



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Influencia de la germinación en la obtención de aislados
proteicos de altramuz

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Amor Lluch, Marta

Tutor/a: García Pérez, José Vicente

Cotutor/a: Benedito Fort, José Javier

Cotutor/a externo: DALMAU ESTELRICH, MARIA ESPERANZA

Director/a Experimental: NAVARRO VOZMEDIANO, PAOLA

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

TRABAJO FINAL DE GRADO

Valencia, 2022

INFLUENCIA DE LA GERMINACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE AISLADOS PROTEICOS DE ALTRAMUZ

Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos 2018-2022

Autor: Marta Amor Lluch.

Tutor académico: José Vicente García Pérez.

Directora experimental: Paola Navarro Vozmediano.

Tutora externa: Esperanza Dalmau Estelrich.

Departamento: Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural (ETSIAMN UPV).

RESUMEN:

Las leguminosas, y en concreto el atramuz, son una excelente fuente de proteínas vegetales. A pesar de ello, existen limitaciones en su uso como fuente proteica debido a la presencia de factores antinutricionales (ANF) y antitecnológicos (ATF) como pueden ser los compuestos fenólicos, grasa y alcaloides. Aunque el contenido de ANF y ATF se reduce durante los procesos de solubilización alcalina y precipitación isoeléctrica, su concentración puede ser elevada en los aislados proteicos. Algunos estudios han puesto de manifiesto que la cantidad de ANF puede disminuir durante la germinación de la semilla, mejorando la calidad de la proteína y concretamente su digestibilidad.

Por todo lo mencionado anteriormente, el objetivo general del presente trabajo consistió en evaluar la influencia de la germinación previa de la semilla de altramuz (var. Tremosilla) y el pretratamiento de extracción con agua en el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante tanto en la harina como en los aislados proteicos. Para la consecución de dicho objetivo se planteó en primer lugar caracterizar la harina de altramuz mediante la determinación de los contenidos en humedad, cenizas, proteínas, polifenoles totales y capacidad antioxidante. Posteriormente se evaluó el comportamiento de dichos parámetros después de la germinación y la extracción con agua tanto en la harina resultante como en los aislados proteicos obtenidos.

Finalmente, los resultados obtenidos han determinado que el pretratamiento de germinación previa aumenta el contenido en polifenoles totales respecto a la harina inicial sin tratar en un 103,70%, un 542,86% en la capacidad antioxidante y un 17,14% en cenizas. Además, el valor medio obtenido en el rendimiento de la obtención de aislado proteico fue del $15\% \pm 1,60$ con un $90\% \pm 0,46$ de pureza.

PALABRAS CLAVE: proteínas; germinación; altramuz; aislados proteicos; polifenoles.

AUTOR: Marta Amor Lluch.

TUTOR ACADÉMICO: José Vicente García Pérez.

DIRECTORA EXPERIMENTAL: Paola Navarro Vozmediano.

TUTORA EXTERNA: Esperanza Dalmau Estelrich.

ABSTRACT:

Legumes, and specifically lupine, are an excellent source of vegetable protein. Despite this, there are limitations in its use as a protein source due to the presence of antinutritional factors (ANF) and antitechnological factors (ATF) such as phenolic compounds, fat and alkaloids. Although the content of ANF and ATF is reduced during the processes of alkaline solubilization and isoelectric precipitation, their concentration can be high in protein isolates. Some studies have shown that the amount of ANF can decrease during seed germination, improving the quality of the protein and specifically its digestibility.

For all the aforementioned reasons, the general objective of this work was to evaluate the influence of the previous germination of the lupine seed (var. Tremosilla) and the pretreatment of extraction with water on the content of polyphenols and antioxidant capacity both in the flour as in protein isolates. In order to achieve this objective, it was first proposed to characterize the lupine flour by determining its moisture content, ashes, proteins, total polyphenols and antioxidant capacity. Subsequently, the behavior of these parameters was evaluated after germination and extraction with water both in the resulting flour and in the protein isolate obtained.

Finally, the results obtained have determined that the previous germination pretreatment increases the content of total polyphenols with respect to the initial untreated flour by 103.70%, 542.86% in antioxidant capacity and 17,14% in ashes. In addition, the average yield of protein isolate was $15\% \pm 1,60$ with $90\% \pm 0,46$ purity regarding the protein content.

KEYWORDS: proteins; germination; lupine; protein isolates; polyphenols.

AUTHOR: Marta Amor Lluch.

ACADEMIC TUTOR: José Vicente García Pérez.

EXPERIMENTAL DIRECTOR: Paola Navarro Vozmediano.

EXTERNAL TUTOR: Esperanza Dalmau Estelrich.

RESUM:

Les lleguminoses, i en concret el tramús, són una excel·lent font de proteïnes vegetals. Malgrat això, hi ha limitacions en el seu ús com a font proteica a causa de la presència de factors antinutricionals (ANF) i antitecnològics (ATF) com poden ser els compostos fenòlics, greix i alcaloide. Encara que el contingut d'ANF i ATF es reduïx durant els processos de solubilització alcalina i precipitació isoelectrica, la seua concentració pot ser elevada en els aïllats proteics. Alguns estudis han posat de manifest que la quantitat d'ANF pot disminuir durant la germinació de la llavor, millorant la qualitat de la proteïna i concretament la seua digestibilitat.

Per tot el que menciona anteriorment, l'objectiu general del present treball va consistir a avaluar la influència de la germinació prèvia de la llavor de tramús (var. Tremosilla) i el pretractament d'extracció amb aigua en el contingut de polifenoles i capacitat antioxidant tant en la farina com en els aïllats proteics. Per a la consecució del dit objectiu es va plantejar en primer lloc caracteritzar la farina de tramús per mitjà de la determinació dels continguts en humitat, cendres, proteïnes, polifenoles totals i capacitat antioxidant. Posteriorment es va avaluar el comportament dels dits paràmetres després de la germinació i l'extracció amb aigua tant en la farina resultant com en els aïllats proteics obtinguts.

Finalment, els resultats obtinguts han determinat que el pretractament de germinació prèvia augmenta el contingut en polifenoles totals respecte a la farina inicial sense tractar en un 103,70%, un 542,86% en la capacitat antioxidant i un 17,14% en cendres. A més, el valor mitjà obtingut en el rendiment de l'obtenció d'aïllat proteic va ser del $15\% \pm 1,60$ amb un $90\% \pm 0,46$ de puresa.

PARAULES CLAU: proteïnes; germinació; tramús; aïllats proteics; polifenoles

AUTOR: Marta Amor Lluch.

TUTOR ACADÈMIC: José Vicente García Pérez.

DIRECTORA EXPERIMENTAL: Paola Navarro Vozmediano.

TUTORA EXTERNA: Esperanza Dalmau Estelrich.

AGRADECIMIENTOS:

Quiero agradecer en primer lugar, a mis padres, por haberme dado la oportunidad de poder tomar el camino correcto, a mi yaya, a mis familiares y a mi segunda familia, la familia Fortea, por el apoyo que he recibido durante toda mi vida por su parte.

A mi tutor académico, José Vicente García Pérez, por la oportunidad de realizar éste trabajo fin de carrera y a mis directoras experimentales Paola Navarro Vozmediano y Esperanza Dalmau Estelrich por la ayuda recibida.

También quisiera agradecer a todos mis amigos y en especial a los amigos que he conocido gracias a esta carrera que han sido esenciales para poder llevar a cabo mis metas. A.

Por último, agradecer a Vicente Micol por la ayuda brindada siempre.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	PROTEÍNAS VEGETALES	1
1.2	ALTRAMUZ COMO FUENTE ALTERNATIVA DE PROTEINAS	2
1.3	FACTORES ANTINUTRICIONALES (ANF) Y ANTITECNOLÓGICOS ATF) ...	3
1.4	INFLUENCIA DE LA GERMINACIÓN EN FACTORES ANTINUTRICIONALES Y ANTITECNOLÓGICOS DE AISLADOS PROTEICOS	5
2	OBJETIVOS.....	6
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
3.1	DISEÑO EXPERIMENTAL	6
3.2	GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE ALTRAMUZ (Var.Tremosilla)	8
3.3	EXTRACCIÓN ACUOSA.....	9
3.4	OBTENCIÓN DEL AISLADO PROTEICO.....	10
3.5	DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD	10
3.6	EXTRACCIÓN ÁCIDA PARA POLIFENOLES	¡Error! Marcador no definido.
3.7	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN PROTEINA	11
3.8	DETERMINACIÓN DE CENIZAS	12
3.9	DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES	12
3.9.1	DETERMINACIÓN EN POLIFENOLES TOTALES (FOLIN)	12
3.9.2	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (FRAP).....	14
4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	15
5	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	15
5.1	ANÁLISIS DEL PROTOCOLO DE GERMINACIÓN	15
5.2	DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	17
5.3	CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	17
5.4	INFLUENCIA DE LA GERMINACIÓN EN EL RENDIMIENTO DE AISLADO PROTEICO Y CONTENIDO EN PROTEINA.....	18
5.5	INFLUENCIA DE LA GERMINACIÓN EN EL CONTENIDO DE CENIZAS	21
5.6	INFLUENCIA DE LA GERMINACIÓN EN EL CONTENIDO DE FACTORES ANTINUTRICIONALES EN LA HARINA	22
5.6.1	POLIFENOLES	22
5.6.2	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	23
5.7	INFLUENCIA DE LA GERMINACIÓN EN EL CONTENIDO DE FACTORES ANTINUTRICIONALES EN LOS AISLADOS PROTEICOS.....	24
5.7.1	POLIFENOLES	24
5.7.2	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	25
6	CONCLUSIONES.....	27
7	REFERENCIAS.....	28

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo del proceso.....	7
Figura 2. Liofilizador.....	8
Figura 3. Harina de germinado.	8
Figura 4. Sistema de extracción para la eliminación de ANF.....	9
Figura 5. Equipo digestor.....	11
Figura 6. Horno mufla.....	12
Figura 7. Espectrofotómetro EZ Read 2000 biochrom.	14
Figura 8. Principio químico del método de FRAP.....	15
Figura 10. Semillas de altramuz germinadas durante 6 días.....	16
Figura 11. Semillas de altramuz germinadas durante 3 días.....	16
Figura 12. Cinética en el proceso de extracción de compuestos fenólicos.	18
Figura 13. Contenido en proteína de harinas de altramuz (g proteína/g ms). Se muestran valores medios \pm desviación estándar.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 14. Contenido en proteína de aislados proteicos de harinas de altramuz (g proteína/g ms). Se muestran valores medios \pm desviación estándar.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 15. Contenido en cenizas de harinas de altramuz (g proteína/g ms). Se muestran valores medios \pm desviación estándar.	21
Figura 16. Contenido en cenizas de aislados proteicos de harinas de altramuz (g proteína/g ms). Se muestran valores medios \pm desviación estándar.	22
Figura 17. Contenido de extracción de polifenoles mediante metanol ácido en harina de altramuz (g ácido gálico/g materia seca). Se muestran valores medios \pm desviación estándar.	23
Figura 18. Capacidad antioxidante obtenida en las harinas de altramuz (g ácido gálico/g materia seca). Se muestran valores medios \pm desviación estándar.	24
Figura 19. Contenido de polifenoles en aislados proteicos de harina de altramuz (g ácido gálico/g materia seca). Se muestran valores medios \pm desviación estándar.	25
Figura 20. Capacidad antioxidante obtenida en aislados proteicos de harina de altramuz (g ácido gálico/g materia seca). Se muestran valores medios \pm desviación estándar.	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos más relevantes con efectos indeseables (ANF y ATF) en aislados de proteínas de leguminosas.....	4
Tabla 2. Contenido en humedad (%) de las harinas de altramuz y sus aislados proteicos.	17
Tabla 3. Datos de pureza proteica (en porcentaje) de los aislados proteicos de harina de altramuz. Se muestran valores medios \pm desviación estándar.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 4. Datos de rendimiento de los aislados proteicos de harina de altramuz.	20

1 INTRODUCCIÓN

1.1 PROTEÍNAS VEGETALES

Las proteínas son las macromoléculas orgánicas más abundantes en las células vivas, y en el ser humano y desempeñan funciones como componentes estructurales, enzimas, hormonas, mensajeros, transportadores y componentes del sistema inmune, entre otras. Las proteínas están construidas a partir de un mismo conjunto de 20 aminoácidos, de los cuales nueve no pueden ser sintetizados en el organismo, por lo que se les considera aminoácidos esenciales. Una de la clasificación de las proteínas más aceptada es la división de las proteínas en función de su procedencia: proteína animal o vegetal. Las proteínas de origen animal, a diferencia de las de origen vegetal, son de alta calidad ya que contienen el total de los aminoácidos esenciales. Por el contrario, en las proteínas de origen vegetal siempre hay algún aminoácido que no está presente en las cantidades necesarias; por ello, se debe ingerir una combinación de vegetales para poder garantizar el aporte completo de aminoácidos esenciales (Quesada y Gómez, 2019).

Investigaciones recientes han demostrado un claro aumento en las preferencias de los consumidores hacia las proteínas de origen vegetal como alternativa a las proteínas animales (Onwezen et al., 2021). Esto se debe principalmente a los beneficios para la salud que proporciona el reemplazo de la ingesta de proteínas de origen animal por proteínas de origen vegetal, también al aumento en el número de personas que adoptan dietas veganas y vegetarianas, así como una mayor conciencia de la agricultura y ganadería sostenible (Aiking, 2011; Perodi et al., 2018; Kyriakopoulou et al., 2019). Este cambio mundial en la demanda de alimentos ha dirigido la atención hacia los cereales y las leguminosas como fuentes prometedoras de proteínas vegetales. Entre todos ellos, las leguminosas tienen un contenido elevado de proteína y constituyen un valioso cultivo de rotación debido a su capacidad de fijación de nitrógeno (Bessada et al., 2019). Por ello, la FAO declaró el 2016 como el Año Internacional de las leguminosas para potenciar su inclusión en una estrategia de producción sostenible de alimentos diseñada para lograr una seguridad alimentaria y una nutrición adecuada (FAO, 2016). El contenido en proteína de las leguminosas varía del 20% en los guisantes al 40% en los altramuces, siendo la mayoría proteínas de almacenamiento (globulinas), albúminas y glutelinas (Bessada et al., 2019). Con respecto al perfil de aminoácidos, las leguminosas tienen un alto contenido de lisina, leucina, ácido aspártico y

arginina, pero suelen ser pobres en aminoácidos que contienen azufre (metionina y cisteína) y triptófano (Bessada et al., 2019).

1.2 ALTRAMUZ COMO FUENTE ALTERNATIVA DE PROTEINAS

Existen más de trescientas especies de altramuz, de los que solo cinco son cultivadas (Glencross, 2001, 2004) y de estas, sólo tres especies son explotadas comercialmente; altramuz blanco (*Lupinus albus*), altramuz dulce o de hoja angosta (*Lupinus angustifolius*) y altramuz amarillo (*Lupinus luteus*). El altramuz tiene un bajo contenido de almidón, pero alto en fibra (30% - 41%), de la cual la mayor parte es insoluble, y un alto contenido en proteína (Kohajdová et al., 2011; Villarino et al., 2016). Así, se ha sugerido que el consumo del altramuz puede proporcionar muchos beneficios para la salud, como reducir el colesterol en la sangre y mejorar la salud intestinal (Arnoldi et al., 2015; Mazumder et al., 2020). El contenido en fibra y proteína del altramuz puede verse modificado según la técnica utilizada para la obtención de subproductos como la harina. Normalmente para la harina de altramuz se utiliza la semilla descascarillada y la molienda, por lo que este proceso disminuye su contenido de lisina (Bórquez Ramírez, 2008).

El contenido de proteína del altramuz, según la literatura existente, varía entre 30% y 42%, siendo la fluctuación atribuible a la variedad del altramuz (Fudiyansyah et al., 1995; Kohajdová et al., 2011). Las proteínas presentes de forma mayoritaria (87%) en el altramuz son globulinas, o comúnmente conocidas como conglutinas (Mane et al., 2018). Por estas razones el altramuz podría usarse en muchos productos alimentarios para mejorar su contenido en proteína y propiedades nutraceuticas. Además, el altramuz tiene propiedades similares a las de la soja, como el tamaño, la apariencia y la composición proteica (Fudiyansyah et al., 1995). Por lo tanto, el aprovechamiento de las semillas de altramuz puede extenderse a la producción de concentrados proteicos que, sumados a otros productos alimenticios, pueden enriquecer sus valores nutricionales y mejorar sus propiedades tecnológicas, dando así alimentos de mayor calidad (Gladstones, 1998; Dijkstra, et al. 2003; Torres, et al., 2007).

1.3 FACTORES ANTINUTRICIONALES (ANF) Y ANTITECNOLÓGICOS ATF)

Los factores antinutricionales y antitecnológicos hacen referencia a aquellos componentes que al valor nutricional de algunos alimentos ya que dificultan o inhiben la asimilación de nutrientes o afectan a propiedades tecnológicas, como el color, estructura, etc... En el caso concreto de los aislados proteicos, la digestibilidad de las proteínas pueden verse reducida por la presencia de los ANF, que pueden clasificarse como compuestos proteicos y no proteicos. Los ANF proteicos incluyen lectinas e inhibidores de la proteasa (tripsina y quimotripsina) que impiden la digestión de proteínas en el tracto gastrointestinal y reducen la absorción de aminoácidos.

Los ANF no proteicos incluyen compuestos fenólicos (p. ej., taninos), saponinas y alcaloides, que desempeñan funciones importantes en los mecanismos de protección de las plantas, y los fitatos que reducen la biodisponibilidad de minerales esenciales, como el hierro (Cabezudo et al., 2021). Algunos ANF, como los compuestos fenólicos, también podrían clasificarse como ATF porque pueden afectar negativamente varias propiedades tecnofuncionales, como el color, y afectar la pureza y el rendimiento de los aislados proteicos (Alu'Datt et al., 2014; Chereau et al., 2016; Rahate et al., 2021). En la tabla 1 se muestra un resumen de los diferentes ANF y ATF presentes en las leguminosas (Bou et al., 2022).

Tabla 1. Compuestos más relevantes con efectos indeseables (ANF y ATF) en aislados de proteínas de leguminosas.

Compuestos	ANF	ATF	Efecto	Referencias
Compuestos fenólicos	-	-	↓Rendimiento, ↓pureza, color efectos, unión a proteínas, ↓ biodisponibilidad aminoácidos	Adrar et al. (2019), Alu'datt et al. (2013), Alu'Datt et al. (2014), Correa y Rogero (2019), Farha et al. (2020), Mondor et al. (2009)
Polisacáridos	-	-	↓Absorción de nutrientes, ↓rendimiento, ↓solubilidad	Chereau et al. (2016), Nadar et al. (2018), Vong y Liu (2016), Vioque et al. (2012)
Alcaloides	-	-	Toxicidad, amargor	Aguilar-Acosta et al. (2020), Chaves et al. (2016), Klupšaitė y Juodeikiene (2015)
Carotenoides, tocoferoles y fitoesteroles		-	↓Rendimiento, ↓pureza, efectos de color	Albuquerque et al. (2020), Moreno-Valdespino et al. (2020)
Fosfolípidos		-	Interacciones proteína lípido, generación de sabores extraños	Sánchez-Vioque et al. (1998)
Inhibidores de la proteasa	-		↓ Digestibilidad	Carbonaro et al. (2015), Mohan et al. (2015)
Fitatos	-	-	↓Biodisponibilidad mineral, ↓rendimiento, ↓solubilidad	Bessada et al. (2019), Mondor et al. (2004)
Saponinas	-	-	↓Lípidos de absorción, toxicidad, ↓rendimiento, ↓pureza	Bessada et al. (2019), Navarro del Hierro et al. (2018) , Reichert et al. (2019), Singh et al. (2017)
Lecitinas	-		↓Absorción, alterada crecimiento, aglutinación de glóbulos rojos	Bessada et al. (2019)
Alfa-galactósidos	-	-	Flatulencia	Martínez-Villaluenga et al. (2008)
Reductores de azúcares		-	↓Rendimiento, reacciones de Maillard	Mondor et al. (2009), Zha et al. (2019)
Triacilglicéridos		-	↓Rendimiento, ↓pureza, precursores mal sabor , proteína-lípido interacciones, reacciones de polimerización	Xing et al. (2018), M. Xu et al. (2020), Byanju et al. (2020)
Minerales		-	↓Rendimiento, interacciones proteicas	Boye et al. (2010)

1.4 INFLUENCIA DE LA GERMINACIÓN EN FACTORES ANTINUTRICIONALES Y ANTITECNOLÓGICOS DE AISLADOS PROTEICOS

Durante la germinación de la semilla algunos de los materiales de reserva se degradan para ser utilizados en la respiración y síntesis de nuevos constituyentes celulares, lo que provoca cambios significativos en la composición de la semilla. Este proceso también eleva los niveles de aminoácidos libres, carbohidratos disponibles, fibra dietética y otros componentes y puede afectar a la funcionalidad de las semillas debido a las posibles modificaciones que puede sufrir el perfil fenólico (Frías et al., 2005; Fernández-Orozco et al., 2006; López-Amorós et al., 2006). Y, en relación a los compuestos asociados a la actividad antioxidante, se aumentan mediante la germinación debido a la activación de las enzimas endógenas y al cambio en el metabolismo bioquímico por las variaciones en la composición fenólica (Dueñas et al., 2009).

Algunos estudios han demostrado que la cantidad de ANF, como los compuestos fenólicos y los inhibidores de la proteasa, disminuye durante la germinación de la semilla, mejorando la calidad de la proteína y, en consecuencia, la digestibilidad de las proteínas de las leguminosas (Ohanenye et al., 2020). También se ha demostrado que otros ANF pueden verse reducidos como los fitatos, cuyo contenido disminuía un 60% mediante el proceso de germinación de garbanzos (Urbano et al. 2000; Ramakrishna, Rani y Rao 2006) mientras que en el caso de la soja, su contenido se redujo en un rango entre 11 y 40% (Urbano et al., 2000; Mohamed et al., 2011; Megat Rusydi y Azrina, 2012; Ohanenye et al., 2020) pusieron de manifiesto que el contenido medio de fitatos, taninos e inhibidores de la tripsina disminuyó un 32% por el proceso de germinación (Ohanenye, et al., 2020).

Los tratamientos postcosecha a los que se ven sometidos las semillas, como el descascarillado, la fermentación, la cocción, el remojo y el tostado, también puede afectar a la composición de ANF y ATF (Bessada et al., 2019; James et al., 2020). Por lo tanto, las investigaciones dirigidas a explorar como la germinación de semillas y los tratamientos postcosecha influyen en el contenido de ANF y ATF son relevantes para mejorar la calidad de los aislados proteicos contribuyendo a una mayor utilización de las leguminosas como alternativa o complemento a la proteína animal en la dieta humana.

2 OBJETIVOS

El objetivo de este estudio fue evaluar la influencia de la germinación previa de la semilla de altramuz (var. Tremosilla) y el pretratamiento de extracción con agua en la composición tanto de la harina como de los aislados proteicos. Para alcanzar este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Poner a punto un protocolo de germinación de las semillas de altramuz
- Obtener el aislado proteico (LPI) de las diferentes harinas de altramuz
- Determinar la fracción proteica, contenido en cenizas, humedad y polifenoles de las diferentes harinas de altramuz
- Determinar la fracción proteica, contenido en cenizas, humedad y polifenoles de aislados proteicos de las diferentes harinas de altramuz

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

En la Figura 1 se muestra un esquema del proceso de obtención de aislados proteicos que se ha seguido en este trabajo a partir de harinas convencionales, harinas provenientes de semillas germinadas y harinas a las que se sometió a un proceso de extracción con agua, a modo de pretratamiento.

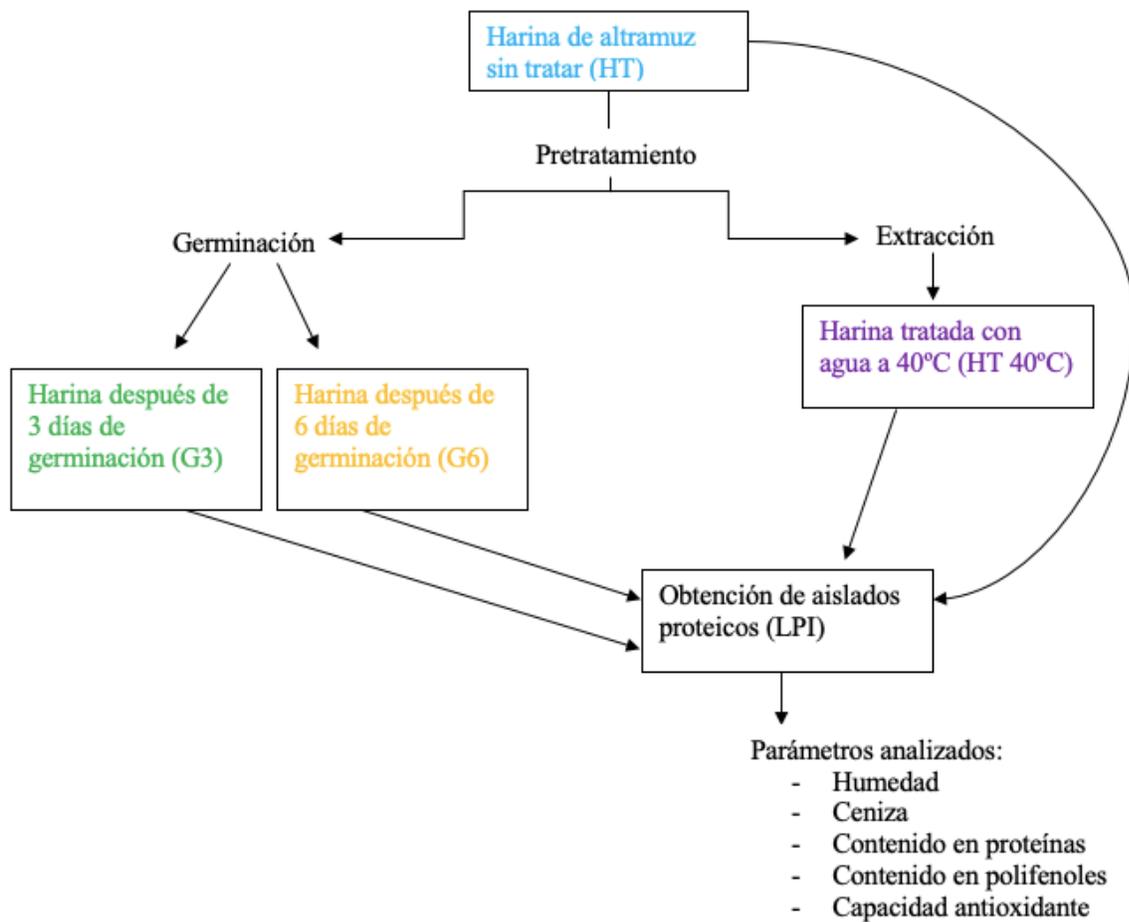


Figura 1. Diagrama del proceso de obtención de aislados proteicos.

3.2 GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE ALTRAMUZ (Var. Tremosilla)

La germinación de las semillas de altramuz (Var. Tremosilla) para la obtención de la harina de germinado se realizó a 3 y 6 días (G3 y G6). El proceso se realizó colocando papel de filtro sobre una base de algodón húmedo en una bandeja, sobre la cual se depositaron las semillas de manera uniforme y se colocó un segundo papel de filtro humedecido por encima. Finalmente se tapó dejando la válvula ubicada en la parte superior de la tapa abierta para que se pudiera producir el intercambio de gases y se mantuvo en oscuridad durante los tiempos establecidos (3 y 6 días). Finalmente, transcurrido el tiempo de germinación, las muestras se envasaron al vacío, se congelaron y se liofilizaron durante 48 h (Figura 2). Por último, para obtener la harina del germinado (Figura 3), los brotes liofilizados fueron triturados con un molinillo de café.



Figura 2. Liofilizador.



Figura 3. Harina de germinado.

3.3 EXTRACCIÓN ACUOSA

Se realiza un pretratamiento con agua con la finalidad de reducir los compuestos fenólicos analizando la cinética del proceso. La extracción se realizó a 40°C con agua destilada (ratio sólido/solvente 1:7) y utilizando un agitador mecánico (RZR 2021, Heidolph) con hélices de 4 cm de diámetro a una velocidad de giro de 952 rpm. Las extracciones se realizaron en un recipiente de 200 mL encamisado para controlar la temperatura durante todo el proceso. Para este propósito, mediante una bomba peristáltica (VitaTech 600, Vitakraft) se recircula a través de la camisa agua desde un depósito de calentamiento equipado con una unidad calefactora (JP Selecta, España) (Figura 4).

Se tomaron muestras del sobrenadante (2 mL) a distintos tiempos (1, 2, 5, 10, 15, 20 y 30 mins). Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 10 s a 13000 rpm (Digicen 21 R Orto alresa) y se filtraron con un filtro de nylon de 0,45µm. Las muestras fueron almacenadas a -28 °C hasta su análisis.

Por otra parte, el residuo sólido obtenido en el proceso de extracción se centrifugó durante 10 min a 10000 rpm (Medifriger BL-S Pselecta) y se liofilizó para obtener la harina tratada (HT 40°C).

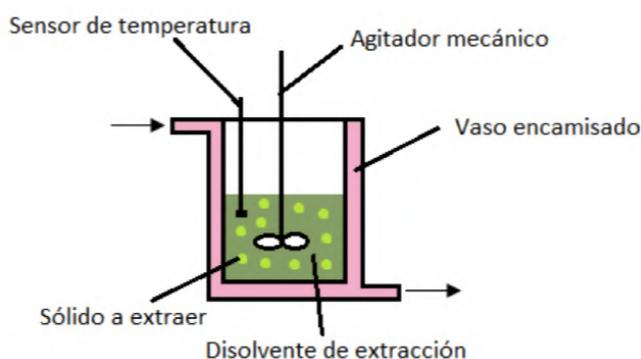


Figura 4. Sistema de

extracción acuosa de harinas.

3.4 OBTENCIÓN DEL AISLADO PROTEICO

La obtención de los aislados proteicos (LPI) se realizó tanto en la harina sin tratar como en la harina tratada para los posteriores análisis. La extracción de proteínas se realizó según el procedimiento descrito por Berghout et al. (2015) con algunas modificaciones. El proceso consistió en la homogenización a temperatura ambiente de la mezcla de harina y agua en proporción 1:8 con la ayuda de un dispersador (Turrax Yellow line DI 25 basic) durante 5 min a 12000 rpm. A continuación, la suspensión se agitó con un agitador magnético (Stuart scientific R000101586) y se realizó la solubilización de la proteína mediante el ajuste del pH a 10,3 usando NaOH 2,0 N. La suspensión se agitó durante 1,5 h más con el agitador magnético y se centrifugó durante 10 min a 3200 g (Medifriger BL-S Pselecta). El residuo obtenido se lavó con agua ajustada a un pH de 10,3 y los sobrenadantes se mezclaron. Seguidamente se realizó el proceso de precipitación de las proteínas a una temperatura de 4 °C ajustando el pH a 4,7 mediante HCl 4 M. La suspensión se mantuvo en agitación durante 30 min seguido de 1 h de reposo. Después de la centrifugación el aislado proteico es lavado con agua destilada y liofilizado.

3.5 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

Se midió el contenido en humedad de la semilla mediante secado por infrarrojos a una temperatura de 105°C (IR Ohaus MB120). Se utilizaron 3 g de muestra y el tiempo medio de secado hasta la estabilización del peso de la muestra fue de 10 min.

3.6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN PROTEINA

La determinación del contenido de proteína se realizó por digestión ácida para lo cual se pesaron 2 g de muestra en tubos de digestión. A continuación, se adicionaron 3 g de catalizador ($K_2SO_4 + CuSO_4$ + proporción 10:1:0.1). Se llevaron los tubos a la unidad de digestión y se añadió bajo campana 10 mL de ácido sulfúrico concentrado y 5 mL de agua oxigenada de 110 volúmenes. Se digiere a $420^{\circ}C$ hasta que presenta un color verde esmeralda (Figura 5). Una vez digeridas, las muestras se diluyeron con 50 mL de agua destilada y se lleva a la unidad de destilación (VELP UDK 127) adicionando 50 mL aproximadamente de NaOH 10 N y se destila en corriente de vapor durante 4 min. Se recogió el destilado (hidróxido amónico) sobre un erlenmeyer que contiene 50 mL de ácido bórico al 4% y se valora con ácido sulfúrico 0.3 N hasta viraje de la disolución de verde a violeta. Los resultados se expresaron como g proteína/g materia seca (ms).



Figura 5. Equipo de digestión proteica

3.7 DETERMINACIÓN DE CENIZAS

Se pesó 1 g de muestra en el crisol y se introdujeron todos los crisoles con la tapa semiabierta en el horno mufla mufla (Pselecta 387 PE) (Figura 6) y se llevó la temperatura a 250 -300 °C para que la materia orgánica se quemara. Una vez cesa el desprendimiento de humos (30-45 min aproximadamente) se aumentó la temperatura hasta 550 °C. Se da por terminada la calcinación cuando el residuo es prácticamente blanco o gris, libre de partículas de carbono (de 4 a 6 h). A continuación, se abrió la mufla y se transfirieron los crisoles a un desecador donde después de este tiempo se dejaron enfriar los crisoles con las cenizas por debajo de 200°C dentro se dejaron hasta que alcancen la temperatura ambiente.

Después de obtener las cenizas se procedió a pesar en balanza analítica para la obtención de resultados, los cuales fueron obtenidos por diferencia de peso antes y después del proceso y expresados como g cenizas/100 g muestra.



Figura 6. Horno mufla.

3.8 DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

3.8.1 EXTRACCIÓN ÁCIDA METANÓLICA

Para evitar la interferencia en la medida del contenido de polifenoles y actividad antioxidante de las proteínas, se realizó una extracción ácida con metanol de las harinas y aislados proteicos con el doble objetivo de extraer los polifenoles y precipitar las proteínas.

El solvente utilizado para la extracción fue una disolución 0.2 M de ácido clorhídrico (HCl) en metanol (CH₃OH), ya que en estudios previos se demostró que las mejores recuperaciones fueron mediante un paso previo con HCl y metanol (Quirantes-Piné et al., 2012). Para realizar la extracción se pesaron 0,5 g de muestra en un recipiente opaco y se añadieron 5 mL del

solvente y se mantuvo en agitación durante 15 minutos (Rotabit Pselecta, 100 rpm). Posteriormente se introdujo en el baño de ultrasonidos 15 minutos y se centrifuga (10000 rpm, 10 min). El resultante se filtra (filtro de nylon 0,45 μm), y se almacenó a -28°C hasta su análisis. Este procedimiento se realizó en las cuatro harinas y en sus correspondientes LPI.

3.8.2 DETERMINACIÓN EN POLIFENOLES TOTALES (FOLIN)

El contenido total en compuestos fenólicos de las muestras se determinó en base al método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi (1965), con ciertas modificaciones para ser adaptado al análisis en microplacas (Eim et al., 2013). Se basa en la oxidación de los grupos fenólicos de los compuestos por el reactivo de Folin-Ciocalteu, formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) que se reducen, por acción de fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}). La coloración azul produce una absorbancia máxima alrededor de 700-750 nm. A partir de la disolución stock de ácido gálico deben prepararse las diluciones correspondientes para realizar posteriormente la recta de calibrado en un rango de concentración desde 0 hasta 1000 mg ác gálico/L.

Para la determinación de compuestos fenólicos totales se mezclaron 50 μl del reactivo de Folin, 10 μl de los patrones o muestras, 100 μl de solución de Na_2CO_3 anhidro al 20% (p/v) y 840 μl de agua destilada y se mezclan mediante el vórtex. Después se incuban a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 minutos y se pasan a una placa de 96 pocillos (200 μl de cada muestra por pocillo). Los resultados se obtienen al medir mediante el espectrofotómetro EZ Read 2000 biochrom (Figura 7) a 700 nm. Los resultados se expresaron como mg GAE/g ms.



Figura 7. Espectrofotómetro EZ Read 2000 biochrom.

3.8.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (FRAP)

Para la determinación de la actividad antioxidante de las muestras se utilizó el método de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) que se modificó del método original (Benzie y Strain, 1996) para adaptarla al análisis en microplacas (González-Centeno et al., 2012).

Para la preparación del reactivo FRAP el mismo día del análisis, se mezclaron tres disoluciones diferentes en la proporción (1:1:10, v/v/v): una disolución 0.01 M de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazine), una de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02 M y un tampón acético-acetato (de pH 3.6, preparado con 3.1 g de CH_3COONa y 16 mL de CH_3COOH glacial por 1000 ml de solución tampón).

En cada pocillo de la microplaca se introdujeron 250 μL del reactivo FRAP y se dejó incubar durante 10 min a 25 °C. Después de este tiempo se realizó una lectura de la absorbancia (A_0) a una longitud de onda de 593 nm, a continuación, se procedió a iniciar la reacción (Figura 8) añadiendo 10 μL de la extracción metanólica de la muestra en cada pocillo. La mezcla se dejó reaccionar bajo las mismas condiciones durante 30 min, tras los cuales se realizó la lectura de la absorbancia a la misma longitud de onda (A_1).

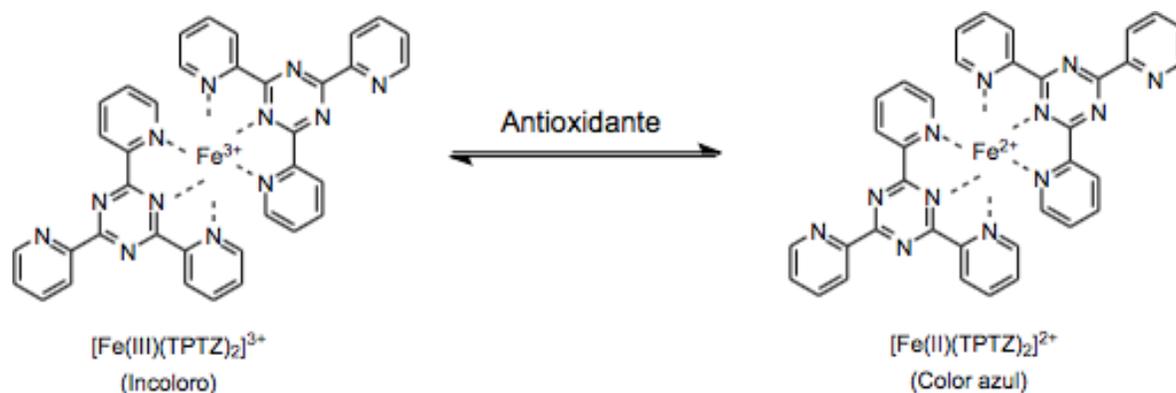


Figura 8. Principio químico del método de FRAP.

El cálculo de la capacidad oxidante se realiza a partir de la diferencia entre las absorbancias A_1 y A_0 que se correlacionó con una recta de calibrado obtenida a partir de concentraciones conocidas (comprendidas entre 0 y 300 μM) del estándar Trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E).

4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados experimentales se presentaron como la media \pm desviación estándar de las n medidas realizadas. El estudio de la variabilidad de las muestras respecto a los diferentes parámetros analizados se llevó a cabo con ayuda del software estadístico Statgraphics Centurion XVII. Se evaluó la normalidad y homocedasticidad de los datos para todas las variables en estudio, utilizando el test de Shapiro-Wilk y el test de Levene, respectivamente. Los datos siguieron una distribución normal y presentaron homogeneidad de varianzas, por lo que se utilizó el test paramétrico ANOVA para evaluar la existencia de diferencias significativas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 ANÁLISIS DEL PROTOCOLO DE GERMINACIÓN

En las Figuras 9 y 10 se muestran las semillas germinadas durante 6 y 3 días. Se puede apreciar como con 3 días, casi todas las semillas han germinado con brotes inferiores a 1 cm, mientras que con 6 días el tamaño medio de los brotes es aproximadamente de 3 cm.

A lo largo del proceso de germinación se detectó contaminación por crecimiento de hongos de manera dispar y aleatoria (Figura 9). Esta contaminación se detectó al final del

trabajo coincidente con mayores tiempos de almacenamiento de las semillas, por lo que ya se disponía de muestras de semillas germinadas tanto a 6 (Figura 10) como a 3 días (Figura 11), por lo que no interfirió en los resultados obtenidos. Sin embargo, para estudios posteriores se propone como solución mejorar la higienización previa de las semillas utilizando inhibidores del crecimiento microbiano, como por ejemplo mediante remojo con una disolución acuosa con etanol al 30% o una disolución de lejía diluida al 15%.



Figura 9. Semillas de altramuз germinadas durante 6 días.



Figura 10. Semillas de altramuз germinadas durante 3 días.



Figura 11. Contaminación por crecimiento de hongos durante la germinación.

5.2 CONTENIDO DE HUMEDAD

En la tabla 2 se muestran los datos de contenido de humedad en las harinas de altramuz y en sus aislados proteicos. La humedad de la harina de tremosilla determinada en base húmeda (g agua/100g muestra) es de 7,6%, similar a valores encontrados en bibliografía (8%) (Bórquez Ramírez, (2008)). Las harinas germinadas (G3 y G6) presentaron valores similares a la harina convencional, y la extracción acuosa a 40°C redujo el contenido de humedad probablemente a que modificó la capacidad de retención de agua de la estructura. Los aislados proteicos liofilizados presentaron contenidos de humedad muy inferiores cercanos a 0,5%.

Tabla 2. Contenido en humedad (% base húmeda) de las harinas de altramuz y sus aislados proteicos.

Muestra	% Humedad
HT	7,6
HT 40°C	2,47
G3	7,44
G6	6,3
LPI HT	0,45
LPI HT 40°C	0,42
LPI G3	0,5
LPI G6	0,71

5.3 CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

A partir del proceso de extracción con agua destilada a 40°C sobre la harina de tremosilla, se analizó el contenido total de polifenoles a diferentes tiempos expresado como mg de ácido gálico por g de materia seca, obteniendo así la cinética del proceso (Figura 12). Inicialmente la cinética es rápida, en los primeros 5 min se obtiene una mayor pendiente, esto se debe a que la solubilidad de los compuestos es mayor al principio del proceso. En comparación con diferentes leguminosas, el altramuz presenta un perfil de solubilidad más estable que el resto de las leguminosas (Acuña y Simbaña, 2010). A mayores tiempos de extracción, la cinética se ralentiza ya que dicho proceso se

encuentra controlado por el fenómeno de la difusión. Además, a los 20 minutos de extracción se alcanza el valor asintótico.

En la figura 12 se observa que a los 5 minutos existe una extracción del 75% respecto al contenido en polifenoles totales de la harina sin tratar. En relación con estudios anteriores se encontró que entre un 83,2-93% de los polifenoles totales se extraían a los 40 minutos (Cox et al., (2012)), por lo que se puede establecer que un tiempo de extracción de 5 minutos sería suficiente

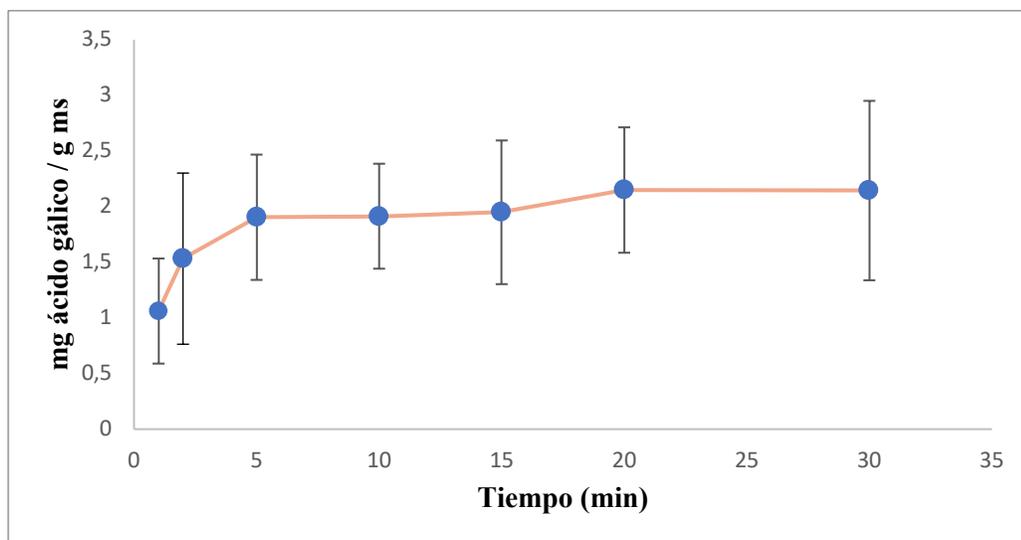


Figura 12. Cinética en el proceso de extracción de compuestos fenólicos.

5.4 INFLUENCIA DE LA GERMINACIÓN EN EL RENDIMIENTO DE AISLADO PROTEICO Y CONTENIDO EN PROTEINA

Como se puede observar en la figura 13, que corresponde a los datos de las diferentes harinas de altramuza, todas las harinas oscilan entre un 0,4-0,5 g proteína/g ms, es decir, un 40-50% de contenido en proteínas, presentando datos similares a los obtenidos en estudios anteriores en variedades como *Lupinus luteus* cv. 4486 (45,7%) (Gulewicz et al., 2008), por lo que el resultado obtenido concuerda con el obtenido en una variedad diferente de altramuza. Además, se observa que el contenido en proteínas es mayor en las muestras de harina provenientes de semillas germinadas (tanto a 3 como a 6 días) respecto a la muestra inicial de harina de tremosilla. Este mismo hecho quedó demostrado en un estudio previo mediante la realización de pruebas comparativas entre la muestra base y la muestra germinada como fueron la determinación del contenido en nitrógeno y aminoácidos de la fracción proteica (Gulewicz et al., 2008).

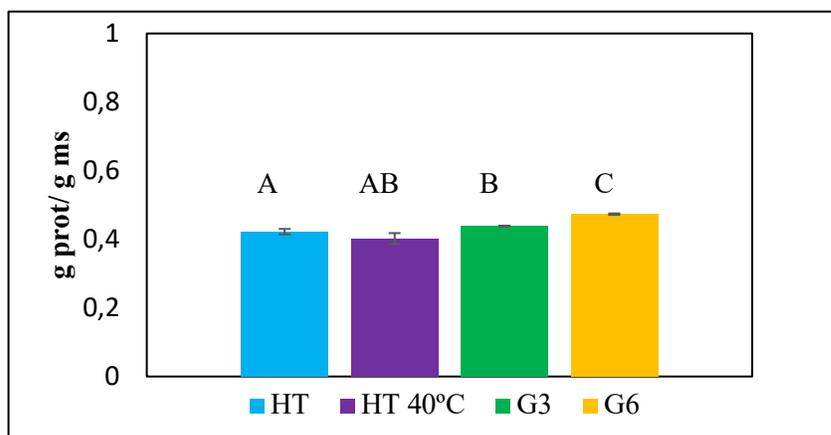


Figura 13. Contenido en proteína de harinas de altramuz (g proteína/g ms). Se muestran valores medios \pm desviación estándar y las letras muestran los grupos estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

En cuanto al contenido de proteína de los aislados, denominado pureza proteica, en todos los casos estuvieron cercanos al 90% (Tabla 3; Figura 14) no encontrándose diferencias significativas entre las diferentes muestras. Un estudio sobre semillas de quinoa negra (*Chenopodium quinoa Willdenow*), obtuvo una pureza de un 55% aproximadamente (Diaz de la Vega et al., 2015). Comparando dicho valor con los obtenidos en las diferentes muestras de harina de altramuz (Tabla 3) se identifican mayores valores de pureza proteica (aproximadamente el 90%) frente a las semillas de quinoa, lo cual puede estar afectado no solo por la materia prima sino también por el método de separación de las proteínas para obtención del aislado.

Tabla 3. Datos de pureza proteica (en % base húmeda) de los aislados proteicos de harina de altramuz. Se muestran valores medios \pm desviación estándar.

Muestra	Pureza proteica (%)
LPI HT	90,31 \pm 1,57
LPI HT 40°C	89,80 \pm 3,07
LPI G3	90,76 \pm 2,34
LPI G6	89,82 \pm 1,60

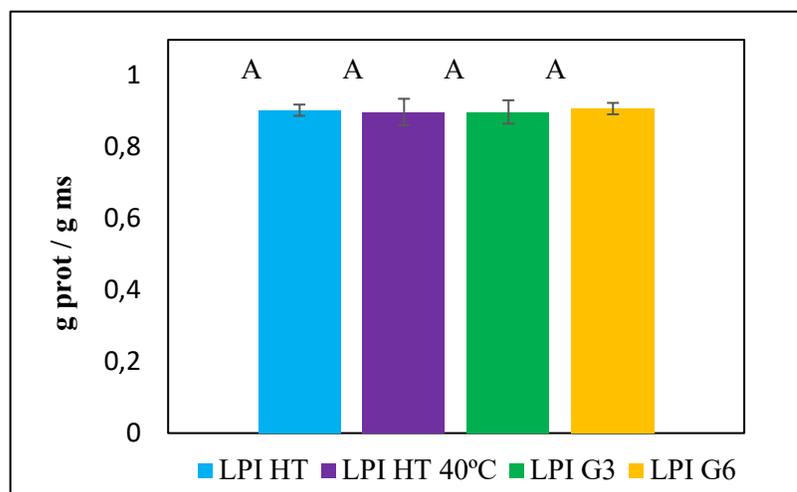


Figura 14. Contenido en proteína de aislados proteicos de harinas de altramuz (g proteína/g ms). Se muestran valores medios \pm desviación estándar y las letras muestran los grupos estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

En la Tabla 4 se muestran los rendimientos de aislados proteicos obtenidos. El valor medio determinado es de un $15\% \pm 1,60$. Se comparó el dato de un 15% aproximadamente de rendimiento en la harina de tremosilla (Tabla 4) con la harina de tarwi, una variedad distinta de altramuz (*Lupinus mutabilis*), que cuenta con 66% de rendimiento de proteína del aislado proteico (Villanueva-Calle, 2018), por lo que la harina de tremosilla presenta un rendimiento inferior respecto a esta variedad distinta de altramuz. Este fenómeno puede deberse a diferentes problemas en el proceso de obtención del aislado, diferencias en la materia prima, etc.

Tabla 4. Datos de rendimiento de los aislados proteicos de harina de altramuz (% base húmeda)

Muestras	Rendimiento (%)
LPI HT	14,66
LPI HT 40°C	17,69
LPI G3	14,35
LPI G6	14,48

5.5 INFLUENCIA DE LA GERMINACIÓN EN EL CONTENIDO DE CENIZAS

En las Figuras 15 y 16 se muestran los contenidos en cenizas de harinas de altramuz y sus aislados proteicos, respectivamente. Como se puede observar en la Figura 15, el contenido en cenizas de las harinas osciló entre un 3-4% presentando datos similares a los obtenidos en estudios anteriores, como 3,6% en Lupino común (Raymundo et al., 2001) y también en otras leguminosas donde se obtuvieron datos desde un 3% hasta un 5% (Rodríguez Macías, 1992).

Además, se puede observar que el contenido en cenizas es mayor en las muestras de harina de germinado (G3 y G6) respecto a las dos primeras, aproximadamente aumentando un 0,5-1%. En comparación con un estudio anterior donde se observaba el cambio en el porcentaje de cenizas en semillas de quinoa y amaranto antes y después de la germinación, este valor se veía aumentado en un 1-2% aproximadamente (Bravo, M., Reyna, J., Huapaya, M. (2013), de la misma manera que en este trabajo. También, se puede observar como el pretratamiento de extracción acuosa a 40°C también disminuyó de forma significativa ($p < 0.05$) el contenido de cenizas.

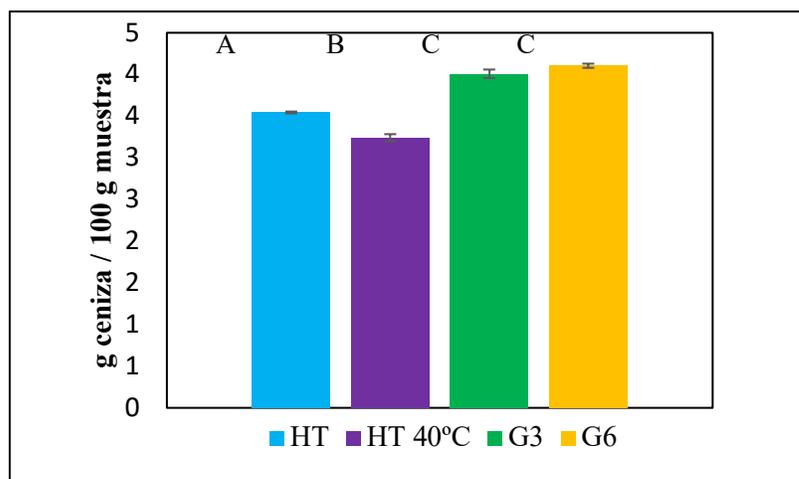


Figura 15. Contenido en cenizas de harinas de altramuz (g proteína/g ms). Se muestran valores medios \pm desviación estándar y las letras muestran los grupos estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

En el caso de los aislados proteicos (Figura 16), el contenido de cenizas osciló entre el 1-2%, no observándose diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las muestras. Este valor se comparó con estudios anteriores donde se obtuvo un valor de cenizas de $4,12 \pm 0,27\%$ para una muestra de aislado

proteico de altramuz andino (*Lupinus mutabilis*) (Guerra y Pozo (2018)), por lo que la variedad de estudio obtuvo datos menores en cuanto a contenido en cenizas.

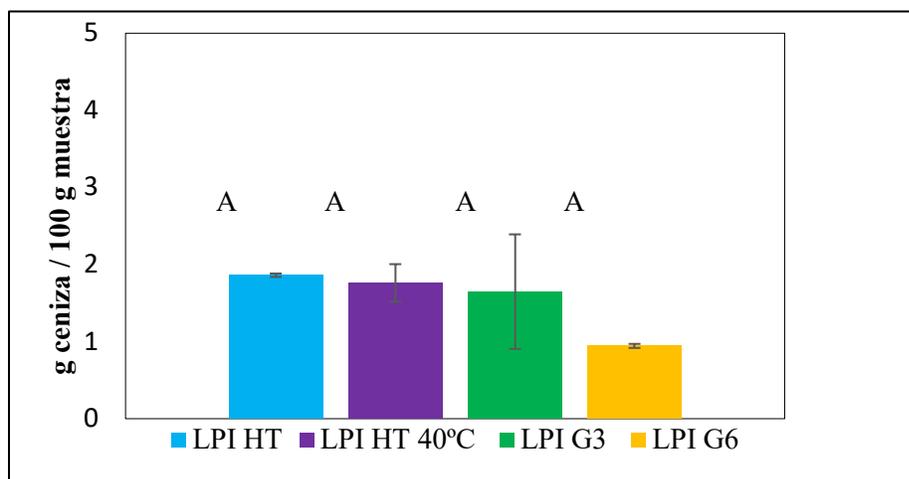


Figura 16. Contenido en cenizas de aislados proteicos de harinas de altramuz (g proteína/g ms). Se muestran valores medios \pm desviación estándar y las letras muestran los grupos estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

5.6 INFLUENCIA DE LA GERMINACIÓN EN EL CONTENIDO DE FACTORES ANTINUTRICIONALES EN LA HARINA

5.6.1 POLIFENOLES

En la figura 17 se muestra el contenido de polifenoles en las harinas de altramuz. Se observa como la germinación incrementó el contenido de polifenoles, siendo especialmente evidente en las muestras germinadas durante 6 días (G6). Este fenómeno es debido a que la germinación provoca cambios en la composición del altramuz, debido principalmente a la activación de enzimas endógenas y al complejo metabolismo bioquímico de las semillas durante este proceso. Además, comparando las muestras G3 y G6 se puede observar un aumento del contenido en polifenoles a medida que aumenta el tiempo de germinado, esto es debido a que aumentan los metabolitos con el tiempo de

germinado (Dueñas et, al. 2009), por lo que se observa que la germinación durante 6 días aumentó de forma significativa ($p<0.05$) el contenido de polifenoles.

En cuanto al pretratamiento de extracción acuso, el impacto en el contenido de polifenoles fue muy leve, disminuyendo ligeramente su contenido respecto a la harina convencional (Figura 17), no observándose diferencias significativas ($p<0.05$).

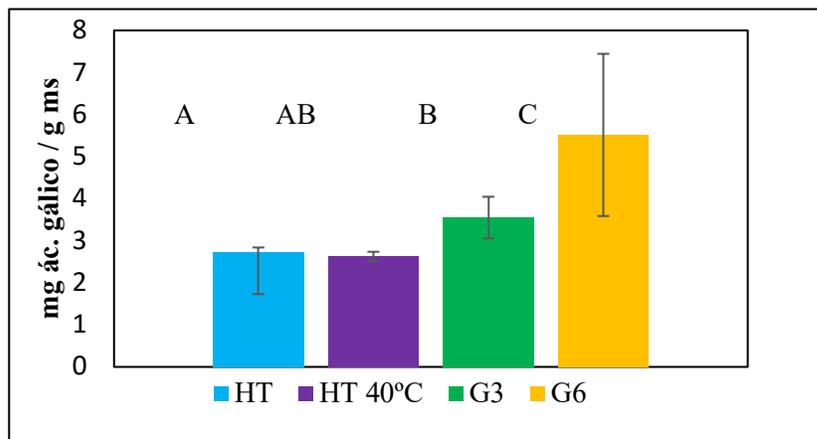


Figura 17. Contenido de extracción de polifenoles mediante metanol ácido en harina de altramuz (g ácido gálico/g materia seca). Se muestran valores medios \pm desviación estándar y las letras muestran los grupos estadísticamente diferentes ($p<0.05$).

5.6.2 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Como se puede observar en la figura 18, que corresponde a los datos de las diferentes harinas de altramuz, se muestra la capacidad antioxidante obtenida en dichas harinas.

La harina G6 presentó una mayor capacidad antioxidante debido a que la germinación provocó cambios significativos en la composición fenólica del altramuz. Estos cambios influyen sobre todo en el contenido de isoflavonas, que son los compuestos fenólicos presentes en el altramuz que más influyen en la actividad antioxidante, especialmente considerando la presencia de la aglicona genisteína en las semillas de altramuz al final del proceso de germinación, con una actividad antioxidante más potente que las formas conjugadas (Arora et al., 1998, M. Dueñas et, al. 2009), por lo que aumentó de forma significativa ($p<0.05$) la capacidad antioxidante.

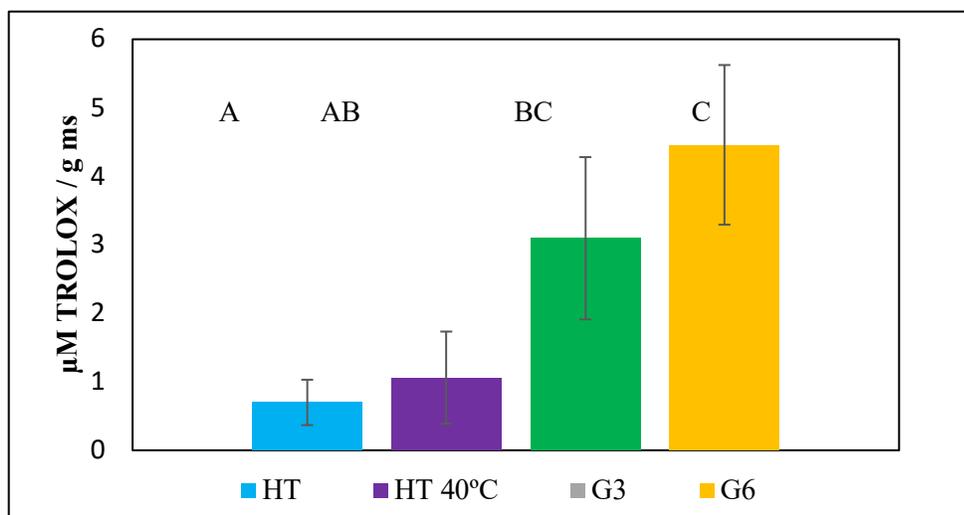


Figura 18. Capacidad antioxidante obtenida en las harinas de altramuz (g ácido gálico/g materia seca). Se muestran valores medios \pm desviación estándar y las letras muestran los grupos estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

5.7 INFLUENCIA DE LA GERMINACIÓN EN EL CONTENIDO DE FACTORES ANTINUTRICIONALES EN LOS AISLADOS PROTEICOS

5.7.1 POLIFENOLES

En la figura 19 se muestra el contenido de polifenoles en aislados proteicos de harina de altramuz. La muestra LPI G6 presentó mayores resultados que en el resto de las harinas debido a que la harina base G6 posee un mayor contenido en polifenoles inicialmente, ya que, a mayor tiempo de germinación, mayor cantidad de metabolitos se generan en el proceso de germinación, los cuales dan paso a más compuestos fenólicos.

Además, el contenido de polifenoles en la muestra LPI HT 40°C es menor debido al proceso de extracción previa, ya que en dicho proceso se solubilizan parte de estos compuestos. Generalmente, el contenido en los aislados proteicos es menor que en las harinas base debido a que en el proceso de obtención del aislado se solubilizan parte de estos, disminuyendo así la cantidad disponible de compuestos fenólicos. Dueñas et, al. 2009).

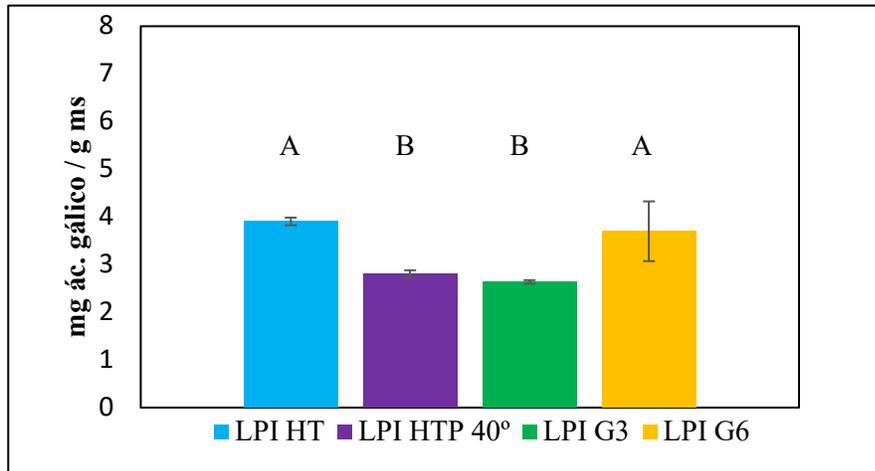


Figura 19. Contenido de polifenoles en aislados proteicos de harina de altramuz (g ácido gálico/g materia seca). Se muestran valores medios \pm desviación estándar y las letras muestran los grupos estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

5.7.2 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En la figura 20 se muestra la capacidad antioxidante obtenida aislados proteicos de harina de altramuz. De la misma manera que se observó en las harinas, en los aislados proteicos la capacidad antioxidante es mayor en la harina de germinado que en el resto, debido a que el proceso de germinación genera cambios en el perfil fenólico de la semilla. En este caso, la harina que mayores datos obtiene es la G3.

Además, el aislado proteico de la harina de altramuz obtuvo los datos más bajos, disminuyendo de forma significativa ($p < 0.05$) la capacidad antioxidante.

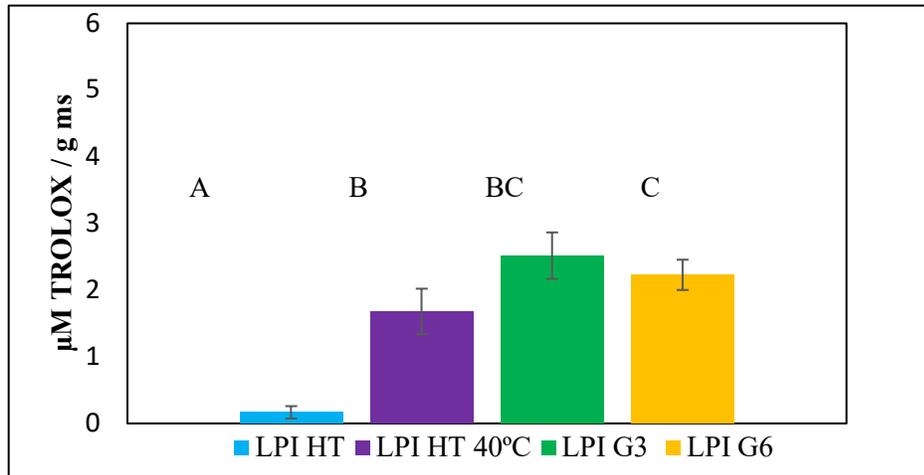


Figura 20. Capacidad antioxidante obtenida en aislados proteicos de harina de altramuz (g ácido gálico/g materia seca). Se muestran valores medios \pm desviación estándar y las letras muestran los grupos estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

6 CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden obtener de este trabajo se exponen a continuación:

- Se obtuvieron aislados proteicos con casi un 90% de pureza proteica y un rendimiento medio de 15 g/100 g harina.
- El pretratamiento de extracción acuosa al que se sometió la harina no conllevó una reducción del contenido de polifenoles de las harinas y aislados proteicos. Únicamente se observó un descenso en el contenido de cenizas.
- La germinación influyó en el contenido de compuestos polifenólicos tanto de las harinas como de los aislados proteicos.
- A medida que aumentó el tiempo de germinación los cambios en el contenido de polifenoles fueron más evidentes.
- A la vista de los resultados obtenidos la germinación no parece una estrategia adecuada para reducir el contenido de polifenoles de harinas y aislados proteicos de altramuz.

7 REFERENCIAS

Acuña, O. y Simbaña, C. (2010) Estudio de las propiedades físicas y funcionales de un hidrolizado enzimático de proteína de chocho a escala piloto y su aplicación como fertilizante. *Revista Politénica*, 29, 1, 78-85

Aiking, H. (2011). Future protein supply. *Trends in Food Science & Technology*, 22(2-3), 112-120.

Alu'Datt, M. H., Rababah, T., & Alli, I. (2014). Effect of phenolic compound removal on rheological, thermal and physico-chemical properties of soybean and flaxseed proteins. *Food Chemistry*, 146, 608–613.

Arias Sanvicente, A., (2013) Evaluación in vitro del efecto de carbohidrasas sobre la bioaccesibilidad de las proteínas en harinas de altramuz (*Lupinus spp.*). Trabajo Final de Grado - Universidad de Almería.

Arnoldi, A., Boschin, G., Zanoni, C., & Lammi, C. (2015). The health benefits of sweet lupin seed flours and isolated proteins. *Journal of Functional Foods*, 18, 550-563.

Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2019). Pulses and food security: Dietary protein, digestibility, bioactive and functional properties. *Trends in Food Science and Technology*, 93(228), 53–68.

Blagrove R.J. Gillespie J.M. Randall P.J. (1976) Effect of sulphur supply on the seed globulin composition of "*Lupin angustifolius Aust. J. Plan Pnysiol.*, 3: 173-184.

Bórquez Ramírez, A. S. (2008). Evaluación nutricional del lupino blanco (*Lupinus albus*) como fuente alternativa de proteínas en dietas comerciales para salmónidos en Chile (Doctoral dissertation).

Bou R., Navarro-Vozmediano P., Domínguez R., López-Gómez M., Pinent M., Ribas-Agustí A., J. Benedito J., M. Lorenzo, Ximena Terra J., V. García-Pérez J., Pateiro M., A. Herrera-Cervera J., Jorba-Martín R. (2022). Application of emerging technologies to obtain legume protein isolates with improved techno-functional properties and health effects

Bravo, M., Reyna, J., & Huapaya, M. (2013). Estudio químico y nutricional de granos andinos germinados de quinua (*Chenopodium Quinoa*) y Kiwicha (*Amarantus Caudatus*). *Revista peruana de química e ingeniería química*, 16(1), 54-60.

Cabezudo, I., Meini, M.-R., Di Ponte, C. C., Melnichuk, N., Boschetti, C. E., & Romanini, D. (2021). Soybean (*Glycine max*) hull valorization through the extraction of polyphenols by green alternative methods. *Food Chemistry*, 338, 128131.

Chéreau, D., Videcoq, P., Ruffieux, C., Pichon, L., Motte, J.-C., Belaid, S., Ventureira, J., & Lopez, M. (2016). Combination of existing and alternative technologies to promote oilseeds and pulses proteins in food applications. *OCL*, 23(4), D406.

Cox, S., Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2012). Effect of different rehydration temperatures on the moisture, content of phenolic compounds, antioxidant capacity and textural properties of edible Irish brown seaweed. *LWT*, 47(2), 300-307.

Diaz de la Vega Huanca, M. (2015) "Evaluación de los parámetros de un aislado proteico de quinua negra (*Chenopodium quinoa* Willdenow) variedad Collana."

Dijkstra, D. S., Linnemann, A. R., & van Boekel, T. A. (2003). Towards sustainable production of protein-rich foods: appraisal of eight crops for Western Europe. Part II: Analysis of the technological aspects of the production chain. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 481–506.

FAO (2016). International year of pulses 2016.

Fernández-Orozco, R., Piskula, M. K., Zielinski, H., Kozłowska, H., Frias, J., & Vidal-Valverde, C. (2006). Germination as a process to improve the antioxidant capacity of *Lupinus angustifolius* L. var. Zapaton. *European Food Research and Technology*, 223, 495–502.

Frías, J., Miranda-Zárate, M. L., & Vidal-Valverde, C. (2005). Effect of germination and fermentation in the antioxidant vitamin content and antioxidant capacity of *Lupinus albus* L., var. Multolupa. *Food Chemistry*, 92(21), 1–220.

Fudiyansyah, N., Petterson, D. S., Bell, R. R., & Fairbrother, A. H. (1995). A nutritional, chemical and sensory evaluation of lupin (*L. angustifolius*) tempe. *International journal of food science & technology*, 30(3), 297-305.

Glencross, B. D. (2001). Feeding lupins to fish: A review of the nutritional and biological value of lupins in aquaculture feeds (p. 126). Department of Fisheries--Research Division, Government of Western Australia.

Guerra, D., & Pozo, P. (2018). Análisis proximal y perfil de aminoácidos del aislado proteico del chocho andino ecuatoriano (*Lupinus mutabilis*). *infoANALÍTICA*, 6(1), 55-66.

Gulewicz P., Cristina Martínez-Villaluenga, C., Frías J., Ciesiołkab D., Gulewicz K., Vidal-Valverde C., (2008) Effect of germination on the protein fraction composition of different lupin seeds. *Food Chemistry*, 107, 830–844.

Huebbe, P., & Rimbach, G. (2020). Historical reflection of food processing and the role of legumes as part of a healthy balanced diet. *Foods*, 9(8), 1056.

James, S., Nwabueze, T. U., Ndife, J., Onwuka, G. I., & Usman, M. A. (2020). Influence of fermentation and germination on some bioactive components of selected lesser legumes indigenous to Nigeria. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2, 100086.

Kadam, S. S., Chougule, B. A., & Salunkhe, D. K. (1989). Lupine. In D. K. Salunke & S. S. Kadam (Eds.). *CRC Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology and Utilization* (vol. II, pp. 163–175). Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.

Khazaei, H., Subedi, M., Nickerson, M., Martínez-Villaluenga, C., Frías, J. y Vandenberg, A. (2019). Proteína de semilla de lentejas: estado actual, progreso y aplicaciones alimentarias. *Alimentos*, 8(9), 391.

Kohajdová, Z., Karovicova, J., Jurasová, M., & Kukurová, K. (2011). Effect of the addition of commercial apple fibre powder on the baking and sensory properties of cookies. *Acta Chimica Slovaca*, 4(2), 88-97.

Kyriakopoulou, K., Dekkers, B., & van der Goot, A. J. (2019). Plant-based meat analogues. In *Sustainable meat production and processing* (pp. 103-126). Academic Press.

López-Amorós, M. L., Hernández, T., & Estrella, I. (2006). Effect of germination on legume phenolic compounds and their antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 277–283.

M. Dueñas, T. Hernández, I. Estrella, D. Fernández, (2009) Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.). *Food Chemistry*, 117, 4, 599-607.

Mane, S. P., Johnson, S. K., Duranti, M., Pareek, V. K., & Utikar, R. P. (2018). Lupin seed γ -conglutin: Extraction and purification methods-A review. *Trends in Food Science & Technology*, 73, 1-11.

Martinez-Villaluenga, C., Gulewicz, P., Frias, J., Gulewicz, K., & Vidal-Valverde, C. (in press-b). Assessment of protein fraction of three varieties of *Pisum sativum* L. Effect of germination. *European Food Research and Technology*.

Mazumder, K., Nabila, A., Aktar, A., & Farahnaky, A. (2020). Bioactive variability and in vitro and in vivo antioxidant activity of unprocessed and processed flour of nine cultivars of Australian lupin species: a comprehensive substantiation. *Antioxidants*, 9(4), 282.

Megat Rusydi, MR y Azrina, A. (2012). Efecto de la germinación sobre los fenoles totales, taninos y contenido de ácido fítico en soja y maní. *Revista internacional de investigación alimentaria*, 19 (2), 673–677.

Mohamed, R., Abou-Arab, EA, Gibriel, AY, Rasmy, NMH y Abu-Salem, FM (2011). Efecto de los tratamientos de procesamiento de leguminosas individualmente o en combinación sobre su contenido de ácido fítico. *Revista africana de ciencia y tecnología de los alimentos*, 2 (2), 2141–5455.

Ohanenye, I. C., Tsopmo, A., Ejike, C. E. C. C., & Udenigwe, C. C. (2020). Germination as a bioprocess for enhancing the quality and nutritional prospects of legume proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 101, 213–222.

Onwezen, M. C., Bouwman, E. P., Reinders, M. J., & Dagevos, H. (2021). A systematic review on consumer acceptance of alternative proteins: Pulses, algae, insects, plant-based meat alternatives, and cultured meat. *Appetite*, 159, 105058.

Parodi, A., Leip, A., De Boer, I. J. M., Slegers, P. M., Ziegler, F., Temme, E. H., ... & Van Zanten, H. H. E. (2018). The potential of future foods for sustainable and healthy diets. *Nature Sustainability*, 1(12), 782-789.

Petterson, D. S. (1998). Composition and food uses of lupins. In J. S. Gladstones, C. Atkins, & J. Hamblin (Eds.), *Lupins as crop Plant: Biology, Production and Utilization*. Wallingford: CAB International.

Quesada, D., & Gómez, G. (2019). ¿ Proteínas de origen vegetal o de origen animal?: Una mirada a su impacto sobre la salud y el medio ambiente. *Revista de nutrición clínica y metabolismo*, 2(1), 79-86.

Rahate, K. A., Madhumita, M., & Prabhakar, P. K. (2021). Nutritional composition, anti-nutritional factors, pretreatments-cum- processing impact and food formulation potential of faba bean (*Vicia faba* L.): A comprehensive review. *LWT*, 138, 110796.

Ramakrishna, V., Rani, PJ y Rao, PR (2006). Factores antinutricionales durante la germinación nación en frijol indio (*Lablab Dolichos*L.) semillas. *Revista mundial de ciencias lácteas y alimentarias*, 1 (1), 6–11.

Raymundo, A., et al. (2001). "Influencia de la relación proteína de altramuz/tensioactivo en las propiedades de flujo y texturales de emulsiones aceite en agua." Repositorio Institucional de la Universidad de Huelva.

Rodríguez Macías R., (1992) "Composición bromatológica de *lupinus exaltatus* zucc. para su utilización como un cultivo alternativo de alto valor proteico". Tesis profesional en la Universidad de Guadalajara.

Sha, L., & Xiong, Y. L. (2020). Plant protein-based alternatives of reconstructed meat: Science, technology, and challenges. *Trends in Food Science and Technology*, 102, 51–61.

Smýkal, P., Coyne, C. J., Ambrose, M. J., Maxted, N., Schaefer, H., Blair, M. W., Berger, J., Greene, S. L., Nelson, M. N., Besharat, N., Vymyslický, T., Toker, C., Saxena, R. K., Roorkiwal, M., Pandey, M. K., Hu, J., Li, Y. H., Wang, L. X., Guo, Y., ... Varshney, R. K. (2015). Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34, 43–104.

Torres, A., Frias, J., & Vidal-Valverde, C. (2005). Changes in chemical composition of lupin seeds (*Lupinus angustifolius*) after selective a- galactoside extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2468–2474.

Torres, A., Frias, J., Granito, M., Guerra, M., & Vidal-Valverde, C. (2007b). Chemical, biological and sensory evaluation of pasta products supplemented with α -galactoside free lupine flours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 74–81.

Urbano, G., López-Jurado, M., Aranda, P., Vidal-Valverde, C., Tenorio, E., & Porres, J. (2000). El papel del ácido fítico en las leguminosas: ¿Antinutriente o función beneficiosa? *Diario de Fisiología y Bioquímica*, 56(3), 283–294.

Villanueva Calle, G. (2018). Formulación de un producto con alto contenido en proteína a partir de un aislado proteico del Tarwi (*Lupinus mutabilis* SWEET). Trabajo fin de grado, Universidad Mayor de San Andrés.

Villarino, C. B. J., Jayasena, V., Coorey, R., Chakrabarti-Bell, S., & Johnson, S. K. (2016). Nutritional, health, and technological functionality of lupin flour addition to bread and other baked products: benefits and challenges. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(5), 835-857.