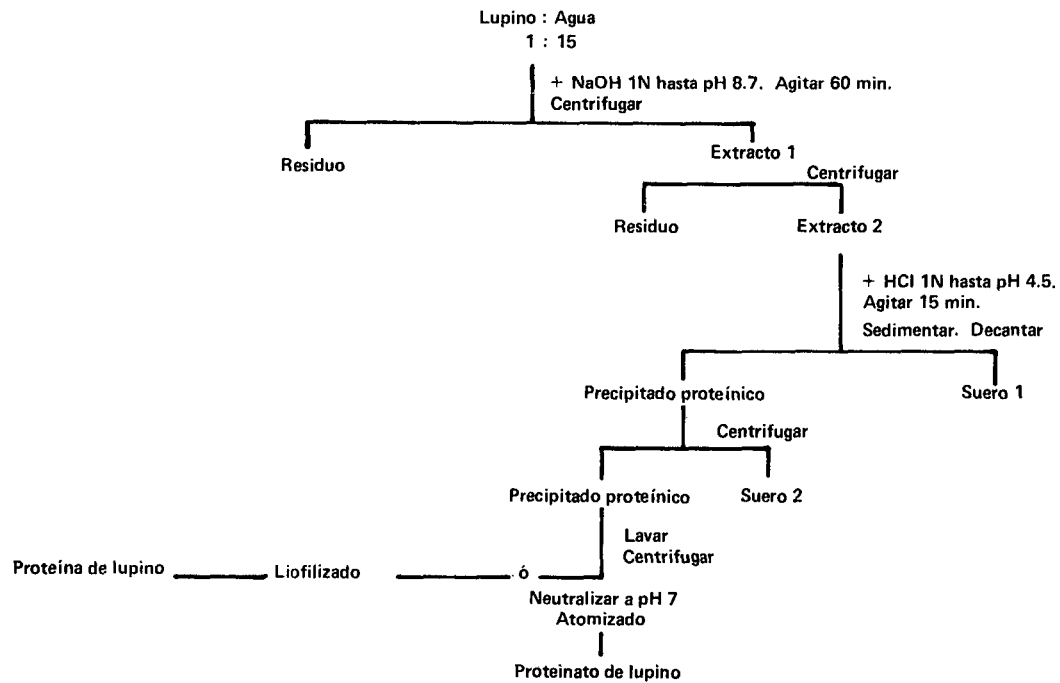


FIGURA 1
Procedimiento seguido para la obtención del aislado proteínico de lupino

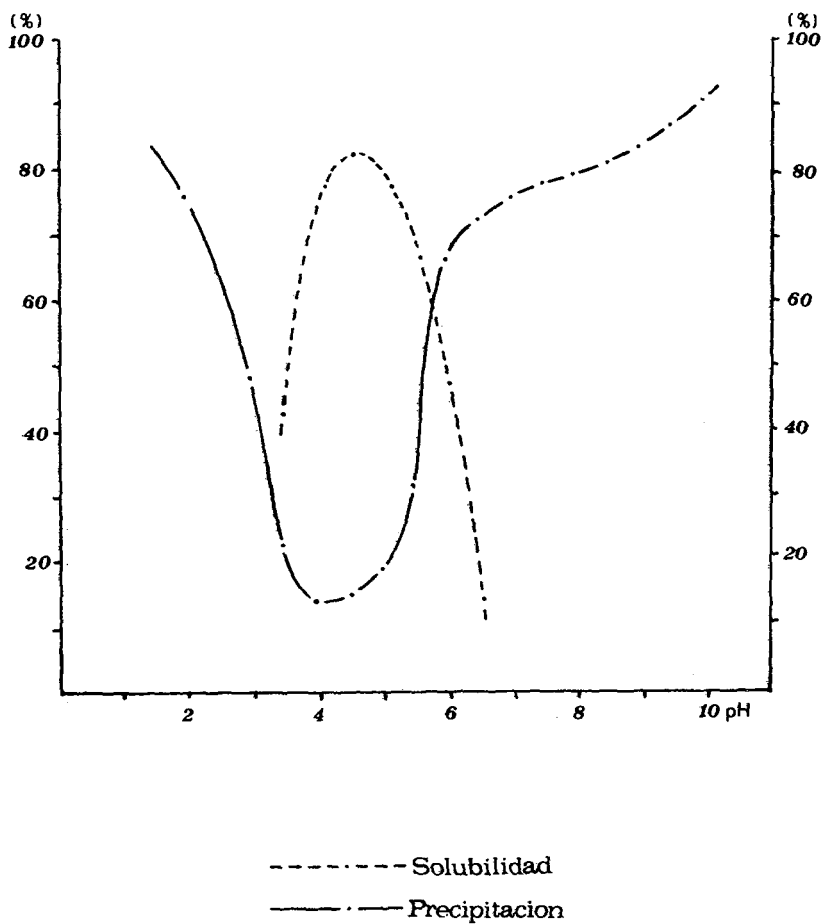


FIGURA 2

Curva de solubilidad y precipitación de la proteína de *Lupinus mutabilis* en relación al pH.

del aislado así preparado se considera de calidad superior.

2. *Relación lupino:solvente*

Relación	o/o Solubilidad
1 : 5	73.75
1 : 10	77.68
1 : 15	77.66
1 : 20	79.03
1 : 30	81.71
1 : 40	82.58

Los resultados obtenidos en este ensayo indican que volúmenes grandes de solvente facilitan una buena solubilidad de la proteína, lográndose una máxima extracción con la relación de 1:40.

3. *Tiempo de extracción.* La cantidad de nitrógeno extraído se incrementa a través del tiempo, hasta alcanzar un equilibrio en el que un mayor tiempo de extracción no influirá en la solubilidad de la proteína. Según los datos obtenidos experimentalmente, 40 minutos se puede considerar como tiempo óptimo de extracción, ya que el empleo de mayor tiempo no sería económico ni incrementaría la solubilidad de la proteína significativamente.

Tiempo (min)	o/o Solubilidad
10	80.60
20	83.00
30	83.80
40	84.70
50	84.70

4. *Temperatura de extracción*

Temperatura °C	o/o Solubilidad
28	80.51
40	80.51
50	81.62
60	79.41

Del detalle anterior se aprecia que la temperatura de extracción no tiene mayor incidencia, ya que el aumento de tempera-

tura en la solución no logra un incremento significativo en cuanto a la solubilidad de la proteína. Por lo tanto, trabajando a temperatura ambiente, se obtienen buenos resultados.

5. *Curva de precipitación de las proteínas a distintos pH.* La curva de precipitación obtenida (Fig. 2) muestra que al pH de 4.5 precipita la mayor cantidad de proteína, por lo que éste se considera como el punto isoelectrico operacional de la proteína del lupino.

6. *Temperatura de coagulación*

Temperatura °C	% Coagulación
28	79.50
40	79.00
50	77.50
60	76.83

Con base en las cifras citadas, se desprende que el incremento de temperatura disminuye la cantidad de proteína precipitada, lo que puede deberse a ligeras alteraciones en la estructura proteínica a causa del incremento en la temperatura.

Ensayos a Nivel de Planta Piloto

El aislado proteínico de lupino obtenido en planta piloto tiene características físicas muy deseadas ya que es inodoro, insaboro, y de color crema agradable, por lo que puede ser incorporado sin ningún problema en la elaboración de diversos productos.

El análisis fisicoquímico del aislado liofilizado y de la materia prima utilizada se exponen en la Tabla 1.

La Tabla 2 muestra el análisis de aminoácidos de la materia prima y del producto final, notándose una disminución de metionina en el aislado obtenido, de 0.8 a 0.2 g/16 g N, por lo que se asume una pérdida de este aminoácido en el transcurso del proceso.

Rendimiento

El rendimiento en materia seca obtenido a nivel laboratorio fue de 31.8%, y éste disminuyó hasta 20.4% al trabajar a nivel de planta piloto, según lo revela la Tabla 3. Este bajo rendimiento se debe principalmente a que no se contó con equipo adecuado en

TABLA 1

ANALISIS QUIMICO DE LA TORTA Y DEL AISLADO PROTEINICO DE *Lupinus mutabilis* COMPARADO CON UN AISLADO PROTEINICO COMERCIAL DE SOYA^a

Componentes	Torta de <i>Lupinus mutabilis</i>		Aislado proteínico de <i>Lupinus mutabilis</i> liofilizado		Aislado proteínico de soya	
% Humedad	11.8		8.0		3.7	
% Proteína (N x 6.25)	48.3	54.7 ^b	90.4	98.3 ^b	94.7	98.3 ^b
% Grasa	2.8		0.7		—	
% Fibra	4.3		0.4		0.2	
% Ceniza	—		1.7		2.7	
% Alcaloides	3.7		0.017 ^c		—	
PDI	18.6		94.8 ^d		—	
pH de la dispersión 1 : 10 en agua	5.6		4.5		5.5	

a En base húmeda.

b En base seca.

c Analizado por cromatografía de gases, por el Ing. Thomas Hatzold en el Centro de Control de Productos Biológicos y Medicamentos.

d Antes de hacer la determinación, se llevó la dispersión al pH de 6.6.

TABLA 2

ANALISIS DE AMINOACIDOS DE LA TORTA Y DEL AISLADO
PROTEINICO DEL *Lupinus mutabilis* *

Aminoácido	g de aminoácido/16 g de N	
	Torta	Aislado
Acido aspártico	9.7	9.6
Treonina	3.5	2.7
Serina	4.6	5.0
Acido glutámico	21.8	25.7
Prolina	3.8	4.8
Glicina	3.8	3.1
Alanina	3.5	2.6
Cistina ^a	1.4	1.3
Valina	3.5	3.3
Metionina ^b	0.8	0.2
Isoleucina	4.0	4.1
Leucina	6.5	6.7
Tirosina	4.1	3.9
Fenilalanina	3.2	3.1
Lisina	5.6	4.9
Histidina	2.8	2.8
Arginina	9.4	11.1
Triptofano ^c	0.9	0.7
NH ₃	1.8	2.2

* Análisis realizado por *Degussa AG, Frankfurt, R. F. Alemania.*

^a Determinado como ácido de cistina.

^b Determinado como óxido de azufre de metionina.

^c Determinado después de hidrólisis alcalina.

la centrifugación para separar el suero del precipitado proteínico, y la velocidad del agitador no fue suficiente para el volumen de trabajo, dificultándose así la solubilidad de la proteína. Un factor sumamente crítico es el bajo índice de solubilidad proteínica de la materia prima que, debido al procesamiento que recibe en la planta de extracción de aceite (tostado), tiene un índice de solubilidad muy por debajo de lo recomendado para el logro de buenos rendi-

TABLA 3

COMPARACION DE LOS RENDIMIENTOS OBTENIDOS A NIVEL DE LABORATORIO Y PLANTA PILOTO

	Rendimiento en materia seca g/100 g de M.P.		o/o Proteína (N x 6.25) base seca		Rendimiento proteínico g prot/100 g prot. de M.P.	
	Labora- torio	Planta piloto	Labora- torio	Planta piloto	Labora- torio	Planta piloto
Torta de <i>Lupinus mutabilis</i>			55.2	54.7		
Residuo	20.6	39.9	47.6	42.5	18.0	30.8
Aislado proteínico de <i>Lupinus mutabilis</i>	31.8	20.4	99.8	98.3	57.6	36.4

M. P. = Materia prima.

mientos. Además, según la literatura, a nivel industrial se recomienda efectuar una extracción doble de la materia prima, lo que no se hizo en la planta piloto ni en laboratorio; o sea, hacer la primera extracción con una relación de 1:15, y la segunda con 1:5. De esta manera, si en el residuo queda aún proteína, ésta es extraída en la segunda extracción.

Los datos en la Tabla 3 también revelan claramente la pérdida de gran cantidad de proteína en el residuo obtenido a nivel de planta piloto, comparado con el ensayo en el laboratorio, debido a las razones ya apuntadas.

Evaluación Biológica

La relación de eficiencia proteínica obtenida para el aislado de proteína es bastante baja en comparación con la caseína, a causa de la deficiencia en metionina. Debido a las diferentes etapas que implica el procesamiento del aislado, la cantidad de metionina obtenida es mucho menor que la de la materia prima original

(Tabla 2). Gran parte de la metionina se queda en el residuo, como lo señalan Ruiz y Hove (9) en su estudio con semillas de *Lupinus angustifolius*. Al adicionar este aminoácido esencial al aislado, se logra un gran incremento del PER, llegándose a una eficiencia proteínica de 86^o/o.

La digestibilidad obtenida para el aislado proteínico es muy buena, siendo excelente cuando se adiciona metionina (Tabla 4).

TABLA 4

RELACION DE EFICIENCIA PROTEINICA Y DIGESTIBILIDAD
(in vivo) DEL AISLADO PROTEINICO DE *Lupinus mutabilis*
COMPARADO CON LA CASEINA

Fuente de proteína	PER*	PER corregido según Campbell	o/o	Digestibilidad*
Aislado proteínico	0.56 ± 0.13	0.46	18.4	85.30 ± 1.61
Aislado proteínico ^a + 0.2 ^o /o de metionina	2.59 ± 0.08	2.15	86.0	89.33 ± 1.06
Caseína	3.01 ± 0.05	2.50	100.0	87.10 ± 0.84

* Determinado según el método de la AOAC 1970 (6).

^a En base a la dieta con 10^o/o de proteína.

SUMMARY

ESTABLISHMENT OF OPTIMUM CONDITIONS FOR THE
PREPARATION OF A PROTEIN ISOLATE FROM *Lupinus mutabilis*,
AT LABORATORY AND PILOT PLANT LEVEL

Laboratory conditions were first investigated to determine the optimum processing parameters for the preparation of a protein isolate from the ground, defatted, commercial flakes of *Lupinus mutabilis*. The extraction variables were: pH (2-10); solvent to lupine ratio (5:1 to 40:1); temperature (28°C -60°C) and time (10-50 min). The isoelectric point of the lupine protein was found to be pH 4.5 with a protein solubility higher than 80^o/o

above pH 8.0. Using 70—100 mesh, ground defatted flakes, and extracting at pH 8.7 for 60 min, a protein isolate was obtained on acidification to pH 4.5 which was 99.8 protein (dry basis), compared to 55.25% protein for the original material. This protein isolate represented 32% of the initial material and 57.6% of the initial nitrogen. When making pilot plant assays we found that the yield of protein isolate decreased to 20.4% of the original material and 36.4% of the initial nitrogen. The protein efficiency ratio for the protein isolate was 2.15 when supplemented with methionine, and had a digestibility of 89.33.

BIBLIOGRAFIA

1. Gross, R. & E. von Baer. Posibilidades del *Lupinus mutabilis* y *Lupinus albus* en los países andinos. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, **27**: 451-474, 1977.
2. Smith, A. K. & S. J. Circle. **Soybeans: Chemistry and Technology**. Vol. I, **Proteins**. Westport, Conn., AVI Publishing Co., Inc., 1978.
3. Mustakas, G. C. & V. E. Sohns. Soy processes, equipment, capital and processing costs. En: **U.S. Farmer Cooperative Service. Edible Soy Protein; Operational aspects of producing and marketing**. Research Report 33. 1976.
4. Bruese, M. **Untersuchungen über Schnelldachweis von Alkaloiden in Lupinenprotein**. Tesis, Institut fuer Ernährungswissenschaften I. Justus - Liebig - Universitaet Giessen. 1976.
5. Schoeneberger, H., C. Ildefonso, R. Gross, H.—D. Cremer & I. Elmadfa. Bestimmung antinutritiver Inhaltstoffe in Lupinen. *Art. Ernaeh. med.*, **5**: 153-156, 1980.
6. Association of Official Agricultural Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 11th ed. Washington, D.C., The Association, 1970.
7. von Baer, D., E. H. Reimerdes, & W. Feldheim. Methode zur Bestimmung der Chinolizidin-Alkaloide in *Lupinus mutabilis*. *Z. Lebens. Unters. Forsch.*, **196**: 27-31, 1979.
8. Beck, A., H. Schmidtborn, M. Spindler & H. Tanner. Bestimmung von gebundenen und supplementierten Aminosaeuren in Futtermitteln und Mischfuttern mit Hilfe der Ionenaustausch chromatographie. *Kraftfutter*, **3**: 118-124, 1978.
9. Ruiz Junior, L. P. & E. L. Hove. Conditions affecting production of a protein isolate from Lupine seed kernels. *J. Sci. Food Agr.*, **27**: 667-674, 1976.