

08TCA - EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE *Pachyrhizus ahipa* ACOPLADA AL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES EMULSIFICANTES

DÍAZ, A.; DINI, C.; VIÑA, S. Z.; GARCÍA, M. A.

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, CIDCA (UNLP-CONICET) 47 y 116 La Plata. Argentina. magarcia@quimica.unlp.edu.ar

Resumen

La ahipa (*Pachyrhizus ahipa*) es una leguminosa poco difundida originaria del norte de Argentina y el sur de Bolivia. Sus raíces son una fuente rica en almidón, resultando muy atractiva como materia prima para la industria de alimentos; particularmente resulta interesante como fuente de almidón libre de gluten alternativa a la mandioca, para la cual se lleva a cabo un proceso sencillo de extracción del almidón en edio acuoso a partir de una pasta de la raíz, y posterior decantación de la lechada obtenida. *P. ahipa* posee también un contenido elevado de proteínas respecto a otras raíces y tubérculos (R&T) comestibles. En este trabajo se propone recuperar las proteínas de ahipa que se pierden durante la extracción acuosa del almidón y evaluar la capacidad emulsificante de las mismas. Para acoplar la extracción de proteínas a la de almidón se propone reemplazar el agua por buffer en los primeros pasos de extracción para optimizar la solubilización de las proteínas. La cantidad de proteína extraída en cada paso se evaluó por el método de Bradford, y el número de lavados necesarios para eliminar el buffer del almidón se determinó a través de medidas conductimétricas de los sobrenadantes. Se analizó si existen cambios en el rendimiento y las características del almidón extraído por este método respecto al obtenido por el método tradicional. Se estudió: contenido de nitrógeno residual, características reológicas de las pastas de almidón, temperatura de gelatinización y color. Asimismo se realizó una aproximación del punto isoeléctrico de las proteínas extraídas, y se evaluó la capacidad emulsificante de las mismas sobre emulsiones O/W 30:70 utilizando aceite puro de girasol como fase oleosa. Los almidones extraídos por ambos métodos presentaron diferencias significativas en algunas de las características estudiadas. Las proteínas presentaron una alta solubilidad en medio acuoso, exhibiendo menor solubilidad a pH ácido (2-5). Las emulsiones con proteínas de ahipa resultaron menos estables que las que contenían proteína de soja (control). Se concluye que es posible obtener proteínas aprovechando el proceso de extracción del almidón con una mínima modificación del proceso, sin pérdida de rendimiento, pero presentando algunos cambios en las características del almidón obtenido. Si bien estas proteínas presentan menor capacidad emulsificante que las de soja, su gran solubilidad en agua es una característica muy útil para su utilización en matrices alimentarias, por lo que podrían presentar otras propiedades tecnológicas interesantes tales como capacidad de retención de agua, capacidad espesante, etc.

1. Introducción

Pachyrhizus ahipa (Wedd.) Parodi, comúnmente denominada “ahipa”, es una especie nativa de Sudamérica perteneciente al género *Pachyrhizus*, incluido en la familia Leguminosas (*Fabaceae*), que produce raíces tuberosas conteniendo almidón como compuesto mayoritario de reserva. Este género es capaz de llevar a cabo una simbiosis eficiente para la fijación de nitrógeno con bacterias del género *Rhizobium* y

Bradyrhizobium, lo que se refleja en un mayor tenor de proteínas en relación a otras raíces y tubérculos comestibles (R&T).

Una de las principales potencialidades de la ahipa es su utilización como cultivo alternativo o complementario al de otras R&T tropicales y subtropicales que se producen como fuentes para la extracción de almidón, ya que, al igual que la mayoría de éstas, *P. ahipa* presenta buenos rendimientos aún con un bajo nivel de agroinsumos, lo que la convierte en una materia prima interesante desde el punto de vista industrial. La extracción de almidón a partir de estas raíces tuberosas fue optimizada en nuestro laboratorio, habiéndose desarrollado un método simple y económico basado en el proceso industrial de obtención de almidón de mandioca (López et al., 2010).

En trabajos previos se ha observado que los almidones de ahipa presentan características tecnológicas promisorias para la elaboración de alimentos, tales como una baja proporción de amilosa y cadenas de amilopectina con un alto grado de ramificación, lo que hace que sus pastas presenten baja tendencia a la retrogradación (López et al., 2012), resultando potencialmente útil como aditivo alternativo al almidón nativo de maíz. Además, las pastas obtenidas a partir de este almidón también presentan una mejor aptitud para la cocción que las de almidón de maíz ya que poseen una temperatura de gelatinización significativamente más baja, y sus gránulos presentan buena capacidad de hinchamiento, lo que permitiría emplearlo como agente espesante (López et al., 2012).

Por otro lado, se determinó que una mínima fracción del almidón de ahipa resulta resistente a la hidrólisis enzimática (< 0,2%), lo que permite suponer que los alimentos derivados de este almidón serán fácilmente digeribles (Doporto et al., 2013), y por enzoinmunoensayos se verificó la ausencia de prolaminas en esta raíz, por lo que la ahipa y sus productos derivados son aptos para la elaboración de productos libres de gluten.

El contenido de proteínas de las raíces se encuentra alrededor de 9-10% en base seca (Dini et al., 2013), pero este contenido se pierde casi totalmente durante el proceso de extracción del almidón (López et al., 2010). Aunque aún es necesario evaluar su valor nutricional y el tipo de propiedades tecnológicas que éstas puedan presentar, las proteínas vegetales siempre son subproductos valiosos de las agroindustrias. Resulta importante entonces poder rescatar y aprovechar este producto como ingrediente para la industria alimentaria.

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es elaborar una estrategia para la obtención y utilización de las proteínas presentes en las raíces de *P. ahipa* acoplada al proceso de extracción de almidón y determinar si las modificaciones introducidas en el proceso afectan el rendimiento y las características tecnológicas del almidón. Asimismo se plantea analizar la capacidad emulsificante de las proteínas extraídas a fin de evaluar un aspecto de su potencialidad como ingrediente para la industria alimentaria.

3. Metodología

3.1 Extracción de proteínas acoplada al proceso de extracción de almidón

3.1.1 Determinación del número de lavados para eliminar el buffer

Se evaluó el número de lavados con H₂O necesarios para eliminar las sales del buffer de extracción (buffer fosfato de sodio 0,05 M, pH 7,4 adicionado con 1M de cloruro de sodio, PO₄⁻³/NaCl) del almidón decantado. Para esto se pesaron exactamente por cuadruplicado muestras de ~10 g de este almidón y se adicionaron 200 ml de buffer

manteniendo la proporción de 2L de solvente de extracción por kg de raíz fresca pelada (López et al., 2010), utilizando datos previamente reportados del contenido de almidón de las raíces (López, 2011). Se realizaron sucesivos lavados del almidón con el mismo volumen de H₂O y se midió la conductividad de los sobrenadantes del almidón decantado luego de cada lavado hasta alcanzar el valor del control de almidón con H₂O.

3.1.2 Proceso de extracción

Se utilizaron raíces de *Pachyrhizus ahipa* provenientes del INTA EEA-Montecarlo (Misiones, Argentina). Las raíces se lavaron, se congelaron a -20°C y se almacenaron durante un año. Posteriormente las raíces se descongelaron a temperatura ambiente, se pelaron, cortaron y procesaron para continuar con el esquema de extracción de almidón que se describe a continuación.

Extracción con buffer: 140g de ahipa pelada y cortada se mezclaron con 280 ml de buffer, manteniendo la relación de 2L de solvente por kg de raíz fresca (López et al., 2010). Se procesaron con una Minipimer (Philips) y se almacenaron 24 h a 4°C. Luego se filtraron con muselina, la lechada se decantó a 4°C y al residuo fibroso se le adicionaron otros 280 ml de buffer y se volvió a procesar. Este esquema se repitió 4 veces. Después de cada decantación, el sobrenadante correspondiente (conteniendo las proteínas) se guardó a 0°C y la lechada siguiente se sumó al almidón ya decantado.

Después de la cuarta extracción, se realizaron 2 más utilizando H₂O en vez de buffer, las lechadas de agua se sumaron y mezclaron con el almidón decantado para lavarlo (de acuerdo al resultado obtenido por las determinaciones conductimétricas). Finalmente, todo el almidón decantado se secó en estufa a 40 °C.

Extracción con H₂O: El esquema es el descrito por López et al. (2010). Es igual que el de extracción con buffer excepto que las 6 extracciones se realizaron con H₂O y el almidón decantado en cada paso se secó en estufa a 40 °C (sin lavado del almidón).

Cada proceso de extracción, con H₂O y con buffer, se realizó por triplicado.

3.2 Rendimiento de extracción de almidón y características del almidón extraído.

Se determinó la masa de almidón obtenida por el método clásico (López et al., 2010) respecto al obtenido al protocolo modificado utilizando buffer PO₄⁻³/NaCl y se calculó el rendimiento de extracción de cada uno de los métodos. Los almidones extraídos se caracterizaron por análisis de color, utilizando un colorímetro (Konica Minolta CR-400), y por ensayos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un equipo MDSC Q100 (TA Instruments) sobre suspensiones acuosas del mismo. El contenido de proteínas residual de los almidones obtenidos por ambos métodos se determinó por conversión del contenido de N total (Kjeldahl) utilizando el valor 6,25 como factor de conversión. Las características reológicas de los almidones gelatinizados se analizaron a través de ensayos rotacionales y dinámicos (López et al., 2012).

3.3 Obtención de las proteínas de ahipa

Los sobrenadantes de extracción con buffer y H₂O fueron recolectados y guardados a 0°C, hasta completar todos los pasos de extracción. La cantidad de proteína presente en cada uno de los sucesivos extractos se determinó sobre alícuotas de los mismos por el método de Bradford. Posteriormente todos los extractos hechos con buffer se juntaron y se procedió a la precipitación de las proteínas por “salting-out” adicionando (NH₄)₂SO₄ al 90% de saturación a 4°C. Se centrifugó a 10000×g durante 25 min a 4°C y las proteínas precipitadas se resuspendieron en buffer fosfato de sodio 0,05 M, pH 7,4 (Forsyth y Shewry, 2002). El exceso de sal se eliminó por diálisis contra H₂O y los extractos obtenidos se liofilizaron y se almacenaron refrigerados en frascos herméticos.

Se determinó el contenido proteico del polvo liofilizado por el método de Kjeldahl.

3.4 Solubilidad y capacidad emulsificante de las proteínas extraídas

Se evaluó el efecto de la variación del pH del medio en la solubilidad de las proteínas extraídas. Se pesaron aproximadamente 250 mg de proteína, se alcalinizó con NaOH hasta total disolución y luego se llevó a neutralidad con ácido acético 1N y se llevó a un volumen final de 50 ml con agua destilada. Se adicionó 1 ml de esta solución de proteína a cada vaso de precipitado conteniendo 10 ml de buffer acetato de sodio 0,1N a los valores de pH estudiados (rango aproximado de pH: 2 a 8); se mezcló, se dejó reposar durante 3 minutos y se midió la absorbancia de las soluciones a 640 nm. Los valores se expresaron como transmitancia porcentual (%) de las soluciones.

Finalmente, se estudió la capacidad estabilizante de emulsiones de las proteínas de ahípa respecto a un hidrolizado proteico de soja comercial Supro® 500E (Danisco®, DuPont, EEUU) utilizado para tal fin. Se evaluó el contenido de proteínas de cada uno de los concentrados por el método de Kjeldahl. Las proteínas se solubilizaron en medio alcalino (pH \approx 9), se centrifugaron a 3000 \times g durante 10 min para eliminar los insolubles y el sobrenadante se llevó a pH 6,2 con HCl 0,1N y se ajustaron a volumen con H₂O para obtener una concentración final de proteínas del 1%. Las emulsiones O/W se formaron mezclando la correspondiente suspensión proteica con aceite puro de girasol comercial (Natura®, AGD, Argentina) en una proporción 30:70 p/p. Las mezclas se emulsionaron utilizando un equipo Ultra Turrax T25 (10000rpm, 2 min.) e inmediatamente se aplicó ultrasonido al 50% de amplitud durante 3 segundos (Vibra-Cell™, Sonics, EEUU) utilizando una punta sonicadora de 13mm de diámetro. Se monitoreó la desestabilización de las emulsiones por medida del porcentaje de “back scattering” (BS, reflectancia) de las mismas durante 60 min en un equipo QuickscanCoulter®.

Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron realizados en al menos dos experimentos independientes, cada uno por duplicado. Las medias fueron analizadas por un análisis de varianza de un factor (ANAVA) con un nivel de significación del 5% ($p < 0,05$) seguido por un test de comparación de medias LSD Fisher con un nivel de significación del 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

Habitualmente, se realizan entre 5 y 6 pasos de extracción del almidón por muestra de raíz para ser considerada exhaustiva, de acuerdo al método clásico de extracción con H₂O reportado por López et al. (2010).

Por medidas conductimétricas se determinó que 2 lavados con H₂O son suficientes para eliminar el exceso de sales del almidón extraído con buffer y decantado, y llegar así al valor del sobrenadante control con H₂O.

En función de los resultados obtenidos, la extracción se realizó en 6 pasos tal como en el método tradicional, pero realizando los 4 primeros pasos de extracción con buffer y sumando las lechadas de cada extracción. Los 2 pasos posteriores se realizaron con agua, y cada lechada obtenida de estos pasos se utilizó para lavar el almidón decantado obtenido en las cuatro primeras extracciones, por lo tanto se realizaron 2 lavados sobre un total de 6 pasos de extracción. Se midió la conductividad del último sobrenadante de decantación respecto al del H₂O para asegurar la eliminación del exceso de sales del almidón decantado.

En la Tabla 1 se muestran los porcentajes relativos de extracción de proteína para cada paso utilizando buffer PO₄⁻³/NaCl como solvente. Se observa que el cuarto paso de

extracción tiene un rendimiento menor al 5% del obtenido en el primero, por lo que tres pasos serían suficientes para mantener un buen rendimiento de extracción.

TABLA 1: Efecto del número de pasos de extracción en el rendimiento de proteínas

Paso de extracción	1°	2°	3°	4°
mg % ^a	94,4±7,3	28,2±3,7	10,8±5,6	2,3±4,0
% extracción ^b	100	29,9	11,4	2,4

^a mg de proteína extraída cada 100 g de raíz en base húmeda. ^b Porcentaje relativo de extracción

En la Tabla 2 se observa que la modificación en el proceso de extracción no disminuyó el rendimiento de extracción de almidón, incluso resultando levemente superior el obtenido con buffer respecto al extraído con agua. El contenido de proteína residual del almidón extraído con buffer resultó significativamente menor al del obtenido con el método tradicional, demostrando la mayor efectividad de extracción de proteínas del buffer respecto al agua.

En cuanto a los parámetros térmicos obtenidos por DSC, se observa que la temperatura del pico de gelatinización no presentó variaciones para ambos almidones, pero sí se observó una diferencia en la entalpía del proceso, resultando significativamente mayor para el almidón extraído con buffer, lo que indicaría que una mayor cristalinidad.

Los parámetros de color ΔE (diferencia total de color) y C^* (Chroma, saturación) también se vieron afectados por el tipo de extracción resultando significativamente menores para el almidón extraído con buffer (Tabla 2) lo que indica que éste presenta una mayor blancura. Las variaciones observadas en ΔE y C^* se atribuyen a los valores de los parámetros de cromaticidad a^* y b^* . Así, el almidón extraído con buffer presentó un valor de a^* de $0,36 \pm 0,05$ y un b^* de $2,44 \pm 0,11$, mientras que el extraído con agua mostró un valor de a^* de $0,41 \pm 0,04$ y un b^* de $3,68 \pm 0,37$, significativamente mayor al primero ($p < 0,05$), indicando una mayor coloración del almidón.

TABLA 2: Efecto del proceso de extracción en las características de los almidones

	Rendim. %	% Prot. Residual	ΔH	T° pico	Parámetros de color		
					ΔE	C^*	H
Buffer	16,39±0,30b	0,01±0,02a	9,05±0,19b	65,46±0,37a	4,59±0,10a	2,46±0,11a	1,4 ±0,02a
Agua	15,70±0,14a	0,54±0,01b	5,88±0,26a	65,78±0,48a	6,07±0,45b	3,70±0,37b	1,46±0,02a

En cuanto a las características reológicas de los almidones obtenidos por ambos métodos se observó que ambos presentan comportamiento pseudoplástico, modelado efectivamente a través del modelo de Ostwald de Waele con valores de $r^2 > 0,99$ (Tabla 3). Sin embargo, se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores de viscosidad aparente (η), resultando superior para el almidón extraído con buffer, y en los parámetros k y n del modelo. Asimismo, el almidón extraído con buffer presentó un valor de tixotropía mayor que el extraído con agua (Tabla 3).

TABLA 3: Efecto del proceso de extracción en el comportamiento reológico de los almidones

	η 500 s ⁻¹	r^2	k	n	Tixotropía
Buffer	196,37 ± 8,70 a	0,996	9,28 ± 0,02 a	0,3776 ± 0,0067 a	6936,5 ± 174,66 a
Agua	79,72 ± 2,76 b	0,999	2,47 ± 0,15 b	0,4466 ± 0,0048 b	4489,0 ± 77,78 b

Se estudió el efecto del pH en la solubilidad de este concentrado proteico a fin de evaluar el tipo de alimentos en los que podría incorporarse. En la Figura 1 se observa una baja solubilidad en un rango de pH de 2-5, representado por un bajo valor de transmitancia porcentual de sus soluciones, presentando una forma sigmoidea, a diferencia de las proteínas de soja que muestran la típica forma de “U” en la curva de solubilidad (Figura 1). A partir de pH 6 ambas fuentes de proteínas muestran buena solubilidad, por lo que serían útiles para su aplicación en matrices alimentarias levemente ácidas.

Los contenidos de proteína para el polvo liofilizado obtenido de ahipa por extracción con buffer y el polvo comercial (Supro 500E®) de proteínas de soja fueron de $56,13 \pm 0,25\%$ y $71,13 \pm 0,62\%$, respectivamente. Se estudió la capacidad emulsificante del concentrado proteico de ahipa respecto al de soja, comercializado a tal fin.

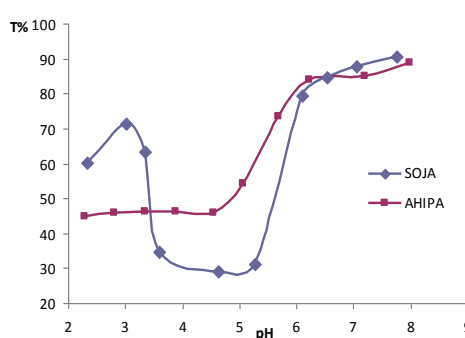


FIGURA 1 Transmittancia % a 640 nm de las proteínas a diferentes valores de pH

Se analizó la desestabilización de las emulsiones en la parte inferior del tubo o zona de cremado (7-20mm) producida por la migración de las gotas de la fase oleosa hacia la parte superior del tubo, y en la parte superior del tubo o zona de desestabilización de la fase crema (50-65mm), que se caracteriza por la fusión de gotas de aceite generando un cambio en los valores del %BS (sectores A y B respectivamente de las gráficas de la Figura 2a). En la Figura 2b se observa una desestabilización de la zona de cremado las emulsiones con proteínas de ahipa respecto a las de soja, presentando descensos significativos ($p < 0,05$) en el %BS a los 20, 40 y 59 min, mientras que las emulsiones con proteínas de soja no presentaron variaciones en el %BS durante todo el período. En la zona de la desestabilización de la fase crema (parte superior del tubo) se observa que con ninguna de las dos proteínas hubo variación significativa del %BS en el tiempo; sin embargo, a partir de $t=30$ min los valores de %BS con proteínas de soja resultaron significativamente menores que con las de ahipa.

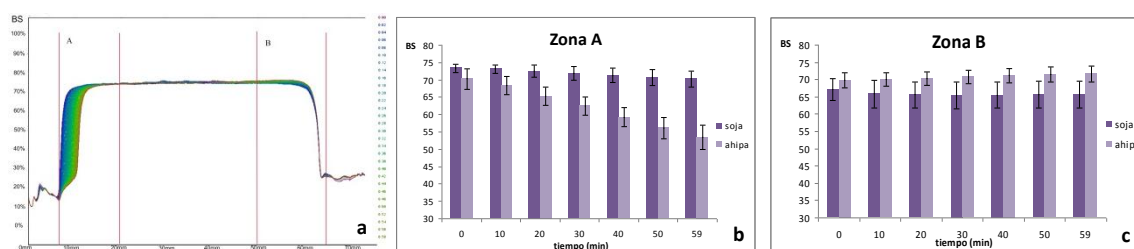


FIGURA 2 a) Perfiles a diferentes tiempos de BS% en función de la longitud del tubo. Zonas analizadas: cremación (zona A) y desestabilización de la fase crema (zona B) **b)** BS en función del tiempo correspondiente a la zona A **c)** BS en función del tiempo correspondiente a la zona B.

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que el uso de buffer en la extracción de almidón permitiría acoplar la extracción de proteínas para el aprovechamiento de este subproducto, siendo 3 pasos de extracción suficientes para extraer la mayor parte de las proteínas solubles. El proceso de obtención de almidón no sufre pérdidas en el rendimiento, y el almidón obtenido presenta menor contenido de proteínas residuales y mayor blancura. El almidón extraído con buffer también presenta propiedades reológicas diferentes a las del almidón extraído con agua, lo que podría deberse a su mayor cristalinidad.

Las proteínas de ahípa presentaron una capacidad de estabilización de emulsiones inferior a la observada para las proteínas de soja a pH 6,2. Esto podría estar relacionado con una baja presencia de grupos hidrofóbicos en este tipo de proteínas, ya que presentan una buena solubilidad a este pH. En base a estos resultados se propone estudiar otras propiedades tecnológicas relacionadas a proteínas solubles con el fin de plantear posibles aplicaciones alimentarias para estas proteínas.

6. Bibliografía

- Dini, C.; Doporto, M.C.; García, M.A.; Viña, S.Z. (2013). Nutritional profile and anti-nutrient analyses of *Pachyrhizus ahípa* roots from different accessions. *Food Research International* 54: 255-261.
- Doporto, M.C.; Dini, C.; Viña, S.Z.; Garcia, M.A. (2014). *Pachyrhizus ahípa* roots and starches: composition and functional properties related to their food uses. *Starch – Stärke* 66: 539 - 548.
- Forsyth, J.L.; Shewry, P.R. (2002). Characterization of the major proteins of tubers of yam bean (*Pachyrhizus ahípa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:1939-44.
- López, O.V.; Viña, S.Z.; Pachas, A.N.A.; Sisterna, M.N.; Rohatsch, P.H.; Mugridge, A.; Fassola, H.E.; García, M.A. (2010). Composition and food properties of *Pachyrhizus ahípa* roots and starch. *International Journal of Food Science & Technology* 45: 223-233.
- López, O.V. (2011). Desarrollo, caracterización y aplicación de envases biodegradables a partir de almidón. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- López, O.V.; García, M.A.; Viña, S.Z. (2012). *Pachyrhizus Ahípa: Revalorización De Un Cultivo Ancestral*, Editorial Académica Española.