

Tesis de Posgrado

Estudio sobre las proteínas de la harina de extracción del girasol

Bendisich, Renata María Margarita

1955

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bendisich, Renata María Margarita. (1955). Estudio sobre las proteínas de la harina de extracción del girasol. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0863_Bendisich.pdf

Cita tipo Chicago:

Bendisich, Renata María Margarita. "Estudio sobre las proteínas de la harina de extracción del girasol". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1955. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0863_Bendisich.pdf

Al Dr. Venancio Deulofeu

Alte

R. Bendisch

M I N I S T E R I O D E E D U C A C I O N

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO SOBRE LAS PROTEINAS

DE LA

HARINA DE EXTRACCION DEL GIRASOL

por

RENATA M.M. BENDISCH

-----o-----

T E S I S

para optar al título de

DOCTORA EN QUIMICA

-----o-----

1 9 5 5

863
Ej. 6

M I N I S T E R I O D E E D U C A C I O N

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

R E S U M E N

ESTUDIO SOBRE LAS PROTEINAS

DE LA

HARINA DE EXTRACCION DEL GIRASOL

por

RENATA M.M. BENDISCH

-----0-----

TESIS

para optar al título de

DOCTORA EN QUIMICA

-----0-----

1955 *Res. de Tesis: 863*

R E S U M E N

La harina de extracción de girasol puede considerarse como un subproducto de la industria aceitera, cuyo mayor empleo se encuentra en su uso como alimento de ganado. Debido a la deficiencia en el consumo proteico mundial y a la necesidad de un mayor aprovechamiento de las fuentes proteicas disponibles, hemos estudiado esta materia prima de bajo costo y de suficiente abundancia con el fin de una posible aplicación como alimento humano.

Con este objeto se determinó la cantidad de proteínas contenidas en la harina en estudio extrayendo la misma con soluciones de hidróxido de sodio al 0,2% , cloruro de sodio al 10% y agua destilada determinándose en cada caso las condiciones óptimas de la operación. Las fracciones proteicas aisladas por precipitación con ácido clorhídrico diluido al tercio a pH = 4 no pueden considerarse como puras sino como mezclas de protidos, impurificadas a su vez con otras sustancias coprecipitadas principalmente cloruro de sodio.

Las cantidades obtenidas son:

ClNa al 10% :	33 %
NaOH al 0,2% :	31 %
agua dest. :	10 %

Fue determinado el contenido en nitrógeno de la harina de extracción y de las fracciones proteicas aisladas por el método de Kjeldahl :

Harina de extracción :	7,1 %	39,6 % de proteína
Extracto ClNa	9,8 %	57 % de proteína
Extracto NaOH	: 10,7 %	61 % de proteína

Extracto agua 16,8 % : 96 % de proteína

La composición cualitativa en aminoácidos esenciales de la harina propiamente dicha como asimismo de las fracciones proteicas fue estudiada por medio de la cromatografía en papel monodimensional descendente, empleandose en este caso la mezcla butanol : ácido acético : agua = 40 : 10 : 50 (en volumen) como solvente y ninhidrina en solución butanólica como revelador. Como dato adicional se repitieron las determinaciones anteriores usando cromatografía circular con igual solvente y revelador. Se pudo comprobar la existencia de todos los aminoácidos esenciales predominando entre ellos :

Arginina Leucina
Fenilalanina Valina
Isoleucina

Fue estudiado con detalle el porcentaje del ácido glutámico existente en la harina de extracción de girasol, debido a su importante empleo terapéutico y como también su uso como agente sazonzante muy difundido. Los valores obtenidos según " Síntesis Orgánicas " o sea hidrólisis clorhídrica de la materia prima con subsiguiente precipitación del aminoácido como clorhidrato y su transformación en ácido libre por neutralización hasta su punto isoelectrico, son los siguientes :

3,4 % a partir de la harina directamente

7,6 % a partir de la proteína extr. con ClNa equiv. a 2,5 %
sobre harina

8,3 % a partir de la proteína extraída con NaOH equiv a
2,5 % sobre harina.

=====0 0 0 =====

A mis padres

Dr. Pedro Cattáneo

Al Dr. Ariel H. Guerrero por sus invaluables enseñanzas, por sus consejos y su constante estímulo presento aquí el testimonio de mi más profunda gratitud.

Al Dr. Pedro Cattaneo por la gentileza de haber apadrinado este trabajo y el interés puesto en el mismo.

Al Dr. Venancio Deulofeu por sus valiosos consejos y las facilidades otorgadas durante la realización del presente trabajo.

Al Estudio Químico "APA" por la generosa hospitalidad brindada como asimismo al Dr. Marcelo Vernengo por su colaboración y su ayuda quiero hacer llegar aquí mi más profundo reconocimiento.

INTRODUCCION

Las proteínas son unos de los componentes principales de los alimentos basándose esta importancia no sólo en el aporte energético, como en el caso de los glúcidos y los lípidos, sino también en la acción plástica desarrollada en el organismo.

Las proteínas consideradas como sustancias energéticas tienen un valor calórico de 4 kcal/g, valor in vivo menor que in vitro debido a la combustión incompleta en el organismo. Pero este valor calórico está sometido además a una serie de variaciones debido a la acción específico-dinámica característica de las proteínas. Esta acción se traduce en un aumento del metabolismo después de la ingestión, originando una liberación de energía en cantidad superior en 30 % a la representada como alimento.

El carácter de sustancia plástica predomina en los prótidos, ya que son los constituyentes esenciales de las células vegetales y animales. Desdobladas en sus componentes, los aminoácidos, son absorbidos por el organismo donde intervienen activamente en el crecimiento de los tejidos o en los procesos de reparación de los ya existentes. Se produce entonces un estado de equilibrio dinámico entre los aminoácidos ingeridos y las proteínas de los tejidos.

Queda planteado en esta forma que el valor nutritivo de las proteínas dependen directamente de su composición o sea de los amino-ácidos que las constituyen. Según los estudios de Osborne y Mendel, y más tarde de Rose (1) (2), se demuestra que no todos los aminoácidos son de igual importancia para el organismo. Existe un grupo llamado de esenciales que no puede ser sintetizado por el cuerpo humano en cantidades suficientes por lo cual se hace indispensable su ingestión,

Además existen los aminoácidos no esenciales, los cuales, aunque son partes constitutivas de las proteínas, son sintetizados por el organismo si la ingestión no es suficiente para cubrir sus necesidades.

De las consideraciones anteriores se deduce la gran importancia que tienen los prótidos en la alimentación humana ya que ellas son las únicas fuentes de aminoácidos esenciales. Y simultáneamente con estas conclusiones es necesario enfrentar el problema de la relación entre la demanda alimenticia de la población mundial y la producción de cantidades suficientes de alimentos para cubrir este requerimiento.

En este problema ocupa un lugar preponderante el consumo de prótidos y la importancia de encontrar y estudiar nuevas fuentes para suplir el llamado mínimo proteico necesario para el mantenimiento de la vida normal del organismo humano, o sea lograr el objetivo: prótidos baratos.

Una forma, aunque parcial, de llegar a una solución en el problema de la deficiencia de la alimentación proteica mundial es la producción de hidrolizados de diversas proteínas o sea mezclas de aminoácidos obtenidos por degradación hidrolítica. Las proteínas utilizadas para tales fines son seleccionadas de acuerdo a tres criterios fundamentales. Se tiene no sólo en cuenta su contenido en aminoácidos esenciales como primer criterio, sino también su facilidad de obtención y el costo, muchas veces factor decisivo, constituyendo el segundo criterio. Según el tercer criterio se pueden aprovechar por medio de esta transformación una gran cantidad de proteínas, las cuales no serían utilizadas en su forma original, por razones de sabor desagradable, etc., pero que al estado de aminoácidos son una contribución importante a la alimentación humana. La aplicación de estos hidrolizados de prótidos ya es muy vasta en medicina, empleándose los como proteínas "predigge

ridas" para aumentar la velocidad de asimilación de los aminoácidos en enfermos hipoproteicémicos, en enfermedades del tracto gastrointestinal y del hígado. Por el momento los costos no permiten la difusión como alimento popular.

Entre los constituyentes de los próticos cabe señalar el ácido glutámico, aminoácido no esencial ya que es sintetizado por el organismo. Aún a pesar de esto su uso y su aplicación son amplios de importancia creciente. Desde hace mucho tiempo el glutamato de sodio, o sea la sal sódica del ácido glutámico fué usado como agente sazonante, principalmente en los países orientales. Conocido hoy en día en todo el mundo debido a esta propiedad característica, se ha fomentado su obtención industrial alcanzando su producción en los Estados Unidos a 2000 tn/año.

Según Cairncross (3) pequeñas cantidades de glutamato de sodio agregadas a los alimentos aumentan el sabor de las mismas sin cambiar sus propias características. Además actúa como estimulante de la superficie de la lengua y de la cavidad bucal produciendo una ligera sensación de aspereza. Este autor clasifica al glutamato de sodio entre los agentes sazonantes y no entre los condimentos debido a la ausencia de olor propio.

Galvin (4) hace un estudio comparativo del gusto del glutamato de sodio en soluciones salinas de diferente concentración y deduce de ello la necesidad del empleo del producto conjuntamente con sal. Un análisis completo del sabor del glutamato de sodio fué realizado por Crocker (5), quien determina a su vez la importancia de la disolución del producto para obtener resultados satisfactorios.

Debido a estas determinaciones su empleo se realiza bajo la forma de mezclas con ácido glutámico y glicina según Sabine (6), con cloruro de sodio y ácido glutámico (7), teniendo además la ventaja de poder reemplazar la sal en las

dietas exentas de la misma, necesarias en los casos de nefritis, según los estudios realizados por Manzier (8).

Aparte de esta aplicación es necesario subrayar que el ácido glutámico aún no siendo indispensable para el organismo, ocupa una posición llave en el metabolismo intermedio de los glúcidos y los prótidos. Su concentración es máxima en los tejidos del cerebro, dando lugar estas determinaciones a estudios sobre la relación entre la ingestión del ácido glutámico y las funciones cerebrales, realizados principalmente por Weil-Malherbe (9) y Waelisch (10). Mediciones realizadas por Munkpad (11) en el plasma de personas normales, esquizofrénicas y epilépticas han demostrado que la concentración del ácido glutámico es menor en un 10 % y en un 5 % en los últimos con respecto a los primeros. Debido a estos resultados se han intensificado los estudios sobre el tratamiento de deficiencias mentales con administración de ácido glutámico. Según Albert, Hoch y Waelisch (12) se ha obtenido un aumento significativo en el coeficiente de inteligencia debido a la ingestión de este aminoácido durante algunos meses en proporciones de 10 a 20 g. por día en el caso de niños retardados. Zimmermann, Buergemeister y Putnam (13) observaron iguales efectos empleando dosis de 6 a 24 g. por día durante varios meses, como también un aumento de capacidad mental en pacientes mongoloides por administración de 12 a 48 g. por día durante un lapso de seis meses (14).

Pero este empleo terapéutico del ácido glutámico de tanta importancia y valor para el hombre todavía se encuentra en pleno desarrollo, no pudiendo preverse hasta el momento las perspectivas exactas de su aplicación.-

- - - -

MATERIAS PRIMAS PARA LA OBTENCION DE PROTIDOS

Según su origen las proteínas pueden dividirse en dos grandes grupos: las animales y las vegetales. No existe diferencia cualitativa decisiva entre ambas clases pero si cuantitativa, ya que la cantidad de cada aminoácido que interviene en su constitución varía de una a otra. Haciendo experiencias para determinar el valor nutritivo de las proteínas de diferente origen, se observó que las proteínas animales son más completas, es decir que proveen al organismo con todos los aminoácidos esenciales necesarios. No así las proteínas vegetales que en muchos casos presentan deficiencias, por ejemplo en lisina como la gliadina, o triptofano como la zeína, la metionina y la treonina. Debido a esto la ingestión de prótidos animales se hace indispensable para el desarrollo normal del organismo, requerimiento que hoy en día está supeditado directamente al factor económico, que es decisivo en muchos casos. Teniendo en cuenta el precio mucho más reducido de los prótidos vegetales, se ha estudiado la forma de aprovecharlos y de conferirles propiedades de proteínas completas.

Esto se realiza por una parte agregando suplementos de aminoácidos puro a las proteínas vegetales "inferiores", aumentando de esta manera el valor biológico de las mismas en forma considerable. Ejemplos importantes para este procedimiento son: el agregado de lisina al gluten de trigo y a la harina, de lisina y treonina al arroz, de metionina y de lisina a la soya, de triptofano al maíz.

Pero también se ha tratado, y siempre con el fin de abaratación y del aumento de la cantidad disponible de prótidos completos, el aprovechamiento de proteínas animales y vegetales obtenidas como subproductos en algunas industrias. Esto se refiere principalmente a las industrias aceiteras, in-

diferentemente si estas usan como materia prima pescados o semillas oleaginosas. Después de la extracción del producto primordial o sea el aceite queda en ambos casos como residuo una harina de alta concentración proteica que puede ser aprovechada fácilmente como fuente alimenticia de bajo costo. Naturalmente son necesarios diversos procesos químicos para obtener una proteína pura y apta para la alimentación humana. Los procedimientos de extracción de prótidos se basan, describiéndolos en rasgos generales, en dos operaciones a saber: la extracción de las proteínas por medio de diferentes soluciones y luego la precipitación de las mismas en condiciones óptimas.

Pero este esquema sumamente simple presupone el conocimiento de las propiedades químicas de los prótidos en cuestión, ya que de éstas depende la naturaleza de los agentes químicos a emplearse.

Osborne dividió a las proteínas simples en seis grandes grupos, clasificación utilizada todavía hoy en día. Según ésta las diferentes clases son:

	<u>Solubles en</u>	<u>Precipitadas por</u>
Albúminas	Agua	Saturación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$
Globulinas	Soluciones salinas diluídas	Media saturación "
Glutelinas	Ácidos y álcalis diluídos	Acidificación
Prolaminas	Alcohol al 70-80 %	Dilución con agua.
Histonas	Soluciones ácidas o alcalinas acuosas	
Protéminas	Agua, ácidos, álcalis diluídos.	

Es necesario aplicar esta clasificación con algunas salvedades y restricciones. Principalmente en el caso de las globulinas y de las glutelinas, por su importancia en este

trabajo, existe el fenómeno de interconvertibilidad, lo cual dificulta una separación nítida entre los agentes de extracción y de precipitación característicos de cada grupo.

El campo abarcado por el estudio realizado con respecto al aislamiento de proteínas vegetales es sumamente vasto comenzando a fines del siglo pasado con los trabajos de Osborne et al. y Abderhalden. El primero de ellos se dedicó al estudio de las proteínas del lino (15), del arroz (16), del trigo (17), de la cdestina (18) para nombrar algunas. Aunque en el presente se siguen en muchos casos los procedimientos empleados por estos autores, se han introducido una gran cantidad de modificaciones debido en parte al aumento del conocimiento de las sustancias en estudio y a la evolución de los elementos de experimentación disponibles.

En el transcurso del tiempo se han estudiado las propiedades de una gran cantidad de prótidos de los más diversos orígenes. Entre estos cabe señalar los trabajos realizados sobre las proteínas del trigo, gliadina y glutenina, según Lamour y Sallans (19), Csonka (20), Cross y Swann (21); sobre las proteínas del algodón por Jones y Csonka (22), Friedmann (23); siendo además de importancia ilustrativa por su exactitud de medición los estudios realizados sobre la proteína del maní por Hones y Horne (24), Danielson (25) y Hohnson y Shooter (26).

Pero en nuestro caso la mayor importancia reside en los estudios y experiencias realizadas con el fin de obtener las proteínas en escala industrial y a partir de harinas de extracción. La atención de los autores se ha concentrado principalmente sobre tres materias primas, que son subproductos de la industria aceitera y utilizadas hasta hace poco únicamente como alimento de ganado.

Vassel y Nessbitt (27), Page, Painter y Nessbitt (28) y Smith, Hohnson y Beckel (29) han estudiado la obtención de

los constituyentes proteicos del lino por medio de extracción con soluciones de cloruro de sodio e hidróxido de sodio y precipitación ácida, determinando la influencia del pH y de la temperatura en ambas operaciones sobre el producto resultante y sobre el rendimiento. De aplicación muy variada y en cantidades grandes es también la proteína extraída del maní, cuyas condiciones de aislamiento fueron determinadas por Prominski, Laborde y Cormi (30), los cuales determinaron con todos los detalles las variables influyentes en la extracción. Son de mucho valor los trabajos realizados por Burnett y Fountain (31), Arthur (32), et al. (33), y Macheboef y Tayeau (34).

Pero es necesario destacar una tercera semilla oleagífera, la soya, la cual desde hace mucho tiempo es un alimento muy importante en Asia y cuya influencia alimenticia principalmente en los Estados Unidos va aumentando rapidísimamente. Aparte de ser una fuente de aceite muy valiosa, sus proteínas, glicinina y faseolina, son de elevada calidad debido a que pueden considerarse como proteínas completas y comparables en composición a la lactoalbúmina. La obtención a partir de la harina de extracción está ya muy avanzada, habiéndose determinado las condiciones de los procedimientos por Smith y Circle (35), los que han estudiado la influencia del pH en las soluciones extrayentes; por Smith, Circle y Brother (36) y Belter, Beckel y Smith (37).

En el presente trabajo nos hemos dedicado al estudio de los métodos de aislamiento de los prótidos contenidos en la harina de extracción del girasol. Estas proteínas fueron estudiadas por primera vez por Abderhalden (38) quien las clasificó entre las globulinas, ya que extrajo con una solución de cloruro de sodio al 10 % y produciendo la precipita-

ción con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. Más tarde fueron aisladas nuevamente por Osborne y Harris (39) utilizando estos autores los mismos métodos y determinando la distribución de nitrógeno. Los estudios más recientes fueron realizados por Wehring (40), Clagget y Hoffmann (41) y Smith y Johnson (42). Este último trabajo es de sumo interés, ya que extrae la proteína con solución de cloruro de sodio y de hidróxido de sodio, precipitando por diálisis y por acidificación y determinando conjuntamente la relación entre el método de extracción y la coloración de la proteína obtenida debida al ácido clorogénico.

No existe hasta el momento ningún intento de estudio sobre el aprovechamiento industrial en gran escala de esta proteína, toma de grandes perspectivas debido a la cantidad de materia prima disponible, así como el bajo costo de la harina de extracción.

El girasol ha adquirido en nuestro país una importancia excepcional como semilla oleaginosa, y si bien su cultivo fué forzoso durante la II Guerra para obtener aceite comestible, las características del mismo y su bajo precio, lo transformaron en permanente y de interés nacional. Desde hace varios años la cosecha de girasol disminuye de un millón de toneladas a un cuarto de millón aproximadamente, pero esto no debe interpretarse como pérdida de interés, sino como error de política industrial, que trató de fomentar la siembra de maíz para obtener alcohol.

La semilla de girasol está formada por una "pepita" de tamaño variable, alrededor de 0.5cm., recubierta por "cáscara" celulósica-pentosánica de color crema a negro, con estrías longitudinales oscuras en el primer caso. El aceite se encuentra en gran proporción en la pepita (50% aproximadamente) y en la cáscara existe menos de 1 % de lípidos propios donde parecen

predominar "ceras". La composición aproximada de la semilla de girasol en porcentaje en peso es:

Semilla fresca [100]	Cáscara [35]	Agua [5]	Cáscara seca [30] con menos de 1% de lípidos	Agua [9]	Aceite [32]	Cáscara seca [30]

Por estacionamiento, madura, cambia su consistencia y pierde agua:

Semilla fresca [100]	Cáscara [33]	Agua [3]	Cáscara seca [30]	Agua [6]	Aceite [33]	Cáscara seca [30]

En la realidad industrial el procedimiento de limpieza quita cerca del 1% de impurezas (tierras, cuerpos extraños, etc.) que no vamos a considerar. En cambio interesa observar la distribución real de los componentes mencionados de acuerdo a la tecnología cuyas operaciones son: 1) Limpieza, tamizado y aspiración. 2) Descascarado: rotura, zarandeo con aspiración. 3) Molienda. 4) Prensado en caliente (aceite de prensas y expeller). 5) Molienda de expeller. 6) Extracción de la harina de expeller con solvente (aceite de extracción y harina de extracción).

Semilla fresca [100]	Cáscara [30]	(0.5% aceite total)	
		Pepita [70]	Aceite de prensas [23]
			Expeller [47]
Aceite de extracción [8]			
Harina de extracción [39] (0.5% aceite total).			

(Expeller y harina son datos teóricos pues el material pierde agua. El dato real de harina no llega a 35 %).

Como resultado se obtiene cáscara, aceite y harina protei

por tercios. La harina de extracción contiene una cierta proporción de cáscara que no se ha podido separar (alrededor del 5%), aceite no extraído (hasta 2%), agua (5-10%), proteínas vegetales (40 %), minerales y aproximadamente 50 % de polisacáridos.

Las aplicaciones fundamentales posibles son: abono, alimento para ganado, medios de cultivo y alimento humano; la primera excluida por las otras. La harina de extracción en nuestro país se exporta a los Estados Unidos con demanda sostenida, sin embargo otras harinas de oleaginosas se utilizan en fermentaciones industriales.

La Cámara Gremial de Aceites Vegetales exige un mínimo de 43 % como suma de lípidos y proteínas, lo cual con un dato aceptable de lípidos (1%) deja 42 % para proteína. Esto, con el factor 6.25, por lo cual dado que para proteínas vegetales se debe utilizar el factor 5.7, la base correcta exigible entonces para proteínas debería ser 38 % (6.7 % de nitrógeno). Es lamentable la confusión producida por el uso del factor 6.25 que corresponde a proteínas animales y será muy difícil de eliminar en el uso comercial. Nuestros datos confirman que el factor a utilizar es $5.7 \times N\%$: proteínas vegetales.

- - - -

ACIDO GLUTAMICO

Para obtener ácido glutámico en cantidades industriales con el objeto de introducirlo en el mercado mundial como tal o como su sal sódica, es necesario seleccionar proteínas como materias primas de un contenido alto de este aminoácido. Según Hall (43) la cantidad de ácido glutámico en un hidrolizado proteico destinado a estos fines debe ser alrededor del 12 %, con un contenido muy bajo en glúcidos y lípidos. Pero esta restricción se hace menos severa si se tiene en cuenta que la mayoría de las proteínas disponibles industrialmente exceden este porcentaje prefijado, principalmente los granos de cereales y las semillas oleaginosas. A estas consideraciones hay que agregar necesariamente el factor económico influyente en la selección de la materia prima, ya que de él depende gran parte del éxito de la industria.

Según Morris B. Jacobs (44) los porcentajes de los diferentes prótidos vegetales son:

<u>Origen</u>	<u>Proteína</u>	<u>% Ac. Glutámico en la proteína.</u>
Maíz	Zeína	31.3
Maíz	Glutelina	12.7
Avena	Mezcla	18.4
Trigo	Gluten	25.0
Hemp.	Edestina	19.2
Maní	Araquina	19.5
Soya	Glicinina	19.5
Arroz	Glutelina	12.7

Pero las principales fuentes aprovechadas hoy en día en escala industrial con gran éxito son el gluten de trigo, el gluten de maíz y el agua residual de Steffens, conocido bajo el nombre de "Steffen's waste water", aunque existen algunos procedimientos que utilizan la soya (45).

El gluten de trigo es la materia de mayor contenido

en ácido glutámico por lo cual debería ser la más aprovechada industrialmente. Pero existe el grave inconveniente económico, que la mayor cantidad de este producto es empleado en otras industrias alimenticias indispensables y que sólo puede disponerse del excedente para las industrias subsidiarias.

Debido a esto se están empleando otros cereales, entre los que se destaca principalmente el maíz. Aunque éste tiene un porcentaje menor en ácido glutámico puede disponerse de él en mayor escala, debido a que su influencia en la alimentación no es tan importante como la del trigo y además se puede obtener como un subproducto de las fábricas de almidón en forma directa.

Estudios realizados sobre el "Steffen's waste water" subproducto obtenido después de someter a las melazas de la remolacha al procedimiento de recuperación de sacarosa, han mostrado que existe en ellos una cantidad suficiente de péptidos que por hidrólisis producen ácido glutámico. La cantidad de este amino-ácido varía entre límites muy amplios, ya que está sujeta al origen de la remolacha y a los procesos anteriores a que fué sometida.

Los procesos tecnológicos empleados con las materias primas anteriormente mencionadas pueden resumirse en el siguiente esquema general, haciendo la salvedad que en cada caso se introducen algunas variaciones particulares:

- 1) La primera operación es la hidrólisis de los compuestos proteicos, o sea la degradación de los mismos hasta la obtención de los aminoácidos. Este proceso puede realizarse empleando ácidos, álcalis o enzimas, como agentes hidrolizantes. El procedimiento más conveniente y más común es el realizado a pH bajo utilizándose en la mayoría de los casos la ebullición con ácido clorhídrico concentrado o al 20 % durante 24 horas, método seguido por Forest Hoglan (46) y por Manning (47) para

el gluten de trigo, y por Meyer (48) para el gluten de maíz, aunque existen diferencias en la presión empleada. También se usa el ácido sulfúrico para efectuar la hidrólisis, que tiene la ventaja de poder ser eliminado totalmente después de la operación por tratamiento con hidróxido de calcio o de bario. Este método se usa según Morris y Blish (49), Hoglan Forest (50) y Manning (47) para el gluten de trigo. La ventaja del empleo del ácido clorhídrico reside en que puede ser separado por destilación y ser recuperado de esta manera en gran parte, siendo la ventaja económica importante porque la cantidad de ácido clorhídrico necesaria es menor que la de ácido sulfúrico para llegar a los mismos resultados. El hidrolizado obtenido contiene huminas en cantidad variable, determinadas por el contenido de glúcidos en la proteína y por la destrucción de cistina y de triptofano.

También se usan los álcalis como agentes hidrolizantes pero no son aplicables a la obtención del ácido glutámico. Esto se debe a que durante el proceso se produce la racemización de los aminoácidos presentes destruyendo de esta manera el ácido l-glutámico, isómero que determina la propiedad sazonzante, ya que la forma dextrógira es inerte.

2) Como paso siguiente se procede a la separación de las huminas y a la decoloración de líquido obtenido. 3) Se concentra luego el hidrolizado, lo cual se realiza por evaporación del ácido. Esta operación puede verificarse de varias maneras diferentes, ya que en algunos casos se procede previamente a una neutralización o alcalinización, según Meyer (48), Chibnall, Rose, Williams y Boyland (51) y Morris y Blish (49) para el gluten de trigo. Este método tiene la finalidad de precipitar conjuntamente otros aminoácidos y sales orgánicas e inorgánicas. Otros autores concentran a pH inicial, como por ejemplo Jacobs (52), para el gluten de trigo, en cambio

Hoglan Forest y Schlaeger (53) en el caso del Steffen's waste water trabajan en medio ácido muy fuerte para eliminar impurezas. Pero todas estas operaciones y sus variaciones particulares convergen en el paso final o sea 4) la precipitación del ácido glutámico a partir de la solución clorhídrica concentrada y llevada al punto isoceléctrico del aminoácido considerado.

Según Chibnall, Rose, Williams y Boyland (51) se puede efectuar un aislamiento previo en forma de clorhidrato del ácido glutámico, método que aumenta ponderablemente la pureza del producto final pero cuyo empleo en la industria no es muy extenso debido a que la precipitación directa del ácido proporciona una sustancia de suficiente pureza comercial.

El procedimiento descrito anteriormente no presenta grandes dificultades en su realización, ya que las diferentes operaciones pueden ser llevadas a cabo sin que sea necesario salvar obstáculos graves como asimismo no se utilizan en ningún momento materias primas y reactivos costosos que influyen económicamente en la producción del ácido glutámico. Pero existe un grave inconveniente en esta industria que se debe al empleo de ácido concentrado en los procesos de hidrólisis y luego en la filtración, decoloración y concentración. Esto dificulta enormemente la construcción del equipo y hace necesario el empleo de materiales costosos para disminuir o evitar la corrosión, principalmente en el caso de bombas y cañerías. Por esto es de gran ventaja el método de neutralización del hidrolizado previo a la concentración. Pero esta solución no es definitiva y aplicable sólo en ciertos casos, debido a que la neutralización aumenta considerablemente el volumen de la solución dificultando la precipitación del ácido, impurificándolo con la gran cantidad de cloruro de sodio formada o bien impone la separación del sulfato de calcio. Es decir que este

método solamente puede ser aplicado a hidrolizados proteicos de una concentración elevada en ácido glutámico.

Existen muy pocos datos analíticos referentes a la composición en aminoácidos de la semilla como de la harina de extracción del girasol, y, al mismo tiempo, son muy escasos los conocimientos sobre el porcentaje del ácido glutámico en las mismas.

Las primeras determinaciones al respecto fueron realizadas por Abderhalden y Reinbold (38) quienes obtuvieron un valor de 13 % con respecto a la proteína aislada con cloruro de sodio al 10 % y empleando el método de la precipitación directa a partir del hidrolizado clorhídrico concentrado. Estas determinaciones fueron repetidas por Osborne y Gilbert (54) con un resultado del 21.79 % no existiendo ningún otro dato bibliográfico complementario hasta la fecha.

P A R T E E X P E R I M E N T A L

EXTRACCION DE PROTEINAS DE HARINA DE GIRASOL.

A) Ensayos de extracción de prolaminas:

Método utilizado: Se suspenden 5 g. de harina de girasol en 500 ml de alcohol etílico al 70 % y se hierve a reflujo durante 2 horas obteniéndose al cabo de este tiempo una solución verdosa. Se filtra dos veces con papel hasta obtener una solución completamente límpida y se concentra a baja presión manteniendo la temperatura alrededor de 40 C. El jarabe obtenido se vierte luego en forma de un chorro fino en un vaso que contiene 100 ml. de agua helada con algunos cristales de cloruro de sodio, produciéndose una leve turbidez y una coloración amarillenta.

Una parte alícuota de dicha suspensión se evapora a baño maría hasta sequedad, obteniéndose como residuo una pequeña cantidad de aceite. Además la turbidez inicial desaparece por calentamiento.

- - -

B) Extracción con cloruro de sodio

1 - Ensayos cualitativos:

Se extraen 5 g. de harina de girasol con 40 ml. de una solución de ClNa al 10 %, agitando la suspensión durante una hora; luego se centrifuga y se filtra el sobrenadante por papel. Se obtiene un líquido límpido de color grisáceo que se reparte en partes alícuotas de 5 ml. en 8 tubos de ensayo. Se realizan los siguientes ensayos:

A).

- a) Con 4 gotas de alcohol al 96 %: precipitado blanco muy abundante.
- b) Con 4 gotas de una solución de sulfato de cobre al 5 %: Precipitado abundante floculoso y de color verde.
- c) Con una solución de cloruro de mercurio al 5%: Precipitado

grisáceo no muy abundante.

- d) Con 3 gotas de ácido tricloroacético: Precipitado muy abundante de color blanco.
- e) Saturando con cloruro de sodio sólido se obtiene un enturbiamiento y una espuma abundante por agitación.
- f) Con 5 gotas de ácido pícrico diluído: Precipitado blanco amarillento.

- - - -

B.)

Se extraen 2 g. de harina de girasol con 30 ml. de una solución de cloruro de sodio al 10 % durante una hora, luego se centrifuga la suspensión, se decanta y se filtra.

- a) A 5 ml. del filtrado anterior se agregan 0.3 ml. de ácido clorhídrico concentrado: Precipitado blanco abundante y floculoso.
- b) Idem con 5 gotas de ácido acético concentrado: precipitado blanco y floculoso.
- c) 5 ml. del filtrado anterior se agregan lentamente $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ sólido y bajo agitación constante hasta saturación. Se obtiene un precipitado floculoso grisáceo.
- d) 5 ml. del filtrado anterior se calientan en un tubo de ensayo directamente a la llama produciéndose coagulación. El precipitado obtenido es de color blanco y no muy abundante, produciéndose únicamente a temperatura de ebullición.

- - - - -

ESTUDIO DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE EXTRACCION CON ClNa

Determinación de los agentes extrayentes:

Se suspenden 1000 g. de harina de girasol en 6 l de una solución de cloruro de sodio al 10 %, se agita la masa durante una hora, manteniendo el pH de la solución igual a 7 por medio del agregado de NaOH al 1%. Se filtra esta suspensión marrón grisácea por un lienzo obteniéndose un líquido muy turbio de color marrón oscuro. Este se filtra nuevamente usándose vacío y papel de filtra, siendo la solución resultante casi completamente límpida. Se obtiene un total de 4 l debido a la cantidad de líquido que embebe el residuo de filtración.

1) Precipitación con ácido clorhídrico:

En un vaso de precipitado se colocan 250 ml de la solución anterior los cuales corresponden a 50 g. de harina. Se agrega lentamente ácido clorhídrico diluído al tercio bajo agitación constante hasta obtener un pH de 4. El precipitado que ya comienza a aparecer al agregar la primera gota de ácido, es muy abundante, de aspecto floculoso y de color blanco. Se deja decantar durante 24 horas, obteniéndose un sobrenadante amarillento y completamente límpido. Se filtra por vacío y con papel y se lava el precipitado tres veces con 50 ml de alcohol al 96 % y tres veces con eter en proporciones de 70 ml. Se obtiene un producto pulverulento y blanco, que se seca en un desecador sobre ácido sulfúrico.

Cantidades obtenidas:

1a. determinación :	7.25 g.:	14.5 %
2a. determinación :	7.22 g.:	14.4 %
3a. determinación :	7.25 g.:	14.5 %

2) Precipitación con ácido acético:

Se procede de la manera anteriormente descripta usando ácido acético diluído al tercio como agente precipitante.

Cantidades obtenidas:

1a. determinación :	6.85 g.:	13.75 %
---------------------	----------	---------

2a.determinación : 6.80 g.: 13.7 %

3a.determinación : 6.80 g.: 13.7 %

3) Precipitación con sulfato de amonio:

En un vaso de precipitados se colocan 200 ml. del extracto de harina con ClNa a pH: 7 y se agregan lentamente y bajo agitación constante $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ sólido hasta saturación de la solución. Se obtiene un precipitado flocculento grisáceo, que se deja decantar durante 24 horas, al cabo de las cuales se filtra por vacío y se lava con alcohol y eter como en los casos anteriores. Se obtiene un producto de color marrón grisáceo y de consistencia muy pegajosa difícil de filtrar. El color se intensifica con los lavados de alcohol y eter.

Cantidades obtenidas: 1a.determinación : 3.10 g.: 6.2 %

2a.determinación : 3.05 g.: 6.0 %

3a.determinación : 3.10 g.: 6.2 %

4) Precipitación por dilución y enfriamiento:

En un vaso de precipitados de 1000ml se colocan 200 ml. de extracto anterior y se agregan 600 ml. de agua destilada calentada previamente a 70 C. Se deja en reposo durante 5 días a 5 C produciéndose en este lapso de tiempo un depósito blanco no muy abundante. Se filtra lavando luego con alcohol y eter.

Acidificando la capa sobrenadante se produce un precipitado flocculoso y abundante, debido a la insuficiente precipitación anterior.

Cantidades obtenidas: 1a.determinación : 1.85 g. : 3.70 %

2a.determinación : 1.80 g. : 3.60 %

3a.determinación : 1.80 g. : 3.60 %

- - -

Determinación de la concentración óptima de la solución de ClNa

1) Extracción con una solución de ClNa al 5 %:

Se extraen 25 g. de harina de girasol con 200 ml.

de una solución de ClNa al 5 % durante una hora y con agitación constante. Se filtra la mezcla agregando luego al filtrado grisáceo ácido clorhídrico diluido al tercio hasta pH: 4. Se obtiene un precipitado abundante, que se deja sedimentar durante 24 horas, se filtra y se lava con alcohol y luego con eter.

Cantidades obtenidas: 1a.determinación : 3.17 g.: 12.7 %
2a.determinación : 3.16 g.: 12.65 %
3a.determinación : 3.16 g.: 12.65 %.

2) Extracción con solución de ClNa al 10 % :

Se procede de la manera anteriormente descripta empleando una solución de ClNa al 10 % como extrayente.

Cantidades obtenidas: 1a.determinación : 3.45 g.: 13.8 %
2a.determinación : 3.45 g.: 13.8 %
3a.determinación : 3.50 g.: 14.0 %.

3) Extracción con solución de ClNa al 20 %:

Se procede de la manera anteriormente descripta empleando una solución de ClNa al 20 % como extrayente.

Cantidades obtenidas: 1a.determinación : 3.45 g.: 13.8 %
2a.determinación : 3.45 g.: 13.8 %
3a.determinación : 3.40 g.: 13.6 %

- - - -

Influencia de la reextracción:

Se extraen 25 g. de harina de girasol con 200 ml. de solución de ClNa al 10 %. El residuo de la filtración es extraído nuevamente con 100 ml. de ClNa al 10 % durante una hora y con agitación constante. Se filtra y se añade el líquido al filtrado anterior, precipitando luego con ácido clorhídrico diluido al tercio.

Cantidades obtenidas: 1a.determinación : 3.85 g.: 15.40 %
2a.determinación : 3.90 g.: 15.60 %
3a.determinación : 3.80 g.: 15.20 %

- - - -

Tiempo de extracción:

a) Se extraen 25 g. de harina con 200 ml. de una solución de ClNa al 10 % durante 24 horas siguiendo la técnica anterior.

Cantidades obtenidas: 1a.determinación : 3.35 g. : 13.40 %
 2a.determinación : 3.50 g. : 13.90 %
 3a.determinación : 3.40 g. : 13.60 %

b) Se procede la manera anteriormente descrita pero reextra[']yendo la harina con 100 ml de la solución de ClNa al 10 % durante una hora, filtrando luego y agregando el líquido al filtrado anterior.

Cantidades obtenidas: 1a.determinación : 3.95 g. : 15.65 %
 2a.determinación : 3.90 g. : 15.60 %
 3a.determinación : 3.80 g. : 15.20 %

- - - -

Cantidad de extrayente:

1) Se extraen 25 g. de harina de girasol con 375 ml de solución de ClNa al 10 % o sea en una relación de 1: 15.

Cantidades obtenidas: 1a.determinación : 5.85 g. : 24.20 %
 2a.determinación : 5.80 g. : 24.00 %
 3a.determinación : 5.80 g. : 24.00 %.

2) Se extraen 25 g. de harina de girasol con 625 ml. de solución de ClNa al 10 % o sea en una relación de 1: 25.

Cantidades obtenidas: 1a.determinación : 7.50 g. : 30.0 %
 2a.determinación : 7.55 g. : 30.2 %
 3a.determinación : 7.50 g. : 30.0 %

- - - -

Obtención de la proteína en las condiciones óptimas establecidas:

En un vaso de precipitados se colocan 25 g. de harina de girasol y se agregan 700 ml. de una solución de ClNa al 10 %. Se agita la suspensión durante una hora, manteniendo el pH durante todo el tiempo igual a 7 por medio del agregado de

gotas de una solución de NaOH al 0.1 %. Después de este lapso de tiempo se filtra por vacío, lavando con 20 ml de ClNa al 10 %, obteniéndose un líquido de color grisáceo verdoso. El residuo se extrae nuevamente con 100 ml de ClNa al 10 % durante una hora, filtrando luego y agregando el líquido al filtrado anterior. Se precipita luego la proteína por medio del agregado de ácido clorhídrico diluido al tercio bajo agitación constante hasta pH:4 medido con papel indicador. Se deja decantar durante 24 horas y se filtra luego por vacío lavando tres veces con 50 ml de alcohol al 96 % y tres veces con la misma cantidad de eter.

El producto obtenido es un polvo blanco y amorfo, el cual presenta aspecto córneo y color marrón grisáceo si no se elimina totalmente el agua por medio de lavajes con alcohol y eter.

<u>Cantidades obtenidas:</u>	1a.determinación:	8.15 g.	: 32.6 %
	2a.determinación:	8.17 g.	: 32.7 %
	3a.determinación:	8.15 g.	: 32.6 %
	4a.determinación:	8.16 g.	: 32.65 %
	5a.determinación:	8.15 g.	: 32.6 %

- - - - -

C.) EXTRACCION CON HIDROXIDO DE SODIO.

L.) ENSAYOS CUALITATIVOS.

Se mezclan 5 g. de harina de girasol con 50 ml de una solución de NaOH al 0.2 %, se agita la mezcla durante una hora, se centrifuga y se filtra el sobrenadante por papel. Se obtiene un líquido de color verde amarillento, colocándose 5 ml. del mismo en cada uno de 8 tubos de ensayo. Se hacen luego los siguientes ensayos:

A.)

a) Con 4 gotas de alcohol al 96 %: precipitado poco abundante.

b) Con 4 gotas de una solución de sulfato de cobre al 5 %:

precipitado abundante de color verde, siendo el color producido por todos los reactivos de color azul.

- c) Con una solución de nitrato de plata al 5 %: precipitado blanco abundante.
- d) Con una solución de cloruro de mercurio al 5 %: precipitado blanco abundante.
- e) Con ácido tricloroacético: precipitado blanco abundante.
- f) Con ácido pícrico: Precipitado abundante de color amarillo.

B)

Se extraen 5 g. de harina de girasol con una solución de NaOH al 0.2 % durante una hora, luego se centrifuga, se decanta y se filtra.

- a) 5 ml. del filtrado anterior se mezclan con 3 gotas de ácido acético concentrado: precipitado blanco verdoso muy abundante.
- b) Idem con ácido clorhídrico diluído al tercio: si se agrega hasta un pH:4 se obtiene un precipitado de color blanco verdoso y un sobrenadante verde grisáceo; a pH menor de 4 el precipitado es de color rosado y el sobrenadante incoloro.
- c) 5 ml del filtrado se mezclan con 3 ml de agua destilada no observándose ni precipitado ni turbidez.
- d) No se produce precipitado por el agregado de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ sólido.
- e) 5 ml. del filtrado anterior se calientan en un tubo de ensayo directamente a la llama no produciéndose coagulación alguna.
- f) 5 ml. del filtrado se mezclan con SO_4H_2 diluído 1:5. Como en el caso del ácido clorhídrico se produce un precipitado blanco verdoso a pH igual a 4 y un precipitado rosado a pH menor de 4.

ESTUDIO DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE EXTRACCION CON NaOH.

Determinación de los agentes precipitantes.

1) Precipitación con ácido clorhídrico.

En un vaso de precipitados se suspenden 25 g. de harina de girasol en 200 ml. de una solución de NaOH al 0.2 %. Se obtiene una mezcla de color amarillo verdoso a pH: 11. Se agita durante una hora al cabo de la cual se filtra por papel y vacío obteniéndose un filtrado de color marrón. Se agrega entonces ácido clorhídrico diluido al tercio gota a gota y agitando continuamente hasta pH: 4. Se obtiene un precipitado floculoso blanco levemente verdoso y un sobrenadante verde después de haber decantado durante 24 horas. Se filtra entonces por vacío y se lava el precipitado tres veces con 50 ml de alcohol al 96 % y tres veces con eter. La proteína aislada presenta un color verde fuerte, que disminuye por aumento de los lavajes con alcohol, hasta obtener un color gris verdoso.

Cantidades obtenidas:

1a.determinación:	3.90 g.	: 15.7 %
2a.determinación:	3.94 g.	: 15.8 %
3a.determinación:	3.90 g.	: 15.7 %.

- - -

2) Precipitación con ácido acético:

Se procede de la manera anteriormente descripta usando ácido acético diluido al tercio como agente precipitante.

Cantidades obtenidas:

1a.determinación:	3.42 g.	: 13.7 %
2a.determinación:	3.45 g.	: 13.85 %
3a.determinación:	3.45 g.	: 13.85 %.

- - -

Determinación de la concentración óptima de la solución de

NaOH:

1) Extracción con solución de NaOH al 0.1 %:

Se extraen 25 g. de harina con 200 ml. de una solución de NaOH al 0.1 %, siendo la suspensión obtenida de color verde claro. Se precipita luego con ácido clorhídrico al tercio como en las determinaciones anteriores. El precipitado es de color blanco y el sobrenadante amarillo, siendo la proteína aislada del mismo aspecto que las anteriores.

Cantidades obtenidas:

1a.determinación :	3.35 g.	: 13.4 %
2a.determinación :	3.40 g.	: 13.6 %
3a.determinación :	3.40 g.	: 13.6 %

- - -

2) Extracción con solución de NaOH al 40 %.

Se extraen 25 g. de harina con 200 ml. de NaOH al 40 %. Se obtiene una suspensión amarilla anaranjada muy viscosa, cuya filtración es sumamente dificultosa. El precipitado producido por el agregado de ácido clorhídrico es blanco mientras que la proteína tiene un tinte levemente verdoso.

Cantidades obtenidas:

1a.determinación :	5.15 g.	: 20.6 %
2a.determinación :	5.16 g.	: 20.7 %

- - -

Extracciones realizadas con soluciones de NaOH al 1 %, 5 %, y 10 % dieron resultados iguales que las determinaciones con 0.2 %.

- - -

Determinación de la influencia de la reextracción:

Se extraen 25 g. de harina con 200 ml de NaOH al 0.2 % como en las determinaciones anteriores. El residuo de la primera filtración se extrae nuevamente con 100 ml de NaOH al 0.2 % durante una hora, se filtra y se juntan ambos líqui-

dos, efectuando luego la precipitación, con ácido clorhídrico.

Cantidades obtenidas:

1a.determinación :	4.32 g.:	17.3 %
2a.determinación :	4.40 g.:	17.4 %
3a.determinación :	4.20 g.:	17.25 %:

Determinación del tiempo de extracción:

Se mezclan 25 g. de harina con 200 ml. de NaOH al 0.2 % y se deja en reposo durante 24 horas. Después de este lapso de tiempo la suspensión presenta comienzos de fermentación, ya que desprende olores pútridos y burbujas al agitar.

- - -

Determinación de la cantidad de extrayente.

1) Se extraen 25 g. de harina con 375 ml. de NaOH al 0.2 % o sea en una relación de 1: 15.

Cantidades obtenidas:

1a.determinación :	7.32 g. :	29.3 %
2a.determinación :	7.40 g. :	29.6 %
3a.determinación :	7.20 g. :	29.1 %

- - -

2) Se extraen 25 g. de harina con 625 ml de NaOH al 0.2 % o sea en una relación de 1: 25.

Cantidades obtenidas:

1a.determinación :	7.35 g. :	29.65 %.
2a.determinación :	7.35 g. :	29.65 %
3a.determinación :	7.40 g. :	29.70 %

- - -

3) Extracciones con mayor cantidad de solvente, o sea en relación 1: 50, 1: 100, no aumentan el rendimiento.

- - -

Determinación del pH de la precipitación:

Se extraen 25 g. de harina como en las determinaciones anteriores. Se precipita la proteína con ácido clorhídrico diluído al tercio a pH : 1 produciéndose un cambio de color

5a. determinación : 7.76 g. : 31.1 %.

- - - - -

D.) EXTRACCION CON AGUA.

1) ENSAYOS CUALITATIVOS.

Se mezclan 5 g. de harina de girasol con 50 ml. de agua destilada, se agita durante una hora, se centrifuga y luego se filtra por papel. Se obtiene un líquido de color grisáceo que se reparte en porciones de 5 ml. entre 8 tubos de ensayo y se hacen los siguientes ensayos:

A.)

- a) Con 4 gotas de alcohol al 96 %: no se observa turbidez ni precipitación en la solución.
- b) Con 4 gotas de una solución de sulfato de cobre al 5 %: precipitado no muy abundante.
- c) Con una solución de nitrato de plata al 5 %: precipitado abundante.
- d) Con una solución de cloruro de mercurio al 5 %: Precipitado abundante de color blanco.
- e) Con ácido tricloroacético: precipitado muy abundante blanco.
- f) Por saturación con cloruro de sodio sólido: no se obtiene precipitado ni enturbiamiento de la solución.
- g) Con algunas gotas de ácido pícrico: precipitado abundante amarillo.

- - -

B.) Se extraen 5 g. de harina de girasol con 50 ml de agua destilada durante una hora, se centrifuga la suspensión, se decanta y se filtra por papel.

- a) 5 ml. del filtrado anterior se mezclan con ácido clorhídrico diluido al tercio. Se produce un precipitado blanco a pH: 4.5 que se disuelve lentamente por ulterior agregado de ácido.
- b) Idem para el agregado de ácido acético.

- c) A 5 ml. del filtrado se agregan lentamente una solución de NaOH al 0.5 %. Se produce primero una turbidez ligera con coloración amarilla de la solución, al aumentar la alcalinidad desaparece dicha turbidez y la solución se torna verde.
- d) No se produce precipitado ni enturbiamiento por el agregado de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ sólido.
- e) 5 ml. del filtrado se calientan en un tubo de ensayo a la llama directamente, produciéndose un enturbiamiento a 60 C, que se intensifica a medida que aumenta la temperatura y se obtienen flóculos blancos a la temperatura de ebullición.

- - -

ESTUDIO DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE EXTRACCION CON AGUA.

Determinación de los agentes precipitantes.

1) Precipitación con ácido clorhídrico.

En un vaso de precipitado se colocan 25 g. de harina de girasol con 200 ml. de agua destilada, evitando así toda influencia de sales disueltas. Se agita la suspensión cuyo pH es igual a 7 durante una hora, obteniéndose un color gris de la misma. Luego se filtra por vacío y se precipita con ácido clorhídrico diluído al tercio a un pH: 4.5. El precipitado obtenido es de color marrón claro y el sobrenadante amarillo. Se deja decantar durante 24 horas, se filtra y se lava tres veces con 50 ml. de alcohol al 96 % y tres veces con eter.

<u>Cantidades obtenidas:</u>	1a.determinación:	1.60 g. : 6.4 %
	2a.determinación:	1.65 g. : 6.5 %
	3a.determinación:	1.65 g. : 6.5 %.

- - -

2) Precipitación con ácido acético:

Se procede de la manera anteriormente descrita usando ácido acético diluído al tercio como agente precipitante.

Cantidades obtenidas: 1a.determinación: 1.55 g. : 6.4 %
2a.determinación: 1.60 g. : 6.6 %
3a.determinación: 1.50 g. : 6.2 %

- - -

3) Precipitación por calentamiento:

Se extraen 25 g. de harina de girasol con 200 ml. de agua destilada durante una hora, se filtra por vacío y se calienta el líquido. A la temperatura de 55 C comienza el enturbiamiento de la misma, que aumenta a medida que se eleva la temperatura hasta obtener a 100 C un precipitado blanco no muy abundante.

Cantidades obtenidas: 1a.determinación: 0.95 g. : 3.85 %
2a.determinación: 0.95 g. : 3.85 %
3a.determinación: 0.90 g. : 3.80 %

- - -

Determinación de la influencia de la reextracción:

Se hace la extracción de la misma manera que en las determinaciones anteriores. Luego se suspende el residuo de la filtración y en 100 ml. de agua destilada y se agita durante una hora. Se filtra y se agrega el líquido al filtrado anterior, precipitando a continuación con ácido clorhídrico.

Cantidades obtenidas : 1a.determinación: 2.20 g. : 8.8 %
2a.determinación: 2.20 g. : 8.80 %
3a.determinación: 2.30 g. : 9.00 %

- - -

Determinación de la cantidad del extrayente.

1) Se extraen 25 g. de harina de girasol con 375 ml. de agua destilada o sea en una relación de 1: 15, precipitando luego con ácido clorhídrico.

Cantidades obtenidas: 1a.determinación: 2.15 g. : 8.6 %
2a.determinación: 2.15 g. : 8.6 %

3a.determinación: 2.20 g. : 8.8 %.

- - -

2) Se extraen 25 g. de harina con 625 ml. de agua destilada o sea en una relación de 1: 25.

Cantidades obtenidas: 1a.determinación: 2.25 g. : 9.0 %

2a.determinación: 2.25 g. : 9.0 %

3a.determinación: 2.25 g. : 9.0 %

- - -

Determinación del tiempo de extracción:

Se mezclan 25 g. de harina con 200 ml. de agua destilada dejando la suspensión en reposo durante 24 horas y siguiendo luego con el método de las determinaciones anteriores.

Cantidades obtenidas: 1a.determinación: 1.65 g. : 6.6 %

2a.determinación: 1.60 g. : 6.4 %

3a.determinación: 1.65 g. : 6.6 %.

- - -

Obtención de la proteína en las condiciones óptimas establecidas:

Se extraen 25 g. de harina de girasol mezclándolas con 600 ml de agua destilada, obteniendo una suspensión a pH 7, que se agita durante una hora. Se filtra luego por vacío obteniéndose un líquido de color grisáceo. El residuo de la filtración se extrae nuevamente con 100 ml de agua destilada durante una hora, filtrando y agregando el líquido al ya existente. Se precipita luego la proteína agregando ácido clorhídrico diluido al tercio hasta pH: 4.5, obteniéndose un precipitado que se deja decantar durante 24 horas. Se filtra entonces y se lava con tres porciones de alcohol al 96 % de 50 ml. y tres veces con igual cantidad de etcr.

La proteína obtenida como producto final es de color netamente blanco.

Cantidades obtenidas: 1a.determinación: 2.49 g. : 9.9 %
 2a.determinación: 2.50 g. : 10 %
 3a.determinación: 2.5 g. : 10 %
 .,determinación: 2.49 g. : 9.9 %
 5a.determinación: 2.50 g. : 10 %.

— — — — —

DETERMINACION DE NITROGENO POR EL METODO DE KJELDAHL.

METODO USADO:

Se mezclan en un balón de Kjeldahl 2 g. de muestra, 0.5 g. de selenio, 0.25 g. de sulfato de cobre y 20 ml. de ácido sulfúrico concentrado, y se calienta hasta la obtención de una solución límpida e incolora. Después de enfriar se diluye con agua hasta 100 ml., utilizando partes alícuotas para las determinaciones posteriores.

Se colocan 25 ml. en un balón de destilación, se alcaliniza con NaOH concentrado y se destila el amoníaco liberado, recogiénolo en 50 ml. de ácido sulfúrico 0.1 N. Se titula el exceso de ácido sulfúrico con una solución de NaOH 0.1 N.

RESULTADOS OBTENIDOS :

Muestra	Cantidad usada	ml NaOH 0.1N f:0.998	%N	%Proteína f: 5.7
Harina de girasol	0.5 g.	25	7.1	39.6
Proteína extraída con ClNa.	0.5 g.	15.6	9.8	57
Proteína extraída con NaOH	0.5 g.	11.8	10.7	61.1
Proteína extraída con agua	0.25 g.	30.0	16.8	95.8

Promedio de nueve determinaciones en cada caso.-

DETERMINACION DEL ACIDO GLUTAMICO

1.) Clorhidrato del ácido glutámico.

En un balón se colocan 5 g. de la sustancia a analizar y se agregan 20 ml. de ácido clorhídrico concentrado, se hierve la mezcla a reflujo durante 6 horas, obteniéndose al cabo de este tiempo un líquido de color negro. Se deja enfriar y se agrega al líquido tibio 2 g. de carbón decolorante, que se deja actuar durante media hora. Luego se filtra por placa filigrante empleando vacío y lavando el residuo con 5 ml de ácido clorhídrico concentrado. El filtrado obtenido de color levemente amarillo se concentra a vacío hasta la mitad de volumen y se mantiene durante doce horas a 0 C. Se separan los cristales obtenidos por filtración a través de papel endurecido, dejándolos luego durante 4 a 5 horas en un desecador con hidróxido de potasio.

Para purificar el producto se lo disuelve en agua caliente en una proporción en peso de 1:1, se decolora con carbón y se agrega ácido clorhídrico concentrado en relación 1:1.3. Después de mantener al líquido durante 12 horas en la heladera, se obtiene un precipitado blanco que se filtra y se lava con algunas gotas de ácido clorhídrico.

2.) Acido glutámico.

Se disuelven los cristales anteriormente obtenidos en agua y se agrega anilina en una proporción (expresada en moles) de 0.2 moles de clorhidrato anterior: 1.1 moles de agua: 0.2 moles de anilina. Se calienta la mezcla durante algunos minutos, se enfría y se agrega alcohol etílico absoluto en la misma cantidad que el agua empleada anteriormente. El ácido glutámico comienza a precipitar casi instantáneamente, dejándose al frío 4 horas para completar la precipitación. Se filtra luego, lavando con algunos ml. de alcohol absoluto y secando en un desecador.

La pureza del ácido glutámico obtenido se verifica por medio de la cromatografía en papel, empleándose en este caso el método ascendente monodimensional. Se usa papel Whatman N 1, como solvente una mezcla de butanol, ácido acético, agua en proporciones de 40:10:50 en volumen y revelando con una solución de ninhidrina al 0.2 % en butanol. Se usó como testigo en estas determinaciones una solución de ácido glutámico puro en ácido clorhídrico diluido.

Rf del ácido glutámico en muestra: 0.19

Rf del ácido glutámico testigo : 0.19.

- - -

RESULTADOS OBTENIDOS:

Muestra	Cantidades usadas	Clorhid.	Ac.Glut.	% Ac.G.
Proteína ext. con ClNa	5 g.	0.550 g.	0.380 g.	7.6
Proteína ext. con NaOH	5 g.	0.585 g.	0.410 g.	8.2
Harina de girasol	5 g.	0.240 g.	0.170 g.	3.4

Como el extracto de ClNa representa el 31 % del total de la harina, su porcentaje en ácido glutámico se transforma en 2.4 % respecto la harina. En el caso del extracto de NaOH el porcentaje es 2.5 % respecto de la harina.

- - -

DETERMINACION DE AMINOACIDOS ESENCIALES POR CROMATOGRAFIA EN PAPEL:

Para determinar los aminoácidos esenciales en la harina de girasol se emplea la cromatografía en papel según el método descendente, aplicándolo a hidrolizados de harina, de proteína extraída con ClNa al 10 % y con NaOH al 0.2 %.

Aparatos y reactivos usados:

Aparato de cromatografía descendente: El aparato

consiste en un cilindro de vidrio de 45 cm de altura y 15 cm de diámetro, cerrado en su parte superior por medio de una placa de vidrio engrasada en sus bordes de contacto. En su interior se coloca una navecilla de metal inoxidable sostenida por dos varillas de metal.

Papel Whatman N 1.

Solvente: Butanol, Acido acético, Agua 40:10:50 (volumen).

Revelador: Solución de ninhidrina al 0.2 % en butanol.

Soluciones standard de aminoácidos esenciales: 1 mg/ml en ácido clorhídrico 0.02 N.

Soluciones a analizar: Se hidrolizan 1 g. de muestra con 20 ml. de ácido clorhídrico 6 N durante 24 horas, se evapora el ácido por destilación a vacío obteniéndose un residuo negruzco, que se deja en el desecador durante 24 horas. Luego se disuelve en 10 ml de agua destilada caliente, se agregan 200 mg. de carbón, se filtra y se evapora nuevamente a vacío hasta sequedad disolviéndose el residuo en 10 ml de alcohol isopropílico al 10 %. La solución obtenida tiene una concentración de 100 mg/ ml. Para las determinaciones cromatográficas se usan en dilución de 1:10.

- - -

Método usado: Se cortan tiras de papel Whatman N 1 de 10 cm. de ancho y 35 cm de largo y se traza una línea a 4 cm del borde más angosto. Sobre la misma y con distancias de 2 cm se aplica la solución a analizar como también las soluciones standard. La cantidad empleada en cada caso es de 10 μ l aplicados con una micropipeta en forma de una mancha de 0.5 cm. de diámetro. Se coloca entonces la tira de papel así preparada en la navecilla y se sujeta por medio de un pedazo de vidrio rectangular, quedando de esta manera uno de los extremos de la tira en el interior de la navecilla mientras que el resto de la misma pende en el interior de la cámara. La nave-

cilla se llena de solvente, colocándose en el fondo de la cámara la fase acuosa del mismo con el fin de saturar la atmósfera. Se cubre la cámara y se deja correr el solvente hasta que su frente haya avanzado 32 cm, para lo cual son necesarios 15 horas. Después de este lapso de tiempo se saca el papel y se seca a la temperatura de 60 C, mediante un ventilador eléctrico. Se procede luego al revelado pulverizando homogéneamente sobre el papel la solución de ninhidrina y secando a 100 C durante una hora. Se obtienen manchas de color púrpura o rojizo, calculándose a partir de las mismas el Rf. correspondiente a cada aminoácido.

- - -

Rf obtenidos:

Aminoácido	Testigo	Harina de girasol	Proteína ext.c/ClNa	Proteína ext.c/NaOH
Lisina	0.056	0.0565	0.056	0.0562
Histidina	0.073	0.073	0.073	0.073
Arginina	0.088	0.089	0.088	0.089
Treonina	0.19	0.19	0.19	0.19
Triptofano	0.48	0.478	0.48	0.481
Tirosina	0.45	0.45	0.45	0.45
Valina	0.42	0.42	0.42	0.42
Metionina	0.51	0.51	0.51	0.51
Fenilalanina	0.60	0.60	0.60	0.60
Isoleucina	0.63	0.63	0.63	0.63
Leucina	0.64	0.64	0.64	0.64

Cromatografía circular:

Como dato adicional se determinaron los aminoácidos esenciales por medio de la cromatografía circular.

Aparatos y reactivos usados: Aparato de cromatografía circular:

consiste en un desecador común con reborde interior.

Papel Whatman N 1.

Solvente: Butanol, Acido acético, agua 40:10:50 (volumen).

Revelador: Solución de ninhidrina al 0.2 % en butanol.

Soluciones de hidrolizado a analizar de harina de girasol, de proteína extraída con ClNa al 10 % y con NaOH al 0.2 %, preparadas como para la cromatografía descendente monodimensional.

- - -

Método empleado: El papel circular se prepara aplicando en el centro del mismo 10 μ l de la solución a analizar por medio de una micropipeta. Se corta luego una tira de papel en forma radial de 0.4 cm. de ancho y 5 cm. de largo, la cual se dobla perpendicularmente al papel. En el interior del desecador se coloca un recipiente conteniendo la fase acuosa del solvente y una caja Petri que contiene este último. Se apoya entonces el papel preparado sobre el borde interior del desecador de tal forma que la tira recortada esté sumergida 2 cm en el solvente permitiendo de esta manera el ascenso del mismo y su expansión radial por el papel. Después de 15 horas el frente del solvente ha recorrido 9 cm, se da por finalizada entonces la operación, se seca el cromatograma a 60 C durante media hora con un ventilador eléctrico, se revela pulverizando con una solución de ninhidrina y se seca nuevamente a 100 C durante una hora. Se obtiene una serie de bandas concéntricas cuya posición determina el Rf característico de cada aminoácido.

Resultados obtenidos:

Aminoácidos	Testigo	Experimental
Lisina	0.22	0.223
Histidina	0.23	0.23

Arginina	0.25	0.25
Treonina	0.36	0.36
Triptofano	0.47	0.469
Tirosina	0.45	0.45
Valina	0.62	0.62
Metionina	0.55	0.55
Fenilalanina	0.66	0.66
Isolucina	0.74	0.736
Leucina	0.74	0.736

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Métodos de extracción:

Para la elección de los métodos de extracción de las proteínas de la harina de girasol nos hemos basado en un principio en la clasificación de Osborne, la cual agrupa a las proteínas según sus diferentes solubilidades en medios específicos para cada caso, refiriéndose únicamente a prótidos aislados previamente. Para el presente trabajo son de especial importancia las albúminas, las globulinas y las glutelinas, debiéndose tener en cuenta que las primeras de ellas no son solamente solubles en agua sino que también en soluciones salinas y álcalis diluídos. Esto trae como consecuencia la dificultad de obtener proteínas puras por extracción con cloruro de sodio e hidróxido de sodio. Además es necesario destacar que durante el proceso de extracción las globulinas y las glutelinas puede producirse una transformación de unas en otras, disminuyendo en cierto grado la limitación estricta impuesta por los agentes extrayentes.

La separación de los prótidos de sus soluciones se realiza por fenómenos de precipitación, los cuales no presentan los mismos caracteres específicos que los de solubilización. Uno de los métodos más generales y más usados en las obtenciones industriales es la precipitación por acidificación, según la cual se lleva la solución proteica a su punto isoeléctrico correspondiente a la mínima solubilidad de la proteína. Como es fácil deducir la aplicación de este método lleva a la obtención de rendimientos máximos ya que no produce un fraccionamiento de las mezclas proteicas en solución. Pero cabe señalar que existe un precipitante específico para las globulinas ya que pueden separarse en forma casi pura por extracción con ClNa y precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

Aplicando estas deducciones a los resultados obteni-

dos en el presente trabajo podemos concluir que las fracciones proteicas aisladas por extracción con soluciones de ClNa y NaOH y con agua y subsiguiente precipitación por acidificación no pueden considerarse como puras sino como mezclas de prótidos.

Existe además una considerable diferencia entre el porcentaje en proteínas existentes en la harina de girasol deducida a partir de las determinaciones de nitrógeno y la cantidad aislada de la misma. Este fenómeno se debe a la desnaturalización sufrida por las proteínas producida en parte por los procesos de extracción de aceite a las que fué sometida la semilla, como asimismo, aunque en menor proporción, a la acción de los agentes extrayentes.

En el siguiente trabajo hemos empleado técnicas utilizadas previamente en el aislamiento de prótidos de semillas oleaginosas, es decir, que no fueron empleados métodos específicos para la sustancia en estudio. Se tomaron como punto de partida los trabajos de Abderhalden et al. y Osborne et al. (55), los cuales, aunque realizados a comienzos de este siglo son la verdadera base de toda investigación en este campo y han determinado las técnicas fundamentales en el estudio de los prótidos.

En el caso de las prolaminas se adoptó la técnica de Hoffmann (56), para el arroz, semejante a la empleada por Jones y Horn (24) para el maní y Csonks (20) para la avena, pudiéndose observar de esta forma la ausencia de este grupo de proteínas en la harina de girasol.

La presencia de globulinas fué determinada por ensayos cualitativos de extracción con cloruro de sodio al 10 %, reactivo clásico de este grupo de prótidos, aunque fueron estudiadas otras concentraciones del mismo como dato comparativo. Para la precipitación de las globulinas fueron ensayados

diferentes métodos existentes en la bibliografía, como la precipitación por dilución y enfriamiento según Svedberg y Stamm (57) para la edestina, método que no tuvo resultados satisfactorios. Igualmente fué intentado el empleo de sulfato de amonió sólido a diferentes saturaciones, citado por Jones y Csonks (22), Danielson (25), Jones y Gersdorff (59), Johnson y Shooter (26) y Johns y Gersdorff (58) pero la proteína obtenida no presenta propiedades y rendimiento comparable. El mejor método encontrado es la precipitación por agregado de ácido, determinando experimentalmente que el empleo de ácido clorhídrico, recomendado por Macheboef y Teyeau (34), Vassel y Nessbitt (27) y Johnson y Shooter (26) es superior al de ácido acético, debido a los mejores rendimientos obtenidos.

Las glutelinas de la harina de girasol fueron disueltas en una solución de hidróxido de sodio al 0.2 %, concentración óptima entre varias ensayadas, y empleada igualmente por Friedmann (230) para el algodón y la soya. Concentraciones más elevadas son poco convenientes debido a que las soluciones espesas producidas dificultan las operaciones posteriores y la gran cantidad de $ClNa$ producida durante la precipitación con ácido clorhídrico impurifica el producto final. Igual que en el caso de las globulinas y por iguales razones se prefirió la precipitación con ácido clorhídrico, recomendada por Smith, Johnson y Beckel (29), Fountain y Burnett (31) y Irving, Fontain y Markley (60).

Jones, Gersdorff, Johns y Fink (61) para el caso de limabean como asimismo Cross y Swann (21) en el caso de trigo, separan las albúminas por extracción con agua destilada y precipitando con acidificación y coagulación el primero y por acidificación el segundo. Por experiencias realizadas hemos adoptado el último de ellos, debido a las can-

tidades obtenidas y siendo además el método más fácilmente controlable.

- - - - -

Obtención del ácido glutámico:

Se determinó el contenido en ácido glutámico en la harina de girasol como asimismo en las proteínas aisladas por extracción con ClNa al 10 %, con NaOH al 0.2 % y agua destilada, empleando el método descrito por Harold King según "Síntesis Orgánicas". Las ventajas de este método residen en la simplicidad de sus operaciones, ya que se obtiene el ácido glutámico directamente por precipitación del clorhidrato a partir del hidrolizado proteico sin necesidad de un aislamiento previo en forma de sales de calcio, según Chibnall, Rose, Williams y Boyland (51) o como sales de bario descrito por Winton y Winton.

La obtención del ácido glutámico en forma de dos etapas o sea precipitación como clorhidrato y luego transformación en ácido libre por neutralización de su solución acuosa hasta el pH de su punto isoeléctrico es más conveniente en el presente caso que la precipitación directa a partir del hidrolizado llevado a pH 3.2, ya que para esto es necesario una intensificación de la concentración que produce un aumento de la coprecipitación de ClNa .

- - - - -

Método de análisis de los aminoácidos:

Para determinar cualitativa y cuantitativamente los aminoácidos existentes en los hidrolizados proteicos fué necesario vencer innumerables dificultades debido principalmente a la semejanza de las propiedades de dichos compuestos.

Los primeros trabajos realizados a comienzos de este siglo tuvieron como resultado la separación de la cistina y tirosina, aunque en forma incompleta, por medio de

la cristalización fraccionada. Emil Fischer (62) en 1901 aplicó por primera vez la técnica general de llevar a cabo la separación de una mezcla de aminoácidos en diferentes subgrupos y proceder luego al estudio de cada uno de ellos. El método propio consiste en la transformación de los aminoácidos en los clorhidratos de los ésteres etílicos por medio de alcohol absoluto y ácido clorhídrico gaseoso. Los compuestos formados son liberados del ácido libre, extraídos con éter y destilados a vacío, ya que los ácidos aminos libres no son suficientemente volátiles para ser destilados. Se obtienen diferentes fracciones según la temperatura y la presión a la cual se lleva a cabo la operación, incluyendo cada una de ellas varios ésteres que luego deben ser separados, utilizando diversos métodos de aislamiento. Los inconvenientes de este método residen en el bajo poder de separación de la destilación a vacío, y, debido a esto, a la laboriosidad de sus técnicas.

Iguals fines tuvo el trabajo de Dakin (63), el cual empleó alcohol butílico para extraer los aminoácidos de sus soluciones acuosas separando el grupo de los ácidos monoamino-monocarboxílicos más solubles en el alcohol que en el agua.

Van Slyke perfeccionó un método (64) según el cual se determina la distribución del nitrógeno en los hidrolizados proteicos. Se obtienen ocho fracciones y datos, los que incluyen: el nitrógeno amídico, el de las huminas, de la arginina, de la cistina, de la histidina, de la lisina, nitrógeno amínico y nitrógeno no amínico. Este método tiene la ventaja de no estar supeditado a las pérdidas producidas por el aislamiento individual de los aminoácidos ya que fracciona solamente el nitrógeno total. Los resultados obtenidos en muchos casos son demasiado elevados debido al hecho de que

no se estima el nitrógeno contenido en sustancias desconocidas, distribuyendo los valores obtenidos entre las conocidas.

Entre otros métodos que utilizan la separación de los aminoácidos en subgrupos deben ser nombrados: la absorción selectiva de los aromáticos sobre carbón según Tiselius (65), separación de los básicos por intercambio iónico por Turba (66) y resinas sintéticas por Block (67) y Wieland (68), también utilizadas para dicarboxílicos por Freudenberg (69) y Cannon (70).

Existen un gran número de reacciones específicas para cada uno de los aminoácidos, ya sea reacciones de precipitación o de coloración. Los métodos gravimétricos usados para separación de aminoácidos comprenden entre otros la precipitación de la histidina con ácido 3-4 diclorobencensulfónico según Vickery (71), de arginina con ácido flaviánico, Kossel y Gross (72), triptofano con sulfato de mercurio determinado Cox y King (73), glicina como éster etílico, clorhidrato, realizado por Fischer (74), de prolina como rodanilato por Bergmann (75), y del ácido aspártico como complejo de cobre según la técnica de Town (76).

Las determinaciones colorimétricas de los aminoácidos han aumentado enormemente en importancia en los últimos tiempos habiendo sido recopilados por Block (77), debido que para ellos es necesario menor cantidad de sustancia que en el caso de las determinaciones gravimétricas. El grave inconveniente de estas reacciones está en la interferencia a las que están expuestas, principalmente si se tiene en cuenta que las determinaciones se realizan siempre sobre mezclas complejas.

Una contribución muy importante a esta clase de análisis son los métodos microbiológicos, los cuales utilizan microorganismos no capacitados para sintetizar el aminoácido

en estudio. Las técnicas se basan en la relación entre la velocidad de crecimiento de los diferentes microorganismos, como por ejemplo el *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus arabinosus*, etc., y la concentración de los aminoácidos a determinar que se agregan en diferentes concentraciones a los medios de cultivo exentos de ellos.

El uso de isótopos en las determinaciones de aminoácidos ha abierto grandes posibilidades para su análisis. En este método introducido por Rittenberg y Foster se agrega a una mezcla de aminoácidos una cantidad conocida de aminoácido a analizar, la cual contiene N^{15} o C^{14} . Aislado luego una muestra del mismo y determinando en la misma el contenido de isótopos, se puede deducir la concentración total de la sustancia en estudio.

Los métodos modernos más empleados en el análisis de los aminoácidos son los cromatográficos, que permiten la separación de las mezclas en grupos o componentes individuales, que luego son analizados por uno de los métodos descritos anteriormente. La cromatografía se realiza generalmente sobre carbón, óxido de aluminio, sílicagel, según Martin y Synge (78) y almidón, cuya técnica fué detallada por Moore y Stein (79).

Consden, Martin y Gordon (80) fueron los primeros en aplicar los resultados obtenidos en las determinaciones anteriores a la cromatografía en papel, método que ha sufrido desde entonces innumerables variaciones y mejoras en su técnica. La cromatografía puede ser ascendente o descendente y a su vez realizarse en forma mono o bidimensional. La técnica ascendente, cuya ventaja es principalmente la simplicidad del aparato usado, es recomendada por Williams y Kirby (81), Rockland y Dunn (82), y Kowkabany y Cassidy (83) para determinaciones en escala chica, y Reindel y Hoppe (84), Bode,

Huebner, Brueckner y Holver (85) para el caso de cromatografía monodimensional. La cromatografía bidimensional ascendente es usada en caso de separaciones nítidas de mezclas complejas como por ejemplo las determinaciones de Wolfson (86), Ma (87) y Datta (88). Los datos de Rf obtenidos por el método descendente son más fácilmente reproducibles, debido a la poca influencia de la calidad del papel usado, lo cual da a este método un alcance cualitativo mucho más extenso que el del ascendente. Fué aplicado por Mac Farren y Mills (89), Mac Farren (90) y Bull, Hahn y Baptiste (91) debiendo destacarse los resultados obtenidos por Dent (92) al estudiar el comportamiento de 60 aminoácidos con el empleo de esta técnica.

Los solventes usados en los métodos cromatográficos son principalmente los no miscibles en agua, entre los cuales se destacan el fenol, recomendado por Block (93), Walker (94) y principalmente en el caso de cromatografía bidimensional conjuntamente con colidina. Este sistema ha dado resultados satisfactorios recopilados por Kowkabany y Cassidy (83), Dent (95), Dent, Stopka y Stewart (96). Otros solventes muy usados son el sistema fenol-lutidina, según Fowden (97), Boissonas (98) y Block (99) para determinaciones bidimensionales y la mezcla butanol:ácido acético:agua según Schwertfeger (100), Levy y Chung (101) y que tiene su principal aplicación en las determinaciones monodimensionales descendentes.

En el presente trabajo hemos adoptado el método descendente debido que los datos de Rf son más constantes y de mejor valor comparativo que los que se obtienen en determinaciones con el método ascendente. El papel de filtro elegido fué el Whatman N 1, que es el más usado para el análisis de los aminoácidos con solventes no miscibles en agua y que

además tiene una velocidad de corrimiento adecuada para el sistema en cuestión.

De los numerosos solventes aplicables a estas determinaciones fué empleada la mezcla butanol, ácido acético, agua en proporción en volumen 40:10:50, ya que reúne una gran cantidad de ventajas con respecto al fenol y a la colidina. Con este solvente hemos visualizado manchas bien delimitadas, reveladas con ninhidrina preparada según Consden (102), que permiten el estudio de cantidades muy pequeñas de aminoácidos; además no produce manchas propias y no tiene una persistencia tan prolongada en el papel como en el caso del fenol. Una de las propiedades más importantes de esta mezcla es su fácil reproducibilidad relacionada con la acción reguladora del ácido acético y su relativa insensibilidad a las variaciones de temperatura.

Como dato complementario se han realizado algunos análisis de los hidrolizados proteicos por medio de la cromatografía circular. Este método fué introducido por Rutter (103) y fué perfeccionado por Giri et al. (104 - 105 y 106). Un estudio detallado de los diferentes factores influyentes sobre estas determinaciones con la presente técnica y los Rf obtenidos por la misma fueron realizados por Saifer y Oreskes (107 y 108). Ambos autores han desarrollado una técnica, la cual aplicada por nosotros al análisis de proteínas de la harina de girasol, ha dado valores de Rf completamente concordantes con sus publicaciones.

- - - 0 - - -

RESULTADOS OBTENIDOS Y CONCLUSIONES:

- 1) Se determinó el contenido de nitrógeno de harina de girasol por medio del método de Kjeldahl, obteniéndose el valor de 7.1 % que corresponde a 39.6 % de proteínas (factor: 5.7).
- 2) Se aislaron los prótidos de la harina de girasol por extracción con solución de cloruro de sodio al 10 %, de hidróxido de sodio al 0.2 % y de agua destilada, y precipitación con ácido clorhídrico a pH: 4.

Fueron obtenidos los siguientes valores promedio:

ClNa al 10 % :	33 %
NaOH 0.2 %	31 %
H ₂ O	10 %

Estas fracciones no corresponden a proteínas puras ya que están constituidas por mezclas de albúminas, globulinas y glutelinas.

- 3) El contenido en nitrógeno de cada una de estas fracciones proteicas fué determinado por el método de Kjeldahl con los siguientes resultados:

Extracto ClNa : 9.8 % :	57 % de proteína.
Extracto NaOH : 10.7% :	61 % de proteína.
Extracto H ₂ O : 16.8% :	96 % de proteína.

Los valores bajos en nitrógeno de las dos primeras fracciones se deben a la cantidad de impurezas, principalmente cloruro de sodio, arrastradas por el precipitado.

- 4) Se aisló el ácido glutámico a partir de la harina de girasol y de dos fracciones proteicas según el método de "Síntesis Orgánicas" obteniéndose:

3.4 % a partir de la harina directamente
7.6 % a partir de proteína extraída con ClNa, equivalente a 2.5 % sobre harina
8.2 % a partir de proteína extraída con NaOH, equivalente a 2.5 % sobre harina.

5) Se estudió la composición en aminoácidos esenciales de la harina de girasol como asimismo los extractos de cloruro de sodio y de hidróxido de sodio, usándose cromatografía en papel monodimensional y descendente y además cromatografía circular.

Fueron determinados los siguientes aminoácidos:

Lisina	Tirosina
Histidina	Valina
Arginina	Metionina
Triptofano	Fenilalanina
Treonina	Isoleucina
Leucina	

predominando entre ellos:

Arginina
Leucina
Fenilalanina
Valina
Isoleucina

y existiendo muy pequeñas cantidades de Lisina.-

- - - 0 - - -

RESUMEN DE CONCLUSIONES:

A) La harina de extracción de girasol, materia prima abundante, puede considerarse como una fuente interesante de prótidos:

33 % extraíbles con soluciones salinas: 19 % de proteína pura.

31 % extraíbles con soluciones alcalinas : 19 % proteína pura.

B) Los prótidos de la harina de extracción del girasol contienen los siguientes aminoácidos esenciales:

Lisina	Tirosina
Arginina	Isoleucina
Histidina	Fenilalanina
Valina	Treonina
Leucina	Metionina.
Triptofano	

C) La cantidad de ácido glutámico obtenida en los prótidos de la harina de extracción del girasol es de 2.5 %, sobre harina.

- - - O - - -

BIBLIOGRAFIA

- (1) Rose, W. - *Physiol.Rev.* 18, 109 (1938).
- (2) Rose, W. - *J.BiolChem.* 146, 683 (1942).
- (3) Cairncross, S.E. - *C.A.* 7887i (1948).
- (4) Galvin, S.L. - *C.A.* 8371c (1948).
- (5) Crocker, E.C. - *C.A.* 7879f (1948).
- (6) Sabine, B.D. - *C.A.* 8561b (1952).
- (7) Ferguson, E.A. - *C.A.* 6096d (1953).
- (8) Manzier, F. - *Wien.Arch.inn.Med.* 28, 439 (1936).
- (9) Weil-Malherbe, H. - *Physiol.Rev.* 30, 549 (1950).
- (10) Maelsch, H. - *Adv.in Protein Chemistry* 6, 299 (1951)
- (11) Munkoad, I - *Acta Psychiat.et Neurol.* 25, 269 (1950).
- (12) Albert, K., Hoch, P.W.H - *J.Nervous Mental Disease* 114, 471 (1951).
- (13) Albert, K.Hoch, P.W.H. - *J.Nervous Mental Disease* 56, 489 (1946).
- (14) Zimmermann, F.T., Bucrgemeister, B.B., Putnam T.J. - *Arch. Neurol. Psychiat.* 61, 275 (1945).
- (15) Osborne, T.B. - *Amer.Chem.J.* 14, 629 (1892).
- (16) Osborne, T.B. - *Amer.Chem.J.* 20, 477 (1907).
- (17) Osborne, T.B. - *Amer. J.Physiol.* 17, 231 (1906).
- (18) Osborne, T.B. - *Amer.J.Physiol.* 14, 662 (1892).
- (19) Larmour, R.K., Sallans, H.R. - *Can.J.Research* 6, 38 (1932).
- (20) Csonka, F.A. - *J.of Biol.Chem.* 75, 189 (1927)
- (21) Cross, D.M., Swann, M.L. - *Ind.Eng.Chem* 16, 49 (1924).
- (22) Jones, D.B., Csonka, F.A. - *J.of Biol.Chem.* 51, 17 (1925).
- (23) Friedmann, J. - *J.of Biol.Chem.* 64, 673 (1922).
- (24) Jones, D.B., Horne M.J. - *J.of Agric.Research* 40, 672 (1932).
- (25) Danielson, G. - *Acta Chem.Scand.* 4, 762 (1950).
- (26) Johnson, S., Shooter, F.J. - *Biochem.a.Biophys.Acta* 5, 361 (1950).
- (27) Vassel, Nesbitt - *J.of Biol.Chem.* 159, 571 (1945).

- (28) Page, Painter y Nesbitt - Ind. Eng. Chem. 38, 95 (1946)
- (29) Smith, A.K., Johnson, S., Beckel, A.C. - Ind. Eng. Chem. 38, 353 (1946)
- (30) Prominski, Laborde, Corni y Mix - J. Amer. Oil Chem. Soc. 28, 508 (1951)
- (31) Burnett, R.S., Fountain, T.D. - Ind. Eng. Chem. 36, 284 (1944)
- (32) Arthur, L. - J. Amer. Oil Chem. Soc. 26, 568 (1949)
- (33) Arthur, L. Mason, H.L., y Mabell, A.L. - J. of Amer. Oil Chem. Soc. 27, 338 (1948)
- (34) Macheboef, A.E., Circle, S.J. - Ind. Eng. Chem. 30, 1414 (1938)
- (35) Smith, A.K., Taveau, M - Corps gras. savons 1, 132 (1948)
- (36) Smith, A.E., Circle, S.J., Brother, G.H. - J. Am. Chem. Soc. 60 1316 (1938)
- (37) Smith, A.K., Belter, P.A., Beckel, A.C. - Ind. Eng. Chem. 36, 799 (1944)
- (38) Abderhalden, E. - Zeitschrift fuer Physiol. Chemie 44, 284 (1905)
- (39) Osborne, T.B., Harris - J. of Am. Chem. Soc. 25, 32 (1903)
- (40) Wehring, K. - Fette und Seifen 51, 385 (1944)
- (41) Clagett, W., Hoffmann, G. - C.A. 1(24 (1953)
- (42) Smith, A.L., Hohnson, C. - Cereal Chem. 25, 399 (1948)
- (43) Hall, A.L. - C.A. 84201 (1948)
- (44) Jacobs, Morris B. - Am. Perfumer Essent. Oil Review 51, 444 (1948)
- (45) Jusuke Sminiki - C.A. 4851b (1951)
- (46) Forest, A, Hoglan - C.A. 3947a (1949) - Patente nortamericana
- (47) Manning, A.D.V. - C.A. 6461c (1950) - Patente nortamericana -
- (48) Meyer, W.G. - Food Industries 21, 596 (1949)
- (49) Morris y Blish - C.A. 6100E (1953) - Patente nortamericana
- (50) Hoglan, Forest A. - P.Us 2533114 Dec. 5, 1950
- (51) Chibnall, Rose, Williams y Boyland - "The Determ. of Amino-acids" by R.J. Block and B. Bolling
- (52) Jacobs, Morris B. - Am. Perf. Essent., Oil Review 51, 545 (1948)

- (53) Hoglan, Forest y Schlaeger, A. - P. Brit. 648784 Jan, 10 (1951)
- (54) Osborne, T.B. y Glibert R.D. - Am. J. of Physiol 15, 333 (1906)
- (55) Osborne, T.B. - "The Vegetable Proteins" 2nd edition Longmans Green - 1924
- (56) Hoffmann, F. - J. of Biol. Chem. 66, 501 (1925)
- (57) Svedberg y Stamm - J. Am. Chem. Soc. 51, 2170 (1929)
- (58) Jones, D.B. y Gersdorff, C.E.F. - J. of Biol. Chem. 75, 213 (1927)
- (59) Johns, F., Gersdorff, C.E.F. - J. of Biol. Chem. 51, 439 (1922)
- (60) Fountain, T.D., Irving, G., Markley, K.S. - Ind. Eng. Chem. 38, 658 (1946)
- (61) Jones, D.B., Gersdorff, C.E.F., Johns, F., Fink, M. - J. of Biol. Chem. 53, 231 (1922)
- (62) Fischer, E. - Ber. Deutsch. Chem. Ges. 34, 433 (1901)
- (63) Dakin, H.D. - J. of Biol. Chem. 14, 321 (1913)
- (64) Van Slyke, D.D. - J. of Biol. Chem. 7, 34 (1910)
- (65) Tiselius, - Ark. Kem. Mineral. Geol. 15B, 1 (1914)
- (66) Turba, - Ber. Deutsch. Chem. Ges. 74, 1829 (1941)
- (67) Block, R.J. - Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 51, 252 (1942)
- (68) Wieland, Th - Ber. deutsch. Chem Ges. 77, 539 (1944)
- (69) Camann. Naturwiss 30, 87 (1942)
- (70) Freudenberg, - J. of Biol. Chem. 152, 401 (1942)
- (71) Vickery, H.B. - J. of Biol. Chem. 143, 77 (1942)
- (72) Kossel, y Gross - Hoppe Seylers Z. physiol. Chem. 135, 167 (1924)
- (73) Cox y King - Org. Syntheses 10, 100 (1930)
- (74) Fischer, E. - Zeitschrift Physiol. Chem 35, 229 (1902)
- (75) Bergmann, M. - J. of Biol. Chem. 110, 471 (1935)
- (76) Town, B.WW - Biochem. J. 35, 417 (1931)
- (77) Block, R.J. y Bolling D. - The Aminoacid Composition of Proteins and Foods - Springfield, Ill, 1951

- (78) Martin, A.P.J. y Syngo, R.L.M. Biochem. J. 35, 1359 (1941)
- (79) Moore, S. y Stein, W.H. - J. Biol. Chem. 176, 367 (1948)
- (80) Conden, R. Gárdon, A.H. Martin, A.J.P. - Biochem. J. 38, 224 (1944)
- (81) Williams, R.J., y Kirby, H. - Nature 107, 481 (1948)
- (82) Rockland, L.B. y Dunn, M.B. - J. Am. Chem. Soc. 71, 4121 (1949)
- (83) Kowkabany, G.N. y Cassidy, H.G. - Anal. Chem. 22, 847 (1950)
- (84) Reindel, y Hoppe - Naturwiss. 8, 245 (1953)
- (85) Bode, Huebner, Brueckner, Holver - Naturwiss. 22, 524 (1952)
- (86) Wolfson, W.Q. - Science 109, 541 (1949)
- (87) Ma, R.M. - Science 110, 232 (1949)
- (88) Datta, S.P. - Science 112, 621 (1950)
- (89) Mac Farren, E.F. - Anal. Chem. 23, 168 (1951)
- (90) Mac Farren, E.F. - y Mills, A.J. - Anal. Chem. 24, 650 (1952)
- (91) Bull, Hahn, y Baptiste - J. Am. Chem. Soc. 71, 550 (1949)
- (92) Dent, C.E. - Biochem. J. 43, 168 (1948)
- (93) Block, R.J. - Science 108, 606 (1948)
- (94) Walker, T.K. - Biochem. J. 41, 240 (1942)
- (95) Dent, Stepka, Steward - Nature 160, 682 (1947)
- (96) Fowden, L. - Biochem. J. 48, 327 (1951)
- (97) Boissonas, R.A. - Helv. Chem. Acta 33, 1966 (1950)
- (98) Block, R.J. Anal. Chem. 22, 1327 (1950)
- (99) Schwertfeger - Naturwiss. 6, 201 (1953)
- (100) Levy y Chung - Anal. Chem. 25, 396 (1953)
- (101) Conden, R. - Biochem. J. 38, 224 (1944)
- (102) Rutter, L. - Nature 161, 435 (1948)
- (103) Giri, y Roa - Nature 169, 923 (1952)
- (104) Giri y Nigam - Naturwiss. 12, 343 (1953)
- (105) Giri y Radhakristian y Vaidynathan - Anal. Chem. 10, 1677 (1952)
- (106) Saifer A. y Oreskes, I. - Anal. Chem. 25, 1539 (1953)
- (107) Saifer A. y Oreskes, I. - Anal. Chem. 27, 854 (1955)