

## Tesis de Posgrado

# Obtención de proteínas blancas de girasol : Suplementación por coprecipitación con proteínas de harina de soja y de leche descremada

Belart, Selma Mora

1980

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Belart, Selma Mora. (1980). Obtención de proteínas blancas de girasol : Suplementación por coprecipitación con proteínas de harina de soja y de leche descremada. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1644\\_Belart.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1644_Belart.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Belart, Selma Mora. "Obtención de proteínas blancas de girasol : Suplementación por coprecipitación con proteínas de harina de soja y de leche descremada". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1644\\_Belart.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1644_Belart.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

«OBTENCION DE PROTEINAS BLANCAS DE GIRASOL  
SUPLEMENTACION POR COPRECIPITACION CON  
PROTEINAS DE HARINA DE SOJA Y DE LECHE  
DESCREMADA»

SELMA MORA BELART

1980

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"OBTENCION DE PROTEINAS BLANCAS DE GIRASOL. SUPLEMENTACION  
POR COPRECIPITACION CON PROTEINAS DE HARINA DE SOJA Y DE  
LECHE DESCREMADA"

SELMA MORA BELART

Tesis presentada para optar al título  
de Doctora en Ciencias Químicas

1980

1644

Agradezco a la Dra. María Helena Bertoni,  
Directora de Tesis, sus enseñanzas y el  
estímulo y colaboración brindados que hi-  
cieron posible la realización de este tra-  
bajo.

Agradezco al Dr. Pedro Cattáneo, Consejero de estudios, por su acertada orientación y por el permanente interés demostrado en este estudio.

Agradezco también:

- A la firma "Molinos Río de la Plata" por haber proporcionado la semilla de girasol, el "lex", la pepa industrial y la harina de soja, todas ellas materias primas fundamentales para la realización de este estudio.
- A la empresa "Kasdorf" S.A. por la provisión de las partidas de leche descremada utilizadas en este trabajo.
- A mis compañeros y demás personal de la Cátedra de Bromatología por su sincera y cordial amistad.

A mi esposo

A mis padres

PARTE I  
INTRODUCCION

- 1) Proteínas de semilla de girasol y de soja. Características.  
Calidad de las proteínas.
- 2) Compuestos polifenólicos que ocurren en la semilla de girasol.  
Factores antinutricionales y no digeribles de la soja.
- 3) Aislamiento de proteínas blancas a partir de harina de girasol.  
Antecedentes.
- 4) Consideraciones en la complementación del patrón de aminoácidos  
esenciales de la proteína de girasol con proteína de soja y  
con proteína de leche descremada.



## 1) Proteínas de semilla de girasol y de soja. Características.

### Calidad de las proteínas

Uno de los problemas más importantes de la alimentación del hombre es el de asegurar adecuadamente las necesidades de energía y proteínas. Un alto porcentaje de la población mundial está subalimentado, de ahí que la mayoría de los países realicen esfuerzos en vistas a reducir ese déficit.

Como una alternativa se ha centrado la mayor atención en las cosechas de oleaginosas y de algunas leguminosas y una parte significativa de esa atención se ha encausado hacia la concentración y aislamiento de sus proteínas.

Como resultado de una labor intensiva durante esta última década, los concentrados y "aislados" proteicos de soja, son actualmente productos comercializables que, de acuerdo a los adelantos tecnológicos, están ganando aceptación como ingredientes para alimentos en razón de sus propiedades funcionales y nutricionales.

De todas las semillas de oleaginosas, la de girasol, utilizada casi exclusivamente por su aceite (1) presenta un interés particular hacia la obtención de concentrados y "aislados" proteínicos con destino a la alimentación humana. Aunque la producción total de proteína es relativamente pequeña, menos del 10% del "achene" (semilla del comercio), la harina libre de aceite llega a rendir 40 - 45 % de proteína de relativamente buena calidad nutricional.

Actualmente en varios países, las tortas o "expellers" de girasol se utilizan fundamentalmente para la alimentación animal. (2)

La producción argentina de girasol promedió durante los úl-

2

timos cinco años 980.000 toneladas/año.

Prácticamente el 10 % de la harina se utiliza en la elaboración de alimentos balanceados para animales y el resto se exporta (3), siendo la producción correspondiente a la cosecha total del país en el período 1978/1979 de 1.430.000 toneladas.

Con respecto al poroto de soja se señala que la producción mundial (4) correspondiente a la campaña 1979/1980 ascendería a 89 millones de toneladas. Los Estados Unidos de Norteamérica, su principal productor, aportaría más del 60 % del total. Los países del cono sur (Brasil, Argentina y Paraguay) también incrementarían su producción, totalizando unos 18 - 19 millones de toneladas.

La mayor demanda de esta leguminosa, en razón de su alto valor proteico, se debe a su insumo creciente en alimentos para animales (productos balanceados) y en alimentación humana (aceite, harina, etc.).

En los programas agrícolas en relación a oleaginosas y leguminosas se pone actualmente énfasis en el desarrollo de líneas de más alto rendimiento y/o mejor patrón de aminoácidos esenciales de sus proteínas.

Durante la campaña agrícola 1978/1979 la producción de soja en el país llegó a 3.700.000 toneladas. Esto significó un aumento del 48 % respecto del volumen cosechado en el período anterior, siendo el principal productor la provincia de Santa Fé y Córdoba en segundo lugar. El incremento de la producción en la provincia de Buenos Aires la coloca entre las tres primeras, reuniendo en conjunto el 90 % de la producción total del país (5).

No hay duda que como oleaginosa el girasol cuenta con el privilegio de ofrecer a la par que un alto rendimiento, un aceite

comestible de color claro, estable y de excelente composición ácida; mientras que contrariamente la soja (esencialmente leguminosa) muestra relativamente bajo rendimiento en aceite, el que ofrece problemas de estabilidad frente al estacionamiento y a determinados usos (fritura).

Por otra parte las harinas respectivas resultantes de la separación de los aceites, son fuentes económicas de proteínas en el mundo y es posible que continuen siéndolo.

No obstante los concentrados proteínicos de semillas de oleaginosas y leguminosas en general producidos hasta el presente (incluyendo soja), no siempre satisfacen plenamente los gustos de las poblaciones necesitadas, tal como surge de las campañas llevadas a cabo en regiones en desarrollo. La dificultad tiene que ver con la poca "aceptabilidad" que le dispensa la población en general, estando ello relacionado a características físicas y funcionales que todavía exigen mayores investigaciones.

Problemas de otra índole son los inherentes a la presencia de ciertos compuestos perjudiciales para la salud: factores antinutricionales (antienzimas, ácido fítico), compuestos polifenólicos y materiales no digeribles que ocasionan trastornos intestinales.

En varios trabajos se señala que las semillas descascaradas de girasol son de sabor dulce y elevado valor nutricional (6). Mitchell y colaboradores (7) hicieron referencia a la alta digestibilidad (94,3 %) y buen valor biológico de la proteína (64,5) de la harina de girasol (obtenida por extracción con solvente a temperatura no superior a 95°).

Por esa misma época, Grau y Almgvist (8) en base a resultados logrados con animales de experimentación, la señalaron como "una fuente completa de aminoácidos para el crecimiento de pollos jóvenes, cuando eran alimentados a un nivel del 20 % de proteína en la dieta".

Block y Bolling (9) también proporcionaron datos sobre digestibilidad "in vitro" y valores de aminoácidos de proteínas de girasol mostrando, por comparación con las proteínas de levaduras, su menor contenido en lisina pero mayor riqueza en aminoácidos azufrados. Prácticamente a las mismas conclusiones llegaron Mc. Ginnis y colaboradores (10) al señalar a la lisina como principal aminoácido deficitario en proteínas de harina de girasol, no requiriendo en cambio suplementación adicional de metionina cuando la dieta se suministraba a pollos en crecimiento.

Los resultados obtenidos por Milner, Hubbard y Wicle (11), al examinar diferentes variedades de semilla de girasol, mostraron un ámbito de contenido en proteínas (nitrógeno x 6,25) de 18 a 21 % y de 27 a 31 % en aceite, valores que por descascarado previo (39 - 46 % de cáscara) oscilaron entre 29 a 32 % y 47 a 53 % respectivamente. Las harinas provenientes de semilla descascarada constituyeron verdaderos concentrados proteínicos (57 - 74 % de proteínas) (nitrógeno x 6,25) (12).

Las publicaciones posteriores, hasta el presente (1) (12) (13) (14) (15) muestran valores de composición y nutritivo dentro del orden de los ya señalados.

En contraste con la mayoría de las semillas de oleaginosas y leguminosas, la pepa de semilla de girasol aparentemente no

contiene sustancias tóxicas o antinutricionales o lo estarían en mínimas proporciones (se señala una débil actividad de algún inhibidor de tripsina) (16) (17).

Los pueblos de varios países productores las ingieren sin cocción u otro procesado previo (Rusia, Polonia, Rumanía).

Sin embargo, otros problemas existen en el procesado de esta semilla. Uno está relacionado con el método de extracción del aceite usado por la industria aceitera, una combinación de prensa - tornillo y extracción por solvente. La harina industrial ("lex") procede de un tratamiento de la "pepa industrial" a la que previamente se sometió a limpieza, descascarado parcial y secado rápido (80 - 90°), calentamiento a 105 - 108° por 25 minutos, pasajes por prensas a tornillo de donde emerge el "expeller" a unos 100° y enfriamiento rápido a 40°. En razón del alto contenido en aceite del endospermo (pepa) el prensado no puede ser realizado a menos que esté presente un cierto porcentaje de cáscara (10 - 15 %). Se extrae luego con hexano técnico (extracción continua) y la harina resultante ("lex") se seca durante 20 minutos (100 - 105°) y se deja enfriar a temperatura ambiente (12).

La presencia de cáscara da porosidad a la torta y facilita la extracción del aceite por solvente. Consecuentemente la harina agotada contiene muy alto porcentaje de fibra cruda (16 - 17 %) lo cual limita su uso directo en la industria alimentaria, especialmente en dietas para niños.

Otro problema importante es el alto contenido en ácido clorogénico y compuestos polifenólicos relacionados que ocurren naturalmente en la semilla. Bajo ciertas condiciones (medio alcalino, pH

superior a 7,5 y presencia de oxígeno) estos compuestos polifenólicos se oxidan a quinonas resultando productos de color verde intenso, como consecuencia de su unión covalente a proteínas, limitando sus posibilidades de utilización en la industria alimentaria.

Frente a los inconvenientes planteados y teniendo en cuenta que la harina de semilla de girasol descascarada total o parcialmente, ofrece posibilidades de uso directo en mezclas con otras fuentes proteínicas, se abandonaron temporariamente los intentos de eliminación de ácidos clorogénicos y en consecuencia el aislamiento de sus proteínas a partir de la harina a través del método clásico de extracción en medio alcalino y precipitación en medio ácido.

El hecho de que el factor limitante en el aprovechamiento de las proteínas de girasol sea la lisina, comprobado a través de numerosas experiencias de índole química y biológica, ofrece el interés de su suplementación conveniente con proteínas animales (carne, leche, pescado) u otras de origen vegetal (soja) deficitarias en metionina pero ricas en lisina (2) (16).

Dependiendo de la variedad, la semilla de soja madura contiene 34 - 39 % de proteína de buena calidad nutricional y 14 - 25 % de aceite, características que han ejercido influencia sobre su historia en la alimentación (18) (19). Esta revela que la soja ha sido siempre un alimento importante en la dieta de los pueblos de Asia. Sólo más recientemente la soja ha sido incorporada como alimento comercializable para occidente y el hecho de que sus componentes principales (proteínas y aceite) incrementen su producción y consumo actual deriva del mayor conocimiento de su composición y de

las modernas técnicas de procesado.

La alta calidad de las proteínas de soja (harina; NPU 74, ratas) (20) ha sido confirmada a través de un gran número de ensayos de alimentación en animales y en humanos, de ahí que a esta leguminosa se la considere como una de las fuentes más atractivas en la mejora de otras fuentes de proteínas en el mundo (ej. cereales, particularmente deficitarios en lisina) (20) (21) (22). Los valores mencionados se logran cuando la harina o producto de soja han sido adecuadamente tratados por calor (destrucción de factores que inhiben la actividad proteolítica de enzimas digestivos y mejoran la digestibilidad de sus proteínas).

## 2) Compuestos polifenólicos que ocurren en la semilla de girasol.

### Factores antinutricionales y no digeribles de la soja

Se había señalado que uno de los problemas que presentan las semillas de oleaginosas y de leguminosas es la presencia de compuestos que son perjudiciales para la salud.

El valor nutritivo de las proteínas (particularmente disponibilidad de sus restos lisina) puede verse afectado en forma adversa por la reacción de estas con productos de oxidación (quinoxinas) de compuestos polifenólicos que están presentes en la misma planta. Recientemente (23) con motivo del creciente interés comercial en la preparación de concentrados de proteínas de hojas y en base a estudios relevantes sobre materiales similares (semillas de leguminosas, de girasol, hojas de tabaco y de frutas) (24, (24) (25) se observó la acción adversa de polifenoloxidasas durante el estacionamiento prolongado de estos vegetales en aerobiosis

y a temperatura ambiente (reacciones de browning enzimático resultantes de copulación de ácidos clorogénicos con grupos tioles de cistina y grupos  $\epsilon$ -amino de lisina), señalando la atención que debiera prestarse a materiales ricos en proteínas, particularmente cuando su contenido en lisina es crítico, por los efectos de sistemas polifenol - polifenoloxidasas presentes en ellos.

Paralelamente y con motivo de los primeros aislamientos de proteínas de semilla de girasol que rendían productos intensamente coloreados, se condujeron estudios de aislamiento, identificación y evaluación de los componentes causantes (ácidos clorogénicos) (12), asociando estos resultados a la reacción producida entre quinonas (productos de oxidación de ácidos polifenólicos) y proteínas, durante la etapa de dispersión alcalina (pH 7,5 o superior) (condensación covalente y polimerización).

Desde el punto de vista tecnológico, las interacciones de los ácidos clorogénicos y sus productos de oxidación con proteínas en medio alcalino, fueron el motivo de una serie continuada de trabajos fundamentalmente dedicados al logro de "aislados" proteicos blancos (12) (26) (27) (28)

Varios investigadores han notado la interferencia que producen los compuestos polifenólicos (ácidos clorogénicos) ocurrentes en ciertos vegetales en el aislamiento de enzimas (ureasa, fosfatasa, fosforilasa,  $\beta$ -glucosidasa, etc). La literatura también hace referencia a la inhibición de la ureasa por ciertos compuestos polifenólicos señalando su prevención por compuestos tiólicos. Existen evidencias de que realmente los inhibidores eran quinonas y que aún trazas de estas tenían efecto significativo. (28).



nales al ácido fítico. Los granos de cereales y las semillas de oleaginosas y leguminosas son particularmente sus fuentes más ricas.

El ácido fítico, en su ocurrencia natural como complejo fitato - mineral - proteína disminuye la digestibilidad del zinc, hierro, manganeso, calcio, cobalto y magnesio (37) en la dieta y aunque la mayoría de los estudios han sido hechos con animales (ratas), se ha probado que interfiere en la absorción del calcio y del hierro en el hombre (33).

La mayor parte de estos efectos se observaron en dietas conteniendo "aislados" proteicos de soja (33) (37).

En general los "aislados" y concentrados proteicos de fuentes vegetales (lino, girasol, sésamo) se enriquecen en este componente en relación al producto o harina de partida, pudiendo ofrecer los mismos inconvenientes que los de soja, sólo que esta última ha sido más estudiada hasta el presente (21).

### 3) Aislamiento de proteínas blancas a partir de semilla de girasol.

#### Antecedentes.

El contenido total de compuestos polifenólicos (ácidos clorogénicos y compuestos relacionados) de la harina desgrasada de girasol está alrededor del 2,4 %.

La semilla descascarada, al igual que la harina industrial resultante de la extracción del aceite ("lex") y los concentrados proteicos, presentan color prácticamente blanco, no obstante cuando se incorporan a productos de horneado, esos compuestos fenólicos contribuyen a su oscurecimiento.

Uno de los problemas en la obtención de "aislados" proteicos a partir de la harina por el método tradicional de extracción alcalina seguida de precipitación en medio ácido a pH isoeléctrico, es el desarrollo de color verde intenso, que como ya se señaló anteriormente, sería la consecuencia de la oxidación de los ácidos clorogénicos que quedarían irreversiblemente ligados a la proteína. El color del producto final limitaría su aplicación en la industria alimentaria.

Después de los estudios realizados por Smith y Johnsen (37), un nuevo acercamiento al problema se repite con los trabajos de Sosulski y Bakal (38). Sus objetivos fueron observar los rendimientos de la dispersión de material nitrogenado en distintos medios y las características de los concentrados proteicos logrados a partir de harinas de semilla de girasol, lino, nabo, comparativamente con los de soja. En los casos de girasol y soja, partieron de semilla totalmente descascarada, operando la extracción de los aceites a temperatura ambiente (hexano normal) en mezcladora y desolventizando las harinas en vacío (45° a fin de reducir al mínimo la desnaturalización de las proteínas (en particular no afectar su solubilidad). Estas últimas fueron dispersadas a través de una serie consecutiva de solventes (agua destilada, solución de cloruro de sodio al 5 %, etanol 70 % y solución de hidróxido de sodio al 0,2 %), y separadamente por el método industrial usado corrientemente para la extracción de la proteína de soja (dispersión en medio alcalino y precipitación ácida a pH isoeléctrico). Los autores señalaron los mayores niveles de material nitrogenado dispersado con la solución alcalina, adoptando este último método como más satisfactorio.

Los precipitados proteicos fueron lavados y liofilizados.

El rendimiento máximo lo lograron para harina de girasol (50 %, expresado como "aislado" por ciento de harina de partida), siendo su contenido en nitrógeno el 14 %. No obstante, la proteína aislada resultó intensamente coloreada en verde, no así la de soja (color arena).

Una de las contribuciones para solucionar este aspecto fue el trabajo de Gheyasuddin y colaboradores (39) quienes utilizaron una solución acuosa de sulfito de sodio al 0,25 % (reductor) durante la extracción del material nitrogenado de la harina de girasol, a pH 10,5 ; precipitando luego las proteínas con ácido clorhídrico a pH 5,0 (80% de la proteína extraída). El precipitado fue lavado con agua y liofilizado.

Una alícuota del precipitado fue sometida a extracción con solvente (isopropanol) antes del lavado acuoso y aunque casi blanco después del secado, todavía contenía compuestos que impartían color a la proteína cuando esta era puesta en solución alcalina (pH mayor de 7,5).

La composición aminoacídica mostró un severo decrecimiento de cistina e incrementos notables en leucina, tirosina y fenilalanina, que los autores atribuyeron a pérdida por solubilidad en agua de fracciones proteicas no precipitables por ácido (pH isoeléctrico).

Así se ensayaron diferentes solventes para la separación previa de los ácidos clorogénicos en la harina de girasol, adición de cantidades convenientes de sustancias que contenían agrupaciones similares a las de la unión peptídica (polivinilpirrolidonas) (formación de complejos por unión hidrógeno con los ácidos cloro-

génicos para su remoción a valores de pH convenientes), adición de otros agentes reductores distintos del sulfito (tales como ascorbatos o tioles durante la etapa de dispersión de las proteínas) y dispersión de estas últimas a pH neutro en medios salinos. Si bien estos caminos permitieron lograr "aislados" blancos, mostraron resultados no satisfactorios respecto de rendimientos ( muy bajos) en la proteína final, mayor o menor grado de desnaturalización de las proteínas en la harina tratada por solventes polares (etanol 70 %, metanol absoluto) lo que disminuía su extracción, baja eficiencia protectora del ácido ascórbico e inconvenientes en la adición de grandes cantidades de poliamidas y en su separación del producto de reacción (no aconsejables para uso industrial) (12).

En una serie de trabajos posteriores presentados por Sosulski y colaboradores (40) (41) se señala la eficacia de extracciones por difusión y en contracorriente de harina de girasol con distintos solventes (agua, ácido diluído o alcohol) y de semilla descascarada con solución ácida, para la remoción de ácidos clorogénicos (5 o 6 etapas de extracción por difusión remueven el 90 % de dichos principios). La extracción ácida diluída o acuosa a 80° mejora la velocidad de extracción de éstos, pero incide desfavorablemente en la pérdida de proteínas en dicho extractivo. Se obtuvieron concentrados proteicos (70 % de proteína como mínimo), productos blancos o ligeramente verdes, con relativamente bajos tenores de ácidos clorogénicos (0,3 a 0,8 % del producto final).

Un muy importante punto, que se puede observar a lo largo de todas estas tentativas, es el ajuste del valor del pH de dispersión. Las experiencias mostraron que en medio acuoso con pH inferior a

7,5 no se observaba desarrollo de color verde por oxidación de ácidos clorogénicos en forma irreversible. Surgió entonces como camino ventajoso desde el punto de vista de la industrialización de "aislados" proteicos (mínimo 90 % de proteínas en el producto final), operar la dispersión del material nitrogenado directamente sobre el producto de la molienda de las pepas de girasol (semilla totalmente descascarada y conteniendo todo el aceite) en medio acuoso pH 7,0 - 7,5 (INTI). La separación de las tres fases presentes (acuosa, aceitosa y residuo insoluble) se hizo por centrifugación, precipitando luego las proteínas en la fase acuosa al valor de pH isoeléctrico (4,4 - 4,6), con ácido clorhídrico. En el líquido sobrenadante de la precipitación, quedaban solubles la mayor parte de los ácidos clorogénicos y los azúcares contenidos en el material de partida. Las proteínas precipitadas, una vez secas por "spray", resultaron de color blanco, con muy bajos niveles de ácidos clorogénicos.

4) Consideraciones en la suplementación del patrón de aminoácidos esenciales de la proteína de girasol con proteína de soja y con proteína de leche descremada.

La literatura (1) (43) (44) (45), señala a la proteína de harina de girasol como deficitaria en lisina y en aminoácidos azufrados totales. En ensayos de suplementación con lisina y metionina, se mejora satisfactoriamente su calidad nutritiva (45). Con carácter informativo, en un trabajo preliminar (42) se obtuvieron valores para lisina y metionina disponible en "aislados" de proteínas de girasol, que comparados con los del patrón FAO (1973)

confirman la deficiencia ya señalada para lisina (3,0 g/ 16 g N frente a 5,5 g/ 16 g N), pero con un contenido en azufrados totales sólo muy ligeramente inferior al del patrón mencionado (3,3 g/ 16 g N frente a 3,5 g/ 16 g N).

Ballester, Pak y col. en estudio comparativo de patrones de aminoácidos esenciales de distintas harinas obtenidas de semillas de oleaginosas, incluyendo soja, observaron la deficiencia en lisina para proteínas de girasol y un contenido superior al del patrón FAO (1973) en azufrados totales (45).

Brad (2) señala que las proteínas de girasol, deficientes primariamente en lisina, tienen un patrón equilibrado en aminoácidos esenciales con relación a otras oleaginosas y que su combinación con proteínas de soja, al igual que con las de origen animal, llevaría a una mejora en su valor nutricional, teniendo en cuenta la compensación de los factores limitantes.

Los estudios de tipo nutricional (experimentos con ratas) llevados a cabo en Chile con dietas a base de harina de girasol suplementada con harina de pescado (rica en lisina) registraron un aumento en su calidad nutritiva practicamente similar al de esta última. Paralelamente los ensayos de alimentación con niños (2 a 7 años de edad) mostraron estadísticamente aumentos significativos en altura y peso corporal(44).

Agren y Lieden (31) al considerar la composición aminoacídica de los concentrados de girasol señalaron que, a excepción de la deficiencia en lisina (primer aminoácido limitante), era bien equilibrada, siendo rica en metionina y triptofano. Después de la coagulación por calentamiento, dicha composición no había cam-

biado significativamente excepto una ligera disminución en lisina.

Con relación a la suplementación de sus proteínas con las de leche descremada, cabe señalar que las numerosas actividades de investigación en distintos países, donde se han implementado soluciones para el desarrollo de mezclas de alta calidad proteínica, no existen diferencias sobre el particular hasta el presente.

PARTE II

DISCUSION DE LA PARTE EXPERIMENTAL



## Objetivos y plan de trabajo

El valor potencial de la proteína de girasol para consumo humano está bien documentado.

Como materia prima para la obtención de alimentos proteínicos (concentrados y "aislados") la semilla de girasol constituye una fuente importante y económica. En efecto los "expellers" y harinas (subproductos de la industria aceitera) revisten especial interés en nuestro país por ser esta oleaginosa la de mayor difusión (rendimiento pronosticado para la cosecha 1979/1980: 1.600.000 toneladas) y por su alto contenido en proteínas de buen valor nutritivo.

El presente trabajo se ha orientado esencialmente al estudio de métodos de aislamiento de proteínas blancas a partir de harinas de extracción de pepa industrial precisando rendimientos y principales características de los "aislados" proteicos logrados.

El plan diseñado a los fines de suplementar dichas proteínas con proteínas de soja o leche descremada incluyó los siguientes pasos previos:

- a) Estudio de composición general y de algunos compuestos particulares de las diferentes materias primas: "lex", harina de extracción de pepa industrial y de pepa descascarada obtenidos a partir de la pepa industrial de girasol (laboratorio).
- b) Ensayar bajo distintas condiciones (pH, número de extracciones, temperatura, naturaleza de ácidos, etc) la remoción de la mayor parte de los compuestos clorogénicos a fin de lograr un material de partida para la dispersión de las proteínas libre o prácticamente libre de dichos compuestos interferentes y luego precipitar

las proteínas en medio ácido ("aislado proteico blanco) y evaluar porcentualmente la pérdida de material nitrogenado en dichos procedimientos.

- c) Estudiar las condiciones óptimas de dispersión de proteínas (pH, temperatura, número de extracciones) sobre los materiales anteriormente obtenidos (residuales de la separación de ácidos clorogénicos) y determinar su rendimiento. Fijar el valor de pH de máxima precipitación, operando sobre el material nitrogenado dispersado en distintas condiciones.
- Confrontar los resultados de acuerdo al procedimiento de mayor rendimiento según b) y c) con los logrados por el método de obtención de proteínas blancas aisladas por extracción acuosa directa (pH 7,0) de la harina de pepa industrial y precipitación a pH isoeléctrico en el extractivo (INTI) (42).
- d) Efectuar un balance de distribución del nitrógeno total, de ácidos clorogénicos y de lisina disponible en los distintos pasos y productos finales logrados en el proceso de obtención del "aislado" proteico.
- e) Elegido el método más conveniente, resolver a escala de laboratorio, el aislamiento de proteínas blancas, su purificación (lavados acuosos y etanólicos), determinar sus características físicas y analíticas (nitrógeno total, cenizas, fósforo total y de ácido fítico, calcio, hidratos de carbono totales, pérdida a 100°, azufrados totales (aminogramas), lisina disponible y ácidos clorogénicos remanentes).
- f) Obtener a escala de laboratorio el "aislado" proteico de harina de semilla de soja descascarada (harina industrial cruda), estudiar su composición general determinándole: cenizas, pérdida

por calentamiento a 100° , calcio, lisina disponible, azufrados totales (aminogramas), fósforo total y de ácido fólico, hidratos de carbono totales y considerar en base a los aminoácidos limitantes de ambas fuentes (proteínas de girasol y de soja), un primer intento de suplementación de los patrones de las respectivas proteínas (score químico).

- g) Obtener a escala de laboratorio el "aislado" proteico a partir de leche descremada (industrial), determinar sus características analíticas (cenizas, pérdida a 100° , calcio, fósforo total, lisina disponible, azufrados totales (aminogramas), hidratos de carbono totales) y considerar, como en el caso anterior, la probable suplementación de proteína de girasol con proteína de leche descremada en base a los respectivos aminoácidos limitantes (score químico).

Es obvio que el éxito de la suplementación de proteínas de bajo o relativamente bajo valor biológico puede lograrse solamente cuando las mezclas han sido formuladas con base científica (cantidad y calidad de las proteínas de ambas fuentes) y después que se haya demostrado fehacientemente la calidad nutritiva del producto resultante a través de ensayos biológicos de experimentación.

Desde el punto de vista del patrón de aminoácidos esenciales, ya que las proteínas de girasol son deficientes primariamente en lisina y de buen nivel en azufrados y las proteínas de soja (como las de leche) son ricas en lisina y deficientes en azufrados, las mezclas de ambas fuentes tendrán distinta calidad proteínica. El suplemento ideal será aquel que proporcione el nivel mayor de lisina, además de contener cantidades y relaciones adecuadas de los otros aminoácidos.

Es valioso disponer esta información previa en el proceso de formulación de un alimento rico en proteína a fin de lograr el mejor patrón de aminoácidos esenciales o uno similar al de las proteínas de huevo o de la leche.

Sólo como una primera aproximación, de carácter teórico, una suplementación o complementación puede diseñarse por medio de la combinación de dos o más proteínas en base a los patrones respectivos de sus aminoácidos esenciales, en comparación con uno de referencia (FAO 1973). Ello no implica necesariamente tener resultados concordantes con las experiencias decisivas (de tipo biológico) ya que no se consideran generalmente la disponibilidad biológica de los aminoácidos, el exceso de alguno de ellos (frecuentemente en proteínas de origen vegetal), factor digestibilidad y presencia de sustancias antinutricionales no eliminables o estables al calor y que contribuyen en distinta medida en la respuesta biológica. Cabe señalar que estudios de esta última naturaleza son necesarios aún en productos que se sabe que no contienen naturalmente sustancias tóxicas, pues estas pueden originarse en el procesado o estacionamiento de materias primas o productos procesados (grasas residuales altamente oxidables, presencia de contaminantes, etc).

a) Los materiales de partida : "lex" y pepa industrial, provistos por la industria (Molinos Río de la Plata), corresponden el primero a harina obtenida industrialmente en el proceso de prensado a tornillo - extracción con solvente (hexano técnico) y el segundo al producto resultante de la molienda gruesa de la semilla de girasol conteniendo gran parte de la cáscara, tal cual se procesa para la obtención del aceite. Esta última es materia prima para la obten-

ción del "lex" (harina industrial).

Parte de la pepa industrial se destinó a la obtención de la harina correspondiente por extracción con hexano, en laboratorio. Paralelamente se obtuvo en laboratorio pepa de girasol descascarada (por flotación, ver Parte Experimental), y la harina de extracción correspondiente (hexano).

Todos estos materiales fueron analizados en su composición general y en algunos compuestos particulares.

El elevado tenor en fibra de las dos primeras harinas condujo a operar su remoción parcial (tamizado en laboratorio, malla 40) y a su posterior análisis.

Con los detalles que figuran en la Parte Experimental, se determinaron los contenidos en humedad, cenizas, nitrógeno total, fibra cruda, aceite (hexano), extracto en eter etílico, ácidos clorogénicos y lisina disponible que figuran en la Tabla 1.

Los valores observados para "lex" (tal cual) y pepa industrial, son acordes con los correspondientes señalados en literatura. y en general con los de un trabajo previo. No obstante se registró una mayor riqueza en proteína : pepa industrial 21,01 % frente a 25,19 % ; pepa libre de cáscara 22,91 % frente a 28,25 % ; "lex" 39,56 % frente a 42,50 % expresados como proteína cruda en base seca) (12), probablemente debido al factor variedad.

Se observa que a menor contenido en fibra corresponde mayor contenido en material nitrogenado y cenizas (el endospermo es de mayor riqueza en materias minerales y nitrógeno que la cáscara).

Los rendimientos en harina señalados al pie de la Tabla, muestran la dificultad que ofrece la molienda fina del "lex" (harina industrial) como consecuencia del procesado (menor rendimiento: 45,8 %)

TABLE 1

CARACTERIZACION DE LOS MATERIALES DE PARTIDA ( semilla, harinas, 1977 )

Material de partida	Humedad %	Cenizas %	Nitrógeno %sss	Proteína cruda % sss	Acetate %	Fill			
"Lex" (tal cual).	9,45	5,71	6,30	6,16	6,80	42,50	2,05	2,26	18
"Lex" (pasado malla 40)	8,54	7,24	7,91	7,13	7,79	48,69	--	--	12
Pepa Industrial (tal cual) Móldida en laboratorio.	5,42	3,46	3,66	3,81	4,03	25,19	48,90	49,37	--
Harina (hexano) de pepa Industrial (pasada malla 40)	9,68	7,56	8,37	8,04	8,90	55,62	--	--	7
Pepa 1libre de cáscara (de pepa Industrial).	7,54	3,52	3,80	4,18	4,52	28,25	48,41	52,35	--
Harina (hexano) de pepa (pasa malla 40).	10,41	9,86	11,00	8,78	9,80	61,25	--	--	5,

Al tamisar las distintas materias primas se obtienen los siguientes rendimientos: "Lex"= 45,8; pasa malla 40; Harina de pepa Industrial: 87,09 pasa malla 40; Harina de pepa descascarada: 90; pasa malla 40.

Materia cruda %sss	Extracto eter etílico (después de hexano) %sss	Ac. clorogénico %	Lisina disp. g / 16 N
1,80 20,76	---	---	---
1,13 13,26	2,24 2,45	3,08 3,37	3,26
---	---	---	---
1,40 8,19	2,00 2,21	3,07 3,40	3,27
---	---	---	---
1,23 5,84	1,64 1,83	3,08 3,41	3,27

5%  
5.500

comparativamente al logrado con la harina obtenida en laboratorio (hexano) a partir de la misma materia prima (87,1 %), luego de su tamizado a través de malla 40.

Este análisis se completó, con fines comparativos, con la determinación de contenido en ácidos clorogénicos en harinas de semilla integral, de pepa descascarada, de pepa industrial (8 a 10 % de fibra) y de "lex" (harina industrial con aproximadamente 13 % de fibra), procedentes todas de una misma partida de semilla original (provista por Molinos Río de la Plata). Las tres primeras harinas fueron obtenidas en laboratorio (hexano técnico). La siguiente Tabla ilustra sobre un mayor nivel en ácidos clorogénicos en la harina proveniente de la pepa totalmente libre de cáscara (descascarada manualmente, ver Parte Experimental - 4,16 %), correspondiendo el menor valor al de harina de semilla integral (3,01 %) y valores similares (aunque ligeramente inferior para el "lex") sobre harinas de pepa industrial (laboratorio) y "lex" (harina industrial obtenido por prensado y posterior extracción con hexano - 3,47 y 3,22 % respectivamente), poniendo en evidencia la mayor riqueza en dichos componentes en la fracción pepa. También se observa que el procesado industrial no ejerce influencia en el nivel de dichos componentes.

	% ácido clorogénico (stc)
"Lex" (harina industrial prensado y hexano) (pasado malla 40)	3,22 %
Harina pepa industrial (hexano, laboratorio) (pasada malla 40)	3,47 %



Harina semilla integral (hexano, laboratorio) (pasada malla 40)	3,01 %
Harina pepa totalmente descascarada (hexano, laboratorio)	4,16 %

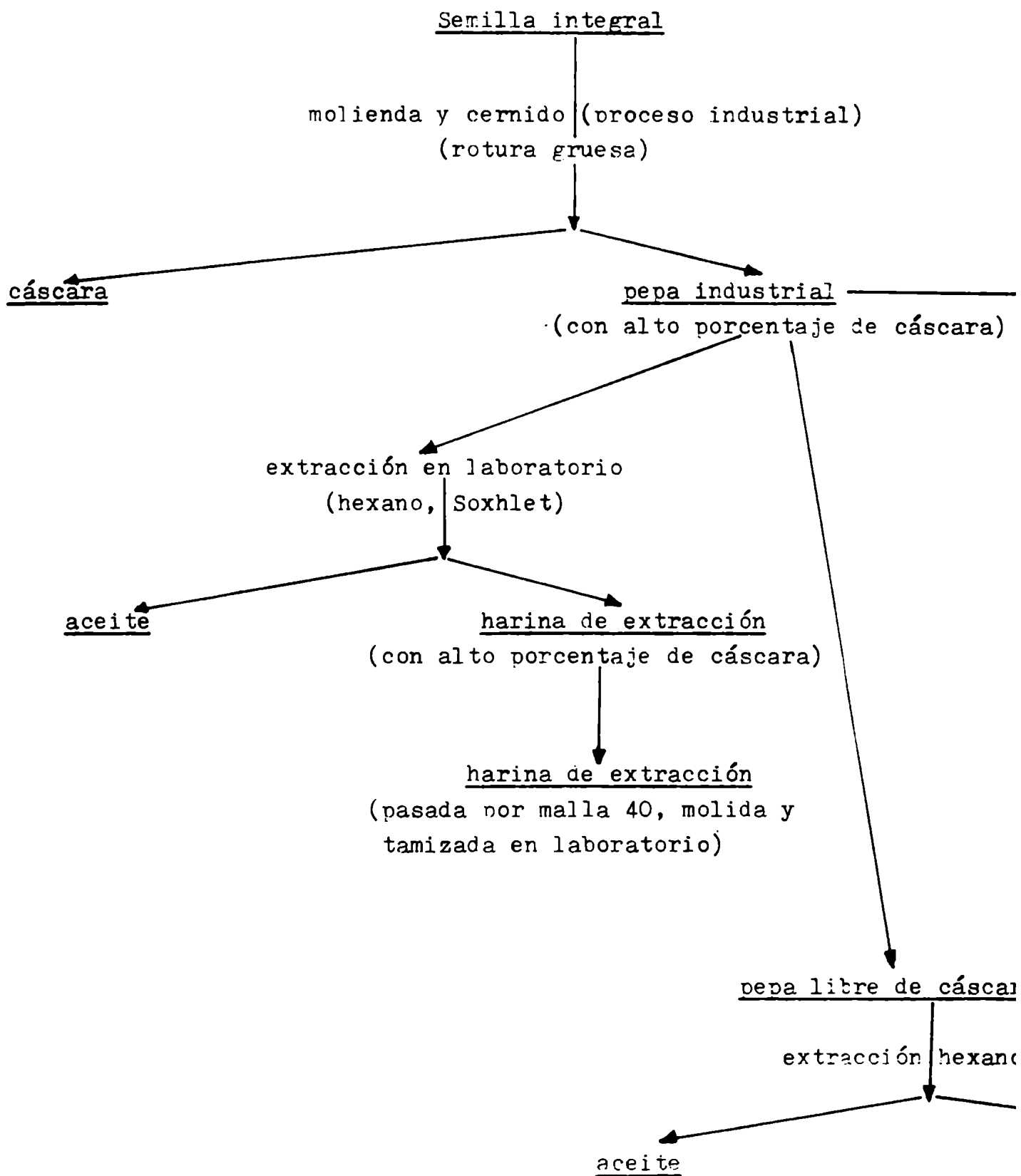
En el siguiente Esquema general (figura 1) se ilustra sobre las distintas etapas en la obtención de las harinas utilizadas en este trabajo.

b) Remoción de compuestos clorogénicos de las harinas de extracción

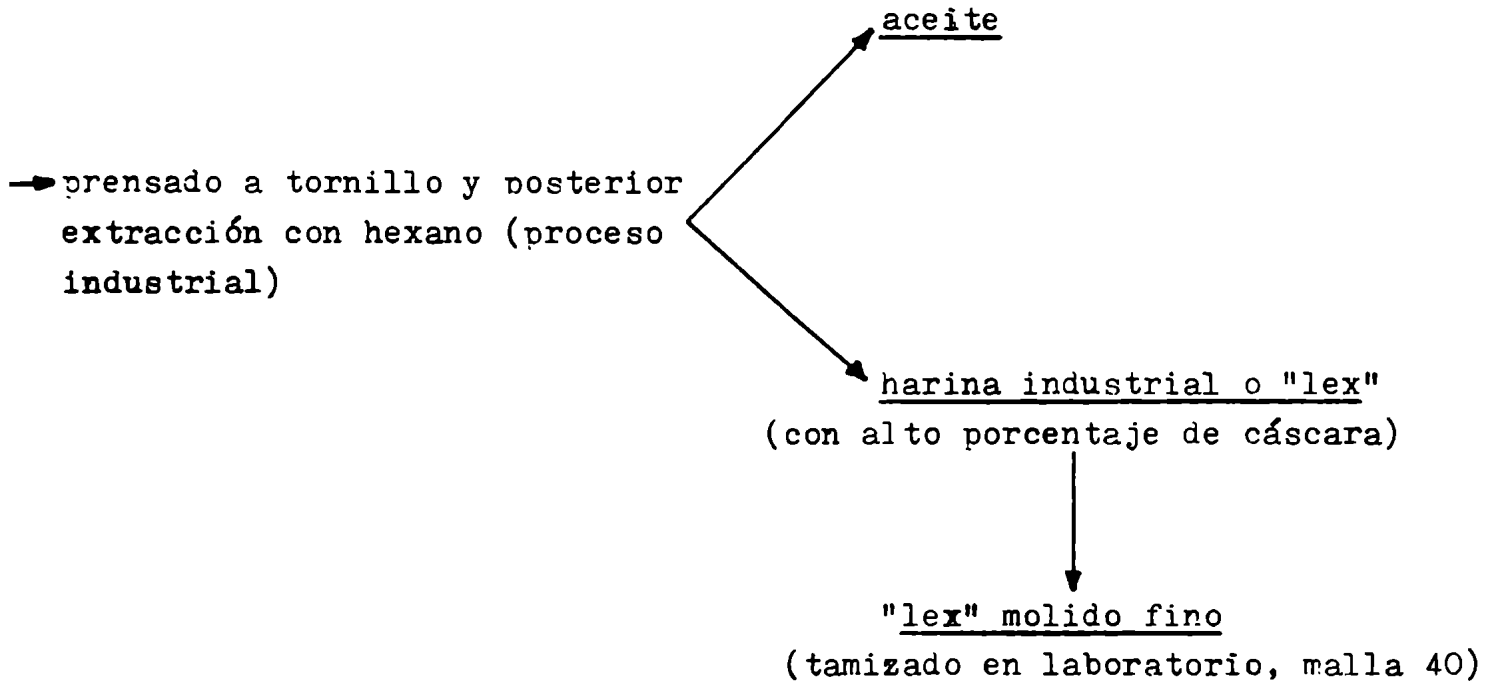
Con la intención de probar la eficacia de diferentes condiciones en la separación de compuestos polifenólicos (ácidos clorogénicos y otros relacionados) y la posterior dispersión del material nitrogenado a partir de las harinas residuales, se condujeron los ensayos que figuran en la Tabla 2.

De acuerdo a las condiciones experimentales señaladas al pie de la misma (extracción a temperatura ambiente de compuestos polifenólicos sobre "lex" y harina de pepa industrial con: agua a pH 6,5 - 6,6; agua + ClH pH 4,4 y ácido cítrico y citrato de sodio pH 4,4) se puede observar que el porcentaje de nitrógeno extraído conjuntamente con la remoción de los ácidos clorogénicos es prácticamente similar en la mayoría de ellos (19 - 23 % del nitrógeno total presente en la harina de partida; ensayos a), b) y c).

Por otra parte el "lex" ("expeller" o harina industrial), no resulta materia prima adecuada para la obtención de "aislados" proteicos, en razón del rendimiento significativamente menor logra-

Esquema General

(figura 1)



(laboratorio, levigación y  
secado a 45<sup>o</sup>, vacío)

→ harina de pepa descascarada  
(molida y tamizada en laboratorio, malla 40)

---

TABLA 2

RENDIMIENTO DE MATERIAL NITROGENADO EN LAS ETAPAS DE DISPERSION

Materia prima	Nitrógeno % Harina de partida	Nitrógeno dispersado con la extracción de clorogé- nicos (1)	Nitrógeno remanente de clorogé- de clorog.	Nitrógeno dispersado en medio alcalino después de extraído el clorogénico (2)	%N tot. har. de partid	
	%harina de partida	%harina de partida	%har. agot. de clorog.	%harina de part.	%N remanent. en harina	
"Lex" (tal cual)	6,16	0,90-1,18	5,26-4,98	2,15	41,0-43,0	34,9
"Lex" (pasado malla 40)	7,13	0,78	6,35	3,15	49,7	44,2
Harina pepa industrial (pasada malla 40)	8,04	1,77-2,00	6,27-6,04	4,89-4,94	78,7-81,0	60,7-61,4
Harina pepa descascara- da (pasada malla 40)	8,78	1,69-1,85	7,09-6,93	5,02-5,49	72,4-77,5	57,1-62,6
Harina pepa industrial (pasada malla 40)	8,04	1,67-1,78	6,37-6,26	5,13-5,45	80,1-87,0	63,5-67,7
Harina pepa industrial (pasada malla 40)	8,04	1,57-1,88	6,47-6,16	4,82	78,3	60,0
Harina pepa industrial (pasada malla 40)	8,04	2,33	5,71	4,66	82,19	57,96

Condiciones generales de dispersión:

- (1) Remoción de ácido clorogénico: (a) 5 extracciones con agua (pH 6,5 - 6,6); relación harina: solvente 1:5; temp. ambiente; 30 min. cada una; centrifugación 2800 rpm.
- (b) 5 extracciones con agua + ClH (pH 4,4); relación harina: solvente 1:5; temp. ambiente; 30 min. cada una; centrifugación 2800 rpm.
- (c) 5 extracciones con citrico-citrato de sodio (pH 4,4); relación harina: solvente 1:5; temp. ambiente; 30 min. cada una; centrif. 2800 rpm.
- (d) 5 extracciones con agua + ClH (pH 4,4); relación harina: solvente 1:5; temp. 45°C; 30 min. cada una; centrifugación 2800 rpm.
- (2) Dispersión de material nitrogenado: en todos los casos menos (d): 3 dispersiones; pH 8,0 a 11,0; temp. ambiente; relación harina; solvente 1:5; 30 min. cada una; centrifugación 2800 rpm.
- (d) 3 dispersiones, pH 8,0 a 11,0; temp. 45°C; relación harina; solvente 1:5; 30 min. cada una; centrifugación 2800 rpm.

do en la dispersión del material nitrogenado (42,0 - 49,7 % sobre nitrógeno remanente) frente a las harinas de extracción por hexano (72 - 87 % sobre nitrógeno remanente). Se observa solo un ligero aumento cuando se opera sobre "lex" previamente tamizado (eliminación parcial de la fibra).

Estas mermas se atribuyen al efecto desnaturalizante del proceso drástico sufrido en la separación del aceite.

Este aspecto sirvió para optar por la otra fuente de materia prima que provee la industria al presente (pepa industrial de girasol) y obtener la harina respectiva en el laboratorio (hexano).

Aparentemente, de los ensayos anteriormente mencionados, la extracción de compuestos polifenólicos operada en medio clorhídrico muestra la menor pérdida de nitrógeno, lo que se refleja en el mayor porcentaje de nitrógeno dispersado en la subsiguiente etapa. Por ello se eligió, en primera instancia, este procedimiento para operar en lo sucesivo.

Trabajos realizados en INTI (42) señalan una mayor remoción de ácidos clorogénicos con el incremento de temperatura en el medio. El efecto del aumento de este parámetro (45°), (ensayo d), operando en medio clorhídrico, conduce a una mayor eliminación de material nitrogenado junto a la remoción de polifenoles (29%), pérdida que afecta el rendimiento en nitrógeno dispersado en la etapa posterior ( medio alcalino - 58 %).

#### c) Estudio de condiciones de dispersión de material nitrogenado

La dispersión directa en medio acuoso, a partir de harina de pepa industrial, sin remoción previa de ácidos clorogénicos, a temperatura ambiente y a pH 7,0 - 7,5 a fin de no inducir cam-

bio de color, conduce a un menor rendimiento en material nitrogenado extraído (63,6 %). Por otra parte, la elevación de temperatura (45°) respecto de la ambiente, aplicada en este procedimiento si bien permite una mayor dispersión de material nitrogenado, favorece paralelamente la velocidad de oxidación de ácidos clorogénicos coloreando el líquido en verde (que comunica color ligeramente verde al precipitado proteico en la operación posterior), con un efecto contrario a la finalidad deseada (obtención de proteínas blancas).

La eliminación de material nitrogenado y otros materiales que se solubilizan y remueven junto a los ácidos clorogénicos (de operar con dicho procedimiento), modifica el valor de pH de máxima precipitación de las proteínas (pH isoeléctrico) dispersadas a partir de la harina remanente, observándose un desplazamiento del mismo desde pH 4,4 - 4,6 (proteínas dispersadas directamente en medio alcalino, sin remoción previa de ácidos clorogénicos) hasta 5,5 (ácido clorhídrico como agente precipitante) según se ilustra en la Tabla 3. Este valor coincide con el señalado en literatura (46).

Una evaluación de conjunto sobre el rendimiento en proteínas aisladas (varias partidas para cada método) según diferentes condiciones operatorias (remoción de ácidos clorogénicos con agua o con solución de ácido clorhídrico pH 4,4; temperatura ambiente; dispersión de proteínas en harina remanente a pH 8,0 a 11,0 y precipitación a pH 4,4 - 4,6 o a pH 5,5; ver Parte Experimental) condujo a valores que oscilan dentro de un margen habitual de rendimiento en "aislados" proteicos, observado para distintas parti-

TABLA 3  
CURVA DE pH ISOELECTRICO

pH de precipitación	N sobrenad. %N extraído	N sobrenadante % N extraído
	(a)	(b)
5,8	12,67	19,64
5,5	6,49 (x)	13,45 (x)
5,2	12,31	--
5,0	12,21	14,07
4,8	12,94	--
4,6	14,49	--
4,4	17,33	15,08
4,2	25,05	16,88
4,0	47,46	--
3,5	88,95	--

(x) : pH isoeléctrico.

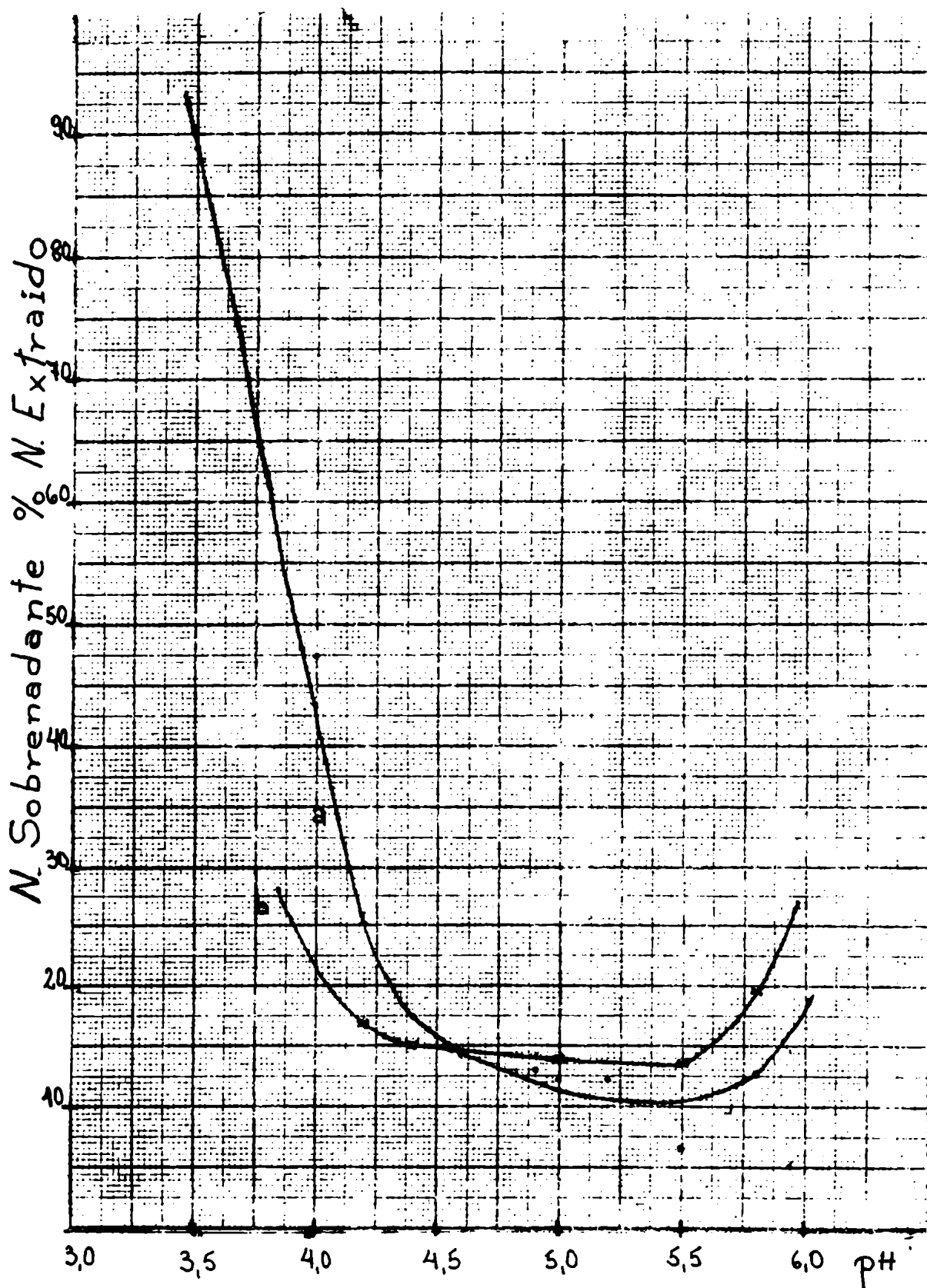
Procedimiento usado:

Primera etapa: a) extracción de ácido clorogénico sobre harina de pepa industrial (pasada malla 40) con agua (5 extracciones, temp. ambiente).

b) extracción de ácido clorogénico sobre harina de pepa industrial (pasada malla 40) con soluc. de ác. clorhídrico pH 4,4 (5 extracciones, temp. ambiente).

Segunda etapa: dispersión de proteínas sobre residuo de (a) o (b) con agua pH 8,0 a 11,0; en tres etapas sucesivas, con aumento progresivo del valor de pH (temp. ambiente).





CURVA DE pH ISOELECTRICO: Figura correspondiente a la Tabla 3.

das de harinas, logrados en trabajos anteriores (12).

Por otra parte, el haber utilizado el valor de pH 4,4 en lugar de 5,5 (como pH isoeléctrico) y haber registrado solo un ligero aumento en el rendimiento (28,6 % en lugar de 25,9 %) se justifica por hallarse dicho punto en un rango similar de pérdida de material nitrogenado según el perfil de solubilidad de proteínas versus pH (tipo meseta - Tabla 4). A este respecto debe llamarse la atención que en una suplementación de estas proteínas con proteínas de soja o de leche descremada (pH de máxima precipitación 4,5 - 4,6) resultaría muy conveniente operar en el entorno de este último.

Para cada sistema estudiado el "aislado" proteico respectivo resultó de color practicamente blanco y de textura satisfactoria (polvo fino, suave al tacto).

Como complemento de esta serie de experiencias y operando según el procedimiento estudiado en INTI, en el cual se omite la etapa de remoción de ácidos clorogénicos y obliga a realizar la dispersión del material nitrogenado a valor de pH 7,0 - 7,5; se realizaron ensayos que dieron los resultados que se registran en la Tabla 5 . Si bien el aumento de temperatura (45 °) con respecto de la ambiente conduce a una mayor dispersión del material nitrogenado a partir de la harina, tal como se señalara en experiencias anteriores, permitió constatar que el pH de la misma no deberá exceder del valor de 7,0 en razón de una mayor velocidad de oxidación de los compuestos polifenólicos (quinonas coloreadas) fenómeno que ya se evidencia a valores de pH ligeramente superiores (7,5) para esa temperatura.

Por otra parte, esa ganancia de material nitrogenado disper-

TABLA 4

RENDIMIENTO EN PROTEINAS AISLADAS

Procedimiento empleado	Rendimiento final en aislado % harina de partida
(a) extracción de ác. clorogénico con agua temp. ambiente; dispersión de mat. nitrogenado en medio alcalino pH 8,0 a 11,0 y precipitación de proteínas a pH 5,5.	25,88
(b) extracción de ácido clorogénico con agua pH 4,4 ( ClH ), temp. ambiente; dispersión de mat. nitrogenado en medio alcalino pH 8,0 a 11,0 y precipitación de proteínas a pH 5,5.	25,91
(c) extracción de ác. clorogénico con agua pH 4,4 ( ClH ), temp. ambiente; dispersión de mat. nitrogenado en medio alcalino pH 8,0 a 11,0 y precipitación de proteínas a pH 4,4 - 4,5.	28,64

TABLA 5

ENSAYOS DE DISPERSION DE MATERIAL NITROGENADO SOBRE  
HARINA DE GIRASOL

<u>MATERIA PRIMA</u>	<u>N % de harina de partida</u>	<u>N dispersado % de harina de partida</u>	<u>N dispersado % N tot. en harina</u>
Harina pepa indust. (pasada malla 40)	8,04	5,71 (a)	71,0
Harina pepa indust. (pasada malla 40)	8,04	6,37 (b)	79,3
Harina pepa indust. (pasada malla 40)	8,04	5,11 (c)	63,6
Harina pepa indust. (pasada malla 40)	8,04	4,86 (d)	60,5

(a) 5 extrac.; pH 7,5-7,6; temp. amb.; relac 1:5; 30 min. cada una; centrif. 2800 rpm.  
 (b) 5 extrac.; pH 7,5-7,6; temp. 45°C; relac 1:5; 30 min. cada una; centrif. 2800 rpm.  
 (c) 5 extrac.; pH 7,0; temp. 45°C ; relac. 1:5; 30 min. cada una; centrif. 2800 rpm.  
 (d) 5 extrac.; pH 7,0; temp. amb.; relac. 1:5; 30 min. cada una; centrif. 2800 rpm.

sado no se traduce en un mayor rendimiento en "aislado" proteico (probablemente ocurra mayor extracción de material nitrogenado no totalmente precipitable), comparativamente al logrado en un proceso similar a temperatura ambiente (rendimiento a temperatura ambiente 22,0%; a 45° 21,9%), con la ventaja, para este último caso, de lograr productos finales de color blanco.

Tal como se procedió con los materiales de partida, los "aislados" proteicos obtenidos por el procedimiento con remoción previa de ácidos clorogénicos (medio clorhídrico, pH 4,4), dispersión directa de material nitrogenado a pH 8,0 a 11,0 y precipitación al valor de pH isoelectrico (4,4 - 4,6), ambas a temperatura ambiente, se caracterizaron a través de los datos analíticos que se resumen en la Tabla 6.

Como puede estimarse comparativamente, el mayor nivel de lisina disponible (3,52 g lis/16 g N respecto de 2,89 g lis/16 g N), el mayor valor de ácidos clorogénicos (0,085 % respecto de 0,029%) y el menor rendimiento en aislado proteico (21,9 % respecto de 28,6 %) se registraron en el producto final logrado por dispersión directa, no obstante conducir ambos casos a "aislados" prácticamente blancos.

Estos resultados sugirieron una probable pérdida de alguna fracción de material nitrogenado rico en lisina, removible conjuntamente con los ácidos clorogénicos (primer procedimiento) en coincidencia con lo señalado en literatura sobre proteínas de hoja (32), mientras que la supresión de esa etapa (segundo procedimiento) favorecería su retención en el "aislado" final, que a su vez muestra un mayor nivel de ácidos clorogénicos.

TABLA 6

CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS AISLADAS

Procedimiento de obtención	Humedad % aislado	Cenizas % aislado	Nitrógeno % aislado	Lisina disp. g / 16 g N	Ac. clorogénico % aislado	Rendimiento % harina
(a)	5,32	0,77	16,33	2,89	0,029	28,6
(b)	2,87	0,47	15,74	3,52	0,085	21,9

(a) extracción de ácido clorogénico con agua pH 4,4 ( CLH ), temp. ambiente; dispersión de material nitrogenado en medio alcalino pH 8,0 a 11,0 y precipitación de proteínas a pH 4,4 - 4,6.

(b) dispersión de material nitrogenado con agua pH 7,0 ( sin remoción previa de ác. clorogénico ), temp. 45°C y precipitación de proteínas a pH 4,4 - 4,6.

d) Balance de distribución de ácidos clorogénicos en distintos pasos de los métodos de obtención de "aislados" de girasol

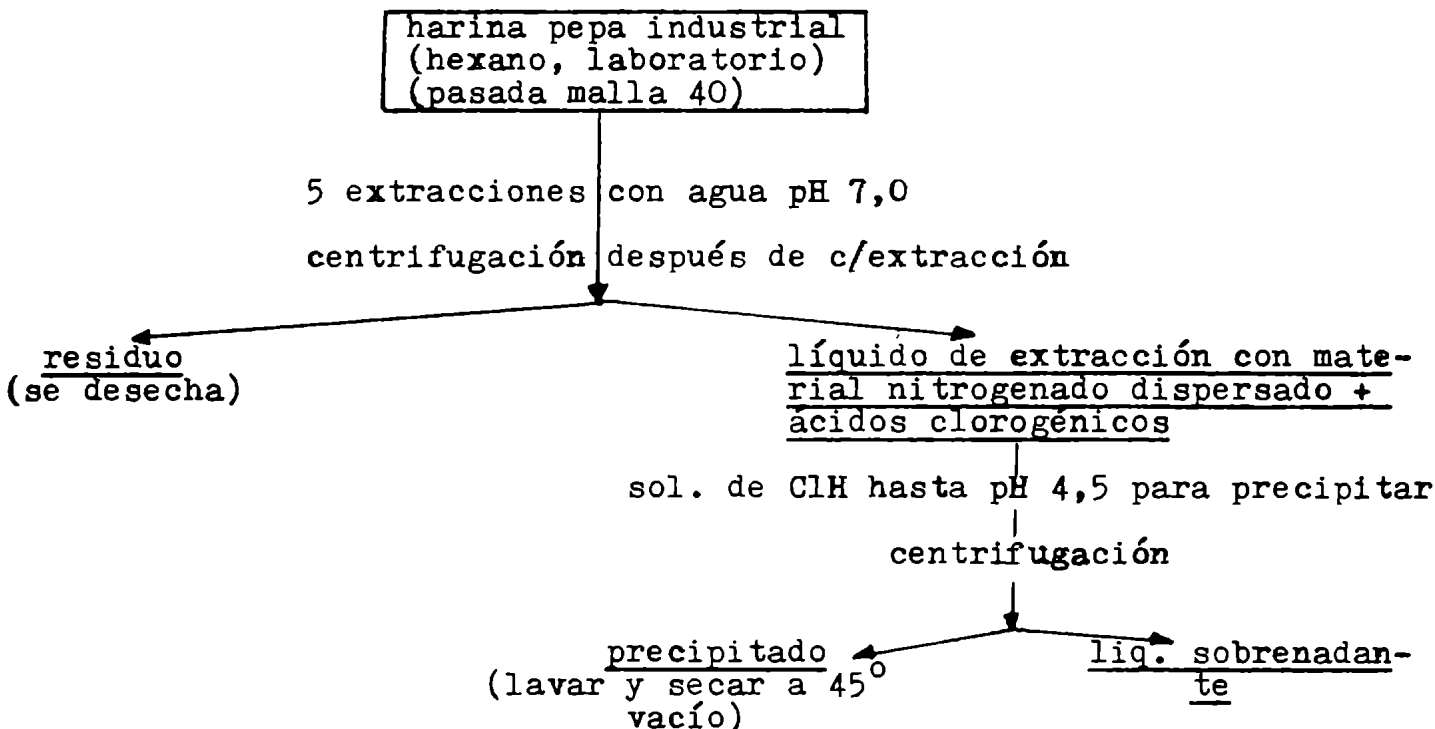
Dentro del plan trazado, se había contemplado efectuar el balance de distribución de ácidos clorogénicos para los dos métodos probados en la obtención de "aislados" de girasol.

Paralelamente, se pensó que la evaluación de lisina disponible en algunos de esos pasos permitiría comprobar si el material nitrogenado que se extrae con la mayor parte de los ácidos clorogénicos es comparativamente de mayor riqueza en lisina disponible que los demás, tal como aparentemente se señala en un único trabajo de literatura (32), en el cual los autores lo consideran consecuencia de la unión de grupos fenólicos al grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina.

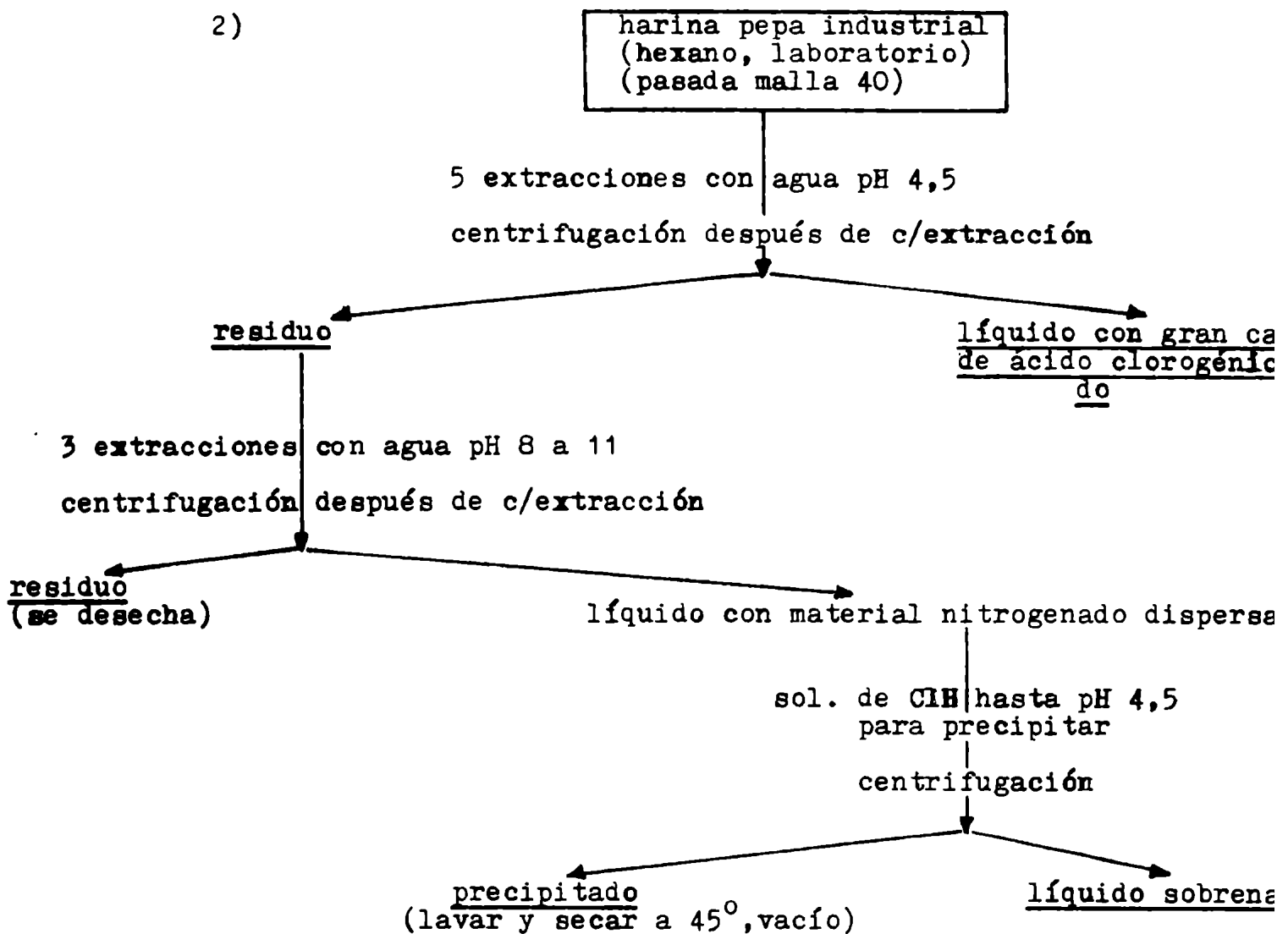
Ello explicaría, por otra parte, el menor valor en lisina disponible del "aislado" obtenido por el método que opera con remoción previa de ácidos clorogénicos.

Los esquemas diseñados para ambos métodos son los siguientes:

1)



2)



Las evaluaciones realizadas en el laboratorio para determinar los materiales en las distintas etapas permitió calcular aproximadamente el contenido en ácidos clorogénicos de las restantes.

Teniendo en cuenta que el material de partida es el mismo para ambos procedimientos, se desprende que un 45 % del total original ya queda eliminado en la etapa de separación previa de ácidos clorogénicos, antes de dispersar las proteínas (pH 8 a 11) y del resto la mayor proporción queda en el residuo agotado (procedimiento



to 2). Contrariamente, en el procedimiento de dispersión directa el 38 % del contenido inicial en la harina de partida queda junto con el líquido que contiene el material nitrogenado dispersado, y de éste la mayor proporción se elimina en el líquido sobrenadante después de la precipitación. La eliminación previa incide hacia una menor retención de esos componentes en el "aislado" final.

La dificultad en evaluar lisina disponible en un medio que contiene alta proporción de azúcares (sobrenadante residual de la precipitación de proteínas) que lleva a una falta de reproducibilidad en los valores hallados, sólo permitió concretar el balance de distribución para los ácidos clorogénicos en dichas etapas.

Consecuentemente en base a todo lo expuesto se decidió operar en lo sucesivo a temperatura ambiente y por el método de dispersión directa de proteínas (sin remoción de ácidos clorogénicos), seguido de precipitación a pH isoelectrico (ClH 4,4 - 4,6) como procedimiento más conveniente a los fines perseguidos, con las ventajas de ofrecer un menor número de pasos y de no introducir desplazamiento en el valor de pH isoelectrico.

e) Aislamiento de proteínas blancas de girasol purificadas. Características físicas y analíticas

Contando con la información obtenida de estudios experimentales previos (12) (INTI) y presentes sobre condiciones óptimas de aislamiento y purificación de proteínas de girasol, se procedió a aplicar la técnica arriba mencionada a fin de obtener cantidad suficiente de "aislado" blanco, purificado con destino a la determinación de su composición general y evaluaciones analíticas particulares (lisina disponible, ácidos clorogénicos,

calcio, etc.) (ver Parte Experimental).

"Aislado" de girasol - Características físicas y químicas

Aspecto: polvo fino, suave al tacto

Color: prácticamente blanco

Olor: inodoro

Rendimiento: 21,9 g proteína/100 g harina

Pérdida a 100°(vacío): 8,20 %

Cenizas (500 - 550°): 0,35 % bs

Hidratos de carbono totales: 2,26 % bs

Fósforo total: 0,72 % bs

Fósforo de ácido fítico: 0,19 % bs (26,4 % del fósforo total)

Fósforo total - fósforo de ácido fítico: 0,53 % bs

Nitrógeno total: 16,99 % bs

Lisina disponible: 3,30 g/16 g N

Lisina total: 3,50 g/ 100 g de "aislado".

Aminoácidos azufrados totales:

Calcio: no detectable

Acido clorogénico: 0,085 % bs

Merece señalarse el nivel significativamente menor en ácido fítico respecto del fósforo total que queda retenido en el "aislado" final, comparativamente a los resultados obtenidos en un trabajo anterior (12), donde el 53 % del fósforo total hallado en el "aislado" correspondía a fósforo de ácido fítico ("aislado" de color ligeramente verde obtenido por dispersión directa en agua a pH 11). Al margen de una probable diferencia en contenidos en fósforo total y de ácido fítico de origen varietal, surge como parámetro de mayor influencia el valor de pH operado en

la etapa de dispersión del material nitrogenado (pH 7,0 para las experiencias del presente caso y 11,0 para las realizadas en un trabajo anterior), que permitiría la mayor extracción de fitatos liberados que luego quedarían como complejos insolubles con las proteínas al valor de pH isoelectrico (4,4 - 4,6) de estas últimas (47).

Merece señalarse que el valor de lisina disponible ( 3,30 g/16 g N) es muy similar al de la harina de partida (3,27 g/16 g N) y superior al de los "aislados obtenidos por dispersión directa a pH 10 - 11 (proteínas verdes, lisina disponible 2,2 g/16 g N) y en presencia de  $\text{SO}_3\text{Na}_2$  (proteínas blancas, 2,4 g/16 g N) (42).

f) Obtención del "aislado" de soja (escala de laboratorio)-  
Características físicas y analíticas- Cálculos previos en  
base a cómputo químico con fines de suplementación de pro-  
teínas de girasol con proteínas de soja ("aislados" mixtos)

Siendo la harina y por lo tanto el "aislado" proteico de gi-  
rasol, deficitarios en lisina (primer limitante) y bien nivelados  
en azufrados totales, se consideró la suplementación de este úl-  
timo por coprecipitación con proteínas de soja (rica en lisina  
y relativamente pobre en azufrados), calculando en base al cóm-  
puto químico las proporciones que en primera aproximación podrían  
dar mezclas complementarias.

A tal fin se procedió primero al análisis de la harina de  
soja comercial (harina cruda de extracción industrial para pre-  
paración de "aislados"), a la obtención del "aislado" correspondien-  
te y a su examen analítico. Estas experiencias permitieron obser-  
var cifras de rendimiento, condiciones de máxima precipitación  
y valores de lisina disponible y de aminoácidos azufrados tota-  
les a utilizar en los cálculos anteriormente mencionados (Tabla  
7).

Los valores registrados para la composición de la harina es-  
tán en concordancia con los resultados señalados en literatura  
(19) (48) (49) (50).

También figuran los valores logrados para los "aislados" de  
soja obtenidos a pH isoelectrico (4,5) a partir de la harina in-  
dustrial, su contenido en nitrógeno, en lisina disponible y azu-  
frados totales, operando a distintos valores de pH de dispersión  
(7,0 y 10,0 respectivamente). Si bien es conocido que los con-

TABLA 7

COMPOSICION GENERAL DE LA HARINA DE SOJA (x)

Humedad %	Cenizas %	Nitrógeno %	Proteína % (N x 6,25)	Fibra cruda %	Lisina disp. g / 16 g N	Extracto en eter etílico
8,40	7,42 btc	8,35 btc	52,19 btc	2,15 btc	6,26	1,09 btc
--	8,10 sss	9,12 sss	57,00 sss	2,35 sss	--	1,19 sss

AISLADO DE HARINA DE SOJA

Extracción a N % harina	N extraído % harina	N % total en harina	Pend. en ais. % harina	Nitrógeno % ais.	Prot. % (N x 6,25)	Lisina disp aislado g / 16 g N.	
pH 7,0	8,35	6,96	83,35	36,45	14,66	91,62	6,50
pH 10,0	8,35	6,96	83,35	38,63	14,31	89,14	6,35

(x) Provisita por la firma "Molinos Rio de la Plata S.A." (harina cruda de extracc, hezano).

tenidos en aminoácidos esenciales presentan variación entre "aislados" obtenidos comercialmente según el procedimiento de preparación, los aquí logrados registran en promedio (para las distintas partidas) valores superiores en lisina disponible a los mencionados en literatura (51) (6,3 - 6,5; de literatura 5,4 a 5,7 g lis/16 g N).

Se observan valores prácticamente iguales para rendimientos en proteínas y en lisina disponible correspondientes al "aislado" de soja obtenido a partir de la harina extraída a pH 7,0 respecto de la extraída a pH 10,0 (condición favorable ya que el proceso de obtención de los "aislados" mixtos opera también a pH 7,0 en la dispersión del material nitrogenado de ambas fuentes).

La literatura también hace mención de la elevada dispersibilidad de las proteínas de soja extraídas a partir de la harina cruda (hexano), con un perfil de solubilidad (curva de nitrógeno dispersado versus valores de pH del medio) que muestra cifras casi constantes entre pH 7,0 - 11,0 (6) (51).

Este comportamiento es muy diferente al que se observa en la dispersión del material nitrogenado de la harina de pepa de girasol, donde solo se hace significativa a valores de pH superiores a 10,0 (12).

Como complemento, se incluyen en los análisis de composición general de la harina y del "aislado" de soja las siguientes determinaciones (ver Parte Experimental) : pérdida por calentamiento a 100°; cenizas; hidratos de carbonototales; fósforo total y de ácido fítico y calcio, cuyos valores promedio figuran en la Tabla 10.

A partir de estas consideraciones, el objetivo del trabajo fue estudiar el efecto del agregado de distintos niveles de proteína de soja en la composición de "aislados" mixtos obtenidos por coprecipitación con proteínas de girasol.

La Tabla 8 agrupa el conjunto de valores de cómputo químico calculados en base a los datos de aminoácidos esenciales limitantes de las fuentes proteicas mencionadas, como una base hacia una probable suplementación.

Teniendo en cuenta la deficiencia en lisina de que adolecen las proteínas de girasol, esta sería balanceada por el contenido relativamente alto que ocurre en las de soja, mientras que el nivel satisfactorio de azufrados totales de las primeras se vería poco afectado dentro de un cierto rango de combinaciones de ambas proteínas.

Sobre esta base y teniendo en cuenta los valores correspondientes de lisina disponible de los "aislados" proteicos de ambas fuentes se han calculado los cómputos químicos (g de aminoácido esencial en proteína x 100/ g de aminoácido esencial FAO) (52) que muestran una suplementación gradual creciente a medida que aumenta el porcentaje de proteína de soja en el "aislado" mixto, cubriéndose los requerimientos para dicho aminoácido esencial prácticamente al nivel de 70 % de proteína de soja y 30 % de proteína de girasol. No obstante, para esa proporción el coprecipitado mixto sería ya deficiente

TABLA 8

COMPUTO QUIMICO CALCULADO PARA DISTINTOS AISLADOS MEZCLA DE GIRASOL Y SOJA

Proteína de soja %	0	30	40	50	60	70	100
Proteína de girasol %	100	70	60	50	40	30	0
Lisina disponible (a)	52,7	72,3	80,4	85,4	92,0	98,5	100
Lisina disponible (b)	64,0	80,2	85,7	91,1	96,5	100	100
Azufrados totales (c)	100	92,0	88,0	84,0	80,5	76,8	65,7

(a) Lisina disponible del aislado obtenido operando con remoción previa de ác. clorogénico (2,89)  
 (b) Lisina disponible del aislado obtenido operando sin remoción previa de ác. clorogénico (3,52)  
 (c) Azufrados totales girasol: 3,6 ( experimental, Tesis A. O. Rucci, 1972).  
 Azufrados totales soja: 2,3 ( literatura ).

(a) y (b) Lisina disponible soja: 6,5 g / 16 g N ( valor experimental ).



en azufrados, lo que limitaría su aprovechamiento. Aparentemente, de los datos de la Tabla 9 (teóricamente al menos), las mezclas más satisfactorias estarían comprendidas en el rango de 40/60; 50/50 y 60/40 respectivamente.

Estos valores cubrirían prácticamente el mismo ámbito para coprecipitados mixtos logrados a través de los dos procedimientos diferentes de obtención de proteínas blancas de girasol (ver páginas N° 70 - 71) :

a) partiendo de la harina de pepa de girasol, previamente agotada de ácidos clorogénicos, a la que se incorporó la proporción correspondiente de harina de soja, para continuar con la dispersión (pH 8,0 - 11,0) y coprecipitación de proteínas al valor de pH isoeléctrico (4,4 - 4,6).

b) operando la dispersión a pH 7,0 directamente sobre la mezcla de ambas fuentes, procediendo luego a la coprecipitación al valor de pH isoeléctrico (4,4 - 4,6).

Como puede observarse, se registra un mejor valor de lisina disponible paralelo a un rendimiento ligeramente superior para los coprecipitados obtenidos de acuerdo al segundo tipo de procedimiento (Tabla 9). Con anterioridad se había señalado que el "aislado" de girasol obtenido por el método de dispersión directa a partir de la harina, mostraba un valor ligeramente superior en lisina disponible respecto de aquel del procedimiento de dispersión de material nitrogenado sobre harina previamente liberada de ácidos clorogénicos, situación que se sigue cumpliendo para el caso de los "aislados" mixtos en la suplementación con distintos niveles de proteína de soja.

TABLA 9

COPRECIPITADOS DE GIRASOL - SOJA

Proteína soja %	Proteína girasol %	Rend. extracción % N / N tot.	Rend. en aislado g prot./100 g har.	N del coprecipitado %	Lista disp. g / 16 g N copp.
50	50(a)	75,4	32,4	14,99	5,18
50	50(b)	80,1	34,2	15,27	4,97
60	40(a)	81,2	35,6	14,43	5,45
60	40(b)	81,4	33,8	15,54	4,91
40	60(a)	76,5	32,9	15,18	4,74
40	60(b)	82,6	29,9	15,56	4,36
70	30(a)	78,8	35,7	14,94	5,43
30	70(a)	75,9	31,8	15,35	4,36

A fin de complementar el cuadro de suplementaciones y operando según este último procedimiento de obtención de coprecipitados, se ensayaron mezclas con las siguientes proporciones de proteínas finales 70/30 y 30/70 % respectivamente (Tabla 9).

Cabe señalar que estos cálculos se han hecho en base a valores experimentales de contenido en nitrógeno total (proteína cruda) de los "aislados" proteicos finales de ambas fuentes y de rendimientos que suelen lograrse en dichos procesos de aislamiento, permitiendo así estimar la cantidad de los materiales de partida a mezclar que representarían las proporciones deseadas para ambas proteínas. Es decir, que implica el conocimiento del contenido de nitrógeno total aportado por cada "aislado" y el rendimiento de los mismos respecto del material de partida (harinas correspondientes).

Un ejemplo facilita la comprensión del cálculo mencionado, siendo de aplicación general para todas las combinaciones de mezclas planeadas.

El "aislado" de girasol (seco a 45°, vacío) obtenido a partir de la harina de pepa industrial (procedimiento directo) rinde 15,7 % de nitrógeno total ( $15,7 \times 6,25 = 98,1$  % proteína cruda).

El "aislado" de soja (seco a 45°, vacío) obtenido a partir de la harina cruda industrial rinde 14,7 % de nitrógeno total ( $14,7 \times 6,25 = 91,6$  % proteína cruda).

Para lograr una mezcla que contenga aproximadamente el 40 % de proteína de girasol y el 60 % de proteína de soja, se necesitan aislar respectivamente  $\frac{100 \times 40}{98,1}$  g de "aislado" proteico de girasol y  $\frac{100 \times 60}{91,6}$  g de "aislado" proteico de soja en el coprecipitado mixto. Teniendo en cuenta las pérdidas que se registraron a través del pro-

cedimiento de obtención de los "aislados" (dispersión, precipitación, purificación y secado final) esas cantidades estarían representadas por las siguientes proporciones de material de partida (harinas) :

- 100 g de harina de pepa industrial de girasol rinden, en promedio, 21,9 g de "aislado" seco a 45°.
- 100 g de harina cruda de soja rinden, en promedio, 36,4 g de "aislado" seco a 45° .

Por lo tanto  $\frac{100 \times 40 \times 100}{98,1 \times 21,9}$  g representaría la proporción a pesar de harina de pepa de girasol, y  $\frac{100 \times 60 \times 100}{91,6 \times 36,4}$  g la que correspondería a la harina cruda de soja.

Es decir que para lograr un "aislado" mixto de girasol conteniendo 60 % de proteína de soja se necesitaría partir de 186,2 g de harina de girasol y de 179,9 g de harina cruda de soja.

Todo ello sobre la base teórica de una supuesta composición constante aportada por cada fuente en el momento y condiciones de la coprecipitación, ya que las estimaciones previas fueron hechas sobre los productos "aislados" y purificados en prácticamente las mismas condiciones experimentales que operarán sobre los "aislados" mixtos.

Los valores de lisina disponible encontrados fueron muy concordantes con los predichos por cálculo de cómputo químico correspondiente, mostrando un mayor nivel con el incremento en el porcentaje de proteína de soja en la mezcla: 4,36; 4,74; 5,18; 5,45 y 5,43 g lis/16 g N respectivamente, para contenidos en nitrógeno total en precipitados mixtos muy similares (14,9 a 15,6 %).

Estos resultados muestran claramente el efecto gradual suplementario de este aminoácido proporcionado por la harina de soja al ser

incorporada en mayor proporción en la mezcla.

No obstante y según los cálculos antes mencionados para el nivel de aminoácidos provistos por ambas fuentes, se limitaría su aprovechamiento con el incremento del porcentaje de soja en la mezcla para proporciones superiores al 50 % de la misma.

La Tabla 10 ilustra además sobre valores de rendimiento y características físicas y analíticas de los distintos "aislados" mixtos obtenidos. Con fines comparativos, se incluyen los datos sobre los "aislados" de ambas fuentes.

La determinación de cenizas muestra un valor máximo para el "aislado" de soja (0,48 %) siendo menores los niveles para todos los de las mezclas y girasol solo (0,27 - 0,35 %). El contenido en fósforo total evidencia una definida tendencia al aumento a medida que se incrementa el porcentaje de proteína de soja en el "aislado" mixto (0,72 - 1,05 %), mientras que el nivel de fósforo de ácido fítico oscila dentro de un estrecho margen para todos ellos (0,16 - 0,19 %); de ahí que el contenido en fósforo remanente (diferencia entre fósforo total y fósforo de ácido fítico) también muestra una tendencia creciente a partir del "aislado de girasol (100 %) al de soja (100%), a través de los distintos "aislados" mixtos, en razón del predominio de fósforo total para la proteína de soja.

Similarmente igual tendencia se observa en el contenido en hidratos de carbono totales, cuyo mayor valor se registró para el "aislado" de soja (4,55 %) y el menor para el de girasol (2,26 %).

Bajo las condiciones en que se llevaron a cabo los presentes ensayos, el agregado de soja (dentro de ciertos límites) tuvo como resultado el mejor nivel de lisina disponible y aminoácidos azufrados totales, beneficio que quedaría a confirmar a través de pruebas biológicas con animales de pexperimentación en el sentido de cumplirse una correlación positiva entre el contenido en lisina disponible del suplemento (soja) y el valor nutritivo evaluado (REP,

TABLA 10 -- COPRECIPITADOS GIRASOL -- SOJA

	pérdida 100°C	Cenizas (sss)	% N (sss)	P total (sss)	P de fítico (sss)	P <sub>tot</sub> - P <sub>fítico</sub> (sss)	H de C (sss)
Girasol	8,20	0,35	16,99	0,72	0,19	0,53	2,26
G <sub>70</sub> - S <sub>30</sub>	6,15	0,26	16,03	0,84	0,19	0,65	2,72
G <sub>60</sub> - S <sub>40</sub>	8,42	0,37	16,36	0,87	0,17	0,70	2,95
G <sub>50</sub> - S <sub>50</sub>	7,36	0,27	16,32	0,93	0,19	0,74	2,81
G <sub>30</sub> - S <sub>70</sub>	7,06	0,33	16,40	0,89	0,16	0,73	3,36
Soja	4,51	0,47	15,54	1,05	0,19	0,86	4,55

NPU, etc.).

g) Obtención de "aislados proteicos de leche descremada industrial. Características analíticas. Intento de suplementación de proteínas de girasol con cantidades crecientes de proteína de leche descremada en base a cálculos de cómputo químico.

Abundante información bibliográfica indica que las proteínas de la leche son fuente excelente para la prevención, tratamiento y cura de la desnutrición proteica. Más aún, en razón de la alta y eficiente utilización de las mismas es que el complejo proteico de la leche se utiliza (al igual que su principal componente: caseína) como proteína de referencia en la evaluación de la calidad nutricional de otras proteínas de origen animal o vegetal (21)

Otra observación de importancia es que la calidad nutricional de dietas formuladas en base a la combinación adecuada de una proteína vegetal (harina o "aislado") y leche descremada o caseína, resultan tan buenas como aquellas dietas diseñadas exclusivamente con proteína de leche (53).

Se consideró de interés estudiar el aprovechamiento de la leche fluida, descremada industrialmente, como fuente rica en lisina para mejorar el valor nutritivo de las proteínas de harina de girasol a través de la coprecipitación de ambas.

Para ello se dispuso resolver a escala de laboratorio, las condiciones óptimas de dispersión y coprecipitación de las proteínas mencionadas (etapa de incorporación de la leche descremada, pH de máxima precipitación, purificación y secado del precipitado mixto obtenido).



Por otra parte y en base a cálculos previos se consideraron los distintos porcentajes de proteínas de leche a incorporar a las de girasol dispersas en medio acuoso, a fin de lograr "aislados" mixtos homogéneos de mayor valor nutritivo (Tabla 11).

Una serie de ensayos previos proporcionó los datos requeridos para dichos cálculos. La leche descremada industrial (provista por la firma Kasdorf S.A.) conteniendo 2,86 g de proteína cruda por 100 mililitros (N x 6,25 - 0,458 % de nitrógeno total); rindió 2,50 g de un "aislado" isoeléctrico (pH 4,4 - 4,6 : pH isoeléctrico de su principal componente proteico: caseína), purificado y seco a 45°, por 100 ml de leche descremada que representa el 87,4 % del contenido proteico en el producto de partida.

En una primera experiencia se realizó la dispersión del material nitrogenado de la harina de girasol directamente en leche descremada fluida (usada en lugar de agua), relación proteína de girasol 70 % - proteína de leche 30 %, al valor de pH 7,0 (de acuerdo con la técnica elegida en la obtención de proteínas de girasol, a fin de no producir cambios de color por oxidación de compuestos polifenólicos) y a temperatura ambiente, se realizaron cinco extracciones de 30 minutos cada una con relación harina : solvente 1 : 5.

Durante y después de concluida la etapa de dispersión se observó la formación lenta de un precipitado blanco que fue removido en parte junto al material fibroso de la harina de girasol en la etapa de centrifugación. Como la precipitación continuaba ocurriendo en forma lenta aún después de centrifugar y mientras se procedía a una nueva dispersión de la harina de partida (ver Parte Experimental), se volvió a centrifugar el total del material extraído antes de pro-

TABLA 11

COMPUTO QUIMICO CALCULADO PARA DISTINTOS AISLADOS MEZCLA DE GIRASOL Y LECHE DESCREMADA

Proteína leche descremada %	0	20	30	40	50	60	70	100
Proteína girasol %	100	80	70	60	50	40	30	0
Lisina disponible (a)	52,7	--	88,7	100	100	100	100	100
Lisina disponible (b)	64,0	85,7	96,6	100	100	100	100	100

(a) Lisina disponible aislado de girasol obtenido operando con remoción previa de ác. clorogénico ( 2,89 g/ 16 g )

(b) Lisina disponible aislado de girasol obtenido operando sin remoción previa de ác. clorogénico ( 3,52 g/ 16 g )

(a) y (b) Lisina disponible aislado leche descremada: 9,5 (valor experimental). gramos/ 16 g N.

ceder a la precipitación (a fin de partir de un líquido límpido).

A partir de este momento y después de juntar los extractivos, se precipitaron las proteínas mixtas al valor de pH isoelectrico (4,4 - 4,6) y a temperatura ambiente.

El "aislado" obtenido, de granulometría muy fina, no sedimentó rápidamente, como es usual, y una vez purificado (lavados acuosos a pH isoelectrico y alcohólicos) y secado (vacío 45°), mostró un rendimiento muy bajo (1,96 % de la mezcla de partida) frente al esperado por cálculo en base a los de ambas fuentes separadamente. Por otra parte el elevado tenor en lisina disponible (8,42 g lis/16 g N) de este "aislado" mixto no correlacionaba tampoco con el valor calculado para la mezcla, sugiriendo que en su composición participaban en alta proporción las proteínas de leche.

Al repetir la experiencia solo se centrifugó inmediatamente después de extraído el material nitrogenado y no después de reunidos los líquidos de las etapas de dispersión de material nitrogenado de la harina de girasol. En consecuencia el rendimiento en "aislado" mixto subió (3,55 %) , no obstante continuaba siendo bajo con respecto al dato esperado (5,20 %).

Podrían señalarse dos factores como responsables de esta situación particular: la presencia de ácidos clorogénicos de la harina de girasol extraíbles por el medio dispersante (leche descremada fluida) que interaccionarían con las miscelas de caseína de esta última o la presencia de iones  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  abundantes en el medio dispersante que reducirían la solubilidad en agua de las proteínas de girasol.

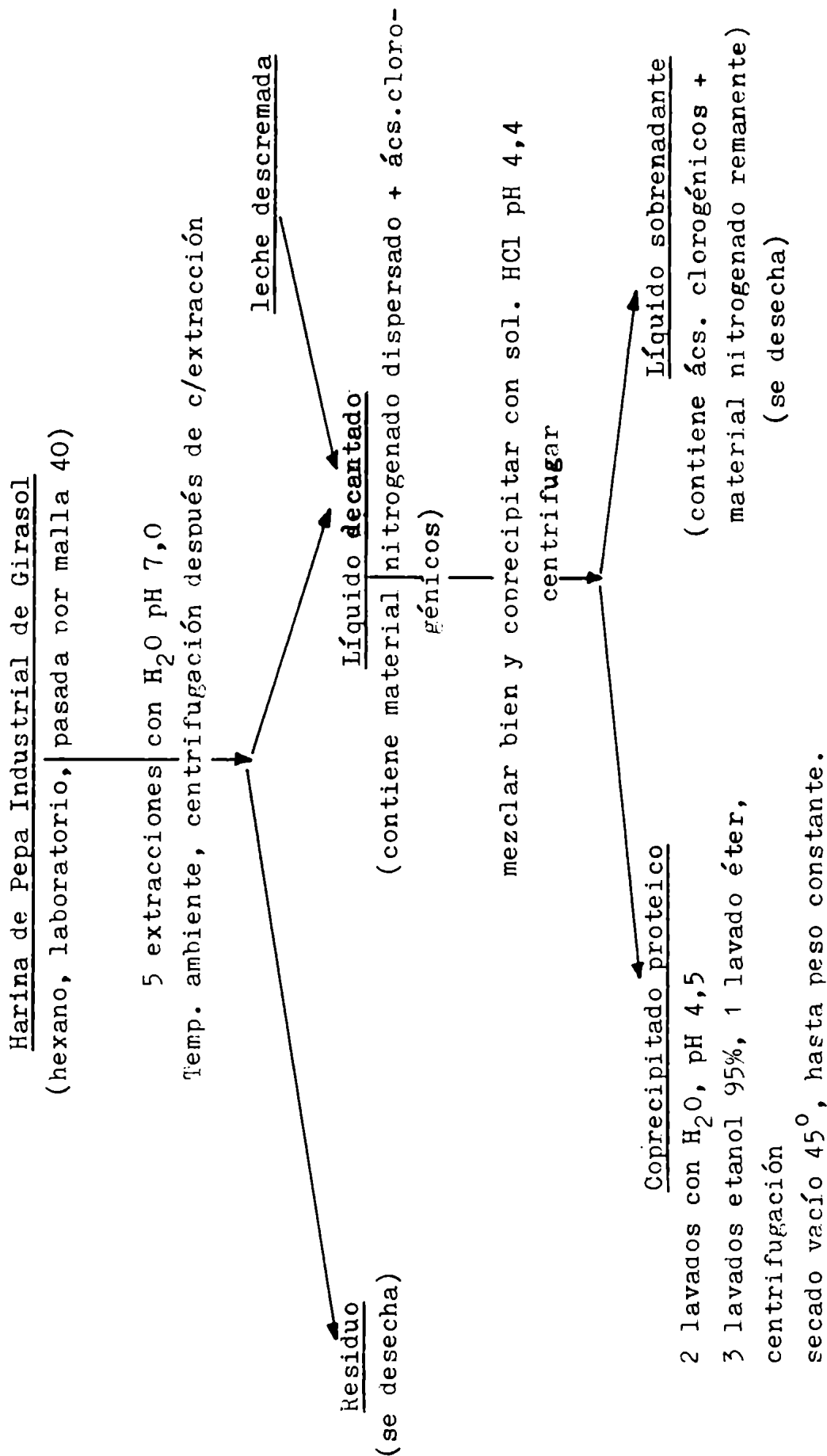
Una evaluación de rendimientos en coprecipitado mixto (para una misma proporción de mezcla de proteína de girasol y de pro-

teína de leche descremada 70:30) llevó a reforzar la última suposición, que por otra parte está soportada por observaciones similares señaladas en literatura, acerca de la influencia de los iones antes mencionados (particularmente  $\text{Ca}^{++}$ , agente precipitante). El alto rendimiento en el coprecipitado de proteínas mixtas (a pH isoeléctrico) obtenido a partir de harina de girasol dispersada en medio acuoso conteniendo caseína comercial (caseína clorhídrica comercial dispersada previamente en agua a pH 10,0 que luego se llevó a pH 7,0 antes de la extracción con harina de girasol), como el logrado por coprecipitación de proteínas provenientes de harina de girasol dispersada previamente en agua (pH 7,0) al que luego se incorporó leche descremada fluida industrial, así lo demuestran. En el primer caso, no existen en el medio dispersante cantidad suficiente de iones  $\text{Ca}^{++}$  (la caseína comercial se obtiene por precipitación de esta proteína en medio ácido y la fracción soluble de calcio se elimina con el suero) para provocar una precipitación anticipada.

Ello decidió en lo sucesivo y para cualquier proporción de proteínas de girasol y de leche en la mezcla, operar en una etapa previa la dispersión del material nitrogenado del girasol en agua a pH 7,0 y luego incorporar la leche descremada, para proceder seguidamente a la coprecipitación a pH isoeléctrico. Segun este procedimiento (ver esquema adjunto, figura N<sup>o</sup>2) se obtuvo un "aislado" mixto blanco con un rendimiento del orden de 5,20 % de mezcla (para la relación 70 % proteína de girasol: 30 % de proteína de leche).

Bajo las mismas condiciones se llevó a cabo la obtención de "aislados" mixtos coprecipitados a partir de distintos niveles de

Esquema de obtención de coprecipitados girasol - leche descremada  
(figura 2)



suplementación con proteína de leche, según puede apreciarse en la Tabla 12.

Se consideró de interés incluir en el esquema los rendimientos y características físicas y químicas de los productos finales purificados y secos a 45° (vacío).

También aquí y a los efectos de una mayor información, se determinaron los contenidos en: cenizas, pérdida a 100° (vacío), hidratos de carbono totales, fósforo total y fósforo de ácido fítico, lisina disponible, calcio y azufrados totales de los "aislados" mixtos obtenidos (ver Parte Experimental). Estos valores se reúnen en la Tabla 12.

Puede observarse un descenso apreciable en hidratos de carbono totales a medida que aumenta el nivel de proteínas de la leche descremada en el coprecipitado. La serie de "aislados" muestra un nivel bastante parejo en fósforo total, con un descenso discreto en fósforo de fítico cuyo origen está en la proteína de girasol, siendo negativo el ensayo para leche sola. El contenido en calcio muestra una tendencia creciente a mayores niveles de proteína de leche descremada en la mezcla. El valor más significativo reside en el contenido en lisina disponible que aportan las proteínas de la leche, con un descenso apreciable a mayores proporciones de proteína de girasol en la mezcla.

Aparentemente la mezcla 70 % de proteína de girasol : 30 % de proteína de leche descremada ( o mejor aún 65 % - 35 %) serían las que cubrirían los niveles considerados como satisfactorios para responder a las necesidades de este aminoácido esencial en la dieta proteica humana.

TABLA 12

COPRECIPITADOS GIRASOL -- LECHE DESCREMADA

Muestra	% H <sub>2</sub> O	% cenizas sss	% N sss	% P tot sss	H de C sss	lis disp. g/16 g N	% Ca sss	% P fítico sss
Leche descremada (aislado)	6,82	0,406	14,42	0,71	0,60	10,40	0,029	—
G <sub>60</sub> - LD <sub>40</sub>	7,77	0,496	16,53	0,72	1,51	5,78	0,027	0,17
G <sub>70</sub> - LD <sub>30</sub>	9,56	0,384	15,85	0,69	1,79	4,84	0,026	0,19
G <sub>80</sub> - LD <sub>20</sub>	9,77	0,488	16,27	0,68	2,64	4,25	0,025	0,22
Girasol	8,20	0,351	16,20	0,72	2,27	3,30	—	0,23
Leche descremada llofilizada	2,61	8,66	5,55	0,86	49,4		1,25	—

También en el presente caso, la evaluación biológica (animales de experimentación) podría confirmar la suplementación señalada.

Cabe hacer mención que el incremento de lisina fue significativo en todas las combinaciones ensayadas. Desde el punto de vista económico, ello representa un ahorro para la fuente de mayor costo (proteína de leche descremada) cuyo efecto se hace notar a niveles tan bajos como 20 % y probablemente menores.

La comparación de los datos arriba mencionados con los valores logrados para leche descremada liofilizada (fuente de partida) permite deducir que gran parte de las materias minerales y de los hidratos de carbono se eliminan en los líquidos sobrenadantes, separados por centrifugación luego de la precipitación de las proteínas mixtas. La determinación cuantitativa de lisina disponible (método con fluor 2,4 dinitrobenceno; ver Parte Experimental) ofreció serias dificultades por la presencia de una alta concentración en hidratos de carbono (lactosa, reductor - browning no enzimático) no permitiendo su evaluación correcta.



PARTE III

PARTE EXPERIMENTAL

### PARTE III

#### PARTE EXPERIMENTAL

##### 1) Materias primas. Obtención de harinas: girasol y soja. Leche descremada. Análisis de composición general

La semilla entera, la pepa industrial y la harina industrial ("lex") o "expeller" de semilla de girasol agotado por hexano, utilizadas como materias primas, fueron provistas por la firma "Molinos Río de la Plata".

La harina industrial o "lex", procede del tratamiento de la pepa industrial de girasol a la que previamente se sometió a limpieza, descascarado parcial y secado rápido (80 - 90°). El proceso abarca un calentamiento a 105- 108° por 25 min., pasajes por prensas a tornillo (a la misma temperatura) de donde emerge el "expeller" a unos 100°. Luego de un enfriamiento rápido a 40°, se extrae con hexano técnico (extractor continuo) por 4 hs. La harina resultante ("lex") se seca durante 20 min. a 100 - 105° y se deja enfriar a temperatura ambiente.

##### Obtención de harinas de extracción (en laboratorio)

a) Harina de pepa industrial: aproximadamente 2500 a 3000 g de pepa industrial de semilla de girasol, una vez molida, se agotaron en Soxhlet por hexano técnico durante 12 hs. Se dejaron secar al aire, remolieron, agotaron nuevamente por hexano (Soxhlet), secaron al aire y finalmente en estufa de vacío a 45 - 50° (elimina-

ción del solvente remanente), se remolió en molinillo y guardó en frasco con buen cierre, hasta el momento de su análisis.

b) Harina de pepa descascarada : a partir de la pepa industrial de girasol se realizó el descascarado por flotación en agua separando las cáscaras y semillas enteras que sobrenadan. Se repite la operación y luego se secaron las pepas en estufa de vacío (en capa fina) a 45 - 50°. Se molieron y extrajeron con hexano en Soxhlet siguiendo los pasos mencionados anteriormente.

c) Harina de pepa totalmente descascarada : se separó manualmente la pepa de la cáscara, y se procedió a la obtención de la harina según la técnica antes indicada.

d) Harina de semilla integral : se obtuvo a partir de la semilla entera de girasol (sin ningún pretratamiento) siguiendo el procedimiento señalado en el ítem a).

Las dos últimas harinas mencionadas fueron empleadas solo para algunas determinaciones de especial interés.

Las harinas obtenidas fueron tamizadas a través de malla 40 y se determinó sobre ellas, al igual que sobre las materias primas de partida los contenidos en humedad, cenizas, nitrógeno total, fibra cruda y extracto en eter etílico de acuerdo a las siguientes técnicas :

Humedad: Se efectuó sobre aproximadamente 1 g de muestra, en estufa de vacío a 100°, hasta peso constante (AOAC, Official Method 13.3, 1950).

Cenizas: Se obtuvieron por incineración de aproximadamente 1 g de muestra en mufla (500 - 550°) hasta lograr un residuo prácticamente

blanco y de peso constante (AOAC, Official Method 13.6, 1950).

Nitrógeno total: Se determinó sobre 0,2 - 0,3 g de harina según el macrométodo de Kjeldahl (AOAC, Official Method 2.24, 1950), efectuando la digestión con mezcla  $H_2SO_4$ ,  $CuSO_4$  y  $K_2SO_4$ .

Fibra cruda: Se realizó sobre harina (material cuyo contenido en aceite es inferior al 1 %, según lo requerido para aplicar la técnica AOAC, Official Method 22.038, 1965), operando por el método de la doble hidrólisis ácida y alcalina.

Extracto en eter etílico: Se efectuó sobre aproximadamente 15 g de harina (material previamente extraído por hexano) agotando en Soxhlet con eter etílico.

Lisina disponible y contenido en ácidos clorogénicos: Al margen de las determinaciones que hacen a su composición general, las harinas mencionadas se examinaron en su contenido en lisina disponible y ácidos clorogénicos con fines comparativos. Se aplicaron las siguientes técnicas:

lisina disponible: Conkerton y Frampton.

ácidos clorogénicos: método adaptado por el INTI.  
cuyo detalle experimental figura más adelante.

Los valores hallados, expresados % de harina tal cual, se refirieron a harina libre de humedad.

En todos los casos se usaron los valores promedio de determinaciones efectuadas por duplicado o triplicado.

### Harina de soja

Esta harina procedente del Brasil fue provista por la firma

"Molinos Río de la Plata".

Para su obtención se sometió al poroto de soja a limpieza y descascarado. Los cotiledones se aplastaron en forma de hojuela y luego se realizó la extracción del aceite con hexano técnico. El residuo así obtenido fue desolventizado y luego molido a malla 100, sin someterlo a ningún proceso de tostación (máxima solubilidad de proteínas, reservado industrialmente para la obtención de "aislados" proteicos).

Sobre este producto se realizaron las distintas determinaciones de composición general y de lisina disponible, a los fines de su caracterización. Para ello se operó según las técnicas señaladas para las harinas de girasol.

#### Leche descremada

Esta materia prima fue provista por la firma Kasdorf.

A fin de obtener una muestra representativa para el análisis de composición general se separaron alícuotas de todas las partidas utilizadas, se liofilizaron y luego se procedió al mezclado y homogeneización de ellas. Sobre la muestra así obtenida se realizaron las determinaciones de ~~humedad~~ humedad, cenizas, nitrógeno total, calcio, fósforo total e hidratos de carbono totales.

Las tres primeras determinaciones se llevaron a cabo por los métodos antes mencionados, mientras que las restantes se hicieron siguiendo las siguientes técnicas:

calcio: AOAC, Official Method 13014; 1965.

fósforo total: Fiske Subarow

hidratos de carbono: Mundson y Walker, AOAC, Official Method 29039; 1965  
cuyos detalles experimentales se mencionan más adelante.

## 2) Ensayos previos al aislamiento de proteínas blancas. Ajuste de las condiciones óptimas de extracción y precipitación

### 2.1) Equipos y reactivos

En los ajustes de pH se usaron soluciones de NaOH y HCl 5 N y las respectivas soluciones diluidas (0,5 N). Se controlaron los valores de pH con electrodo de vidrio (pH-meter E 516 - Titriskop Metrohm).

La extracción del material nitrogenado y la precipitación de las proteínas se efectuó a temperatura ambiente (20 - 25°).

En las etapas de extracción y precipitación se utilizó un agitador mecánico de vidrio y en las separaciones por centrifugación se operó con una centrífuga Universal Junior III S o Macrofuge a 2800 rpm.

En la etapa de purificación de las proteínas precipitadas, se usó en todos los casos agua destilada previamente ajustada al valor de pH correspondiente de precipitación. En los lavados siguientes se utilizó etanol 95 % (destilado) y eter etílico puro (destilado).

### 2.2) Técnica de dispersión de proteínas. Elección de la materia prima de partida y del medio de extracción más adecuado para la remoción de los ácidos clorogénicos y compuestos polifenólicos relacionados presentes en la harina de girasol

Se utilizaron como materias primas de partida las siguientes: "lex", harina de pepa industrial y harina de pepa descascarada, decidiendo en base a los rendimientos de extracción y precipitación obtenidos cual de ellas resultaría más adecuada.

### 2.2.1) Remoción de ácidos clorogénicos

En un tubo de centrífuga de 600 ml de capacidad, provisto con agitador, se colocaron 20 g de muestra suspendiéndolos en 100 ml del solvente en ensayo agitándose permanentemente durante media hora.

Las distintas condiciones estudiadas fueron:

- a) medio de extracción: agua destilada, pH 6,5 - 6,6 ----- temperatura ambiente.
- b) medio de extracción: agua + HCl pH 4,4 ----- temperatura ambiente
- c) medio de extracción: buffer cítrico - citrato de Na ----- temperatura ambiente.
- d) medio de extracción: agua + HCl pH 4,4 ----- temperatura 45°, mantenida durante todo el período necesario por un circulador de agua con termostato.

Se centrifugó la suspensión obtenida durante 30 min. a 2800 rpm.

El líquido sobrenadante se trasvasó a un matraz aforado (1000 ml) decantándolo a través de malla metálica de acero inoxidable (200 mallas/cm).

El residuo resultante es sometido a una nueva extracción en idénticas condiciones a las mencionadas inicialmente y se repiten las operaciones de extracción y centrifugación hasta llegar a un total de cinco, reuniendo en todos los casos los líquidos sobrenadantes decantados en el mismo matraz y llevando finalmente a volumen.

Se midieron alícuotas (por triplicado) para determinar el porcentaje de material nitrogenado dispersado junto con la remoción

de ácidos clorogénicos.

### 2.2.2) Dispersión del material nitrogenado

Se operó sobre el residuo obtenido después de la primer etapa de remoción de ácidos clorogénicos, suspendiéndolo en 100 ml de agua destilada (relación harina : agua 1:5) y llevando al valor de pH adecuado para la dispersión con NaOH 5 N o 0,5 N.

Se realizaron tres extracciones aumentando el pH con el número de extracciones, desde 8 hasta 11, con agitación permanente, durante 30 min. y a temperatura ambiente o a 45° de acuerdo a las condiciones utilizadas en la primer etapa.

La suspensión obtenida se centrifugó por 30 min. a 2800 rpm. Los líquidos sobrenadantes fueron trasvasados a través de malla de acero inoxidable (200 mallas/cm) a un matraz aforado de 500 ml y finalmente se llevó a volumen.

Se midieron alícuotas (por triplicado) a fin de determinar el rendimiento en material nitrogenado dispersado a partir de las distintas materias primas y con las diferentes condiciones empleadas.

### 2.3) Técnica directa de dispersión de material nitrogenado sin remoción previa de ácidos clorogénicos

Se operó siguiendo las condiciones indicadas por un procedimiento desarrollado en INTI (42).

En un tubo de centrífuga de 600 ml de capacidad, provisto de un agitador, se colocaron 20 g de muestra suspendiéndolos en 100 ml de agua destilada a pH 7,0; agitando continuamente durante media hora, a temperatura ambiente. Luego se centrifugó la suspensión por



30 min. a 2800 rpm. La solución sobrenadante se decantó a través de malla de acero inoxidable (200 mallas/cm) recogién dose en un matraz aforado de 1000 ml.

Sobre el residuo obtenido se precedió nuevamente a la dispersión del material nitrogenado en idénticas condiciones a las mencionadas anteriormente, realizando luego la centrifugación y decantación del líquido sobrenadante. Esta operación se repitió hasta llegar a un total de cinco veces, reuniendo los líquidos obtenidos en el mismo matraz y llevando finalmente a volumen.

El residuo final de estas operaciones fue desechado.

En una nueva experiencia se llevó a cabo toda la técnica anteriormente descrita pero a una temperatura de 45°, al igual que usando agua destilada a pH 7,5 como medio dispersante, y a temperatura ambiente o a 45°; a fin de seleccionar las condiciones óptimas para la dispersión de material nitrogenado y obtención de proteínas blancas.

En todos los casos se tomaron tres alícuotas del líquido de extracción final, para determinar el contenido en nitrógeno total, a fin de poder evaluar el rendimiento del procedimiento.

#### 2.4) Precipitación

Se llevó a cabo agregando a los líquidos de extracción solución de ácido ClH 5 N y ajuste final al valor de pH de máxima precipitación (4,4) con HCl diluido (0,5 N), a temperatura ambiente y con agitación constante hasta llegar a un valor de pH estable de 4,4.

Se obtuvo un precipitado esponjoso, que decantaba rápidamente, y se lo separó por centrifugación, desechando el líquido sobrenadante. Inmediatamente después y por 2 veces consecutivas fue la-

vado con agua destilada previamente ajustada al valor de pH 4,4 (relación precipitado:agua 1:20), resuspendiendo el precipitado por agitación fuerte y centrifugando después de cada lavado. Los líquidos sobrenadantes se desecharon.

Este procedimiento se siguió en igual forma ya sea partiendo del líquido de extracción obtenido por la técnica indicada en el ítem 2.2 o en el ítem 2.3.

### 2.5) Purificación

Los coágulos anteriores se lavaron por agitación enérgica y por tres veces consecutivas, con etanol 95 % (relación precipitado-etanol 1:20), a temperatura ambiente; lavando finalmente con eter etílico (relación precipitado-eter aproximadamente 1:10).

Se centrifugó después de cada lavado, obteniéndose así las proteínas purificadas de color blanco grisáceo y consistencia compacta.

### 2.6) Secado

Los precipitados se dejaron aproximadamente 12 horas en desecador y luego se extendieron en capa delgada y secaron a 45° (vacío). Se obtuvieron en forma de polvo fino, blanco y liviano.

Sobre las proteínas obtenidas se practicaron los análisis cuyos resultados han sido discutidos: pérdida a 100°, cenizas, nitrógeno total, lisina disponible, hidratos de carbono totales, fósforo total, fósforo de ácido fítico, calcio y ácidos clorogénicos.

3) Determinación del pH de máxima precipitación para las proteínas obtenidas de acuerdo a la técnica que opera con remoción previa de ácidos clorogénicos.

Se operó de acuerdo a la técnica de remoción de ácidos clorogénicos con agua destilada (pH 6,5 - 6,6) y dispersión del material nitrogenado en agua pH 8 a 11 y a temperatura ambiente, sobre 60 g de harina de pepa industrial de girasol y llevando los líquidos obtenidos durante la etapa de dispersión a un volumen final de 1500 ml, en matraz aforado.

Este líquido con el material nitrogenado dispersado, fue separado en alícuotas de 200 ml cada una y sobre el volumen restante se tomaron tres porciones de 20 ml cada una para determinar nitrógeno extraído.

Sobre las alícuotas de 200 ml se agregó solución de ácido HCl hasta llegar al pH de precipitación que se deseaba estudiar, siendo los valores de pH elegidos los siguientes: 3,5 - 4,0 - 4,2 - 4,4 - 4,6 - 4,8 - 5,0 - 5,2 - 5,5 y 5,8.

En todos los casos se separó el precipitado obtenido por centrifugación y el líquido sobrenadante se decantó a un matraz aforado de 250 ml llevándose a volumen. Se tomaron distintas alícuotas de acuerdo con el pH en estudio, para determinar la cantidad de nitrógeno soluble (sobrenadante) en cada uno de los casos.

Con los datos obtenidos se determinó la relación entre el nitrógeno sobrenadante y el porcentaje de nitrógeno extraído, lo que permitió construir la curva de valores de pH versus Nitrógeno sobrenadante y fijar el valor de pH isoeléctrico.

Esta experiencia se volvió a realizar pero utilizando la técnica de remoción de ácidos clorogénicos con agua + HCl pH 4,4 y

dispersión del material nitrogenado en agua pH 8 a 11; a temperatura ambiente. En este caso los valores de pH elegidos para la precipitación fueron: 4,2 - 4,4 - 5.0 - 5,5 y 5,8 y se siguieron los mismos pasos indicados anteriormente.

#### 4) Obtención del "aislado" proteico de soja a partir de harina cruda industrial. Elección del pH óptimo de extracción.

4.1) En un tubo de centrífuga de 600 ml de capacidad, provisto de agitador se colocaron 40 g de harina cruda de soja, dispersándolos en agua llevada en un caso a pH 7,0 y en otro a pH 10,0.

En ambas experiencias se realizó la extracción del material nitrogenado siguiendo los mismos pasos indicados para la dispersión de proteínas a partir de la harina de girasol, por el método que opera sin remoción previa de ácidos clorogénicos (ver ítem 2.3) o sea realizando 5 dispersiones sucesivas con agua destilada a pH 7,0 o 10,0 con centrifugación después de cada una y reuniendo los líquidos decantados en matraz aforado, llevando finalmente a volumen. Se tomaron tres alícuotas para determinar sobre ellas el porcentaje de nitrógeno extraído.

#### 4.2) Precipitación

Se lleva a cabo con solución de ácido HCl 5 N y luego con HCl diluido (0,5 N) para ajustar el pH al valor de máxima precipitación (4,4) agitando continuamente hasta obtener un valor de pH estable.

Se realizaron inmediatamente 2 lavados acuosos con agua llevada a pH isoeléctrico, seguidos de centrifugación y luego se continuó la purificación en iguales condiciones a las indicadas para proteínas de girasol.

#### 4.3) Secado

Se dejó en desecador durante 12 horas aproximadamente y lue-

go se secó (en capa fina) a  $45^{\circ}$  en estufa de vacío, hasta peso constante, obteniendo así el rendimiento en precipitado final.

La proteína así aislada y seca presentó color blanco crema y granulosidad fina. Los rendimientos se mencionaron en la Discusión y sobre la mezcla homogénea de las distintas partidas logradas se practicaron los análisis cuyos resultados han sido discutidos.

5) Obtención del "aislado" proteico a partir de leche descremada industrial.

5.1.) A partir de 4,0 litros de leche descremada industrial, se precipitaron las proteínas al valor de pH isoeléctrico (4,5) por agregado de solución de ácido HCl primero 5 N y luego diluída 0,5 N, con agitación permanente, hasta lograr un valor de pH constante.

Se centrifugó el precipitado obtenido, decantando y desechando el líquido sobrenadante.

Seguidamente se lavó el precipitado con agua llevada a pH 4,5 por agitación fuerte, centrifugando después de cada lavado.

5.2) Purificación

Se purificaron las proteínas realizando tres lavados con etanol 95 % (destilado) y luego finalmente 1 lavado con eter etílico (destilado), siempre por agitación fuerte y con centrifugación después de cada uno de ellos.

5.3) Secado

Después de 12 horas en desecador se secaron las proteínas en estufa de vacío a 45° hasta peso constante, lo que permitió calcular el rendimiento obtenido en el procedimiento.

Las proteínas purificadas se presentaron en forma de polvo fino, liviano y de color blanco.

Sobre ellas se practicaron los análisis de composición general cuyos resultados figuran en la Discusión.

6) - Determinación de lisina disponible

Se aplicó la técnica de Conkerton y Frampton (54) según se describe a continuación.

Reactivos y soluciones

Sol.  $\text{NaHCO}_3$  al 10 %.

Sol. alcohólica de 2,4-dinitrofluorobenceno: preparada por disolución de 0,3 - 0,4 g de la droga en 10 ml de etanol 96 % destilado.

Sol. de HCl 6 N.

Sol. de HCl 1N.

Técnica

Preparación de 2,4-dinitrofenilproteínas

100 - 300 mg de muestra (por cuadruplicado) se pesaron en erlenmeyer de 500 ml. Se agregaron 3 bolitas y 10 ml de la solución de  $\text{NaHCO}_3$  a cada recipiente. Se mezcló bien y dejó en reposo por 10 minutos a la temperatura ambiente. Luego se agregaron 10 ml de solución alcohólica de 2,4-dinitrofluorobenceno a tres de los recipientes. Todos fueron sacudidos suavemente en agitador mecánico horizontal por 2 horas a la temperatura de la habitación.

Las mezclas fueron concentradas hasta casi sequedad pasando corriente de aire tibio sobre cada una de ellas.

A través de 4 extracciones sucesivas con eter etílico (porciones de 50 ml) se extrajeron de las mezclas adicionadas de reactivo, el exceso de éste y algo de 2,4-dinitrofenol producido en la reacción (producto colateral).

La cuarta muestra, a la cual no se agregó 2,4-dinitrofluorobenceno y que sirvió como blanco, fue extraída con dos porciones sucesivas de eter etílico (50 ml).



Para efectuar las extracciones, el eter se mezcló bien con la masa semisólida y la fase etérea se separó después de reposo por decantación. Por pasaje de corriente suave de aire tibio se eliminaron las trazas finales de éter.

#### Hidrólisis de 2,4-dinitrofenilproteínas

Las muestras y el blanco se hidrolizaron en autoclave por 6 hs. ( $121^{\circ}$ ; 16 libras de presión) con HCl 6 N (50 ml). Inmediatamente y aún calientes, los productos de hidrólisis fueron filtrados a través de crisoles filtrantes de vidrio prensado ( $G_3$ ) ayudando con vacío. Se lavaron con agua destilada el erlenmeyer y el filtro, hasta un volumen cercano pero menor que 100 ml. Se trasvasaron a matraces aforados de 100 ml, completando el volumen con agua destilada, mezclando bien.

#### Determinación colorimétrica de $\epsilon$ -2,4-dinitrofenil lisina

De cada hidrolizado se separó una alícuota de 10 ml que fue extraída en ampolla de decantación con 4 porciones sucesivas de eter etílico (50 ml c/u) para eliminar los 2,4-dinitrofenilaminoácidos interferentes y el resto de 2,4-dinitrofenol. El blanco se lavó solamente dos veces con eter etílico. Las alícuotas así lavadas se diluyeron a 25 ml con agua destilada en matraces aforados.

De cada solución se midieron alícuotas por duplicado (3 - 5 ml, dependiendo de la intensidad del color) en matraces aforados de 25 ml. Una de ellas fue diluída a volumen con HCl 1N y la otra con solución acuosa de  $\text{NaHCO}_3$  10 %.

Se agitaron para mezclar bien y se leyeron las absorbancias respectivas en espectrofotómetro a 360 nm, usando el blanco correspondiente como solución de referencia.

La concentración del 2,4-dinitrofenol (DNP), dada en mg/ml se calculó en base a la fórmula:

$$\text{DNP} = K (A_1 - A_2)$$

donde  $A_1$  y  $A_2$  son las absorbancias correspondientes a las soluciones alcalina y ácida respectivamente;  $K$  (0,0158) es la recíproca de la diferencia entre las absortividades del 2,4 dinitrofenol en medios alcalino y ácido respectivamente, determinados experimentalmente.

La concentración de la  $\epsilon$ -2,4-dinitrofenillisina ( $\epsilon$ -DNPlisina), en mg/ml se calculó en base a la siguiente expresión:

$$\epsilon\text{-DNPlisina} = \frac{A_1 - K_1 (\text{DNP})}{K_2}$$

donde el valor de  $K_1$  es 77,4 (absortividad del 2,4-dinitrofenol), y  $K_2$  es 46,9 (absortividad de la  $\epsilon$ -2,4-dinitrofenillisina), medidos a 360 nm en solución alcalina.

### 7) - Determinación de fósforo total

La técnica que se describe a continuación (12) se aplicó a la determinación de fósforo total en las proteínas finales aisladas de los materiales de partida (harina de girasol, de soja y leche descremada) y en los distintos productos de coprecipitación (proteína de girasol adicionada de cantidades crecientes de soja o leche descremada).

#### Soluciones y reactivos

Se prepararon con drogas p.a. y agua bidestilada.

$H_2SO_4$  conc. (d: 1,84)

$HNO_3$  65 %

$H_2SO_4$  10 N

urea

Sol. de molibdato de amonio 5 %

Reactivo de Fiske-Subbarow: preparado por agregado de 0,5 g de  $Na_2SO_3$  puro a una solución de 15 g de  $NaHSO_3$  puro en 80 ml de agua bidestilada, completando a un volumen de 100 ml. A esta solución se agregaron 0,25 g de ácido 1-amino-2-naftol,4sulfónico, agitando energicamente durante unos minutos. Se dejó en reposo (30 min.), agitó nuevamente y filtró por papel. Se conservó en frasco caramelo de buen cierre.

#### Técnica

##### Destrucción de materia orgánica

Se pesó exactamente una cantidad conveniente de muestra ("aislados" proteicos: 0.30 - 0.35g), de acuerdo con una estimación previa de posible contenido en fósforo. Se adicionaron 5 ml de  $H_2SO_4$

concentrado (d. 1,84) y 10 ml de  $\text{HNO}_3$  65 %, calentando cuidadosamente hasta aparición de humos blancos (sulfúricos). Se agregaron sucesivas porciones de  $\text{HNO}_3$  65 % ( de 2 ml cada una) calentando después de cada agregado hasta humos blancos, hasta obtener un líquido límpido e incoloro (destrucción completa de materia orgánica). Se agregaron 2 ml de agua bidestilada y unos cristallitos de urea y se calentó nuevamente hasta humos blancos (eliminación de restos de  $\text{HNO}_3$ ).

El producto de la mineralización se trasvasó a matraz aforado de 25 ml, se llevó a volumen, midió una alícuota que se diluyó 10 veces (en todos los casos con agua bidestilada).

Paralelamente, se condujo un ensayo en blanco, en igualdad de condiciones.

#### Reacción colorimétrica

Sobre el producto de la mineralización anterior, se procedió a la valoración colorimétrica del fósforo total, según la técnica de Bartlett (55), de acuerdo con el orden de agregado de reactivos que se indica a continuación.

- Medición del blanco o muestra (tres alícuotas con distintos volúmenes, siendo el volumen mayor a medir de 2,1 ml) en tubos de aproximadamente 15 ml de capacidad.
- Agua bidestilada hasta completar a 2,1 ml de volumen total, si las alícuotas fueron de menores volúmenes.
- 0,50 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 N, por igual a todos los tubos (blancos y muestras).
- 2,00 ml de agua bidestilada a cada tubo, completando así un volumen de 4,60 ml en total.

- 0,20 ml de solución de molibdato de amonio.
- 0,20 ml de reactivo de Fiske-Subbarow, que completan un volumen total de 5,0 ml en cada tubo.

Es importante para una formación homogénea del compuesto coloreado, agitar bien después del agregado de cada solución.

Los tubos tapados con una bolita de vidrio, se colocaron en baño de agua hirviente durante 7 min. Se enfriaron y se leyó la absorbancia en cubetas de vidrio de 1,000cm de espesor, en espectrofotómetro (Zeiss, PM Q II) a 830 nm, usando agua bidestilada como referencia. Para cada serie de determinaciones se midió el blanco respectivo.

Los contenidos en fósforo total se calcularon en base a la curva de calibración lograda con solución patrón de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (200  $\mu\text{g}$  P/ 100 ml), operando en igualdad de condiciones.

Los resultados se expresaron como P total % de muestra.

### 8) Determinación de fósforo correspondiente a ácido fítico

La técnica que se transcribe (56) se aplicó a los "aislados" proteicos obtenidos a partir de la harina de girasol, de soja y a los distintos productos de coprecipitación (proteína de girasol adicionada de cantidades crecientes de proteínas de soja o leche descremada).

#### Soluciones y reactivos

Todas las soluciones se prepararon con drogas p.a., usando agua destilada.

- Sol. ácido tricloroacético (TCA) al 3 % (p/v).
- Sol.  $\text{FeCl}_3$  (2 mg  $\text{Fe}^{+3}$ /ml en TCA al 3 %).
- Sol.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  al 3 % en TCA al 3 %.
- Sol. HCl 0,5 N.
- Sol. HCl 0,1 N.
- Sol. NaOH 1,5 N.
- Sol. o-fenantrolina 0,1 %.
- Sol. clorhidrato de hidroxilamina al 10 %.
- Sol. buffer de acetato de Na 2 M (272 g NaOAc.3  $\text{H}_2\text{O}$ /l).
- Sol. azul de bromofenol (0,1 g de la droga, disolver en 1,5 ml de NaOH 0,1 N y llevar a 25 ml con agua destilada) (indicador zona de viraje pH 3,0 - 4,6).
- Sol. patrón de  $\text{Fe}^{+3}$ : disolver 3,512 g de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  p.a. en agua destilada, agregar 5 gotas de HCl concentrado y diluir a 500 ml con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada (1 ml : 1 mg Fe).
- Sol. patrón de  $\text{Fe}^{+3}$  diluida: preparada por dilución de 10 ml de la solución anterior a 1 l con agua destilada (1 ml : 0,01 mg Fe).

## Técnica

### Extracción de fitatos y precipitación como sal férrica

Se pesó exactamente una cantidad de muestra que contuviera entre 5 y 30 mg de fósforo de fitato (aproximadamente 1,5 a 3,5 g) y colocó en erlenmeyer de 250 ml. Se extrajo con 50 ml de TCA 3 % por 30 min. (agitación magnética), con agitación manual ocasional para bajar el material adherido a las paredes por encima del nivel del líquido. Se centrifugó (20 min. a 2800 rpm) y filtró el sobrenadante por papel de poro cerrado (b.azul S & S).

Se transfirieron 15 ml del filtrado a un tubo de centrifuga cónico (aprox. 40 ml de capacidad). Se agregaron 4 ml de solución de  $\text{FeCl}_3$ , 2 o 3 gotas de solución de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  3 % en TCA 3 % y calentó en baño de agua hirviente durante 1 hora. Se centrifugó (20 min. 1500 rpm) y decantó cuidadosamente el sobrenadante claro. Se lavó dos veces el precipitado por dispersión en 20 - 25 ml de TCA 3 %, calentando en baño de agua hirviente y centrifugando después de cada lavado. Se lavó finalmente con agua destilada en igual forma (el precipitado de fitato férrico así lavado deberá ser blanco o blanco-crema, sino lavar nuevamente). Se dispersó el precipitado en pocos ml de agua destilada y se agregaron 3 ml de NaOH 1,5 N, mezclando bien. Se llevó aproximadamente a un volumen de 30 ml y calentó en baño de agua hirviente durante 30 min. a fin de coagular el  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  recién precipitado. Se lavó dos veces el precipitado con proporciones de 60 - 70 ml de agua destilada caliente, centrifugando después de cada lavado y desechando el líquido sobrenadante.

Se disolvió el  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  lavado en 1 ml de HCl 0,5 N calentando

en baño de agua hirviente (aproximadamente 10 min.), y trasvasando a un matraz aforado de 100 ml con ayuda de 10 - 25 ml de HCl 0,1 N (la cantidad de HCl total deberá tenerse en cuenta para que al incorporar la solución buffer quede dentro de la zona de viraje del indicador) y finalmente con agua destilada para llevar a 100 ml.

### Reacción colorimétrica

Se midió una alícuota de la solución anterior (2 - 5 ml) en matraz aforado de 25 ml, agregó 1 ml de la sol. de clorhidrato de hidroxilamina 10 %, rotando el matraz por unos instantes para favorecer el mezclado.

Se agregó solución buffer de NaOAc 2 M en cantidad suficiente para provocar el viraje del azul de bromofenol (#), se añadió luego 1 ml de la solución de O-fenantrolina, llevó a volumen con agua destilada y mezcló bien. Después de reposar por 5 min. se leyó la absorbancia en espectrofotómetro (Zeiss PM Q II) a 510 nm en cubeta de cuarzo de 1,000 cm de espesor.

Paralelamente se efectuó un blanco con los reactivos. Se descontó el valor del blanco.

Se preparó la curva standard midiendo alícuotas de la sol. patrón diluida de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1 ml: 0,01 mg Fe), y desarrollando la reacción colorimétrica.

Se interpoló en la curva standard el valor de absorbancia correspondiente a la muestra, despejando la concentración de Fe.

(#)- La cantidad agregada se tiene en cuenta para su incorporación en el ensayo en blanco.



Se tuvieron en cuenta las diluciones realizadas y la cantidad de muestra pesada para obtener el valor de Fe (proveniente de fitato férrico) % de muestra. Dicho valor dividido por 1,20 da el valor de fósforo de fítico % de muestra.

## 9) Determinación de calcio

Esta determinación se realizó sobre todos los "aislados" proteicos obtenidos a partir de la harina de girasol y de soja, sobre los distintos productos de coprecipitación (proteína de girasol adicionada de cantidades crecientes de proteína de soja o leche descremada), así como también sobre la leche descremada liofilizada y su "aislado" proteico respectivo.

### Soluciones y reactivos

Todas las soluciones se prepararon con drogas p.a. usando agua destilada.

- HCl concentrado.
- Sol. de verde de bromocresol ( 0,1 g de la droga se disuelven en 14,3 ml de NaOH 0,01 N diluyendo a 250 ml con agua destilada) (zona de viraje 3,8 - 5,4).
- Sol. de NaOAc 20 %.
- Sol. de ácido oxálico 3 %.
- Sol. de  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 + 50.
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado.
- Sol. de  $\text{KMnO}_4$  0,05 N (valorada).

### Técnica (57)

Se pesó exactamente una cantidad de muestra comprendida entre 3 y 5 g, que se calcinó en mufla (500 - 550°) hasta obtener cenizas blancas. Una vez obtenidas se agregó a la cápsula 5 ml de HCl concentrado, permitiendo que el ácido lave la porción superior de la cápsula y evaporando hasta sequedad en baño de vapor. Se disol-

vió el residuo agregando 2,0 ml de HCl (conc.), medidos exactamente, calentando 5 min. en baño de vapor con vidrio de reloj sobre la cápsula, lavando finalmente el vidrio de reloj con agua destilada. Se filtró el contenido de la cápsula por papel de poro cerrado (b. azul S & S) en un recipiente de 400 ml, diluyendo a 150 ml con agua destilada.

Se agregaron 8 a 10 gotas de verde de bromocresol y solución de NaOAc 20 % en cantidad suficiente para cambiar el pH a 4,8 - 5,0 (azul), cubriendo con vidrio de reloj el vaso de precipitados y calentando a ebullición.

Se precipitó el calcio lentamente por agregado de solución de ácido oxálico 3 %, 1 gota cada 3 a 5 seg., hasta que el pH sea 4,4 - 4,6 (óptimo para la precipitación del oxalato de calcio), lo que se indica por el color verdoso de la solución (se debe evitar el exceso de ácido oxálico indicado por tintes amarillos, que demuestra un indeseable desplazamiento del pH). Se hirvió 1 a 2 min. y dejó descansar durante una noche.

Se filtró la solución sobrenadante clara a través de papel de poro cerrado (b. azul S & S), lavando el recipiente y el precipitado con aproximadamente 50 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (1 + 50) en pequeñas porciones.

Se rompió el papel de filtro y lavó el precipitado con una mezcla de 125 ml de agua destilada y 5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (conc.) a 80 - 90°, recogiendo en erlenmeyer de 250 ml.

Usando solución de  $\text{KMnO}_4$  0,05 N se tituló la solución antes obtenida, a 70 - 90°, hasta obtener un ligero color rosado, agregando en ese momento el papel de filtro y continuando la titulación en caso necesario. Se corrigió por el blanco y expresaron los resultados como g o mg de calcio % de muestra.

## 11) Determinación de hidratos de carbono totales

La concentración en hidratos de carbono totales fue determinada por el método colorimétrico fenol-sulfúrico (58) (59) sobre los "aislados" proteicos y coprecipitados mixtos.

### Reactivos y soluciones

- Sol. de fenol al 5 %: preparada disolviendo en agua destilada 5g de fenol (destilado bajo nitrógeno), llevando a 100 ml.
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, grado analítico.
- Sol. patrón de galactosa: preparada disolviendo galactosa patrón en agua destilada y llevando a volumen (1 ml de esta solución deberá contener alrededor de 70  $\mu$ g de galactosa).

### Técnica

A 1 ml de la dispersión acuosa de la muestra conteniendo entre 10 y 70  $\mu$ g de hidratos de carbono totales, introducida en un tubo de ensayos, se agregó 1 ml de la solución de fenol al 5 % y mezcló bien. Por medio de una pipeta de escurrimiento rápido (cuyo orificio de salida fue agrandado) se agregaron 5 ml de sulfúrico concentrado, agitando bien para distribuir uniformemente tanto el reactivo como el calor desarrollado por la reacción. Después de 10 min. de reposo, se introdujo el tubo en un baño de agua a 25 - 30° por 20 min. Paralelamente se realizó un blanco con 1 ml de agua destilada en lugar de la muestra. Se midieron las absorbancias de la muestra y del blanco en espectrofotómetro a 492 nm (#) (hexosas) en cubas de cuarzo de 1,000 cm de espesor, frente a agua destilada.

Para cada determinación se midieron triplicados de la mues-

tra y del blanco y se calcularon los valores promedio de las absorbancias respectivas. Luego de sustraer el valor del blanco, se determinó la cantidad de hidratos de carbono a través de la curva de calibración previamente preparada para un azúcar particular (galactosa patrón).

(#) Previamente a la obtención de la curva de calibración (standard) se fijó la posición del máximo de absorbancia para la reacción con galactosa patrón (70  $\mu\text{g}$ ) entre 400 y 500 nm.

## 12) Determinación de ácidos clorogénicos

Esta técnica (60) se aplicó a todas las harinas obtenidas a partir de la pepa industrial de girasol y a los "aislados" proteicos provenientes de esta fuente.

### Soluciones y reactivos

- Etanol : agua 4 : 1.
- Etanol : agua 9 : 1.
- Sol. de ácido acético 10 %.

### Técnica

Se pesaron exactamente 3 g de muestra para el caso de harinas y alrededor de 20 g de muestra para el caso de "aislados" y se extrajeron con 50 ml de la mezcla etanol : agua 4 : 1 durante 12 hs. en extractor continuo (Twisselman).

El extracto alcohólico obtenido se filtró cuantitativamente a un matraz aforado de 50 ml, llevando a volumen siempre con la misma mezcla etanol : agua.

De la solución del matraz se tomó una alícuota (20 - 70  $\mu$ l) para efectuar la cromatografía en papel.

Para la cromatografía en papel se utilizó papel Whatman N° 1; cubas cromatográficas chicas y sin previa saturación con el solvente. La cromatografía fue ascendente. El solvente de desarrollo usado fue una solución de ácido acético 10 % y el tiempo de corrida fue de aproximadamente 1 hora 30 min. (espacio recorrido 17 a 18 cm). Se sacaron las tiras de papel de la cuba cromatográfica dejando secar al aire.

Se localizó el ácido clorogénico bajo la luz ultravioleta

( $\lambda$ : 364 nm) por comparación con un patrón sembrado a tal efecto, y se recortó la mancha correspondiente.

Se cortó en nequeños cuadraditos (la mancha separada), colocando los trozos en un tubo con buen cierre y agregando 5 ml (exactamente medidos) de etanol : agua 9 : 1. Se agitó durante 5 min. para extraer el ácido clorogénico y luego se centrifugó. La absorbancia de la solución sobrenadante se midió a 330 nm, en cubetas de cuarzo de 1,000 cm de espesor, usando un espectrofotómetro Zeiss PM Q II.

Se preparó la curva standard utilizando distintas diluciones de una solución patrón de ácido clorogénico obtenida pesando 25 mg de este compuesto y llevándolos a 25 ml en matraz aforado; midiendo la absorbancia de las mismas en las condiciones indicadas anteriormente.

Se interpoló en la curva standard el valor de absorbancia correspondiente a la muestra y teniendo en cuenta las diluciones realizadas, la cantidad de muestra sembrada y la masa pesada, se obtuvo la concentración de ácido clorogénico % de muestra.

PARTE IV

RESUMEN Y CONCLUSIONES



#### PARTE IV

##### RESUMEN Y CONCLUSIONES

a) En nuestro país, la cosecha de girasol es significativa cuando se la compara con las de otras oleaginosas y los subproductos remanentes de la extracción del aceite (harinas, "expellers", tortas residuales) constituyen similarmente fuente de proteínas de importancia económica. En relación a ello se hace una reseña de los trabajos realizados hasta el presente sobre composición general y valor nutritivo de sus proteínas para uso en formulaciones de dietas para humanos.

Paralelamente se discute acerca de la ocurrencia y eliminación de compuestos polifenólicos (ácidos clorogénicos y otros relacionados) presentes en las harinas de girasol.

Finalmente se presenta la información recogida en literatura sobre estudios de aislamiento de proteínas y su suplementación llevados a cabo hasta el presente.

b) El trabajo presente se ha orientado esencialmente al estudio de métodos de aislamiento de proteínas blancas a partir de harinas de extracción de pepa industrial de girasol, incluyendo rendimientos y principales características físicas y químicas de los "aislados" proteicos logrados y su suplementación con proteínas de soja o de leche descremada, fuentes ricas en lisina (pri-

mer aminoácido limitante en girasol).

Contó con los siguientes pasos previos: estudio de la composición general y de algunos componentes en particular de los materiales de partida; de la remoción de la mayor parte de los compuestos clorogénicos de la harina a fin de obtener "aislados" proteicos blancos (extracción de proteínas en medio acuoso netamente alcalino, pH 8 a 11 y precipitación a pH isoelectrico) y de su comparación con los resultados logrados de acuerdo al método de aislamiento de proteínas directo (INTI, extracción acuosa a pH 7,0 y precipitación a pH isoelectrico, sin separación previa de ácidos clorogénicos).

Elegido el método más conveniente, resolver a escala de laboratorio, el aislamiento de proteínas blancas en cantidad suficiente a fin de determinar sus características físicas y químicas; considerar la suplementación de tales proteínas (deficientes en lisina) por coprecipitación con proteínas de soja y de leche descremada en base a valores de cálculos químicos calculados para ambas fuentes (girasol-soja y girasol-leche descremada), contando con el estudio previo de rendimientos y características analíticas de los "aislados" de cada una de las fuentes separadamente.

La experimentación conducida en este trabajo llevó a las siguientes conclusiones:

1) El análisis de composición general de las harinas de extracción de pepa industrial (hexano, laboratorio), del "lex" (harina industrial) y de la pepa descascarada por flotación (laboratorio, hexano) permitió comprobar que a menor contenido en fibra corresponde mayor contenido en cenizas y en materia nitrogenada:

el endospermo es de mayor riqueza que la cáscara.

2) El análisis comparativo de contenido en ácidos clorogénicos en harina de semilla integral, pepa descascarada y pepa industrial obtenidas por extracción con hexano (laboratorio) y "lex" (harina industrial), procedentes todas de una misma partida de semilla original muestra un mayor nivel en la proveniente de pepa totalmente descascarada (4,16 %), correspondiendo el menor valor al de la harina de semilla integral (3,01 %) y cifras similares (algo superior para el "lex") sobre harinas de pepa industrial y "lex" (3,47 y 3,22 respectivamente), poniendo en evidencia la mayor riqueza en dichos compuestos de la pepa.

Aparentemente el procesado industrial no ejerce influencia en el nivel de estos compuestos (3,47 y 3,22 %).

3) La remoción eficiente de ácidos clorogénicos (obtención de proteínas blancas) operada sobre "lex" y harina de pepa industrial se logró con agua clorhídrica (pH 4,4) (menor pérdida de material nitrogenado que se refleja en el mayor porcentaje de nitrógeno dispersado en harina agotada) en comparación con los otros solventes usados (agua pH 6,5 - 6,6; solución de ácido cítrico - citrato de sodio pH 4,4), a temperatura ambiente.

Se señala una mayor remoción de ácidos clorogénicos paralelamente al aumento de temperatura, no aconsejable porque conduce a una pérdida mayor de material nitrogenado.

4) El "lex" o harina industrial no resulta materia prima conveniente para la obtención de "aislados" proteicos en razón de un bajo rendimiento en nitrógeno dispersado (42 - 49 %) respecto del de la harina de extracción (hexano) (72 - 87 %), atribuible al efec-

to desnaturalizante del proceso drástico aplicado en la separación del aceite.

5) La remoción de los ácidos clorogénicos, que ocasiona paralelamente eliminación parcial de material nitrogenado, conduce al desplazamiento del valor de pH de máxima precipitación de proteínas (de 4,4 a 4,6 a 5,5), dispersadas a partir de la harina remanente (pH 8 a 11). Ese valor de pH isoeléctrico (5,5) coincide con lo señalado en literatura, en condiciones similares.

No obstante, de continuar operando la precipitación al valor de pH 4,4 - 4,6 ; no ocasiona pérdidas significativas en el rendimiento final del "aislado" respecto del obtenido por el método directo (sin remoción previa de ácidos clorogénicos; pH 7,0 - 7,5 de dispersión). Por otra parte resulta conveniente para la coprecipitación con proteínas principalmente de fuentes vegetales (ej. soja).

6) Se señala la no conveniencia, en el método directo de obtención del "aislado", de operar a temperaturas superiores a la ambiente (ej. 45°), que si bien permite dispersar mayor cantidad de material nitrogenado de la harina, aumenta la velocidad de oxidación de los ácidos clorogénicos (coloración verde proveniente de condensación de quininas coloreadas con proteínas).

7) El análisis comparativo de los "aislados" proteicos logrados por ambos métodos (con o sin remoción previa de ácidos clorogénicos) a partir de la misma materia prima, permitió observar un mayor nivel de lisina disponible y un contenido ligeramente superior en ácidos clorogénicos para el producto obtenido por el segundo método (sugiriendo que parte de la lisina se pierde unida a los áci-

dos clorogénicos.

8) Un balance de distribución de ácidos clorogénicos en las distintas etapas de los dos métodos de obtención de "aislado" proteico, permitió señalar que un 45 % del contenido inicial en harina queda eliminado en su remoción previa y del resto, la mayor parte queda retenida en el residuo agotado después de la dispersión del material nitrogenado.

Por el contrario en la dispersión directa del material nitrogenado, la mayor proporción de los ácidos clorogénicos se elimina con el líquido sobrenadante después de la precipitación de las proteínas.

La separación previa incide hacia una menor retención de dichos compuestos en el producto final (0,029 y 0.085 % de "aislado" respectivo).

9) Del análisis de composición del "aislado" proteico obtenido por el método directo (sin remoción previa de ácidos clorogénicos) merece señalarse el nivel significativamente bajo de ácido fítico (fósforo de ácido fítico : 26 % del fósforo total retenido en el precipitado) comparativamente a resultados logrados sobre "aislados" de trabajos anteriores (obtención de "aislados" proteicos sobre material nitrogenado dispersado directamente a pH 10 - 11; 53 %). Se sugiere que el operar a un pH de dispersión de proteínas tan alto (pH 11) permitiría una mayor extracción de fitatos que luego, al valor de pH isoeléctrico, quedarían como complejos insolubles con las proteínas.

También cabe destacar que el valor de lisina disponible (3,30 g lis/ 16 g N) resultó muy similar al de la harina de partida (3,27

6 lis/ 16 g N) y muy superior al de los "aislados" obtenidos en un trabajo anterior por dispersión directa a pH 10 - 11 (proteínas verdes, lisina disponible 2,2 y proteínas blancas obtenidas en presencia de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , 2,4 g lis/ 16 g N).

En el "aislado" final no se detecta la presencia de calcio, por los métodos corrientes.

10) El análisis de la harina de soja (harina cruda de extracción industrial, para preparación de "aislados") estudiada en su composición general registró datos similares a los señalados en literatura.

11) A partir de la harina cruda de soja se obtuvieron "aislados" proteicos que correspondían a dispersión de material nitrogenado realizadas a pH 7,0 y 10,0 respectivamente observando valores similares en rendimiento y lisina disponible (6,50 y 6,30 g lis/ 16 g N respectivamente); condición favorable, por otra parte, para la obtención de "aislados" mixtos con girasol. En ambos casos los contenidos en lisina disponible fueron superiores a los mencionados en literatura para "aislados" (de literatura 5,4 - 6,0 g lis/ 16 g N) (51).

12) Sobre la base de los valores calculados del cómputo químico teniendo en cuenta el aminoácido limitante en proteínas "aisladas" de girasol (lisina) y de proteínas "aisladas" de soja (azufre) y los rendimientos respectivos, las mezclas de proteínas (en el coprecipitado mixto) más satisfactorias estarían comprendidas en el rango de 40/60; 50/50 y 60/40 respectivamente.

Aparentemente para la proporción de 70 % de proteínas de soja y 30 % de proteínas de girasol, el coprecipitado sería ya deficien-

te en azufrados, lo que limitaría su aprovechamiento.

Las proporciones antes mencionadas cubrirían prácticamente los requerimientos, en coprecipitados logrados por los dos procedimientos antes descritos (con o sin remoción previa de ácidos clorogénicos). Se observa comparativamente valores superiores de rendimiento y lisina disponible cuando se trabaja con el segundo de los métodos mencionados.

13) Los valores hallados por cómputo químico se vieron confirmados a través de la evaluación de lisina disponible en los distintos "aislados" mixtos obtenidos: a mayor nivel de proteína de soja en el coprecipitado mayor concentración en lisina disponible.

Para la estimación de la suplementación por cómputo químico en base a los contenidos de aminoácidos azufrados de ambas fuentes, se partió de valores de literatura. Sin embargo resta su confirmación a través de las determinaciones de tales aminoácidos (aminogramas) en los "aislados" de partida y en los coprecipitados a fin de verificar si las predicciones son correctas.

14) Con fines comparativos y complementarios de los estudios anteriormente señalados, se analizaron tanto los "aislados" obtenidos de ambas fuentes, como los "aislados" mixtos coprecipitados, en sus contenidos en cenizas totales, fósforo total y fósforo de ácido fítico e hidratos de carbono totales.

Los contenidos en cenizas presentan un valor máximo para el "aislado" de soja (0,48 %), siendo menores los correspondientes a todos los coprecipitados y al de girasol solo (0,27 - 0,47).

El contenido en fósforo total evidencia una tendencia definida al aumento a medida que se incrementa el porcentaje de pro-

teína de soja en el coprecipitado (0,72 - 1,05 %), mientras que los niveles de fósforo de ácido fítico oscilan dentro de un margen estrecho para todos ellos (0,16 - 0,19 %), mostrando un predominio en fósforo total para la proteína de soja.

Una tendencia similar se observó en el contenido en hidratos de carbono totales, cuyo mayor valor se registró para el "aislado" de soja (4,55 %) y el menor para el de girasol (2,26 %).

15) Sobre la base de datos experimentales llevados a cabo con leche fluida, descremada industrialmente (2,86 % de proteína cruda, 9,5 g lis/ 16 g N) para la obtención del "aislado" proteico (rendimiento 87,5 % del contenido proteico del material de partida, pH isoeléctrico 4,4 - 4,6), se consideró como una fuente importante a fin de utilizarla en la suplementación de proteínas de girasol (deficientes en lisina).

Un cálculo previo (cómputo químico) permitió considerar los distintos porcentajes de proteína de leche a incorporar a las de girasol a fin de lograr "aislados" mixtos homogéneos y de mayor valor nutritivo.

16) Las experiencias realizadas mezclando ambas fuentes proteicas, antes de la dispersión de las proteínas de girasol; es decir operando la extracción de proteínas de girasol directamente con leche descremada en vez de agua, a pH 7,0, condujeron a resultados irregulares y de bajo rendimiento en coprecipitados mixtos (ocurre parcial precipitación de proteínas de girasol que se pierden con la separación del residuo agotado de la harina). Ello estaría ligado posiblemente, a la presencia de suficiente cantidad de iones  $\text{Ca}^{++}$  aportada por la leche. En favor de esta suposición



estarían los valores de altos rendimientos en "aislados" mixtos, con tenor de lisina disponible similar a lo esperado, logrados en coprecipitaciones de proteínas de girasol obtenidas a partir de la harina dispersada en agua, a las que se le incorporó caseína industrial (libre de  $\text{Ca}^{++}$ ) y de coprecipitados logrados por agregado de leche descremada al líquido de dispersión de proteínas de girasol ya separado de la harina residual (pH 7,0), para proseguir en ambos casos con la coprecipitación al valor de pH isoelectrico (4,4-4,6).

Aparentemente la mezcla 70 % de proteína de girasol, 30 % de proteína de leche descremada (o mejor aún 65 : 35 %) serían las que cubrirían satisfactoriamente los requerimientos del aminoácido lisina en dietas para humanos.

El incremento de lisina fue significativo para todas las combinaciones ensayadas (60 : 40; 70 : 30; 80 : 20 %). Ello representa un ahorro, desde el punto de vista económico, respecto de la fuente de mayor costo (proteína de leche) cuyo efecto sobre las proteínas de girasol se hace notar desde niveles tan bajos como 20 % y probablemente menores.

17) A los efectos de una mayor información, surge de la observación de los valores de composición de los distintos "aislados" mixtos logrados y de los de las fuentes de origen, que a medida que aumenta el nivel de proteína de leche en el coprecipitado aumenta el contenido en hidratos de carbono totales, desciende el fósforo de ácido fítico, se mantiene prácticamente constante el fósforo total y asciende el porcentaje de calcio. El valor más significativo reside en el contenido en lisina disponible que aportan

las proteínas de leche, con un descenso apreciable a mayores proporciones de proteína de girasol en el coprecipitado mixto.

### Experiencias Futuras

El presente trabajo se llevó a cabo con el objeto de estudiar la obtención de proteínas de girasol blancas y de las condiciones óptimas de obtención de "aislados" mixtos por coprecipitación y paralelamente el efecto suplementario de niveles crecientes de una proteína rica en lisina sobre la calidad de la proteína aislada de la harina de pepa industrial de girasol (deficiente en lisina).

Surge de interés, para experiencias futuras, llevar a cabo evaluaciones biológicas (NPU, PER) a fin de confirmar los datos logrados por cómputo químico y por evaluación de lisina disponible en los productos finales. Asimismo la evaluación de otros aminoácidos esenciales cuyos niveles estén relacionados a la calidad de las proteínas en ensayo.

## BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1) R.W. Howell, J. Am. Oil Chem. Soc., 48, 492 (1971).
- 2) S. Brad, Industrias Alimentarias y Agrícolas, enero, N° 1, 27 (1969).
- 3) M. F. Bonino, VII Simposio Nacional y IV Latinoamericano de Oleaginosas, noviembre 1976.
- 4) La Nación, sábado 8 de setiembre de 1979, Buenos Aires.
- 5) Estimaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- 6) A.K. Smith, Econ. Botany, 8, 291 (1954).
- 7) H.H. Mitchell, T.S. Hamilton y J.R. Beadles; J. Nutr., 29, 13 (1945).
- 8) C.R. Grau y H.J. Almquist, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 60, 373 (1945).
- 9) R.J. Block y D. Bolling, Arch. Biochem., 6, 277 (1945).
- 10) J. Mc Ginnis, P. Tung Hsu y J.S. Carver, Poultry Sci, 27, 389 (1948).
- 11) R.T. Milner, J.E. Hubbard y M.B. Wiele, Oil and Soap, 22, 304 (1945).
- 12) A.O. Rucci, Tesis, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1972.
- 13) F.W. Sosulski, Canadian Inst. Food Technol. J., 2, 28 (1969).
- 14) E. Yáñez, D. Ballester, A. Maccioni, R. Spada, I. Barja, N. Pak, C.O. Chichester, G. Donoso y F. Mönckeberg, The American J. of Chemical Nutr., 22, 878 (1969).
- 15) I. Sameh, J.M. Quirós y R. Basualdo, Rev. Arg. de Grasas y Aceites, noviembre, 8 (1970).

- 16) PAG Bulletin, vol II, N<sup>o</sup> 4, 34 (1972).
- 17) J. Baudet y J. Mossé, J. Am. Oil Chem. Soc., 54, 82A (1977).
- 18) W.R. Aykroyd y J. Doughty, Las leguminosas en la Alimentación Humana, FAO, N<sup>o</sup> 19, 42 (1964).
- 19) F.E. Horan, J. Am. Oil Chem. Soc., 51, 67A (1974).
- 20) N.E. Artz, Nutritional Value of Soybean Protein for Infants and Children, Corn Products Institute of Nutrition, U.S.A. (1965).
- 21) R. Bressani y I.G. Elias, Advances in Food Research, 16, 44, 52, 58, 59 y 60 Academic Press, New York, 1968.
- 22) A.M. Altschul, Proteins, their chemistry and Politics, Chapman and Hall, London, 280 (1965).
- 23) A.M.C. Davies, V.K. Newby y R.L.M. syngé, J. Sci. Food Agr., 29, 33 (1978).
- 24) W.S. Pierpoint, Biochem. J., 112, 609 (1969).
- 25) W.S. Pierpoint, R.J. Ireland y J.M. carpenter, Phytochemistry, 16, 29 (1977).
- 26) G. Sondini y M. Canella, J. Agr. Food Chem., 25, 822 (1977).
- 27) J. Baudet y J. Mossé, J. Am. Oil Chem. Soc., 54, 82A (1977).
- 28) W. D. Loomis y J. Battaile, Phytochemistry, 5, 423 (1966).
- 29) B. Milč, S. Strojanović, N. Vucūrevič y M. Turčic, J. Sci. Food Agr., 19, 108 (1968).
- 30) R. Bierolai y A. Bondi, J. Sci. Food Agr., 14, 124 (1963).
- 31) G. Ågren y S.Å. Lieden, Acta Chim. Scand., 22, 1981 (1968).
- 32) N.L. Lahiry, L.D. Satterlee, H.W. Hsu y G.W. wallace, J. Food Sci., 42, 83 (1977).
- 33) J.J. Rackis, J. Am. Oil Chem. Soc., 51, 161A, 174A (1974).

- 34) J.J. Rackis, J.E. Mc Ghee y A.N. Booth, Cereal Chem. 52, 85 (1975).
- 35) S. Boonwisut y J. R. Whitaker, J. Agric. Food Chem., 24, 1130 (1976).
- 36) B.L. O'Dell, A.R. de Boland y S.R. Koirtyohann, J. Agr. Food Chem., 20, 718 (1972).
- 37) A.K. Smith V.L. Johnsen, Cereal Chem., 25, 399 (1948).
- 38) F.W. Sosulski y A. Bakal, J. Can. Inst. Food Technol., 2, 28 (1969).
- 39) S. Gheyasuddin, C.M. Cater y K.F. Mattil, Food Technol, 24, 242 (1970).
- 40) F.W. Sosulski y C.W. Mc Clearly, J. Food Sci, 37, 253 (1972).
- 41) T.Y. Fan y F.W. Sosulski, Cereal Chem., 53, 118 (1976).
- 42) Procedimiento para la obtención de aceite y proteínas en forma simultánea y de proteínas a partir de productos oleaginosos. Inscripción en propiedad industrial 267097. Registro Nacional de la Propiedad Industrial, presentado para la obtención de una patente.
- 43) A.M. Altschul, Processed Plant Protein Foodstuffs, Academic Press, New York, 882 (1958).
- 44) R.J. Evans y S.L. Baudemer, Cereal Chem., 44, 417 (1967).
- 45) D. Ballester, N. Pak, E. Yáñez, A. Reid, E. Trabucco, I. Pennacchiotti, L. Masson, M.A. Mella, J. Vinagre, D. Cerda, H. Smith - Hebbel y G. Donoso, Nutr. Bromatol.Toxicol., 6, 63 (1967).

- 46) G. Sondini y M. Canella, J. Agric. Food Chem., 25, 822 (1977).
- 47) K. Okubo, D.V. Myers y G.A. Jacobucci, Cereal Chem., 53, 513 (1976).
- 48) R.L. Kellor, J. Am. Oil Chem. Soc., 51, 77A (1974).
- 49) K.F. Mattil, J. Am. Oil Chem. Soc., 51, 81A (1974).
- 50) G.C. Zaragoza, Tesis, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1978.
- 51) E.W. Meyer y L.D. Williams, World Soybean Research, setiembre 1976.
- 52) FAO/OMS, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y Organización Mundial de la Salud, "Necesidades de Energía y Proteínas", Informe 52, Roma 1973.
- 53) B.M. Nicol y P.G. Phillips, "Advances in Food Research", 16, 1, Academic Press, New York, 1968.
- 54) E. J. Conkerton y V.L. Frampton, Archives of Biochemistry and Biophysics, 81,133 (1959).
- 55) G.R. Bartlett, J. Biol. Chem., 234, 466 (1959).
- 56) A.O. Rucci y M.H. Bertoni, Anales Asoc. Quim. Argentina, 62, 365 (1974).
- 57) AOAC, American Official Agricultural Chemists, 13014, 193 (1965).
- 58) M. Dubois, K.A.Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith, Anal. Chem., 28, 350 (1956).
- 59) R.L. Whistler y M.L. Wolfrom, "Methods in carbohydrate Chemistry", vol 1, Academic Press, New York, 388 (1962).



60) Técnica adaptada en el INTI , Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, a partir de un artículo de J.V. Pomenta, J. Food Sci., 36, 490 (1971).

*(H. Pomenta)*

*Zein M. Belal*