

Tesis de Posgrado

Suplementación de proteínas aisladas de harina integral de lino por coprecipitación con proteínas de harina de soja y de suero de queserías

Gomez, Rosa Gregoria

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. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:

Gomez, Rosa Gregoria. (1980). Suplementación de proteínas aisladas de harina integral de lino por coprecipitación con proteínas de harina de soja y de suero de queserías. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1666_Gomez.pdf

Cita tipo Chicago:

Gomez, Rosa Gregoria. "Suplementación de proteínas aisladas de harina integral de lino por coprecipitación con proteínas de harina de soja y de suero de queserías". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1666_Gomez.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

"SUPLEMENTACION DE PROTEINAS AISLADAS DE HARINA INTEGRAL DE
LINO POR COPRECIPITACION CON PROTEINAS DE HARINA DE SOJA Y
DE SUERO DE QUESERIAS"

ROSA GREGORIA GOMEZ

tesis presentada para optar al título
de Doctora en Ciencias Químicas

1981

1666

Agradezco a la Dra. María H. Bertoni,
Consejera de Estudios y Directora de
Tesis, quien me brindó colaboración
y estímulo constantes posibilitando
la concreción de este trabajo.

Agradezco:

- En particular al Dr. Pedro Cattáneo por su permanente interés en este estudio.

Agradezco también:

- A la firma "Molinos Río de la Plata" por haber proporcionado la harina de soja, materia prima fundamental para la realización de este trabajo.
- A la empresa "Kasdorf S.A." por la provisión de las partidas de suero de queserías y al Ing. E. Alegre por su diligente actuación en el transporte de las mismas.
- Al Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) y muy especialmente al Dr. J.C. Monesiglio (INTA) por la asistencia técnica en la obtención de aminogramas.
- A la Comisión Nacional de Energía Atómica por la evaluación de calcio por espectrometría de absorción atómica.
- Al Dr. J. Bouzas por la colaboración prestada en las determinaciones del factor antitriptico y de la actividad ureásica.
- A mis compañeros de la cátedra de Bromatología por su sincera amistad.

A mis padres

PARTE I
INTRODUCCION

- 1)- Proteínas de semilla de lino. Harina integral de extracción. "Aislado proteico". Obtención, características físicas y químicas y valor nutritivo.
- 2)- Proteínas de semilla de soja. Harina industrial. "Aislado proteico". Obtención, características físicas, químicas y valor nutricional.
- 3)- Suero de queserías (subproducto de la industria lechera). Características físicas y químicas. Valor nutritivo de sus proteínas.
- 4)- Consideraciones generales sobre posibles mejoras en el valor nutritivo de proteínas de lino en ensayos de suplementación por coprecipitación con proteínas de soja y de suero de queserías. Antecedentes.

1)- Proteínas de semilla de lino. Harina integral de extracción.
"Aislado proteico". Obtención, características físicas y químicas y valor nutritivo.

En la producción de semilla de lino oleaginoso, la Argentina, tiene una posición significativa en el mundo. Dentro del país ocupa el segundo lugar como oleaginosa, después del girasol.

Durante el período 1960/76 y hasta el presente la producción de semilla de lino alcanzó un valor máximo (838.000 ton.), respecto de períodos anteriores y posteriores al 62/63 (período pico). No obstante se observó una tendencia creciente en esta última cosecha respecto del período anterior (78/79 : 600.000 ton) (x).

En estos últimos años las oleaginosas y sus subproductos de industrialización (tortas, "expellers", harinas residuales de extracción del aceite), al igual que las leguminosas de grano comestible y sus harinas residuales de extracción, reciben atención preferencial dentro de los planes que estudian la disponibilidad de fuentes proteínicas. Así la soja, el girasol, el algodón y el maní son las fuentes de mayor utilización en el mundo.

Los datos registrados en literatura¹ ilustran sobre un contenido de alrededor del 26-28 % de proteína (b.s.) para la semilla de lino con todo el aceite. En base seca la harina resultan

(x) Valores obtenidos en la Sección "Estimaciones Agropecuarias" del Ministerio de Agricultura de la Nación.

}

te de la extracción del aceite (hexano) contiene 40-48% de proteína, tenor que la ubica como fuente importante a considerar en el aislamiento de estas últimas, particularmente destinadas a formar parte de formulaciones suplementadas en la industria alimentaria.

Se señala también, que el desarrollo de importantes aplicaciones industriales para la proteína y/o el mucílago de lino, beneficiaría la producción económica de su cosecha.

Forchieri² en un estudio realizado sobre composición acídica de aceites de distintas variedades de semilla de lino oleaginoso, analizó en su composición general las harinas residuales de extracción (hexano), dando como composición representativa de las 80 variedades (mezcla de todas las harinas) la siguiente: humedad 11,63; cenizas 5,46; fibra cruda 7,98; extracto etéreo 0,97 y nitrógeno (Kjeldahl) 5,95% (proteína cruda 42%)(b.s.).

Por otra parte la presencia de principios tóxicos y antinutricionales (glicósidos cianogénicos y factor antipiridoxínico), la dificultad práctica en la separación de la cáscara-pepa, la cantidad significativa de mucílago que ocurre en la semilla, justificaron el estudio del aislamiento de sus proteínas a partir de la harina integral residual, con miras a la alimentación humana.

Fue así que una vez considerada la escasa literatura sobre el particular, se inició una línea de trabajo sobre proteínas de lino que tuvo como punto de partida las experiencias preli-

minares llevadas a cabo por Forchieri² y continuadas por Bertoni y Cattaneo³ con la descripción de un procedimiento a escala de laboratorio para el aislamiento de las proteínas, tratamientos de purificación y secado final. El procedimiento utilizado que comprende una etapa de dispersión en medio alcalino (pH 9-10) a temp. amb., seguida de precipitación en medio ácido (ClH, pH de máxima precipitación 4,0), lavados acuosos a pH 4,0 y etanólicos de las proteínas precipitadas y secado final (estufa de vacío, 45°), a la par que eleva la concentración proteínica (aislado) elimina los factores tóxicos y otros materiales no deseables (pigmentos, taninos) que están presentes tanto en la semilla como en la harina de extracción.

El producto final, una vez seco, tiene aspecto de polvo fino, blanco, inodoro e insípido, características aceptables para considerar su incorporación a los alimentos tradicionales sin modificar sus características organolépticas.

Por esa época Sosulski y Bakal⁴ en un estudio sobre proteínas aisladas de distintas semillas de oleaginosas (lino, girasol y nabo) hicieron referencia a valores de composición de harinas de extracción (hexano, temp. amb.) de distintas variedades de semilla de lino oleaginoso mostrando un tenor de proteína cruda del orden del 43-45%, que conducían a aislados proteicos cuyo contenido en nitrógeno total era de 11 a 12% (b.s.) con un alto rendimiento respecto de harina de partida (37-40%).

Comparativamente la harina integral de lino, motivo de este estudio, no sólo presentó menor nivel de proteína (42% b.s.) si

no menor rendimiento en aislado proteico (24%), pero de un mayor grado de pureza (12,9-13,3% en nitrógeno total) al señalado en el estudio arriba mencionado.^{3,5}

En razón del bajo valor de nitrógeno total en el aislado proteico obtenido (13%) respecto al de otros aislados proteicos (15-16%; girasol, soja, zapallo, caseína, cítricos^{5,6,7,8} y frente al comportamiento particular del mismo (fuerte retención acuosa con consistencia de gel), Bertoni y Cattaneo consideraron la probable presencia de polisacáridos (provenientes de la fracción mucílago contenida en la semilla) en el producto final.

La evaluación de hidratos de carbono totales (método fenol-sulfúrico) permitió revelar un contenido del orden del 20% de tales componentes en el aislado proteico purificado (valor que se mantenía constante aún después de dos sucesivas redisoluciones y reprecipitaciones efectuadas sobre el aislado)⁹.

Por cromatografía descendente sobre papel y previa hidrólisis, identificaron galactosa, ramnosa, xilosa, arabinosa y glucosa; composición cualitativa análoga a la señalada en literatura para los componentes del mucílago originalmente contenido en la semilla^{10,11,12}.

En un trabajo posterior, Bertoni y Cattaneo mostraron la ocurrencia de una distribución desigual en la asociación de la fracción de hidratos de carbono con la proteína, en el aislado final de lino (fraccionamiento en columna de Sephadex, medición de absorbancia en U.V. y valoración de hidratos de carbono en eluidos)⁹.

Desde el punto de vista nutricional¹³ el aislado proteico de

lino muestra una composición equilibrada en aminoácidos esenciales, no obstante verse limitada su calidad biológica por el bajo tenor en lisina (REP 1,76; caseína 2,50; UPN₁₀ 57,80 \pm 3,80; UPN_{st} 61,10 \pm 4,50; D 91,12 \pm 4,00 y VB 63,4).

En el aspecto toxicológico, señalaron que las observaciones realizadas¹³ no evidenciaron signos de daños patológicos a excepción de una ligera infiltración grasa en hígado, ni se manifestaron signos de mal funcionamiento en los parámetros analizados, dentro del término de la experiencia (28 días).

Cabe señalar que, no obstante estos resultados (ensayos de toxicidad aguda), se requieren otros de la misma naturaleza pero de mayor duración a fin de considerar su probable incorporación a formulaciones para la alimentación humana.

Posteriormente, Sosulski y Sarwar¹⁴ encaran el estudio del valor nutricional de harinas y aislados proteicos de semillas de oleaginosas, mostrando por comparación con caseína, el bajo nivel de lisina en proteínas de harina y aislado de lino, como puede observarse en la Tabla 1. Registraron también, un alto nivel en ácido glutámico y en arginina tomando como referencia los correspondientes a caseína.

Los autores atribuyeron el bajo valor del "score de la proteína" en el aislado (61), respecto del de la harina de partida (82), a la pérdida de lisina durante el proceso de aislamiento.

Tabla 1

Relaciones de aminoácidos esenciales (mg aa/g N muestra) de caseína, harina y aislado proteico de semilla de lino.

<u>Aminoácido</u>	<u>Caseína</u>	<u>Lino</u>	
		<u>Harina</u>	<u>Aislado</u>
arginina	200	675	641
histidina	150	131	119
isoleucina	337	244	269
leucina	662	343	378
lisina	512	237	193
metionina	163	106	125
metionina+ cistina	194	275	281
fenilalanina	306	256	294
fenilalanina+ tirosina	643	387	475
treonina	256	187	212
triptofano	181	81	87
valina	418	306	344
Total (EAA)	3203	2060	2239
IEAA ^{1,3}	80	69	75
Score prot. ^{1,2}	57	82	61

- 1- Arginina e histidina no incluidas en el cálculo.
- 2- Basado en el patrón FAO 1965 (proteína de huevo).
- 3- Media geométrica de las relaciones de los aminoácidos esenciales en una proteína a aquellas de la de referencia (proteína de huevo).

Con el fin de mejorar nutricionalmente las proteínas de lino, Revuelto y Bertoni⁵ obtuvieron aislados mixtos homogéneos por coprecipitación de las mismas con caseína clorhídrica industrial.

Los resultados indicaron claramente que un nivel de 40% de caseína era el mejor suplemento (correspondiendo a la relación:

200g de harina de lino y 30,1g de caseína comercial).

Una suplementación eficiente también se logró con niveles de 15-20% de caseína en el aislado mixto final.

El efecto de la suplementación fue seguido en los aislados mixtos obtenidos, por la estimación del "cómputo químico" y corroborado a través de los valores de utilización neta proteica (NPU), digestibilidad y lisina disponible, cifras que por otra parte, confirman la deficiencia en lisina de la proteína de lino.

Estos resultados de suplementación satisfactorios sirvieron de base para considerar el mejoramiento de las proteínas de lino a través de la coprecipitación con proteínas de soja y de suero de queserías (buenas fuentes de lisina). Este camino, ensayado extensivamente y con eficiencia en la mejora de proteínas de cereales (suplementación con proteínas de soja y leche descremada), es de importancia en la formulación de mezclas para áreas donde la desnutrición proteica infantil constituye un serio problema y donde generalmente no se dispone o no es accesible económicamente una fuente satisfactoria como la leche.

La justificación de una suplementación reside en la ventaja de lograr mezclas superiores en valor nutricional al del material de partida deficitario (proteína de lino) y en el aprovechamiento de subproductos de la industria aceitera (harinas de extracción) o de desechos de la industria láctica (suero residual de queserías).

Dado que en literatura no existen antecedentes de suplementación de proteínas de lino con proteínas de soja o de suero, fue

el propósito de este trabajo estudiar las condiciones óptimas de aislamiento de proteínas mixtas homogéneas logradas por coprecipitación de las dispersadas de ambos materiales de partida, en mezclas según las proporciones más convenientes desde el punto de vista nutricional y evaluar las distintas características físicas y químicas de los productos así logrados.

2)- Proteínas de semilla de soja. Harina industrial. "Aislado proteico". Obtención, características físicas, químicas y valor nutricional.

En el desarrollo de las proteínas de lino mejoradas, se tuvo en cuenta entre otros factores, el de la disponibilidad actual o potencial de las materias primas en el país. En tal sentido la semilla de soja, es una de las leguminosas de más abundante cosecha (con una producción de 3.700.000 ton. período 1978/79, para todo el país). No obstante, el subproducto adecuado para la obtención del "aislado proteico" (harina cruda de extracción, hexano, de alto índice de solubilidad) es de escasa producción al presente, aunque con grandes posibilidades de producción futuras.

Está plenamente documentado que la harina de semilla de soja es buena fuente de lisina y relativamente pobre en azufrados totales^{15,16,17,18,19}. La insuficiencia en estos últimos, no es muy importante en nuestro caso, dado que la harina de lino los contiene en cantidad suficiente y sus mezclas con proteínas de soja ofrecen la posibilidad de una complementación conveniente.

En la Tabla 2 se muestra en forma comparativa el patrón de aminoácidos esenciales de cada fuente frente al de referencia (FAO 1973)^{20,21,3}.

Tabla 2

<u>Aminoácidos</u> <u>esenciales</u> (g/16g N)	<u>Patrón de prot.</u> <u>de referencia</u>	<u>Aislado de</u> <u>soja</u>	<u>Aislado de</u> <u>lino</u>
leucina	7,0	7,9	5,3
lisina	5,5	6,0	3,7
isoleucina	4,0	4,7	6,1
metionina+ cistina	3,5	2,4	3,8
fenilalanina+ tirosina	6,0	9,0	6,9
treonina	4,0	3,7	3,3
triptófano	1,0	1,2	1,3
valina	5,0	4,7	4,9

Como puede observarse el producto de mayor calidad nutricional es el derivado del poroto de soja. La proteína de lino aunque deficiente en lisina, presenta un patrón bastante equilibrado en sus aminoácidos.

Disponer de esta información previa es valioso en todo proceso de formulación de un alimento rico en proteínas y de buen valor biológico, ya que es necesario combinar estos materiales de manera de lograr un mejor patrón de aminoácidos esenciales,

superior al de los materiales de partida o similar al de proteínas de la leche.

La semilla o poroto de soja ha servido como alimento por varias centurias en algunas partes del mundo (particularmente en Asia). Actualmente es una fuente comercial importante de aceite y de proteína y en razón del relativamente alto valor biológico de esta última, dentro de las fuentes vegetales estudiadas, esta leguminosa (a su vez bastante rica en aceite) ha merecido la mayor atención en todo el mundo como fuente importante de la dieta humana (especialmente en programas escolares).

Ha sido preparada en una gran variedad de formas para consumo del hombre y la literatura a este respecto es voluminosa^{22, 23,24,25,26,27,28,29,30,31,32}.

La semilla integral de soja contiene aproximadamente un 40% de proteínas (b.s.), 20% de aceite, 5% de cenizas y alrededor del 32% de hidratos de carbono incluida la fibra³³.

La fracción de hidratos de carbono contiene un 8% de cáscara y aproximadamente 15% de hidratos de carbono insolubles (arabinogalactanos, arabanos, polisacáridos acídicos), constituyendo el resto la fracción soluble de los mismos (sacarosa, rafinosa, estaquiosa, arabinosa, glucosa y verbascosa)^{33,34}.

La presencia de rafinosa, estaquiosa y verbascosa^{35,34} es la causa del "flatu", que ocasiona un sinnúmero de disturbios gástricos.

La harina de soja (residual de la extracción del aceite, 1% de extracto etéreo) se concentra en proteínas cuyo nivel supera

el 50%, al igual que se incrementan los % de los otros componentes, señalándose como buena fuente de K, Ca, Mg y P; aunque este último se encuentra en buena parte como fitato^{34,36}.

La composición típica de harinas, concentrados y aislados proteicos de soja puede verse en la siguiente tabla³³:

Tabla 3

Composición típica de harinas, concentrados y aislados de soja

<u>Componente</u> (% en b.s.)	<u>Harinas</u>	<u>Concentrados</u>	<u>Aislados</u>
Proteína	56,0	72,0	96,0
Grasa	1,0	1,0	0,1
Fibra	3,5	4,5	0,1
Cenizas	6,0	5,0	3,5
Hidratos de carbono (sol.)	14,0	2,5	0
Hidratos de carbono (insol.)	19,5	15,0	0,3

Los "aislados" constituyen los productos más ricos en proteínas (superior al 90%), con un contenido en cenizas variable (dependiente del método de obtención y purificación) y con cantidades mínimas de lípidos e hidratos de carbono y fibra (obtenidos a partir de poroto descascarado).

Tal como se puede concluir de los valores de la tabla, los concentrados y más aún los aislados, no presentan los problemas relativos al "flatatus" mencionados para harinas.

El valor nutritivo de las proteínas vegetales puede verse a

fectado por algunos componentes no proteicos tales como taninos, hidratos de carbono no digeribles y factores antinutricionales. Algunos de estos factores adversos pueden salvarse a través de distintos procesos tecnológicos que se desarrollan a fin de eliminar o inactivar esos componentes indeseables.

Como resultado de estudios dichos procedimientos llevan a una situación de compromiso a fin de minimizar el daño en el valor biológico de sus proteínas. Afortunadamente en el caso de la soja, la inhibición de la mayoría de los factores antinutricionales se logra por adecuado tratamiento por calor húmedo, el que también favorece su digestibilidad³⁷, tal como pudo probarse a través de ensayos biológicos con animales de experimentación (ratas), mostrando un significativo aumento en el valor nutritivo de sus proteínas (PER de la harina cruda 1,40; harina tratada por calor 2,70)³⁷.

Así, para optimizar el valor nutricional de productos de soja desgrasados, deben someterse a un tratamiento por calor que destruya la mayor proporción de los factores antinutricionales que interfieren en la digestión y utilización de la protefna.

En la tabla 4 ³⁴ se muestra el efecto benéfico del calentamiento (en sus distintos grados) que pesa inversamente sobre el grado de desnaturalización de las proteínas.

Un excesivo calentamiento resulta en una pérdida en aminoácidos azufrados y en lisina, influyendo adversamente en la palatabilidad (sobretostado).

Tabla 4

Relaciones entre tratamiento térmico, valor nutritivo y actividad de factores antinutricionales.

<u>Tratamiento térmico</u>		<u>PER^a</u>	<u>Actividad de factores anti-^bnutricionales</u>		
Grado	PDI ^c		SBTI	Ureasa	Hemaglutinina
Sin tostar	85+	1,31	500	2,10	52
Ligeramente tostado	60-75	1,59	150	1,70	51
Totalmente tostado	20-40	2,19	15	0,10	14

^aPER: relación de eficacia proteica. Valores corregidos (caseína "standard" PER 2,50)

^bSBTI:inhibidor de tripsina (unidades). Ensayo realizado por el método de Cargill. Ureasa: ensayo del aumento de pH AOCS, método BA9-58. Hemaglutinina: (unidades) método de Liener Arch. Biochem. Biophys. 54:223

^cPDI: índice de dispersibilidad de proteína. AOCS-MOCS mét.10-66

Son numerosos los trabajos en los cuales la proteína de soja en forma de harina o fluida (leche) ha sido usada en combinación con proteínas de cereales (maíz, trigo) o de semillas de oleaginosas (girasol, sésamo) con excelentes resultados biológicos, comparados con los logrados con formulaciones conteniendo leche reconstituida. Resultados satisfactorios similares se han registrado en campañas llevadas a cabo con poblaciones infantiles desnutridas³⁸. Más aún, se han encontrado para los distin-

tos productos de la soja, múltiples aplicaciones en países desarrollados, en formulaciones con miras a mejorar el nivel nutricional de productos de panadería, así como en calidad de espesante en sopas y salsas, como extendedor y/o ligante en carnes, pollos, productos marinos y análogos de huevos y quesos^{39,40,41}.

Los preparados reconocidos como más versátiles para todas las fuentes de proteínas vegetales, los constituyen los "aislados". Son sus formas más puras, en las que están ausentes o en mínimas proporciones aquellos constituyentes que afectarían adversamente sus propiedades funcionales y organolépticas.

En el caso de la soja, si bien se eliminan totalmente los factores de flatulencia (hidratos de carbono solubles), no ocurre lo mismo con los factores antinutricionales (inhibidor de tripsina, etc.) cuyo nivel residual varía en mayor o menor proporción de acuerdo a la técnica de obtención del "aislado"^{37,42}; indicando que su utilización en los alimentos requiere necesariamente el proceso de inactivación (previo o en la elaboración del nuevo producto).

Desde un punto de vista tecnológico, tanto la semilla de lino como la de soja, requieren condiciones óptimas de industrialización (tratamientos no drásticos en la separación del aceite, para rendir una harina de alta calidad nutricional y funcional (mayor índice de solubilidad). Tal como se opera al presente en la industria, ello ha sido entendido por la industria aceitera para soja (obtención de harina cruda de extracción, hexano), no ocurriendo lo propio para la semilla de lino, procedimiento en

el que se opera en forma drástica (temperatura y presiones no convenientes para las propiedades antes mencionadas de sus proteínas).

El camino más económico y por lo tanto el utilizado por la industria para la obtención de "aislados proteicos" de soja es el clásico de dispersión alcalina (pH 9-10) y precipitación ácida (pH 4,5) (obtención de proteínas isoeléctricas) que finalmente se lavan con agua ajustada al valor de pH isoeléctrico y secan por "spray"²¹.

Los rendimientos son altamente satisfactorios, lográndose un producto prácticamente blanco, inodoro e insípido. Como es frecuente observar en todos los "aislados proteicos" ocurre una ligera disminución del valor biológico respecto del de la harina de partida, en razón de pérdidas parciales (en mayor o menor medida) de fracciones de proteínas, factor importante a tener en cuenta en el cálculo de score químico al planear las combinaciones posibles de mezclas de proteínas de ambas fuentes.

PARTE II

DISCUSION DE LA PARTE EXPERIMENTAL

PARTE II

DISCUSION DE LA PARTE EXPERIMENTAL

A)- Objetivos

En la Parte I, se han considerado las razones de la utilización de la harina de lino residual de la extracción del aceite (hexano) como material de partida para la obtención del "aislado proteico", haciéndose referencia a sus características físicas y nutricionales.

En el presente trabajo se ha encarado el estudio complementario del comportamiento de las proteínas de la harina de lino frente a la dispersión en medio alcalino y precipitación en medio ácido, observando la influencia de la temperatura y valores de pH sobre rendimiento.

Paralelamente, se controló el efecto de ambos factores sobre el valor de lisina disponible en el aislado final (aminoácido limitante en proteína de lino).

Así mismo se ha considerado la complementación por coprecipitación de dichas proteínas con cantidades crecientes de una proteína rica en lisina (soja y suero de queserías) a fin de lograr "aislados mixtos" homogéneos y enriquecidos en dicho aminoácido.

Se han llevado a cabo los exámenes de composición de las fuentes usadas como material de partida, el estudio previo de las condiciones óptimas de obtención de sus "aislados proteicos" respectivos y el de sus características físicas y químicas.

cas.

Si bien existen en literatura antecedentes sobre mejoramiento de la calidad de proteínas a través de mezclas de fuentes vegetales o por agregado a éstas de caseína, leche descremada o suero de leche, sólo se registra hasta el presente un trabajo previo sobre suplementación de proteínas de semilla de lino con caseína industrial⁵. De ahí que se encarase la utilización de harina industrial de soja y del suero de queserías (subproductos de las industrias aceitera y láctea) en calidad de suplementos.

Los resultados logrados en este trabajo cubren un amplio panorama de experiencias preliminares que propenden al aprovechamiento, en las mejores condiciones operatorias, de las fuentes mencionadas.

Desde un punto de vista práctico, la incorporación de estos suplementos ofrecerían además las ventajas de lograr en general, propiedades físicas y organolépticas esencialmente iguales a las del producto aislado no suplementado y la obtención de un aislado mixto homogéneo en forma similar a la del producto libre de suplementación, brindando así un procedimiento accesible para llevar a cabo a nivel industrial.

B)- Plan de trabajo. Discusión.

Se dispuso el siguiente plan de trabajo:

- 1)- Estudiar la composición general de los materiales de partida: harina integral de semilla de lino oleaginoso (hexano); ha

rina industrial de soja cruda y suero de queserías (subproducto de la fabricación de quesos blandos).

2)- Estudiar las condiciones óptimas de máxima dispersión (medio alcalino, NaOH) y de máxima precipitación (medio ácido, HCl) de proteínas de harina de lino, considerando influencia de temperatura y valores de pH.

3)- Obtener el aislado proteico de soja. Determinar sus características físicas, químicas y componentes de interés nutricional.

4)- Estudiar la influencia del tiempo de calentamiento (calor húmedo) respecto del grado de inactivación del factor antitriptico en el aislado de soja y paralelamente sobre el contenido en lisina del mismo.

5)- Estudiar similarmente las condiciones óptimas de precipitación de las proteínas del suero en función de valores de pH, temperatura y naturaleza del ácido y agentes precipitantes.

6)- Resolver, a escala de laboratorio, las condiciones óptimas de coprecipitación de proteínas de harina de lino y de soja y de lino y de suero (etapa de incorporación del suplemento, pH de máxima coprecipitación, purificación del precipitado obtenido por lavados y secado del mismo).

7)- Considerar, en base a cálculos previos (lisina disponible y azufrados totales) los porcentajes de harina de soja o el volumen de suero a adicionar a la harina de lino o al producto de su dispersión en medio acuoso, a fin de obtener por coprecipitación una serie de "aislados mixtos homogéneos" con concentracio

nes crecientes en los suplementos (proteínas de soja o suero) hasta lograr aquellos que igualen o se aproximen convenientemente a los valores de lisina disponible y de azufrados totales que se recomiendan en el patrón de aminoácidos esenciales de FAO 1973 (score químico).

8)- Disponer suficiente cantidad de los aislados suplementados a distintos niveles a fin de efectuar la evaluación de sus rendimientos, características físicas, químicas y la determinación de componentes particulares (lisina disponible, azufrados totales, hidratos de carbono, fósforo de ácido fítico, calcio, etc.) y la comparación de los valores logrados con los de los aislados sin suplementar.

A los fines de una mejor distribución del trabajo efectuado y para un mayor entendimiento de sus distintas partes, se discutirá primero el estudio de la suplementación de proteínas de lino con proteínas de soja y en una segunda parte el de las experiencias correspondientes a la suplementación con proteínas de suero de queserías.

1)- Estudio de la composición general de las harinas de extracción (hexano) de semilla de lino y de soja.

Con los detalles que figuran en la Parte Experimental, la harina integral de semilla de lino se obtuvo en laboratorio por agotamiento con hexano (Soxhlet) de la semilla integral previamente molida.

La harina de soja industrial (x) responde al producto obtenido por desolventizado (sin tostación) después del agotamiento por hexano técnico de las hojuelas preparadas a partir de poroto de soja descascarado y limpio. El mismo es sometido finalmente a molienda fina (malla 100) . Este producto (harina sin tostar) es el que la industria destina como material de partida para la obtención de "aislados proteicos", en razón de su alta solubilidad en agua.

Con el propósito de dar una idea de la granulometría resultante de la molienda en laboratorio (molinillo de café) de la harina residual de lino, se llevó a cabo una clasificación por tamaño de partículas (ASTM) consignando el porcentaje en peso de las fracciones retenidas en las distintas mallas. La Tabla 5 ilustra sobre esos valores y los correspondientes a harina de soja (x).

Como puede observarse, la mayoría de partículas de la harina integral de lino quedan retenidas en mallas 62 y 80 (250 y

(x) Provista por la firma Molinos Río de La Plata S.A. (Brasil)

177 μ de abertura/pulgada lineal) quedando sólo un pequeño porcentaje en plato (porción que pasa por malla 100). La harina industrial de soja cumple, en este caso, con el requisito legal de granulometría para la harina correspondiente.⁴³

Tabla 5

Granulometría de las harinas de partida de lino y soja

	N° de abertura/pulgada lineal			Plato
	62	80	100	
	ASTM (μ)			
				<u>% de partículas retenidas en cada malla</u>
<u>Harina integral de lino</u>	43,0	41,0	13,2	2,8
<u>Harina industrial de soja</u>	-	-	5,0	95,0

Como primer paso se determinaron los valores de composición general de la harina integral de lino, los que resultaron acordes con los señalados en trabajos anteriores^{2,5}. El examen de composición general de la harina industrial de soja encuadra dentro de las cifras mencionadas en literatura para la "harina"^{33,34} y dentro de las especificaciones recomendadas por el Código Alimentario Argentino.

La Tabla 6 reúne los valores registrados para ambas harinas de extracción. Las características organolépticas también se consideran en el mismo.

2)- Estudios sobre dispersión y precipitación de proteínas de lino. Influencia de la temperatura y valores de pH.

Teniendo en cuenta que la harina integral de lino presenta dificultades en la dispersión y precipitación de sus proteínas por la presencia de cantidades significativas de mucílago (que ocurre naturalmente en la semilla, principalmente en la cáscara) se decidió realizar una serie de ensayos a fin de observar la influencia de parámetros tales como pH y temperatura, manteniendo constantes las otras condiciones de dispersión y precipitación, ya consideradas como más convenientes en trabajos anteriores^{2,5} (relación harina:solvente, tiempo de dispersión y velocidad, y tiempo de centrifugado)(ver Parte Experimental).

La Tabla 7, ilustra sobre los valores hallados para distintos pH del medio y para distintas temperaturas mantenidas constantes durante toda la etapa de dispersión de las proteínas.

De su observación se deduce que a medida que aumenta el valor del pH del medio dispersante, se logra un mayor rendimiento en material nitrogenado solubilizado (marcado aumento entre pH 6 y 7 y luego, a partir de 8 una meseta).

En cambio no se registra una tendencia similar respecto del aumento de temperatura durante la etapa de dispersión (30→50°). Cabe señalar aquí que se llevaron a cabo numerosas experiencias previas a temperatura ambiente (aprox. 25°) para un valor de pH de dispersión 9-10. Todos estos valores concuerdan con resultados de ensayos realizados con anterioridad al presente trabajo (valores no publicados), en los que se operó a temperatura am-

biente, 30 y 45° para un pH 9-10 en el medio dispersante.

En base a ello, se procedió en lo sucesivo a efectuar las dispersiones de harina de lino a temperatura ambiente.

Tabla 7

Proteínas de harina integral de semilla de lino. N dispersado / N total (harina) en función del valor de pH y temp. de dispersión.

pH disp.	30°		40°		50°	
	N disp. % har.	N disp. % N tot.	N disp. % har.	N disp. % N tot.	N disp. % har.	N disp. % N tot.
6,0	2,47	42,0	----	----	----	----
7,0	3,70	62,9	3,66	62,2	3,67	62,4
8,0	3,84	65,3	----	----	----	----
9,0	3,87	65,8	3,80	64,6	3,95	67,2
10,0	3,87	65,8	----	----	----	----
11,0	4,07	69,2	4,19	71,2	4,23	71,9

Parámetros constantes: cantidad de harina a dispersar: 10 g
 n° de dispersiones: 2 y 1 lavado
 relación harina/agua: 1:20 y 1:11,5 en etapas de dispersión y 1:5 en lavado
 tiempo c/ etapa dispersión: 1 h.
 tiempo y veloc. centrifugación: 30', 2800 rpm.

Para decidir el camino a operar respecto del valor de pH de dispersión, si bien surge de la Tabla 7 que a mayores valores de

pH (superiores a 10) se registra un ligero aumento en el material nitrogenado dispersado, se consideró el probable efecto en el rendimiento en aislado final y sobre la disponibilidad de la lisina contenida en el mismo.

Evidentemente una mayor extracción de material nitrogenado puede deberse a material de distinta composición que el que se extrae a menores valores de pH, con influencia a su vez sobre el punto de máxima precipitación de proteínas.

Por tal razón y en conocimiento del perfil de precipitación (medio ClH) de proteínas dispersadas a pH 9-10, versus valores de pH, del cual se obtuvo el valor correspondiente al de máxima precipitación (4,0)², se llevaron a cabo las experiencias necesarias para obtener dicho perfil pero operando sobre el material nitrogenado dispersado a pH 11 (temp. ambiente).

Para ello se dispersó la harina integral de lino al valor de pH elegido (11,0)(relación harina:agua 1:20; 1:5 y 11,5, fijada con anterioridad) removiendo el material nitrogenado por centrifugación. Se ensayó la precipitación del material nitrogenado dispersado a distintos valores de pH, sobre alicuotas del extracto alcalino por agregado de variadas cantidades de soluciones de ClH, con agitación permanente. Los precipitados fueron removidos por centrifugación, midiéndose el nitrógeno de los sobrenadantes para cada valor de pH. (ver Parte Experimental)

La Tabla 8 y la representación gráfica de los valores presentes en ella Fig. 1, permiten visualizar claramente un corri

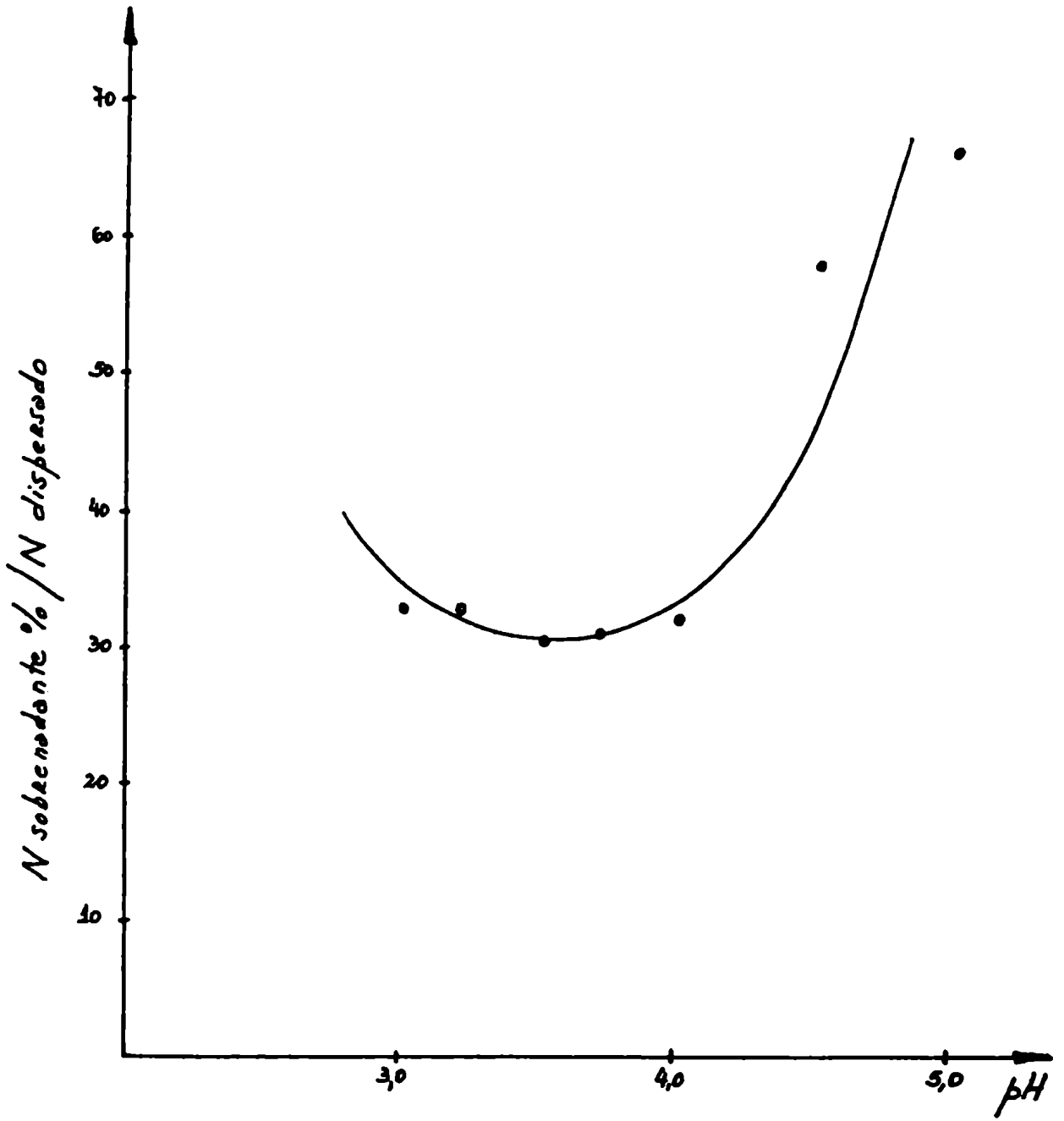
miento del mismo hacia la zona ácida (pH de máxima precipitación 3,5) respecto del ensayo anteriormente mencionado.

Tabla 8

Harina integral de lino. Elección del valor de pH de máxima precipitación, sobre material nitrogenado dispersado (pH 11)

<u>pH de precipitación</u>	<u>N sobrenadante% / N dispersado</u>
3,0	31,87
3,2	32,04
3,5	30,21
3,7	30,66
4,0	31,35
4,5	57,21
5,0	65,53

Figura 1



Harina integral de lino. Nitrógeno sobrenadante/ material nitrogenado dispersado (pH 11), en función del pH de precipitación.

Con los detalles dados en la Parte Experimental, las experiencias completas para las dos condiciones arriba mencionadas, fueron conducidas variando solamente el valor de pH de dispersión de material nitrogenado, y manteniendo constantes los otros parámetros (relación harina:solvente, temperatura, condiciones de agitación y centrifugación, purificación del precipitado y secado final), registrando finalmente rendimiento y valor de lisina disponible de los aislados respectivos (al valor de máxima precipitación para cada caso). La Tabla 9 reúne los valores encontrados y de su comparación surge, que si bien los rendimientos son similares y caen dentro del rango de oscilación registrado para distintas partidas de aislados obtenidos por un mismo proceso, el nivel de lisina disponible, así como la riqueza en nitrógeno del aislado final, son algo inferiores para el proveniente del material nitrogenado a mayor valor de pH (11,0) .

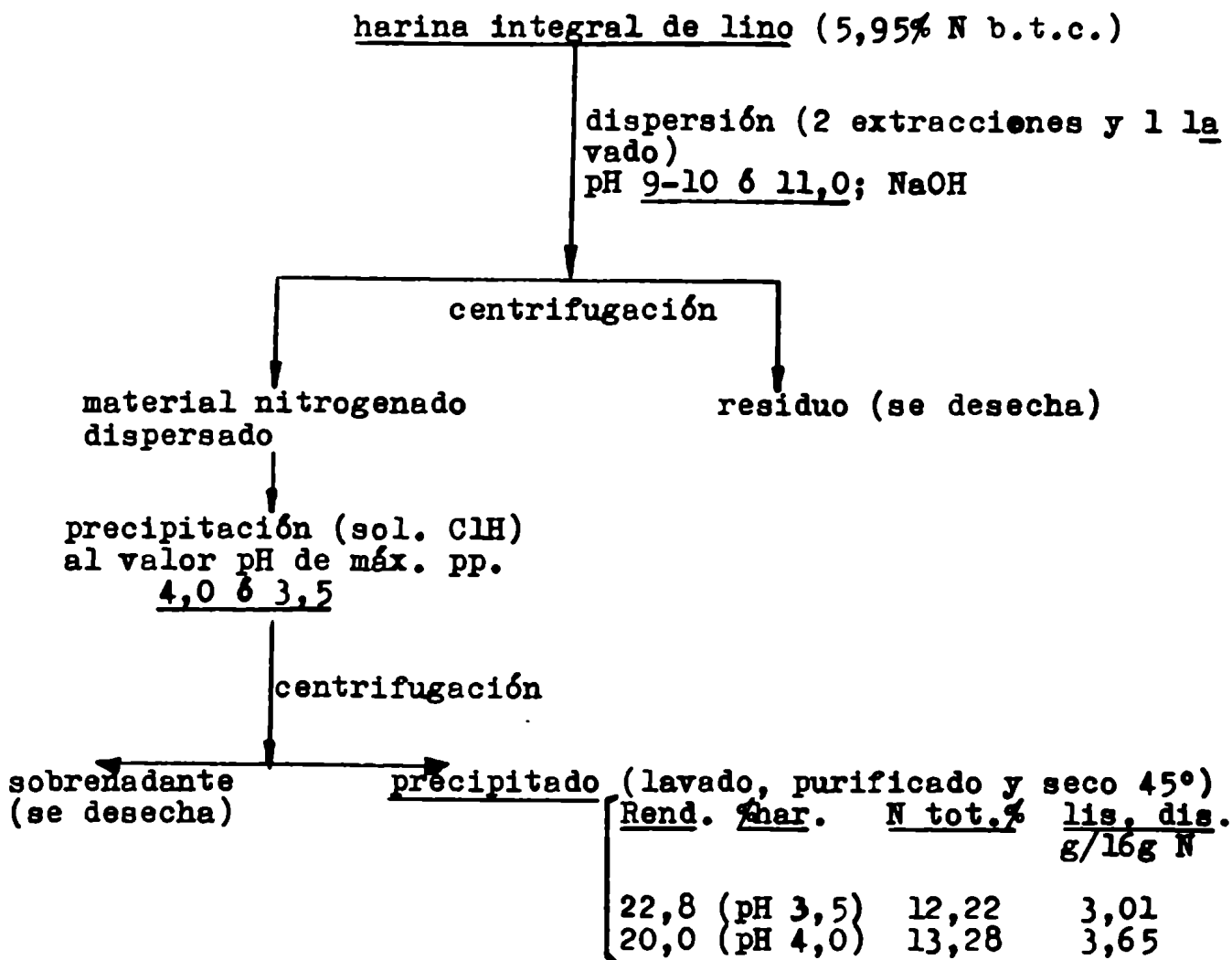
Así mismo cabe considerar la poca conveniencia de operar a un pH tan elevado (11,0), aunque se disperse a temperatura ambiente, debido a una probable formación de dehidroalanina (daño ocasionado a la lisina por un medio fuertemente alcalino)^{44,45}.

Tabla 9

Harina integral de semilla de lino. Influencia del valor de pH de dispersión y de precipitación en el rendimiento en "aislado proteico" y en el valor de lisina disponible del mismo.

	<u>dispersión a pH 9-10</u> <u>pH máx. pptación 4,0</u>	<u>disp. a pH 11</u> <u>pH máx. pp. 3,5</u>
rendimiento en aislado final (% harina)	20,0	22,8
N total en aislado final (%)	13,28	12,22
lisina disponible (g/16g N)	3,65	3,01

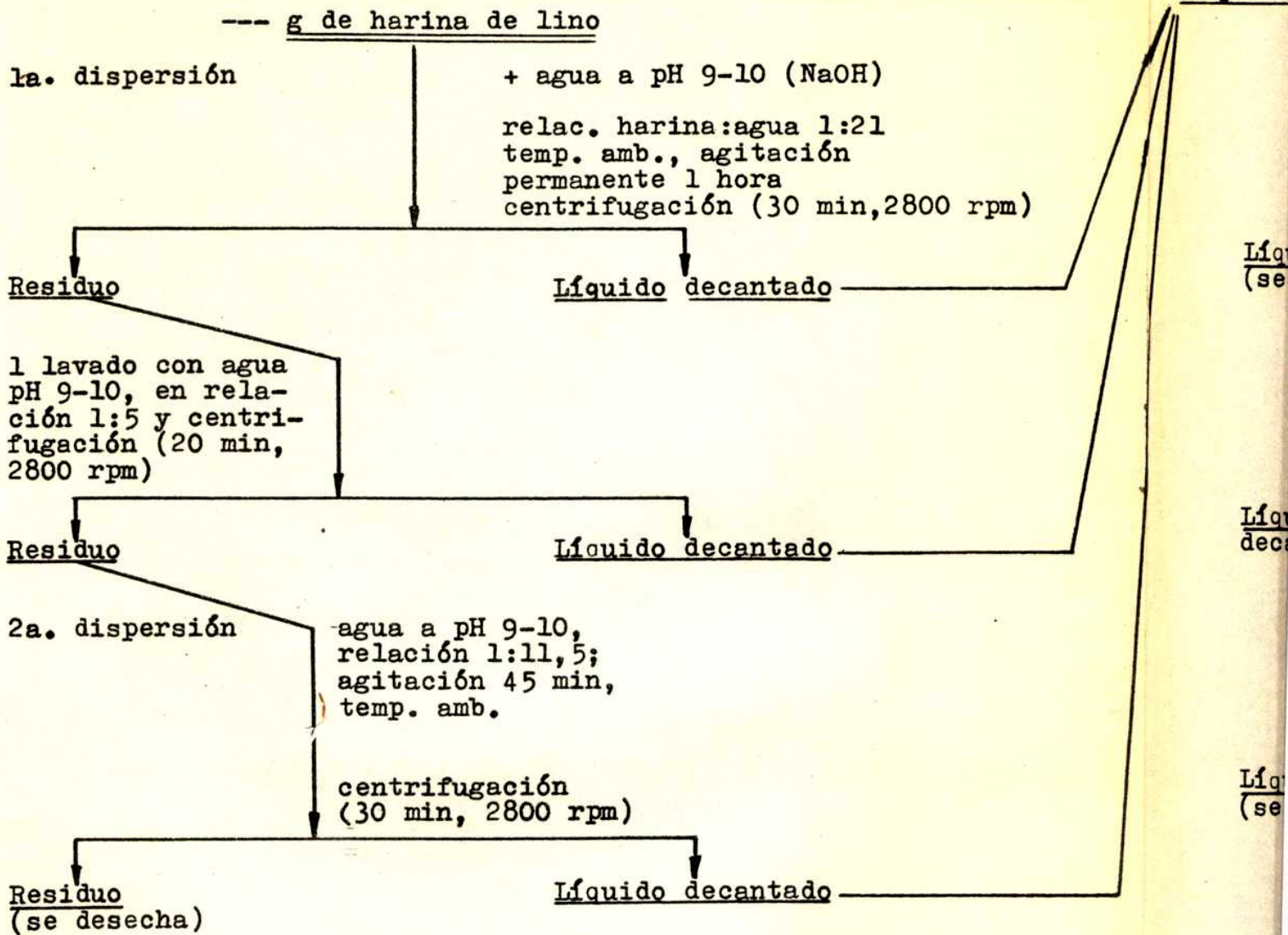
A continuación se ilustra en forma de esquema el procedimiento seguido en ambos casos.

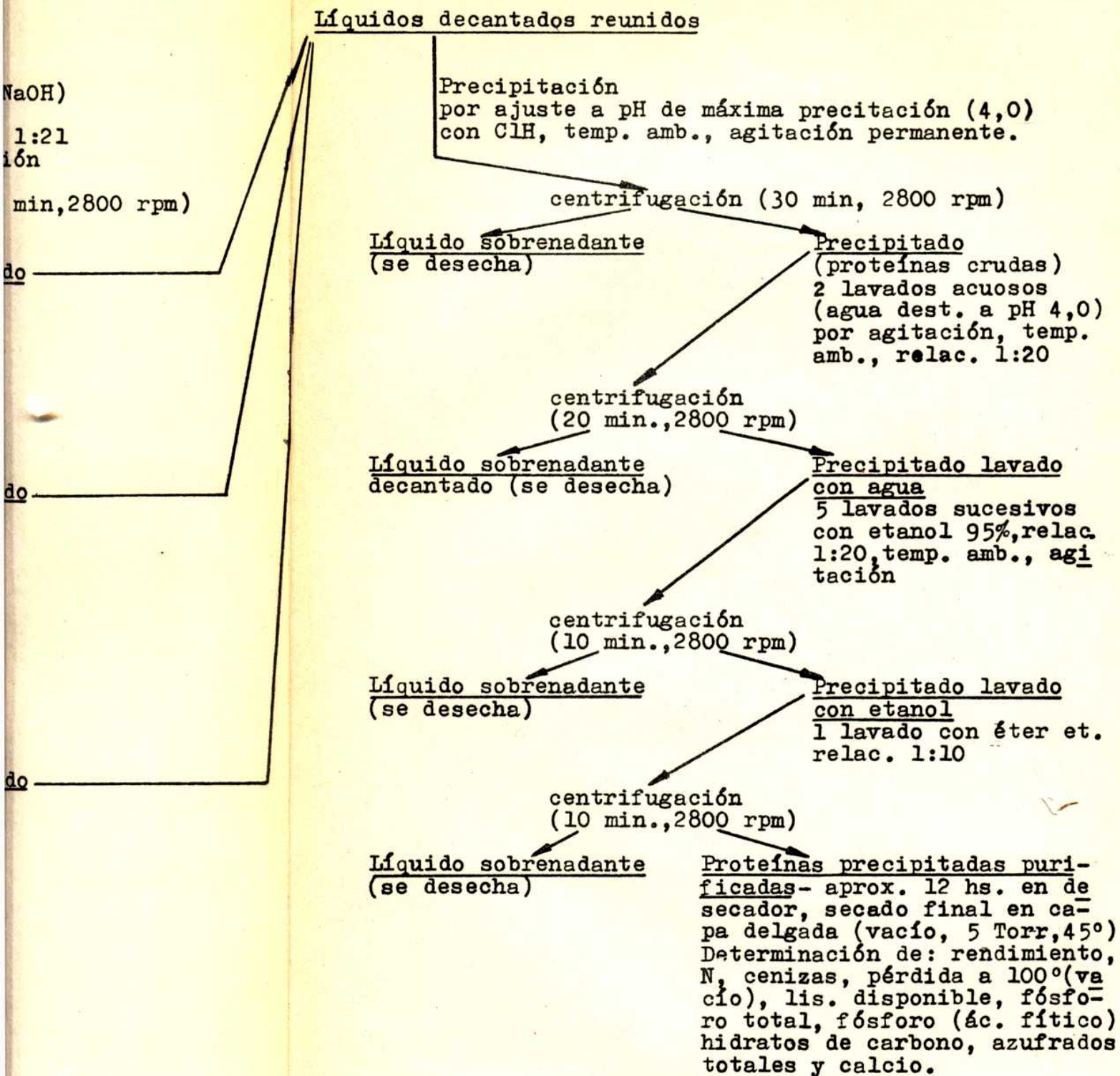


Teniendo en cuenta las observaciones señaladas se consideró conveniente, en lo sucesivo, efectuar las dispersiones sobre harina integral de lino al valor de pH 9-10 y precipitar las proteínas extraídas a pH 4,0, ambas etapas a temperatura ambiente.

El procedimiento completo de aislamiento de dichas proteínas responde al esquema adjunto. Se registraron rendimiento y características físicas y químicas del aislado obtenido. (P. Experimental)

Figura 2





3)- Obtención del "aislado proteico" a partir de harina industrial de soja cruda.

En vista de la abundante literatura referente a condiciones de aislamiento de proteína de soja, donde se señalan valores de pH óptimo de dispersión (9-10) y de máxima precipitación (4,5)²¹,
46 se adoptaron dichos valores para operar en la obtención del aislado (temp. amb.), registrando rendimiento, y características físicas y químicas del mismo.

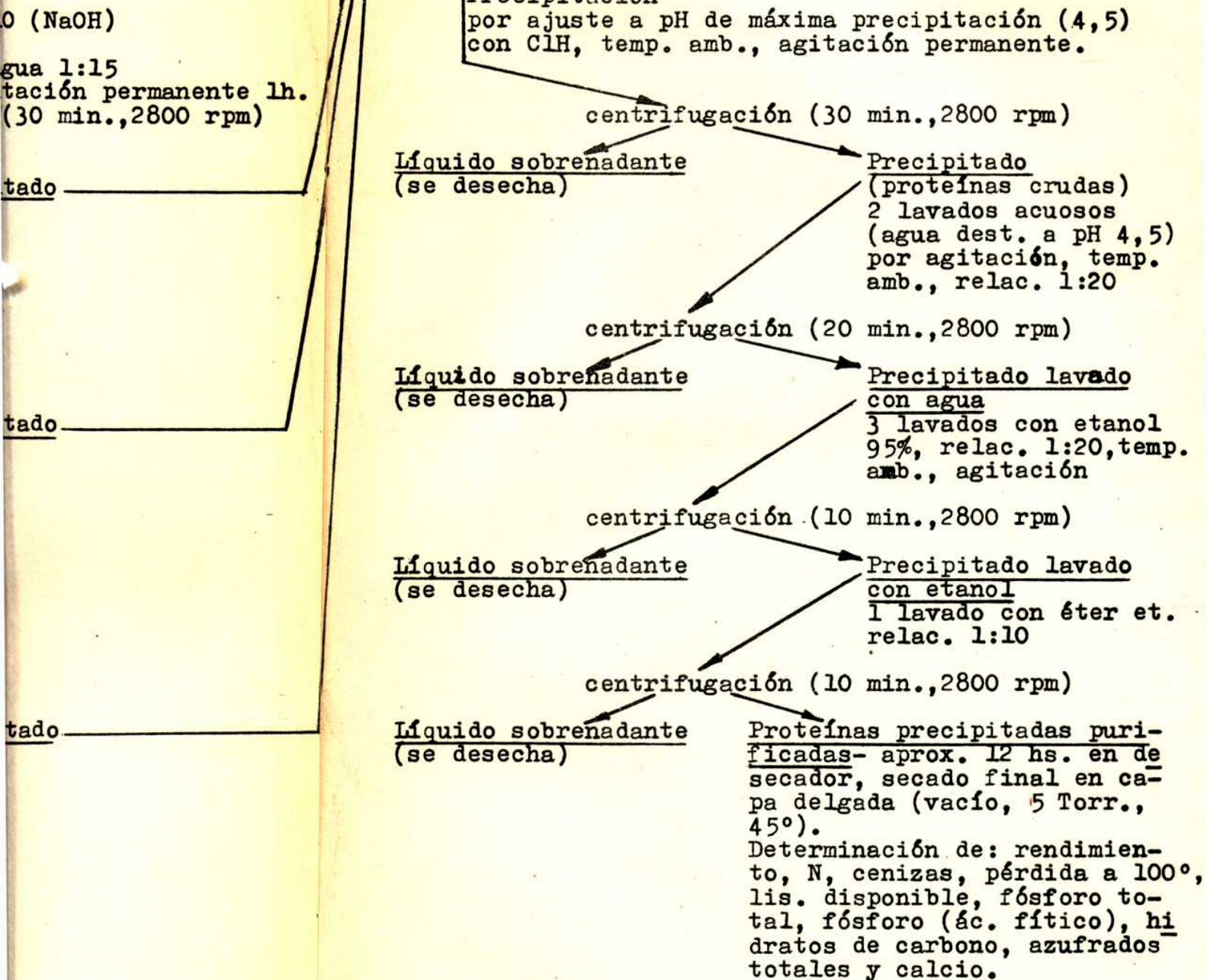
En la Figura 3 se presenta un esquema que permite seguir las distintas etapas del procedimiento de obtención.

4)- Estudio de la influencia del tiempo de calentamiento (calor húmedo) sobre el grado de inactivación del factor antitriptico en el "aislado de soja", el contenido de lisina disponible y el de azufrados totales en el mismo.

42

Se quiso conocer a través de un método químico, cual era el valor de actividad de antitripsina en el "aislado de soja" obtenido a partir de harina sin tostar (Brasil) y observar el efecto del tratamiento por calor húmedo (autoclave, presión atmosférica) en dicho valor (según detalles en Parte Experimental).

Está demostrado que el grado de inactivación del factor antitriptico surge paralelo a la mejora en el valor nutritivo del producto así tratado, pero un excesivo calentamiento puede ocasionar daño a la proteína. Por ello se determinó el contenido en lisina disponible y el de azufrados totales (metionina+cistina), antes y después del tratamiento. También se determinó en los mismos casos la actividad ureásica.

Líquidos decantados reunidos

En la Tabla 10 se reúnen los resultados registrados sobre un "aislado de soja" obtenido según el esquema de la Fig.3. En la misma se puede observar una reducción apreciable del factor anti-tríptico y una inactivación total de la actividad ureásica en los aislados tratados, mientras que el contenido en lisina disponible y el de azufrados totales no se ven afectados (Parte Exp.).

Tabla 10

Efecto del tiempo de calentamiento sobre un aislado de soja, obtenido a partir de harina sin tostar.

<u>Tiempo</u> <u>vapor de agua</u> <u>P=1 atm (min)</u>	<u>Actividad</u> <u>ureásica</u>	<u>Factor</u> <u>antitriptico</u> <u>(UIT/mg)</u>	<u>Lis. disp.</u> <u>(g/16g N)</u>	<u>Azufrados</u> <u>totales</u> <u>(g/16g N)</u>
0	0,4	64,3	6,35	2,40
8	0	27,0	6,58	--
15	0	14,5	6,60	2,46

- 6)- Estudio de las condiciones óptimas de coprecipitación de proteínas de lino y de soja.
- 7)- Cálculos previos en base al contenido en lisina disponible y en aminoácidos azufrados totales de ambas fuentes. Obtención de "aislados mixtos".

En la elección de las condiciones óptimas de coprecipitación de proteínas de lino con proteínas de soja para los fines mencionados en los objetivos, se tuvieron en cuenta las siguientes características de las respectivas fuentes:

- El patrón de aminoácidos esenciales y en particular el valor de lisina disponible y de azufrados totales y la relación de los mismos respecto del patrón de la proteína considerada como referencia por FAO (1973)²⁰.

- Los rendimientos logrados en los aislados respectivos y su concentración en nitrógeno total.

- Los valores de pH de máxima precipitación de las proteínas de cada fuente (4,0 y 4,5) y un valor intermedio (4,2).

Teniendo en cuenta los valores logrados en la experimentación actual (evaluación de lisina disponible y de azufrados totales) (ver Parte Experimental), la información suministrada por trabajos previos^{3,5} y la de literatura^{16,38}, aparentemente la suplementación satisfactoria de la proteína de lino (deficiente primariamente en lisina y buena fuente en azufrados totales), con proteína de soja (rica en lisina y pobre en azufrados) sería factible.

De la comparación de las deficiencias respectivas, al menos teóricamente habría una complementación para determinada proporción en la mezcla de ambas fuentes. Sobre esta base y como un primer intento (ya que sólo se consideran los aminoácidos limitantes tal como se explicó en la Introducción), se han calculado las proporciones de proteína de soja que sería necesario incorporar a la proteína de lino (cubriendo las pérdidas ocurridas a través de las etapas de dispersión, precipitación y purificación) para que se cumpla la nivelación de los aminoácidos deficitarios mencionados. Paralelamente mostrar, para que porcentaje de proteína de soja (deficiente en azufrados) en el coprecipitado, comenzaría éste

a ser primer limitante.

Los valores experimentales de contenido en nitrógeno (proteína cruda) de los aislados proteicos finales de ambas fuentes y sus rendimientos (valores promedio de los logrados en numerosas experiencias de aislamiento, respecto de la harina de partida), sirvieron para calcular la cantidad de material de partida a mezclar (harinas) que representarían las proporciones elegidas para ambas mezclas.

A continuación se detallan los pasos del cálculo mencionado (a través de un ejemplo), que son de aplicación general a todas las combinaciones de mezclas experimentadas.

El aislado proteico de lino (seco a 45°) obtenido a partir de harina integral, rinde 12,83% de N total ($12,83 \times 6,25 = 80,19\%$ de proteína cruda).

El aislado proteico (seco a 45°) obtenido de harina industrial de soja cruda rinde 14,63% de N total ($14,63 \times 6,25 = 91,44\%$ de proteína cruda).

Para lograr un aislado mixto que contenga aproximadamente 40% de proteína de lino y 60% de proteína de soja, se necesitarían obtener respectivamente $100 \times 40 / 80,19$ g de aislado de lino y $100 \times 60 / 91,44$ g de aislado de soja. Teniendo en cuenta los rendimientos en el proceso de obtención (considerando las pérdidas que se registran en las etapas de dispersión, precipitación, lavados y secado final) esas cantidades estarían representadas por las siguientes proporciones de harinas de partida:

- cada 100g de harina de soja industrial (promedio) rinden 38,6g de producto final seco a 45° ("aislado proteico de soja").

- cada 100g de harina de lino rinden (promedio) 21,15g de producto final seco a 45° ("aislado proteico de lino").

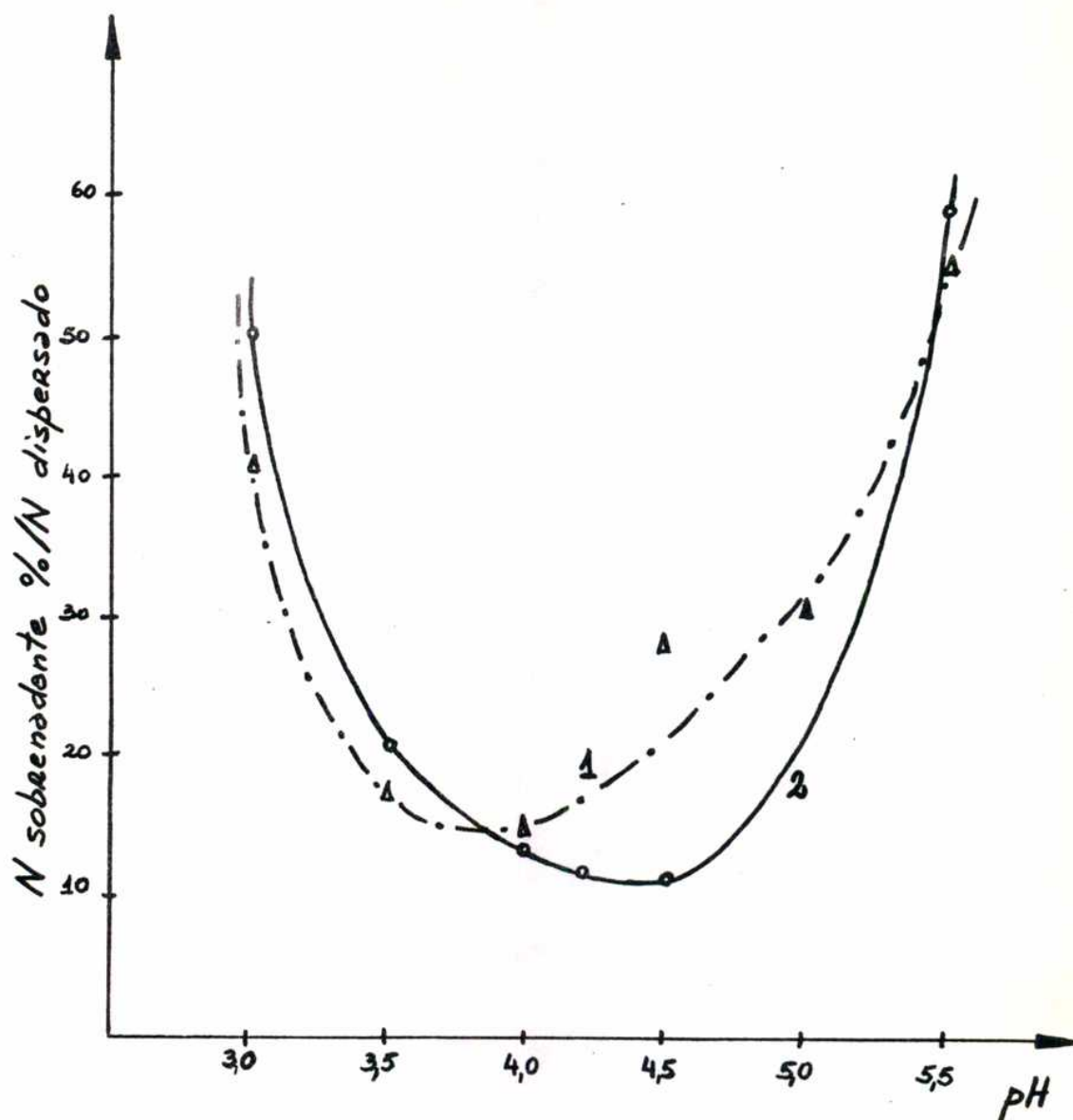
Por lo tanto: $100 \times 40 \times 100/80,19 \times 21,15$ representaría la proporción a pesar de harina integral de lino y $100 \times 60 \times 100 / 38,6 \times 91,44$ la que correspondería a harina industrial de soja. Es decir, que para lograr un "aislado mixto" en el que se suplemente proteína de lino con 60% de proteína de soja, se necesitaría partir de 235,8g de harina integral de lino y de 170,0g de harina de soja, aceptando como hecho de que ambas fuentes contribuyan con una composición constante, ya que las estimaciones previas fueron hechas sobre los productos aislados en las mismas condiciones que operarían sobre los aislados suplementados.

Influencia del valor de pH de máxima precipitación en la obtención de "aislados mixtos".

Surge de la observación de los valores de pH de máxima precipitación para la obtención de los aislados individuales (lino y soja) que es factible operar la coprecipitación al valor de pH isoeléctrico, ya sea del de la proteína de lino (4,0) o del de soja (4,5). No obstante, dentro del ámbito 4,0-4,5 podría darse un mayor rendimiento en aislado mixto y/o un mejor nivel de lisina disponible que satisficiera a un rango de proporciones en la mezcla a suplementar. (Fig. 4).

Por ello se planearon una serie de experiencias en las que se efectuó, para cada nivel de suplementación, la coprecipitación

Figura 4



Proteínas aisladas de harina integral de lino (1) y de harina de soja (2).

Nitrógeno sobrenadante (%N dispersado) en función del pH de precipitación.

a valores de pH 4,0; 4,5 y 4,2 como punto intermedio, observando paralelamente, rendimiento, contenido en nitrógeno y lisina disponible en el aislado mixto final.

En la Tabla 11 se resume el conjunto de valores logrados. La cantidad de los materiales de partida fue la misma para cada serie de experiencias que abarcaron un mismo nivel de suplementación, operándose de acuerdo a una técnica general que se detalla en la Parte Experimental (Fig. 5).

El análisis comparativo de estos resultados revela:

- un rendimiento ligeramente menor en aislado mixto para las coprecipitaciones efectuadas a pH 4,0 y 4,5 en relación a las realizadas a 4,2.
- un contenido en lisina disponible consistentemente superior al valor calculado para la mezcla (en cada proporción respectiva) en el coprecipitado obtenido a pH 4,5 (punto isoeléctrico de las proteínas de soja), inferior en el correspondiente a pH 4,0 (punto isoeléctrico de las proteínas de lino) y concordante en el caso de operar a 4,2.
- un contenido en nitrógeno total en los coprecipitados para las mismas mezclas, que oscila en el estrecho rango de 13,7 y 14,6 (aislado de lino sólo 12,8 y soja sola 14,6).

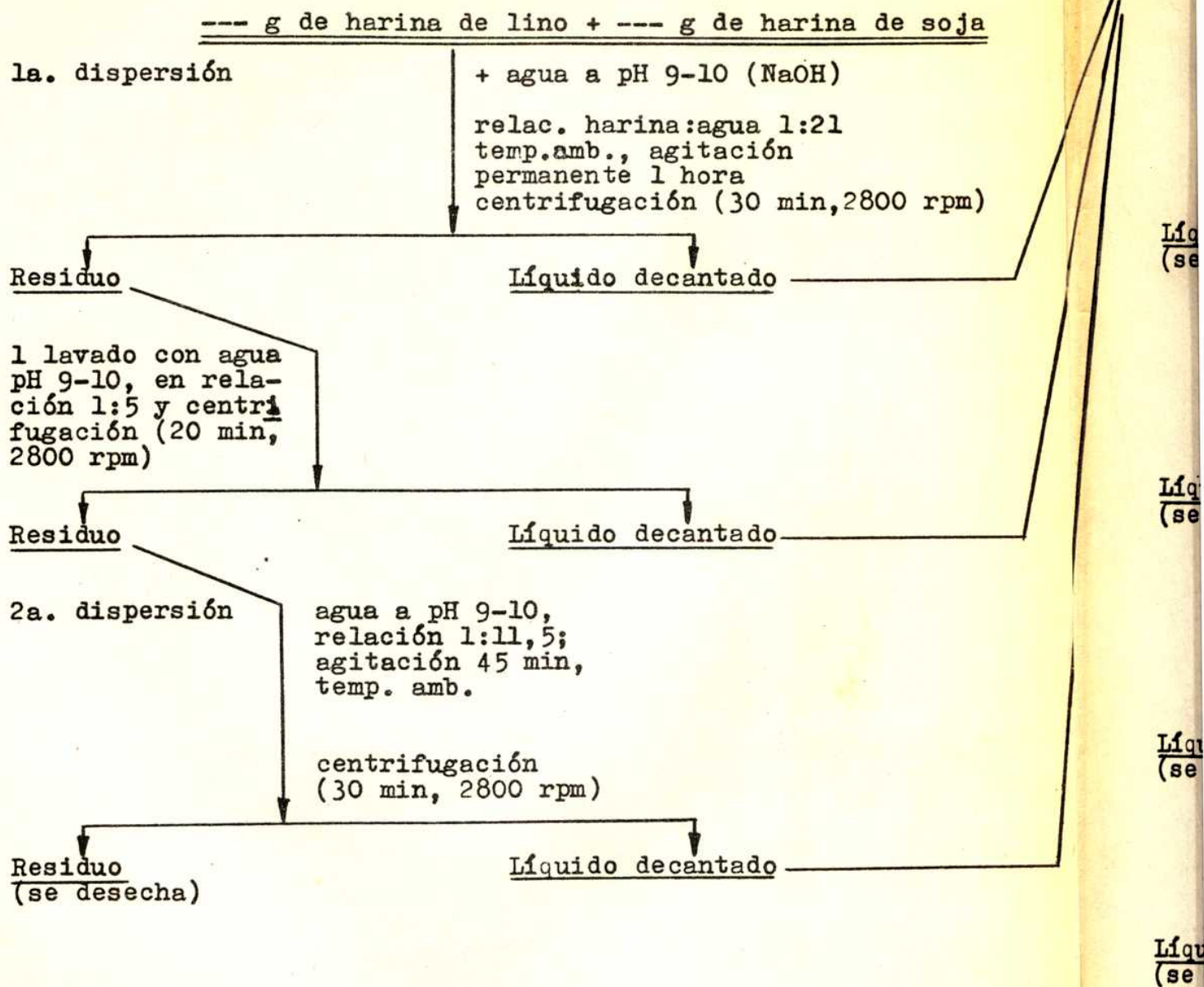
Aparentemente se refleja la mayor proporción de proteína de lino en el coprecipitado a pH 4,0 a través de un menor contenido en lisina, la mayor contribución de proteína de soja en el coprecipitado a pH 4,5 por su mayor contenido en lisina, correspondiendo valores intermedios para el precipitado mixto a pH 4,2

Tabla 11

Influencia del valor de pH de máxima precipitación en la obtención de "aislados mixtos".

<u>Soja</u> % prot.	<u>Lino</u> % prot.	<u>pH</u> <u>pptac.</u>	<u>Rendimiento</u> % copp./har.	<u>Lis. disp.</u> g/16g N b.s.	<u>N %</u> <u>b.t.c.</u>
100	0	4,5	38,60	6,35	14,63
70	30	4,5	33,79	5,88	14,54
70	30	4,2	34,77	5,63	14,64
70	30	4,0	34,12	5,58	14,46
60	40	4,5	29,57	5,57	14,20
60	40	4,2	32,33	5,45	13,98
60	40	4,0	30,24	4,97	14,09
50	50	4,5	26,37	5,00	14,17
50	50	4,2	29,87	4,97	13,97
50	50	4,0	23,19	4,43	14,08
40	60	4,5	25,28	4,79	14,17
40	60	4,0	27,34	4,75	13,76
30	70	4,5	21,10	4,52	14,03
30	70	4,2	24,21	4,46	14,15
30	70	4,0	23,19	4,43	14,08
0	100	4,0	21,15	3,65	12,83

Figura 5



Líquidos decantados reunidos

a de soja

2800 rpm)

Precipitación por ajuste a pH de máxima precipitación con ClH, temp. amb., agitación permanente,

centrifugación (30 min, 2800 rpm)

Líquido sobrenadante
(se desecha)

Precipitado
(proteínas crudas)
2 lavados acuosos (agua dest. a pH) por agitación, temp. amb., relac. 1:20

centrifugación (20 min., 2800 rpm)

Líquido sobrenadante
(se desecha)

Precipitado lavado con agua
5 lavados sucesivos con etanol 95%, rel. 1:20, temp. amb., agitación

centrifugación (10 min, 2800 rpm)

Líquido sobrenadante
(se desecha)

Precipitado lavado con etanol
1 lavado con éter et. relac. 1:10

centrifugación (10 min., 2800 rpm)

Líquido sobrenadante
(se desecha)

Proteínas coprecipitadas purificadas
aprox. 12 hs. en desecador, secado final en capa delgada (vacío, 5 Torr, 45°)

pero con un rendimiento más alto.

De acuerdo a esto, de operar la precipitación a pH 4,2, los aislados mixtos responderán a un nivel de lisina disponible muy concordantes con los calculados en base a los contenidos de los aislados de partida respectivos.

En todos los casos y a través de distintas proporciones en las mezclas, se observa claramente el efecto gradual suplementario de la proteína de soja al contribuir con un mayor nivel de lisina cuando es incorporada en mayor proporción en sus mezclas con proteínas de lino. Así mismo un ligero incremento en rendimiento a medida que aumenta la proporción de harina de soja en la mezcla (Tabla 11).

8)- Evaluación de características físicas, químicas y determinación de componentes particulares de los aislados suplementados a distintos niveles. Comparación de los valores logrados con los de los aislados sin suplementar.

Los resultados de un estudio de composición aminoacídica de los diferentes "aislados mixtos" obtenidos, (ver Parte Experimental) así como los de ambas fuentes de partida separadamente, muestran para los aminoácidos limitantes de ambas, que la proporción de proteína de lino a proteína de soja (60:40) en el aislado mixto cubriría el nivel sugerido por FAO/OMS (1973) de lisina para el patrón ideal²⁰ (Tabla 12).

El aislado en el cual ambas proteínas participan en un 50% cubriría el 95% (score químico) del valor señalado (5,5), mientras que en ambos casos el nivel de aminoácidos azufrados tota-

Tabla 12

Contenido en aminoácidos para distintos aislados coprecipitados de lino y soja.

<u>g/16g N</u> (sss)	<u>soja:lino</u> (% prot.)					
	0:100	30:70	50:50	60:40	70:30	100:0
lis. disp.	3,65	4,53	5,24	5,56	5,80	6,35
lis. tot.	4,37	4,77	5,59	5,74	6,65	7,24
met.	1,91	1,61	1,44	1,41	1,46	1,22
cis.	1,39	1,11	1,21	1,08	1,22	1,18
met.+cis.	3,30	2,72	2,65	2,49	2,68	2,40
treo.	3,67	--	--	--	--	3,31
leu.	6,12	--	--	--	--	6,91

les (metionina + cistina) resultaría sólo ligeramente superior a los valores frecuentemente encontrados para proteína de soja sola y al hallado en este trabajo (2,4); e inferiores al recomendado por el patrón FAO (3,5)(en experiencias para ratas en crecimiento)(Tabla 13).

Especulando con los resultados logrados, aparentemente la coprecipitación de proteínas de lino y soja conduciría a un valor nutritivo máximo (SC 77,7; lino:soja 70:30) superior al de los aislados de ambas fuentes de partida. Ello en razón del efecto complementario de ambos patrones de aminoácidos esenciales, aportando la proteína de lino mayor riqueza en aminoácidos azufrados y la de soja mayor nivel en lisina en los coprecipita -

Tabla 13

Cómputo químico calculado para distintos aislados coprecipitados de lino y soja.

<u>Score</u> <u>químico</u>	<u>soja:lino</u> (% prot.)					
	0:100	30:70	50:50	60:40	70:30	100:0
lis. disp.	66,4	82,4	95,3	100	100	100
met. +cis.	94,3	77,7	75,7	71,1	76,6	70,3
leu.	87,4	90,8	93,0	94,2	95,3	98,7
treo.	91,7	89,0	87,2	86,4	85,5	82,8
trip."	>100	>100	>100	>100	>100	>100

"en el caso del triptofano se ha considerado el valor de literatura:

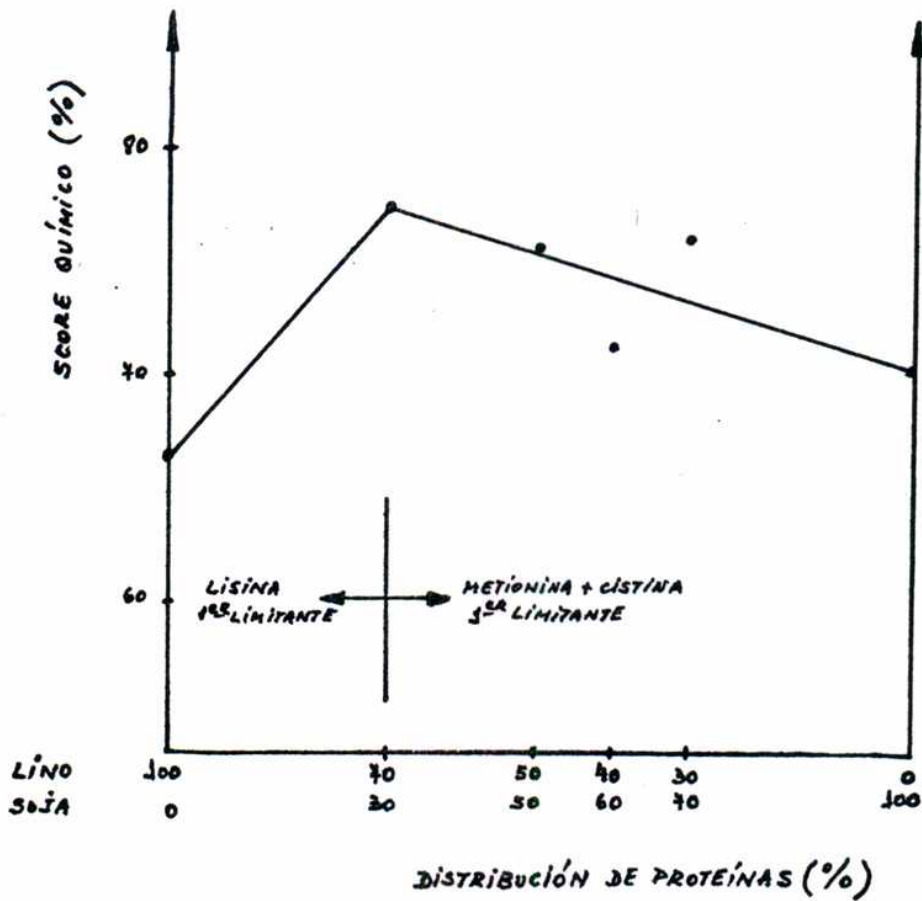
lino⁹ (1,30)

soja²¹ (1,20)

dos obtenidos. Con proteínas de lino y soja, la proporción óptima que llevaría a un máximo de utilización sería la relación antes mencionada, limitada en su aprovechamiento por el primer limitante (aminoácidos azufrados totales).

Los aislados coprecipitados con mayores proporciones de proteína de lino que 70% serían deficitarios en lisina (ler. limitante) con menor valor de score químico y aquellos con mayor proporción de proteína de soja del 30% estarían limitados en mayor medida por los aminoácidos azufrados, como puede apreciarse en la Fig.6.

Figura 6



Proteínas aisladas por coprecipitación a partir de harinas de lino y soja.

Score químico (%) en función del porcentaje de distribución de proteínas coprecipitadas de ambas fuentes.

Todo ello sobre la base de la supuesta composición constante aportada por cada fuente al valor del pH de máxima precipitación.

Al considerar, teóricamente, los niveles del 2° y 3° limitante en la proteína aislada de lino (leucina y treonina) y la suplementación llevada a cabo en el presente trabajo a distintos niveles con proteína de soja (aminograma), surge que esos niveles aumentan al incrementar la proporción de proteína de soja para la leucina y disminuyen en el caso de la treonina, continuando en todas ellas el contenido en azufrados totales como factor de limitación primaria en el aprovechamiento de las proteínas y sin modificar las conclusiones antes anotadas.

El agregado de metionina de síntesis y la evaluación biológica con animales de experimentación (ratas) podrían corroborar lo antedicho y mostrar la limitación por parte de la lisina (2° limitante) para el caso particular de la coprecipitación 70:30.

Es de destacar que existen referencias en literatura que ilustran sobre oscilaciones en contenido en aminoácidos esenciales (particularmente azufrados, entre otros) según cultivares, condiciones ambientales y culturales de los granos de leguminosas¹⁹.

Desde el punto de vista nutricional, Bressani³² ha resumido los resultados de estudios de alimentación con proteína de soja con ratas en crecimiento, mostrando que la soja cruda es de bajo valor nutricional y que la calidad de su proteína puede mejorarse a través de procesado por calor y por suplementación con metionina. La significación cuantitativa de estas observaciones fue evaluada cuidadosamente en nutrición humana por la labor conjunta de grupos de especialistas del MIT (Instituto Tecnológico de Ma -

ssachusetts) y del INCAP (Instituto de Nutrición para CentroAmérica y Panamá)²², examinando particularmente el efecto de la suplementación de aminoácidos azufrados para distintos grupos de edades, en razón de sus diferentes requerimientos.

Es importante señalar que el valor de la proteína de soja (harina o aislado) para adultos humanos es considerablemente más alto que el sugerido en estudios de alimentación con ratas de crecimiento rápido, indicando que un producto de soja bien procesado y en dietas que cubran las demás necesidades de nutrientes, es capaz de cubrir los requerimientos sin suplementación con metionina.

Aunque varios estudios indican que la proteína de soja no suplementada puede consumirse a niveles suficientemente adecuados y prevenir la malnutrición infantil, un modesto nivel de suplementación con metionina en las formulaciones basadas enteramente en soja, se considera beneficioso.

Resulta razonable pensar entonces, que al extrapolar los resultados logrados en ensayos con animales de experimentación al niño, las combinaciones señaladas para los coprecipitados como convenientes en lisina disponible lo serían también en azufrados totales (met+cis; 2,5-2,6).

Con fines comparativos se incluyeron en el análisis de composición general de los aislados de las fuentes de partida y de los diferentes aislados coprecipitados; las siguientes determinaciones (ver Parte Experimental): pérdida a 100° (vacío), cenizas totales (500-550°), nitrógeno total, lisina disponible, fósforo total, fósforo de ácido fítico, hidratos de carbono y calcio, cu

Los valores promedio figuran en la Tabla 14.

Para su evaluación se consideró primero la obtención de cantidad suficiente de cada aislado a fin de poder realizar todas las determinaciones sobre la misma partida.

La determinación de cenizas totales permitió registrar un ligero incremento con la mayor proporción de proteína de lino en el coprecipitado, siendo el mayor nivel el registrado para el aislado de lino solo.

Puede observarse un aumento apreciable en el contenido en hidratos de carbono a medida que aumenta la proporción de proteína de lino en el coprecipitado o aislado mixto, dado que la soja sola retiene en la precipitación de sus proteínas un 4,5% de hidratos de carbono, mientras que el aislado de lino está asociado con alrededor del 20% de un polisacárido (mucílago que ocurre naturalmente en la semilla). Los valores para las distintas mezclas son proporcionales a los diferentes niveles de ambos integrantes.

Los distintos aislados mixtos muestran un ligero decrecimiento en el tenor de fósforo total a medida que se incrementa la proporción de proteína de lino en la mezcla, en razón de que la soja (0,83%) es mejor fuente de fósforo que el lino (0,45%).

La magnitud del contenido en ácido fítico (expresado como P% b.s.) no muestra prácticamente cambios a lo largo de las diferentes mezclas dado que ambas fuentes son similarmente ricas en el mismo (componente antinutriente que ocurre naturalmente en la semilla, en el que se enriquecen las proteínas precipitadas)(fuertemente retenido por uniones electrostáticas a grupos proteicos en la zona del pH isoelectrico)⁴⁷.

Se incluyen en esta Tabla los valores hallados para nitrógeno total y lisina disponible correspondientes a estas nuevas partidas de aislados, los que a su vez muestran concordancia con los obtenidos en partidas anteriores.

Tabla 14

Características físicas y valores analíticos de los aislados mixtos para diferentes niveles de suplementación.

<u>Relación soja:lino</u> <u>(% prot.)</u>	0:100	30:70	50:50	60:40	70:30	100:0
color			———— blanco crema ————			
olor			———— inodoro ————			
sabor			———— insípido ————			
granulosidad			———— polvo fino, suave al tacto ————			
pérdida a 100° (vacío)(%)	9,04	5,63	6,04	6,04	6,22	8,39
cenizas (% sss)	0,64	0,44	0,58	0,43	0,41	0,29
nitrógeno (% sss)	13,86	14,82	14,56	14,68	14,16	16,00
lisina disp. (g/16g N)	3,65	4,53	5,24	5,56	5,80	6,35
P total (% sss)	0,45	0,52	0,54	0,64	0,67	0,83
P de ác. fítico (% sss)	0,27	0,19	0,19	0,21	0,20	0,21
P total-P de fít. (% sss)	0,18	0,33	0,35	0,43	0,47	0,62
hidratos de carbono (% sss)	19,24	13,99	14,79	13,09	9,38	4,55
calcio (% sss)	0,019	--	--	--	--	0,010

PARTE I

CONTINUACION DE LA INTRODUCCION

3)- Suero de queserías (subproducto de la industria lechera).

Características físicas y químicas. Valor nutritivo de sus proteínas.

La importancia de los volúmenes de sueros desechados o mal aprovechados, residuales de la industrialización de distintos tipos de quesos (pasta dura, semidura y blanda), la presencia en ellos de proteínas solubles de elevado valor biológico, son razones suficientes para considerarlos como materia prima de importante aporte proteico a los fines de la alimentación del hombre y los animales.

El rendimiento en suero varía según el tipo de queso que se ha elaborado. El queso duro "tipo Cheddar" requiere aproximadamente unos 100 litros para producir 10 kg de queso; dando 9 litros de suero por kg de queso. En el caso de quesos semiduros o blandos, el rendimiento es de la mitad o aún de 2/3 partes de dicha cifra, dependiendo del grado de blandura (a mayor blandura, mayor retención de suero en el queso).

La elaboración de caseína industrial, es otra fuente para la producción de suero. Si se tiene en cuenta que cada 100 l de leche desnatada se obtienen aproximadamente 3 kg de caseína, de 1 kg de producto terminado pueden recuperarse cerca de 32 l de suero. El hecho de que la caseína se obtenga en escala industrial ha permitido que por lo menos una parte del suero pueda ser utilizada para la producción comercial de lactosa y de ácido láctico⁴⁸.

El uso del suero como alimento, en mayor o menor escala, cuenta

ta para aquellos países donde existe una industria de productos lácteos en desarrollo avanzado y una gran producción de queso.

Por otra parte, en los países o regiones donde no se han introducido los adelantos modernos en la industria láctea, es común desechar el suero.

En nuestro país la producción total y anual de quesos de todo tipo oscila en el entorno de las 240.000 Ton., de las cuales se exportan unas 16.300, el resto se comercializa internamente para consumo. La producción de queso blando es de alrededor de 92.200 Ton/año, siendo sus principales productores las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba.

El suero proveniente de los mismos se desecha, importándose unas 680.000 Ton./año de suero en polvo grado alimentario ⁴⁹.

Generalmente la elaboración consiste en condensar, deshidrar o separar sus componentes (las proteínas en forma de queso de suero y la lactosa comercial).

Sin embargo debido a que el suero tiene un elevado contenido de agua (93%), no siempre es factible aplicar esos procesos. A menos que se los lleve a cabo en escala suficientemente amplia, los mismos resultan poco económicos. La pequeña industria no tiene otra alternativa que desprenderse de la producción diaria de suero lo más rápidamente posible, dado la naturaleza perecedera del mismo. En algunos casos una parte del suero vuelve a manos de los agricultores que suministraron la leche, aunque en la mayoría se desecha.

Al igual que en el caso de la leche, la necesidad de conser-

var el producto perecedero y disminuir su volumen para facilitar su transporte y almacenamiento ha llevado a la preparación del suero deshidratado y condensado. El suero deshidratado o en polvo se produce en los EEUU de NA y en algunos otros países en pequeña escala comercial. En los EEUU un 50% del suero que proviene de la producción de queso es recuperado para consumo animal y humano. Se realiza para ello, un secado por "spray" similar y comparable al utilizado para obtener leche en polvo⁵⁰.

La composición aproximada del suero deshidratado se puede observar en la Tabla 15.

Las proteínas contenidas en el suero son de excelente calidad. El suero es también una muy buena fuente de vitaminas y minerales provenientes de la leche.

A pesar de que el contenido proteico del suero es de sólo 13% (deshidratado), se lo reconoce como excelente suplemento para la mayoría de las proteínas que constituyen los alimentos básicos de grandes poblaciones en el mundo (cereales). La adición de pequeños porcentajes de las proteínas del suero a las harinas de maíz, trigo y arroz blanco pueden llegar a duplicar la eficiencia de utilización de estas últimas. Es fácil comprender que la suplementación es una de las mejores vías de aprovechamiento de este subproducto de la industria láctea.

El suero o "lactosuero" o "suero de queserías" es el líquido amarillo verdoso remanente de la separación de la "cuajada" (caseína) a partir de leche entera o descremada.

La "caseína" puede ser coagulada por cuajo o "rennet", (para-

Tabla 15

Composición aproximada de suero deshidratado 50.

	(%)	<u>Aminoácidos</u>	(%)	<u>Vitaminas</u>
Proteína	12,9	Arginina	0,32	Vitamina A 200 UI/lb
Grasa	0,9	Metionina	0,25	Vitamina E 0,11 "
Fibra	0	Lisina	1,07	Vitamina B ₁₂ 10,0 ug/lb
Cenizas	8,0	Triptofano	0,22	Tiamina 2,2 mg/lb
Humedad	4,5	Histidina	0,20	Riboflavina 10,0 "
Calcio	0,6	Isoleucina	0,74	Niacina 4,0 "
Fósforo	0,6	Leucina	1,14	Acido pantoténico 20,0 "
Sodio	0,7	Fenilalanina	0,36	Colina 900 "
Lactosa	73,0	Valina	0,73	Acido fólico 0,44 ug/lb
Energía (kcal/lb)	1500,0	Treonina	0,83	

caseína o caseína al cuajo o rennet-caseína), o por medio de ácido (pH 4,5-4,6)(caseína ácida; caseína isoeléctrica) ya sea éste agregado o producido en la leche por fermentación de la lactosa (ácido láctico); siendo el producto principal el queso de bola o "requesón" (tipo "cottage"). A menudo, en la fabricación de este último, se suele usar tanto "rennet" como ácido o ambos. Cuando se parte de leche entera el suero remanente puede contener aproximadamente un 0,70% de grasa. Es de práctica usual hacer pasar dicho suero por un separador para retener la mayor cantidad de grasa posible (crema de suero) con destino a la fabricación de manteca (agregándola a la crema destinada para ello), aunque difiere de la crema de leche corriente en sus propiedades de batido.

También puede obtenerse "lactosuero" después de la separación de la "caseína nativa" por ultracentrifugación.

El lactosuero , cualquiera sea el procedimiento de obtención, es un líquido pobre en extracto seco (5-6,5%) que se altera muy rápidamente por acción de distintos microorganismos, de ahí que deba utilizarse o tratarse sin dilación. Es conveniente tener en cuenta su origen y de acuerdo a ello se lo clasifica en:

Lactosuero dulce, el procedente de la coagulación por cuajo o rennet de leches no ácidas. Es de utilidad general.

Lactosuero ácido, el procedente de la fabricación de quesos frescos o de pasta blanda en medio ácido o bien de la separación de caseína láctica. Para la mayor parte de sus aplicaciones se los neutraliza previamente. En el último caso el contenido de lactosa está reducido a causa de la fermentación láctica y la acidez

puede elevarse hasta 1,20% (en ácido láctico).

Proteínas del suero- Las proteínas del suero constituyen aproximadamente 0,6% de la leche o un 20% de sus proteínas totales. Una distribución de las principales sustancias nitrogenadas de la leche de vaca se muestra en la Tabla 16⁵¹

Tabla 16

Distribución de las principales sustancias nitrogenadas de la leche de vaca.

			<u>Proporciones</u>	
			<u>relativas</u>	<u>gramos por litro</u>
<u>Prótidos totales</u>	100			32
<u>Caseína entera</u>	78	100		25
Caseína α s		40		10,0
Caseína β		30		7,5
Caseína κ		15		3,8
Diversos		15		3,7
<u>Proteínas del suero</u>	17	100		5,4
β - lactoglobulina		50		2,70
α - lactoalbúmina		22		1,20
Globulinas (inmunes)		12		0,65
Sero-albúmina		5		0,25
Proteosas-peptonas		10		0,60
<u>Sustancias nitrogenadas no proteicas</u>	5			1,6

Las proteínas del suero (proteínas solubles), están constituidas por una mezcla de proteínas y glicoproteínas. Sus componentes son las albúminas y globulinas, que se insolubilizan por calentamiento a aproximadamente 90°. En contraste con la caseína

na (proteína más abundante de la leche), las proteínas del suero son solubles al valor del pH isoelectrico de la caseína (4,5-4,6)

Cuando están desnaturalizadas (acción del calor), su solubilidad en la región isoelectrica (o en soluciones salinas) está disminuida en gran medida y coprecipitan con la caseína.

La fracción proteica coagulable por calor del suero es fundamentalmente "globulina" y "albúmina". La no coagulable, pero precipitable en parte por ácido tricloroacético, se la designa fracción "proteosa-peptona" (sustancias de PM intermedio entre proteínas y péptidos).

El esquema que se muestra en la Figura 7 ilustra sobre las fracciones proteicas de la leche separables por distintos medios.

La composición de las proteínas del suero de leche está sujeta a una variación más marcada que la de la caseína, frente a distintos factores, particularmente en relación al ciclo de lactación.

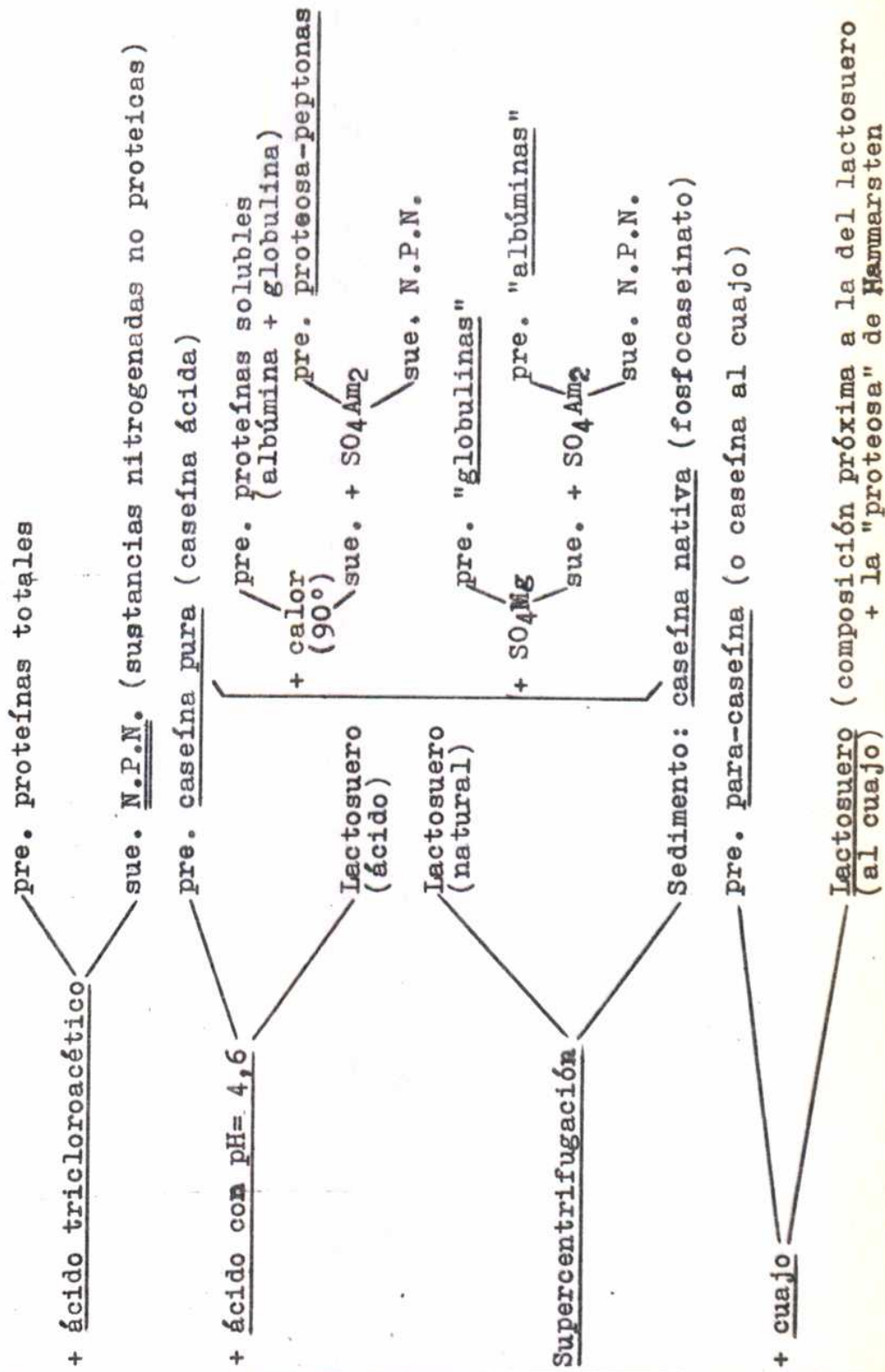
Las sustancias "nitrogenadas no proteicas" son materiales dializables, de PM inferior a 500, que permanecen en solución en las distintas condiciones en que se produce la precipitación de las proteínas y son de estructura química muy variable (junto a aminoácidos libres se encuentra urea, creatina, creatinina, ácido úrico, amoníaco, nucleótidos, fosfolípidos)^{51, 52}.

Los estudios sobre cinética de desnaturalización de las proteínas del suero de leche vacuna muestran el siguiente orden creciente de resistencia al calor (curvas de desnaturalización): inmunoglobulinas, albúmina del suero, β -lactoglobulina y α -lactoglobulina. La β -lactoglobulina, que comprende el 40-60% de la

Figura 7

Separación de los prótidos de la leche (los sulfatos de magnesio y amonio se adicionan hasta saturación) (pre=precipitado; sue=suero).

LECHE



fracción proteica del suero, domina el curso de la desnaturalización por calor.⁵²

Son innumerables los trabajos sobre composición de proteínas de leche (caseína, particularmente los electroforéticos), no así sobre proteínas solubles del suero (residual de queserías y mantequería)^{53, 54}.

En pocos años se han iniciado actividades para el uso en gran escala de esta fuente potencial de proteínas y las respuestas alentadoras han dado una intensificación en los estudios, paralelamente a un alza de precios para dicha materia prima.

Hasta no hace muchos años, el suero se consideraba como un residuo de eliminación costosa. Lo frecuente era derivarlo a los ríos. Con el desarrollo de la industria quesera, se crearon problemas en su eliminación (contaminación de aguas). En este sentido, las reglamentaciones en prevención de la contaminación, obligaron a los fabricantes a elaborar el suero o a montar instalaciones propias de evacuación. La primera alternativa, que es la más beneficiosa, ha llevado a intentar nuevos usos para el suero.

Actualmente, la elaboración de suero en polvo (desechado o concentrado), para piensos es una solución económica.

El desarrollo en la utilización del suero ha ocurrido simultáneamente con las mejoras en los procesos y calidades. El polvo de suero, hoy en día es un componente en muchos alimentos para consumo humano, entre los que se incluyen, por ejemplo, productos de panificación y pastelería, helados, sopas preparadas, queso fundido, bebidas analcohólicas y formulaciones para niños.^{55, 56}

Las desventajas del polvo del suero son su tendencia al apelmazamiento y el ser pulvurulento. Se ha tratado de encontrar métodos para la obtención del producto con características de no apelmazable e instantáneo⁵⁷.

La higroscopicidad del suero en polvo es provocada principalmente por su contenido de la lactosa amorfa, pero las proteínas y sales también participan en la absorción de humedad. Sin embargo, la lactosa como componente predominante del suero tiene una influencia decisiva sobre su higroscopicidad. Por lo tanto, la misma puede rebajarse considerablemente si la lactosa está presente en el producto final en forma de un monohidrato de alfa-lactosa, no higroscópica, aunque el polvo de suero con un 100% de contenido de lactosa en forma de cristales es todavía hasta cierto punto higroscópico, debido a las sales y las proteínas.

En el proceso de fabricación se logra un 90 a 95% de transformación de lactosa amorfa en cristalina, con lo cual se reduce a un mínimo la higroscopicidad.

A las proteínas del suero, se las dispone comercialmente hasta el presente sólo en forma de un concentrado de color amarillo parduzco insoluble y de textura arenosa (polvo palpable). Estas características limitan su uso en alimentos. En contraste, las formas obtenidas con un mínimo de desnaturalización presentan propiedades físicas altamente deseables en tal sentido. Por ejemplo, su "flavor" relativamente suave, su alta solubilidad y su facilidad para coagular por calor (fenómeno que es responsable de interesantes interacciones con otras proteínas)^{58, 59}.

Aparentemente se pueden obtener distintos grados de interacciones (formación de complejos) dependientes de la relación de β -lactoglobulina a la otra proteína, tipo y concentración de la misma, tiempo y temperatura de calentamiento. Generalmente se requiere una concentración relativamente alta (más que un 10% en base líquida) para una mayor eficiencia en la formación del complejo, que se hace evidente a través de una gelación.

Se piensa que la interacción mencionada es consecuencia de un intercambio de uniones disulfuro entre moléculas de proteínas cuando se calientan sus soluciones⁵¹. Las lactoglobulinas son buena fuente de azufrados y su contribución en tal sentido se considera importante.

Un resultado de la interacción inducida de lactoalbúmina soluble con otras proteínas es el incremento de la capacidad ligante de agua del complejo formado (coprecipitado). Cuando son secados por "spray" (condiciones apropiadas), además de alto nivel en proteína, presentan un "flavor" suave con excelente estabilidad del mismo.

Otra aplicación importante de las proteínas solubles del suero (previamente concentradas) es la producción de proteínas texturizadas.

Se expenden texturizados (gránulos) preparados a partir de formulaciones en las que intervienen grasa, concentrado de proteínas de suero y "flavors" (a queso, jamón, pollo, etc.). Al agregarlos a una sopa, en el comienzo de la ebullición, los gránulos se hidratan y las proteínas coagulan para dar piezas con

"flavor" y textura similar al producto deseado (alta retención acuosa y de "flavors"). También se preparan gránulos con "flavors" a fruta de particular interés en productos de horneado y de cereales para desayuno.

El concentrado de suero de leche se usa con éxito como ligante en la producción de proteínas vegetales texturizadas (reemplaza parcialmente a la albúmina de huevo usada como ligante de "fibras" a base de proteína de soja).

En la manufactura de alimentos, el concentrado de suero ha mostrado su versatilidad como ingrediente (sea por sus funciones como agente ligante, de retención acuosa y de "flavors") en puré instantáneo de papas, fideos, salchichas, etc.⁵⁹.

En la necesidad creciente de desarrollar procesos accesibles comercialmente para recuperar la mayor parte de las proteínas de suero de leche para alimento humano, se han empleado procesos tales como diálisis, ósmosis inversa, ultrafiltración, intercambio iónico y cristalización.

No obstante, un procedimiento que ha recibido poca atención involucra el uso del etanol (u otros alcoholes de bajo peso molecular) para desestabilizar y precipitar las proteínas del suero separando en parte minerales y lactosa que quedan en el sobrenadante. Morr y Lin⁶⁰ señalan la conveniencia de utilizar etanol 72% para precipitar el 45-60% de las proteínas y producir un concentrado conteniendo unas cuatro veces más de proteínas (en base a los sólidos totales) comparado al suero de partida. De sus ensayos a escala de laboratorio consideran la remoción de calcio, o-

tros minerales y lactosa (oxalato de potasio, diálisis y pasaje por columna de Amberlite) antes del tratamiento por etanol, a fin de lograr un mínimo de coprecipitación de tales componentes (mayor pureza y solubilidad en agua).

La necesidad de eliminar particularmente iones calcio lo fue en razón de que su presencia reducía la solubilidad en agua del concentrado proteico final.

En estudios relativamente recientes, se ha concentrado la atención en el uso de métodos basados en la separación de proteíñas de suero con electrolitos (formación de complejos insolubles con carboximetilcelulosa, trimetafosfato, hexametafosfato y tetrametafosfato de sodio), incrementando el contenido proteico del precipitado por filtración en gel o por intercambio iónico.

En tal sentido Hidalgo y col.⁶¹ presentaron un estudio exhaustivo de condiciones óptimas de precipitación de proteínas de suero con hexametafosfato de sodio (relación suero:agente precipitante, pH, temperatura, influencia de los cationes del suero, condiciones de agitación y centrifugación), purificación del precipitado (remoción del exceso de agente precipitante), incremento de la concentración de proteínas en el producto final y propiedades de solubilidad de este último.

Otros investigadores informan que el polifosfato férrico parece ser un agente útil para la recuperación de proteínas del suero de queserías. Las proteínas precipitadas contienen 12-15% de Fe, pudiendo servir como importantes fuentes de este último en formulaciones con productos lácteos y cereales. Ello es de particular importancia desde el punto de vista nutricional, en

regiones donde la dieta necesita enriquecimiento en dicho elemento⁶².

Las proteínas aisladas del suero de queserías muestran propiedades funcionales únicas que las hacen convenientes para la fortificación de bebidas analcohólicas carbonatadas.

Considerando el volumen significativo de bebidas carbonatadas que se consumen, especialmente por los niños, la incorporación de sólo un 1% en peso de suero (concentrado desecado, con 80% de proteína), representaría un aumento del valor nutritivo con un ligero incremento en los costos. Un programa de fortificación de este tipo rendiría beneficios tanto a los consumidores de tales bebidas como a los productores de quesos. Es obvio que las proteínas aisladas deberán sufrir un mínimo de **desnaturalización** en razón de su principal propiedad funcional : "solubilidad".

El método presentado por Holsinger y col.⁶³ para aislar proteínas desnaturalizadas al mínimo, a partir de queso tipo "cottage" comprende etapas de clarificación y ultrafiltración para la obtención del concentrado proteico a partir del suero, seguido de una filtración por gel, cuyo eluato se seca por "spray", previa evaporación y clarificación.

La ultrafiltración y filtración por gel, en esa secuencia, separan lactosa y sales de las proteínas del suero. La solución resultante de proteínas queda concentrada y aunque las pérdidas (en proteínas) son relativamente altas, la calidad de las mismas en el producto final es excelente. Las proteínas del suero son particularmente ricas en lisina y el producto deshidratado (en condiciones de mínimo daño para la lisina) es una fuente va

liosa como agente de fortificación.

El éxito comercial de las formulaciones diseñadas dependerá, naturalmente del costo involucrado en la obtención del concentrado con mínima desnaturalización.

Los autores señalan una serie de ventajas en la incorporación del concentrado a bebidas analcohólicas: solubilización completa del concentrado proteico al valor de pH de bebidas carbonatadas (2-3, 5), soluciones claras y "flavor" estable no detectable a producto lácteo cuando se fortifica con niveles de hasta el 1% en muchos preparados (naranja, frutilla, etc.) y ligera pérdida de lisina (3%) para más de un año de estacionamiento (a pesar de la presencia de azúcar reductor formado por hidrólisis de la sacarosa), mientras se da un incremento en el valor nutritivo del producto.

Estas propiedades de las proteínas del suero resultan satisfactorias para una serie de aplicaciones en formulaciones que tienden, a la par que una mejora en el valor biológico de las proteínas básicas, una mayor aceptabilidad en el producto final.

Los trabajos desarrollados por Rham y col.⁶⁴ son prueba de la eficacia de la fortificación de proteína de soja (aislado industrial) con proteína de suero de queserías. En formulaciones en las que se reemplazó hasta un 40% de la proteína de soja con proteína de suero, se registró un incremento significativo en el valor del PER con respecto al del la proteína de soja sola.

Los resultados fueron similares utilizando proteína de suero desnaturalizada por calor (100°, 20 min.) y precipitada a pH 4,5 o proteína recuperada por ultracentrifugación (no desnatura

lizada por calor) obtenida de suero de queso dulce.

Las mezclas de proteínas fueron hechas antes de la evaluación del PER, probándose la correcta suplementación del patrón de aminoácidos esenciales de las proteínas de soja, deficientes en azufrados con proteínas de suero (ricas en azufrados).

El valor biológico y las propiedades funcionales de las proteínas de nabo (colza) se ven incrementados en la coprecipitación con proteínas de suero (residual de la fabricación de queso cottage). El aislado mixto obtenido por coprecipitación (95°, pH 4,6) a partir de las proteínas previamente aisladas de la harina de nabo (pH alcalino) adicionadas de suero, mostró mejores características físico-químicas (color, poder emulsificante, capacidad de absorción de grasa) que el aislado proteico de nabo solo. El autor⁶⁵ señala que el patrón de aminoácidos y algunas propiedades funcionales del coprecipitado son distintas de aquellas de los productos obtenidos por simple mezcla de los aislados respectivos, lo cual parecería responder a una interacción compleja entre ambas proteínas durante el proceso de coprecipitación. El concentrado proteico de nabo ensayado en lugar del aislado, mostró similar comportamiento que el aislado en los coprecipitados con suero, pero sus propiedades funcionales fueron diferentes (más bajas retenciones acuosa y grasa y mejores propiedades de emulsificación y batido que el concentrado de nabo solo).

Lindsay y col.⁶⁶ sugieren el uso directo de suero de queserías como medio de dispersión de proteínas de subproducto de la molienda de trigo (fracción de la pepa remanente de la separa -

ción de la harina, y de partículas gruesas de salvado, más rica en lisina que la harina, usada como alimento para rumiantes), de salvado de arroz y de harina de soja, que proveen productos (coprecipitados) de mayor valor nutritivo que los provenientes de dispersiones con agua. Los costos de la operación de secado de dichos concentrados, aparentemente no excederían los involucrados en el secado de suero solo (suero desecado en polvo).

El uso de leche descremada o de suero de queserías en formulaciones de enriquecimiento (suplementación y complementación) de proteínas vegetales tiene no sólo la ventaja de lograr una mejora significativa en el valor nutritivo de estas últimas, sino también en el aprovechamiento de productos lácteos que alcanzan en esta forma una mayor distribución en poblaciones que sufran de desnutrición.

Esas mezclas son altamente deseables en razón de la disponibilidad de fuentes locales de proteínas de origen vegetal, que varían de un área a otra.

Así la literatura muestra un considerable número de trabajos sobre efectos suplementarios entre proteínas vegetales y/o vegetales y animales³⁸.

Preparaciones muy útiles como sustitutos de leche descremada se han logrado mezclando concentrado de proteínas de pescado por dispersión en suero, que luego se presentan en forma de polvo (producto desecado por "spray", conteniendo 15-30% de proteína de pescado)⁶⁷, o sustitutos en base a proteínas aisladas de soja con suero concentrado, con o sin adición de aceites de coco o de girasol⁶⁸.

En ambos casos, la nueva formulación se enriquece simultáneamente con los compuestos minerales aportados por el suero (similares a los de la leche). También en varios trabajos se ha señalado la utilización satisfactoria del suero de queserías en la manufactura de bebidas nutritivas, en las cuales el producto se prepara previa coagulación por calor (55-60°) de las proteínas del suero en dispersión acuosa al 8-9% (ajuste del valor de pH y agregado de iones calcio o magnesio a fin de disminuir la temperatura de coagulación)⁶⁹.

Otro rubro en el cual se han llevado a cabo varios intentos, ha sido en la obtención de "leches artificiales" preparadas a base de proteína de soja adicionada con caseína comercial⁷⁰.

Se piensa que las proteínas del suero (subproducto de queserías) serían utilizadas más eficientemente en el futuro para consumo humano.

De especial interés son los elevados niveles en lisina, triptofano y azufrados de sus proteínas; los que hacen que este subproducto sea valioso como suplemento de proteínas vegetales de baja o relativamente baja calidad nutricional (cereales, lino, etc.).

Los concentrados de proteínas de suero podrían reemplazar a la leche descremada en polvo en preparaciones para lactantes, ya que el efecto de suplementación de las proteínas del suero es más pronunciado que el de la leche descremada.

Los concentrados de suero no tienen "flavor" ni textura desagradable); presentan alta solubilidad (procesados en condiciones adecuadas); factores que favorecen su incorporación a distintos

platos.

El nivel relativamente bajo del aminoácido fenilalanina de las proteínas del suero, las señala particularmente convenientes como una fuente natural de proteínas en la dieta recomendada para el tratamiento de niños con fenilcetonuria⁷¹.

En nuestros laboratorios, se ha prestado especial interés al estudio de condiciones óptimas de coprecipitación de proteínas vegetales de relativamente bajo valor biológico (lino, girasol) con proteínas de origen animal o vegetal de buena calidad (soja), aprovechando los productos residuales de industria aceitera (harinas o "expellers") y de la industria láctea (caseína comercial, leche descremada y suero de queserías)^{5,72}.

Se ha puesto énfasis en el uso de la harina integral residual de extracción de semilla de lino oleaginoso en razón de su alta disponibilidad en nuestro país y de la poca atención que se ha prestado hasta el presente a esta oleaginoso como fuente de proteínas (aislado proteico) potencialmente útil para el hombre y los animales.

Continuando la línea planeada en este sentido y habiendo de mostrado la suplementación satisfactoria de proteína de lino con caseína industrial⁵, se contempló el estudio de las condiciones óptimas de coprecipitación de proteína de lino con proteínas de suero de queserías, que son fuente de alta riqueza en lisina, aminoácido primariamente deficiente en las proteínas de lino.

PARTE II

CONTINUACION DE LA DISCUSION DE LA PARTE EXPERIMENTAL

DISCUSION DE LA PARTE EXPERIMENTAL (CONTINUACION)

5)- Estudio de las condiciones óptimas de precipitación de las proteínas de suero en función de valores de pH, temperatura, naturaleza del ácido y agentes precipitantes.

En la Introducción hemos señalado que tanto desde el punto de vista tecnológico como nutricional, la utilización de los componentes del suero es a la vez factible y conveniente.

No obstante se han indicado las limitaciones técnicas y económicas que cuentan en el desarrollo de procesos de deshidratación y concentración de este subproducto. En tales casos como una alternativa y en beneficio de regiones deficitarias, existen grandes posibilidades de su utilización inmediata en estado fluido (tal cual). Dentro de esta última alternativa se ha orientado el presente trabajo.

Se ha encarado como primer paso el estudio de su composición general, observando la probable fluctuación de algunos de sus componentes para distintas partidas de suero procedente del mismo tipo de fabricación de queso blando y de la misma central lechera (x).

Los resultados que figuran en la Tabla 17 para suero líquido y liofilizado, son representativos de numerosas partidas del material recibido durante el lapso de un año.

(x) Proveniente de Kasdorf S.A.

Tabla 17

Composición media de diferentes partidas de suero.(x)

	<u>suero líquido</u> (% p/v)	<u>suero liofilizado</u> (% p/p sss)
nitrógeno	0,14	2,12
proteína (Nx6,38)	0,89	13,53
cenizas	0,73	11,86
acidez (en ác. láctico)	0,52	--
grasa	0,5	--
lactosa	4,30	63,80
calcio	0,114	1,98
sólidos totales	6,1	--
pH	4,40	--
humedad	--	3,46
fósforo total	--	1,07

(x)- Tecnología: queso tipo blando, obtenido por agregado de cuajo y fermentación láctica (sin adición de sales de calcio), a partir de leche entera.

Las partidas de suero (5 litros cada vez, enviadas antes de cumplir las 24 hs. a partir del drenaje en la fabricación del queso y mantenidas en refrigerador) presentaron siempre aspecto opalescente (debido a partículas finas en suspensión de color blanco) verdoso.

El contenido en proteínas (Nx6,38) fue cercano al 1% (0,89%) valor que prácticamente concuerda con el mencionado en literatu-

ra para dicho subproducto proveniente de quesos obtenidos a partir de leche entera⁵².

Los valores de pH, cenizas totales y lactosa, estuvieron comprendidos entre los mencionados en literatura⁷³ para suero de queso "cottage" y para el proveniente de queso duro tipo "Cheddar"^{48, 52}.

Si bien los concentrados proteicos desnaturalizados al mínimo generalmente son valiosos por sus propiedades funcionales, las proteínas del suero separadas por calentamiento adecuado, aunque nutricionalmente similares a las de menor grado de desnaturalización, ven limitado su uso en las formulaciones de alimentos debido esencialmente a su poca solubilidad. No obstante, el valor nutricional es factor fundamental y primario, pudiendo no ser necesario el carácter funcional.

El proceso de separación de proteínas del suero coagulándolas por calentamiento es una operación simple.

Según se señala en literatura, cuando el suero se mantiene a una temperatura suficientemente alta por un determinado período de tiempo, las proteínas coagularán (por desnaturalización).

La cantidad de las mismas que puede coagular dependerá de varios factores (temperatura, tiempo, pH, fuerza iónica). En la práctica es suficiente un tratamiento a 85-100° mantenido durante 15-10 min. o a 120° durante 8 min.⁷⁴ a fin de evitar efectos perniciosos en las proteínas.

Prácticamente toda la proteína coagulable puede separarse, para un tiempo de 8 min para un rango de pH entre 5,5 y 6,5.

Se llevó a cabo el estudio de los mismos parámetros (temp.

y pH) sobre la materia prima recibida en el presente trabajo, para elegir las condiciones más adecuadas respecto de un rendimiento satisfactorio en precipitado proteico.

Teniendo en cuenta que el suero se utilizaría como agente de dispersión de las proteínas de harina de lino a los fines de su coprecipitación, el valor de pH inicial debería incrementarse hasta el rango 9-10.

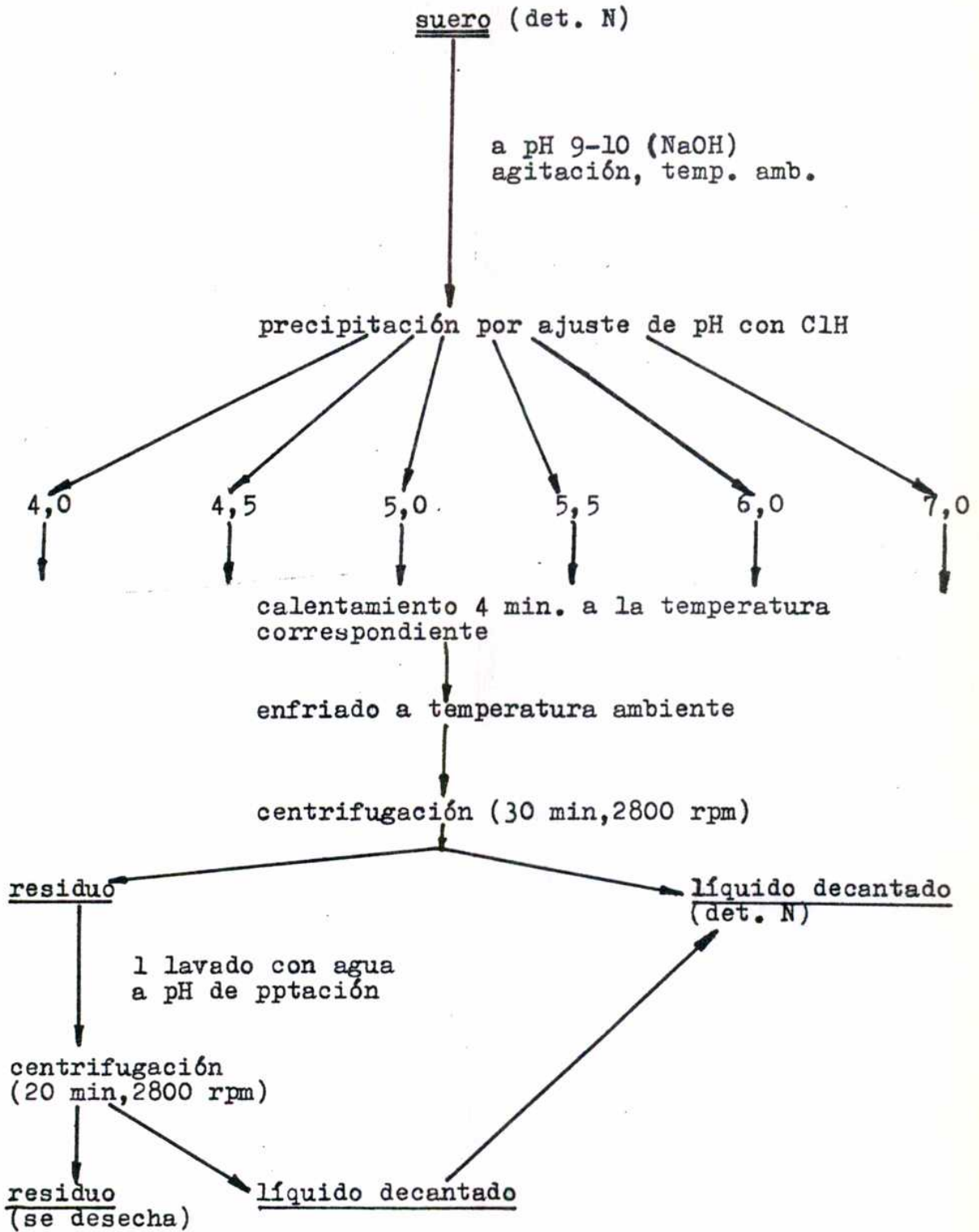
Como puede observarse en la Tabla 18 (ver esquema de la Figura 8) se registra el mayor rendimiento en precipitado para el ámbito de temperatura de 85-90°, a igualdad de tiempo de calentamiento (4 min.) para todos los ensayos, siendo los precipitados (coágulos) más cohesivos y de grano más grueso respecto de los obtenidos a temperaturas más bajas. (ver Parte Experimental)

Tabla 18

Efecto de la temperatura sobre el rendimiento en precipitado proteico.

<u>pH de precipitac. (CIH)</u>	<u>N sobrenadante % / N total</u>		
	<u>20-25°</u>	<u>50-55°</u>	<u>85-90°</u>
3,0	---	---	84,61
4,0	71,79	70,51	53,85
4,5	73,71	69,87	---
5,0	73,71	69,87	53,85
5,5	77,56	75,00	53,85
6,0	74,36	71,15	53,85
7,0	67,94	68,57	46,15

Figura 8



Si bien la literatura indica que a una temperatura mayor (120° o superior, menor tiempo) no se vería afectada la calidad nutricional de las proteínas del suero,⁷⁴ por razones de orden práctico a escala de laboratorio y desconociendo el probable efecto de tan alta temperatura sobre las proteínas de lino, se decidió operar en lo sucesivo dentro del ámbito 85-90° durante 4 min.

Por tal razón, se ensayó su influencia sobre las proteínas de lino, tomando como índice el valor de lisina disponible y su comparación con el de las proteínas de lino precipitadas a temperatura ambiente. Esta experiencia se aprovechó para registrar el posible efecto de la temperatura sobre los rendimientos de dispersión y precipitación, de acuerdo a los esquemas de las Figuras 2 y 9.

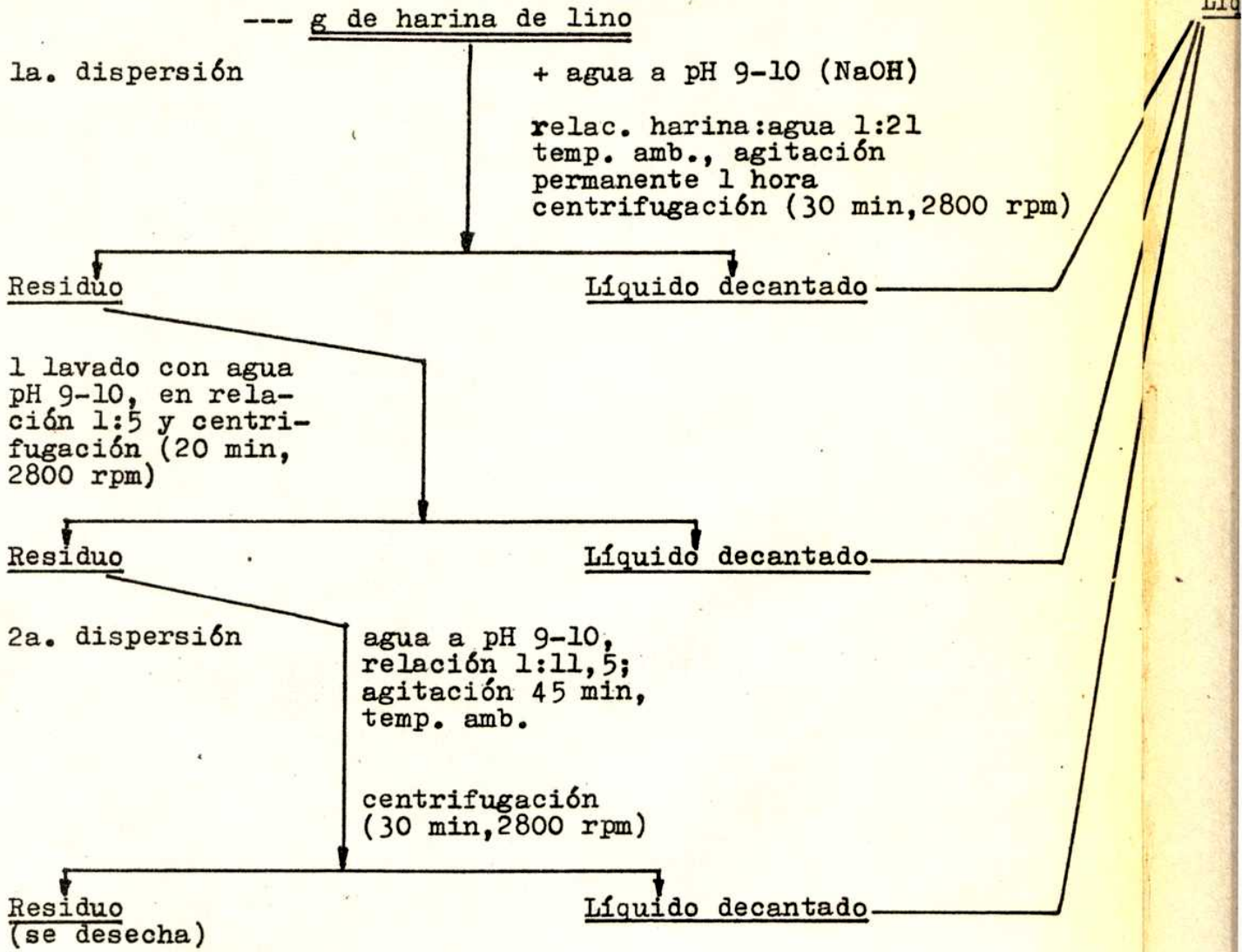
Como puede observarse en la Tabla 19, los valores de rendimiento caen en el rango de los logrados usualmente para tratamiento sin calor (temp. amb.) y los de lisina muestran perfecta concordancia.

Tabla 19

Efecto de la temperatura en la precipitación de las proteínas de harina integral de lino.

<u>Tratamiento</u>	<u>Extracción</u> (%)	<u>Rendimiento</u> (% ppdo/har)	<u>Lis. disp.</u> (g/16g N)
temp. amb.	67,0	20,5	3,65
por calor (90°)	70,4	21,0	3,65

Figura 9



Líquidos decantados reunidos (det. N)

(NaOH)
relación 1:21
agitación
30 min, 2800 rpm

ajuste a pH 4,0 con ClH
calentamiento 5 min, 90°, agitación permanente
se lleva a temperatura ambiente

centrifugación (30 min, 2800 rpm)

Líquido sobrenadante
(se desecha)

Precipitado
(proteínas crudas)
2 lavados acuosos
(agua dest. a pH 4,0)
por agitación, temp.
amb., relac. 1:20

centrifugación
(20 min, 2800 rpm)

Líquido sobrenadante
(se desecha)

Precipitado lavado
con agua
5 lavados sucesivos
con etanol 95%, relac.
1:20, temp. amb. agi-
tación

centrifugación
(10 min, 2800 rpm)

Líquido sobrenadante
(se desecha)

Precipitado lavado
con etanol
1 lavado con éter et.
relac. 1:10

centrifugación
(10 min, 2800 rpm)

Líquido sobrenadante
(se desecha)

Proteínas precipita-
das purificadas
(det. rend. y lis. disp)

tado

tado

tado

Según se concluye de los datos de la Tabla 18 (valores de rendimiento versus pH y temperatura), el valor de pH 7,0 sería el de máxima precipitación para las condiciones de la experiencia.

Entre los factores que llevan a un mayor rendimiento en coágulo a partir de leche (entera o descremada) en la fabricación de quesos, la concentración de Ca^{++} es de suma importancia, promoviendo a su vez una mayor firmeza al precipitado (caseína) o facilitando la coagulación a menor temperatura⁷⁵.

La influencia del valor de pH durante la coagulación por calor de las proteínas del suero, al igual que la de los aditivos iónicos y no iónicos en diferentes niveles de concentración, ha sido motivo de estudios relativamente recientes⁷⁶.

Por tal motivo y en razón de que se señala que un exceso de sales de calcio, (que queda en el líquido sobrenadante o suero) remanente de la separación de la caseína, interfiere desfavorablemente en el punto isoeléctrico de las proteínas del suero⁶¹, se decidió evaluar el contenido en calcio en las partidas de suero recibidas de la industria e intentar reducir su nivel, de ser necesario.

Según la información bibliográfica, los coágulos obtenidos por calor al valor de pH isoeléctrico sin eliminación de Ca^{++} , tendrían un alto tenor en cenizas, de ahí que se ensayaran distintos caminos para eliminarlas. Así, un método consiste en insolubilizar las sales de calcio en el suero a pH 7,0 (sol. NaOH), dejando reposar por 3 hs. y luego separar el sobrenadante, o reducir dichas sales ajustando el pH del suero previamente enfriado después de la coagulación por calor, al valor de 4,6 (ác. acé

tico), que redissuelve las sales de calcio precipitadas (se separan en el sobrenadante por centrifugación) o por el uso de un agente precipitante (oxalato de sodio) que separa Ca^{++} precipitado antes de la coagulación por calor⁷⁷.

Ya que en los antecedentes de literatura se menciona la influencia desfavorable del exceso de Ca^{++} sobre el rendimiento de las proteínas precipitadas del suero y a fin de tratar de desplazar el pH de máxima precipitación (7,0) hacia valores de pH cercanos al de las proteínas de lino; se contempló en el presente trabajo, la reducción del contenido en Ca^{++} por modificación del valor de pH del suero (a 7,0) y pasaje de CO_2 (10 min.) a través del mismo. Paralelamente se determinó el contenido en nitrógeno total con el fin de comprobar si la precipitación de Ca^{++} provocaba un descenso en el % de N total (ver Parte Experimental).

De acuerdo al esquema de la Figura 10, se obtuvieron los resultados que se resumen en la Tabla 20 y que sirvieron de base para el desarrollo de futuras experiencias.

Figura 10

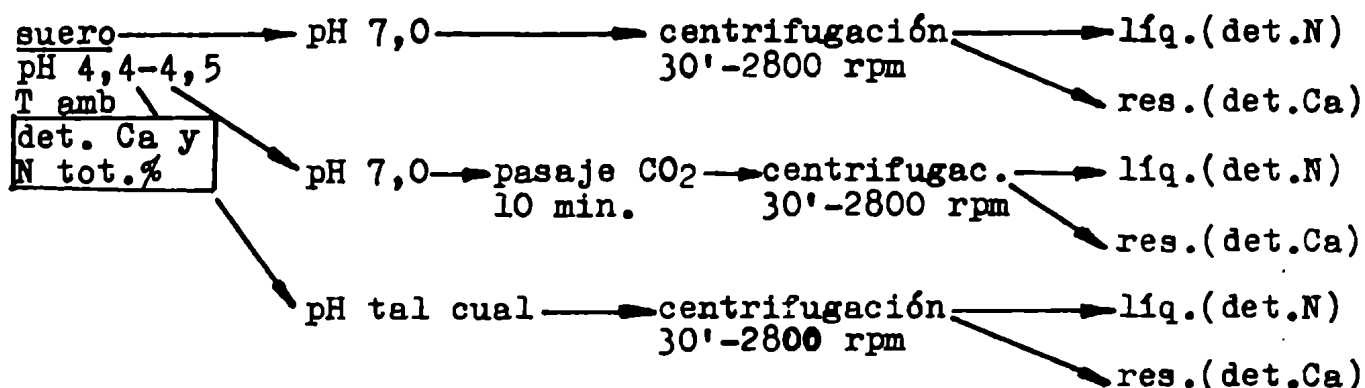


Tabla 20

Contenido de nitrógeno y calcio remanente luego de diferentes tratamientos sobre muestras de suero.

<u>Procedimiento</u>	<u>% N tot.</u>	<u>Ca (mg rem/100 ml suero)</u>
suero	0,13	117,0
suero-pH 7,0 centrifugado	0,10	47,4
suero-pH 7,0 pasaje CO ₂ -centr.	0,12	111,3
suero-pH 4,5 centrifugado	0,12	115,0

De su comparación surge que en presencia de CO₂ no ocurre una mayor eliminación de Ca⁺⁺, aunque en ambos procedimientos se registra una disminución respecto del contenido original.

Es evidente que la precipitación está fundamentalmente relacionada al valor de pH, siendo máxima a 7,0 ya que el burbujeo de CO₂ provoca un descenso en dicho valor (pH 6,2 en el líquido sobrenadante final, después de haber llevado a pH 7,0).

También es importante señalar que no ocurre pérdida de material nitrogenado en cualquiera de las operaciones realizadas.

En experiencias repetidas se observaron comportamientos similares, confirmando los resultados señalados.

No obstante, los datos registrados respecto de la concentración de Ca⁺⁺ remanente en el líquido sobrenadante variaba con la partida de suero recibida y el tiempo de estacionamiento de éste después de llevado a pH 7,0 (con o sin pasaje de CO₂ y antes de centrifugar).

Los resultados precedentes, considerados junto a la no variación en el contenido en nitrógeno total del suero tal cual y centrifugado, pueden interpretarse, de acuerdo a trabajos hallados en literatura, como consecuencia de la interacción entre iones Ca^{++} y lactosa presentes en el medio para formar un complejo Ca-lactosa insoluble. El grado de insolubilidad sería dependiente de factores tales como pH, fuerza iónica del medio y relación molar Ca-lactosa. Aparentemente el tiempo de contacto entre ambos reagentes estaría relacionado al equilibrio que podrían alcanzar las formas soluble e insoluble del complejo formado⁷⁸.

Tal como aparece en el esquema siguiente (Figura 11), se han diseñado diferentes experiencias, que permitieron observar la influencia de la variación de la naturaleza del ácido precipitante y de la presencia de iones Ca^{++} en mayor o menor concentración, sobre los correspondientes valores de pH de máxima precipitación de las proteínas del suero. (ver Parte Experimental)

El burbujeo de CO_2 a través del suero (pH 7,0) que provoca la precipitación parcial de Ca^{++} , muestra su efecto en el valor de pH de máxima precipitación conducido con ClH. En todos los otros casos ocurre similarmente un desplazamiento de dicho valor de pH hacia el lado ácido. De todos los tipos de ácidos ensayados, la precipitación con PO_4H_3 deja la menor cantidad de nitrógeno sobrenadante en el suero (Tabla 21 y Figura 12).

Interesó también probar, para este mismo ácido, la influencia del menor nivel de Ca^{++} (obtenido por centrifugación del suero después de llevado a pH 7,0, que reducía en mayor medida su contenido respecto del de pasaje de CO_2). Los valores logrados lo ubi-

Figura 11

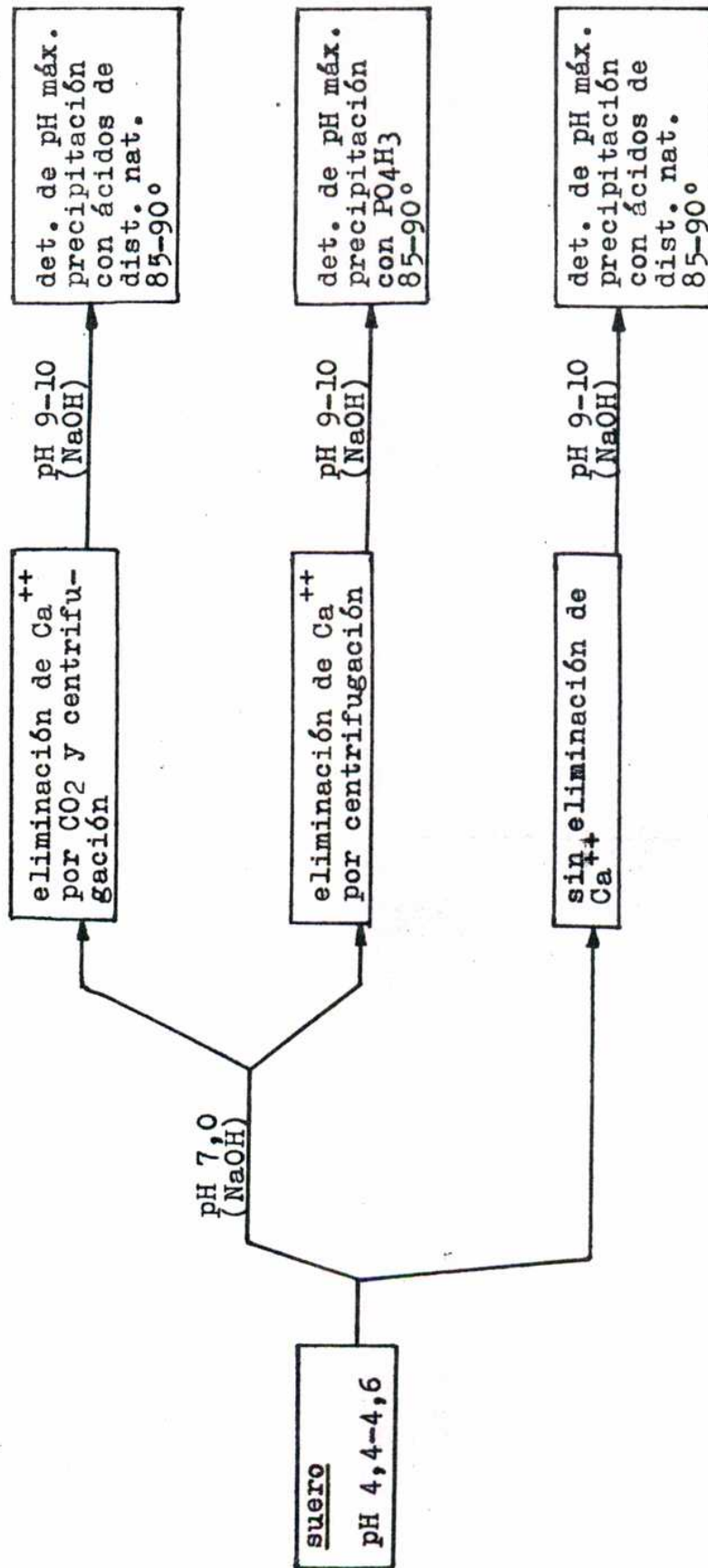


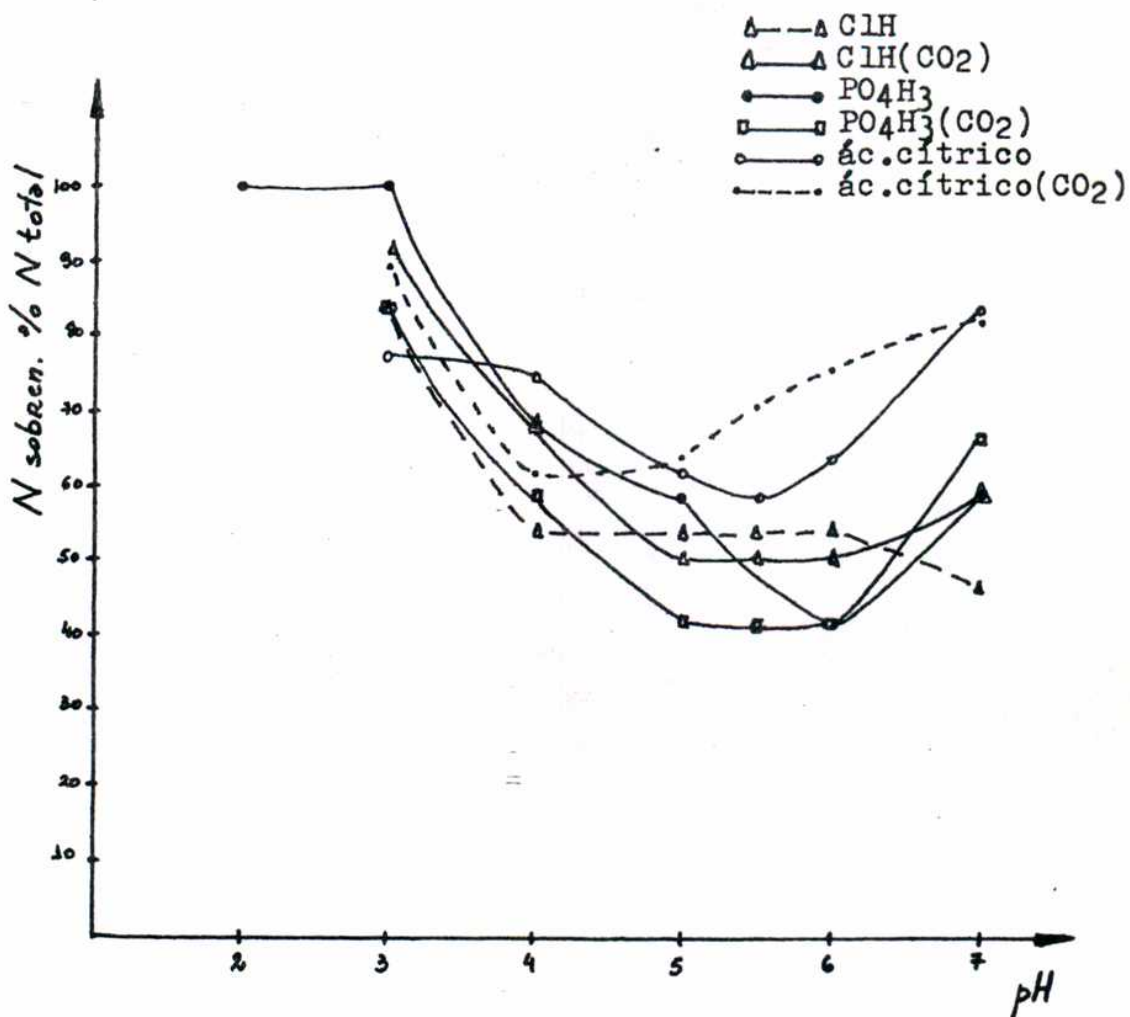
Tabla 21

Estudio del efecto de distintos ácidos y concentración de Ca^{++} sobre el rendimiento y pH de máxima precipitación de las proteínas del suero.

<u>pH de (x)</u> <u>precipitación</u>	<u>N sobrenadante % N total</u>					
	<u>ClH</u>	<u>ClH</u> <u>(CO₂)</u>	<u>PO₄H₃</u>	<u>PO₄H₃</u> <u>(CO₂)</u>	<u>ác. cí-</u> <u>trico</u>	<u>ác. cí-</u> <u>trico(CO₂)</u>
2,0	--	--	100,0	--	--	--
3,0	84,6	91,7	100,0	83,3	77,5	89,5
4,0	53,8	66,7	66,7	58,3	74,2	61,9
5,0	53,8	50,0	58,3	41,7	61,7	63,8
5,5	53,8	50,0	--	41,7	59,2	70,5
6,0	53,8	50,0	41,7	41,7	63,3	75,2
7,0	46,1	58,3	58,3	66,7	83,3	81,9

(x) temperatura 85-90° mantenida durante 3-5 min. al pH de precipitación.

Figura 12



Nitrógeno sobrenadante % nitrógeno total en función del pH ajustado utilizando distintos ácidos en la precipitación de las proteínas del suero.

can entre los ya hallados, sin mayores beneficios.

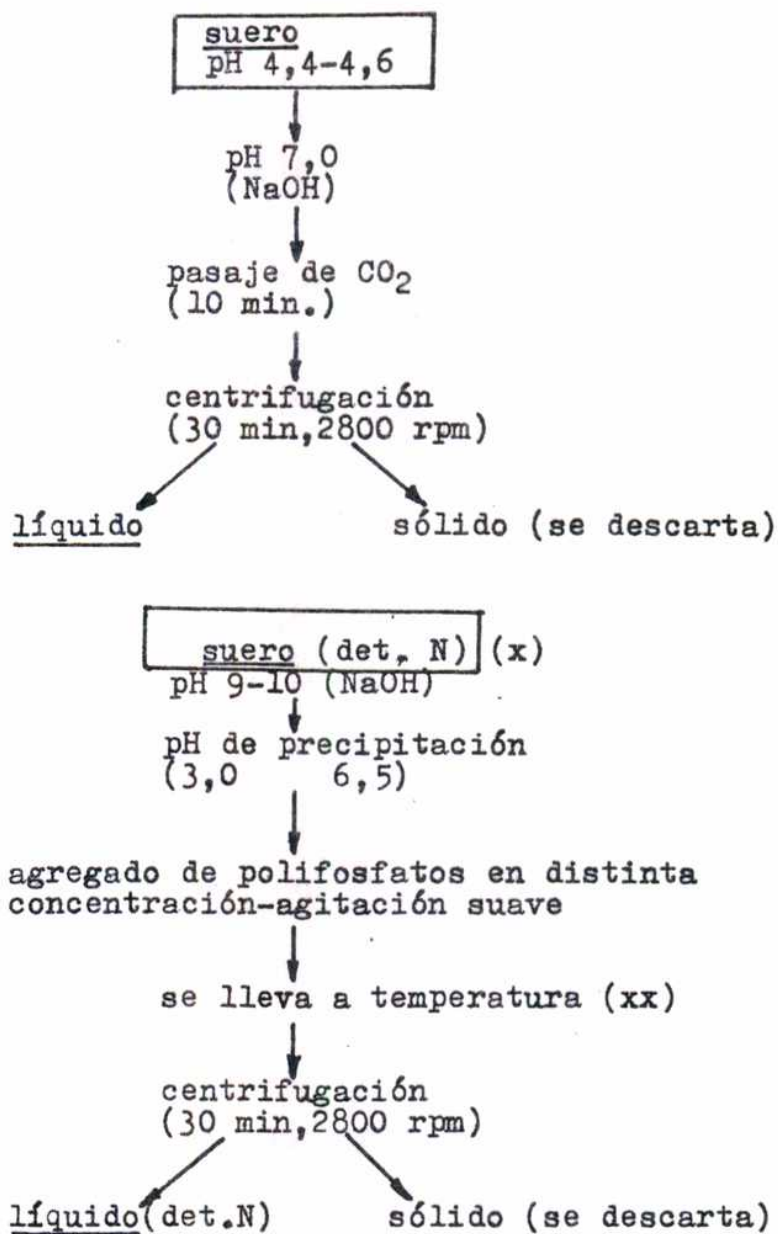
En consecuencia, puede señalarse la ventaja de recurrir al uso del PO_4H_3 como precipitante cuando se opera sobre suero solo (con y sin eliminación parcial de iones Ca^{++}) y sin el agregado de otros agentes coadyuvantes de la precipitación.

En conocimiento de una serie de publicaciones en las que se sugiere la conveniencia de agregar al medio sales de sodio de polifosfatos (al valor de pH de máxima precipitación) a fin de lograr un rendimiento más satisfactorio en coágulo y de la observación del desplazamiento que tales sales provocan en el valor del pH isoeléctrico (de acuerdo a su concentración y aporte de cargas negativas) hacia el lado ácido, se diseñó otro conjunto de experiencias realizadas de acuerdo al esquema de la Figura 13 y cuyos resultados analíticos figuran en la Tabla 22. (ver Parte Experimental)

Factores tales como temperatura, concentración de iones calcio y fosfato en el medio están relacionados entre sí y un predominio de iones fosfato como el aportado por el hexametáfosfato, se traduce en un desplazamiento significativo del valor de pH de máxima precipitación (3,0). En este sentido los datos obtenidos concuerdan en cierta medida con los aportados por la literatura⁶¹.

En principio, este efecto causado por el tripolifosfato, permitiría coprecipitar las proteínas del suero y de lino al valor de pH de máxima precipitación de las proteínas de este último (coincidencia en pH de máxima precipitación). Cabe destacar que se eligió la menor concentración en tripolifosfato (50 mg/100 ml. suero), con la que se lograba el efecto deseado.

Figura 13

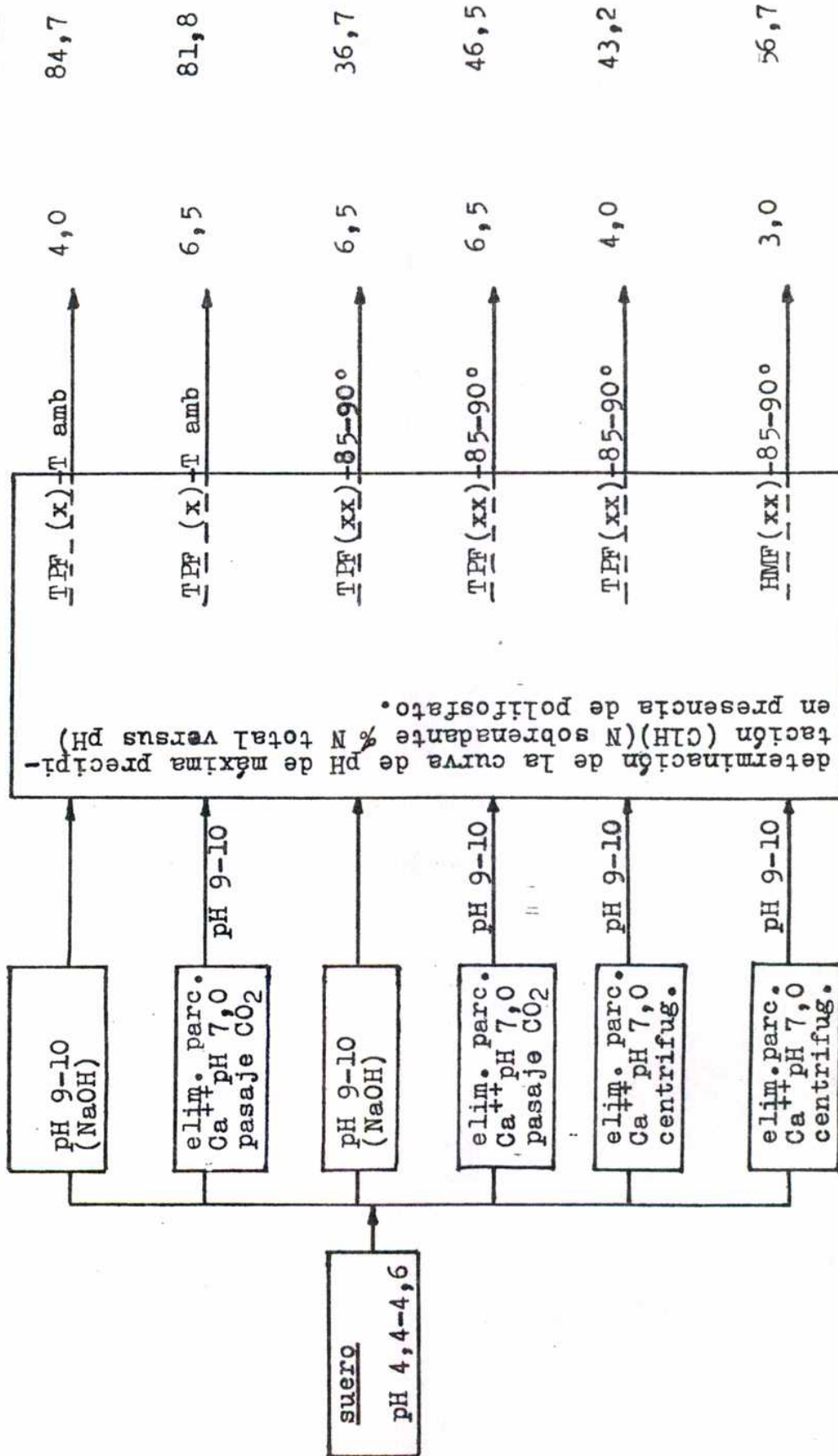


(x)- suero tal cual o líquido tratado por pasaje de CO₂

(xx)- temperatura ambiente o calentamiento a 85-90° durante 4 min
y enfriamiento a temperatura ambiente

Tabla 22

pH máxima N sobren.
pptación %N total



determinación de la curva de pH de máxima precipitación (CIH) (N sobrenadante % N total versus pH) en presencia de polifosfato.

(x) ensayado en 3 concentraciones diferentes (50, 100 y 150 mg/ml de suero)
(xx) ensayado en 2 concentraciones diferentes (50 y 150 mg/ml de suero)

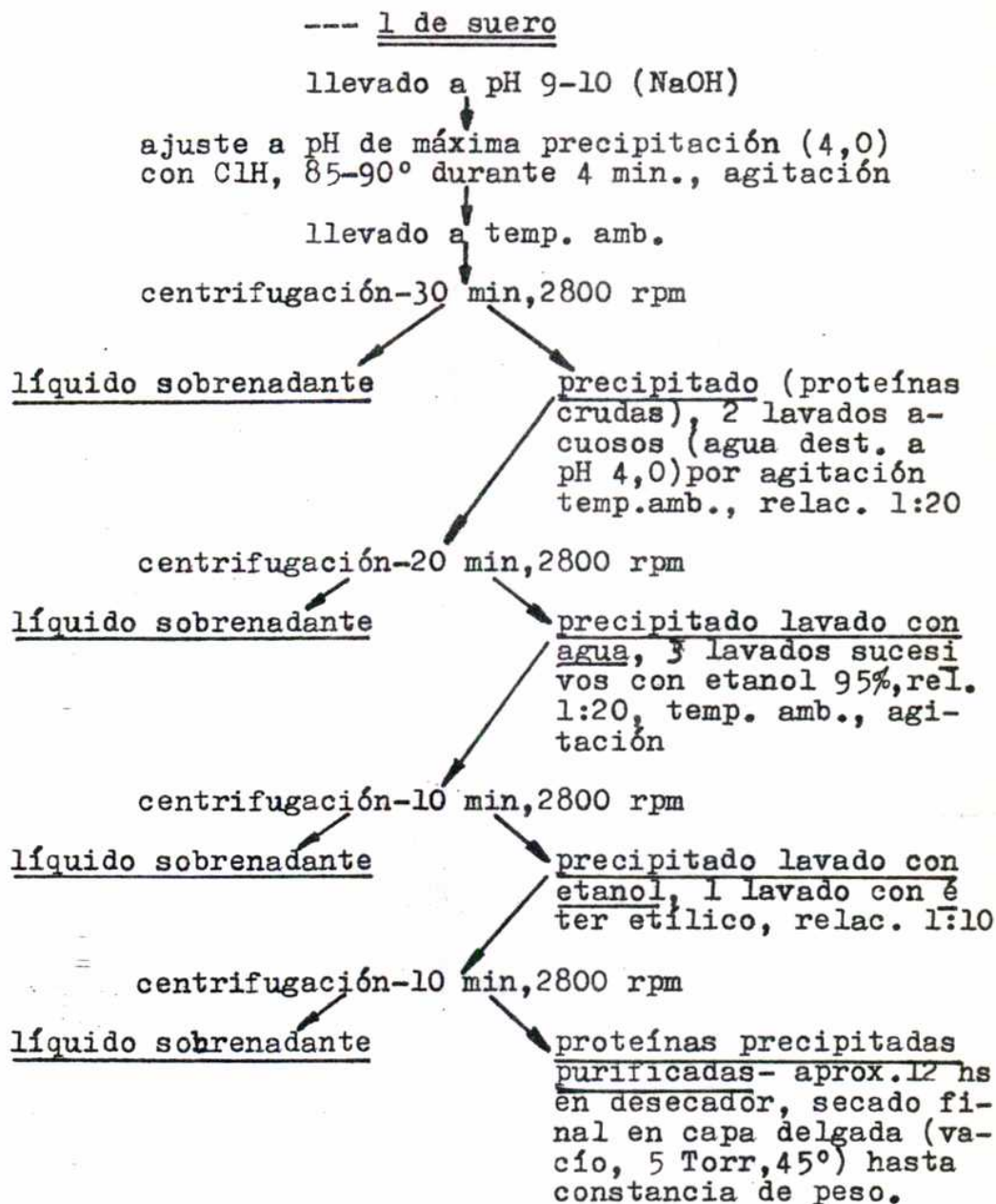
Antes de proceder a su aplicación a las proteínas de lino, se decidió hacer un par de experiencias completas sobre suero hasta la obtención del aislado proteico respectivo y observar la incidencia del resto de condiciones operatorias (lavados, purificación y secado) en el rendimiento final y en el valor de lisina disponible de dicho producto. Paralelamente se llevó a cabo y en las mismas condiciones operatorias, el aislamiento de proteínas de suero sin el agregado de TPF (ver Parte Experimental) (Fig.14)

Los datos encontrados no difieren prácticamente en rendimiento y contenido de nitrógeno en el aislado final (3,94 y 3,37 g/l suero original; 13,90 y 13,53 % de N). No obstante, el dato de mayor valor para la suplementación de la proteína de lino se encontró más favorable en el producto obtenido por precipitación sin agregado de TPF (10,88 y 11,46 g lis. disp./16 g N respectivamente), lo cual inclina la elección de este último procedimiento.

6)- Determinación de las condiciones óptimas de coprecipitación de proteínas de harina de lino y de suero (etapa de incorporación del suplemento, agente precipitante, pH de máxima coprecipitación, purificación del precipitado obtenido por lavados y secado del mismo).

El procedimiento propuesto para el logro de "aislados mixtos" por coprecipitación de proteínas de lino y suero, contempla la utilización del mismo suero como medio dispersante de las proteínas de lino. En conocimiento de los inconvenientes que se presentan en la dispersión de algunas proteínas vegetales con

Figura 14



leche descremada (proteína de girasol y leche descremada fluida), durante la cual se produce un precipitado floculento en el que se pierde nitrógeno junto con el insoluble centrifugado en dicha etapa⁷², se trató de observar el comportamiento del suero frente a la harina de lino.

Para ello y en base a una relación preestablecida arbitrariamente de mezcla de proteínas de harina de lino:suero, que no correspondiese a límites extremos de cada uno de sus componentes (60:40) se dispersaron las proteínas de harina de lino directamente en suero (sin eliminación previa de Ca)(pH 9-10), siguiendo la técnica corrientemente usada para la obtención de aislado de lino con agua (sin adición de TPF)(Figura 2). Paralelamente se procedió a operar con la misma técnica, pero usando suero de la misma partida al que previamente se le había burbujeado CO₂ (pH 7,0)(eliminación parcial de Ca⁺⁺ removido por centrifugación).

Tabla 23

Material nitrogenado dispersado obtenido variando la proporción y el medio dispersante.

<u>Relación(% prot)</u> <u>lino:suero</u>	<u>Medio dispersante</u>	<u>N dispersado %</u> <u>N total</u>
60:40	agua (pH 9-10)	60,0
	suero (pH 9-10)	75,7
	suero (pasaje CO ₂ pH 9-10)	73,5
90:10	suero (pH 9-10)	66,8

La Tabla 23 muestra una mejor dispersión de proteína de lino con suero que con agua (pH 9-10), con resultados ligeramente superiores para el suero en el que no se eliminaron los iones Ca^{++} (N dispersado % N total en la mezcla).

* Para fijar finalmente las condiciones definitivas del trabajo, se probó la misma forma de dispersión sobre otra relación de mezcla proteínas lino:suero(90:10), elegida de tal manera que permitiera operar una extracción de material nitrogenado aceptable aún en el caso de suplementar por coprecipitación las proteínas de lino con un bajo nivel de proteínas de suero.

En este caso también se logró una mejora respecto de la dispersión hecha con agua sola (pH 9-10).

Quedaba entonces por investigar el efecto que produciría la presencia de TPF en el medio de obtención del aislado de lino en las condiciones que operarían en la coprecipitación (calentamiento a 85-90°) teniendo en cuenta que la harina de este último aporta sales propias del vegetal de origen, con muy posible influencia en la carga iónica total. Por tal motivo y considerando un posible desplazamiento del pH de máxima coprecipitación hacia valores superiores al de las proteínas de lino, los ensayos se realizaron a dos pH distintos 4,0 y 4,5.

Los resultados que se registraron para el "aislado de lino" muestran rendimientos muy inferiores en presencia de TPF (sobre operaciones independientes precipitando con CLH a pH 4,0 y 4,5; 85-90°: 14,64 y 12,08 g% harina) respecto de valores del orden de 20-24% para el procedimiento de obtención sin TPF (pH 4,0 de máxima precipitación; 85-90°).

Tabla 24

<u>Relación (%prot.)</u> <u>lino:suero</u>	<u>Procedimiento</u> <u>(85-90°-3 a</u> <u>5 min.)</u>	<u>N disp % N tot.</u>	<u>Rendimiento N</u> <u>(% aisl./g</u> <u>sol. inic)</u>	<u>Ids. disp.</u> <u>(g/16g N)</u>	
0:100	pH 4,0	---	3,4(g/l)	13,53	11,46
0:100	TFF (50 mg/ml) pH 4,0	---	3,9(")	13,90	10,88
84:16	pH 4,0	72,76	13,08	13,35	5,17
84:16	pH 4,5	54,32	12,20	14,45	5,12
84:16	pH 7,0 (centrif) pH 4,0	66,33	13,14	13,24	5,08
84:16	pH 7,0 (centrif) pH 4,5	66,33	11,05	14,51	5,02
84:16	TFF (50 mg/ml) pH 4,0	68,20	10,66	13,91	4,56
84:16	TFF (50 mg/ml) pH 4,5	68,17	10,62	14,26	4,63
70:30	pH 4,0	---	11,07	13,32	6,58
70:30	pH 4,5	---	8,52	14,20	6,45
60:40	pH 4,0	---	8,37	14,10	6,32
60:40	pH 4,5	---	6,97	14,71	6,51

La Tabla 24 reúne las experiencias realizadas a partir de una misma relación harina de lino:suero a fin de observar la influencia del nivel de Ca^{++} , presencia o no de TPF y diferentes valores de pH en la coprecipitación de sus proteínas (rendimiento, valor de lisina disponible y riqueza de nitrógeno en el aislado mixto). Así mismo, otras dos relaciones de las fuentes se ensayaron frente a distintos valores de pH de coprecipitación.

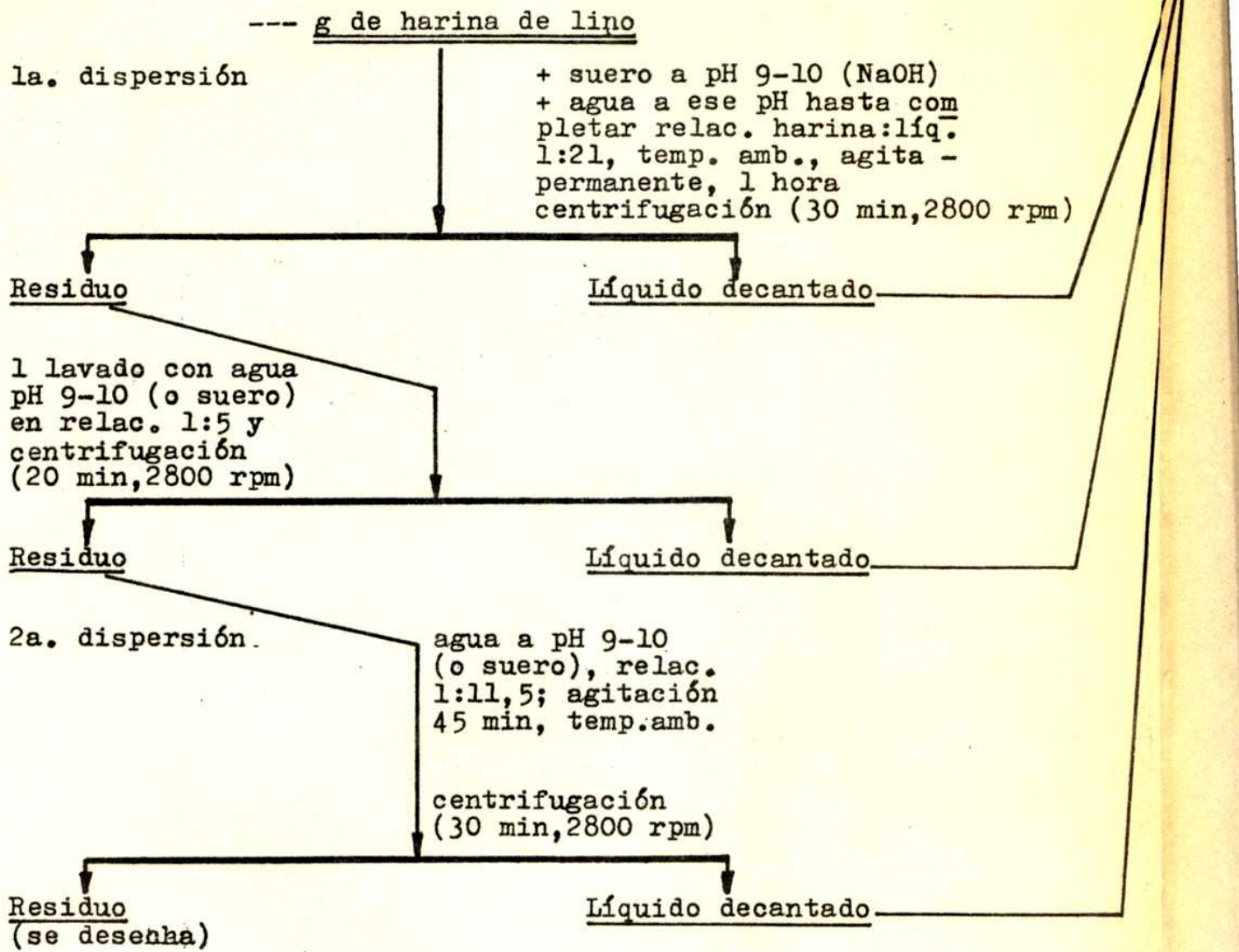
De su observación surge que la presencia de TPF conduce, en todos los casos, a un contenido menor en lisina disponible, sea para el suero solo o en el coprecipitado mixto. No se observa beneficio alguno de operar la eliminación parcial de Ca^{++} (pH 7,0 y centrifugación) sobre valores de rendimiento y lisina disponible. La coprecipitación conducida a pH 4,0 (isoeléctrico de las proteínas de lino) muestra mayores valores de rendimiento para todos los casos (con similares niveles de lisina disponible).

Por lo tanto se eligió proceder a realizar la coprecipitación utilizando suero tal cual y coprecipitar a pH 4,0 (procedimiento más sencillo y satisfactorio: ver Figura 15 y Parte Experimental).

8)- Evaluación de características físicas, químicas y determinación de componentes particulares de los aislados suplementados. Comparación de los valores logrados con los de los aislados sin suplementar.

En la Tabla 25 se dan los valores obtenidos para algunos aminoácidos de distintos aislados proteicos de lino suplementados con suero y su comparación con los de las fuentes de parti-

Figura 15



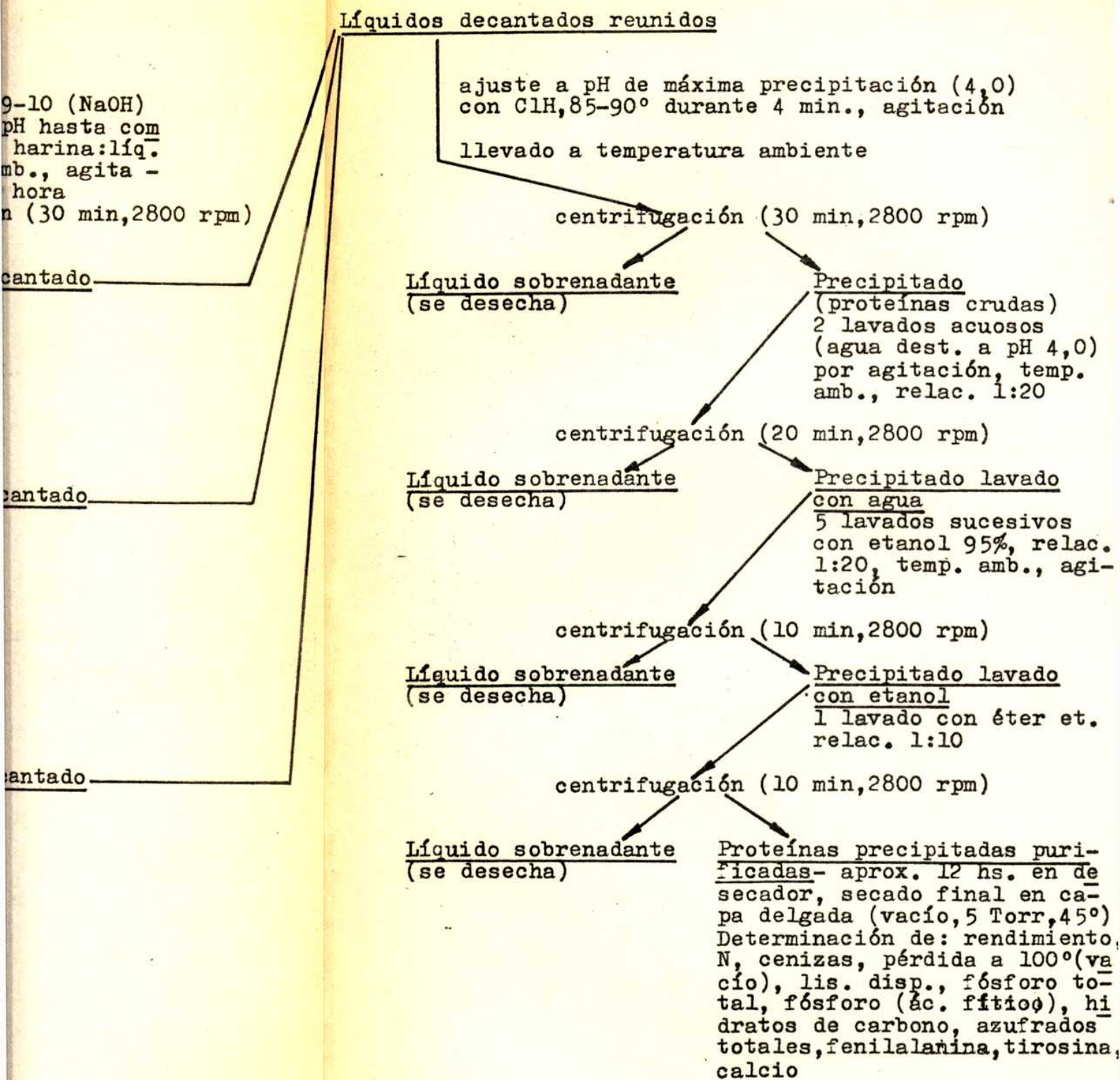


Tabla 25

Contenido en aminoácidos para distintos aislados coprecipitados de protefinas de lino y suero.

<u>g/16g N</u> (sss)	<u>lino:suero (% prot.)</u>							
	<u>0:100</u> pH 4,0	<u>84:16</u> pH 7,0 pH 4,0	<u>84:16</u> pH 4,0	<u>70:30</u> pH 4,5	<u>60:40</u> pH 4,0	<u>100:0</u> pH 7,0-TFF pH 4,0	<u>100:0</u> pH 4,0	<u>100:0</u> pH 4,0
<u>lis. disp.</u>	3,65	5,08	5,17	6,45	6,32	10,88	11,46	
<u>lis. tot.</u>	4,37	5,52	5,58	7,09	6,80	12,25	11,78	
<u>met.</u>	1,91	1,60	1,92	2,06	2,16	2,60	2,92	
<u>cis.</u>	1,39	0,52	0,43	0,59	0,95	1,65	0,98	
<u>met+cis</u>	3,30	2,12	2,35	2,65	3,11	4,25	3,90	
<u>fen+tir</u>	6,86 ^x	8,23	8,52	8,46	8,15	8,73	8,57	
<u>Score</u> <u>químico</u>								
<u>lis. disp.</u>	66,4	92,4	94,0	>100	>100	>100	>100	>100
<u>met+cis</u>	94,3	60,6	67,1	75,7	88,8	>100	>100	>100

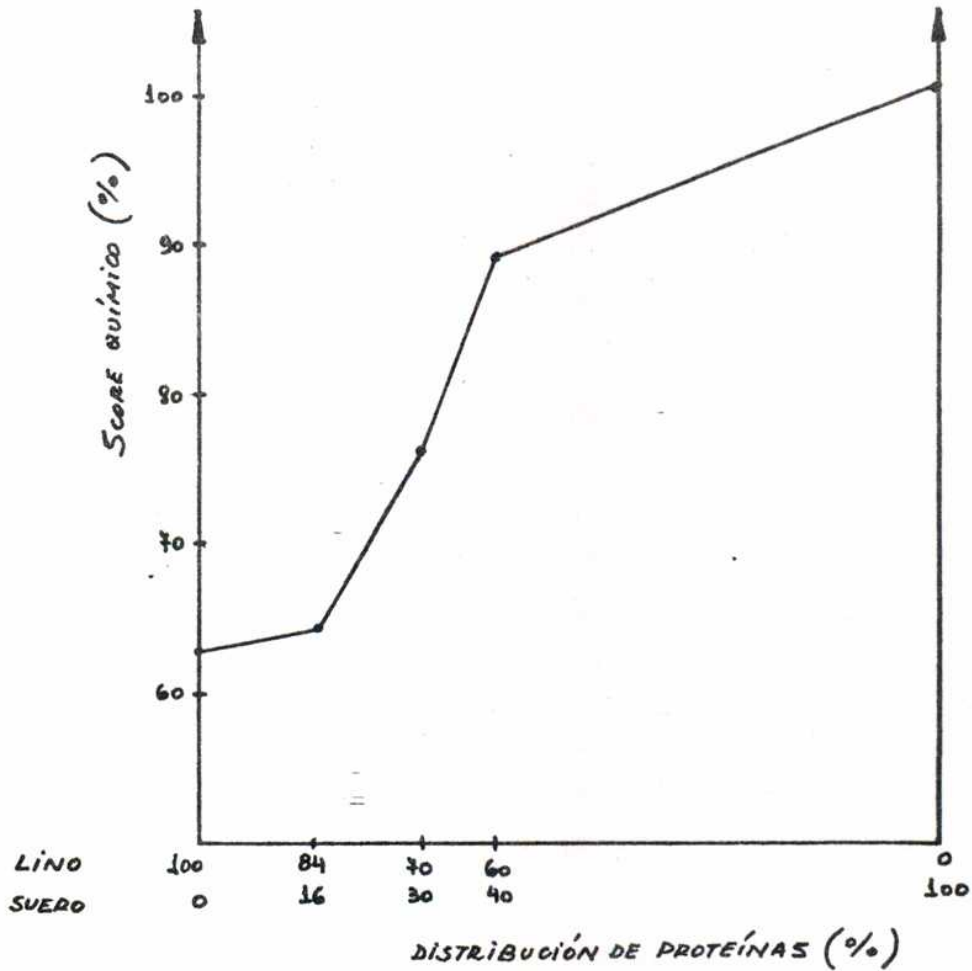
^x dato de bibliografía

da (lino y suero respectivamente). Podemos observar que para la proporción 84:16 (relación proteína de lino:suero) en el aislado mixto el valor de lisina disponible (5,17) representa el 94% del total recomendado por FAO en el patrón de referencia (1973), siendo no obstante deficitario primariamente en azufrados totales (2,35; FAO: 3,5)(S.C. 67%). Para relaciones proteicas del orden de 70:30 y 60:40 lino:suero, los niveles de lisina disponible superarían el valor recomendado de 5,5 (6,45 y 6,32). En ambos casos la eficiencia de la proteína de los aislados mixtos respectivos se vería limitada también por los azufrados totales (76 y 89% respectivamente). No obstante, de operar con la última de las relaciones señaladas (60:40) nos hallaríamos en el caso más satisfactorio, con un contenido en lisina disponible superior al indicado por FAO (6,3 g/16g N)(ver Figura 16).

En un trabajo anterior⁵ referente al estudio de suplementación de proteínas de lino con caseína industrial, se señalaron como 2° y 3° limitantes en la proteína aislada de lino a los aminoácidos leucina y treonina, que en el presente caso estarían cubiertos en sus niveles para todas las proporciones estudiadas (mayor riqueza en las proteínas de suero; FAO, 1973, 70 y 40 g/16g N respectivamente).

Se consideran además los aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina). La razón de su inclusión en la Tabla 25 se debe a que existen referencias bibliográficas en las que se señala a la fenilalanina como deficitaria en las proteínas de suero residual de queserías y a esta fuente como alimento conveniente para niños que padecen de fenilcetonuria⁷¹. No obstante la suma de am -

Figura 16



Proteínas aisladas por coprecipitación a partir de harina de li-
no y suero de queserías.

Score químico (%) en función del porcentaje de distribución de
proteínas coprecipitadas de ambas fuentes.

Los aminoácidos muestran valores superiores al recomendado por FAO en el patrón de referencia (6,0 g/16g N).

Cabe tener en cuenta en la suposición de que el aminoácido esencial fenilalanina estuviese en déficit respecto de su nivel óptimo, el contenido en tirosina (aminoácido semiesencial) representa una buena fuente de ahorro de aquel aminoácido (su precursor).

Por otra parte y según las recientes publicaciones de un grupo de expertos en nutrición (MIT e INCAP)²², el contenido en aminoácidos azufrados totales (met + cis) indicado en el patrón de la proteína de referencia (FAO, 1973) sería elevado respecto de los niveles adecuados para calcular dietas destinadas a niños mayores, adolescentes y adultos, apareciendo como muy beneficiosa la suplementación con metionina de síntesis para formulaciones de alimentos a base de proteína de soja para infantes y niños pequeños. En tal caso la relación de proteínas 84:16 resultaría satisfactoria.

Merece mencionarse, que los valores logrados para cistina (Tabla 25) no resultaron los esperados según cálculo para las distintas proporciones a partir de los respectivos en las fuentes correspondientes, siendo consistentemente más bajos. Ello llevó a pensar primeramente en una destrucción parcial durante el proceso de hidrólisis previo a la obtención del aminograma; no obstante los valores hallados para las fuentes respectivas no hacen suponer lo propio. Queda la posibilidad de interpretar esa disminución, que por otra parte parece dependiente de condiciones tales como valor de pH del suero antes de la extracción (pH 7,0) y de

la presencia de tripolifosfato, de pérdida por vía solubilidad de alguna fracción proteica al momento de la coprecipitación. La suma de ambos aminoácidos azufrados (met + cis) resulta altamente satisfactoria para la relación proteica 60:40 en el coprecipitado mixto (3,11 g/16g N).

En el presente caso, la evaluación biológica con animales de experimentación, podría confirmar las suplementaciones estudiadas. Desde un punto de vista económico y de utilización eficiente (aprovechamiento de subproductos de la industria alimentaria), tan sólo la incorporación de alrededor de un 30-40% de proteína de suero lograría un efecto beneficioso nutricionalmente.

Se consideró de interés incluir valores de características físicas y químicas de los distintos productos finales purificados y secos a 45° (vacío).

Se llevaron a cabo las siguientes determinaciones : cenizas (500-550°), pérdida a 100° (vacío), hidratos de carbono, fósforo total, fósforo de ácido fítico y calcio en los aislados obtenidos (ver Parte Experimental), cuyos valores se ilustran en la Tabla 26.

Puede observarse un ascenso apreciable en hidratos de carbono totales a medida que aumenta el nivel de proteína de lino en el coprecipitado. Comparativamente el contenido de los mismos resulta ligeramente superior para el suero tratado previamente a pH 7,0 y adicionado de TPF, a igualdad de las demás condiciones experimentales. El contenido en fósforo total, al igual que el de ácido fítico muestra un efecto ascendente a medida que aumenta la proporción de proteína de lino, única fuente que aporta es

te último componente de contenido nulo para suero solo). Llama la atención la disminución que provoca en el contenido de fósforo total (0,09%) del aislado de suero, la presencia de TFF en el medio.

Tanto el aislado de suero como el de lino retienen pequeñas cantidades de calcio (0,033 y 0,019% respectivamente).

Tabla 26

Características físicas y valores analíticos de los aislados mixtos para diferentes niveles de suplementación.

<u>Relación suero:lino</u> <u>(% prot.)</u>	0:100	16:84	30:70	40:60	100:0	100:0 (TPF)
color	→	→	→	→	→	→
			blanco crema			
olor	→	→	→	→	→	→
			inodoro			
sabor	→	→	→	→	→	→
			insípido			
granulosidad	→	→	→	→	→	→
			polvo fino, suave al tacto			
pérdida a 100° (vacío)(%)	9,04	8,14	8,54	6,60	7,88	8,14
cenizas (% sss)	0,64	1,39	0,51	0,42	0,47	0,79
nitrógeno (% sss)	13,86	14,57	15,52	15,31	14,92	15,28
P total (% sss)	0,45	0,39	0,25	0,20	0,28	0,09
P de ác. fítico (% sss)	0,27	0,29	0,12	0,06	no se detecta	no se detecta
P total-P de fítico (% sss)	0,18	0,10	0,13	0,14	0,28	0,09
hidratos de carbono (% sss)	19,24	13,50	11,06	7,62	3,47	4,99
caloio (% sss)	0,019	---	---	---	---	0,033

PARTE III

PARTE EXPERIMENTAL

PARTE IIIPARTE EXPERIMENTAL

1)- Estudio de la composición general de las harinas de extracción de semilla de lino y de soja.

1.1. Harina de extracción de lino.

La semilla de lino oleaginoso, adquirida en el comercio sirvió como material de partida para la obtención de la harina integral de extracción (Soxhlet, hexano técnico).

La semilla de lino molida se agotó en Soxhlet por hexano técnico, secó al aire, remolió y extrajo nuevamente hasta agotamiento. El producto resultante se secó al aire y eliminó el resto del solvente en estufa de vacío a 45°. Se obtuvo así la harina integral de extracción, que se guardó en frasco de buen cierre hasta el momento de su análisis.

Sobre este material se determinaron los contenidos en humedad, cenizas, nitrógeno total, extracto etéreo, fibra cruda y lisina disponible, de acuerdo con las siguientes técnicas:

Humedad: AOAC, Official Method 22003, 1965.

Cenizas: AOAC, Official Method 13006, 1965.

Nitrógeno total: macrométodo Kjeldahl, AOAC, Official Method 2.24, 1950.

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

Fibra cruda: AOAC, Official Method 22038, 1965.

Lisina disponible: al margen de las determinaciones que hacen a su composición general, la harina integral se examinó en su contenido en lisina disponible, según Conkerton y Frampton⁷⁹.

Los valores hallados se refieren a la harina tal cual y libre de humedad, respondiendo a valores promedio de determinaciones efectuadas por duplicado o triplicado.

1.2. Harina de soja.

La harina de soja utilizada fue provista por la firma "Molinos Río de la Plata" (Brasil), obtenida previa limpieza y descascarado del poroto, por extracción con hexano técnico de las hojuelas (cotiledones laminados). El residuo obtenido fue desolventizado y luego molido a malla 100, sin someterlo a proceso de tostación (máxima dispersabilidad en agua, especial para obtención de aislado proteico). 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 la harina integral de lino.

2)- Estudios sobre dispersión y precipitación de proteínas de lino. Influencia de la temperatura y valores de pH.

Equipos y reactivos.

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

Durante la extracción del material nitrogenado, la tempera

tura de la solución se llevó al valor deseado (circulador de agua con termostato) y la precipitación de las proteínas se efectuó a temperatura ambiente (20-25°)(sol. ClH).

En las etapas de dispersión y precipitación se utilizó un agitador mecánico de vidrio y en las separaciones por centrifugación, se operó con una centrífuga Universal Junior IIIS, a 2800 rpm.

En las etapas de purificación, se usó, agua destilada previamente ajustada al valor de pH correspondiente según el caso. En los lavados se utilizó etanol 95% destilado y éter etílico puro (destilado) para acelerar el secado.

2.1. Dispersión del material nitrogenado.

En balón de 3 bocas provisto con agitador, se dispersaron partidas de harina integral de lino por agitación permanente (1 hora), a diferentes temperaturas (30,40,50°) con agua destilada (relación harina:agua 1:21), y a distintos valores de pH de dispersión (6,0→11,0; sol. NaOH 5N). Por centrifugación se separó el líquido sobrenadante del residuo que contiene toda la fibra. Este último se trató por agitación con agua destilada ajustada previamente al pH de dispersión (relación 1:5) y centrifugó nuevamente para separar el líquido sobrenadante que se reunió con el anterior. El residuo se sometió a una nueva extracción con agua destilada (relac. 1:11,5) manteniendo por otra hora el valor de pH de dispersión en las condiciones antes mencionadas. Al término de ese tiempo se centrifugó y el sobrenadante se unió a los anteriores. En todos los casos los líquidos decanados se pasaron a través de tela metálica (acero inoxidable ,

200 mallas/cm). Se determinó, para cada una de las distintas condiciones operatorias, el % de nitrógeno dispersado.

2.2. Obtención del aislado de harina integral de lino.

Para su obtención, así como para los distintos ensayos descritos en la Parte II, se utilizó el mismo procedimiento general que se detalla a continuación.

2.2.1. Dispersión. Se realizó según las operaciones que se indican en 2.1. (pH óptimo de dispersión 9-10).

2.2.2. Precipitación. Se llevó a cabo por añadido de sol. de ClH 5N y ajuste del valor de pH de precipitación (óptimo 4,0, ClH 0,5N) de los líquidos de extracción a temperatura ambiente y con agitación permanente hasta lograr la estabilidad en el valor de pH deseado. El precipitado se separó por centrifugación, después de lo cual y por dos veces sucesivas, se lavó con agua previamente ajustada al valor de pH de precipitación (resuspensión del precipitado por fuerte agitación; relación precipitado:agua 1:20), centrifugando luego de cada lavado. Los líquidos decantados se desecharon.

2.2.3. Purificación. Los coágulos anteriores (de consistencia de "gel") se lavaron por agitación enérgica y por 5 veces consecutivas, a temperatura ambiente con etanol 95% y finalmente con éter etílico (relac. 1:20 en todos los casos). Se centrifugó después de cada lavado. Las proteínas así purificadas presentaron color blanco-cremoso, siendo su consistencia compacta.

2.2.4. Secado. Los precipitados se dejaron aproximadamente 12 hs. en desecador y luego se extendieron en capa delgada, secándolos a temperatura de 45° (vacío, 5 Torr). Se obtuvieron en forma de

polvo fino, liviano y de color blanco-cremoso.

3)- Obtención del "aislado proteico" a partir de harina industrial de soja cruda.

3.1. Dispersión. La extracción del material nitrogenado se realizó siguiendo los mismos pasos que para la dispersión de proteínas a partir de la harina de lino, con distinta relación harina:agua en las dispersiones debido a la menor viscosidad que se observa en este caso (relaciones 1:15; 1:5 y 1:10).

3.2. Precipitación. Se llevó a cabo con sol. de ClH 5N y luego con ClH diluido ajustando el pH al valor de máxima precipitación (4,5) agitando continuamente hasta obtener un valor de pH estable.

3.3. Purificación. Se lavó como en el caso de las proteínas de harina de lino, operando con sólo 3 lavados etanólicos en lugar de 5.

3.4. Secado. Se efectuó en forma similar al secado de las proteínas de lino, llevando a constancia de peso, obteniendo así el rendimiento en precipitado final. La proteína así aislada y seca presentó color blanco-crema y granulosis fina.

4)- Estudio de la influencia del tiempo de calentamiento sobre el grado de inactivación del factor antitriptico en el "aislado de soja", el contenido de lisina disponible y el de azufrados totales en el mismo.

Para la inactivación los aislados fueron dispuestos en forma de una delgada capa sobre una tela metálica (200 mallas/cm) y sometidos a la acción del vapor de agua a P atmosférica (au-

toclave) durante el tiempo indicado para cada caso (8 y 15 min.).

Luego se procedió a secar los mismos en estufa de vacío a 45°. Sobre los aislados así tratados y sin tratar se realizaron las siguientes determinaciones:

Actividad antitriptica: método de Kakade, Rackis y colaboradores.⁴²

Actividad ureásica: AOCS Tentative Method Ba-9-58.

Lisina disponible: método de Conkerton y Frampton⁷⁹.

Azufrados totales: el valor suma de metionina y cistina se obtuvo por el método de Spackman, Stein y Moore⁸¹ utilizando un Aminoacid Analyzer Beckman Modelo 120 B.

5)- Estudio de las condiciones óptimas de precipitación de las proteínas de suero en función de valores de pH, temperatura, naturaleza del ácido y agentes precipitantes.

5.1. Suero.

El suero utilizado como materia prima para este trabajo fue provisto por la firma Kasdorf S.A. A fin de obtener una muestra representativa para el análisis de composición general se separaron alicuotas de las partidas recibidas durante 1 año, liofilizaron inmediatamente (se mantuvieron en bolsitas de material plástico al vacío), luego se procedió al mezclado y homogeneización de ellas. Sobre la muestra obtenida de esta forma y sobre muestras líquidas de suero recién recibidas se realizaron las determinaciones indicadas en la Tabla 17.

Los valores de nitrógeno total, cenizas, pH y humedad fueron encontrados por los métodos antes mencionados, mientras que las restantes se hicieron por las siguientes técnicas:

Acidez: AOAC Official Method 16023, 1965.

Grasa: AOAC Official Method 16061, 1965.

Lactosa: AOAC Official Method 29039, Mundson y Walker, 1965.

Calcio: AOAC Official Method 13014, 1965.

Sólidos totales: AOAC Official Method 22009, 1965.

Fósforo total: Bartlett modificado⁶.

5.2. Efecto de la temperatura y el pH sobre el rendimiento en precipitado proteico.

El suero tal cual (sobre el que se determinó contenido en N total) se llevó a pH 9-10 con sol. NaOH a temperatura ambiente y con agitación constante. Luego se ajustó el pH con sol. ClH a los distintos valores indicados en la Fig. 8 y una vez logrado el mismo se llevó a temperatura mediante mantas calefactoras manteniendo la misma en el valor necesario por 4 min. con agitación permanente. Se lo enfrió luego rápidamente hasta llegar a temperatura ambiente, centrifugándolo entonces 30 min. a 2800 rpm. y haciendo un lavado posterior. Los líquidos decantados se pasaron a través de tela metálica (200 mallas/cm) y se analizaron en su contenido en nitrógeno para determinar el rendimiento de precipitación.

5.3. Tratamientos para eliminación de Ca⁺⁺.

Se procedió a operar de 3 formas diferentes:

5.3.1. el suero que inicialmente se encuentra a pH 4,4-4,6 fue llevado a pH 7,0 con sol. NaOH, y sometió a centrifugación 30 min. a 2800 rpm., obteniéndose un líquido y un residuo.

5.3.2. el suero una vez llevado a pH 7,0 como se indica en 5.3.1. se le burbujé CO₂ durante 10 min. a temperatura ambiente a tra

vés de la solución y luego se operó como en 5.3.1.

5.3.3. el suero sin ninguna modificación fue centrifugado.

Sobre el suero tal cual y los líquidos decantados finales se determinó el contenido de nitrógeno. Sobre el primero y los sólidos residuales se evaluó el contenido en calcio, por los métodos mencionados anteriormente.

5.4. Efecto de la naturaleza del ácido utilizado sobre el rendimiento de la precipitación.

En esta etapa se operó según se indica en la Fig. 11 sobre el suero tal cual o sobre los líquidos obtenidos según 5.3., llevándolos a pH 9-10, y ajustando el mismo para los distintos valores indicados en la Tabla 21, con sol. de los ácidos ClH, PO_4H_3 y cítrico, de la misma forma que se había trabajado según 5.2.

5.5. Agregado de polifosfatos en el medio de precipitación.

Al líquido proveniente del tratamiento con pasaje de CO_2 tal como se describe en 5.3.2. se lo lleva primero con sol. NaOH a pH 9-10 (pH de dispersión de las proteínas de harina de lino) agitando en forma permanente; se ajusta con sol. ClH a distintos valores de pH (rango entre 3,0 y 6,5). Se agregó polifosfato de sodio (tripolifosfato o hexametafosfato) en distinta concentración (50, 100 y 150 mg/ 100 ml suero) con agitación suave llevando a la temperatura establecida (ambiente ó 85-90° durante 4 min.).

En el caso que se somete a calentamiento, se lleva a temperatura ambiente y luego se centrifuga a 2800 rpm por 30 min.

5.6. Obtención del aislado de proteínas del suero.

5.6.1. Precipitación. El suero es llevado primero a pH 9-10 con

sol. NaOH y luego a 4,0 con agitación hasta que el pH sea estable, se lo calienta a 85-90° durante 4 min. (manta calefactora), en - fría rápidamente a temperatura ambiente y centrifuga 30 min. a 2800 rpm.

5.6.2. Purificación. En forma similar a las otras obtenciones de aislados ya descritas, se realizaron 2 lavados acuosos con agua destilada ajustada a pH 4,0, 3 lavados etanólicos y uno con éter etílico. Se obtiene en esta etapa una masa sumamente esponjosa y blanca con una gran capacidad de absorción de líquidos. Se seca en vacío a 45° hasta constancia de peso, quedando un polvo muy fino y de color blanco.

Para el aislado obtenido con el agregado de TPF se utilizó el esquema descrito en 5.5. (primeras etapas) usando una concentración de 50 mg/ 100 ml de suero y la etapa de purificación se realizó de la misma forma descripta aquí.

6)- Estudio de las condiciones óptimas de coprecipitación de proteínas de lino con proteínas de soja o de suero.

En el caso de la coprecipitación de proteínas de lino y soja, según se esquematiza en la Fig. 5 se siguió la misma técnica descripta en 2.(Fig.14).

En la coprecipitación de proteínas de lino y suero, se procedió a utilizar en líneas generales también la técnica detallada en 2 en cuanto a las etapas de dispersión y purificación utilizando suero en lugar de agua en la relación adecuada para el % de proteínas de cada fuente y completando con agua destilada cuando fuera necesario para dar la proporción harina de lino:lí

quido dispersante fijada (Fig. 15), siguiendo en la etapa de precipitación las indicaciones de temperatura y tiempo óptimas para las proteínas de suero según se detallan en 5.6.

8)- Evaluación de características físicas, químicas y determinaciones de componentes particulares de los aislados suplementados. Comparación de los valores logrados con los de los aislados sin suplementar.

Sobre los aislados coprecipitados y los sin suplementar se determinó: lisina total, metionina, cistina, tirosina y fenilalanina (según se indica en 4); humedad, cenizas, nitrógeno total y lisina disponible (de acuerdo a los métodos mencionados en 1.1); hidratos de carbono totales y fósforo total (técnicas indicadas en 5.1.); determinando fósforo de ácido fítico por colorimetría⁶ y calcio por espectrometría de absorción atómica (espectrómetro Jarrell-Ash MVAA 82500, equipado con quemador laminar para llama aire-acetileno).

PARTE IV

RESUMEN Y CONCLUSIONES

PARTE IVRESUMEN Y CONCLUSIONES

1)- En vista del incremento en la demanda de alimentos proteicos, los "expellers" y harinas residuales de la separación del aceite, representan subproductos valiosos desde los puntos de vista comercial y nutricional al igual que los subproductos de origen animal.

Se hace referencia a la producción actual, en relación a semilla de lino (oleaginosa), de soja (leguminosa) y a suero de queserías (subproducto de la industrialización de quesos blandos), materiales de partida en el desarrollo del presente trabajo.

Se presenta una revisión de resultados de estudios previos (conducidos en este laboratorio) sobre aislamiento de proteína de harina integral de lino y del incremento de su valor nutritivo por coprecipitación con caseína industrial (único antecedente sobre el particular). Así mismo se incluye la información recogida de literatura sobre estudios de composición general y valor nutricional de proteínas de soja y de suero de queserías, que se consideran excelentes "suplementos" proteínicos.

2)- El objeto fundamental de este trabajo fue el de estudiar las condiciones óptimas de aislamiento de proteínas mixtas homogéneas logradas por coprecipitación de las proteínas dispersadas a partir de harina de lino y soja y de lino y suero de queserías. Previo estudio de composición general de los materiales de partida, se considera la obtención de una serie de "aislados" de lino

suplementados en proporciones crecientes con proteínas de soja o suero, a los fines de su evaluación comparativa de características químicas y nutricionales (cómputo químico) frente a la de sus fuentes y al patrón de aminoácidos esenciales de la proteína de referencia (FAO/OMS, 1973). El método de aislamiento de las proteínas se llevó a cabo por el procedimiento clásico de dispersión en medio alcalino y precipitación en medio ácido al valor de pH de máxima precipitación, purificación y secado (vacío, 45°) del aislado finalmente separado.

3)- La experimentación realizada llevó a las siguientes conclusiones:

a)- Los valores de composición química general de la harina integral de lino (hexano), así como los de la harina de soja (descascarada, sin tostar, hexano, Brasil), son acordes con los logrados en trabajos anteriores (lino) y con los de literatura (soja), encuadrando los de soja dentro de los exigidos por el Código Alimentario Argentino para la harina de soja.

La harina integral de lino es un concentrado proteico (41,6% proteína cruda), deficitario primariamente en lisina (4,08%) y con un contenido en fibra cruda relativamente bajo (9%). La harina industrial de soja muestra un alto nivel de proteína cruda (56,9%), bajo contenido en fibra (2,3%) y alto contenido en lisina disponible (6,3%).

b)- Ensayos de dispersabilidad de proteínas sobre harina integral de lino, para distintos valores de pH del medio y a diferentes temperaturas (ambiente hasta 50°) señalan mayor rendimiento a medida que aumenta el valor del pH (6 a 8), incremen -

tándose ligeramente para valores superiores a 10 (pH 11,0). No se registró una tendencia similar respecto del aumento de temperatura. El valor de pH de máxima precipitación para las proteínas dispersadas en el ámbito pH 9-10 fue de 4,0; ocurriendo un ligero desplazamiento en este último cuando se procedía a la dispersión a pH superior a 10 (3,5).

El nivel de lisina disponible (1er aminoácido limitante en la proteína de lino) resultó algo inferior para el "aislado" proveniente de la dispersión efectuada a pH 11,0 (3,65 g/16g N a pH 9-10 y precipitado a 4,0; y 3,01 para pH 11,0 con precipitación a 3,5).

Considerando, además, la poca conveniencia de operar a un pH tan elevado (11,0) aún a temperatura ambiente (probable daño a determinados aminoácidos esenciales por un medio fuertemente alcalino), se decidió operar la dispersión a temperatura ambiente y pH 9-10. Se evaluaron rendimiento y características físicas y químicas del aislado proteico correspondiente. (purificado y seco a 45°, vacío).

c)- Conocidas ampliamente las condiciones de dispersión y precipitación de proteínas de harina de soja (dispersión a pH 9-10, máxima precipitación a 4,5) se adoptaron dichos valores para la obtención del aislado y evaluaron su rendimiento y características físicas y químicas, una vez purificado y seco a 45° (vacío).

El calentamiento de estos últimos (autoclave), durante 15 min. redujo notablemente el factor antitriptico (64,3 a 14,5 UIT/mg) e inactivó completamente la actividad ureásica, sin influencia adversa sobre los niveles de lisina disponible y amino-

ácidos azufrados totales (lis. disp. 6,3-6,6%; azuf. tot. 2,40-2,46% antes y después del tratamiento respectivo).

d)- Sobre la base de los valores calculados del cómputo químico teniendo en cuenta los lros aminoácidos limitantes de cada aislado (lino y soja), los rendimientos respectivos y el perfil de solubilidad versus pH de precipitación de las proteínas dispersadas, se calcularon las proporciones de las harinas respectivas que serían necesarias mezclar para coprecipitar aislados mixtos con distinto nivel de cada fuente, con miras a una complementación beneficiosa en su valor nutritivo. La observación de los perfiles señalados permitió considerar, además, un valor de pH de precipitación intermedio (4,2)(4,0 para proteína de lino y 4,5 para proteína de soja) para el cual los aislados mixtos obtenidos, respondieron en más estrecha concordancia con los niveles de lisina disponible calculados.

e)- En todos los casos y a través de distintas proporciones en las mezclas de harinas de partida, se observó claramente en los aislados coprecipitados la suplementación gradual de la proteína de soja al ser incorporada en mayor proporción frente a la de lino.

El aislado mixto en el cual la relación de las proteínas de soja a lino fue de 60/40%, mostró un contenido en lisina disponible que cubre el sugerido por FAO/OMS en el patrón de la proteína de referencia (1973)(5,5%), mientras que para la relación 50/50 estaría cubriendo solamente el 95,3% de dicho valor. No obstante y en ambos casos, la proteína se vería limitada en su

aprovechamiento por los aminoácidos azufrados (1er limitante) para dichas mezclas (con valores similares al de aislado de soja solo). Aparentemente la coprecipitación de ambas proteínas conduciría a un valor nutritivo máximo (cómputo químico 77,7; proteína de lino : prot. de soja 70:30) superior al de los aislados de ambas fuentes de partida.

Los aislados coprecipitados con mayor proporción de proteína de lino que 70% serían deficientes en lisina y aquellos con mayor riqueza en proteína de soja que 30% lo serían por su nivel en azufrados totales.

Teóricamente, el 2do y 3er limitante de la proteína de lino (leucina y treonina)(aminograma) a través de la suplementación desarrollada con soja no modificarían las conclusiones señaladas (leucina aumenta al aumentar la proporción de proteína de soja en el coprecipitado y treonina disminuye). Estos resultados quedarían a confirmar por experimentación biológica (ratas).

f)- Con fines comparativos se incluyó el análisis de composición general de los aislados de las fuentes de partida y de los correspondientes a distintas proporciones de ambas, en los cuales se destacó un aumento en el contenido en hidratos de carbono a medida que aumentaba el nivel de proteína de lino y ligero decrecimiento en el contenido en fósforo total, manteniéndose prácticamente constante el contenido en fósforo de ácido fítico en todas ellas.

g)- Como paso previo a la suplementación de proteínas de lino con proteínas de suero (subproducto de queserías) se encaró el estudio de la composición general de este suplemento. Distintas

partidas de suero fluido (proveniente de la elaboración de queso blando, de la misma central lechera) fueron suficientemente constantes como para ofrecer valores promedio representativos, de los cuales interesaron a los fines de este trabajo el nivel de proteína (0,89%), pH (4,40) y Ca^{++} (0,114% p/v). Paralelamente se dan los valores promedio de muestras de suero liofilizado. En todos los casos los valores logrados concuerdan con los señalados en literatura.

h)- El mayor rendimiento en precipitado proteico, dentro de las condiciones prácticas a escala de laboratorio, se obtuvo operando a pH 7,0, coagulando por calentamiento a 85-90° durante 4 min.

Esta etapa de calentamiento (en el momento de la precipitación por ClH, pH 4,0) ensayada con proteínas de lino no afectó sus valores de rendimiento y lisina disponible comparativamente al precipitado obtenido a temperatura ambiente.

i)- Se observó, a través de una serie de experiencias, que el contenido en Ca^{++} del suero interfería en el pH de máxima precipitación de sus proteínas, siendo el PO_4H_3 , de los distintos ácidos ensayados para la precipitación, el más satisfactorio para lograr mayor rendimiento en precipitado proteico del suero, a igualdad de todas las demás condiciones.

j)- La presencia de iones polifosfato, previa eliminación parcial de Ca^{++} , provoca un mayor desplazamiento en el valor de pH de máxima precipitación de las proteínas del suero, dependiendo en su efecto de su concentración y cargas iónicas aportadas al medio. Los valores obtenidos muestran concordancia con lo señalado, no obstante si bien el precipitado proteico no difiere prác

ticamente en rendimiento de precipitación y en contenido en nitrógeno total, su valor de lisina disponible es inferior al obtenido en el aislado precipitado sin su presencia (10,88 y 11,46/16g N).

Considerando que los resultados de estas últimas experiencias (obtención del aislado final) quedan expresados en rendimiento % de suero de partida (a los fines prácticos) y teniendo este último un contenido tan bajo en proteína (1%), las diferencias registradas en material nitrogenado que quedan en los sobrenadantes (para diferentes ensayos con ácidos calculados en N%N de partida) quedan prácticamente anuladas. Es por ello que en la práctica se puede operar la precipitación con sol. de ClH en vez de PO_4H_3 o con agregado de TFF sin diferencias apreciables en el rendimiento.

k)- En base a una serie de ensayos previos, en los cuales se operó con distintas proporciones de harina de lino y suero (60:40 y 90:10), la dispersión de proteínas de harina de lino directamente en suero (en lugar de agua) al valor de pH 9-10, ofreció ventajas en el rendimiento de material nitrogenado extraído respecto del agua sola.

l)- Teniendo en cuenta que la harina de lino aporta su propia carga mineral al medio de dispersión (suero) se ensayó el efecto del TFF en las condiciones de coprecipitación (ClH pH 4,0 y 4,5 ; calentamiento a 85-90°). Los resultados mostraron rendimientos muy inferiores a los obtenidos en la precipitación sin este agente (12-15% respecto de 20-24%).

Ensayadas diferentes proporciones de suplementación (lino:sue

ro), a distintos valores de pH (4,0 y 4,5), con y sin agregado de TPF y con y sin separación previa parcial de Ca^{++} , (ácido precipitante ClH, 85-90°, 4 min.) consistentemente los mejores valores de rendimiento en coprecipitado y en lisina disponible se lograron al valor de pH 4,0 y en ausencia de TPF.

m)- La evaluación (aminogramas) de algunos aminoácidos esenciales (lisina, azufrados totales y aromáticos totales) en aislados mixtos obtenidos para distintas proporciones de proteína de lino y suero, permitió concluir que para la relación 84:16, el valor de lisina disponible (5,17) representa el 94% del total recomendado por FAO (1973) en el patrón de referencia. En relaciones de 70:30 y 60:40 se superaría ese nivel. No obstante, los distintos aislados mixtos se verían limitados en su aprovechamiento por el contenido en azufrados totales (metionina + cistina) cuyo nivel máximo se da para la relación 60:40. Los aminoácidos leucina y treonina (2° y 3° limitantes) en proteína de lino, estarían cubiertos para todas las proporciones estudiadas por su mayor riqueza en las proteínas de suero, al igual que los niveles de aminoácidos aromáticos.

Se señala la conveniencia de su confirmación por vía biológica (NPU, PER):

n)- Se consideró de valor comparativo el estudio de composición general de los aislados mixtos logrados y el de los materiales de partida. Se observó un aumento apreciable en hidratos de carbono a medida que aumentaba el nivel de proteína de lino en el coprecipitado. El contenido en fósforo total al igual que el de ácido fí

tico se incrementó en el mismo sentido, siendo la proteína de lino la única fuente que aporta este último componente (antinutriente). Se registraron pequeños porcentajes de calcio en los aislados de suero y lino (0,033 y 0,019% respectivamente).

BIBLIOGRAFIA

-BIBLIOGRAFIA-

- 1- A.K. Smith, Econ. Botany, 8, 291 (1954).
- 2- H.A. Forchieri, Tesis, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A. (1970).
- 3- M.H. Bertoni y P. Cattáneo, Anales Asoc. Quím. Argentina, 60, 363 (1972).
- 4- F.W. Sosulski y A. Bakal, J. Inst. Technol. Aliment. (Canadian), 2, 28 (1969).
- 5- S.C. Revuelto, Tesis, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A. (1976).
- 6- A.O. Rucci, Tesis, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A. (1972).
- 7- M.S. Vigo, Tesis, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A. (1972).
- 8- A.E. Tortosa, Tesis, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A. (1976).
- 9- M.H. Bertoni y P. Cattáneo, Anales Asoc. Quím. Argentina, 61, 129 (1973).
- 10- H. Akhtardzhiev y D. Kolev, Compt. rend. acad. bulgare Sci., 10, 387 (1957); C.A., 52:14203g.
- 11- K. Zagorski, Ann. Univ. Mariae Curie Sklodowska, Lublin. Polonia, 14, 59 (1962); C.A., 57:8877h.
- 12- J. Kalac y J. Zemanova, Biol. Pr., 20, 58 (1974); C.A., 82: 83042g.
- 13- M.E. Sambucetti, G. Gallegos y J.C. Sanahuja, Arch. Latinoamer. de Nutr., XXIII, 1, 79 (1973).

- 14- F.W. Sosulski y G. Sarwar, J. Inst. Canadian Sci. Technol. Aliment., 6, 1, 1 (1973).
- 15- E.W. Meyer, 3rd. International Congress of Food Sci. and Technology, 235, Washington, D.C. (1970).
- 16- E.W. Meyer, J. Am. Oil Chem. Soc., 48, 9, 484 (1971).
- 17- J.J. Rackis, R.L. Anderson, H.A. Sasame, A.K. Smith y C.H. Etten, Agr. Fd. Chem., 9, 5, 409 (1961).
- 18- R.L. Kellor, J. Am. Oil Chemists' Soc., 51, 77A (1974).
- 19- R. Bressani y L.G. Elías, Food and Nutrition Bulletin, 1, 4, 23 (1979).
- 20- FAO/OMS, Necesidades de Energía y de Proteínas, Informe N° 52 Roma (1973).
- 21- E.W. Meyer y L.D. Williams, World Soybean Research, 904 (1976)
- 22- V.R. Young, N.S. Scrimshaw, B. Torum y F. Viteri, J. Am. Oil Chemists' Soc., 56, 3, 110 (1979).
- 23- J.E. Kinsella, J. Am. Oil Chemists' Soc., 56, 3, 242 (1979).
- 24- W. Hoover, J. Am. Oil Chemists' Soc., 56, 3, 301 (1979).
- 25- J. Laurijssen, J. Am. Oil Chemists' Soc., 56, 3, 311 (1979).
- 26- W.L. Brown, J. Am. Oil Chemists' Soc., 56, 3, 316 (1979).
- 27- E.F. Sipos, J.G. Endres, P.T. Tybor y Y. Nakajima, J. Am. Oil Chemists' Soc., 56, 3, 320 (1979).
- 28- J. Mansvelt, J. Am. Oil Chemists' Soc., 56, 3, 350 (1979).
- 29- C.V. Morr, J. Am. Oil Chemists' Soc., 56, 3, 383 (1979).
- 30- W.A.B. Thomson, J. Am. Oil Chemists' Soc., 56, 3, 386 (1979).
- 31- C.W. Hesseltine y H.L. Wang, Chem. and Ind., 12, 393 (1979).
- 32- R. Bressani, J. Am. Oil Chemists' Soc., 52, 4, 254A (1975).

- 33- F.E. Horan, J. Am. Oil Chemists' Soc., 51, 1, 67A (1974).
- 34- R.L. Kellor, J. Am. Oil Chemists' Soc., 51, 1, 77A (1974).
- 35- M.M. Handy, J. Am. Oil Chemists' Soc., 51, 1, 85A (1974).
- 36- P.G. Van Stratum y M. Rudrum, J. Am. Oil Chemists' Soc., 56, 3, 130 (1979).
- 37- I. Liener, J. Am. Oil Chemists' Soc., 56, 3, 121 (1979).
- 38- R. Bressani y L.G. Elías, Advances in Food Research, 16, 1, Academic Press, New York (1978).
- 39- H. Roberts, J. Am. Oil Chemists' Soc., 56, 3, 206 (1979).
- 40- B. Favre, J. Am. Oil Chemists' Soc., 56, 3, 146 (1979).
- 41- F.E. Horan, New Protein Foods, 1, A, 392, Academic Press, New York (1976).
- 42- J.O. Bouzas y M.H. Bertoni, Anales Asoc. Quím. Argentina, 68, 81 (1980).
- 43- Código Alimentario Argentino, Cap. XIX, art. 1407 al 1412, Ministerio de Bienestar Social (1980).
- 44- M.L. Raymond, J. of Fd. Sci., 45, 1, 57 (1980).
- 45- M. Sternberg, C.Y. Kim y R.A. Plunkett, J. of Fd. Sci., 40, 6, 1168 (1975).
- 46- G.O. Zaragoza, Tesis, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A. (1978).
- 47- K. Okubo y D.V. Myers, Cereal Chem., 53, 4, 513 (1976).
- 48- FAO, Mejor aprovechamiento de la leche, Serie sobre productos agropecuarios N° 7 (1949).
- 49- Secretaría de Estado de Agricultura y Ganadería, Reseña Estadística 1978.

- 50- S.M. Weisberg, New Protein Foods, 2, B, 52, Academic Press, New York (1976).
- 51- C. Alais, Ciencia de la Leche, Compañía Editorial Continental S.A., Barcelona (1971).
- 52- E.D. Whittier y B.H. Webb, Byproducts from milk, Reinhold Publishing Corporation, New York (1950).
- 53- O.A. Sbodio, R.D. Reyna, E. Castelar, R. Bacchetta y O. Perin, La Alimentación Latinoamericana, 103 (1977).
- 54- J.R. Whitaker, Food Proteins, AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut (1977).
- 55- PAG Bulletin, V, 1 (1975).
- 56- R.P. Bates, L.C. Wu y B. Murphy, J. of Fd. Sci., 39, 3, 585 (1974).
- 57- L. Gómez Tena, Vía Láctea, 5, 17, 5 (1973).
- 58- C.V. Morr, Fd. Technology, 30, 3, 19 (1976).
- 59- W.H. Wingerd, J. of Dairy Sci., 54, 8, 1234 (1971).
- 60- C.V. Morr y S.H.C. Lin, J. of Dairy Sci., 53, 9, 1162 (1970).
- 61- J. Hidalgo, J. Kruseman y H.U. Bohren, J. of Dairy Sci., 56, 8, 988 (1973).
- 62- S. Jones, E.B. Kalan, T.C. Hazel, J. Agr. Fd. Chem., 20, 2, 229 (1972).
- 63- V.H. Holsinger, L.P. Posati, E.D. De Vilbiss y M.J. Pallansch Fd. Technology, 59 (1973).
- 64- O. De Rham, P. Van De Rovaart, E. Bujard, F. Mottu y J. Hidalgo, Cereal Chem., 54, 2, 238 (1977).
- 65- L.U. Thompson, Can. Inst. Fd. Sci. Technol. J., 10, 1, 43 (1977)

- 66- G.W. Lindsay, R.M. Saunders y G.O. Kohler, J. of Fd. Sci., 42, 5, 1365 (1977).
- 67- S.I.W. Bosund y B.L. Bengtsson, Fr. Demanole 2.185.363, 8/2 1974; C.A., 81:36689t.
- 68- C. Pompei y D. Bazzoni, Italy 540.4, 2/2/1974; C.A., 81:62348a
- 69- Gev. Oppen. 2.354.603, 16/5/1974; C.A., 81:48753x.
- 70- C. Giddey, G. Dove, Swiss 549.347, 31/5/1974; C.A., 82:3025r.
- 71- E. Forsum y L. Hambreaus, PAG Bulletin, II, 4 (1972).
- 72- S.M. Belart, Tesis, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A (1980).
- 73- R.V. Josephson, S.S.H. Rizvi y W.J. Harper, J. of Fd. Sci., 40, 3, 479 (1975).
- 74- C.C. Panzer, E.F. Schoppet, H.I. Sinnamon y N.C. Aceto, J. of Fd. Sci., 41, 6, 1293 (1976).
- 75- K. Herian, Veda Vyzk Potravín Prum. 1973; C.A., 81:13474ly.
- 76- R. Townend y D.M. Gyuricsck, J. Dairy Sci., 57, 10, 1152 (1974) C.A., 82:2887m.
- 77- S.H. Richert, C.V. Morr y C.M. Cooney, J. of Fd. Sci., 39, 1, 42 (1974).
- 78- D.B. Oommans, R.A. Bernhard y T.A. Nickerson, J. of Fd. Sci., 45, 2, 362 (1980).
- 79- E.J. Conkerton y V.L. Frampton, Archives of Biochemistry and Biophysics, 81, 133 (1959).
- 80- M.L. Kakade, J.J. Rackis, J.E. Mc Ghee y G. Puski, Cereal Chem., 51, 309 (1974).
- 81- D.H. Spackman, W.H. Stein y S. Moore, Analytical Chemistry, 30, 7, 1191 (1958).

Albert

P. H.