

Tesis de Posgrado

Estudios de suplementación de aislados proteicos vegetales por coprecipitación con proteínas de alta calidad procedentes de subproductos animales : Coprecipitación de proteína de lino con caseína comercial

Revuelto, Sara Concepción

1976

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:

Revuelto, Sara Concepción. (1976). Estudios de suplementación de aislados proteicos vegetales por coprecipitación con proteínas de alta calidad procedentes de subproductos animales : Coprecipitación de proteína de lino con caseína comercial. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1513_Revuelto.pdf
Revuelto, Sara Concepción. "Estudios de suplementación de aislados proteicos vegetales por coprecipitación con proteínas de alta calidad procedentes de subproductos animales : Coprecipitación de proteína de lino con caseína comercial". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1976.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1513_Revuelto.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

"ESTUDIOS DE SUPLEMENTACION DE AISLADOS PROTEICOS VEGETALES
POR COPRECIPITACION CON PROTEINAS DE ALTA CALIDAD PROCEDEN-
TES DE SUBPRODUCTOS ANIMALES - COPRECIPITACION DE PROTEINA
DE LINC CON CASEINA COMERCIAL"

SARA CONCEPCION REVUELTO

Tesis presentada para optar al título
de Doctora en Ciencias Químicas

1976

Agradezco a la Dra. María H. Bertoni,
Consejera de Estudios y Directora de
Tesis, quien al brindarme su estímulo
y colaboración posibilitó la concreción
de este trabajo.

Agradezco:

- En particular al Dr. Pedro Cattaneo por sugerir la idea de coprecipitación y también por su permanente interés en este estudio.
- Al Dr. Juan C. Sanahuja y a sus colaboradores de la cátedra de Bromatología y Nutrición Experimental de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A., por haber participado en el planeamiento de las pruebas biológicas y puesto a mi disposición el equipo y materiales necesarios para las mismas. En especial a la Bioqca. Rosario Farina quien con su asesoramiento y ayuda hizo posible la realización de dichos ensayos.
- A mis compañeros de la cátedra de Bromatología por su sincera amistad.

Agradezco también:

- A las autoridades de la Fundación "Instituto de la Leche" Vicente L. Casares y Hersilia Lynch de Casares y particularmente al Sr. Adolfo Di Franco por la provisión de la partida de caseína que posibilitó este trabajo.
- Al Sr. A. Gurzi, Jefe del Departamento de Desarrollo y Control de Calidad de Adhesivos, de Refinerías de Maíz S.A.I.C. por haber proporcionado la dextrina de alta calidad utilizada en la elaboración de las dietas para ensayos biológicos, y al Dr. Aníbal L. Grosso por cuyo intermedio se llevó a cabo dicha gestión.

A mi padre

A mis hermanos

PARTE I

INTRODUCCION

- 1)- Enfoque global sobre mejoras en el valor nutritivo de fuentes proteínicas.
- 2)- Proteínas de semilla de lino. Composición. Mejoramiento del valor biológico por suplementación.
- 3)- Caseína industrial. Obtención. Composición. Valor nutritivo.
- 4)- Ensayos de suplementación por coprecipitación de proteínas vegetales con caseína. Antecedentes.

1)- Enfoque global sobre mejoras en el valor nutritivo de fuentes proteínicas.

En los programas sobre mejoras en cantidad y calidad nutritiva de los alimentos en general, y en particular, desde el punto de vista calórico-proteico, existen enfoques muy interesantes, que van abriéndose paso con mayor o menor éxito según sean las posibilidades y disponibilidades de cada país. Entre ellos caben citarse los mejoramientos en prácticas agrícolas y ganaderas (mayor productividad), en genética de plantas y animales (proteínas de mayor valor biológico, reducción o eliminación de factores antinutricionales y/o tóxicos, mayor rendimiento en peso, etc.), el enriquecimiento de los alimentos (agregado de aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales) y el progreso tecnológico de alimentos elaborados (obtención de concentrados y aislados proteínicos, formulaciones de alto contenido proteico y bajo costo, proteínas funcionales, etc.).

Dentro de los planes nutricionales, un nuevo enfoque actualmente en auge, es la distribución de excedentes de producción por parte de países altamente industrializados hacia los poco y no desarrollados, especialmente de trigo, leche descremada y subproductos de la industrialización de oleaginosas (tortas, "expellers" y harinas residuales) y de productos lácteos (caseinatos, sueros o líquidos residuales de la manufactura del queso y de la caseína).

Sobre todo a medida que los alimentos básicos van siendo menos abundantes en el mundo entero, revisten más importancia aquellos programas que tienden a evitar "pérdidas por derroche" de productos potencialmente nutritivos. Es probable que en estos intentos de "prevención de pérdidas potenciales de nutrientes" (1), haya tantas o más posibilidades de modernización en los aspectos tecnológico y social, que en las soluciones directas con miras a la nutrición de un pueblo. No obstante, como requisito previo, es importante tener no-

ción de la disponibilidad de esas nuevas fuentes a fin de proporcionar un beneficio máximo (nutricional-económico) para la alimentación del ser humano y de los animales. Es evidente que ello variará de una región a otra y de un nivel socioeconómico a otro.

No hay duda, que frente al problema calórico-proteico (sea éste originado por falta de recursos o por distribución despareja), un país encontrará la solución más ventajosa utilizando aquellas fuentes que esté en mejor situación de producir, tratando de hallar la manera óptima de asociarlas, suplementarlas o modificarlas a fin de elevar tanto el contenido como la calidad de sus proteínas.

En estos últimos años las oleaginosas y los subproductos de su industrialización (tortas, "expellers", harinas residuales de la separación del aceite) y las leguminosas de grano comestible, tienen atención preferencial dentro de los planes que tratan de mantener un balance entre la expansión demográfica y la disponibilidad de fuentes proteínicas. Así, la soja, el girasol, el algodón y el maní figuran entre las de mayor utilización y consumo. No obstante, para ciertos países, alguna otra fuente de proteína distinta de las antes mencionadas, puede constituir un recurso primordial (coco, palma, hojas, etc.).

2)- Proteínas de semilla de lino. Composición. Mejoramiento del valor biológico por suplementación.

En nuestro país, la semilla de lino ocupa el tercer lugar como oleaginosa, después del girasol y de la soja.

Los años anteriores a los de la cosecha actual (371.800 ton., 1975/76) mostraban un cuadro más favorable. Tomando como base el período 1960/76, la producción fue superior en un 33 y 56 % sobre las de los años anteriores y subsiguientes, respecto del valor máximo

en el rendimiento en cosecha logrado en 1962/63 (838.600 ton.)(^). Esta comparación refleja una falta de equilibrio en su producción que podría resultar desventajosa si se tiene en cuenta, que entre los subproductos vegetales ricos en proteínas (de acuerdo con resultados iniciales obtenidos dentro de este enfoque), el aislado proteico de lino ofrecía perspectivas alentadoras para su industrialización, al igual que el aceite extraído de esta oleaginosa (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). En este aspecto, Cattáneo proporcionó en un Informe (10) una evaluación comprensiva acerca de la utilización potencial del aceite de semilla de lino oleaginoso y de los subproductos de su industrialización. Consideró los siguientes objetivos:

Sobre aceite de lino crudo, la obtención de monoglicéridos de ácidos totales para su uso como emulsificantes (de índole "secante") en formulaciones de plaguicidas líquidos acuosos; sobre aceite de lino semi-refinado y refinado, y a través de diferentes procesos de hidrogenación (selectiva y no selectiva), asegurar la transformación de trienos no conjugados (linolénico) en dienos a fin de permitir desodorizaciones correctas, productos estables (sin problemas de "flavor reversion") y de distintas características físico-químicas, asegurando a la vez que los sistemas de hidrogenación no den lugar a conjugación apreciable de dobles enlaces y a la formación de monómeros cíclicos en el producto terminado.

Forchieri (2) en un estudio realizado sobre composición acídica de aceites de semilla de lino, analizó en su composición general, las harinas remanentes de la extracción del aceite (hexano, Soxhlet) registrando, con sólo dos excepciones, un aumento en el contenido proteico con el avance de la época de siembra (valores extremos:

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

N \times 6,25; 38,4-47,7 % b.s., mayor concentración de valores 42-45 % para 80 partidas correspondientes a distintas variedades de semilla). De acuerdo con las determinaciones efectuadas sobre una única muestra (mezcla de las 80 harinas antes obtenidas), la composición general representativa de la misma fue la siguiente: humedad 11,63; cenizas 5,46; fibra cruda 7,98; extracto en éter etílico 0,97 y nitrógeno (Kjeldahl) 5,95 % (proteína bruta 42 %) en base seca.

Estas experiencias preliminares, unidas a otras similares halladas en literatura, indicaron que la harina de semilla de lino podía ser aprovechada como fuente potencial de proteínas.

Así, el contenido proteico en semilla entera, 26-28 % b.s., se eleva a 40-48 % b.s. en la harina integral de extracción del aceite.

La presencia de principios tóxicos y antinutricionales (glicósidos cianogénicos y factor antipiridoxínico), la dificultad práctica de separación cáscara-pepa, y la cantidad significativa de mucílagos que contiene la semilla, constituyeron las razones que justificaron el aislamiento de las proteínas a partir de la harina integral residual, con destino a la alimentación humana.

Así, Bertoni y Cattáneo (4), describieron un procedimiento a escala de laboratorio para el aislamiento de las proteínas, que comprende una etapa de dispersión a pH 9,5 (NaOH) a temp. amb., seguida de precipitación a pH isoelectrico (4,0; HCl), tratamientos de purificación de las proteínas precipitadas a través de lavados acuosos a pH 4,0 y etanólicos (95 %) y finalmente secado (vacío) a 45°.

El procedimiento utilizado, a la par que eleva la concentración proteínica, elimina el residuo de hidratos de carbono insolubles, remueve los factores tóxicos, los lípidos residuales que acompañan a las proteínas en su precipitación y muy probablemente otros materiales no deseables que están presentes tanto en la semilla como en

la harina de extracción (pigmentos, taninos).

El producto obtenido presenta, una vez seco, aspecto de polvo fino, liviano, blanco, inodoro e insípido, cualidades que permitirían incorporarlo a los alimentos sin afectar su apariencia, color, sabor y aroma particulares.

Operaciones en escala macro de laboratorio permitieron obtener cantidad suficiente del "aislado" para su análisis de composición general y evaluación nutricional.

El rendimiento en aislado proteico (seco a 45°) osciló entre 22,0 y 24,5 % de harina y sus características analíticas fueron las siguientes:

Pérdida a 100° (vacío) 6,08; cenizas 0,35; nitrógeno (Kjeldahl) 12,1 (12,9 % b.s. y libre de cenizas); fósforo total (como P) 0,45 y fósforo (ácido fítico) (como P) 0,36 % (80 % del P total).

El bajo valor de nitrógeno (equivalente a aproximadamente 80 % de proteína bruta) resultó coincidente con el observado en el Centro de Investigación de Grasas y Aceites (CIGA) y con los publicados en diversos trabajos (3).

Sosulski y Bakal (5), en sus trabajos iniciales sobre proteínas aisladas de distintas semillas de oleaginosas (nabo, lino y girasol), señalaron los siguientes valores de composición general para harinas correspondientes a tres variedades de semilla de lino oleaginoso, obtenidas en condiciones suaves de extracción del aceite a fin de no dañar el valor nutritivo de sus proteínas (hexano, temp. amb.): Proteína cruda 43,1-45,5; fibra cruda 10,0-10,2; cenizas 5,9 y extracto libre de nitrógeno 38,6-40,8 % (b.s.).

Las proteínas aisladas por el procedimiento de dispersión alcalina y precipitación ácida a pH isoeléctrico, lavadas con agua y lio-

filizadas, mostraron un contenido de 11,2-12,7 % de nitrógeno (b.s.), operando con un rendimiento en "aislado" del 36,8-40,0 % (respecto de harina de extracción).

Comparativamente a los resultados logrados por Bertoni y Cattáneo (4), el mayor tenor en nitrógeno de la harina de partida (7,0 respecto de 5,9 %), condujo probablemente a un mayor rendimiento en aislado (37-40 % respecto de 22,0-24,5 %), siendo en cambio algo inferior la pureza del mismo (11,2-12,7 % respecto de 12,9-13,3 % de nitrógeno, b.s.). Sosulski relaciona este bajo contenido en nitrógeno en el aislado final, con la presencia probable de compuestos no nitrogenados en alta proporción. En razón de ese bajo valor en nitrógeno y frente al comportamiento particular del coágulo recientemente obtenido en la precipitación de proteínas (fuerte retención acuosa), Bertoni y Cattáneo consideraron la probable presencia de polisacáridos en el aislado purificado final.

A través de dos sucesivas redisoluciones (pH 10,0-10,5) y reprecipitaciones (pH 4,0), efectuadas sobre el aislado, no registraron prácticamente incremento en su contenido en nitrógeno (12,9; 13,0 y 13,3 % sobre proteínas secas a 45° - 13,4; 13,5 y 13,8 % sobre producto seco a 100°, vacío), en concordancia con lo mencionado por Smith y col. (3) en experiencias similares.

En este último producto, estimaron la concentración en hidratos de carbono totales en aproximadamente 20 % (método fenol-sulfúrico), entre los que pudieron identificar la presencia de galactosa, ramosa, xilosa, arabinosa y glucosa (previa hidrólisis, cromatografía descendente sobre papel). De las referencias de literatura surge la analogía de composición cualitativa para hidratos de carbono en el hidrolizado y los componentes del mucílago contenidos originalmente

en la semilla (11) (12) (13).

Un fraccionamiento en columna de Sephadex (medición de la absorbancia de las fracciones eluidas en UV), les permitió poner en evidencia la desigual distribución en la asociación hidratos de carbono y proteínas en el aislado final obtenido (14).

Desde el punto de vista de su evaluación nutricional, el análisis del contenido en aminoácidos esenciales de la proteína así aislada, mostró una composición equilibrada, no obstante verse limitada su calidad biológica por un bajo nivel en lisina, como surgió de su comparación con los requerimientos para la rata en crecimiento. Los valores para aminoácidos azufrados, treonina y leucina también se estimaron como subóptimos. De ahí que su valor nutritivo haya resultado inferior al de la caseína tomada como control. Las Tablas 1 y 2 agrupan el conjunto de datos logrados por Sambucetti y Sanahuja (8). La primera ilustra sobre la composición en aminoácidos esenciales, incluyendo el valor de lisina disponible del aislado antes obtenido y la segunda los valores logrados en su evaluación biológica.

Tabla 1

Contenido en aminoácidos esenciales. Aislado proteico de harina integral de semilla de lino.

	g/16 g N
lisina total	4,11
lisina disponible	3,67 (89 % de la total)
triptofano	1,30
metionina	2,32
cistina	1,46
fenilalanina	4,47
tirosina	2,39
leucina	5,28
isoleucina	6,09
valina	4,95
treonina	3,33

Tabla 2Valor nutritivo de la proteina aislada de harina integral de semilla de lino.

Relación de Eficacia Proteica (REP)	1,76 (caseina 2,5)
Utilización Proteica Neta (UPN ₁₀)	57,80 ± 3,80 (^)
Utilización Proteica Neta "standard" (UPN _{st})	61,10 ± 4,50 (^^)
Digestibilidad (D)	91,12 ± 4,00
Valor Biológico (VB)	63,4

(^)- Media ± desviación standard de la media.

(^^)- Valor calculado con la media de la UPN_{op10} según la fórmula

$$\frac{UPN_{op} \times 54}{54 - P} - 8$$

En lo referente a inocuidad, las observaciones realizadas (8) no evidenciaron signos de daño patológico a excepción de una ligera infiltración grasa en hígado, ni se manifestaron síntomas de mal funcionamiento en los parámetros analizados, dentro del término de la experiencia (4 semanas). No obstante, cabe señalar que en este aspecto, se requieren ensayos de toxicidad de mayor duración a fin de considerar su incorporación a formulaciones para la alimentación humana.

Continuando sus estudios previos sobre composición de harinas y aislados proteínicos de semillas de oleaginosas, Sosulski y Sarwar (6) encararon el aspecto nutricional de los mismos. De la comparación de valores individuales de los aminoácidos esenciales hallados para harina y aislado de lino y caseina (procedimiento Spackman, analizador automático), tanto la harina como el aislado resultaron muy deficientes en lisina, como puede observarse en la Tabla 3. Los autores señalaron, además, un alto nivel en el aminoácido no esencial ácido glutámico y en arginina respecto de los de caseina tomada como referencia.

Tabla 3

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 aquéllas de la de referencia (proteína de huevo).

Como puede observarse, el valor del "score" resultó inferior en el aislado que en la harina de partida (82 a 61), hecho que los autores atribuyeron a la pérdida de lisina durante el proceso de aislamiento de las proteínas.

Por otra parte, Sarwar, Sosulski y Bell (7) en forma práctica-

mente simultánea con el trabajo anteriormente mencionado, publicaron los resultados de una nueva serie de experiencias de índole nutricional, así como el estudio de la composición general de la harina y aislado proteico de semilla de lino. En las Tablas 4 y 5 se agrupan algunos valores logrados en dicho estudio, facilitando así la comparación de los mismos.

Tabla 4

Composición general e Índice de aminoácidos esenciales para caseína y proteínas de la harina y "aislado" de semilla de lino.

<u>Fuente</u>	<u>N(%)</u>	<u>Proteína cruda(%)</u> (Nx6,25)	<u>Fibra</u> <u>cruda</u> (%)	<u>Cenizas</u> (%)	<u>EAA</u> (mg/gN)	<u>IEAA</u>	<u>Score</u> <u>prot.</u>
caseína	15,1	94,3	-	0,2	1,3	3553	78 61
harina de lino	8,3	50,2	44,2	7,4	5,7	2866	71 63
aislado proteico de lino	13,6	84,9	74,7	0,4	2,1	2999	77 49

Tabla 5

Valor nutritivo de las proteínas de la harina y del "aislado" de semilla de lino, respecto del de caseína.

<u>Fuente de proteína</u>	<u>REP</u> (Nx6,25)	<u>REP</u> (Nx5,5)	<u>Digestibilidad</u> <u>aparente (%)</u>	<u>Valor Biológico</u> <u>aparente (%)</u>
caseína	1,89	-	84,4	30
harina de lino	1,53	1,74	72,2	32
"aislado" de lino	1,75	1,99	84,0	29

La interpretación dada por los autores al conjunto de valores

consignados y su interrelación, les llevó a las siguientes conclusiones:

La REP para el aislado de lino fue comparable a la de la caseína y cuando fue calculada en base al factor 5,5 de conversión de nitrógeno en proteína, resultó superior al valor del control.

Los coeficientes de digestibilidad para la harina y el aislado fueron inferiores al del control y ello conduce a una elevación en el dato del Valor Biológico, especialmente para la proteína de la harina. El coeficiente de correlación positivo entre el "Score" de la proteína y su Valor Biológico fue altamente significativo.

Al igual que en el trabajo precedente (6), los valores de aminoácidos esenciales totales (EAA) y de índice de aminoácidos esenciales (IEAA) mostraron deficiencia en lisina frente a caseína. En el aislado mejoró el contenido en aminoácidos esenciales totales y su índice, pero debido a pérdidas de lisina, el "Score" de la proteína se vio afectado seriamente.

En base a los resultados ya expuestos al comienzo de este ítem, y a los datos anteriores, cabría en este momento considerar los mecanismos disponibles para el mejoramiento de la calidad proteínica del lino.

Las deficiencias antes mencionadas, no significan que la proteína en estudio no pueda ser de utilidad potencial para los fines propuestos, particularmente si se tiene en cuenta que muy pocas dietas de consumo corriente están formadas por una sola fuente proteica. Por otra parte, desde el punto de vista de la nutrición animal, la mayoría de las proteínas vegetales son deficientes en uno o más aminoácidos esenciales. El éxito en la obtención de una dieta o un producto mixto de mayor valor nutritivo se centraliza en la habilidad de corregir parcial o totalmente el patrón deficiente de aminoácidos

en una proteína dada, con otra u otras que tengan un patrón de aminoácidos capaz de corregir esas deficiencias; o mediante la adición de aminoácidos puros o por la combinación de ambas alternativas.

El valor biológico de la proteína de lino es entonces susceptible de mejorar, ya sea suplementándola con los aminoácidos esenciales en los cuales muestra deficiencia, o bien por la mezcla con otra proteína, que sea buena fuente de ellos. Desde un punto de vista práctico y particularmente en el caso del "aislado proteico" de semilla de lino (bajo nivel de proteína), la adición de cantidades adecuadas de una fuente rica en proteína de alto valor biológico tendría la ventaja de corregir no sólo las deficiencias mencionadas sino de incrementar el contenido proteico de la mezcla final.

De la información existente, surge que de todos los caminos para mejorar proteínas de bajo valor biológico, aquél de la suplementación con cantidades convenientes de concentrados o aislados proteínicos vegetales, o de proteínas animales, es el que permitiría utilizarla con mayor eficiencia. Estos métodos han sido ensayados extensivamente en la suplementación de proteínas de cereales y de otras proteínas vegetales de valor biológico bajo o relativamente bajo, en áreas donde la desnutrición proteínica infantil constituye un problema, y donde generalmente no está disponible una fuente altamente satisfactoria como la leche.

La justificación de mayor peso de la suplementación, reside en su potencial para beneficiar en relativamente corto tiempo, a la mayor parte de la población que padece de desnutrición proteínica, por medio del mejoramiento del alimento o alimentos que son de mayor consumo.

Desde este ángulo nutricional, existen grandes posibilidades de obtener mezclas muy superiores a los materiales de partida (hari-

nas, concentrados, aislados) provenientes de fuentes vegetales (15) (16) (17) (18) (19) (20).

Numerosos estudios experimentales realizados tanto en humanos como en animales, han demostrado la utilidad de un gran número de materiales en la suplementación de la cantidad y calidad de proteínas de bajo valor biológico (particularmente cereales) y los productos elaborados con ellas (panes, bizcochos, galletas). Estos materiales pueden clasificarse en cuatro categorías:

a)- Concentrados proteínicos de origen animal: harina de pescado, leche entera o descremada, caseína, proteína de huevo, harinas de carne, de carne y hueso, de sangre, etc..

b)- Concentrados proteínicos de origen vegetal: harinas de semillas de leguminosas, subproductos de semillas de oleaginosas, levaduras y germen de cereales.

c)- Aislados proteínicos: principalmente los derivados de semillas de leguminosas, oleaginosas y de hojas.

d)- Aminoácidos esenciales puros, particularmente lisina y metionina que son los más accesibles comercialmente por su menor costo.

Es concepto básico y ampliamente reconocido que el valor biológico de las proteínas depende del contenido, disponibilidad y balance de sus aminoácidos esenciales. De ahí que en todo programa de suplementación es esencial el conocimiento de la composición aminoacídica de las fuentes a utilizar.

Dado que en literatura no existen antecedentes de suplementación de proteína de lino, sólo a título de ejemplo comparativo, se mencionarán los ensayos exitosos de suplementación de proteínas de maní, que también presenta deficiencias en lisina y treonina como la proteína de lino (21), aunque en este caso particular también hay

deficiencia de azufrados.

Como otras semillas de oleaginosas y, al igual que el lino, requiere condiciones óptimas de industrialización (tratamientos no drásticos en la separación del aceite) para rendir una harina de alta calidad nutricional. El valor biológico de las proteínas de la harina se ve incrementado notablemente en mezclas con leche descremada, como lo evidenciaron las condiciones clínicas de niños desnutridos con los que se realizó la prueba. En ensayos biológicos con ratas, también las mezclas del "aislado proteico" obtenido de la harina, con leche descremada no fueron inferiores a la leche descremada sola tomada como referencia, siendo el aislado por sí mismo, menos efectivo.

Estos resultados se confirmaron en el tratamiento de niños con desnutrición grave, alimentados con mezclas de aislado proteico de maní y leche descremada. La suplementación con caseína en vez de leche descremada, también mostró resultados satisfactorios (22).

Las experiencias que se comentan permitieron suponer como factible la suplementación satisfactoria del aislado proteico de lino con caseína industrial. La utilización de esta última a los fines propuestos ofrece características favorables, no sólo desde el punto de vista nutricional, sino económico, en razón de incrementar el aprovechamiento práctico y más eficiente de subproductos lácteos. Consecuentemente se estimularía también la economía de industrias afines.

3)- Caseína industrial. Obtención. Composición. Valor nutritivo.

Es propósito de este trabajo, considerar dentro de los antecedentes, las características químico-nutricionales de la caseína y su efecto suplementario al utilizarla con otras fuentes de proteína de uso corriente. A este respecto y en la actualidad, esas características se encuentran bien definidas en base a los numerosos estudios de

que ha sido objeto.

Desde el punto de vista tecnológico, la caseína se obtiene a partir de leche descremada (subproducto de mantequeras), mediante precipitación por acidificación o por el uso de renina. Las formas de acidificación pueden variar: producción bacteriana de ácido láctico a partir de lactosa en el seno de la leche descremada o adición de ácido clorhídrico o sulfúrico. En todos los casos, después de lavados acuosos, el producto es drenado y secado. Es esencial un secado rápido a baja temperatura para obtener un producto de color claro (45-55°).

La composición de la caseína diferirá según el procedimiento utilizado en su fabricación (tipo y condiciones de precipitación y lavado del coágulo). Así, el procedimiento de precipitar por acidificación conduce a caseínas con menores tenores en calcio comparativamente a las logradas con renina; el número y tiempo de contacto en los lavados acuosos reduce en mayor o menor medida el contenido en lactosa retenido por el precipitado (23); la acidificación (clorhídrico o sulfúrico) del agua de lavado influye en el contenido en cenizas y particularmente en el de calcio y en las propiedades físicas de la caseína final, al igual que el valor de pH de precipitación elegido y la temperatura de operación (24).

De ahí que no sea factible ofrecer un análisis típico o promedio de composición general de caseínas comerciales, pues los valores presentan amplia variación sobre todo si se tiene en cuenta la falta de uniformidad en los métodos de valoración.

En forma general y cubriendo prácticamente los diferentes tipos de caseínas industriales, el % de humedad oscila entre 6 y 10, el de grasa entre 0,7 y 2,0 y el de cenizas entre 2,5 y 8,3. Es en esta última donde se registran las mayores variaciones. La precipitación de

caseína por acidificación bacteriana (bacterias lácticas, pH de precipitación aprox. 4,6) conduce a productos finales que contienen entre 2,5 y 4,5 % de cenizas totales, mientras que la caseína obtenida por acidificación con ácidos clorhídrico o sulfúrico (pH aprox. 4,5-4,6) registra contenidos del orden de 3,0-3,5 % y la precipitada por ácido en condiciones especiales (ácidos clorhídrico o sulfúrico, pH 4,1 y temp. mayor de 35°), un nivel significativamente menor 1,9 a 3,0 %, siendo su textura granular ("grain-curd"). Bajo la influencia de la concentración acídica creciente, el fosfato de calcio se disocia en forma progresiva del complejo con caseína.

La caseína de renina contiene entre 7,0 y 8,3 % de cenizas (25); y suele considerarse como requerimiento razonable un contenido de aprox. 7,5 % (26). Este valor comparativamente alto frente a caseínas de otros orígenes se atribuye a que está constituida fundamentalmente por caseinato de calcio.

El método de precipitación por renina se usa casi exclusivamente para producir caseína para manufactura de plásticos, ya que este producto presenta propiedades que se consideran esenciales para tal fin, las que aparentemente están relacionadas con su elevado contenido en cenizas. Las caseínas obtenidas por precipitación ácida se destinan para otros usos comerciales, donde son importantes las propiedades adhesivas (en adhesivos, como agente dispersante en insecticidas, etc.).

La preparación de caseína para propósitos de investigación y uso analítico, requiere mayores cuidados a fin de no exponerla a altas concentraciones de iones hidroxilo o hidrógeno en razón del riesgo de racemización o hidrólisis bajo esas condiciones.

En líneas generales, la caseína se precipita a partir de leche

descremada diluida, por adición de ácido acético o clorhídrico diluidos, se redisuelve en agua que contiene la mínima cantidad de álcali necesaria para solubilizarla, se filtra para remover sustancias insolubles, reprecipita con ácido diluido y finalmente lava con agua. Luego es triturada con etanol absoluto, tratada con éter y finalmente secada sobre ácido sulfúrico a presión reducida o sobre cloruro de calcio a presión atmosférica.

La caseína así obtenida contiene alrededor de 0,85 % de fósforo (1,95 % P_2O_5). En otros procedimientos, se describe la remoción de calcio por medio de oxalato de potasio agregado a la leche desnatada antes de la precipitación de la caseína o la filtración de caseína solubilizada a pH 6,3 para separar caseinato y fosfato de calcio, antes de precipitarla. Los autores de estos métodos sostienen que la caseína así purificada contiene un nivel de fósforo algo inferior a 0,85 % (25).

En la precipitación de caseína a pH 4,1 ("grain-curd", comercial); los lavados del coágulo con agua ligeramente acidulada, remueven todo el calcio que excede del 0,20 % (expresado como OCa) y todo el P_2O_5 que sobrepasa el 1,81 (0,79 % P). Para la mayoría de los propósitos, esa pequeña proporción de cenizas remanentes (menos de 0,50 %) no se considera objeccionable (25).

La caseína es el principal componente proteico en la fase dispersa de la leche, existiendo como partículas de tamaño macromolecular (micelas) formadas esencialmente por caseinato de calcio, fosfato de calcio e iones magnesio y citrato. El resto de la caseína está presente como caseína soluble en la fase solución y la distribución relativa de las caseínas en los estados micelar o soluble es una función de la temperatura, pH y fuerza iónica del medio (27).

Aunque la caseína es heterogénea y es correcto hablar de "caseína

nas" de la leche, el simple término "caseína" se usa corrientemente por conveniencia práctica. En forma similar, los términos "albúmina" y "globulina" se usan para las proteínas del suero, aunque éstas al igual que la "caseína" no están constituidas por una sola proteína.

Los más recientes análisis de constitución de "caseína" llevados a cabo sobre numerosas muestras de leche, la presentan como una mezcla de extraordinaria complejidad. Posiblemente el mejor cuadro de tal complejidad surja de los fraccionamientos logrados por métodos electroforéticos. A título de ejemplo, los estudios de Seitov y Zhumashev (28) sobre composición en proteínas de caseína total de leche de vaca, revelaron quince fracciones designadas $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4, \alpha_5, \alpha_6, K_2, K_0, K_1, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \delta_1, \delta_2$ y δ_3 . Las subfracciones α -caseínas constituyen el 41,9 % de la "caseína" total, siendo predominantes las α_1 y α_2 (9,9 y 24,4 % resp.). Las K-caseínas forman el 27 % de la caseína total, con un 12,5 y 10 % de las subfracciones K_2 y K_1 respecto del total. A la fracción δ correspondió sólo el 1,8 % de la caseína total y dicha proporción resultó variable para diferentes muestras de leche.

Factores zootécnicos revelaron diferencias en aminoácidos sólo en aspectos cuantitativos para las distintas proteínas (27) (29).

En forma general, "caseína" es el grupo heterogéneo de fosfoproteínas precipitadas de la leche descremada en el entorno de pH 4,6.

La caseína ha sido ampliamente usada en el desarrollo de métodos para el análisis cuantitativo de aminoácidos de proteínas. Una compilación de datos de determinaciones de aminoácidos registrados por distintos investigadores sobre caseína y sus fracciones clásicas (α, β, δ caseínas) puede verse en la Tabla 6 (25).

Tabla 6

Composición en aminoácidos de caseína y sus fracciones (g/100 g prot.)

<u>Componente</u>	<u>caseína</u> (a)	<u>α-caseína</u> (a,b)	<u>β-caseína</u> (a)	<u>γ-caseína</u> (c)
N total	15,63	15,53	15,33	15,40
P total	0,86	0,99	0,61	0,11
S total	0,78	0,72	0,86	1,03
glicina	2,0	2,3	1,6	1,5
alanina	3,2	3,8	2,0	2,3
valina	7,2	6,3	10,2	10,5
leucina	9,2	7,9	11,6	12,0
isoleucina	6,1	6,4	5,5	4,4
prolina	10,6	7,5	15,1	17,0
fenilalanina	5,0	4,6	5,8	5,8
tirosina	6,3	8,1	3,2	3,7
triptofano	1,7	2,2	0,83	1,2
serina	6,3	6,3	6,8	5,5
treonina	4,9	4,9	5,1	4,4
cistina + cisteína	0,34	0,43	0,0	0,0
metionina	2,8(d)1,94(e)	2,5	3,4	4,1
arginina	4,1	4,3	3,4	1,9
histidina	3,1	2,9	3,1	3,7
lisina	8,2	8,9	6,5	6,2
ácido aspártico	7,1	8,4	4,9	4,0
ácido glutámico	22,4	22,5	23,2	22,9
N amida	1,6	1,6	1,6	1,6

(a)- Resultados analíticos Gordon y col., J. Am. Chem. Soc., 72, 4282 (1950); 75, 1678 (1953) y 71, 3293 (1949).

(b)- Resultados reportados por Hipp y col., Arch. Biochem. Biophys., 94, 35 (1961).

(c)- Resultados reportados por Gordon y col., J. Biol. Chem., 236, 2908 (1961) y por Piez y col., J. Biol. Chem., 236, 2912 (1961)

(d)- Valor similar (2,86) hallado por Ch. Ivanov y col., Anal. Chim. Acta, 30, 549 (1964).

(e)- Valor reportado por H. Mikulowska y W. Slowinski, Prace Inst. Lab. Badawczych Przemyslu Spozywczego, 13, 133 (1963); C.A., 60:16198c.

El contenido en azufre total de caseína (0,78%) está localizado en los aminoácidos metionina de todas sus fracciones y el resto en cistina y cisteína de la fracción α -caseína (más específicamente en la fracción K-caseína, obtenida a su vez del fraccionamiento de α -caseína). Cuando se fraccionó la "caseína" se halló que la α -caseína contenía toda la cisteína.

El fósforo aparece en las caseínas en mayor grado en las fracciones α y β . Se sostiene que se encuentra como éster o-monofosfato unido a los grupos HO de los restos serina (25) (30). Esta agrupación fosfato es muy importante para la unión de iones calcio y participa en la formación de las micelas de caseína. La relativa constancia en la composición de la mezcla de proteínas que constituyen la "caseína" es notable y muy probablemente refleja la fuerza de las uniones que mantienen ligadas dichas fracciones bajo condiciones ordinarias.

Los niveles de triptófano y lisina son particularmente importantes, pues estos aminoácidos son limitantes en harinas y productos a base de harinas. De ahí que la leche y por consiguiente la caseína, sean excelentes fuentes para la suplementación nutricional de productos a base de cereales.

La presencia de pequeñas cantidades de hidratos de carbono en caseína ha sido detectada por varios investigadores. Están localizados en su mayor parte en la fracción α -caseína y más particularmente en la porción K-caseína. Consisten principalmente de hexosa, hexosamina y ácido acetilneuramínico (ácido siálico).

Las micelas de caseína en la leche se encuentran altamente solvatadas y retienen grandes cantidades de agua. Se sugiere que la concentración total de calcio, fosfato y la presencia de hidratos de carbono, tengan importancia en la regulación de ese nivel de solvatación. Esta propiedad resulta de interés para la industria papadera desde

que las micelas actuarían como reservorios de agua necesaria para una mayor gelatinización térmica del almidón. Las micelas de caseína reconstituida no alcanzan los niveles de hidratación de las naturales (27) (30).

Invariablemente, pequeñas cantidades de materiales lipídicos aparecen en leche descremada desecada y en caseína. Se sugiere que estos lípidos puedan ejercer influencia sobre las propiedades de la masa en panificación, a la par que ser fuente de "off-flavors" por oxidación. Se considera también la probable contribución de dichos lípidos, como la de los hidratos de carbono antes mencionados junto a la lactosa, en los fenómenos de pardeo no enzimático ("browning") vía reacción de Maillard durante la etapa de horneado en panificación.

Desde el punto de vista conformacional, se compara a la caseína nativa con una proteína desnaturalizada. Mediciones de rotación óptica y de otras propiedades físicas sugieren una configuración desordenada para la fracción α -caseína. El elevado contenido en prolina parece ser suficiente para prevenir la formación helicoidal. Esta configuración es ventajosa desde el punto de vista nutricional, pues la hace particularmente susceptible a la digestión proteolítica, sin desnaturalización preliminar (25) (27) (30).

Abundante información bibliográfica indica que la proteína de leche es fuente excelente para la prevención, tratamiento y cura de la desnutrición proteínica. Más aún, en razón de su alta y eficiente utilización, la caseína ha sido y es utilizada como proteína de referencia en la evaluación de la calidad nutricional de proteínas de otras fuentes de origen animal o vegetal (22).

También los hidrolizados de caseína preparados por tratamiento ácido o enzimático, complementados adecuadamente con calorías, han

dado resultados altamente satisfactorios en la recuperación de niños desnutridos.

Por otra parte, si se compara la combinación de aminoácidos esenciales de las proteínas de la leche, al igual que la de la caseína con la de proteína del huevo, resultan deficientes en aminoácidos azufrados (31). En ensayos de alimentación de animales de experimentación (ratas; estudios de niveles de aminoácidos en sangre) para la determinación de aminoácidos limitantes, la caseína y sus hidrolizados revelaron deficiencia de azufrados (metionina+cistina) (32) (33).

Aun teniendo en cuenta que los valores reportados de cómputo químico y de Utilización Proteica Neta (UPN) están sujetos a variabilidad metodológica y biológica, los siguientes datos consignados en el Informe FAO Nº 52 (1973) (Cuadro 22) (34) revelan una consistente concordancia con el concepto general de que el contenido en aminoácidos esenciales es factor preponderante en determinar la calidad de la proteína; Tabla 7.

Tabla 7

Valores de cómputo químico y de UPN de las proteínas de leche.

<u>Proteína</u>	<u>Cómputo químico,</u> de acuerdo al pa- trón de referencia FAO (30).	% de energía	<u>UPN</u>		<u>UPNop 10%</u> (ratas)
			de la pro- teína		
		2-3	4-5	6-7	8-10
huevo entero	100	87	-	-	94
leche humana	100	95	85	95	87
leche de vaca	95	81	79	81	74

Jekat y Kofranyi (35) en ensayos de largo término de balanceo nitrogenado con humanos, tomando el Valor Biológico de la proteína de huevo como referencia (VB: 100), hallaron para las proteínas de

leche un VB de 80 y para caseína de 72.

Arakawa y col (36), en experiencias realizadas con ratas alimentadas con dietas conteniendo 8 % de caseína, registraron valores del orden de 59 y 71 para UPN y VB respectivamente.

Ogino y Chen (37) por su parte, alimentando carpas con dietas conteniendo distintas proteínas al nivel del 10 %, obtuvieron el valor más alto para proteína de yema de huevo (VB: 89), siguiéndole caseína con un valor de 80.

Delaney y col. (38), en un estudio sobre composición y valor nutricional de la biomasa de Saccharomyces fragilis hallaron un valor de UPN de $75,3 \pm 3,0$ para ^{la} caseína utilizada como control.

Durante estos últimos años, la tendencia predominante es el desarrollo de fórmulas mixtas de alimentos que contienen cereales, harinas o proteínas aisladas de oleaginosas y de otras fuentes vegetales no convencionales suplementadas con concentrados ricos en proteínas de alto valor biológico (harinas de pescado, caseína, leche descremada, etc.), con aparentemente buenos resultados en la mayoría de los casos. El efecto benéfico de estos suplementos generalmente correlaciona con las cantidades y disponibilidades de los aminoácidos esenciales en que son deficitarias las proteínas a mejorar, y con la concentración proteica de los propios suplementos.

Son ejemplos concluyentes la suplementación de harina de algodón con harina de pescado, caseína, o leche descremada como fuentes de lisina (39) y la corrección del valor nutritivo de arroz con distintos concentrados proteicos (harina de semilla de algodón, harina de soja, harina de pescado, leche descremada, caseína, y levadura torula) donde la caseína resultó ser el mejor suplemento (40).

Otra observación de importancia, es que la calidad nutricional de dietas basadas en la combinación adecuada de una proteína vegetal (harina o aislado) y leche descremada y/o caseína, resultan tan buenas como dietas basadas exclusivamente en proteínas de leche (41). En muchos casos se suelen enriquecer con agregado de sales de calcio (42).

Solomon y Ferguson (43) describen un proceso continuo en el que utilizan cloruro de calcio como agente precipitante de las proteínas de leche, obteniendo un producto enriquecido en calcio que tiene uso como suplemento en alimentos para humanos y animales.

Algunos procedimientos interesantes (44) incluyen el agregado, a soluciones o suspensiones de caseína, de sustancias termoestabilizantes como polisacáridos (preferentemente ácido poligalacturónico, galactanos y arabinos) y otras proteínas (preferentemente proteínas coagulables como las del suero de la leche). Estos concentrados son precipitados llevando la mezcla a pH adecuado, con agregado de solución de cloruro de calcio, separando el precipitado de la fase líquida por enfriamiento brusco. Para el secado final se procede por métodos corrientes. Se obtienen así concentrados de proteínas termoestables sobre la base de caseína, prácticamente sin gusto particular y aptas para la suplementación proteínica de otros alimentos. Contribuye también a la utilización de las reservas de proteínas de alto valor nutritivo contenidas en subproductos de la industria lechera.

4)- Ensayos de suplementación por coprecipitación de proteínas vegetales con caseína. Antecedentes.

La revisión bibliográfica disponible no revela ningún caso de estudio de suplementación de concentrados proteínicos obtenidos de

semilla de lino por coprecipitación con proteínas de origen animal o vegetal. Sólo se hace mención de una investigación (45) (patente) orientada en el sentido de mejorar el rendimiento y características físicas de las proteínas de soja con caseína, aprovechando la etapa de extracción de las proteínas de soja para incorporar la caseína (solubilizada previamente en medio alcalino o como tal), precipitarlas conjuntamente, lavar el coágulo obtenido y finalmente secarlo.

El método de preparación consiste sumariamente en extraer las proteínas de la soja desengrasada (harina) con agua o solución alcalina (hidróxido de sodio 0,06 %) o solución salina (cloruro de sodio 5 %) y en dicha solución incorporar la caseína tal cual (si se utilizó medio alcalino para la extracción) o agregarla solubilizada previamente (como sal de sodio, amonio, etc.) en los otros casos. Se coprecipitan mediante el uso de ácido clorhídrico a pH 4,5 - 4,6 (máximo de precipitación). Se separa el precipitado a través de tela (100 mallas) y lava finalmente con agua.

La presencia de caseína facilita una mejor separación de las proteínas de soja, en el sentido de un aumento sustancial en el rendimiento (42 % en la precipitación de proteína de soja sola y 80 % en la coprecipitación, respecto del total de proteínas extraídas), que los autores atribuyen a la acción aglomerante de las partículas de caseína al precipitar.

Consideran las ventajas del lavado acuoso del coágulo a fin de eliminar factores antinutricionales de la soja y sabores característicos desagradables de ambas fuentes proteicas.

El precipitado separado y lavado, como tal (conservado por congelación) o deshidratado, o solubilizado en medio básico, tiene utilidad en la preparación de alimentos para el hombre y animales.

El secado (spray o secador al vacío) aplicado al producto final previamente solubilizado en medio alcalino (carbonatos o hidróxidos de sodio o amonio) o adicionado de azúcares o sales de ácido fosfórico polimerizado, conduce a productos que se redisuelven fácilmente en agua. El secado del coágulo lavado, tal cual se obtiene en la coprecipitación, conduce a productos que sólo se suspenden en agua pero que son solubles en medio alcalino.

Una variante estudiada por los autores en el procedimiento antes descrito, consiste en el calentamiento (90°, 10 min.) de la solución que contiene ambas proteínas antes de la coprecipitación (medio alcalino), seguido de enfriamiento y coprecipitación por ácido a pH 4,6.

Ese calentamiento previo ocasiona un aumento notable en la viscosidad de la solución, que no^{se} observa en el extracto proteico de soja sola y que finalmente conduce a un coágulo poco soluble en medio alcalino.

La característica señalada resulta interesante para su aplicación en la elaboración de alimentos congelados, de confitería, pastelería, productos cárneos, panadería y otros.

De los datos mencionados en los diferentes ensayos de este trabajo, surge como más aconsejable el siguiente rango de proporciones en los materiales a coprecipitar: 30 - 60 kg de caseína o caseinato, 1000 l de extracto de proteína de soja obtenido a partir de 100 kg de harina de soja desgrasada.

Como aclaración adicional a este proyecto mencionado es necesario destacar que los autores no abordaron el aspecto nutricional del producto mixto obtenido. Apparently su interés se ha radicado

en los mejores rendimientos y características físicas, organolépticas y de aplicación de los productos obtenidos según las variantes aplicadas a un procedimiento general de coprecipitación.

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 separación del aceite, como materia prima para la obtención del "aislado proteico" y se ha hecho referencia a la calidad nutricional de sus proteínas.

En el presente trabajo se ha encarado la suplementación por coprecipitación de dichas proteínas (deficientes primariamente en lisina) con cantidades crecientes de una proteína rica en dicho aminoácido (caseína industrial) a fin de obtener "aislados mixtos" homogéneos.

Se han considerado los exámenes de composición general de los materiales de partida (harina de lino residual de extracción y caseína clorhídrica comercial de buena calidad), incluyendo la evaluación de lisina disponible de ambas fuentes a fin de calcular, en primera aproximación, los porcentajes de caseína a agregar para el logro de un máximo incremento en el valor nutricional del "aislado mixto" a obtener.

Como complemento de estos estudios se ha contemplado la determinación de la Utilización Proteica Neta (UPN). Digestibilidad (D) y valoración de lisina disponible de los distintos "aislados mixtos" obtenidos, con el objeto de comparar en tales aspectos nutricionales el efecto de la incorporación de cantidades crecientes de caseína a la proteína de lino, respecto de la de lino sin suplementar.

Si bien existen en literatura antecedentes acerca del mejoramiento de la calidad de proteínas de origen vegetal por agregado, (mezcla directa o por coprecipitación) de caseína o de leche descremada, no existe información hasta el presente con relación a proteína de lino.

Los resultados satisfactorios que se adelantan en este trabajo, se espera podrán ser de utilidad en el futuro con el fin de encontrar mejores usos para los subproductos considerados y otros similares con destino a la alimentación humana y/o animal.

A este respecto resulta de interés hacer notar que dentro del rubro elaboración de productos lácteos argentinos, la caseína muestra un descenso en la producción, respecto de dos años atrás, del 50 % (1972: 12.169 ton y 1974: 6.984 ton, habiendo pasado por un máximo en 1956 de 41.024 ton). Este hecho provocó grandes bajas en el campo de la exportación. Así en 1956 se exportaron 33.300 ton, frente a cifras del orden de 4.300 correspondientes a 1974 (^).

B)- Plan de trabajo y su discusión.

Se dispuso el siguiente orden de trabajo:

- 1)- Estudiar la composición general de los materiales de partida: harina de semilla de lino (hexano) y caseína clorhídrica comercial.
- 2)- Conocidas las condiciones óptimas de máxima dispersión (medio acuoso alcalino, HONa) y de máxima precipitación (medio ácido, HCl) de proteínas de harina integral de lino (trabajos previos llevados a cabo en este laboratorio), obtener proteínas aisladas de la harina

(^)- Memoria, Ejercicio Nº 56 - 1974 - 1975, Centro de la Industria Lechera, Bs. As., Argentina.

de lino de la presente partida (escala macro de laboratorio) a fin de estudiar sus características químicas y nutricionales.

Estudiar similarmente las condiciones para redispersar y precipitar la caseína comercial (pH óptimo de dispersión y de máxima precipitación) y efectuar un balance de la distribución del nitrógeno total contenido en la caseína comercial de partida a través del proceso de su aislamiento, purificación y secado final.

Obtener el aislado proteico purificado a partir de caseína comercial, en cantidad suficiente con destino a su evaluación nutricional y determinación de características químicas.

3)- Resolver, a escala de laboratorio las condiciones de coprecipitación de proteínas de lino y de caseína (incorporación de la caseína, pH de máxima coprecipitación, purificación del coágulo por lavados y secado final). En base a cálculos previos (lisina disponible) considerar los distintos porcentajes de caseína a incorporar a las proteínas de lino dispersas en medio acuoso alcalino, a fin de obtener por coprecipitación, una serie de "aislados mixtos" con concentraciones crecientes en caseína hasta lograr aquél de valor nutricional máximo o similar al de la caseína sola.

4)- Elegidas las técnicas adecuadas, proceder a su adaptación en escala macro (de laboratorio) a fin de disponer cantidades suficientes de "aislados" para efectuar ensayos de valor nutricional y de digestibilidad con animales de experimentación, la evaluación de nitrógeno total, pérdida a 100° (vacío), lisina disponible y la comparación de los valores logrados. Paralelamente la obtención en escala macro permitirá tener idea del rendimiento en "aislados proteicos".

5)- La determinación con fines comparativos, de los contenidos en cenizas, fósforo total y de ácido fítico e hidratos de carbono asociados a las proteínas de los respectivos aislados.

1)- Estudio de la composición general de los materiales de partida: harina de semilla de lino (hexano) y caseína clorhídrica comercial de buena calidad.

Con los detalles que figuran en la Parte Experimental se determinaron los contenidos de humedad, cenizas, nitrógeno total, fibra cruda y extracto graso que figuran en la Tabla 8.

Los valores observados para la harina de lino se han encontrado acordes con los correspondientes a los señalados en trabajos previos (4) (14): humedad 11,63, cenizas 5,46, fibra cruda 7,98, extracto en éter etílico 0,97 y nitrógeno total (Kjeldahl) 5,95 % sobre harina tal cual. También presentaron concordancia con los registrados por Sosulski y Bakal (5): cenizas 5,90, nitrógeno total 6,87 y fibra cruda 10,10 % en base seca y por Sarwar, Sosulski y Bell (7): cenizas 5,70, nitrógeno total 8,03 y fibra cruda 7,40 % en base seca, ambos sobre harina integral. El alto valor encontrado en este último caso para nitrógeno total, corresponde a la harina integral proveniente de una variedad de semilla de lino (Redwing) de alto nivel en nitrógeno.

El examen de composición de la caseína clorhídrica comercial utilizada en este trabajo registró un contenido en cenizas comprendido en el ámbito mencionado en literatura (25) para caseína comercial obtenida por precipitación ácida (3,3 - 5,5 % b.s.), siendo no obstante su contenido en nitrógeno y por tanto en proteína (14.7 % b.s. y libre de cenizas; $N \times 6,38 = 93,8 \%$) superior al máximo valor señalado para productos comerciales corrientes (76 - 86 %). En tal sentido, encuadra en las especificaciones que se recomiendan para caseínas de buena calidad o productos de mayor aceptación (26) que además de presentar un color crema claro y olor suave agradable, responderán a un

Tabla 8

Características analíticas de la harina integral de semilla de lino y de la caseína comercial (1).

	<u>humedad</u> (%)	<u>cenizas</u> (%)	<u>nitrógeno</u> <u>total</u> (%)	<u>proteína cruda</u> (%) (Nx 6,25)	<u>extracto</u> <u>graso</u> (%)	<u>fibra</u> <u>cruda</u> (%)
	b.t.c.	b.s.	b.t.c.	b.s.y l.c.	b.t.c.	b.s. b.t.c. b.s.
<u>harina integral</u>	10,26	5,20	5,99	41,69	44,28	0,97
<u>semilla de lino</u> (hexano)	8,74	3,93	4,31	12,58	14,08	88,00
<u>caseína comercial</u> (1)	8,74	3,93	4,31	12,58	14,08	88,00
						(1) < 1,0
						< 1,0

						0,97
						8,58
						9,56

(1) - caseína clorhídrica comercial, de buena calidad, remolida en laboratorio.

(1) - (Nx 6,38) = 93,8 b.s. y libre de cenizas.

contenido de humedad menor del 10,0 %, del 1 % de grasa (b.s.), de 4,0 % de cenizas (b.s.) y de 14,25 % de nitrógeno ($N \times 6,38 = 91$ % prot. en b.s., libre de cenizas y de grasa).

Los valores de nitrógeno superiores a 15 % ($N \times 6,38 > 95$ %) se dan en caseinas para propósitos analíticos, en las cuales el contenido en cenizas es inferior a los mencionados anteriormente. Así, Whitter y Webb (26) señalan un contenido de 15,51 % de nitrógeno (b.s. y libre de cenizas) para caseina pura.

Las características organolépticas de la caseina comercial utilizada también se consideraron aceptables: color crema y olor suave característico.

Con el propósito de dar una idea de la granulometría típica resultante de la molienda (molinillo para café, en laboratorio) de los materiales de partida, se llevó a cabo una clasificación por tamaño de las partículas por medio de tamices (ASTM), consignando finalmente el % en peso de las fracciones retenidas en las distintas mallas. (Tabla 9).

Tabla 9

Características físicas de los materiales de partida.

	<u>Granulometría (%)</u>				<u>Color</u>	
	Nº abertura/pulgada lineal	62	85	100		Plato
	ASTM (μ)	250	177	149		
<u>harina integral de lino</u>		42,6	48,0	8,8	0,6	blanco parduzco
<u>caseina clorhídrica comercial</u>		56,9	13,5	3,9	15,7	crema

La casi totalidad de las partículas de la harina integral de lino presentan un grado de división que oscila entre mallas 62 y 85. Las partículas de caseína, en cambio, presentan granulosis más variable, no obstante el 67 % del total corresponde a las de mayor tamaño. Una textura "arenosa" y una densidad mayor también caracterizan a dichas partículas.

Cabe destacar la marcada diferencia en estas características respecto de las partículas del aislado proteico obtenido de la harina de lino (como veremos más adelante) desde que ^{se} van a poner de manifiesto en las de los "aislados mixtos" que contengan mayores proporciones de caseína incorporada.

Probablemente esas características estén también relacionadas con un mayor rendimiento en precipitado obtenido en presencia de proteína de lino.

2)- Obtención en escala macro (de laboratorio) de proteínas de semilla de lino. Estudio de las condiciones óptimas de obtención de caseína precipitada a partir de caseína comercial. Aislamiento, purificación y secado del producto final. Obtención en escala macro (de laboratorio).

2.1. Aislamiento de proteínas a partir de harina integral de semilla de lino.

Contando con la información obtenida de estudios experimentales previos (4) sobre condiciones óptimas de aislamiento de proteínas de lino que condujeron a establecer una macrotécnica de laboratorio, se procedió a aplicar directamente dicha técnica (cuyo detalle se incluye en la P. Exptal) a fin de obtener aproximadamente 300 - 350 g de aislado proteico con destino a su evaluación biológica, valoración de lisina disponible y características analíticas.

Para lograrlo se aislaron las proteínas de 7 partidas de 200 g de harina integral de lino (hexano) hasta totalizar unos 335 g de proteínas secas a 45° (vacío), que se reunieron en una sola muestra bien homogeneizada.

Los rendimientos en "aislado" oscilaron alrededor del 24 % respecto de harina de partida (46,0 - 49,4 g c/200 g de harina). Sus valores analíticos y características físicas fueron los siguientes:

color	blanco lig. crema
aspecto	polvo fino
olor	inodoro
sabor	insípido
granulometría	mallas 62-100 : 25 %; plato : 75 %
humedad	5,67 %
cenizas	0,65 % (b.s. 0,69)
nitrógeno total	12,25 % (b.s. 12,99)
proteína cruda (N x 6,25; %)	81,19 (b.s.); 81,73 (b.s. y libre de cenizas)

Desde que la aceptabilidad de un producto tiene importancia particular, cabe señalar que el color del aislado obtenido, resultó altamente satisfactorio. especialmente si se lo compara con el de los productos finales descritos por Sosulski y Bakal (5) y Sarwar, Sosulski y Bell (7) (color pardo).

2.2. Estudio de las condiciones óptimas de obtención de caseína reprecipitada a partir de caseína comercial. Obtención en escala macro (de laboratorio)

2.2.1. Dispersión.

Se realizaron una serie de ensayos previos a fin de ajustar

las condiciones óptimas operatorias, de acuerdo al método de dispersión acuosa en medio alcalino y precipitación en medio ácido, procedimiento que se señala como más conveniente para operar en escala industrial.

Por aplicación de la técnica que se detalla en la P. Exptal., la determinación del pH óptimo de dispersión de la caseína comercial (manteniendo constantes otras variables: temp., relación caseína:agua, velocidad y tiempo de agitación), permitió observar que el valor máximo se logra a alrededor de pH 10,5 o superior.

En experiencias individuales y operando sobre 5 g de muestra, se cubrió el rango de valores de pH comprendidos en el ámbito 7,5 - 11,5. Los resultados registrados son valores promedio de 3 determinaciones para cada valor de pH:

<u>pH</u>	<u>N % N total</u> (en caseína) (b.t.c.)
7,5	79,7
8,5	84,6
9,5	95,0
10,5	99,0
11,5	99,0

La representación gráfica (Fig. N° 1) de las cifras obtenidas muestra una elevación gradual hasta alcanzar el valor máximo (99,0 %) a pH 10,5 y mantiene dicho nivel de dispersión a mayores valores de pH.

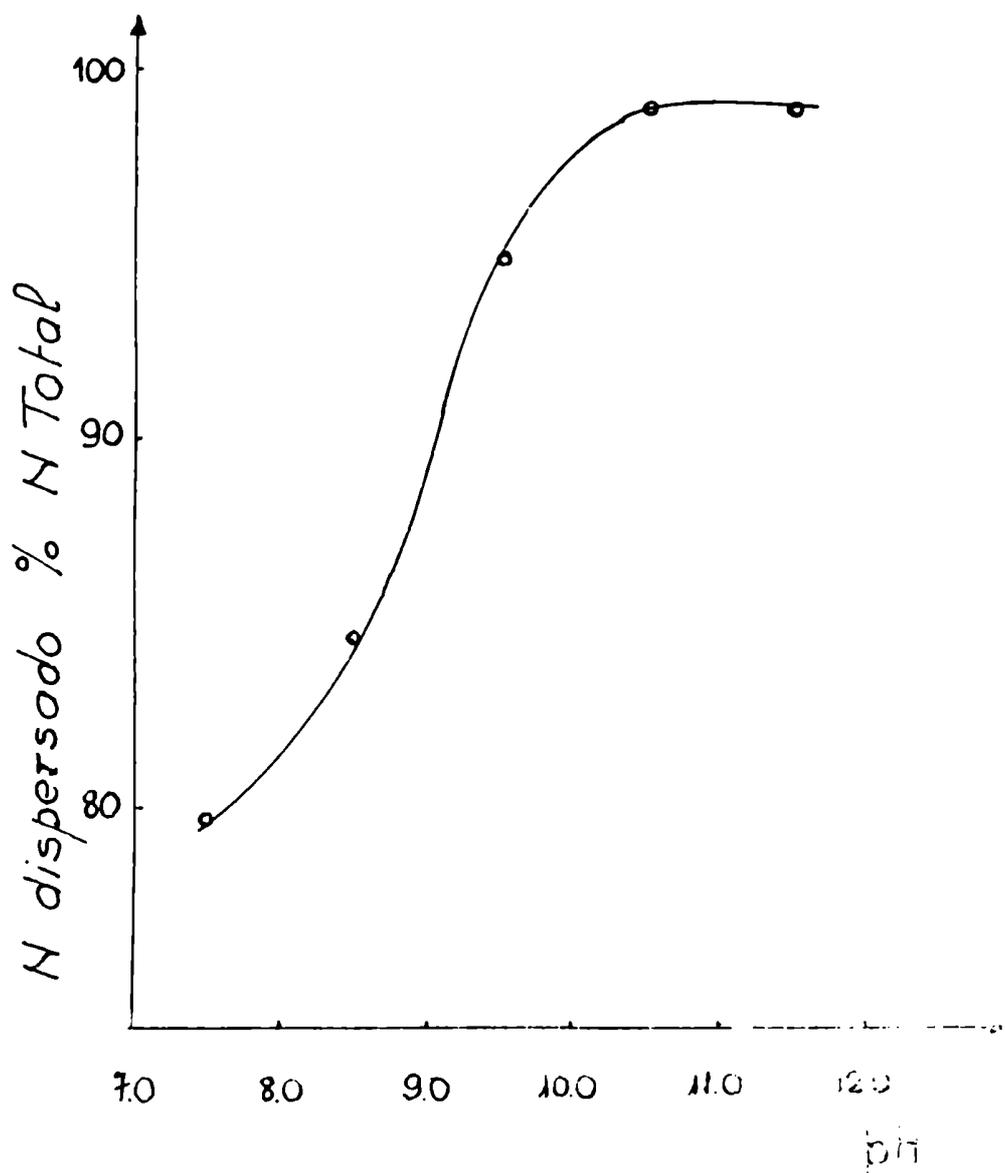


Fig. N° 1 - PROTEINAS DISPERSADAS DE CASEINA CLOPULDITA
MERCIAL -
Nitrógeno dispersado (% N total en
función del pH de extracción.

Teniendo en cuenta las observaciones señaladas en literatura acerca del probable daño a las proteínas por el tratamiento con álcali en condiciones severas (pérdidas de cistina y lisina principalmente, disminución de su valor nutritivo) (46) (47) (48) (49) (50), pareció conveniente, en lo sucesivo, operar las dispersiones al mínimo valor de pH (10,5) que solubilice el máximo de material nitrogenado a temperatura ambiente.

2.2.2. Elección del pH de máxima precipitación (pH isoeléctrico).

Para conducir estos ensayos, la caseína comercial se dispersó previamente a pH 10,5 (con las relaciones caseína:agua 1:20; 1:5 y 1:10, fijadas en la experiencia anterior); removiendo el material remanente por centrifugación. Se ensayó la precipitación de la caseína a distintos valores de pH, sobre alícuotas del extracto alcalino por adición de variadas cantidades de solución de HCl, con agitación permanente. El precipitado fue removido por centrifugación, midiéndose el nitrógeno sobrenadante para cada valor de pH.

Los datos logrados según la técnica que figura en la P. Exptal. y que se registran a continuación, están representados en la gráfica correspondiente (Fig. Nº 2):

<u>pH de precipitación</u>	<u>N sobrenadante % N dispersado</u>
3,0	46,6
3,2	34,7
3,8	8,46
4,1	3,22
4,3	2,87
4,5	2,88
4,6	2,64 (^)
4,7	3,09


 zona de
máxima
precipitación

4,8	2,97
5,0	35,0
5,4	(prácticamente soluble en su totalidad)

(^)- Zona de pH de máxima precipitación: 4,3 - 4,6; punto isoeléctrico: 4,6; N dispersado respecto del total contenido en caseína: 95 - 100 %.

La literatura señala como valor de pH isoeléctrico (máxima precipitación) 4,5 - 4,6 (25) (26) (27), no obstante puede observarse de la gráfica que existe una zona (señalada con flecha) entre pH 4,3 y 4,6 donde prácticamente queda en el sobrenadante el 2,6 - 2,9% del material nitrogenado dispersado (zona de mínima solubilidad de la "caseína").

Whittier y Webb (26), al referirse a caseína industrial obtenida por precipitación ácida, señalan que no obstante presentar el valor de pH 4,6 como mínimo de solubilidad, dichas proteínas una vez separadas de la solución, no se redisuelven apreciablemente en medios levemente ácido o alcalino. Hay evidencias de que puede agregarse más ácido hasta que el valor de pH descienda a 4,1 o aun menor, sin que se llegue a afectar prácticamente su solubilidad (procesos de obtención de caseína "grain-curd" o procesos continuos de precipitación, en los que se logra un coágulo de características bien diferenciadas por la mayor eliminación de sales de calcio y facilidad de lavados, que influyen en su textura). Es interesante hacer notar, que tal como surge de la observación del "perfil de solubilidad" versus valores de pH de precipitación (Fig. Nº 2) la meseta que abarca la región de pH entre 4,1 y 4,8, con muy ligeros cambios en la solubilidad de las proteínas, es una característica que concuerda con lo anteriormente señalado, dado que la caseína utilizada en el ensayo fue separada por precipitación ácida en su obtención a partir de leche descremada.

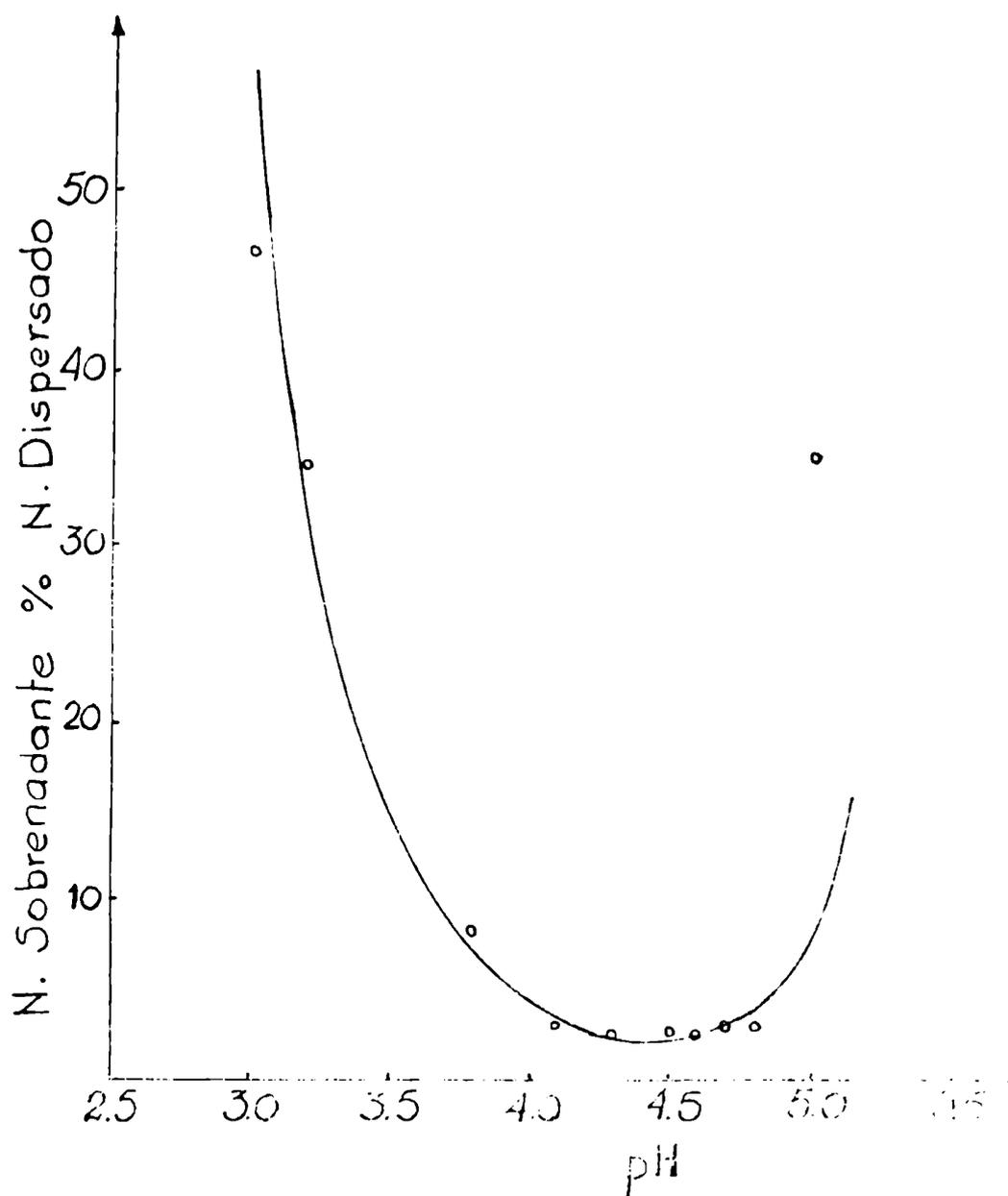


Fig. Nº 2 - PROTEINAS AISLADAS DE CASEINA CLORÍDRI
Nitrógeno sobrenadante (% N dispersado)
del pH de precipitación.

Tal característica, como se indicará más adelante, favoreció en el sentido de una mejor coprecipitación en presencia de proteínas de harina de lino, cuyo pH isoeléctrico se halla en el entorno de 4,0.

2.2.3. En experiencias más completas y una vez elegido el pH de máxima precipitación, se procedió a hacer un balance cuantitativo de las distintas fracciones separadas durante el proceso de dispersión-precipitación de caseína comercial (ver P. Exptal.).

A continuación se ilustran los valores obtenidos:

Etapa de dispersión: (dos dispersiones sucesivas a pH 10,5 con relaciones caseína:agua 1:20 y 1:10; y un lavado con relación caseína:agua 1:5 después de la primera dispersión).

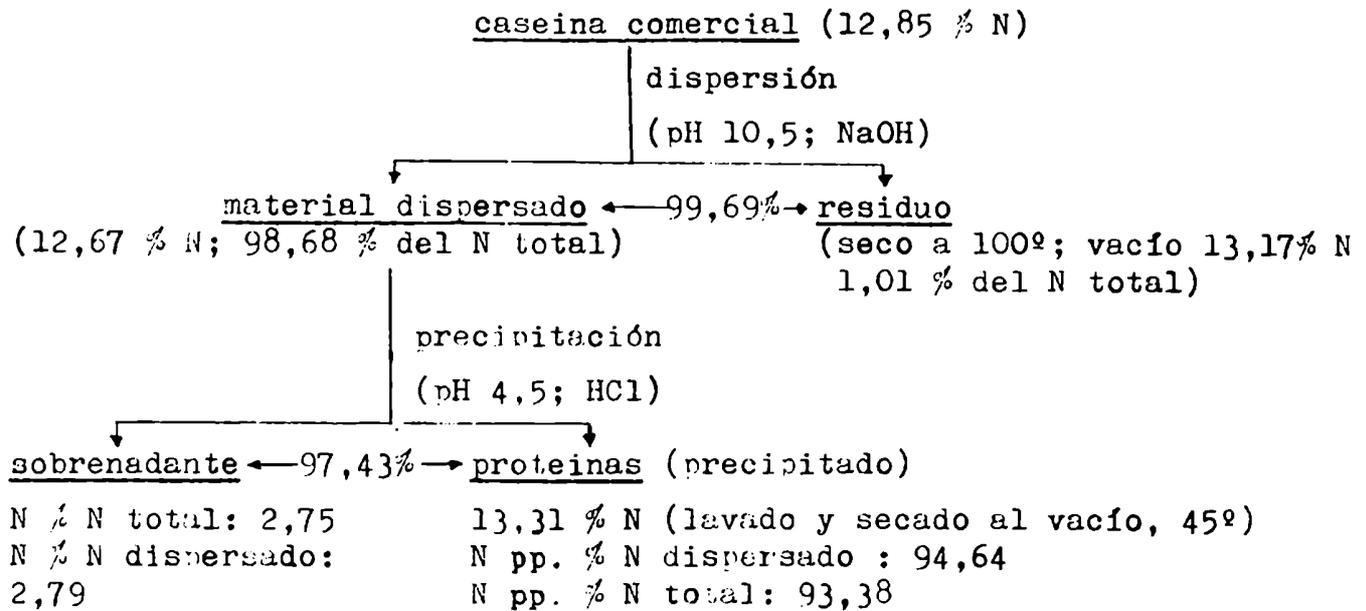
N dispersado % N total (caseína)	98,68
N de residuo % N total (caseína)	1,01
N % de residuo (seco a 100°, vacío)	13,17

Etapa de precipitación: (pH isoeléctrico 4,5)

N soluble % N total (caseína)	2,75
N soluble % N dispersado	2,79
N precipitado % N dispersado	94,64
N % proteína aislada (seca a 45°, vacío)	13,31

La cantidad de nitrógeno precipitado, calculada en base a la diferencia entre el N total de la dispersión original y la cantidad remanente en el sobrenadante después de la precipitación (95,93 % respecto del N total o 97,21 % respecto del N dispersado, fue superior a la calculada en base al peso del precipitado obtenido (seco a 45°) y su contenido en N (94,64 N pp. % N dispersado; 93,38 % del N total). Esa diferencia se atribuye a las pérdidas que ocurren en las operaciones de lavado del precipitado (arrastre mecánico) y a la capa del mismo que queda adherida al tubo de centrifuga.

El siguiente esquema ilustra sobre los resultados obtenidos (detalles, ver P. Exptal.):



El coágulo de proteínas resultó de color blanco y de consistencia compacta. Después de efectuados los lavados acuosos a pH isoeléctrico y los lavados etanólicos (EtOH 95 %) (temp. amb.) sus características fueron altamente satisfactorias (blanco, insípido, olor suave característico, y en forma de gránulos finos de textura arenosa, una vez secos a 45°, vacío).

2.3. "Aislado proteico" a partir de caseína comercial, en macro-escala de laboratorio.

De acuerdo con las condiciones experimentales de aislamiento anteriormente señaladas, se procedió a la separación en escala macro (de laboratorio) de aprox. 500 g de proteínas con destino a su evaluación biológica, a la determinación de lisina disponible y de sus características analíticas.

Para lograrlo se aislaron las proteínas de 3 partidas de 200 g de caseína clorhídrica comercial. Se obtuvieron 554,7 g de proteínas secas a 45° (vacío), con las siguientes recuperaciones parciales: 184,7; 184,4 y 185,6 g (total 554,7 g); rendimiento (promedio) 92,5 % sobre caseína de partida. Los detalles operatorios figuran en la P. Exptal.

Una vez reunidas las distintas partidas (secas a 45°) en una sola muestra, fueron analizadas con los siguientes resultados:

pérdida a 100° (vacío) (%)	6,25
cenizas (500 - 550°) (%)	3,80 (b.s. 4,05)
nitrógeno (Kjeldahl, macro) (%)	13,95 (b.s. 14,88)
nitrógeno (en b. libre de humedad y cenizas) (%)	15,51

3)- Elección de las condiciones óptimas de coprecipitación de proteína de lino y de caseína. Cálculos previos en base al contenido en lisina disponible de ambas fuentes. Obtención de aislados mixtos.

3.1. En la elección de las condiciones óptimas de coprecipitación de proteína de lino con caseína para los fines deseados, se tuvieron en cuenta las siguientes características de las respectivas fuentes:

3.1.1. El patrón de aminoácidos esenciales y en particular el valor de lisina disponible y su relación respecto del patrón provisional de la proteína tomada como referencia por FAO (1973).

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

3.1.3. Los perfiles de solubilidad de las proteínas versus valores de pH de precipitación.

Sobre la base de la experimentación actual (determinación de lisina disponible en los materiales de partida y en los aislados respectivos, ver P. Exptal.) de la información recogida en trabajos previos (4) (8) y de literatura (51), aparentemente la suplementación de la proteína de lino (deficiente primariamente en lisina) con caseína sería favorable, incrementando el valor biológico de la mezcla resultante. Teniendo en cuenta las respectivas composiciones aminoacídicas, la deficiencia en lisina de que adolecen las proteínas de lino sería contrarrestada por el contenido relativamente elevado que tiene en ese aminoácido la caseína, mientras que el nivel aceptable de azufrados en la primera, no se vería afectado dentro de un margen amplio de combinaciones con la caseína.

Surge como consecuencia inmediata de la comparación de los contenidos porcentuales en aminoácidos esenciales de la proteína de lino con los respectivos del patrón FAO (34), la siguiente secuencia en el orden de aminoácidos limitantes: lisina, leucina y treonina (1º, 2º y 3º limitante).

Sobre estas bases y teniendo en cuenta los valores correspondientes para caseína (51) se han calculado las proporciones de caseína que sería necesario incorporar a la proteína de lino (cubriendo las pérdidas a través del procedimiento de dispersión, precipitación y purificación de ambas fuentes), para nivelar los tres aminoácidos deficitarios señalados. Similarmente, se calculó para qué porcentaje de caseína (a su vez deficitaria en azufrados) en la mezcla aquélla comenzaría a limitar su valor biológico.

3.1.1. Los valores de cómputo químico ($\text{g aa esenc. prot.} \times 100 / \text{g aa esenc. FAO}$) (52) revelan que dentro de un ámbito de niveles entre el 1 y 40 o 50 % de caseína incorporada a la mezcla, ocurriría una suplementación gradual, cubriéndose los requerimientos para los si-

güientes aminoácidos esenciales deficitarios según el siguiente detalle (Tabla 10):

Tabla 10

Valores de cómputo químico, calculados para distintas mezclas de aislados de lino-caseína.

	<u>cómputo químico</u>					
	0	20	30	40	50	100
aislado de caseína (^) (%)	0	20	30	40	50	100
aislado de lino (^) (%)	100	80	70	60	50	0
lisina disponible	68,0	87,9	97,8	100	100	100
leucina	75,4	88,3	94,8	100	100	100
treonina	83,3	89,5	92,5	95,7	99,0	100
azufrados totales	100	100	100	100	100	92,0

(^)- Contenido en aminoácidos esenciales deficitarios en proteína de lino: lisina disponible (det. en lab.) 3,74 g/16 g N; leucina (8) 5,28 g/16 g N; treonina (8) 3,33 g/16 g N y azufrados totales 3,78 g/16 g N (8).

Contenido en aminoácidos esenciales en caseína: lisina disponible (det. en lab.) 9,22 g/16 g N; leucina (51) 9,80 g/16 g N; treonina (51) 4,58 g/16 g N y azufrados totales (51) 3,22 g/16 g N.

Para mezclas inferiores al 20 % de caseína se logran valores de cómputo químico gradualmente menores para todos los aminoácidos considerados.

3.1.2. Cálculos previos de suplementación. Consideración de los rendimientos logrados en aislados de lino y caseína y sus contenidos en nitrógeno total.

Conocidos experimentalmente el contenido en nitrógeno total (proteína cruda) de los aislados proteicos finales de ambas fuentes y los rendimientos que suelen lograrse en dichos procesos de aisla-

miento, se pudo calcular la cantidad de los materiales de partida a mezclar que representarían las proporciones deseadas para ambas proteínas.

Es decir, que el cálculo a que se hace referencia, implica el conocimiento del contenido en nitrógeno total aportado por cada aislado y el rendimiento de los mismos respecto del material de partida correspondiente.

Un ejemplo facilita la interpretación del cálculo antes mencionado, siendo de aplicación general a todas las combinaciones de mezclas planeadas.

El aislado proteico de lino (seco a 45°), obtenido a partir de harina integral, rinde 12,20 % de N total ($12,20 \times 6,25 = 76,25$ % de proteína cruda).

El producto aislado (seco a 45°) a partir de caseína comercial rinde 14,10 % de N total ($14,10 \times 6,25 = 88,12$ % de proteína cruda).

Para lograr una mezcla que contenga aproximadamente el 90 % de proteína de lino y 10 % de caseína, se necesitarían aislar respectivamente $100 \times 90 / 76,25$ g de aislado de lino y $100 \times 10 / 88,12$ g de aislado de caseína en el producto final. Teniendo en cuenta las pérdidas que se registran a través del proceso de aislamiento (dispersión, precipitación, purificación y secado) esas cantidades estarían representadas por las siguientes proporciones de productos de partida:

c/100 g de harina de lino rinden (promedio) 24 g de producto final seco a 45° ("aislado" de lino).

c/100 g de caseína comercial rinden (promedio) 92 g de producto final seco a 45° ("aislado" de caseína).

Por lo tanto: $100 \times 90 \times 100 / 76,25 \times 24$ representaría la proporción

a pesar de harina integral de lino; y $100 \times 10 \times 100 / 88,12 \times 92$ la que corresponde a caseína comercial. En otras palabras, para lograr un aislado mixto suplementando proteína de lino con 10 % de caseína, se utilizarían 491,8 g de harina integral de lino y 12,33 g de caseína comercial.

Todo ello sobre la base de la supuesta composición constante aportada por cada fuente, desde que las estimaciones previas fueron hechas sobre los productos aislados y purificados en las mismas condiciones que operarían sobre los aislados mixtos.

3.1.3. El otro factor de importancia considerado fue el perfil que relaciona solubilidad del material nitrogenado dispersado y los valores de pH de precipitación para cada fuente proteica.

A título ilustrativo, la Fig. 3, incluye ambos perfiles: curva 1, que representa los valores de solubilidad del N dispersado de caseína comercial respecto de los valores de pH de precipitación; y curva 2, que representa los mismos parámetros para proteína de lino (resultados logrados en un trabajo previo y utilizados a fin de permitir su comparación) (2).

Surge en forma evidente que es factible operar la coprecipitación de ambas proteínas al valor de pH isoeléctrico de la proteína de lino, particularmente si se tiene en cuenta un hecho comentado anteriormente (Disc. P. Exptal. 2.2.): la menor facilidad de redisolución de la caseína una vez precipitada y separada del medio, por efecto de ligeras variaciones de pH.

A pesar de ello, se realizaron unas primeras pruebas de coprecipitación a fin de demostrarlo experimentalmente.

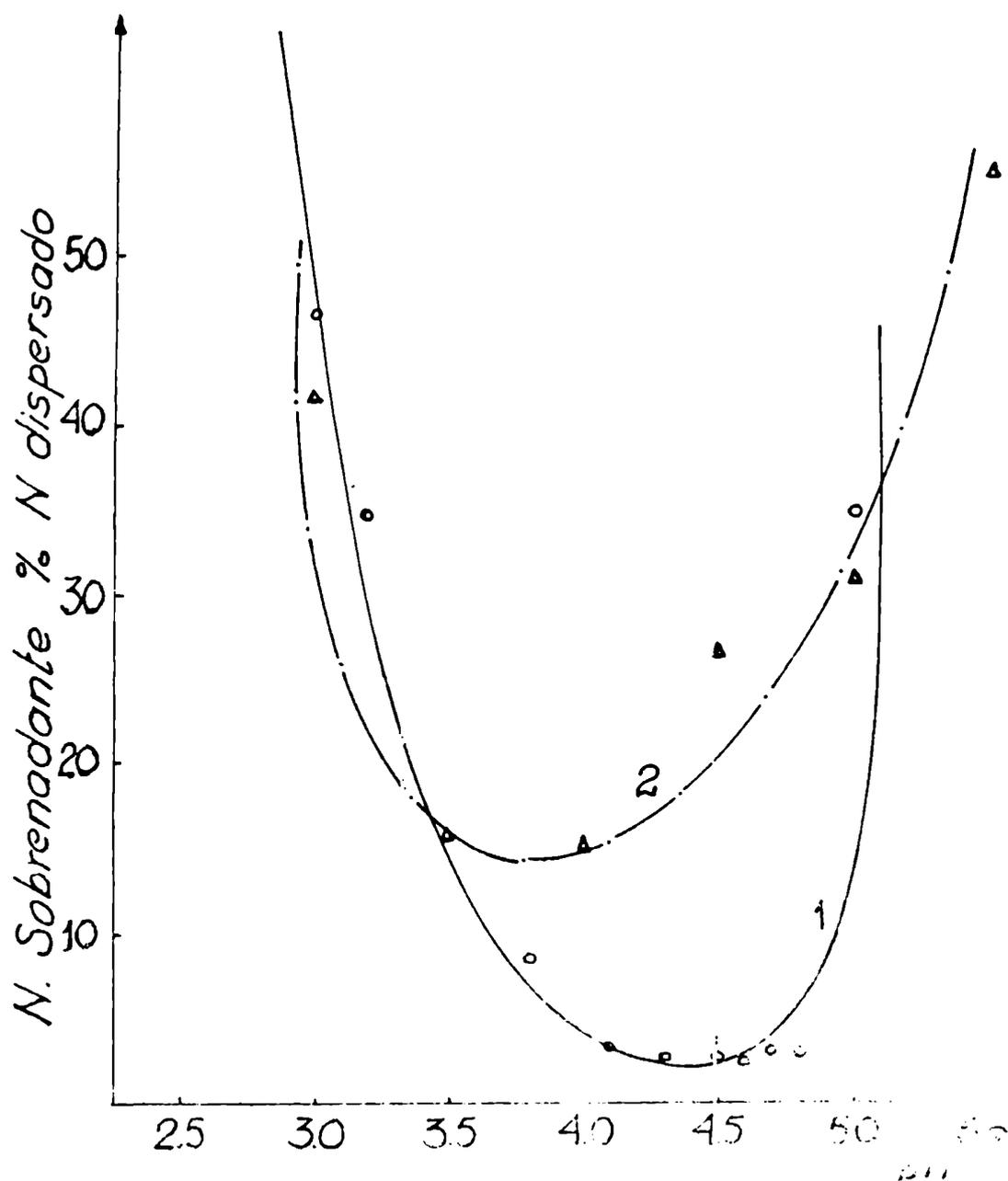


Fig. Nº 3 - PROTEINAS AISLADAS DE CASEINA COMERCIAL (1) -
 RINA INTEGRAL DE LINO (2) -
 Nitrógeno sobrenadante (% N dispersado) en función del
 pH de precipitación.

Se consideró el nivel de 20 % de suplementación y se coprecipitó separadamente y de acuerdo a la misma secuencia de operaciones en ambos casos, a pH 4,0 (punto isoeléctrico de las proteínas de lino) y a pH 4,5 - 4,6 (pH isoeléctrico de la caseína). Se registraron, sobre los aislados mixtos logrados (precipitados purificados y secos a 45°) los siguientes datos: rendimiento, pérdida a 100° (vacío), nitrógeno total y lisina disponible.

En la Tabla 11 se ilustra el conjunto de valores obtenidos para pH 4,0 y 4,5 respectivamente. La cantidad de los materiales de partida fue la misma para ambas experiencias: 30,00 g de harina integral de lino y 1,69 g de caseína clorhídrica comercial, operándose de acuerdo con la técnica mencionada en la P. Exptal.4).

Tabla 11

Características de los aislados mixtos (proteína de lino + 20 % de caseína) coprecipitados a pH 4,0 y 4,5.

aislado mixto (prot. lino 80 % + caseína 20 %) coprecipitado a pH:	4,0	4,5-4,6
rendimiento (%)	28,1(^)	22,5(^ ^)
pérdida a 100° (vacío) (%)	8,90	3,03
nitrógeno total (% , b.s.)	13,44	14,14
lisina disponible (g/ 16 g N)	5,07	4,98
lisina disponible (% de aislado mixto)	4,26	4,40

(^)- 8,03 g de producto aislado seco a 45°.

(^ ^)- 6,97 g de producto aislado seco a 45°.

El análisis comparativo de los resultados revela:

- un mayor rendimiento en aislado final para la coprecipitación efectuada a pH 4,0.
- un contenido en nitrógeno en el aislado final obtenido a pH 4,5-4,6 sorprendentemente alto. Este valor (promedio de 4 determinaciones concordantes) tendría justificación en observaciones experimentales llevadas a cabo en un trabajo previo sobre proteínas de lino (2) (cuadro 5), donde se registró un incremento para el contenido en nitrógeno en proteínas aisladas entre el pH isoelectrico 4,0 y 5,0, paralelo a la disminución en rendimiento.
- un contenido similar para lisina disponible (4,40 y 4,26 %) respecto del aislado final para ambos coprecipitados, valor que al ser expresado en base a 16 g de N, se evidencia algo mayor para el coprecipitado a pH 4,0 (aparentemente compensado por los distintos niveles de nitrógeno).

Sobre estas bases, se decidió en lo sucesivo coprecipitar las diferentes mezclas de suplementación, a pH 4,0 (pH isoelectrico de la proteína de lino) dado que en esas condiciones se logra mayor rendimiento en el aislado mixto con un nivel en lisina disponible similar.

Los resultados obtenidos para lisina disponible en cada aislado mixto coprecipitado con diferentes niveles de caseína en la mezcla, muestran claramente el efecto gradual complementario de este aminoácido proporcionado por la caseína al ser incorporada en mayor cantidad.

<u>nivel de caseína contenido en el aislado mixto coprecipitado a pH 4,0</u>	3%	10%	20%	40%
lisina disponible (g/ 16 g N)	4,26	4,48	5,07	5,94
nitrógeno (% b.s.)	13,09	13,22	13,44	13,76

4)- Aislamiento de proteínas de lino suplementadas a diferentes niveles con caseína, en macro-escala de laboratorio. Estudios nutricionales.

4.1. De acuerdo con las condiciones operatorias cuyo detalle figura en la P. Exptal., se procedió al aislamiento en escala macro (en laboratorio) de 250 - 300 g de "aislados proteicos mixtos" con destino a su caracterización y evaluación nutricional. Para el propósito perseguido se utilizarán los resultados de estas experiencias nutricionales a fin de evaluar la importancia relativa del nivel del suplemento y la calidad de la mezcla proteínica resultante.

Para lograrlo se aislaron las proteínas de numerosas partidas de 200 g de harina integral de lino suplementadas con diferentes niveles de caseína comercial (5, 10, 15, 20 y 40 %) calculados según se mencionó en la parte 3.1.2. de esta Discusión.

Una vez completada la etapa de dispersión del material nitrogenado de la harina de lino y sobre el total de los líquidos separados, se incorporó la cantidad calculada de caseína comercial previamente dispersa en medio acuoso alcalino. El conjunto, homogeneizado por agitación, fue adicionado de ácido hasta alcanzar el pH de máxima precipitación (4,0). Las etapas siguientes comprenden la separación, lavado, purificación y secado (45°, vacío) de los aislados mixtos obtenidos.

La Tabla 12 ilustra sobre los rendimientos parciales logrados para las distintas partidas de aislados mixtos coprecipitados, para diferentes niveles de caseína.

Se reunieron las partidas de aislados correspondientes al mismo nivel de suplementación, se mezclaron íntimamente, secaron nuevamente a 45° (vacío) y guardaron en recipiente de buen cierre hasta

el momento de su utilización.

Tabla 12

Rendimientos en aislados mixtos para diferentes niveles de suplementación.

nivel de suplementación con caseína	5 %	10 %	15 %	20 %	40 %
	g de aislado mixto/ 200 g harina de lino + x g caseína comercial (seco 45%, vacío)				
	50,5	52,3	55,4	57,5	70,3
	51,4	51,0	56,5	58,6	73,6
	52,5	50,8	57,4	56,7	73,8
	52,0	53,5	54,6	58,1	73,0
	51,2	51,7	56,2	56,2	
total de aislado mixto obtenido (g)	257,6	259,3	287,1	287,1	290,7
rendimiento % (promedio)	25,4	25,3	27,4	27,2	31,6

Estas cifras (promedio) de rendimientos para los aislados mixtos, superiores al valor logrado para el aislado de lino sin suplementar (prom.: 24,0 %). reflejan la casi total coprecipitación de la caseína incorporada, dado que muestran un incremento hacia mayor nivel de suplementación.

Los aislados mixtos así obtenidos, mostraron las siguientes características físicas y valores analíticos (Tabla 13).

Tabla 13

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

<u>nivel de suplementación con caseína en el aislado final</u>	0 (lino)	5	10	15	20	40	100 (caseína)
color			← blanco crema →				
olor			← inodoro → suave caracter.				
sabor			← insípido → suave caracter.				
granulosidad	fina	fina	fina	fina	lig. are- nosa	arenosa	arenosa
pérdida a 100° (vacío) (%)	7,05	6,32	6,24	7,08	5,57	3,45	6,25
nitrógeno (kjeldahl) (% b.s.)	13,08	13,24	13,30	13,32	13,36	13,46	14,81
lisina disponible (% b.s.)	3,06	3,44	3,68	3,94	4,18	4,80	8,53
lisina disponible (g/16 g N)	3,74	4,16	4,43	4,73	5,01	5,70	9,22

Los datos de lisina disponible revelan el aporte en tal sentido de la caseína en la mezcla coprecipitada, desde que al nivel del 40 % (posiblemente entre 20 y 30 %) cubre los requerimientos para niños señalados por FAO (1973) (5,50 g/ 16 g N).

Para completar la información se incluye la Tabla 14 que ilustra sobre la precisión del método de evaluación química de lisina disponible (53) y la relación lineal entre lisina disponible y el % de caseína en los aislados mixtos coprecipitados.

Tabla 14

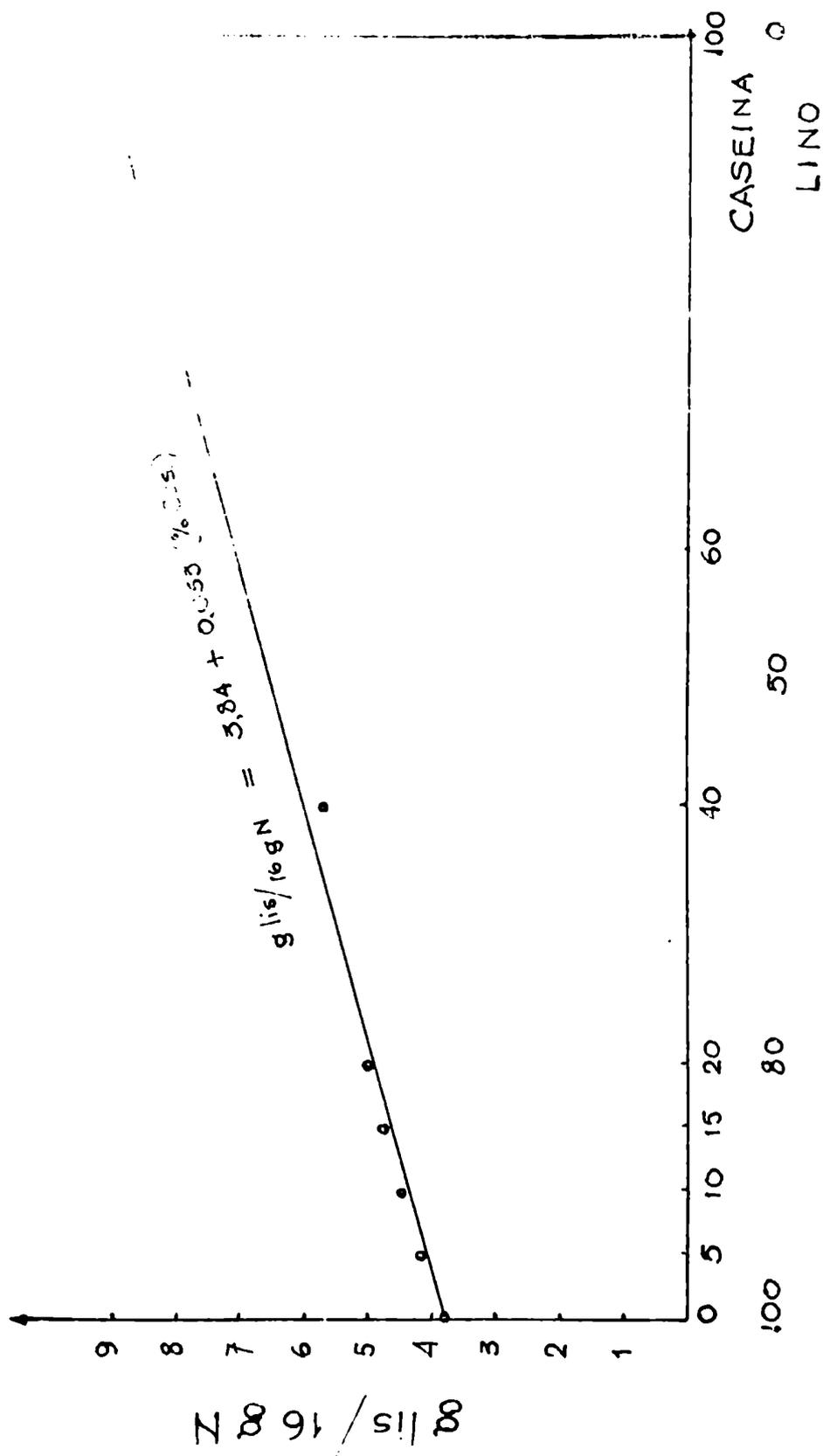
Evaluación de lisina disponible en los aislados mixtos de caseína y de lino.

aislado de:	nº de det.	lisina disponible (g/16 g N) (^)	s(^)
lino	3	3,74	0,05
lino supl. 5 %	3	4,16	0,08
lino supl. 10 %	3	4,43	0,20
lino supl. 15 %	3	4,73	0,06
lino supl. 20 %	3	5,01	0,10
lino supl. 40 %	3	5,70	0,07
caseína 100 %	3	9,22	0,07

(^)- $\bar{X} = \frac{\sum X_i}{N}$ = media aritmética; X_i = determinación individual.

(^^)- $s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N - 1}}$ = desviación standard.

La Figura 4 representa la relación lineal entre lisina disponible y el % de caseína en el aislado mixto, para la cual se obtuvo un coeficiente de correlación (+) $r = 0,997$, valor que lo ubica en la clasificación de una correlación casi perfecta.



Distribución porcentual de proteína en la dieta

Fig. No 4... PROTEINAS AISLADAS POR COPRECIPITACION A PARTIR DE HARINA DE LINO Y DE CASEINA COMERCIAL -

Lisina disponible (g/16 g N) en función del porcentaje de distribución de proteínas coprecipitadas, en la dieta.

4.2. Evaluación biológica de los aislados proteicos mixtos (lino suplementado con diferentes niveles de caseína) y su comparación con los aislados obtenidos del lino y caseína comercial.

Se llevaron a cabo una serie de pruebas biológicas (Utilización Proteica Neta y Digestibilidad) en ratas, para determinar el orden de eficiencia de la suplementación con caseína por coprecipitación y a distintos niveles sobre proteína aislada de lino. Ello permitió su comparación con los valores logrados para proteína de lino sin suplementar y para caseína (usada como referencia).

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar de la colonia perteneciente a la cátedra de Promatología y Nutrición Experimental de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.B.A..

Los ensayos se llevaron a cabo agregando todos los nutrientes, incluyendo vitaminas y minerales a la dieta, dejando como única variable la proteína a examinar, de acuerdo a los detalles que figuran en la P. Exptal.

La primera etapa fue la preparación de la serie de dietas a nivel constante en proteína (10 %). También fue similar el Valor Calórico de las mismas, comprobado experimentalmente según P. Exptal. 7. Una de ellas contenía solamente la proteína aislada de la harina de lino y otra, solamente el aislado obtenido de caseína comercial. Las dietas remanentes (isoproteicas) se prepararon con cada uno de los aislados mixtos obtenidos a diferentes niveles de suplementación con caseína coprecipitada en presencia de proteína de lino (5, 10, 15, 20 y 40 % respectivamente).

Los resultados se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15

Valor de UPN de proteínas aisladas de lino, caseína y aislados de lino suplementados con diferentes niveles de caseína.

Fuente proteica incorporada a la dieta (aislado)	nº det.	UPNop	% prot. en la dieta	V.C. kcal/g dieta	P%	UPNst	CPN		
lino	4	59,7	3,9	9,63	4,75	19,87	8,11	62,2	4,84
lino + 5% caseína	3	62,4	0,7	11,03	4,65	19,45	9,49	67,7	5,92
lino + 10% caseína	4	63,7	3,7	10,07	4,75	19,87	8,48	67,6	5,40
lino + 15% caseína	3	64,5	1,2	10,08	4,64	19,41	8,69	68,9	5,61
lino + 20% caseína	4	64,5	2,4	10,23	4,63	19,37	8,84	69,1	5,70
lino + 40% caseína	4	73,4	1,5	10,29	4,68	19,58	8,79	79,7	6,45
caseína	4	71,6	5,2	10,47	4,90	20,50	8,55	77,1	6,12

$$UPNst = \frac{UPNop \times 54}{54 - P\%} - 8 \quad ; \quad P\% = \text{kcal provistas por proteínas} / 100 \text{ kcal dieta.}$$

$$CPN = \frac{NDpCal = UPNop \times P\%}{100} \quad ; \quad CPN = \text{kcal aportadas por la proteína de la dieta que son totalmente utilizables para la síntesis proteica.}$$

Según se observa, la creciente suplementación con caseína, indujo un incremento significativo en la calidad nutricional del aislado mixto final, en comparación con el valor logrado para el aislado de lino sin suplementar. Apparentemente la mejor suplementación entre ambas proteínas es aquella en que la caseína aporta el 40 % del total de las proteínas en el aislado coprecipitado. En base al peso de los materiales de partida, esa proporción correspondería a la relación 200 g de harina de lino y 30.07 g de caseína comercial, que por dispersión y subsiguiente coprecipitación del material nitrogenado rinden un aislado mixto que corresponde al de dicha calidad biológica.

Los resultados representados en la Fig. 5, están indicando que en las distintas mezclas en suplementación y hasta alcanzar el nivel del 20 % en caseína, disminuyen y se van nivelando las deficiencias en lisina, treonina y leucina de la proteína de lino a medida que aumenta la proporción de caseína en el aislado coprecipitado.

También se observa que entre los niveles del 15 al 20 % en caseína, ésta aporta ya suficiente cantidad de esos aminoácidos esenciales para provocar un impacto positivo en la calidad de la proteína de lino.

El valor máximo logrado al nivel de suplementación del 40 % parece alcanzar el correspondiente para el aislado de caseína comercial, teniendo en cuenta el ámbito de oscilaciones en los resultados (errores) frecuente dentro de este tipo de experiencias.

En la Tabla 15 también puede observarse que los valores medios de UPNst muestran una tendencia similar al de los UPNop, al aumentar el porcentaje de caseína en el aislado utilizado, por ser las dietas prácticamente isoproteicas e isocalóricas.

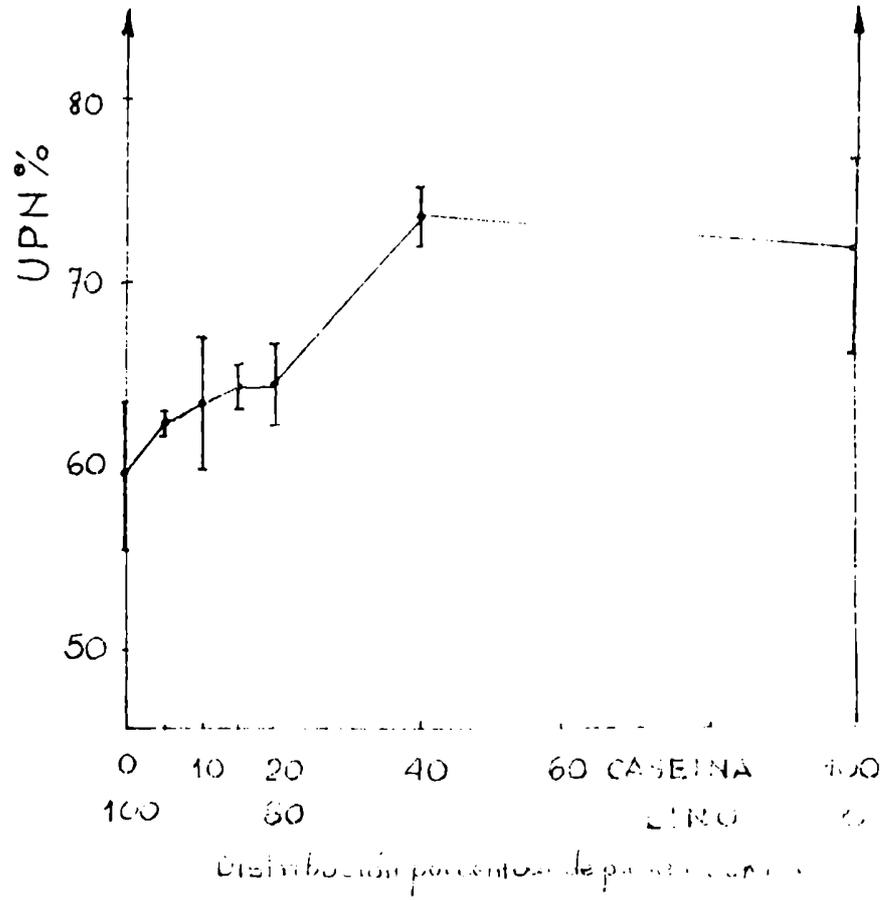


Fig. No 5 - PROTEINAS ALIAS POR CADA KILO EN HARINA DE LINO Y CASHEI CONJUNTO
 Utilización Proteica Neta (UPH) en porcentajes de cada día y día, en la día.

En la Fig. 6, se aprecia la relación establecida entre los valores de UPNop y de lisina disponible respectivos, correspondientes a las dietas con diferentes niveles de suplementación con caseína utilizadas.

De nuevo aquí, es de interés hacer notar que el efecto suplementario de la lisina (representado en este caso por un incremento en el valor de la UPN), fue acentuándose progresivamente, conforme el nivel de caseína aumentaba en la dieta.

Los cálculos previos, en términos comparativos, de la composición en aminoácidos esenciales de la proteína aislada de lino, con la del patrón provisional de la proteína de referencia FAO (34), revelaron como primer aminoácido limitante a la lisina. A partir de estos resultados biológicos se juzga de interés comparar, la buena concordancia entre la predicción establecida según el cómputo químico, y los valores de UPN, utilizando ratas jóvenes en etapa de crecimiento.

Asimismo los valores de digestibilidad parecen estar influidos, en líneas generales, por el nivel de suplementación de caseína en el aislado mixto contenido en la dieta. La Tabla 16 y la representación de dichos valores en la Fig. 7, suministran datos acerca de esta relación, indicativos de que el valor de la digestibilidad (D) asciende ligeramente conforme aumenta el nivel de suplementación con caseína. El coeficiente de correlación entre ambos valores fue de +0,967 (r) (correlación muy buena). Aparentemente, si bien la D del aislado proteico de lino sin suplementar es alta (87,4) se observa el efecto de la inclusión progresiva de una proteína de mayor digestibilidad como lo es la caseína (92,5).

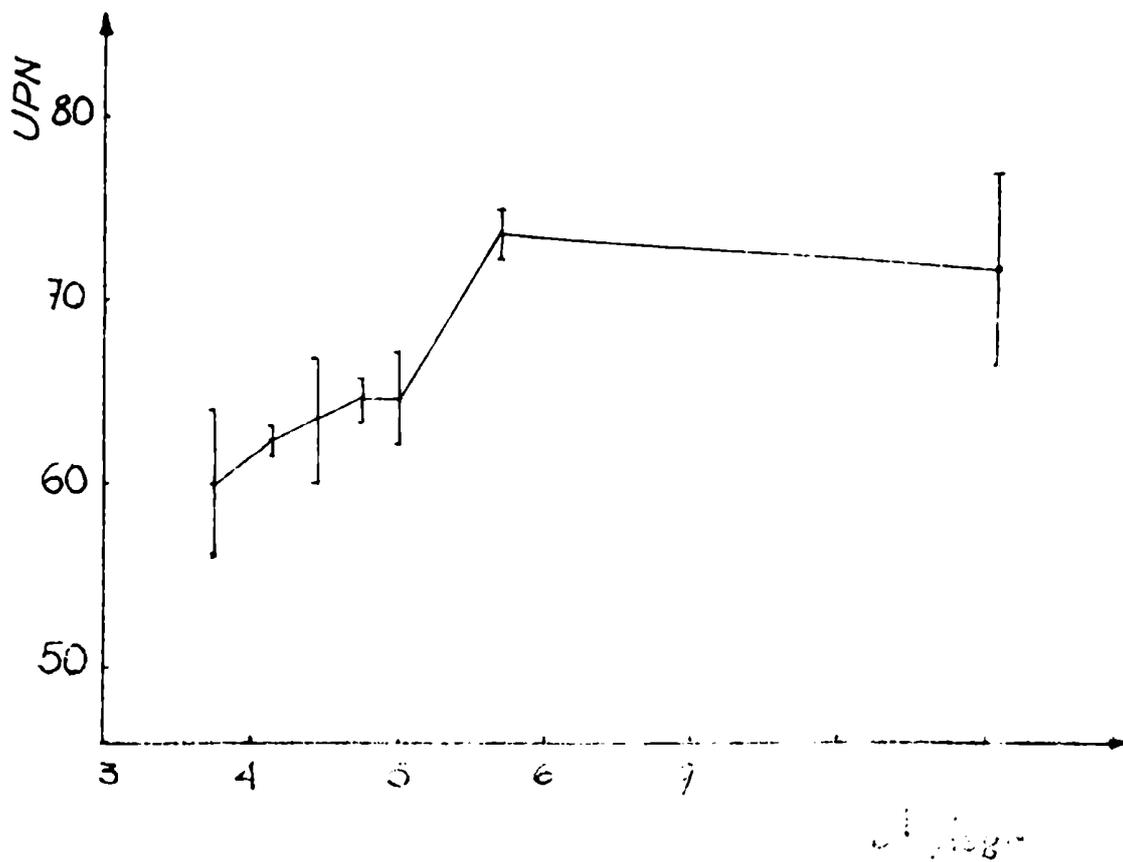
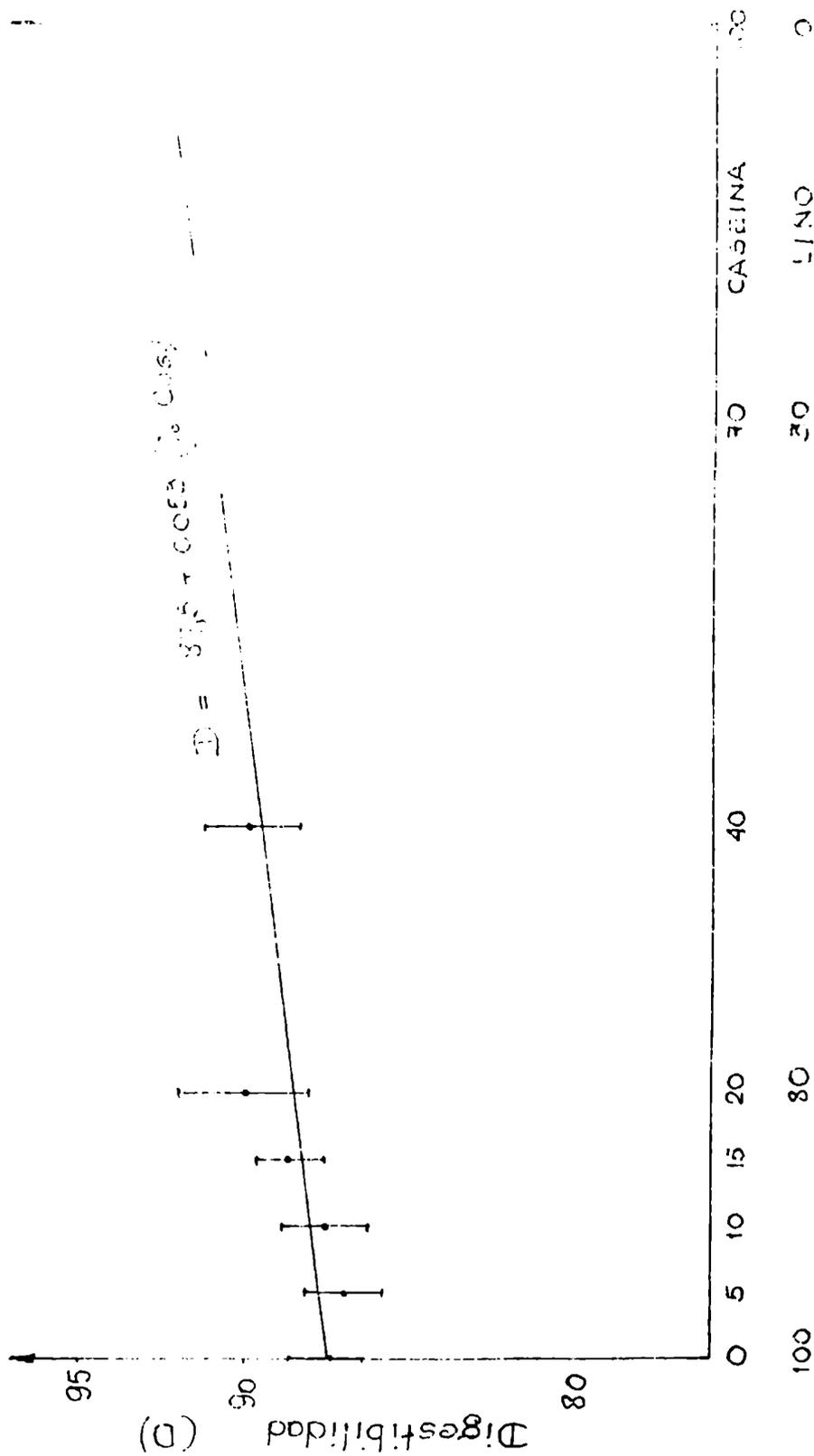


Fig. Nº 6 - PROTEINAS...
 HARINA DE...
 Utilización Pro...
 nivel de...



Distribución porcentual de proteína en la dieta.

Fig. 10.2 - PROTEINAS AISLADAS POR COPRECIPITACION A PARTIR DE MANIACA DE LINO Y DE CASEINA COMESTIBLE.

Digestibilidad (%)
 las coprecipitados
 y la dieta

Tabla 16

Valores de digestibilidad (D) en función del incremento en el porcentaje de caseína en los aislados mixtos ensayados.

<u>proteína</u>	<u>D</u>	<u>s</u>	<u>nº det.</u>
aislado de:			
lino (100 %)	87,4	1,0	4
lino + 5 % caseína	86,9	1,3	4
lino + 10 % caseína	87,5	1,4	4
lino + 15 % caseína	88,6	1,0	3
lino + 20 % caseína	89,9	2,1	4
lino + 40 % caseína	89,7	1,5	4
caseína (100 %)	92,5	2,4	4

En el presente caso, la importancia de la lisina fue evidente en todos los niveles de suplementación de las dietas ensayadas. No obstante, el haber logrado finalmente un valor comparable al de la caseína tomada como referencia, da la pauta de que simultáneamente se habrían suplementado todos los aminoácidos limitantes de la proteína de lino, a fin de mantener un balance apropiado entre ellos. Cabe aquí señalar que las proteínas de lino son buena fuente de azufrados totales (3,78 g/16 g N) frente al valor de requerimiento dado por FAO (3,5 g/ 16 g N) para niños.

La literatura informa sobre un conocimiento mucho más profundo del patrón de aminoácidos esenciales necesario para cubrir los requerimientos individuales en ratas en crecimiento que en infantes. De ellos surgen, no obstante, los menores requerimientos, particularmente en lisina y azufrados, para estos últimos. Es razonable su consideración al extrapolar los resultados logrados en ensayos de alimen-

tación con ratas en crecimiento al niño, desde que estaríamos subestimando su calidad biológica para éste.

Desde el punto de vista económico, representa un ahorro en la fuente de mayor costo (caseína) efectuar suplementaciones con niveles algo menores del 40 %.

5)- Determinación de los contenidos en cenizas totales, fósforo total y de ácido fólico e hidratos de carbono totales en los respectivos aislados.

Con fines comparativos, se incluyeron en el análisis de composición general de los aislados de partida y de los diferentes aislados mixtos coprecipitados las siguientes determinaciones (ver P. Experimental) cenizas totales, fósforo total y fósforo de ácido fólico e hidratos de carbono totales; cuyos valores (promedio) figuran en la Tabla 17.

La determinación de cenizas totales (obtenidas en presencia de un fijador de fósforo: sal de magnesio) permitió registrar un máximo nivel para el aislado de caseína (4,1 % b.s.) inferior al señalado para caseína clorhídrica comercial (4,31 % b.s.) justificable ya que se la obtuvo en laboratorio por redispersión, precipitación y purificación a partir de aquélla.

Puede observarse un descenso apreciable en el contenido en hidratos de carbono totales, dado que el aislado proteico de lino retiene en su precipitación 23 % (b.s.) de dichos componentes (no eliminables por sucesivas redispersiones y reprecipitaciones) y en el aislado obtenido a partir de caseína comercial están ausentes.

Los diferentes aislados mixtos coprecipitados muestran un decrecimiento notorio y progresivo en esos componentes, concordante con

Tabla 17

Composición en cenizas, fósforo total y de ácido fítico e hidratos de carbono totales de los diferentes aislados proteícos obtenidos.

	aislado de:				caseína comercial		
	harina de lino	5%	10%	15%		20%	40%
cenizas totales (%b.s.)	2,0	2,1	2,3	2,3	2,4	2,5	4,1
hidratos de carbono totales (%b.s.)	23,7	22,3	20,7	20,1	19,0	15,9	0(1)
P de ácido fítico (%b.s.)	0,16	0,18	0,12	0,13	0,13	0,12	0(1)
P total (%b.s.)	0,31	0,34	0,31	0,35	0,38	0,49	0,69
P total - P ácido fítico co (%b.s.)	0,15	0,16	0,19	0,22	0,25	0,37	0,69

(1) - no detectado experimentalmente.

la suplementación creciente con caseína.

El contenido en fósforo total para el aislado de lino registra el menor valor en la serie de aislados obtenidos (0,31 % b.s.) y los aislados mixtos muestran una discreta subida con el aumento en el % de caseína en los mismos.

La magnitud del contenido en ácido fítico (expresado en P % ba) registra una tendencia al descenso (ligera, pero observable) a través de toda la serie de aislados mixtos y a partir del aislado de lino, desde que en la caseína está ausente este componente.

El nivel de fósforo remanente (% b.s.) (diferencia entre P total y P fítico), también muestra una tendencia creciente a partir del aislado de lino, a través de los preparados mixtos por coprecipitación hasta el de caseína, en razón del predominio consistente en fósforo inorgánico (fosfatos) en dicho sentido.

PARTE III

PARTE EXPERIMENTAL

PARTE III

PARTE EXPERIMENTAL

1)- Materias primas. Obtención de harina de lino. Caseína clorhídrica comercial de buena calidad. Análisis de composición general.

La semilla de lino oleaginoso, adquirida en el comercio (cosecha 1973) sirvió como material de partida para la obtención de la harina integral de extracción (hexano técnico).

1.1. Obtención de la harina de extracción de lino.

Aproximadamente 15 kg de semilla de lino, una vez molida, se agotaron en Soxhlet por hexano técnico. Para ello se realizó una primera extracción a fin de eliminar la mayor parte del aceite, remolviendo la semilla en molinillo y reextrayendo hasta agotamiento. El producto resultante se secó al aire y eliminó el resto de solvente en estufa de vacío a 45°. Se obtuvo así la harina integral de extracción (aprox. 8 kg), 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 y fibra cruda % de producto tal cual, de acuerdo con las siguientes técnicas:

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

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

peso constante (AOAC, Official Method 13.6, 1950).

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

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

Los valores hallados expresados % de harina tal cual, se refirieron a harina libre de humedad. El valor de nitrógeno total se da en base seca y libre de cenizas. En todos los casos se usaron los valores promedio de determinaciones efectuadas por duplicado o triplicado.

Lisina disponible: Al margen de las determinaciones que hacen a su composición general, la harina integral se examinó en su contenido de lisina disponible, con fines comparativos. Se aplicó la técnica de Conkerton y Frampton cuyo detalle experimental figura más adelante.

1.2. Caseína clorhídrica comercial.

La caseína utilizada fue remitida por la Fundación "Instituto de la Leche" Vicente L. Casares y Hersilia Lynch de Casares rotulada como "caseína clorhídrica de buena calidad". Se presenta como un producto de granulosis variable (retenido en malla 25, 10 %; en malla 40, 27 %; pasando el 63 % por malla 40), de color crema y textura firme, arenosa. La suspensión acuosa registra un valor de pH de aprox. 4,8.

Sobre este producto se realizaron las distintas determinaciones

de composición general y de lisina disponible, a los fines de su caracterización.

Para las determinaciones de humedad, nitrógeno total y lisina disponible se operó según las técnicas señaladas para harina de lino.

Dada la naturaleza del material, rico en fosfatos, fue necesario calcinar en presencia de un fijador. Se determinó sobre 1 g de muestra, previamente adicionada de 2 ml de solución saturada de $Mg(NO_3)_2$ y llevado a seco sobre tela metálica. Se calcinó en mufla (500 - 550°) hasta peso constante. Se condujo paralelamente un blanco con igual volumen de solución de fijador, que se descontó del peso total.

2)- Obtención de proteínas aisladas de harina integral de lino. Ensayos previos al aislamiento de proteínas a partir de caseína comercial. Ajuste de condiciones óptimas de extracción y precipitación.

2.1. Obtención del aislado de lino.

2.1.1. Equipos y reactivos.

En los ajustes de pH se usaron soluciones de HONa o de HCl 5 N y las respectivas soluciones diluidas (0,5N). Se controlaron los valores de pH con electrodo de vidrio (pHmeter E 3963-Methrom).

Durante la extracción del material nitrogenado, la temperatura de la solución se mantuvo a 30° (circulador de agua con termostato) y la precipitación de las proteínas se efectuó a temp. amb. (20 - 25°).

En las etapas de extracción y precipitación se utilizó un agitador mecánico de vidrio, y en las separaciones por centrifugación

se operó con una centrífuga Universal Junior IIIS, a 2800 rpm.

En la etapa de purificación de las proteínas precipitadas, se usó en todos los casos, agua destilada previamente ajustada al valor de pH correspondiente de precipitación.

En los lavados subsiguientes se utilizó etanol 95 % (destilado).

2.1.2. Obtención en escala macro de laboratorio.

Se procedió de acuerdo con condiciones operativas establecidas en un trabajo previo sobre aislamiento de proteínas de harina integral, en el cual se fijaron los valores de pH óptimos de dispersión y de máxima precipitación de dichas proteínas (4).

a)- Dispersión del material nitrogenado.

En balón de tres bocas provisto con agitador, se dispersaron por separado partidas de 200 g de harina integral por agitación permanente durante 1 hora, a temp. amb. en 4200 ml de agua destilada (relación harina:agua 1:21), manteniendo el valor de pH de óptima dispersión (9 - 10) por añadido de solución de HONa 5 N. Por centrifugación se separó el líquido sobrenadante del residuo que contiene toda la fibra. Este último se trató por agitación con 1000 ml de agua destilada ajustada previamente al pH de dispersión (9 - 10) (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 2300 ml de agua destilada (relación harina:agua 1:11,5) manteniendo por otra hora el valor de pH de dispersión (9 - 10), 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 decantados se pasaron por tela metálica (acero inoxidable, 200 mallas/cm).

b)- Precipitación.

Se llevó a cabo por añadido de solución de HCl 5 N y ajuste al valor de pH de máxima precipitación (4,0) con HCl diluido (0,5 N), a los líquidos de extracción. a temp. amb. y con agitación permanente hasta lograr un pH estable de 4,0. El precipitado se separó por centrifugación, después de lo cual y por dos veces sucesivas, se lavó con 1000 ml de agua ajustada previamente al valor de pH 4,0 (re-suspensión del precipitado por fuerte agitación) (relación precipitado:agua 1:22), centrifugando luego de cada lavado. Los líquidos decantados se desecharon.

c)- Purificación.

Los coágulos anteriores se lavaron por agitación energética y por 4 veces consecutivas, a temp. amb., con 1000 ml de etanol 95 % (las dos primeras veces) y 800 ml (las dos últimas), lavando finalmente con aproximadamente 400 ml de éter etílico. Se centrifugó después de cada lavado. Las proteínas así purificadas presentaron color blanco-cremoso, siendo su consistencia compacta.

d)- Secado.

Los precipitados se dejaron aproximadamente 12 hs en desecador y luego se extendieron en capa delgada, secándolos a temp. de 45° (vacío, 5 Torr). Se obtuvieron en forma de polvo fino, blanco y liviano. Los rendimientos se mencionaron en la Discusión y sobre la mezcla homogénea de proteínas de todas las partidas logradas se practicaron los análisis cuyos resultados han sido discutidos: pérdida a 100° (vacío), cenizas, nitrógeno, lisina disponible, hidratos de carbono, fósforo total, fósforo (ácido fítico), Utilización Proteica Neta y Digestibilidad.

2.2. Obtención de caseína "aislada" en laboratorio. Estudios previos de condiciones óptimas operativas para el aislamiento de proteínas a partir de caseína comercial.

2.2.1. Equipos y reactivos.

Los mismos señalados en 2.1.1.

2.2.2. Técnica de dispersión de la proteína. Elección del pH óptimo.

En balón de tres bocas, provisto de agitador mecánico, se colocaron 5 g de muestra y suspendieron en 100 ml de agua destilada (relación sólido:líquido 1:20). Se agitó en forma permanente durante 1 hora, manteniendo constantes la temperatura de 30° y el valor del pH de dispersión a ensayar (7,5; 8,5; 9,5; 10,5 y 11,5), con solución de NaOH 5 N, ajustando con solución diluida de NaOH 0,5 N. El conjunto se transvasó a matraz aforado (250 ml) decantándolo a través de tela metálica (acero inoxidable, 200 mallas/cm). El residuo se lavó por agitación con 25 ml de agua destilada previamente ajustada al pH de dispersión y centrifugó durante 20 min (2800 rpm). El líquido sobrenadante se agregó al separado en la primera extracción.

Se operó una segunda dispersión similar a la primera con relación sólido:agua 1:10, en iguales condiciones, reuniendo el líquido separado después de centrifugación con los anteriores. Se llevó finalmente a volumen y midieron alícuotas (por triplicado) para determinar nitrógeno dispersado a los diferentes valores de pH ensayados. Los valores promedio obtenidos de Nitrógeno dispersado % Nitrógeno total (sobre caseína comercial de partida) se utilizaron para el trazado de la curva de la Figura 1.

2.2.3. Elección del pH de máxima precipitación (isoelectrico).

En balón de tres bocas provisto de agitador mecánico, se colo-

caron 60 g de muestra que se suspendieron en 1200 ml de agua destilada previamente ajustada al valor de pH 10,5 (elegido de acuerdo con la experiencia anterior), correspondiendo a una relación sólido:agua de 1:20. Manteniendo la temp. a 30° y el pH señalado, se agitó en forma permanente durante 1 hora para su máxima dispersión.

El conjunto se centrifugó (30 min, 2800 rpm) y el líquido sobrenadante se transvasó a matraz aforado, decantando a través de tela metálica (malla 200 de acero inoxidable). El residuo se lavó por agitación con 300 ml de agua destilada previamente ajustada a pH 10,5 (relación sólido:agua 1:5), centrifugó nuevamente (20 min, 2800 rpm) y el líquido decantado se reunió al anterior después de pasarlo por malla 200. El residuo se transfirió nuevamente al balón donde se procedió a una nueva dispersión del material nitrogenado a pH 10,5 (relación sólido:agua 1:10, 30°), con agitación permanente aprox. 45 min.

El líquido decantado después de centrifugar se reunió con los anteriores y finalmente se llevó a volumen de 3000 ml, (se utilizaron 2 matraces de 2000 y 1000 ml respectivamente que se mezclaron íntimamente antes de medir alícuotas). Se fraccionó en alícuotas de igual volumen (600 ml c/u) colocadas en sendos vasos de precipitación y se midieron separadamente (por triplicado) volúmenes convenientes para determinar Nitrógeno dispersado total. Se operó la precipitación de caseína a distintos valores de pH, cubriendo el ámbito de 3,0 a 5,0, con agitación que continuó hasta unos 2 min después de alcanzado el valor de pH deseado y a temp. amb.. Para regular el pH se usó solución de HCl 5 N, ajustando finalmente con solución diluida de HCl 0,5 N.

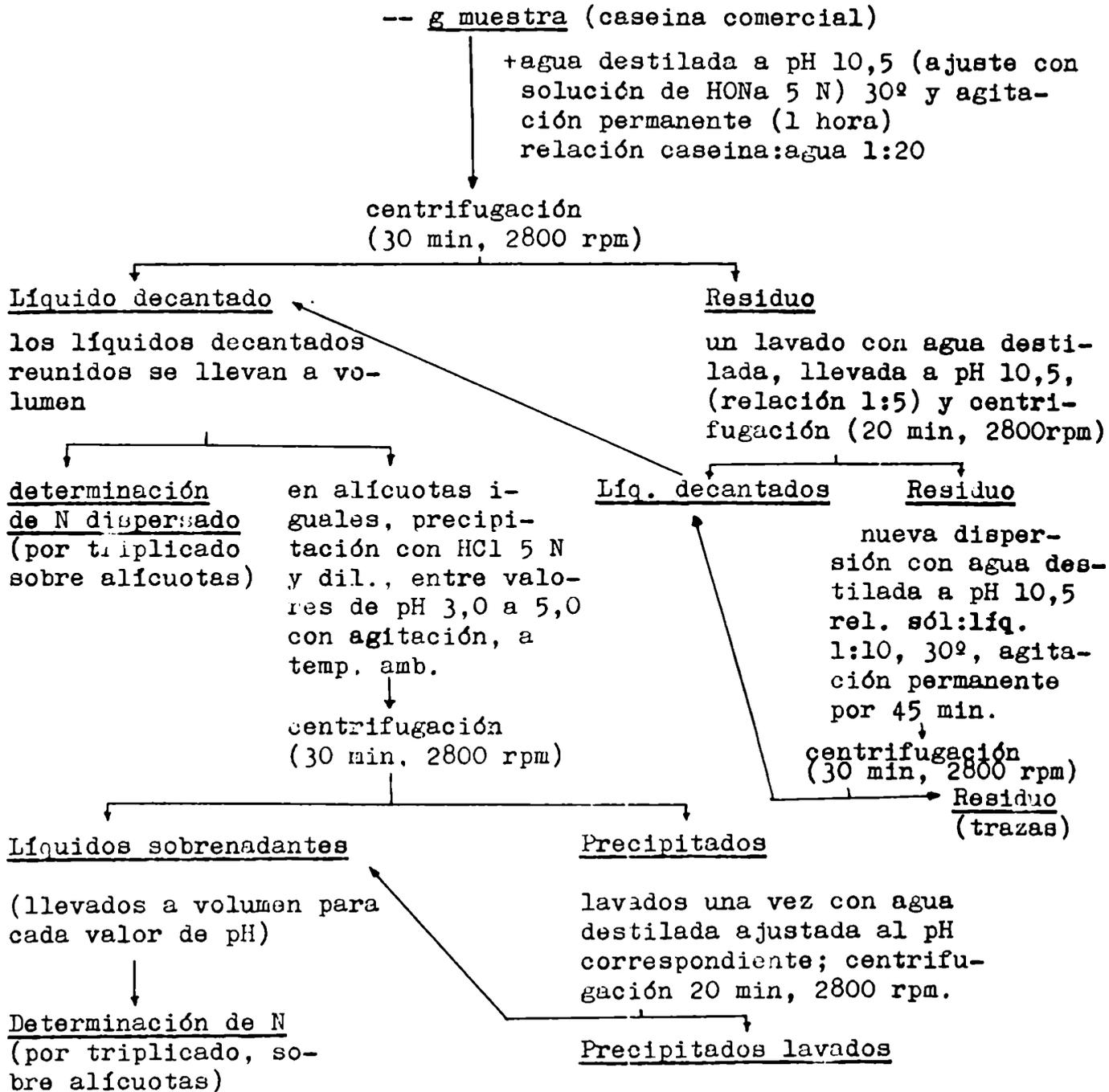
Los precipitados obtenidos se separaron por centrifugación

(30 min, 2800 rpm), lavando en todos los casos con el mismo volumen mínimo de agua previamente llevada al valor de pH correspondiente (50 ml) y los sobrenadantes respectivos se decantaron en matraces aforados (500 ml). Se llevó a volumen y midieron alícuotas para determinar nitrógeno en el sobrenadante, para cada valor de pH.

Los datos obtenidos, consignados en la Figura 2, muestran el porcentaje de material nitrogenado soluble (sobrenadante) en función de los valores de pH, registrándose cifras mínimas en la zona de máxima precipitación (isoelectrico).

A continuación se presenta un esquema general del procedimiento descrito.

Esquema general. Dispersión de caseína clorhídrica comercial y precipitación a diferentes valores de pH (elección del valor de pH de máxima precipitación, isoelectrico).



2.2.4. Balance de la distribución del nitrógeno total en caseína comercial, en el proceso de aislamiento de la proteína.

Una cantidad adecuada de muestra (50,0 g de caseína clorhídrica comercial) se dispersó en agua destilada ajustada al pH óptimo de dispersión preelegido (10,5) en la relación sólido:agua 1:20. La mezcla fue agitada por 1 hora a temp. amb., reajustando el valor de pH cuando era necesario. Se centrifugó y decantó el líquido sobrenadante a través de tela de acero inoxidable (200 mallas/cm), recogiendo en matraz aforado (2 l).

Sobre el residuo se practicó un lavado acuoso (agua destilada ajustada a pH 10,5; relación sólido:agua 1:5) y luego se operó con dos dispersiones sucesivas más en las condiciones ya señaladas, pero con relaciones sólido:agua 1:10.

El residuo se lavó con etanol 95 %, llevó en estufa de vacío a 100° hasta peso constante y se determinó nitrógeno.

Los líquidos decantados reunidos se llevaron a volumen. Una parte del mismo se destinó para valorar el nitrógeno dispersado y el remanente se ajustó al valor de pH elegido como isoeléctrico (4,5; temp. amb.), separando el coágulo proteico por centrifugación (30 min, 2800 rpm).

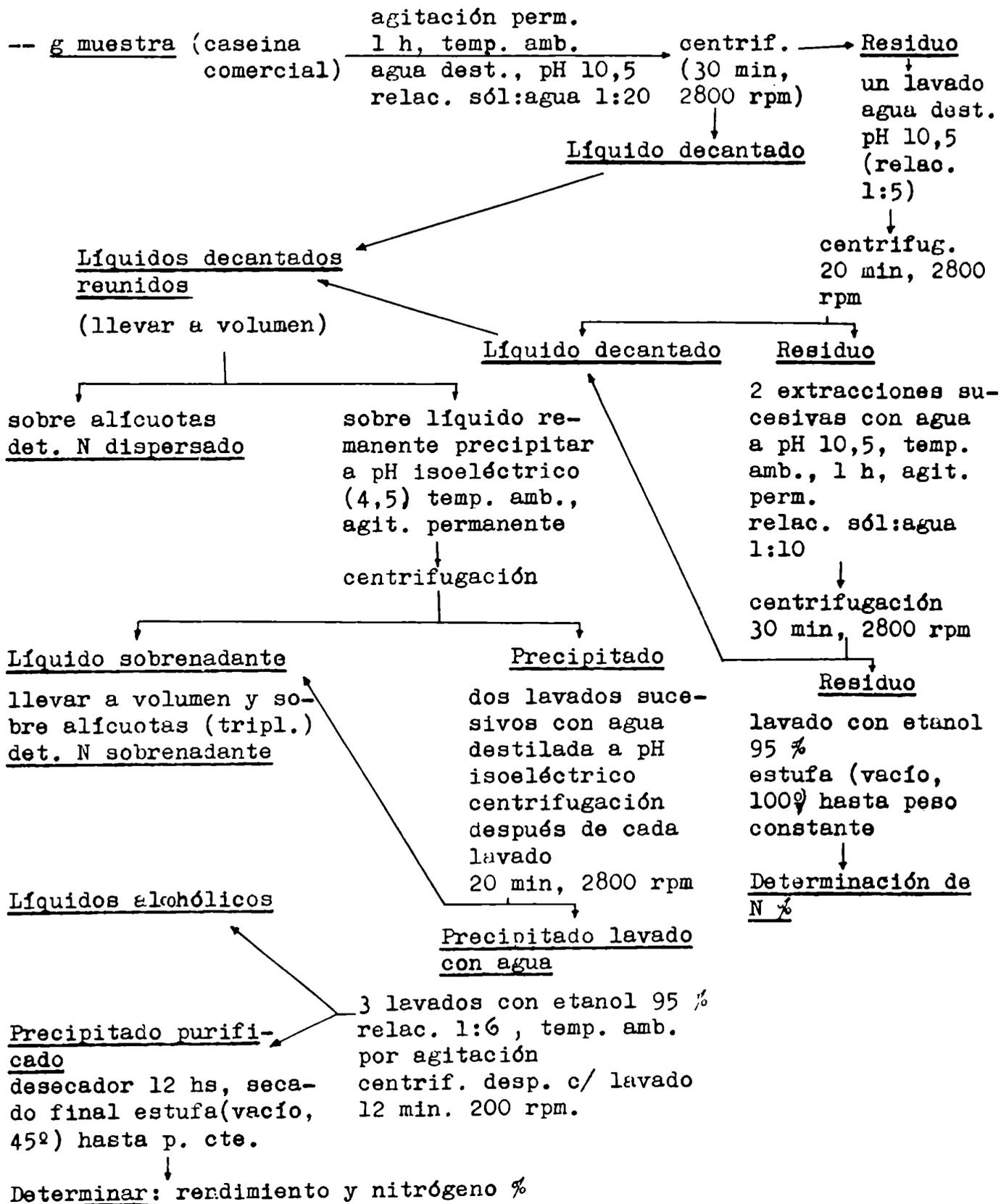
Después de decantar el líquido sobrenadante en matraz aforado, el precipitado de proteína cruda se lavó dos veces (por agitación a fondo) con agua destilada ajustada al valor del pH isoeléctrico, centrifugando después de cada lavado (20 min, 2800 rpm). Sobre los líquidos sobrenadantes de la precipitación y de lavados reunidos y llevados a volumen, se determinó (por triplicado) el nitrógeno sobrenadante.

Las proteínas así lavadas se extrajeron por tres veces con etanol 95 % (3 lavados sucesivos, desmenuzando a fondo el coágulo por agitación), usando la relación mínima (g proteína seca: ml solvente 1:6) y a temp. amb..

Sobre las proteínas purificadas, previamente secadas en vacío a 45° se determinaron: rendimiento y contenido en nitrógeno (triplicado).

El esquema general que sigue resume todas las etapas realizadas.

Esquema general. Balance de la distribución del N total en el aislamiento de proteínas a partir de caseína comercial.



3)- Caseína aislada a partir del producto comercial. Macrotécnica de laboratorio.

Se procedió de acuerdo con las condiciones operatorias definidas en experiencias anteriores, donde se fijaron los valores de pH de dispersión óptima y de máxima precipitación.

3.1. Dispersión del material nitrogenado.

En balón de tres bocas, provisto de agitador, se dispersó por separado partidas de 200 g de caseína comercial por agitación permanente durante 1 hora, a temp. amb. en 4000 ml de agua destilada, manteniendo el valor de pH óptimo de dispersión (10,5) por añadido de solución de HONa 5 N. Por centrifugación se separó el líquido sobrenadante del residuo. Este último se trató con 1000 ml de agua destilada ajustada a pH 10,5, centrifugó nuevamente para separar el líquido sobrenadante que se reunió al anterior. El residuo se sometió nuevamente a dos dispersiones sucesivas con 2000 ml cada una de agua destilada a pH 10,5 (relación sólido:agua 1:10), en las condiciones ya señaladas. Al término de cada dispersión se centrifugó y el sobrenadante se unió a los anteriores.

3.2. Precipitación.

Se operó por añadido de solución de HCl 5 N y ajuste al valor de pH isoeléctrico elegido (4,5 - 4,6) con solución de HCl diluido (0,5 N), a los líquidos de dispersión de la etapa anterior. Se realizó a temp. amb. y con agitación permanente hasta estabilidad en el pH mencionado. El precipitado se separó por centrifugación, después de lo cual y por dos veces sucesivas, se lavó con agua destilada ajustada a pH 4,5 (resuspensión del precipitado por agitación) (relación sólido:agua 1:6), centrifugando luego de cada lavado. Los líquidos

decantados se desecharon.

3.3. Purificación.

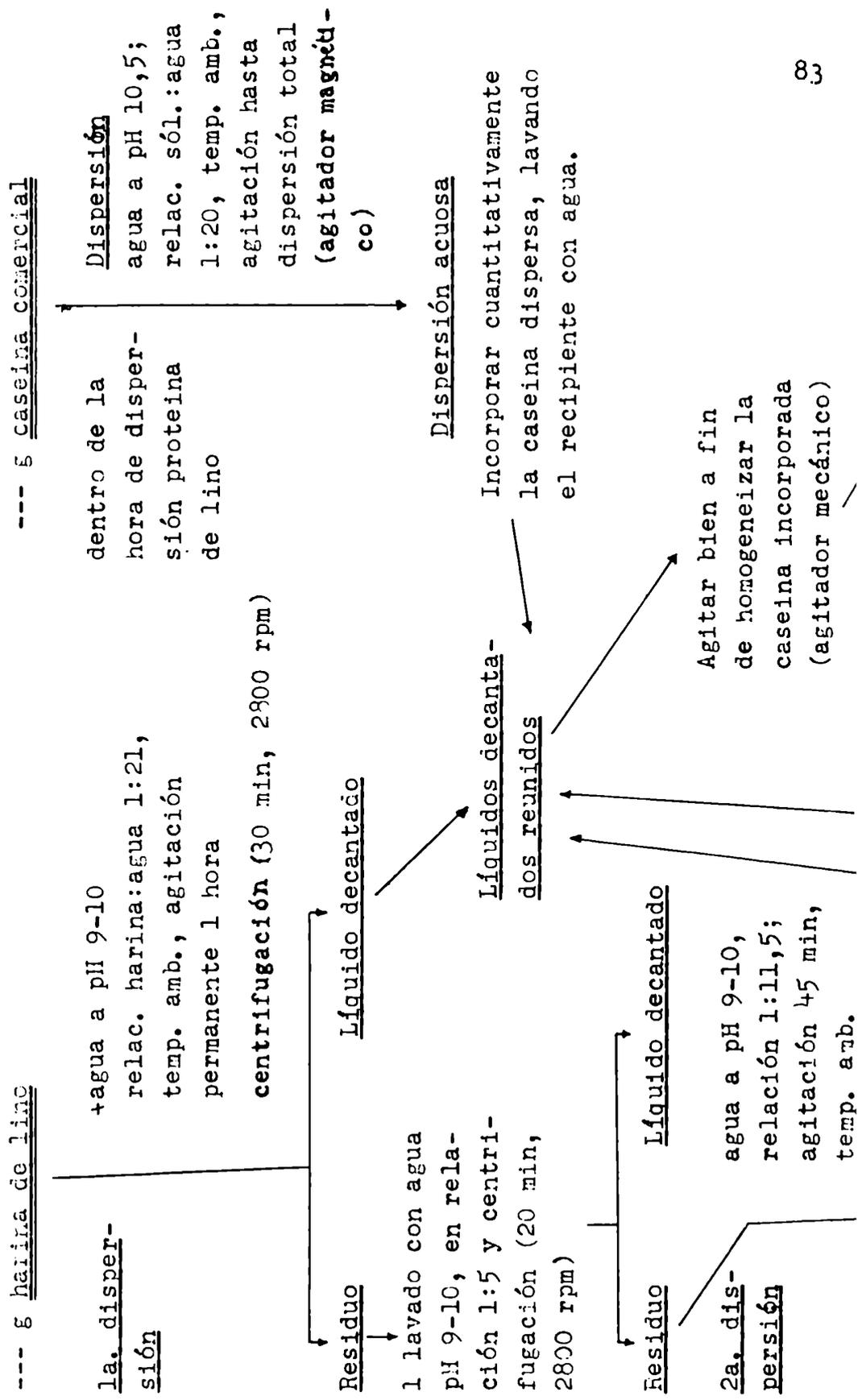
Los coágulos anteriores se lavaron por agitación enérgica y por 3 veces consecutivas, a temp. amb. con etanol 95 % (2 veces con 1200 ml, relación sólido:solvente 1:6 y una vez con 600 ml, relación 1:3), lavando finalmente con unos 300 ml de éter etílico (a fin de acelerar el secado). Se centrifugó después de cada lavado.

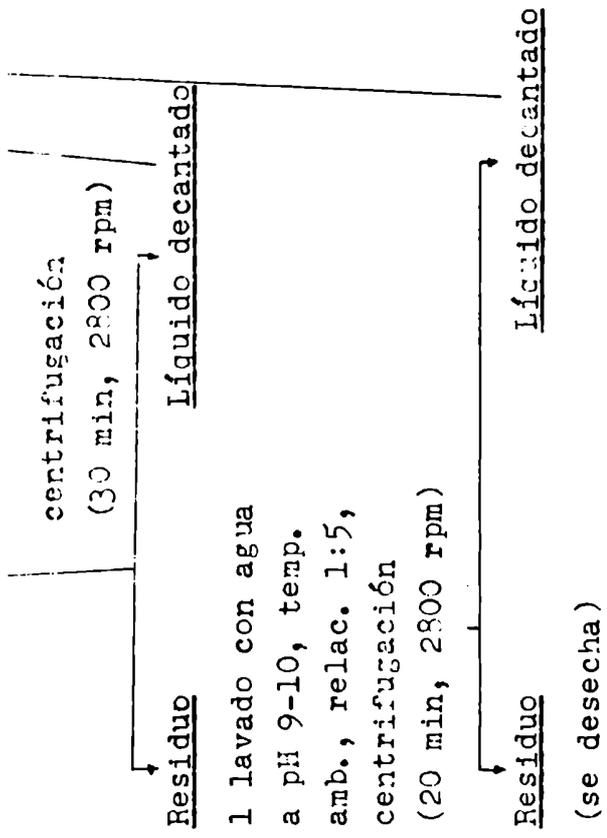
3.4. Secado.

Los coágulos así purificados se dejaron por unas 12 horas en desecador y luego se extendieron en capa delgada en estufa de vacío (5 Torr) donde se mantuvieron hasta peso constante (45°).

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

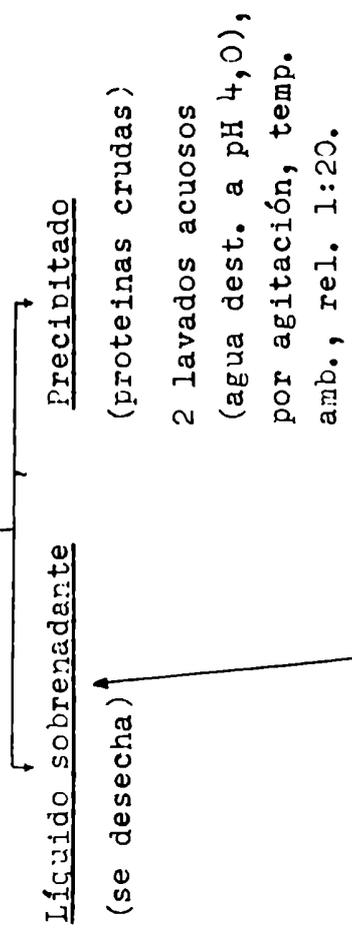
4) - Obtención de "aislado" de proteína de lino suplementado con caseína. Método de coprecipitación en macro-escala de laboratorio.





Coprecipitación

por ajuste a pH de máxima precipitación (4,0) con HCl, temp. amb., agitación permanente, hasta 5 min después de alcanzado el valor de pH deseado.



Proteínas coprecipitadas purificadas
aprox. 12 hs en desecador, secado final en capa delgada (vacío, 5 Torr, 45°C).
Determinación de: rendimiento,
N, cenizas, pérdida a 100° (vácío), lis. disponible, fósforo total, fósforo (ác. fítico), hidratos de carbono, UPN y D.

1 lavado con éter etílico, relac. 1:10.

5)- Determinación de lisina disponible.

Se aplicó la técnica de Conkerton y Frampton (53) según se describe a continuación.

5.1. Reactivos y soluciones.

Sol. NaHCO_3 al 10 %.

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

Sol. HCl 6 N.

Sol. HCl 1 N.

5.2. Técnica.

5.2.1. Preparación de 2,4-dinitrofenilproteínas.

100 - 300 mg de muestra (por cuadruplicado) se pesaron en erlenmeyer de 500 ml. Se agregaron 3 bolitas y 10 ml de la sol. de NaHCO_3 a cada recipiente. Se mezcló bien y dejó en reposo por 10 min. a la temp. de la habitación. Luego se agregaron 10 ml de sol. alcohólica de 2,4-dinitrofluorobenceno a tres de los recipientes. Todos fueron sacudidos suavemente en agitador mecánico horizontal por 2 horas a temp. amb..

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

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

La cuarta muestra, a la cual no se agregó 2,4-dinitrofluorobenceno y que sirvió como blanco, fue extraída con dos porciones sucesi-

vas de éter etílico (50 ml).

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

5.2.2. Hidrólisis de 2,4-dinitrofenilproteínas.

Las muestras y el blanco se hidrolizaron por 6 hs (autoclave, 121°; 16 libras de presión) con HCl 6 N (50 ml). Inmediatamente y aún calientes, los productos de hidrólisis fueron filtrados a través de crisoles filtrantes de vidrio prensado (G3) ayudando con vacío. Se lavaron con agua destilada, el erlenmeyer y el filtro hasta un volumen cercano pero menor que 100 ml. Se trasvasaron a matraces aforados de 100 ml, completando el volumen con agua destilada, mezclando bien.

5.2.3. Determinación colorimétrica de ϵ -2,4-dinitrofenilalanina.

De cada hidrolizado se separó una alícuota de 10 ml que fue extraída en ampolla de decantación con 4 sucesivas porciones de éter etílico (50 ml c/u) para eliminar los 2,4-dinitrofenilaminoácidos interferentes y el resto de 2,4-dinitrofenol. El blanco se lavó solamente dos veces con éter etílico. Las alícuotas así lavadas se diluyeron a 100 ml con agua destilada en matraces aforados.

De cada solución se midieron alícuotas por duplicado (3 - 5 ml, dependiendo de la intensidad del color) en matraces aforados de 25 ml. Una de ellas fue diluida a volumen con HCl 1 N y la otra con sol. acuosa de NaHCO₃ 10 %.

Se agitaron para mezclar bien y se leyeron las absorbancias respectivas en espectrofotómetro a 360 nm, usando el blanco corres-

pondiente como solución de referencia.

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

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

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

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

$$(\xi \text{-DNP-lisina}) = \frac{A_1 - K_1(\text{DNP})}{K_2}$$

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

6)- Evaluación biológica de los aislados proteicos obtenidos.

6.1. Métodos.

6.1.1. Utilización Proteica Neta (UPN).

Se realizó de acuerdo con el método de Miller y Bender (54) utilizando ratas de la cepa Wistar, sin discriminación de sexo.

Los animales, de aprox. 30 días de edad y entre 50 y 60 g de peso fueron alojados individualmente en jaulas metálicas con fondo de alambre tejido, y alimentados durante 24 hs con dieta libre de proteínas.

Posteriormente se distribuyeron en lotes de 4 ratas cada uno, de tal forma que los pesos promedio de los distintos lotes no difirieran en más de 2 g (^). Los lotes fueron ubicados en forma vertical uno junto al otro (^).

Durante 10 días los animales fueron alimentados "ad libitum" con dietas en ensayo, a excepción de un lote que lo fue paralelamente con dieta libre de proteína. En todos los casos se les suministró agua destilada sin restricción.

La temperatura ambiente durante toda la experiencia se mantuvo en aprox 21°.

Diariamente se registró la cantidad de dieta ingerida, y los animales fueron pesados cada dos días a fin de controlar la evolución normal de la experiencia.

(^)- El loteo realizado en esta etapa evita errores por pérdida desigual de peso durante el día en que se suministra dieta carente de proteínas.

(^^)- Se logra así que las condiciones ambientales afecten por igual a los distintos lotes.

Una vez transcurrido el tiempo señalado, los animales fueron sacrificados en atmósfera de cloroformo y colocados sobre bandejas de aluminio. Se les practicaron un corte longitudinal y dos transversales, y fueron secados en estufa de aire a 100° durante 48 hs, registrándose la pérdida de peso individual. Conocido así el contenido en agua, se calculó el nitrógeno corporal mediante la ecuación que representa la relación N/H₂O f(edad), que para la cepa utilizada fue la siguiente (^):

$$y = \frac{2,76 + 0,0293x}{100} \quad \text{donde } y = \frac{N(g)}{H_2O(g)} \quad ; \quad x = \text{edad}$$

en días en el momento del sacrificio.

La UPN se obtuvo mediante la fórmula:

$$UPN = \frac{B - (B_k - I_k)}{I} \cdot 100 \quad \text{donde } B \text{ y } B_k \text{ representan}$$

el contenido en N corporal de los animales alimentados con la dieta en ensayo y con la dieta libre de proteínas respectivamente. I e I_k constituyen las ingestas de N respectivas; B, B_k, I e I_k son totales para cada lote, es decir la sumatoria de los cuatro valores individuales.

(^)- Ecuación proporcionada por el personal de la cátedra de Bromatología y Nutrición Experimental de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), obtenida por experiencias propias para la cepa y condiciones de trabajo utilizadas.

6.1.2. Digestibilidad (D).

Se realizó simultáneamente con el ensayo anterior, de acuerdo con la técnica de Miller y Bender (54).

A partir del cuarto día de experiencia y hasta el fin de la misma se recogió diariamente (en forma individual) la materia fecal de 2 a 3 ratas de cada lote y de 3 del lote "libre de proteínas". Las heces fueron tratadas por acetona (eliminación de grasa) adicionada de unas gotas de HCl (c) (como conservador) durante el curso de la experiencia. Al final de la misma fueron lavadas con acetona (eliminación de los restos de dieta que pudieran quedar adheridos) y secadas bajo lámpara IR. Posteriormente se determinó su peso, y previa molienda en mortero a fin de lograr su homogeneización, su contenido en nitrógeno (ver Pte. Exptal. 1.1.).

Se aplicó la fórmula:

$$D = \frac{I - (F - Fk)}{I}$$

donde F es el nitrógeno total en las heces de cada uno de los animales en experiencia, Fk es el nitrógeno total promedio en las heces de las ratas alimentadas con la dieta libre de proteína e I es el nitrógeno total ingerido a partir del cuarto día para el animal elegido.

Finalmente fueron promediados los valores de D para un mismo lote.

6.2. Dietas.

6.2.1. Preparación.

6.2.1.1. Dieta base.

Teniendo en cuenta las proporciones señaladas posteriormente en Composición (6.2.2.), se realizó en primer lugar la homogeneización en mortero de las sales minerales junto con las vitaminas hidrosolubles. Luego se agregó la solución de colina y se introdujo parte de la dextrina hasta obtener un producto seco, el cual, junto con el resto de la dextrina, se homogeneizó durante 10 min en una mezcladora a paletas. Posteriormente y sin detener el batido, se añadieron los lípidos adicionados de las vitaminas liposolubles. Se continuó la agitación durante 45 min.

6.2.1.2. Dietas de prueba.

Se homogeneizaron en mezcladora a paletas los siguientes componentes: dieta base (50 %), aislado proteico (10 % proteína = N x 6,25) y dextrina para completar, durante 20 min.

Se guardaron en bolsas de polietileno y en cámara frigorífica hasta su utilización.

6.2.1.3. Dieta libre de proteínas.

Se homogeneizaron en mezcladora a paletas durante 20 min: dieta base (50 %) y dextrina (50 %).

Se guardó en las mismas condiciones que las dietas de prueba.

6.2.2. Composición

La composición de la dieta base fue la siguiente:

<u>Componentes</u>	<u>%</u>
minerales	10
vitaminas hidrosolubles	0,5
vitaminas liposolubles	1,0

colina (^)	0,3
lípidos (^^)	9,0
proteínas	---
dextrina	79,2

(^)- Se utilizó citrato de colina al 60 %.

(^^)- Se utilizó aceite de soja.

El detalle sobre la composición de las mezclas de minerales, vitaminas hidrosolubles y liposolubles figura en la Tabla 18.

Tabla 18

Composición de las mezclas de sales minerales, vitaminas hidrosolubles y vitaminas liposolubles utilizadas en la preparación de la dieta^{base}(55).

Mezcla de sales minerales.

<u>Componentes</u>	<u>%</u>
CO ₃ Ca	29,29
PO ₄ H ₂ K	34,31
PO ₄ HCa.2H ₂ O	0,43
Cl ₂ a	25,06
SO ₄ Mg.7H ₂ O	9,98
Fe(C ₆ H ₅ O ₇).6H ₂ O	0,623
SO ₄ Cu (anh.)	0,156
SO ₄ Mn.H ₂ O	0,121
Cl ₂ Zn	0,02
IK	0,0005
Mo ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆ .4H ₂ O	0,0025

Mezcla de vitaminas hidrosolubles.

La mezcla de vitaminas hidrosolubles aporta por 100 g de dieta de prueba:

	<u>mg</u>
VB1	0,5
VB2	0,5
niacina	2,5
VB6 HCl	0,25
VB12	0,002
VK	0,05
pantotenato de Ca	2,0
ácido fólico	0,02
biotina	0,01
inositol	10,0
VC	5,0

Mezcla de vitaminas liposolubles.

La mezcla de vitaminas liposolubles aporta por 100 g de dieta de prueba:

VA	400 U.I.
VD	40 U.I.
VE	10 U.I.

disueltas en 5 g de aceite de maíz.

6.2.2.2. Dietas de prueba.

Para posibilitar el cálculo de la cantidad de aislado a introducir en las dietas a fin de obtener un 10 % en proteína, se determinó el contenido acuoso de los mismos, escaso tiempo antes de la preparación de las dietas.

Una vez elaboradas se determinó para cada una su contenido en humedad, nitrógeno, extracto graso (hexano) y valor calórico (Pte. Exptal. 7).

Los resultados obtenidos figuran en la Tabla 19.

Tabla 19

Datos analíticos de las dietas de prueba.

Dieta conteniendo los aislados señalados	N(%)	Prot.(%) (N×6,25)	H2O(%)	Extracto graso(%) (hexano)	Valor calórico		P%([^])
					kcal/g	kJ/g	
lino	1,54	9,63	8,42	4,54	4,75	19,87	8,11
coprec. 5 %	1,76	11,03	8,30	4,35	4,65	19,45	9,48
coprec. 10 %	1,61	10,07	8,43	4,48	4,75	19,87	8,48
coprec. 15 %	1,61	10,08	8,02	4,82	4,64	19,41	8,69
coprec. 20 %	1,64	10,23	8,18	4,42	4,63	19,37	8,84
coprec. 40 %	1,65	10,29	7,78	4,52	4,68	19,58	8,80
caseína	1,68	10,47	8,01	4,80	4,90	20,50	8,54

([^])- P%= Calorías proteicas = kcal aportadas por las proteínas/100 kcal dieta.

6.2.2.3. Dieta libre de proteína.

Para la dieta libre de proteína obtenida se lograron los si-

güentes resultados:

nitrógeno (%): 0,08; humedad (%): 8,52; extracto graso (hexano)(%): 4,72 y valor calórico (kcal/g): 3,97, (kJ/g): 16,61.

7)- Determinación del valor calórico (VC) de las dietas.

Se determinó en bomba calorimétrica, modelo balístico (Ballistic Bomb Calorimeter).

Se trabajó a 24 atm de presión de oxígeno.

7.1. Calibración de la bomba.

7.1.1. Corrección por calor de combustión del hilo.

Como el hilo de algodón utilizado para llevar la ignición a la pastilla (de largo constante) libera calor durante la combustión, se determinó la deflexión del galvanómetro originada únicamente por la combustión del mismo (θ_1). El valor obtenido por sextuplicado fue: $\theta_1=2$.

7.1.2. Calibración con la sustancia "standard".

Se hicieron pastillas de ácido benzoico (patrón, grado termoquímico) de 0,30 - 0,35 g, y se determinó la deflexión del galvanómetro originada por su combustión (θ_2). Conociendo el valor calórico del ácido benzoico (6,32 kcal/g) y la masa pesada en cada caso (w_i), la constante de calibración Y se calculó como:

$$Y = \sum_i w_i \quad \text{donde } Y_i = \frac{6,32 w_i}{\theta_2 - \theta_1} \quad \text{kcal/div. (para cada det.)}$$

El valor experimental de Y resultó 0,0923.

7.2. Combustión de las dietas. Cálculo de su VC.

Se hicieron pastillas de cada dieta (0,30 - 0,40 g) lográndose

para cada caso la deflexión resultante de su combustión (θ_3) en forma similar a la realizada para el ácido benzoico. Conociendo la constante de calibración calculada anteriormente y la masa exacta de dieta pesada (z) se determinó el valor calórico de cada dieta del siguiente modo:

$$VC \text{ (kcal/g)} = (\theta_3 - \theta_1) Y/z$$

Los valores consignados en la Discusión de la Pte. Exptal. se lograron por promedio de 3 determinaciones sucesivas.

8)- Determinación de fósforo total.

La técnica que se describe a continuación (56) se aplicó a la determinación de fósforo total en las proteínas finales aisladas de los materiales de partida (harina de lino y caseína comercial) y en los distintos productos de coprecipitación (proteína de lino adicionada de cantidades crecientes de caseína).

8.1. Soluciones y reactivos.

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

H₂SO₄ conc. (d: 1,84)

HNO₃ 65 %

H₂SO₄ 10 N

urea

Sol. de molibdato de amonio 5 ‰

Reactivo de Fiske-Subbarow: preparado por agregado de 0,5 g de Na₂SO₃ puro a una solución de 15 g de NaHSO₃ puro en 80 ml de agua bidestilada, completando a volumen de 100 ml. A esta solución se agregaron 0,25 g de ácido 1-amino-2naftol,4-sulfónico, agitando enérgicamente

durante unos minutos. Se dejó en reposo (30 min.), agitó nuevamente y filtró por papel. Se conservó en fresco caramelo de buen cierre.

8.2. Técnica.

8.2.1. Destrucción de materia orgánica.

Se pesó exactamente una cantidad conveniente de muestra ("aislados proteicos": 0,30 - 0,35 g), de acuerdo con una estimación previa de posible contenido en fósforo. Se adicionaron 5 ml de H₂SO₄ conc. (d. 1,84) y 10 ml de HNO₃ 65 %, calentando cuidadosamente hasta aparición de humos blancos (sulfúricos). Se agregaron sucesivas porciones de HNO₃ 65 % (una de 10 ml y 3 de 2 ml) calentando después de cada agregado hasta humos blancos, hasta obtener un líquido limpio e incoloro (destrucción completa de materia orgánica). Se agregaron 2 ml de agua bidestilada y unos cristallitos de urea y se calentó nuevamente hasta humos blancos (eliminación de restos de HNO₃).

El producto de la mineralización se trasvasó a matraz aforado de 50 ml, llevó a volumen, midió una alícuota que se diluyó 10 veces (en todos los casos con agua bidestilada).

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

8.2.2. Reacción colorimétrica.

Sobre el producto de la mineralización anterior, se procedió a la valoración colorimétrica del fósforo total, según la técnica de Bartlett (57), de acuerdo con el orden de agregado de reactivos que se indica a continuación.

- Medición del blanco o muestra (tres alícuotas con distintos volúmenes, siendo el volumen mayor a medir de 2,10 ml) en tubos de aprox.

15 ml de capacidad.

- Agua bidestilada hasta completar a 2,10 ml de volumen total, si las alícuotas fueron de menores volúmenes.
- 0,50 ml de H₂SO₄ 10 N, por igual a todos los tubos (blancos y muestras).
- 2,00 ml de agua bidestilada a cada tubo, completando así un volumen de 4,60 ml en total.
- 0,20 ml de sol. de molibdato de amonio.
- 0,20 ml de reactivo de Fiske-Subbarow, que completan un volumen total de 5 ml en cada tubo.

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

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

Los contenidos en fósforo total se calcularon en base a la curva de calibración lograda con sol. patrón de KH₂PO₄ (200 µgP/100ml), operando en igualdad de condiciones.

Los resultados se expresaron como P total % de muestra.

9)- Determinación de fósforo correspondiente a ácido fítico.

La técnica que se transcribe (58) se aplicó a los aislados

proteicos obtenidos a partir de la harina de lino, de caseina comercial y de los distintos productos de coprecipitación (proteína de lino adicionada de cantidades crecientes de caseina).

9.1. Soluciones y reactivos.

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

- Sol. ácido tricloroacético (TCA) al 3 % (p/v).
- Sol. FeCl_3 (2mg Fe^{+3} /ml en TCA al 3 %).
- Sol. Na_2SO_4 al 3 % en TCA al 3 %.
- Sol. HCl 0,5 N.
- Sol. HCl 0,1 N.
- Sol. NaOH 1,5 N.
- Sol. o-fenantrolina 0,1 %.
- Sol. clorhidrato de hidroxilamina al 10 %.
- Sol. buffer de acetato de Na 2 M (272 g $\text{NaOAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}/1$).
- Sol. azul de bromofenol (0,1 g de la droga, disolver en 1,5 ml de NaOH 0,1 N y llevar a 25 ml con agua destilada) (indicador, zona de viraje pH 3,0 - 4,6).
- Sol. patrón de Fe^{+3} : Disolver 3,512 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p.a. en agua destilada, agregar 5 gotas de HCl conc. y diluir a 500 ml con H_2O destilada (1ml : 1 mg Fe).
- Sol. patrón de Fe^{+3} diluida: Preparada por dilución de 10 ml de la solución anterior a 1 l con agua destilada (1ml : 0,01 mg Fe).

9.2. Técnica.

9.2.1. Extracción de fitatos y precipitación como sal férrica.

Se pesó exactamente una cantidad de muestra que contuviera en-

tre 5 y 30 mg de P de fitato (aprox. 1,5 - 2,0 g) y colocó en erlenmeyer de 250 ml. Se extrajo con 50 ml de TCA 3 % por 30 min (agitación magnética), con agitación manual ocasional para bajar el material adherido a las paredes por encima del nivel del líquido. Se centrifugó (20 min, 2800 rpm) y filtró el sobrenadante por papel de poro cerrado (b. azul S.&S.).

Se transfirieron 15 ml del filtrado a un tubo de centrifuga cónico (aprox. 40 ml de capacidad). Se agregaron 4 ml de solución de FeCl_3 , 2 o 3 gotas de solución NaSO_4 3 % en TCA 3 % y calentó en baño de agua hirviente por 1 hora. Se centrifugó (20 min, 1500 rpm) y decantó cuidadosamente el sobrenadante claro. Se lavó dos veces el precipitado por dispersión en 20-25 ml de TCA 3 %, calentando en baño de agua hirviente y centrifugando después de cada lavado. Se lavó finalmente con agua destilada en igual forma (el precipitado de fitato férrico así lavado deberá ser blanco o blanco-crema, sino lavar nuevamente). Se dispersó el precipitado en pocos ml de agua destilada y se agregaron 3 ml de solución de NaOH 1,5 N, mezclando bien. Se llevó aprox. a un volumen de 30 ml y calentó en baño de agua hirviente durante 30 min a fin de coagular el $\text{Fe}(\text{OH})_3$ recién precipitado. Se lavó (2 veces) el precipitado con porciones de 60-70 ml de agua destilada caliente, centrifugando después de cada lavado y desechando el líquido sobrenadante.

Se disolvió el $\text{Fe}(\text{OH})_3$ lavado en 1 ml de HCl 0,5 N calentando en baño de agua hirviente (aprox. 10 min) y trasvasando a matraz aforado de 100 ml con ayuda de 10 - 25 ml de HCl 0,1 N (la cantidad de HCl total deberá tenerse en cuenta para que al incorporar la solución buffer quede dentro de la zona de viraje del indicador) y finalmente con agua destilada para llevar a 100 ml.

9.2.2. Reacción colorimétrica.

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

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

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

Se preparó la curva standard midiendo alícuotas de la sol. patrón diluida de $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)2.6\text{H}_2\text{O}$ (1ml : 0,01 mg Fe), y desarrollando la reacción colorimétrica.

Se interpoló en la curva standard el valor de absorbancia correspondiente a la muestra, despejando la concentración de Fe. Se tuvieron en cuenta las diluciones realizadas y la cantidad de muestra pesada para obtener el valor de Fe (proveniente de fitato férrico) % de muestra. Dicho valor dividido por 1,20 da el valor de P fítico % muestra.

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

10)- Determinación de hidratos de carbono totales.

La concentración en hidratos de carbono totales fue determinada por el método colorimétrico fenol-sulfúrico (59) (60).

10.1. Reactivos y soluciones.

- Sol. de fenol al 5 %: preparada disolviendo en agua destilada 5 g de fenol (destilado bajo nitrógeno), llevando a 100 ml.
- H₂SO₄ conc. (96 %) grado analítico.
- Sol. patrón de galactosa: preparada disolviendo galactosa patrón en agua destilada y llevando a volumen (1 ml de esta solución deberá contener alrededor de 70 μ g de galactosa).

10.2. Técnica.

A 1 ml de la dispersión acuosa de la muestra conteniendo entre 10 y 70 μ g de hidratos de carbono totales, introducida en tubo de ensayos, se agregó 1 ml de la sol. de fenol al 5 % y mezcló bien. Por medio de una pipeta de escurrimiento rápido (cuyo orificio de salida fue agrandado) se agregaron 5 ml de H₂SO₄ conc., agitando bien para distribuir uniformemente tanto el reactivo como el calor desarrollado por la reacción. Después de 10 min de reposo, se introdujo el tubo en un baño de agua a 25-30° por 20 min. Paralelamente se realizó un blanco con 1 ml de agua destilada en lugar de la muestra. Se midieron las absorbancias de la muestra y del blanco en espectrofotómetro a 492 nm (^) (hexosas) en cubas de cuarzo de 1,000 cm de espesor, frente a agua destilada.

Para cada determinación se midieron triplicados de la muestra

- (^)- Previamente a la obtención de la curva de calibración (standard) se fijó la posición del máximo de absorbancia para la reacción con galactosa patrón (70 μ g) entre 400 y 500 nm.

y del blanco y se calcularon los valores promedio de las absorban-
cias respectivas. Luego de sustraer el valor del blanco, se determi-
nó la cantidad de hidratos de carbono a través de la curva de cali-
bración previamente preparada para un azúcar particular (galactosa
patrón).

PARTE IV

RESUMEN Y CONCLUSIONES

PARTE IVRESUMEN Y CONCLUSIONES

1)- Se presenta una revisión acerca de los antecedentes sobre mejoras en el valor nutritivo de fuentes proteínicas vegetales con proteínas de origen animal (de alto valor biológico) con destino a la alimentación humana y se mencionan nuevos enfoques sobre planes nutricionales que consideran el aprovechamiento de subproductos de ambos tipos de fuentes.

En vista del incremento en la demanda de alimentos proteicos, las tortas, "expellers" y harinas residuales de la separación del aceite representan actualmente subproductos de alto valor comercial, al igual que los subproductos de origen animal.

Se hace referencia a la situación actual, en relación a niveles de producción de semilla de lino y de caseína comercial, materiales de partida en la conducción del presente trabajo.

Se presenta la información recogida sobre estudios de suplementación en general, de aislados proteicos por incorporación de proteínas de leche y de caseína comercial, desde que no existen antecedentes en particular sobre suplementación de proteínas de lino.

Paralelamente se hace una revisión de los resultados logrados en trabajos previos (conducidos en este laboratorio) sobre aislamiento de las proteínas de harina de lino y sus características físico-químicas y nutricionales. Se informa sobre antecedentes de literatura acerca de dichas características evaluadas en caseínas industriales.

2)- El objeto fundamental de este trabajo fue el de conducir el es-

tudio de las condiciones óptimas de aislamiento de proteínas mixtas homogéneas logradas por coprecipitación de los materiales nitrogenados dispersados de la harina de lino y de caseína comercial. Se considera la obtención de una serie de tales aislados mixtos suplementados en proporciones crecientes con caseína y el estudio comparativo de las características físicas, químicas y nutricionales de todos ellos frente a las del aislado proteico de lino sin suplementar y a las de caseína considerada como patrón de referencia por su alto valor biológico.

El método de aislamiento de las proteínas consistió en la aplicación del procedimiento clásico de dispersión acuosa alcalina y precipitación en medio ácido al pH de máxima coprecipitación y la purificación del aislado finalmente obtenido. Se realizó la evaluación de las distintas características antes mencionadas sobre los aislados así logrados.

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

a)- La harina integral de extracción (hexano, en laboratorio) de semilla de lino, registró 6,7 % de N ($6,7 \times 6,25 = 42,125$ % de proteína), 9,6 % de fibra cruda y 5,8 % de cenizas en base seca. El valor hallado para proteína la señala como un "concentrado" proteínico potencial. Teniendo en cuenta la presencia de factores tóxicos y antinutricionales presentes en la semilla y en la harina y que el aislado proteico está libre de ellos (según se menciona en los antecedentes) su utilización en la alimentación humana y animal estaría condicionada a la obtención de este último.

El elevado valor en nitrógeno 14,1 % ($N \times 6,38 = 90,138$ % de pro-

teina) y el contenido en cenizas 4,3 %, ambos en base seca, unidos a sus características organolépticas satisfactorias, encuadran a la caseína clorhídrica comercial utilizada, como un subproducto de muy buena calidad (los valores de $N \times 6,38$ superiores a 95 % se dan para caseínas puras para propósitos de investigación).

b) Se aislaron, en escala macro de laboratorio y de acuerdo a condiciones óptimas estudiadas en trabajos previos, las proteínas del lino, con rendimientos que oscilaron alrededor del 24 % respecto de la harina integral de partida, con características físicas satisfactorias (polvo blanco fino, inodoro, insípido), con los siguientes valores analíticos: cenizas 0,69 %; N total 12,99 %, proteína cruda ($N \times 6,25$) 81,19 % en base seca.

En base a una serie de ensayos previos se eligió el valor de 10,5 como pH óptimo de dispersión del material nitrogenado de la caseína comercial y el de 4,5 - 4,6 (zona de pH 4,3 - 4,6) como de máxima precipitación, ambos a temperatura ambiente. El perfil de solubilidad representado en base a los valores de nitrógeno sobrenadante después de precipitación versus valores de pH, revelaron una meseta que abarca la zona de pH 4,1 - 4,8 con muy ligero cambio en la solubilidad de las proteínas, característica concordante con lo señalado en literatura para caseína clorhídrica comercial, para la cual se menciona que no obstante presentar un valor mínimo de solubilidad a pH 4,6, su redisolución en medios ligeramente ácidos o alcalinos es poco apreciable. Esta circunstancia favoreció un mayor rendimiento en la coprecipitación con las proteínas de lino, cuyo valor de pH de máxima precipitación oscila alrededor de 4,0.

Según se pudo evaluar en un ensayo de balance cuantitativo de

nitrógeno separado en las diferentes operaciones de obtención del aislado, se solubilizó (en dos etapas de dispersión y un lavado del residuo) alrededor del 99,0 % de la caseína comercial de partida y se precipitó, a pH 4,6, el 94,0 % del nitrógeno dispersado (incluyendo dos lavados del coágulo con agua a pH isoeléctrico y cuatro lavados etanólicos sucesivos antes del secado).

Las características físicas del aislado obtenido, evaluadas sobre el producto final logrado de ensayos en escala macro de laboratorio, fueron altamente satisfactorios (granulado fino, blanco, olor suave característico) cuyos valores analíticos fueron: cenizas 4,05% y nitrógeno 14,88 % en base seca.

c)- Los mayores rendimientos en aislados coprecipitados a diferentes niveles de suplementación con caseína se lograron a pH 4,0, valor de máxima precipitación de las proteínas de lino y al cual coprecipita prácticamente el total del material nitrogenado de la caseína comercial, con un contenido en lisina disponible prácticamente similar respecto del aislado coprecipitado a pH 4,5 - 4,6 (pH isoeléctrico de la caseína).

Los rendimientos (promedio), estimados en procedimientos en escala macro de laboratorio, evidenciaron un ligero aumento a medida que se incrementaba el nivel de suplementación de caseína en la mezcla en coprecipitación: 25,4 (5 %), 25,3 (10 %), 27,4 (15 %), 27,2 (20 %) y 31,6 (40 %).

d)- Los valores hallados para lisina disponible en los respectivos aislados muestran una correlación casi perfecta ($r = +0,997$) respecto del porcentaje de caseína en el aislado mixto.

e).- Sobre la base de valores experimentales de lisina disponible en las proteínas de los productos de partida, su comparación con el patrón de aminoácidos esenciales de referencia (FAO) (cómputo químico) y los rendimientos logrados para los aislados respectivos, se pudo calcular "a priori", dentro de qué ámbito de suplementación de proteína de lino con caseína se lograría la mejora deseada en el valor nutritivo de la mezcla.

Estos resultados se vieron confirmados a través de ensayos biológicos efectuados con animales de experimentación, alimentados con dietas que contenían (como único factor variable) la proteína a ensayar (aislados proteicos coprecipitados a diferentes niveles de suplementación). Para ello se determinaron las UPN en función del grado de suplementación de proteínas de lino con caseína, observándose un incremento significativo en la calidad nutricional del aislado mixto ensayado, a medida que aumentaba la proporción de caseína incorporada.

El aislado obtenido de caseína comercial se consideró como proteína de referencia.

De los niveles usados, aparentemente el de 40 % en caseína mostró ser el mejor suplemento (UPNop = 73,4; caseína 71,6) correspondiendo a la relación 200 g de harina de lino y 30,07 g de caseína comercial, que por dispersión y coprecipitación del material nitrogenado, rinden el aislado mixto correspondiente.

No menos importante, es el hecho de que con suplementaciones del orden del 15 al 20 % en caseína, se aprecian mejoras en la calidad de la proteína de lino.

Se considera que el efecto benéfico en esta suplementación está correlacionado principalmente con la cantidad y disponibilidad de

la lisina, en que es deficiente primariamente la proteina de lino y la concentración del propio suplemento, desde que la caseina es muy buena fuente de dicho aminoácido.

f)- Otro punto de interés a considerar en la evaluación biológica de una proteina, es la digestibilidad verdadera. Los valores de digestibilidad son elevados para las proteinas obtenidas en forma de aislados, no obstante se registró un incremento gradual hacia mayores niveles de suplementación con caseina en los aislados mixtos: 87 % para lino sin suplementar a prácticamente 90 % con 40 % de caseina, con una correlación altamente significativa ($r = +0,967$).

g)- Con fines comparativos y complementarios de los estudios anteriormente señalados, se analizaron tanto los aislados obtenidos de los materiales de partida como los aislados mixtos coprecipitados, en sus contenidos en cenizas totales, fósforo total y fósforo de ácido fítico e hidratos de carbono totales, en los que se pudo apreciar las siguientes relaciones:

Los contenidos en cenizas totales presentan un valor máximo para el aislado obtenido a partir de caseina comercial (4,10 % b.s.), inferior al señalado para esta última (4,31 % b.s.) desde que se eliminan principalmente fosfatos en el proceso de su aislamiento.

El aislado proteico de lino, de acuerdo al método de obtención, retiene en su precipitación componentes tales como ácido fítico e hidratos de carbono (mucilago) que ocurren naturalmente en la semilla, y por lo tanto en la harina residual de extracción del aceite. Los contenidos respectivos van disminuyendo a medida que se incrementa el nivel de caseina en el aislado mixto obtenido por coprecipitación. No obstante, el contenido en fósforo, distinto del correspondiente

al de ácido fítico (fósforo remanente entre fósforo total y fósforo de ácido fítico) muestra una tendencia creciente a mayores niveles de suplementación de lino con caseína (registrando su máximo valor para caseína pura), desde que en esta última la riqueza en fósforo de fosfatos supera significativamente al tenor en fósforo total provisto por la proteína de lino.

EXPERIENCIAS FUTURAS

El presente trabajo se llevó a cabo con el objeto de estudiar las condiciones óptimas de obtención de aislados mixtos por coprecipitación, y paralelamente el efecto suplementario de niveles crecientes de caseína comercial sobre la calidad de la proteína aislada de harina integral de lino.

En experiencias futuras se considera de interés hacer lo propio en pruebas comparativas utilizando leche descremada (subproducto de mantequeras) a fin de observar si se logra un efecto superior en la eficiencia de suplementación.

Para ello se consideran útiles no sólo las determinaciones de lisina disponible y los ensayos de evaluación biológica con animales de experimentación, sino la evaluación de otros aminoácidos esenciales cuyo nivel esté relacionado a la calidad de la proteína bajo ensayo.

Cabe señalar, no obstante los resultados satisfactorios logrados, que en el aspecto nutricional se requieren ensayos de toxicidad a largo plazo respecto del aislado proteico de lino, a fin de considerar su incorporación definitiva en la alimentación humana.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1)- G.A.P., Boletín del Grupo Asesor del Sistema de las Naciones Unidas sobre Proteínas y Calorías, V, Nº 1, marzo, 1975.
- 2)- H.A. Forchieri, Tesis, "Influencia de la variedad y del avance de la época de siembra sobre la composición de semilla de lino oleaginoso y sobre rendimiento, características físico-químicas y composiciones acídicas de los aceites de extracción", Fac. de Cs. Exactas y Nat., Univ. de Bs. As. (1970).
- 3)- A.K. Smith, V.L. Johnsen y A.C. Beckel, "Linseed Proteins. Alkali Dispersion and Acid Precipitation", Ind. Eng. Chem., 38, 252 (1946).
- 4)- M.H. Bertoni y P. Cattáneo, "Aislamiento de proteínas de membrana integral de semilla de lino", Anales Asoc. Quím. Argentina, 67, 363 (1972).
- 5)- F.W. Sosulski y A. Bakal, "Isolated proteins from rapeseed, sunflower and Sunflower Meals", J. Inst. Technol. Aliment. (Canada), 7, 28 (1969).
- 6)- F.W. Sosulski y G. Sarwar, "Aminoacid Composition and Protein Isolates", J. Inst. Canadian Technol., 6, Nº1, 1 (1973).
- 7)- G. Sarwar, F.W. Sosulski y J.M. Bell, "Protein Isolates of Oilseed Meals and Protein Isolates", Canadian Sci. Technol. Aliment., 6, Nº1, 17 (1973).
- 8)- M.E. Sambucetti, G. Gallegos y J.C. Samanillo, "Proteína extraída de las semillas de lino. Caracterización y estabilidad", Arch. Latinoamer. de Nutr., 23, 111 (1973).

- 9)- H. Forchieri, M.H. Bertoni, G. Karman de Sutton y P. Cattáneo, "Aceites de semilla de lino oleaginoso. Composición química. Influencia de la época de siembra", Anales Asoc. Quím. Argentina, 53, 313 (1970).
- 10)- P. Cattáneo, Informe presentado al Sr. Presidente del Simposio Nac. de Oleaginosos, Bs. As., marzo, 1971.
- 11)- Hr. Akhtardzhiev y D. Kolev, "The composition of the mucilaginous of flax-seed", Compt. rend. acad. bulgare Sci., 10, 387 (1957); C.A., 52:14203g.
- 12)- K. Zagorski, "Hydrolytic studies on the linseed mucilage", Ann. Univ. Mariae Curie Sklodowska, Lublin-Polonia, 14, 59 (1961); C.A., 57:8877h.
- 13)- J. Kalac y J. Zemanova, "Linseed (*Linum usitatissimum*)", Food. Pr., 20, 58 (1974); C.A., 82:83042g.
- 14)- M.H. Bertoni y P. Cattáneo, "Sobre la composición de un aislado proteico de harina integral de semilla de lino", Anales Asoc. Quím. Argentina, 61, 129 (1973).
- 15)- Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, "El mejoramiento nutricional del maíz", Guatemala, 1972, oct. 1972.
- 16)- Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, "Los cursos proteínicos en América latina", 1971, agosto 1971.
- 17)- R. Jarquin, P. Noriega y K. Brasconi, "The white wheat flours with supplements of amino acid", Arch. Latinoamer. Nutr., 16, 89 (1966).

- 18)- C. Gilbert y J. Gillman, "Some methodological problems affecting the supplementation of corn assessed biologically with special reference to the value of skimmed milk powder, soybean, food yeast and casein", S. African J. Med. Sci. 24, 41 (1959); "Advances in Food Research", 16, Academic Press, New York, 1968.
- 19)- J. Lefaivre, L. Tremblay, J.P. Julien, G.J. Brissou, "Soluble milk proteins as a complement to soybean proteins", Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 5, 87 (1972); C.A., 77:125128u.
- 20)- S.M. Talley, I. Miles y J.N. Freeman, "Effect of plant protein quality and source on growth, sexual development and subsequent productivity of poultry", Feedstuffs, 45, 26, 72 (1973); C.A., 79:30785h.
- 21)- D.E. McOsker, "The limiting aminoacid sequence in raw and roasted peanut protein", J. Nutr., 76, 453 (1962); "Advances in Food Research", 16, Academic Press, New York, 1968.
- 22)- R. Bressani y L.G. Elías, "Processed vegetable protein mixtures for human consumption in developong countries", "Advances in Food Research", 16, 52, 58, 59 y 60, Academic Press, New York, 1968.
- 23)- L.L. Muller, "Casein manufacture and quality", J. Dairy Technol., 14, 81 (1959); C.A. 54:231041.
- 24)- O.I. Koneva, L.A. Shpilevskaya, "Effect of wash water on casein quality", Tr. Belorussk. Issled. Inst. Moloch. Prom., 1, 159 (1971); C.A., 75:30785h.
- 25)- B.H. Webb y A.H. Johnson, "Fundamentals of Milk", Avi. Publ. Co., Inc. Westport, Connecticut; 1968.

- 26)- E.O. Whittier y B.H. Webb, "Byproducts from milk", Reinhold Publ. Co., New York, USA, 1950.
- 27)- J.E. Kinsella, "The chemistry of dairy powders with reference to baking", "Advances in Food Research", 19, 148, Academic Press, New York, 1971.
- 28)- Z.S. Seitov, Zh. Zhumashev, "Protein composition of the total casein of cow milk", Biokhimiya, 35, 430 (1970); C.A., 73: 105508g.
- 29)- P.V. Kugenev y M.N. Medvedeva, "Aminoacid composition of casein in milk from cows of different age", Molochnaya Prom., 21, 29 (1960); C.A., 54:12410d.
- 30)- H.A. McKenzie, "Milk Proteins", "Advances in Protein Chemistry", 22, Academic Press, New York, 1967.
- 31)- FAO/OMS, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, y Organización Mundial de la Salud; "Necesidades de Proteinas", Informe N° 37, Roma, 1966.
- 32)- J.M. McLaughlan, "Blood aminoacid studies - V - Determination of the limiting aminoacid in diets"; Can. J. Biochem., 42, 153 (1964); C.A., 61:12390e.
- 33)- K. Myszkowska, "Preparation and chemical characterisation of protein hydrolyzates", Acta Pol. Pharm., 20, 77:138473c.
- 34)- FAO/OMS, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, y Organización Mundial de la Salud; "Necesidades de Energía y de Proteinas", Informe N° 38, Roma, 1966.
- 35)- F. Jekat y E. Kofrangi, "Determination of the limiting amino acid in diets"; Can. J. Biochem., 42, 153 (1964); C.A., 61:12390e.

- of dietary proteins XV Milk and milk products"; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 351, 47 (1970); C.A., 72:76314n.
- 36)- S. Arakawa y H. Ishikawa, "New estimation of net protein utilization of casein and hydrogen peroxide-treated fish meal by mouse bioassay and Ford Value of the fish meal"; Hissu Amino-San Kenkyu, 41, 5 (1969); C.A., 73:117834y.
- 37)- Ch. Ogino y M. Chen, "Protein nutrition in fish IV. Biological value of dietary proteins in carp"; Nippon Suisan Gakkaishi, 39, 797 (1973); C.A., 79:103945x.
- 38)- R.A.M. Delaney, R. Kennedy y B.D. Walley, "Composition of *Saccharomyces fragilis* biomass grown on lactose permeate"; J. Sci. Fd. Agric., 26, 1177 (1975).
- 39)- L.G. Elías, R. Bressani, "Aminoacid and protein supplementation of deffated cottonseed flour", Arch. Latinoamer. Nutr., XXI, 249 (1971).
- 40)- L.G. Elías, R. Jarquin, R. Bressani y C. Albertazzi, "tación del arroz con concentrados proteicos", Arch. Latinoamer. Nutr., 18, 27 (1968).
- 41)- B.M. Nicol y P.G. Phillips, "Reference grown and reference dried skimmed milk as supplements to Nigerian men and children". "Progress in nutrition of infants and preschool children. WHO Bulletin 1968. "Advances in Food Research", 16, 1. Academic Press, 1968.
- 42)- C. Giddey, G. Dove, "Artificial milk containing vegetable protein", Swiss 549.347, 31/5/1968.

- 43)- D. Solomon y K. Ferguson, "Co-precipitates of milk protein"; Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australian 403.065 (1970); C.A., 74:22010h.
- 44)- J. Borgwardt, P. Conrad, H. HÄrtling, M. Kabus, W. Krüger, H. Sielaff, E. Quensel, W.D. Wunderlich, "Procedimiento para la preparación de concentrados de proteínas"; Patente 2.110.854, Publ. 10/2/1972 (Alemania).
- 45)- T. Higami, H. Yamakawa, M. Yoyu, K. Kobata y H. Watanabe; "Obtención de proteínas"; Patente 24067, Publ. 10/7/1971 (Japón).
- 46)- M.J. Horn, D.B. Jones y S.J. Ringel, "Isolation of a new sulfur-containing aminoacid (lanthionine) from sodium carbonate treated wool", J. Biol. Chem., 138, 141 (1941).
- 47)- K.J. Carpenter, J. Duckworth, G.M. Ellinger y D.H. Shrimpton, "The nutritional evaluation of protein concentrates obtained from the alkali digestion of herrings"; J. Sci. Food Agr., 1, 278 (1952).
- 48)- Z.Bohak, "N^ε-(DL-2-amino,2-carboxyethyl)-L-lysine, a new amino acid formed on alkaline treatment of proteins", J. Biol. Chem., 239, 2878 (1964).
- 49)- K. Ziegler, I. Melchert y C. Lürken, "N^δ-(2-amino-2-oxoethyl)-L-ornithine, a new aminoacid from alkali-treated proteins", Nature, 214, 404 (1967).
- 50)- A.P. De Groot y P. Slump, "Effects of several types of proteins on aminoacid composition and nutritive value", Nutr., 98, 45 (1969).
- 51)- Food Policy and Food Science Service, Nutrition...

- "Aminoacid content of foods and biological data on proteins", Rome, 1970.
- 52)- National Academy of Sciences, National Research Council, "Evaluation of protein quality", Publ. 1100, Washington D.C. (1963).
- 53)- E.J. Conkerton y V.L. Frampton, "Reaction of gossypol with free ϵ -amino groups of lysine in proteins", Archives of Biochemistry and Biophysics, 81, 133 (1959).
- 54)- D.S. Miller y A.E. Bender, "The determination of the Net Utilization of proteins by a shortened method", Brit. J. Nutr. 9, 382 (1955).
- 55)- M.E. Sambucetti, Tesis, "Evaluación de la calidad de las proteínas alimenticias. Estudio experimental del método de la Utilización Proteica Neta para la determinación del valor nutritivo de concentrados proteicos de origen animal: harinas de pescado", Fac. de Farmacia y Bioq., UBA, 1971.
- 56)- A.O. Rucci, Tesis, "Sobre el aislamiento de proteínas de subproductos de semilla de girasol", Fac. de Ciencias Exactas y Nat., UBA, 1972.
- 57)- G.R. Bartlett, "Phosphorus assay in column chromatography", Biol. Chem., 234, 466 (1959).
- 58)- A.O. Rucci y M.H. Bertoni, "Determinación de ácidos en los subproductos de semilla de girasol", Anal. Quím., 62, 365 (1974).
- 59)- M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rees, "Colorimetric method for determination of substances", Anal. Chem., 28, 350 (1956).

60)- R.L. Whistler y M.L. Wolfrom, "Methods in carbohydrate Chemistry", vol. 1, Academic Press, New York, 388 (1962).

M.H. Bertoni
Dra M. H. Bertoni,
Directora de Tesis
Prof. Tit. Int.

Sara C Revuelto
SARA C REVUELTO