

Hidrólisis enzimática en harina de quinua y tarwi por efecto de α -amilasa

Enzymatic hydrolysis in quinoa y tarwi flour by α -amylase effect

Hidrólise enzimática em farinha de quinua e tarwi por efeito do α -amilasa

NANCY ALEJANDRA NAVIA-COARITE¹, GASTON LUIS NINA-MOLLISACA²,
EVELIN PATY MENA-GALLARDO³ & LILY SALCEDO-ORTIZ^{4*}

RESUMEN

*La quinua y el tarwi se caracterizan por ser altamente nutritivos, con el fin de aumentar su consumo se buscan nuevas alternativas de procesos alimentarios, artesanales y biotecnológicos. En este estudio se evaluó la digestibilidad de polisacáridos contenidos en harina de quinua real (*Chenopodium quinoa Willd*), variedad blanca (QB), negra (QN) y en oligosacáridos contenidos en harina de tarwi (*Lupinus mutabilis*)*

Recibido para evaluación: 2 de Mayo de 2018.

Aprobado para publicación: 2 de Noviembre de 2018.

- 1 Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Instituto de Investigaciones Químicas, Laboratorio de BIOORGÁNICA. Lic. en Ciencias Químicas. La Paz, Bolivia.
- 2 Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Instituto de Investigaciones Químicas, Laboratorio de BIOORGÁNICA. Lic. en Ciencias Químicas. La Paz, Bolivia.
- 3 Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Instituto de Investigaciones Químicas, Laboratorio de BIOORGÁNICA. Est. de Ciencias Químicas. La Paz, Bolivia.
- 4 Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Instituto de Investigaciones Químicas, Laboratorio de BIOORGÁNICA. MSc. en Productos Naturales. La Paz, Bolivia.

*Correspondencia: e-mail: priebiet2004@gmail.com; lsalcedo@fcpn.edu.bo

(T) por aplicación enzimática de α -amilasa in vitro. El análisis proximal de los granos (métodos AOAC), mostró valores similares a los de referencia. Se cuantificó el contenido de azúcares libres en harina de los granos, encontrándose en %, $10,05 \pm 0,3$ para QB, $8,25 \pm 0,3$ para QN y $0,19 \pm 0,01$ para T. Se determinó el contenido de almidones, $51,08 \pm 0,3\%$ en QB y $49,04 \pm 0,4\%$ en QN. Los azúcares reductores por efecto de Termamyl Sc en % de sustrato fue de $25 \pm 1,9$ (QB), $27,5 \pm 1,5$ (QN) y $2,01 \pm 0,3$ (T). Los parámetros cinéticos encontrados: Km: $80,4 \text{ mg/mL}$, $V_{\max} 0,36 \text{ mg/mL min}^{-1}$ (QB); Km: $98,8 \text{ mg/mL}$, $V_{\max} 1,72 \text{ mg/mL min}^{-1}$ (QN); T: Km: $3,14 \text{ mg/L}$ y $V_{\max} 4,81 \text{ mg/mL/min}^{-1}$, se derivaron del gráfico de Lineweaver Burk.

ABSTRACT

Quinoa and tarwi are characterized by their high nutritional value so their crops have spread to various countries. In recent years to increase consumption new food processing alternatives are sought, artisanal and biotechnological. In this study the digestibility of polysaccharides contained in quinoa flour (*Chenopodium quinoa* Willd), white variety (QB), black variety (QN) and oligosaccharides of tarwi flour (*Lupinus mutabilis*) (T) by enzymatic application of α -amylase was evaluated in vitro. The proximal analysis of the grains was performed, finding values similar to those of reference (AOAC methods). The content of free sugars in flour of the grains was $10,05 \pm 0,3$ for QB, $8,25 \pm 0,3$ for QN and $0,19 \pm 0,01$ for T. The starch content was determined, $51,08 \pm 0,3\%$ in white quinoa (QB) and $49,04 \pm 0,4\%$ in black quinoa (QN). The reducing sugars by the effect of Termamyl Sc in % of substrate was $25 \pm 1,9$ (QB), $27,5 \pm 1,5$ (QN) and $2,01 \pm 0,3$ (T). The kinetic parameters found: Km: $80,4 \text{ mg/mL}$, $V_{\max}: 0,36 \text{ mg/mL min}^{-1}$ (QB); Km: $98,8 \text{ mg/mL}$, $V_{\max}: 1,72 \text{ mg/mL min}^{-1}$ (QN); Km: $3,14 \text{ mg/L}$ and $V_{\max} 4,81 \text{ mg/L min}^{-1}$ (T), were derived from the Lineweaver Burk plot.

RESUMO

Quinoa e tarwi são caracterizados por serem altamente nutritivos, de modo que suas culturas se espalharam para vários países. Para aumentar o consumo, novas alternativas de alimentos, processos artesanais e biotecnológicos são buscadas. Neste estudo, a digestibilidade de polissacáridos contido na farinha quinoa real (*Chenopodium quinoa* Willd), variedade branca (QB), a variedade preta (QN) e oligossacáridos contidos na farinha de Tarwi (*Lupinus mutabilis*) (T), por aplicação enzimática foi avaliada de α -amilase in vitro. A análise proximal dos grãos (métodos AOAC) apresentou valores semelhantes aos de referência. o teor de açúcares livres na reunião grãos de farinha de $10,05 \pm 0,3$ para QB, determinou-se $8,25 \pm 0,3$ e $0,19 \pm 0,01$ QN conteúdo T. amido, $51,08 \pm 0,3\%$ $49,04 \pm 0,4\%$ QB e foi quantificada em QN Os açúcares reductores de Termamyl Sc em % de sustrato foram de $25 \pm 1,9$ (QB), $27,5 \pm 1,5$ (QN) e $2,01 \pm 0,3$ (T). Os parâmetros cinéticos encontrados: Km: $80,4 \text{ mg/mL}$, $V_{\max} 0,36 \text{ mg/mL min}^{-1}$ (QB); Km: $98,8 \text{ mg/mL}$ $V_{\max} 1,72 \text{ mg/mL min}^{-1}$ (QN); T: Km: $3,14 \text{ mg/L}$ e $V_{\max} 4,81 \text{ mg/L min}^{-1}$, foram derivados do gráfico de Lineweaver Burk.

PALABRAS CLAVE:

Chenopodium quinoa, *Lupinus mutabilis*, Carbohidratos, Parámetros cinéticos

KEYWORDS:

Chenopodium quinoa, *Lupinus mutabilis*, Carbohydrates, Kinetic parameters.

PALAVRAS CHAVE:

Chenopodium quinoa, *Lupinus mutabilis*, Carboidratos, Parâmetros cinéticos

INTRODUCCIÓN

Los granos andinos, como quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) y Tarwi (*Lupinus mutabilis* sweet) son alimentos originarios de la zona andina de Sud América [1, 2], la quinua, es el grano, cuyo alto valor nutritivo ha generado un alto nivel de exportación del grano beneficiado, particularmente de Bolivia y Perú, actualmente toda la región andina, desde Colombia hasta el norte de Chile y Argentina, han incentivado su producción [3], ingresando a una competencia inusual. La demanda de mercado internacional ha favorecido la producción de 4 variedades de quinua real en Bolivia: Real Blanca, Toledo, Phisanqalla (grano rojo o café), y C´hiara (grano negro) [4]. Por otro lado, el Tarwi (*Lupinus mutabilis* sweet) que presenta alto valor nutritivo, tiene menor grado de estudio, lo que ha limitado su comercialización. Se debe destacar que el proceso de des-amargado de Tarwi y el proceso de beneficiado de la quinua son factores que elevan los costos de su comercialización.

Se han realizado muchos estudios sobre el efecto de consumo de quinua en la reducción del riesgo de enfermedades crónicas, entre las más reportadas están sus propiedades anti-oxidantes [5-7], anti-inflamatoria [8, 9], inmunomodulador [10], anticancerígenas [11], hipo-colesterolemia y antihipertensivo [12, 13]. En base a estos estudios científicos se prevén perspectivas nutraceuticas de la quinua y aplicaciones funcionales beneficiosas para la salud humana [14]. Por lo que actualmente está siendo cultivada en América del Norte, Europa, regiones subtropicales de África y Asia, más de 50 países han iniciado su cultivo [3,15].

La quinua y el Tarwi presentan alta concentración de lisina, que repercute en el contenido de proteínas de alta calidad [14, 16], característica poco frecuente en alimentos vegetales. Otra característica común es su Índice Glucémico Bajo [14], que hace que estos granos sean propicios para desarrollar alimentos modificados con alta propiedad nutricional que puedan ser administrados como aditivos nutricionales específicos.

Muchas de las enfermedades crónicas que afligen a la sociedad de un modo particular (cáncer, obesidad, hipertensión, trastornos cardiovasculares) se relacionan de un modo muy estrecho con la dieta alimenticia [17], por lo que, el buscar nuevas formas de consumo de alimentos altamente nutritivos como

los granos andinos son necesarios, para incrementar su consumo en diversas formas.

En el presente estudio se identificó el porcentaje de hidrólisis biológica por aplicación de α -amilasa Termamyl Sc en harinas desengrasadas de granos andinos: quinua real blanca, quinua real negra (C´hiara) y Tarwi, con todos los componentes que forman parte natural de los granos, sin introducir compuestos que alteren el pH natural, para establecer las bases de obtención de aditivos nutricionales de mejor digestión.

MÉTODO

Materia prima

Los granos orgánicos certificados de Quinua Real Blanca, Quinua Real Negra y Tarwi fueron entregados por la empresa de alimentos Irupana Organic Andean Food S.A.

Obtención de harina de quinua blanca (QB), quinua negra (QN) y Tarwi (T)

Los granos fueron molidos en una moladora de granos BOSCH por 10 minutos, para luego ser tamizado en tamices de acero norma ASTM 11 [18], obteniéndose la harina compuesta.

Análisis proximal

El análisis proximal se determinó de acuerdo a métodos AOAC establecidas en la Norma Boliviana. Humedad, ceniza, fibra, lípidos, proteínas (N x 6,25) [19], los carbohidratos por determinación indirecta.

Harina desengrasada

Se procedió por el método soxhlet [18].

Cuantificación de azúcares libres y totales

La cuantificación de azúcares libres en harina de granos completa y desengrasada, se realizó por el método Dubois (Método fenol sulfúrico) por triplicado [19, 20]. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Génesis 10S UV-VIS a 490 nm. Para azúcares libres (QB y QN) se pesaron 100 mg llevando a 100 mL con agua destilada (100 mg.dL⁻¹) se mezcló por 5 minutos, se centrifugó por 5 min a 3500 rpm, se tomó la muestra del sobrenadante.

Para el Tarwi, se procedió por el método DNS después de una hidrólisis ácida en base a una curva patrón [21].

Almidones

La determinación de almidones se realizó por el método AOAC 996.11 [22], utilizando curva patrón de glucosa.

Enzima

Termamyl Sc, una α -amilasa termo estabilizable de *Bacillus licheniformis*, se utilizó para la licuefacción de almidones contenido en harina desengrasada de granos andinos. La actividad enzimática de la enzima de 120 KNU g^{-1} , donde cada unidad de kilo novo α -amilasa (KNU) descompone 5,26 g de almidón por hora en condiciones normales, pH recomendado 5,4 - 5,8, dosaje recomendado de 0,15 - 0,45 Kg/ton de almidón [23], equivalente a una relación enzima/sustrato (E/S) 0,015 - 0,045.

Hidrólisis enzimática

Sobre la base de pruebas preliminares, tomando en cuenta la dificultad en la agitación por la consistencia provocada por la gelatinización de las diferentes muestras de quinua real blanca (QB), quinua real negra (QN) y Tarwi (T), se establecieron diferentes concentraciones de sustrato (almidón), en las quinuas y oligosacáridos en el tarwi (Cuadro 1), se realizó la hidrólisis de almidones en harina de los granos desengrasados por aplicación de la enzima Termamyl Sc, en reactores preparados con balones de 3 bocas de 500 mL conectado a refrigerante, en baño maría sobre platos térmicos con agitación y temperatura regulables, considerando que los granos contienen componentes propios que forman una matriz adecuada para la hidrólisis, no se utilizaron soluciones tampón ni adición de calcio. Se homogenizó a agita-

ción constante, dejando ebullición por 5 min para la gelatinización, se trabajó a 85°C. Con base en datos de la ficha técnica de Termamyl Sc, con 20 uL (0,0252 g) de enzima por triplicado. Previa cuantificación de azúcares reductores se inactivo con HCl 0,5 N para el seguimiento del proceso enzimático se utilizó el método de Fehling [24], realizando una dilución 1:6 para la QB, 1:2,5 para QN, para el Tarwi se utilizó el método Dubois con dilución 1:10.

Los parámetros cinéticos de Km y Vmax para Termamyl Sc en una matriz de harina de granos (QB, QN y T) sin grasas fueron estimados, en condiciones de pH propios de cada grano: QB, pH 5,6; QN, pH 5,5; T pH 5,0. Se utilizó la doble recíproca de Lineweaver Burk en base a la cinética de Michaelis - Menten, con la siguiente ecuación.

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Análisis estadístico

Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar (DS). Se realizó el Análisis de Varianza (ANOVA) con el programa SPSS Statistics. Se utilizó la prueba de Duncan para el análisis proximal y Tukey para las demás evaluaciones.

RESULTADOS

Análisis proximal de Quinua Real Blanca, Quinua Negra y Tarwi

Los valores obtenidos del análisis proximal (Cuadro 2), se encuentran dentro rangos encontrados en

Cuadro 1. Relación E/S para la aplicación de termamyl® en harina desengrasada de quinua real blanca(QB), quinua real negra (QN) y Tarwi (T).

QB	QB	QN	QN	T	T
Almidón (%)	Rel. E/S	Almidón (%)	Rel. E/S	Oligosacáridos (%)	Rel. E/S
5	0,5	1,5	1,7	0,85	3,0
7,5	0,34	3,0	0,84	1,28	2,0
10	0,25	4,0	0,63	1,70	1,5
12,5	0,20	5,0	0,5	2,13	1,2
15	0,17	6,0	0,42	2,55	1,0

otros estudios, particularmente de los carbohidratos totales en la quinua que varía desde 54,5 hasta 66,8 [25 - 27], está determinación de carbohidratos por diferencia incluye la fibra total dietética [28], factor que debe considerarse cuando se quiere valorar almidones u otro tipo específico de carbohidratos.

Como se puede observar, los carbohidratos en *lupinus mutabilis* representan 16,41 %, similar a otros reportes [29, 30], la composición de carbohidratos según Gross R. et al (1988), corresponde a 15% de oligosacáridos consta de estaquiosa 70%, rafinosa 17%, sacarosa 10%, verbascosa 6% en 2 variedades de *lupinus mutabilis*, carbohidratos no digeribles a excepción de la sacarosa [30], la determinación de carbohidratos por diferencia en *lupinus mutabilis* llega hasta un 28,2% [31]. En relación a las proteínas los valores encontrados se encuentran dentro de los de referencia [25, 30]. La alta concentración de proteínas da lugar a diferentes propuestas de consumo, el contenido de lisina (aminoácido esencial) de *lupinus mutabilis* se encuentra en nivel superior al recomendado FAO [32], con bajo contenido de aminoácidos azufrados por lo que se recomienda hacer combinaciones con cereales u otros [33], por las características cuantitativas y cualitativas es importante desarrollar diversos productos, artesanales y biotecnológicos para mejorar el consumo de los granos andinos estudiados.

Con respecto al valor de significancia ($p=0,000$), se concluye que la variables que influye en el análisis estadístico, son los componentes de los tres granos. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre las dos variedades de quinua real negra y quinua real blanca en, grasa, fibra cruda y proteína, en relación a los componentes del tarwi las diferencias son significativas en todos los componentes.

Almidones

El contenido de almidones en quinua real blanca y negra (C´hiara) (Cuadro 3) son similares a los reportados por USDA (2013) de 52,2%. Los almidones de quinua han sido valorados por sus características particulares, entre las cuales resalta la alta estabilidad al congelamiento resistente a la retrogradación y deshidratación [34, 37], su consumo es recomendado para un buen rendimiento y recuperación en el deporte [2]. El almidón de quinua es altamente ramificado y consiste en pequeños gránulos (partículas tamaño menor que 2 μm de diámetro), más pequeños que las partículas de cereales comunes [35], los

almidones de la quinua han sido estudiados para su extracción por su alta estabilidad [36].

Es posible afirmar que hay diferencias significativas en el contenido de almidón total con respecto a ambas variedades de quinua ($p=0,001$).

Azúcares libres y totales

Como se puede observar en el Cuadro 4, nuestros resultados revelan alto contenido de azúcares libres en la quinua real blanca y en la quinua real negra, coincidiendo con los reportados anteriormente [36]. En otro estudio, se reportó 2,9% de sacarosa, 1,4% de maltosa, 1,7% de glucosa y 0,2% de fructuosa, como parte de azúcares libres, en materia seca [37], un reporte anterior muestra el contenido de azúcares libres hasta un 15% en la variedad Sajama con un contenido de glucosa 4,55%, fructuosa 2,41% y sacarosa 2,39% [38]. Se debe considerar que el método Dubois es sensible a todo tipo de carbohidratos, en este sentido la cuantificación de azúcares libres incluye a compuestos fenólicos glucosilados, saponinas y otros compuestos unidos a carbohidratos [38]. La presencia de azúcares libres probablemente sea variable, en relación a la época de cosecha, almacenamiento y condiciones ambientales en que se encuentren los granos. Los azúcares totales encontrados fueron de

Cuadro 2. Análisis proximal de QB, QN y T (g/100).

Componente	QB*	QN**	T***
Humedad	10,67±0,8	10,17±0,5	6,48±0,21
Cenizas	2,37±0,01	3,26±0,34	3,61±0,01
Grasa cruda	5,7±0,4	7,7±0,36	19,5±0,6
Proteínas	15,02±0,24	14,4±0,28	48,0±0,58
Fibra	3,1±0,11	6,5±0,3	6,0±0,21
Carbohidratos totales	63,06	57,97	16,41

*QB: Quinua Real Blanca
**QN: Quinua Real Negra
***T: Tarwi

Datos expresados con la media \pm SD de tres repeticiones

Cuadro 3. Almidones totales (%) de QB & QN.

Muestra	Almidones totales (%)
Quinua real blanca (QB)	51,08 \pm 0,30
Quinua real negra (QN)	49,04 \pm 0,40

Todos los datos son la media \pm SD de tres repeticiones

Cuadro 4. Azúcares libres (AL) y azúcares totales (AT), equivalentes a dextrosa (ED) en% de QB, QN y T.

Muestra	AL (%) en Harina	AL (%) Harina Desengrasada	AT (%) en Harina	AT (%) en Harina Desengrasada
Quinua Real Blanca (QB)	10,05 ± 0,30	10,80 ± 0,35	61,82 ± 1,25	66,80 ± 0,90
Quinua Real Negra (QN)	8,25 ± 0,30	8,60 ± 0,40	59,65 ± 1,10	63,90 ± 1,05
Tarwi (T)	0,19 ± 0,01	0,23 ± 0,01	17,20 ± 0,60	20,40 ± 0,80

Todos los datos son la media ± SD de tres repeticiones

61,82% para QB, 59,65 para QN y 17,2 para T, valores cercanos a los obtenidos por diferencia en el análisis proximal. Los azúcares libres en el Tarwi se encuentran en cantidades insignificantes, sin duda debido al proceso de des-amargado exhaustivo.

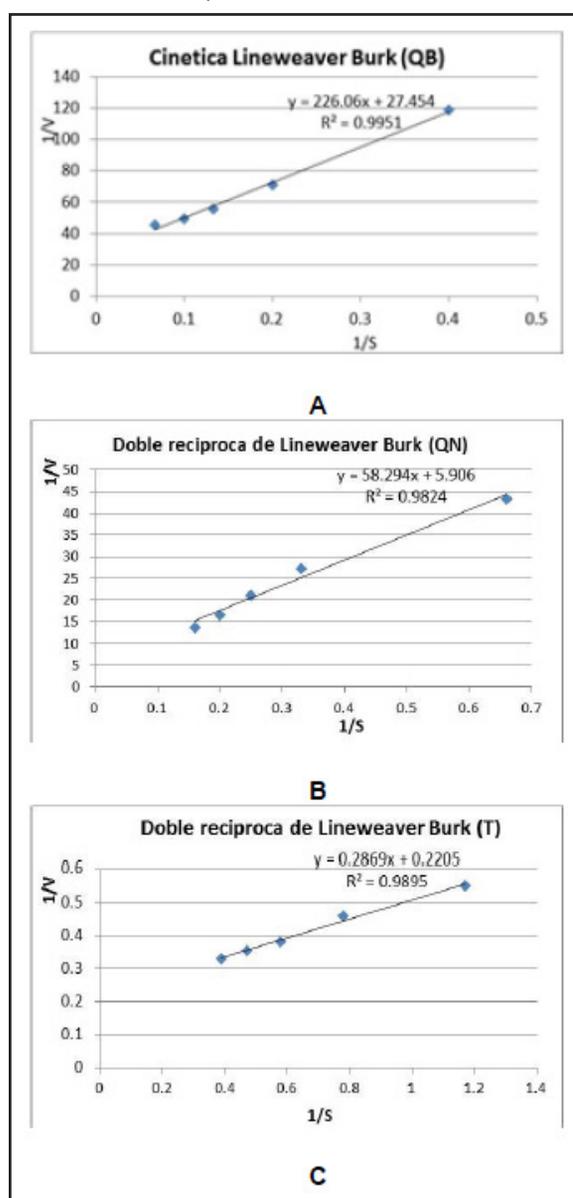
Puesto que el valor-p es menor que 0,05, existe una relación significativa de todos los factores con un nivel de confianza del 95%. Se observa diferencia significativa (p=0,999) entre los subconjuntos 1, 2 y 3, azúcares libres y azúcares totales en harina compuesta y desengrasada de QB, QN y T

El valor de significancia por Tukey (p=0,999) muestra claramente que hay diferencias significativas entre los tres granos con respecto a los azúcares libres y totales en harina compuesta y desengrasada.

Hidrólisis enzimática

El proceso de hidrólisis de almidones por efecto de Termamyl Sc concluye aproximadamente a los 40 minutos para la quinua real blanca (QB) y a los 30 min para la quinua real negra (QN), a diferentes concentraciones de sustrato (almidón) establecidos en el Cuadro 1, la consistencia de la quinua negra en su gelatinización es muy densa, mostrando una gelificación a menor concentración que la quinua real blanca por lo que las concentraciones de trabajo fueron diferentes, este aspecto indica una diferencia en las características físicas de los almidones de quinua real blanca y quinua real negra (C'hiara). Para el tarwi el proceso de hidrólisis a las concentraciones indicadas de oligosacaridos en harina de tarwi concluye cerca de los 60 min, los oligosacaridos contenidos en harina de tarwi sometidos a Termamyl Sc dan una producción de azúcares reductores baja por lo que resulta despreciable el someter el sustrato a la enzima a-amylasa (cuadro 5), este resultado respalda un alto contenido de oligosacaridos tipo estaquiosa, rafinosa y verbascosa [30], oligosacáridos no digeribles,

Figura 1. Doble recíproca de Lineweaver Burk de 1/V versus 1/S, para obtener Km y Vmax para Termamyl Sc., a dosis constante de Enzima, con sustrato contenido en: A. harina de QB, B. harina de QN y C. harina de T.



sin embargo se evidencia la posible presencia de malto oligosacáridos que contienen enlaces a (1-4) entre glucosas que da lugar al resultado encontrado. Los resultados, junto a las referencias encontradas, indican que el tarwi es un alimento adecuado para personas que no quieren consumir carbohidratos, en especial para los que sufren de obesidad y diabetes.

Por cada 100 g de almidón contenido en harina de quinua desengrasada se observa cerca del 26% de hidrólisis expresados en equivalente de dextrosa (DE) por efecto de Termamyl Sc, lo que se traduce en que por cada 100 g de harina de quinua real se hidroliza alrededor de 13 g de sus almidones, considerando que en ambos casos (quinua real blanca y negra) el contenido de almidones es alrededor del 50%. La enzima Termamyl Sc tiene amplia aplicación en alimentos para la licuefacción, particularmente en la producción de siropes, así como en la industria alcohólica por lo que se la eligió para realizar este estudio siendo que requiere condiciones de pH ligeramente ácidas y contenido de calcio bajo (40ppm) [39], la quinua por referencias contiene cerca de 47 mg% [40], en *Lupinus mutabilis* se reporta 370 mg% [41], razón por la que se trabajó sin adicionar calcio al proceso de hidrólisis.

Manteniendo la dosis constante de enzima Termamyl Sc de 0,0252 g, a diferentes concentraciones de sustrato (Cuadro 1), se obtuvo diferentes relaciones enzima/sustrato (E/S), encontrándose la constante de Michaelis-Menten (Km) y la velocidad máxima (Vmax) por la doble recíproca de Line-Weaver Burk (Cuadro 6), según los datos encontrados, la afinidad del sustrato a la enzima en las condiciones citadas es mayor en la quinua real blanca en relación al sustrato que se encuentra en la quinua real negra.

Para cada enzima, se considera generalmente el Km y Vmax con sustrato libre, existen varios estudios de los parámetros cinéticos de α -amilasa de *Bacillus licheniformis*, se ha reportado un Km de 10,97 mg/mL y Vmax de 44,54 U/mL de la enzima aislada [42]. En el estudio de Ul-Haq *et al* (2010) a concentración fija de enzima después de su purificación de la amilasa a partir de *Bacillus licheniformis* EMS-6 se obtuvo un Km de 8,3 mg/mL y 2778 U/mg min⁻¹ de Vmax con almidón de 0,1 a 1,2% [43], la comparación de Km y Vmax es difícil de realizar ya que depende del sustrato utilizado, condiciones de la reacción, cantidad de enzima, en nuestro caso no utilizamos el sustrato

Cuadro 5. Equivalentes de Dextrosa porcentual por efecto de Termamyl Sc en almidón/oligosacáridos en harina de QB, QN y T.

% ED (QB)	% ED (QN)	% ED (T)
25,0 ± 1,9	27,5 ± 1,5	2,01 ± 0,3

ED: Equivalentes Dextrosa

Cuadro 6. Valores de Km y Vmax con 0,025g de Enzima.

Muestra	Km	Vmax
QB	80,4 mg/mL	0,36 mg/mL min ⁻¹
QN	98,8 mg/mL	1,72 mg/mL min ⁻¹
T	1,3x10 ⁻³ mg/mL	4,53 mg/L min ⁻¹

libre. En otro estudio de α -amilasa de *Bacillus licheniformis* inmovilizada utilizando 500 μ g/mL de proteína (enzima) se obtuvo una Vmax de alrededor de 506 U/mg y un Km aproximado de 5 μ M, consistente con el de α -amilasa libre [44]. Cuanto más pequeño el Km mayor la afinidad de la enzima siempre que se de en las mismas condiciones.

El proceso de hidrólisis para cada preparado se dio a diferentes consistencias, en el caso de las quinuas, la viscosidad es muy alta en la gelatinización, coincidiendo con datos de Ahamed *et al.* (1996) que reporta, una alta viscosidad sobre el 5% de almidón, llegando a su máximo entre el 7 y 10% [34], en nuestro estudio se evidenció que la quinua negra presenta mayor gelatinización a menor concentración de almidón, lo que indica diferencias en cuanto al tipo de almidones que constituyen estas 2 variedades, quinua real blanca (QB) y quinua real negra (QN), que podrían repercutir en la digestibilidad *in vivo*.

Con la quinua real blanca es factible trabajar hasta 10% de sustrato y con la quinua real negra hasta el 5% de sustrato por sus características de gelatinización en condiciones de laboratorio.

CONCLUSIONES

Se demostró que la aplicación de α -amilasa (Termamyl Sc) en una matriz de almidón contenido en harina de quinua desengrasada, de las variedades quinua real blanca y quinua real negra sin añadir ningún componente adicional origina cerca de 26% de azúcares reductores expresados en equivalentes de dextrosa, el efecto de α -amilasa en los oligosacáridos del Tarwi es muy bajo. Se obtuvieron los valores de

Vmax y Km a dosis constante de enzima con variación de la concentración de sustrato.

AGRADECIMIENTOS

Al programa gubernamental IDH (Impuestos de Hidrocarburos) por el financiamiento a los proyectos "Aplicación tecnológica enzimática para el desarrollo de aditivos nutricionales de fácil digestión a partir de quinua, La Paz" y "Desarrollo de una formula nutricional para personas que sufren deficiencia renal en base a quinua real y Tarwi", a la empresa de alimentos Irupana Organic Andean Food S.A. por la dotación de la materia prima orgánica certificada, y al Instituto de Investigaciones Químicas de la Universidad Mayor de San Andrés por su apoyo incondicional.

REFERENCIAS

- [1] VICENTE, J.J. El cultivo de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) en el Estado Plurinacional de Bolivia. Revista Científica de Investigación IN-FO-INIAF, 1(7), 2016, p. 88-100.
- [2] GRAF, B.L., ROJAS-SILVA, P., ROJO, L.E., DELATORRE-HERRERA, J., BALDEON, M.E. and RASKIN, I. Innovations in Health Value and Functional Food Development of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 14, 2015, p. 431-445.
- [3] GRANADOS, O. La guerra por el grano de oro. Perú arrebató a Bolivia el liderato en la exportación y producción. El País [online]. 2016. https://elpais.com/economia/2016/03/31/actualidad/1459422139_795680.html [20 de septiembre 2017].
- [4] BONIFACIO, A., ARONI, G. y VILLCA, M. Catálogo etnobotánica de la Quinoa Real. La Paz (Bolivia): Fundación PROINPA, 2012, 63 p.
- [5] REPO DE CARRASCO, R., y ENCINA, Z.C. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: quinua (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) y kiwicha (*Amaranthus caudatus*). Revista Sociedad Química de Perú, 74(2), 2008, p. 85-99.
- [6] PASKO, P., BARTON, H., ZAGRODZKI, P., GORINSTEIN, S. and FOLTA, M. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. Food Chemistry, 115, 2009, p. 994-998.
- [7] DINI, I., TENORE, G.C. and DINI, A. Antioxidant compound contents and antioxidant activity before and after cooking in sweet and bitter *Chenopodium quinoa* seeds. LWT-Food Science and Technology, 43, 2010, p. 447-451.
- [8] HWANG, T.L., WANG, C.C., KUO, Y.H., HUANG, H.C., WU, Y.C., KUO, L.M. and WU, Y.H. The hederagenin saponin smg-1 is a natural fmlp receptor inhibitor that suppresses human neutrophil activation. Biochemical Pharmacology, 80, 2010, p. 1190-1200.
- [9] WANG, X., LIU, R., ZHANG, W., ZHANG, X., LIAO, N., WANG, Z., LI, W., QIN, X. and HAI, C. Oleanolic acid improves hepatic insulin resistance via antioxidant, hypolipidemic and anti-inflammatory effects. Molecular and Cellular Endocrinology, 376, 2013, p. 70-80.
- [10] ZEVALLOS, V.F., ELLIS, H.J., SULIGOJ, T., HERENCIA, L.I. and CICLITIRA, P.J. Variable activation of immune response by quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) prolamins in coeliac disease. The American Journal of Clinical Nutrition, 96, 2012, p. 337-344.
- [11] GAWLIK-DZIKI, U., ŚWIECA, M., SUŁKOWSKI, M., DZIKI, D., BARANIAK, B. and CZYŻ, J. Antioxidant and anticancer activities of *Chenopodium quinoa* leaves extracts - *In vitro* study. Food and Chemical Toxicology, 57, 2013, p. 154-160.
- [12] PASKO, P., BARTON, H., ZAGRODZKI, P., IZEWSKA, A., KROSNIAK, M., GAWLIK, M. and GORINSTEIN, S. Effect of Diet Supplemented with Quinoa Seeds on Oxidative Status in Plasma and Selected Tissues of High Fructose-Fed Rats. Plant Foods for Human Nutrition, 65, 2010a, p. 146-151.
- [13] PASKO, P., ZAGRODZKI, P., BARTON, H., CHLOPICKA, J. and GORINSTEIN, S. Effect of Quinoa Seeds (*Chenopodium quinoa*) in Diet on some Biochemical Parameters and Essential Elements in Blood of High Fructose-Fed Rats. Plant Foods for Human Nutrition, 65, 2010b, p. 333-338.
- [14] FUENTES, F. and PAREDES, X. The state of the world's quinoa, Chapter: Nutraceutical Perspectives of Quinoa: Biological Properties and Functional Applications. New Jersey (USA): Regional Office for Latin America and Caribbean at Food and Agriculture Organization (FAO), 2015, p. 286-299.
- [15] PULVENTO, C., RICCARDI, M., LAVINI, A., D'ANDRIA, R., IAFELICE, G. and MARCONI, E.

- Field trial evaluation of two *Chenopodium quinoa* genotypes grown under rain-fed conditions in a typical mediterranean environment in south Italy. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 96, 2010, p. 407-411.
- [16] GÜENES-VERA, N., ARCINIEGA-RUIZ, O. and DÁVILA-ORTIZ, G. Structural analysis of the *Lupinus mutabilis* seed, its flour, concentrate and isolate as well as their behavior when mixed with wheat flour. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 37, 2004, p. 283-290.
- [17] JONES, P.J. Clinical nutrition: 7. Functional foods—more than just nutrition. *Canadian Medical Association Journal*, 166(12), 2002, p. 1555-1563.
- [18] INSTITUTO BOLIVIANO DE NORMALIZACIÓN Y CALIDAD (IBNORCA). Norma boliviana. Correspondiente a la Norma Andina NA 0038. Granos andinos – Pseudo cereales – Clasificación y requisitos. La Paz (Bolivia): 2007, 9 p.
- [19] DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., ROBERS, P.A. and SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 1956, p. 350-356.
- [20] ÁVILA-NÚÑEZ, R., RIVAS-PÉREZ, B., HERNÁNDEZ-MOTZELAK, R. y CHIRINOS, M. Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *Multicencias*, 12, 2012, p. 129-135.
- [21] SOUTHGATE, D.A.T. Determination of Food Carbohydrates, Elsevier Applied Science. 2 ed. Nueva York (USA): 1991, p. 132-138.
- [22] MEGAZYME. Total starch, assay procedure (amylglucosidase/α-amylase method). Maryland (USA). AOAC 996.11, AACC. Method 76-13.01, 2017, 24 p.
- [23] NIELSEN, K.R. Termamyl Scan α-amylase prepared produced by *Bacillus licheniformis* expressing a gen encoding a modified α amylase from *Bacillus estearothermofilus*. In *Enzyme regulatory Affairs NNAS*. Bagsvaerd (Dinamarca): Novo nordisk, 1999, 59 p.
- [24] OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. 20 ed. Maryland (USA): 2016, 56 p.
- [25] DINI, A., RADTRELLI, L., SATURININO, P. and SCHETTINO, O. A compositional study of *Chenopodium quinoa* Seeds. *Nahrung*, 36, 1992, p. 400-404.
- [26] US DEPARTMENT OF AGRICULTURE, AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE (USDA). National nutrient database for standar reference, release 26. Nutrient Data Laboratory home page. U.S. Departament of Agriculture Web site. [Online]. 2013. Disponible: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>. [citado 18 de Febrero de 2017].
- [27] REPO-CARRASCO-VALENCIA, R. and ASTU-HUAMAN-SERNA, L. Quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd.) as a source of dietary fiber, and other functional components. *Ciencia e Tecnología de alimentos*, 31(1), 2011, p. 225-230.
- [28] SCHNEEMAN, B.O. Physical and chemical properties, methods of analysis and physiological effect. *Food Technology*, 40, 1986, p. 104- 109.
- [29] ORTEGA-DAVID, E., RODRÍGUEZ, A., DAVID, A. y ZAMORA-BURBANO, A. Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. *Acta Agronómica*, 59(1), 2010, p. 111-118.
- [30] GROSS, R., VON BAER, E., KOCH, F., MARQUARD, R., TRUGO, L. and WINK, M. Chemical composition of a new variety of the Andean lupin (*Lupinus mutabilis* cv. Inti) whit low alkaloid content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1, 1988, p. 353-361.
- [31] TAPIA, M. El Tarwi lupino andino. Tarwi, tauri o chocho. *Lupinus mutabilis* sweet. 1 ed. Lima (Perú): Fondo Italo Peruano, 2015, 25 p.
- [32] SCHOENEBERGER, H., GROSS, R., CREMER, H.D. and ELMADFA, I. Composition and Protein Quality of *Lupinus mutabilis*. *Journal of Nutrition*, 112, 1982, p. 70-76.
- [33] SCHOENEBERGER, H., GROSS, R., CREMER, H.D. and ELMADFA, I. The protein quality of lupins (*Lupinus mutabilis*) alone and in combination with other protein sources, *Plant Foods of Human Nutrition*, 32(2), 1983, p. 133-143.
- [34] AHAMED, N.T., SINGHAL, R.S., KULKARNI, P.R. and MOHINDER, P. A lesser-known grain, *Chenopodium quinoa*: Review of the chemical composition of its edible parts. *Food and Nutrition Bulletin*, 19, 1998, p. 61-70.
- [35] VEGA-GALVEZ, A., MIRANDA, M., VERGARA, J., URIBE, E., PUENTE, L. and MARTINEZ, E.A. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient Andean grain: a review, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 2010, p. 2541-2547.
- [36] ARZAPALO, D., HUAMÁN, K., QUISPE, M. y ESPINOZA, C. Extracción y caracterización del almidón de tres variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) negra collana, pasankalla roja

- y blanca Junín. Revista de la Sociedad Química del Perú, 81(1), 2015, p. 44-54.
- [37] OGUNBENGLE, H.N. Nutritional evaluation and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour. International journal of food sciences and nutrition, 54(2), 2003, p. 153-158.
- [38] REPO-CARRASCO, R., ESPINOZA, C. and JACOBSEN, S.E. Nutritional Value and Use of the Andean Crops Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). Food Reviews International, 19, 2003, p. 179-189.
- [39] GONZALES, J.A., ROLDAN, A., GALLARDO, M., ESCUDERO, T. and PRADO, F.E. Quantitative determinations of chemical compounds with nutritional value from Inca crops: *Chenopodium quinoa* ('quinoa'). Plant foods for human nutrition, 39, 1989, p. 331-337.
- [40] KONISHI, Y., HIRANO, S., TSUBOI, H. and WADA, M. Distribution of Minerals in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Seeds. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 68, 2004, p. 231-234.
- [41] ITALIA. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAO). Simposio Regional del chocho o tarwi (*Lupinus mutabilis*). Quito (Ecuador): 2016, 25 p.
- [42] ADEYANJU, M.M., AGBOOLA, F.K., OMFUVBE, B.O., OYEFUGA, O.H. and ADEBAWO, O.O. A thermostable extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis* isolated from cassava steep wáter. Biotechnology Letters, 6, 2007, p. 473-480.
- [43] UL-HAQ, I., MOHSIN-JAVED, M., UZMA, H. and ADNAN, F. Kinetics and thermodynamic studies of alpha amylase from *Bacillus licheniformis* mutant. Pakistan Journal of Botany, 42(5) 2010, p. 3507-3516.
- [44] RASIAH, I. and REHM, B. One-Step Production of Immobilized α -Amylase in Recombinant *Escherichia coli*, *ppl*. Environmental Microbiology, 75(7), 2009, p. 2012-2016.