

129

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela de Ciencias Químicas



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**"ESTUDIO DE LA INHIBICION DEL ACIDO CLOGENICO
DURANTE EL PROCESO DE EXTRACION
DE LAS PROTEINAS DEL GIRASOL"**

TESIS PROFESIONAL

que para obtener el título de:

Q U I M I C O

presenta:

CRISTINA GARIBAY BAGNIS

Asesor: Q.F.B. Rosa María Muñoz Saucedo



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

INTRODUCCION

I.- ANTECEDENTES

1. Girasol
2. Compuestos Fenólicos:
 - 2.1. Generalidades
 - 2.2. Compuestos fenólicos en el girasol
 - 2.3. Acido clorogénico
 - 2.4. Agentes reductores

II.- MATERIAL Y METODOS

1. Material:
 - 1.1. Materia prima
 - 1.2. Reactivos
 - 1.3. Equipo
2. Métodos experimentales:
 - 2.1. Obtención del aislado protéico de girasol
 - 2.2. Tratamientos químicos.

3. Métodos analíticos:

- 3.1. Humedad
- 3.2. Cenizas
- 3.3. Grasas
- 3.4. Proteínas
- 3.5. Fibra bruta
- 3.6. Acido clorogénico
- 3.7. Aminoácidos
- 3.8. Color

III.- RESULTADOS Y DISCUSION

1. Condiciones de extracción de las proteínas de girasol:

- 1.1. Efecto del pH
- 1.2. Efecto de la proporción harina: agua
- 1.3. Efecto del tiempo de agitación
- 1.4. Efecto de la temperatura

2. Tratamientos químicos:

- 2.1. Con tetraborato de sodio
- 2.2. Con metabisulfito de sodio
- 2.3. Con ascorbato de sodio
- 2.4. Efecto de la concentración de reactivo sobre el rendimiento en la extracción de las proteínas.

3. Aislados protéicos:

3.1. Composición química

3.2. Color

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

Con el rápido crecimiento de la población mundial, así como el elevado costo de las proteínas de origen animal, se ha hecho indispensable la búsqueda de nuevas fuentes de alimentos para cubrir la demanda de productos nutritivos en la dieta humana; entre estos últimos, podemos citar los productos proteícos vegetales provenientes de cereales, leguminosas y oleaginosas.

El girasol (Helianthus annuus L.) se encuentra actualmente entre los cinco principales cultivos de semillas oleaginosas, -- junto con la soya, el algodón, el cacahuete y la colza.

De la semilla de girasol se extrae un aceite comestible, que se caracteriza por contener un porcentaje elevado de ácidos -- grasos insaturados, factor importante desde el punto de vista nutricional. El aceite de girasol es, hasta el momento, el -- componente de mayor valor en la semilla, ocupando el segundo -- lugar en la producción mundial de aceites vegetales.

Una vez extraído el aceite, como sub-producto se obtiene la -- torta residual (bagazo), la cual es utilizada actualmente en -- la preparación de raciones para animales. La torta de girasol es rica en proteínas que, debido a sus propiedades organolépti -- cas, funcionales y nutricionales, la tornan un ingrediente po -- tencial en la industria de alimentos.

Sin embargo, el uso de los productos protéicos de girasol está limitado debido a la presencia del ácido clorogénico, un compuesto fenólico que, en condiciones neutras o alcalinas, se oxida dando lugar a la formación de compuestos que imparten una coloración indeseable a las protefnas.

Hasta la fecha existen muchos trabajos de investigación enfocados a la eliminación del ácido clorogénico, principalmente a través de la extracción del ácido mediante solventes polares. No obstante, los métodos sugeridos no han sido completamente satisfactorios por diversas razones: la extracción del ácido no es suficiente para garantizar la obtención de aislados protéicos incoloros; pueden provocar la desnaturalización de las protefnas o son económicamente inviables.

El objetivo principal de este trabajo es el dedesarrollar un método de obtención de aislado protéico de girasol con color aceptable, mediante el uso de sustancias químicas que inhiban la reacción de oxidación del ácido clorogénico durante la etapa de extracción de las protefnas.

I.- ANTECEDENTES

1. Girasol.

El girasol (Helianthus annuus L.) es una de las 67 especies de Helianthus (del griego helios: sol, anthos: flor) pertenecientes a la familia Compositae (1).

El girasol es originario de Estados Unidos y México, y fue introducido a Europa en el siglo XVI. Antiguamente se cultivaba como planta de ornato, a la cual se le atribufan algunas propiedades medicinales, hasta que, en la década de 1830 a 1840, comenzó a ser utilizada en Rusia como fuente de aceite comestible, siendo actualmente el principal cultivo de ese país (2).

Hay dos tipos de girasol cultivados comercialmente: las variedades con bajo porcentaje de contenido de aceite (menor de - - 30%), que son consumidos "in natura" o en raciones para aves; y las variedades con alto porcentaje de contenido de aceite, - de más de 40%, las cuales son industrializadas para la obtención del aceite (3).

La remoción del aceite se realiza actualmente por diferentes métodos: por prensado, por prensado seguido de extracción con solvente, o por extracción directa con solvente (Figura 1). La

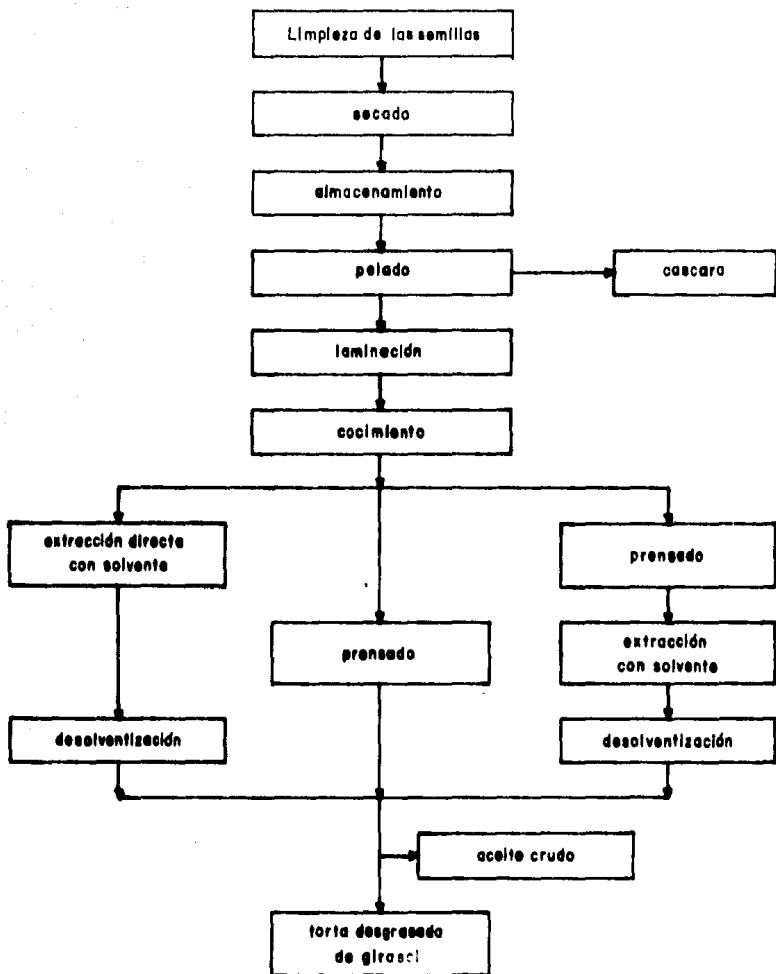


Figura 1 Métodos de procesamiento industrial de la semilla de girasol para la obtención de aceite y torta desgrasada.

torta residual comercial contiene aproximadamente 9% de humedad, 45% de protefna, 3.5% de grasa, 9.5% de fibra bruta, 7% de cenizas y 26% de materia no nitrogenada (4).

La torta de girasol es, sin duda, una fuente de proteínas de buena calidad: es digerible en un 90%, tiene un elevado valor biológico (60%) y no contiene factores tóxicos (5,6). Además del alto porcentaje de protefnas, la torta desgrasada de girasol es rica en calcio (0.46 a 0.57%) y fósforo (0.58 a 1.47%), y es una fuente rica en vitamina A, ácido nicotínico, tiamina, ácido pantoténico, riboflavina y biotina (7).

De la torta desgrasada pueden obtenerse varios productos, tales como el harina (45 a 50% de protefna), los concentrados (70% de protefna) y los aislados protéicos (90-95% de protefna), los cuales pueden tener diversas aplicaciones en la industria de alimentos.

De acuerdo con Robertson y Burns, (8), el principal problema en la utilización de la torta de girasol en la alimentación humana, es la presencia del ácido clorogénico responsable del apareamiento del color verde, característico durante la extracción de las proteínas en medio alcalino.

El uso de los productos proteicos de girasol en la industria alimenticia, dependerá en gran parte del desarrollo de métodos eficaces para la remoción o inactivación del ácido clorogénico.

2. Compuestos fenólicos.

2.1. Generalidades:

La utilización de las proteínas vegetales en las dietas a humanos o a animales se ve adversamente afectada por la presencia de diversos compuestos fenólicos, los cuales poseen la capacidad de ligarse a las proteínas, modificando sus propiedades --funcionales y nutricionales (9).

Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, pudiendo encontrarse en la raíz, tallo, hojas, frutas y semillas. Los niveles en los que se encuentran en los alimentos varía considerablemente, de acuerdo con diversos factores, tales como la germinación, grado de madurez, almacenamiento y procesamiento (10).

Dependiendo de su estructura, los compuestos fenólicos pueden clasificarse en varios grupos: fenoles simples, ácidos fenólicos y sus derivados, cumarinas, flavonoides y polifenoles (taninos, lignina, gossipol) (figura 2) (11).

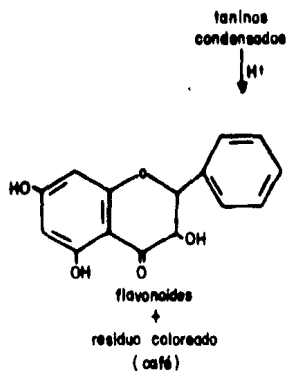
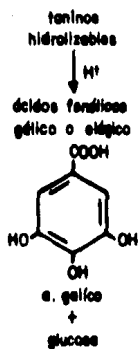
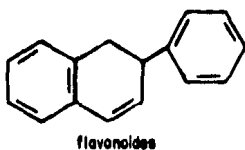
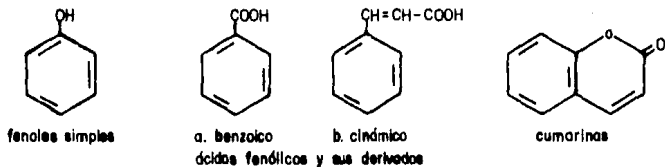


Figura 2. Estructuras básicas de los compuestos fenólicos encontrados en los alimentos.

En los últimos años ha venido aumentando el interés por el estudio de los compuestos fenólicos presentes en los alimentos, tanto desde el punto de vista tecnológico, como por la influencia que ejercen sobre las propiedades funcionales, nutricionales y sensoriales de los alimentos a los cuales están asociados.

Algunos fenoles simples son empleados como saborizantes, en concentraciones relativamente bajas, en una gran variedad de sistemas alimenticios. Por otro lado, ciertos ácidos fenólicos y taninos poseen un sabor amargo, astringente, deseable en diversos productos como el vino y la cerveza, e indeseable en otros, como es el caso de algunas frutas o del harina de soya. Algunos compuestos fenólicos ejercen un efecto inhibitor en la germinación de la cebada, mientras que otros presentan propiedades como antioxidantes (12,13).

Durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos, en especial de frutas y vegetales, tienen lugar una serie de reacciones de oscurecimiento, enzimático o no enzimático, en las cuales intervienen los fenoles. La etapa fundamental en el oscurecimiento enzimático de los alimentos, es la oxidación de los compuestos fenólicos a o-quinonas, por medio de la acción de la o-difenoloxidasas. Entre las reacciones de oscurecimiento no enzimático que involucran los fenoles, se encuentran la formación de complejos con metales pesados (especialmente el -

hierro), y la conversión de leucoantocianidinas en antocianidinas (14).

2.2. Compuestos fenólicos en el girasol:

La concentración de los compuestos fenólicos en el harina de girasol varía entre 3.0 y 3.5%. El ácido clorogénico es el principal compuesto fenólico presente en las semillas, encontrándose normalmente en una concentración de 1.1 a 4.5%, con una media de 2.8% (15).

El ácido caféico y el ácido quínico, productos de la hidrólisis del ácido clorogénico, también son componentes naturales de las semillas de girasol. Los ácidos clorogénicos y caféico constituyen aproximadamente el 70% de los compuestos fenólicos totales. En menor proporción se encuentran los ácidos quínico, sináptico, isoferúlico, p-cumárico y trans-cinámico (16).

2.3 Acido clorogénico:

El ácido clorogénico es un compuesto fenólico que se encuentra ampliamente distribuido en las plantas superiores, algunas veces en concentraciones substanciales.

El ácido clorogénico existe en diversas formas isoméricas, que pueden agruparse en:

- a) Ácidos cafeoilquinicos: ésteres de los ácidos caféico y --quinico.
- b) Ácidos dicafeoilquinicos: ésteres que contienen 2 moléculas de ácido cafeico, unidas a una molécula de ácido quinico.
- c) Ácidos feruloilquinicos: ésteres de los ácidos ferúlico y --quinico, los cuales son considerados como los monometil-éte--res de los ácidos cafeoilquinicos.
- d) Ácidos p-cumaroilquinicos: ésteres del ácido p-cumárico - - (ácido 4-hidroxicinámico) con el ácido quinico.
- e) Ácidos cafeoilferuloilquinicos: ésteres poco conocidos, - - constituidos por un residuo de ácido caféico y otro de áci--do ferúlico, unidos a un residuo de ácido quinico (monome--til-éteres de los ácidos dicafeoilquinicos) (17).

En la figura 3 se muestran las estructuras de los isómeros co--munmente encontrados; en general, el término "ácido clorogénico" se refiere al ácido 3-cafeoilquinico. Otros términos tales co--mo ácido neoclorogénico, isoclorogénico y criptoclorogénico, son frecuentemente utilizados para diferenciar los diversos isóme--ros (18,19).

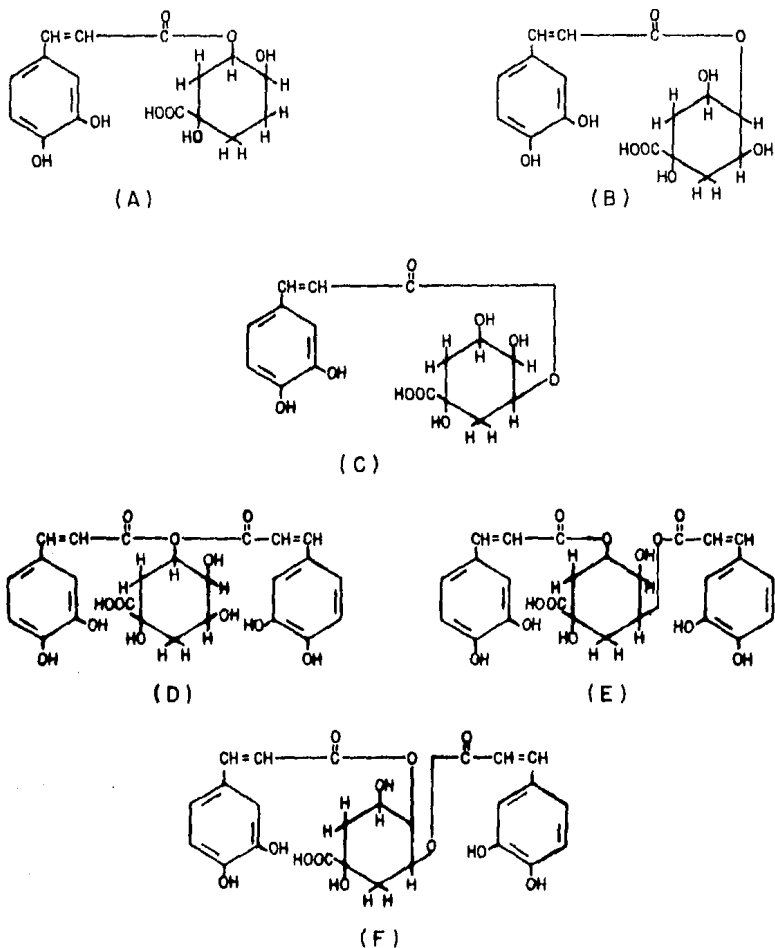
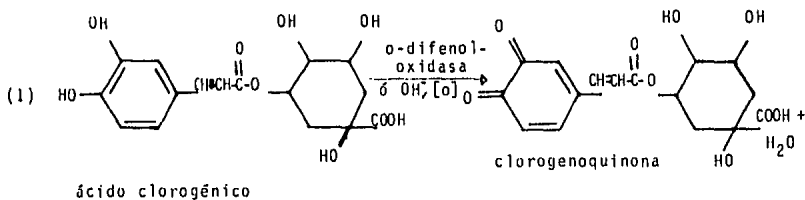


Figura 3. Estructuras de los principales isómeros del ácido clorogénico: (A) δ -clorogénico (3-cafeoilquinico); (B) δ -criptoclorogénico (4-cafeoilquinico); (C) δ -neoclorogénico (5-cafeoilquinico); (D), (E) y (F) δ -isoclorogénicos: 3,4-dicafeoilquinico, 3,5-dicafeoilquinico y 4,5-dicafeoilquinico, respectivamente.

El ácido clorogénico participa en las reacciones de oscurecimiento enzimático de frutas -peras, manzanas, etc.- y en el desarrollo de colores indeseables en diversos alimentos, como en el caso del enverdecimiento de la cáscara de la papa, de los concentrados protéicos de hojas y de los aislados protéicos de girasol (20,21).

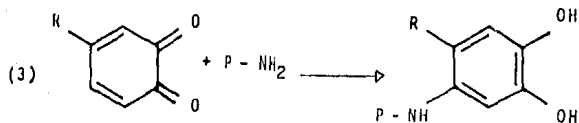
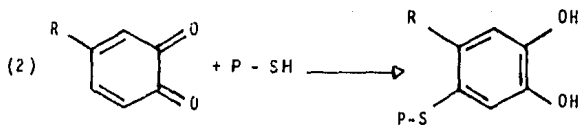
El ácido clorogénico se oxida químicamente, en presencia de oxígeno y en condiciones alcalinas, o enzimáticamente, por la acción de las fenol-oxidasas, formando la clorogenoquinona (Ecuación 1).



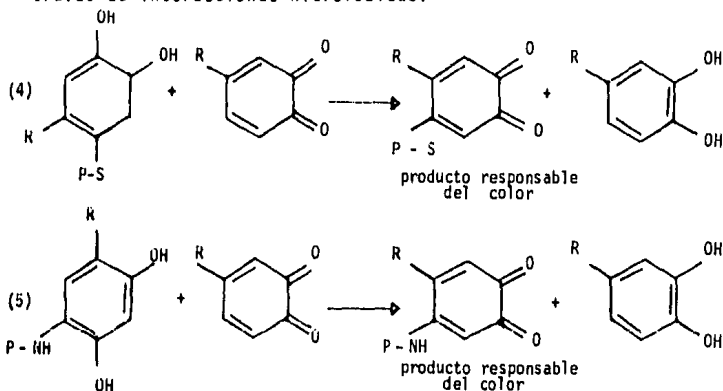
Este compuesto, altamente reactivo, participa de una serie de reacciones secundarias, que resultan en productos intensamente coloreados, responsables por los cambios característicos de color en los alimentos. Entre estas reacciones se encuentran: --

(1) la reducción de las quinonas, con la subsecuente oxidación de compuestos con menor potencial de óxido-reducción, tales como las antocianinas, glicósidos de las flavonas y el ácido ascórbico; (2) la formación de complejos con los grupos amino y sulfhidrilo de aminoácidos y proteínas; y (3) la condensación y polimerización con fenoles o con productos de las reacciones secundarias, como por ejemplo, el floroglucinol (22).

Tal vez la reacción secundaria más importante en relación con el oscurecimiento de alimentos es la condensación con aminoácidos y proteínas. Las quinonas se unen a las proteínas a través de enlaces covalentes con los grupos amino terminal y -E-amino de la lisina y con los grupos sulfhidrilo (Ecuaciones 2 y 3); los complejos fenol-proteína resultantes, pueden oxidar



se a derivados coloreados, en presencia de un exceso de quino-
na (Ecuaciones 4 y 5). Los compuestos fenólicos también pue-
den unirse a las proteínas mediante puentes de hidrógeno o a
través de interacciones hidrofóbicas.



La formación del color verde durante la preparación del aisla-
do protéico de girasol, por el método convencional de extrac-
ción de las proteínas en medio alcalino, seguido de su precipi-
tación en el pH isoeléctrico, constituye una seria limitación
para la utilización del aislado en la industria de alimentos.

Existen en la literatura una serie de trabajos realizados con
el objetivo de desarrollar métodos de extracción del ácido clo-
rogénico de los productos protéicos de girasol. Normalmente -
son utilizados solventes polares (agua, soluciones ácidas dilu-
lufdas, soluciones alcohólicas), para remover los ácidos fenó-
licos. Sin embargo, hasta el momento no ha podido lograrse la

extracción completa de estos compuestos, resultando en un producto coloreado y, en ocasiones, parcialmente desnaturalizado debido al efecto de los solventes sobre las protefnas.

Con el desarrollo de métodos eficientes que remuevan el ácido clorogénico o inhiban su reacción con las protefnas, los productos protéicos de girasol podrán encontrar una amplia variedad de usos como ingredientes en alimentos.

2.4. Agentes reductores:

Los agentes reductores, tales como el dióxido de azufre (SO_2) y el ácido ascórbico, son utilizados comúnmente para controlar el oscurecimiento enzimático durante el procesamiento de los alimentos (23). El SO_2 también es utilizado en la inhibición del oscurecimiento no enzimático (24). Otros compuestos como el tetraborato y el metaborato de sodio también presentan un efecto inhibitor, formando un complejo con el sustrato y previniendo su posterior oxidación (25).

En base a lo expuesto anteriormente, en este trabajo fueron -- utilizados el tetraborato de sodio, ascorbato de sodio y metabisulfito de sodio, para tratar de controlar la reacción de -- oxidación del ácido clorogénico durante el proceso de obten--- ción del aislado protéico de girasol.

II.- MATERIAL Y METODOS.

1. Material.

1.1. Materia prima:

Los aislados protéicos de girasol fueron elaborados a partir - de harina desgrasada de girasol, proveniente de semillas de la variedad IAC-Anhandy.

1.2. Reactivos:

Los reactivos utilizados para los diversos tratamientos y análisis químicos fueron de pureza analítica. El ácido clorogénico usado era de la Sigma Chemical Company (Catálogo N° C-3878); el ascorbato de sodio provenia de Laboratorios ROCHE -Productos Químicos y Farmacéuticos, S.A.- y los demás reactivos, de Laboratorios Merck.

1.3. Equipo:

Balanzas: analítica y semianalítica.

Baño maría con control de temperatura.

Estufa.

pH metro Corning 125/2

Digestor y destilador de protefnas

Extractor Gold Fish

Bomba de vacfo

Molino de ciclón.

Centrífuga Sorval Superspeed RC2-B

Espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer, Lambda 3.

Mallas de 80-100 mesh (0.2 mm).

Agitador magnético

Analizador automático de aminoácidos Beckman 119-CL

Rotavapor Buchi-RE

Colorímetro Hunter D 25 Optical Head.

2. Métodos experimentales.

2.1 Obtención del aislado protéico de girasol:

Para preparar los aislados protéicos de girasol, se determinaron inicialmente las condiciones óptimas para la extracción de las protefnas, en medio alcalino. Para esto, se obtuvieron -- curvas de solubilidad de las protefnas a diferentes valores de pH, temperatura, razón harina: agua y tiempo de agitación.

- (a) Curva del índice de nitrógeno soluble (INS) en función -- del pH:

Se pesaron muestras de 2.5g de harina desgrasada de girasol y se dispersaron en 50 ml. de agua destilada (1:20 -- p/v), ajustándose el pH con NaOH 1.0N o HCl 1.0N a diferentes valores, comprendidos en el rango de 1 a 12. Las dispersiones se mantuvieron en agitación durante 30 min. a ~25°C, y fueron centrifugadas a 10,000xg durante 10 min. a 5-10°C. Se filtró el sobrenadante a través de fibra de vidrio, y del filtrado se tomaron alcuotas de 1 a 2 ml, para la determinación del nitrógeno soluble, de acuerdo con el método descrito en el inciso 2.2. El índice de nitrógeno soluble (INS) fue calculado en cada caso, mediante la ecuación:

$$\% \text{ INS} = \frac{\% \text{ nitrógeno soluble}}{\% \text{ nitrógeno total}} \times 100$$

- b) Curva de INS en función de la razón harina: agua:

Muestras de 2.5g de harina desgrasada de girasol fueron colocadas en agitación durante 30 min. a 25°C y pH 10.0 (ajuste con NaOH 1.0N), dispersándolas en agua destilada, a razones de 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:40, --

1:50, 1:75 y 1:100 (p/v). Las suspensiones fueron analizadas según el método descrito en el inciso (a).

c) Curva de INS en función del tiempo de agitación:

Se procedió en forma semejante al inciso (a), bajo las siguientes condiciones de extracción:

razón hariana:agua:	1:15 (p/v)
pH:	10.0
temperatura:	25°C
tiempo de agitación:	10,20,30,45,60 y 70 min.

d) Curva de INS en función de la temperatura:

Las muestras de harina desgrasada fueron tratadas en forma semejante a la descrita en el inciso (c), durante 30 minutos, a diferentes temperaturas (25,30,40,60 y 70°C).

A partir de los resultados obtenidos en los incisos a, b, c y d, los aislados protéicos fueron preparados siguiendo el diagrama mostrado en la Figura 4. La harina desgrasada se dispersó en agua destilada en una proporción de 1:15 (p/v), y se ajustó el pH a 10.0, por adición de NaOH 1.0N. La suspensión

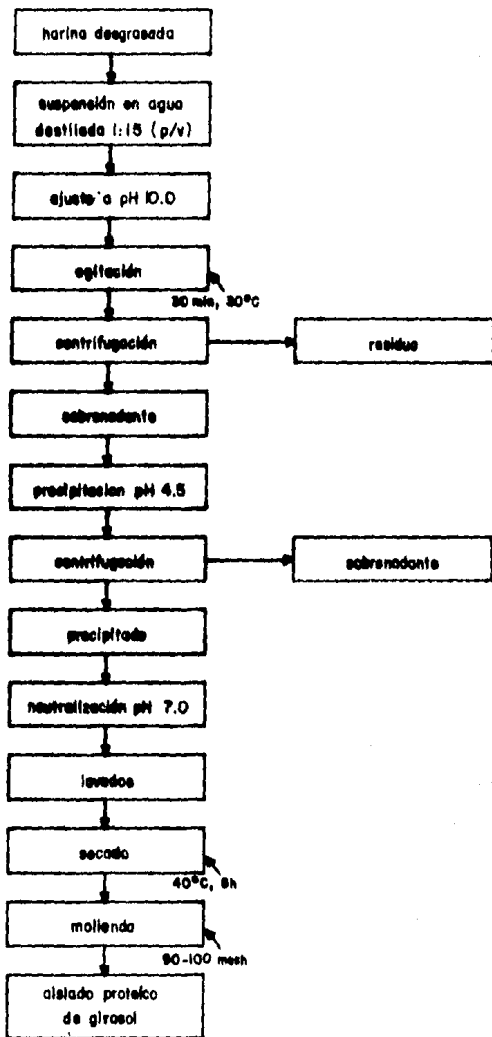


Figura 4. Diagrama del procesamiento para la obtención del aislado proteico de girasol.

se mantuvo en agitación durante 30 min a $30 \pm 1^\circ\text{C}$; posteriormente, se centrifugó a $2,500\times g$ durante 20 min., y las proteínas del sobrenadante se aislaron por precipitación isoeléctrica a pH 4.5, mediante la adición de HCl 1.0N, seguida de centrifugación a $2,500\times g$ durante 10 min. El precipitado fue re-suspendido en agua destilada, en una proporción de 1:10 (p/v), neutralizado por ajuste del pH a 7.0 y centrifugado nuevamente a $2,500\times g$ durante 10 min., haciendo dos lavados sucesivos con agua destilada a pH 7.0. El precipitado se secó en estufa con circulación forzada de aire, a 40°C durante 8h., y fue molido en molino de ciclón hasta una granulometría de 90-100 mesh.

2.2. Tratamientos químicos:

Para evitar el desarrollo del color verde en los aislados proteicos de girasol, la etapa de extracción de las proteínas en medio alcalino fue realizada en presencia de ascorbato de sodio, tetraborato de sodio y metabisulfito de sodio, a diferentes concentraciones, en el rango de 0.001 a 0.5 M.

Las muestras de harina fueron dispersadas en las soluciones de reactivo a diferentes concentraciones, en una proporción de 1:15 (p/v); se ajustó el pH a 10.0 y las dispersiones se mantuvieron en agitación durante 30 min. a 30°C ; posteriormente se centrifugaron a $10,000\times g$ durante 10 min., y se tomaron alícuotas del sobrenadante para determinar el porcentaje de nitróge-

no soluble. La intensidad del color de las soluciones fue determinada haciendo diluciones de 1/100 (v/v) y midiendo su absorbancia a 685 nm.

Las proteínas del sobrenadante fueron recuperadas en forma semejante a la descrita para la obtención del aislado protéico sin tratamiento.

3. Métodos analíticos.

La materia prima y los aislados protéicos obtenidos a partir de los diferentes tratamientos, fueron analizados utilizando los métodos descritos a continuación:

3.1. Humedad

Muestras de 5.0g fueron colocadas en estufa con circulación forzada de aire a 130°C durante 2 hr. o hasta peso constante (26). El porcentaje de humedad fué calculado mediante la ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{peso de agua evaporada}}{\text{peso de muestra húmeda}} \times 100$$

3.2. Cenizas:

Se pesaron muestras de 2.0g en crisoles de porcelana, los cuales fueron colocados sobre una estufa hasta eliminar todos los vapores y posteriormente se dejaron durante 5 horas en la mufla a 550°C. El porcentaje de cenizas fue calculado según la relación:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{peso de cenizas}}{\text{peso de muestra}} \times 100$$

3.3. Grasas:

Las determinaciones de grasa se realizaron utilizando un extractor Gold Fish, y éter de petróleo como solvente. Para cada análisis se usaron muestras de 2.0g, las cuales se dejaron en reflujo durante 5hr. El contenido de grasa fue calculado a partir de la ecuación:

$$\% \text{ Grasas} = \frac{\text{peso de grasa extraída}}{\text{peso de muestra}} \times 100$$

3.4. Proteínas:

El porcentaje de proteínas fue calculado multiplicando el contenido de nitrógeno total (N total) por el factor 6.25. El contenido de nitrógeno total se determinó utilizando una modificación del método Kjeldhal (27). Las muestras de 100 mg.

fueron colocadas en digestión durante 3 hr., añadiendo 3 ml de H_2SO_4 concentrado y 0.2g de catalizador ($94g K_2SO_4 + 5g CuSO_4 + 1g TiO_2$); posteriormente, fueron transferidas al destilador; - se les adicionó NaOH al 50% hasta neutralización, y se continuó la destilación hasta recoger 100 ml de destilado, en 10 ml de ácido bórico al 2%, conteniendo unas gotas de indicador mixto (2 partes de rojo de metilo + 1 parte de azul de metileno). Las muestras se titularon con HCl 0.02 N y el porcentaje de nitrógeno se calculó mediante la ecuación:

$$\% N = \frac{(V \times N) \text{ ácido} \times 1.4008}{g \text{ muestra}}$$

donde:

V= volumen de HCl usado en la titulación

N= normalidad del HCl

3.5. Fibra bruta:

El contenido de fibra bruta fue determinado con el método de Van Soest, (28). Se pesaron muestras de 1.0g y se colocaron en matraces redondos de 250 ml; se les adicionaron 10 ml de solución de detergente ácido y se mantuvieron en reflujo, en baño María, durante 1 hr. Se filtraron en caliente a través de un filtro de porcelana, utilizando el mínimo vacío necesario. El residuo se lavó dos veces con agua destilada (90-100°C) y posteriormente con acetona, hasta que el filtrado saliera completamente incoloro. Los filtros se dejaron secar en la estufa -

a 100°C durante 8 hr. y luego se pesaron, para obtener los gramos de fibra.

3.6. Acido clorogénico:

El contenido de ácido clorogénico en el harina y aislados proteícos de girasol fue determinado según el método colorimétrico de Bittoni et al (29). Muestras de 1.0g fueron suspendidas en una solución tampón de carbonato-bicarbonato 0.2M a pH 10.5, y se mantuvieron en agitación en baño María a 25°C, durante 1 hr; se les adicionaron 5 ml de borato de sodio 0.1M para detener la reacción, luego se centrifugaron las suspensiones a - - 10,000 xg durante 10 min., y se midió la absorbancia de los solu brenadantes a 685 nm. Para determinar la concentración del -- ácido clorogénico, se obtuvo una curva de calibración usando - concentraciones conocidas del ácido, en el rango del 0 al 5%.

3.7. Aminoácidos:

La composición en aminoácidos de los productos proteícos de gi rasol fue determinada por el método de intercambio iónico de - Spackman et al, (30), usando un Analizador Automático Beckman 119-CL. Las muestras fueron preparadas siguiendo básicamente las recomendaciones descritas en el manual del equipo: una can tidad conocida de proteína (25 a 30 mg) se coloca en un tubo - pyrex (12 x 15 mm), se le adiciona HCl 6N hasta llenar casi --

por completo el tubo, y se cierra con una tapa con sello de teflón para mantener el tubo herméticamente cerrado y en ausencia de oxígeno. La muestra es hidrolizada colocando el tubo en una estufa a 110°C durante 22 hr, y el hidrolizado se filtra en filtro de vidrio con porcelana. El filtrado es transferido a un matraz volumétrico de 100 ml y se completa el volumen con agua destilada hasta el aforo. Se toman 20 ml de muestra, y se evaporan hasta sequedad en un retoevaporador, a 60°C. El residuo se lava dos veces con 10 ml de agua destilada, evaporando cada vez el agua de lavados y finalmente se disuelve en 5 ml de solución tampón de citrato de sodio a pH 2.2. Se inyectan 100 μ l de esta solución al analizador de aminoácidos y, una vez corrido el cromatograma, se calculan cuantitativamente los aminoácidos, en base al área de los picos, excepto el triptófano, que se destruye durante la hidrólisis ácida.

3.8. Color:

El color del harina y de los aislados obtenidos a partir de los diferentes tratamientos fue evaluado subjetivamente por un observador de visión normal, con discriminación superior, sometido a una prueba de visión del color (31). Los colores fueron ordenados según la escala de Munsell, (32). El color también fue determinado, en algunos casos (cuando la cantidad de muestra así lo permitía) instrumentalmente, mediante el colorímetro Hunter, modelo D-25 Optical Head.

III.- RESULTADOS Y DISCUSION.

1. Condiciones de extracción de las proteínas de girasol.

1.1. Efecto del pH:

Las proteínas de la harina desgrasada de girasol presentaron elevada solubilidad a un pH arriba de 8.0, alcanzando un valor máximo de nitrógeno soluble, de 95% a pH de 10.0; por otro lado, se observó un rango de solubilidad mínima en las regiones de pH entre 3.0 y 6.5 (figura 5). Los resultados obtenidos son semejantes a los publicados por diversos autores (33,34,--35,36). Parece ser que el amplio rango de pH del punto isoeléctrico es una característica propia de las proteínas de girasol.

1.2. Efecto de la proporción harina: agua:

La máxima extracción de las proteínas de girasol se obtuvo utilizando una relación de harina:agua de 1:10 (p/v), bajo las condiciones anteriormente mencionadas (pH 10.0, t=25°C, 30 min.). Al aumentar el volumen del solvente no hubo prácticamente ningún efecto sobre el rendimiento en la extracción (Figura 6). Resultados similares han sido reportados en trabajos anteriores (37,38,39,40).

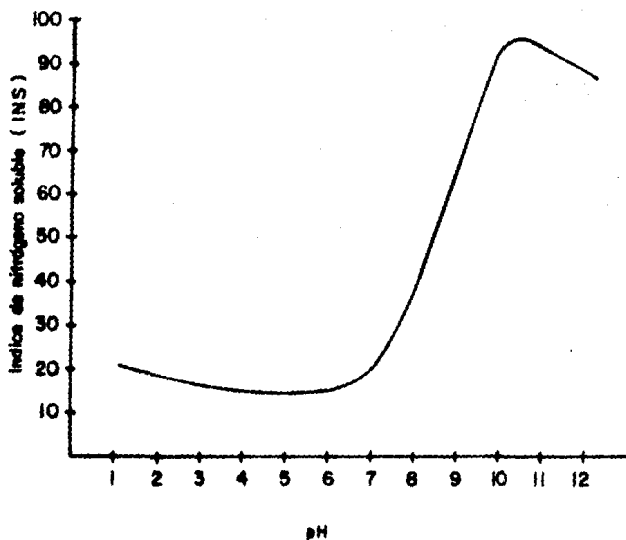


Figura 5. Solubilidad de las proteínas de la harina desgrasada de girasol en función del pH.

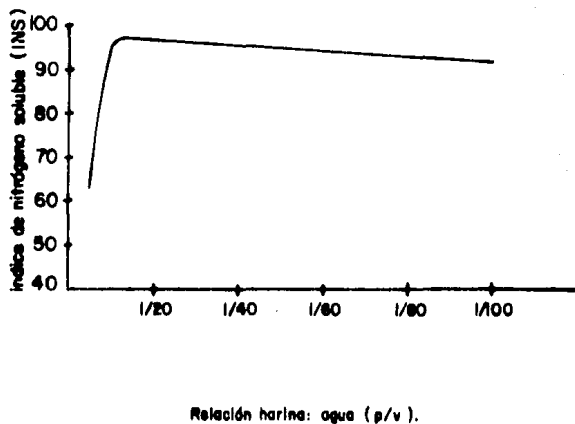


Figura 6. Solubilidad de las proteínas de la harina desgrasada de giresol en función de la proporción harina: agua (p/v).

Para las pruebas posteriores, se optó por utilizar una proporción harina:agua de 1:15 (p/v), con el objeto de facilitar las condiciones de trabajo, disminuyéndose las pérdidas durante -- las transferencias del material de un recipiente para otro, -- sin afectar con ésto el rendimiento en la extracción.

1.3. Efecto del tiempo de agitación:

De acuerdo con los resultados obtenidos, mostrados en la Figura 7, se observó que la máxima solubilidad de las protefnas- - (95%) se alcanzó después de 30 min. de extracción. Se observó también una ligera disminución en el INS después de 70 min. de agitación, lo cual pudo deberse a una desnaturalización par- - cial de las protefnas, al ser éstas sometidas a un período largo de agitación.

1.4. Efecto de la temperatura:

La solubilidad máxima de las protefnas de la harina desgrasada de girasol se obtuvo al efectuar la extracción de las mismas a una temperatura de 30°C, observándose al mismo tiempo una tendencia a la disminución de la solubilidad a medida que umenta ba la temperatura (Figura B). Resultados semejantes fueron obtenidos por Gheyasuddin et al, (41), quienes atribuyen la pérdida de solubilidad a temperaturas arriba de los 70°C, a una - posible coagulación de las protefnas.

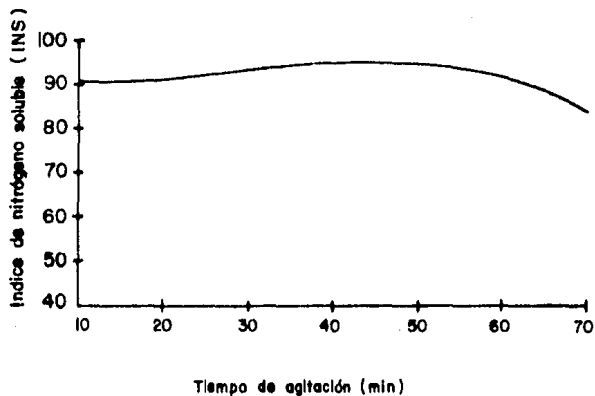


Figura 7. Solubilidad de las proteínas de la harina desgrasada de girasol en función del tiempo de agitación (min).

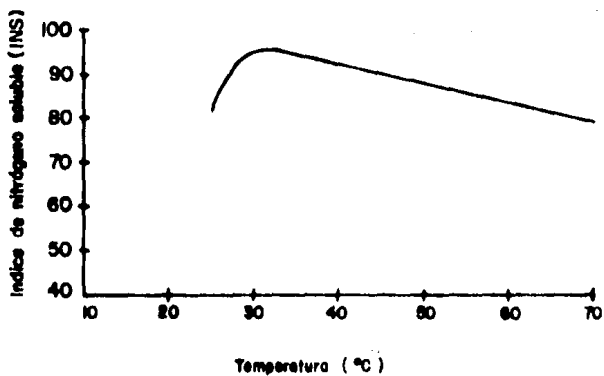


Figura 8. Solubilidad de las proteínas de la harina desgrasada de girasol en función de la temperatura.

De acuerdo con los resultados mencionados en los párrafos anteriores, se seleccionaron las siguientes condiciones de extracción, las cuales fueron utilizadas en la preparación de los aislados protéicos de girasol, obtenidos a partir de los diferentes tratamientos:

pH:	10.0
Proporción harina:agua	1:15 (p/v)
Tiempo de agitación:	30 min.
Temperatura:	30° C.

Todas las extracciones fueron realizadas manteniendo las muestras a una velocidad mínima de agitación, suficiente para mantener el material en suspensión y así evitar una posible desnaturalización de las proteínas de girasol, debido a una agitación excesiva.

Las condiciones de extracción sugeridas en este estudio, son muy semejantes a las reportadas por otros autores, quienes utilizaron diferentes variedades de semillas de girasol (42,43,44, 45,46,47,48).

2. Tratamientos químicos.

2.1. Con tetraborato de sodio:

El efecto de la concentración de tetraborato de sodio sobre la aparición del color durante la extracción de las proteínas, -- puede apreciarse a través de los resultados presentados en la figura 9. Las soluciones protéicas tratadas con tetraborato -- de sodio a una concentración mayor de 0.1M, presentaron un color amarillo claro, y una absorbancia mínima de 0.08%, mientras que las muestras tratadas con cantidades menores del reactivo, resultaron en soluciones de color verde oscuro y mayor -- absorbancia, indicando que la concentración de tetraborato fue insuficiente para inhibir completamente la reacción de oxidación del ácido clorogénico.

2.2. Con metabisulfito de sodio:

En el tratamiento con metabisulfito de sodio, pudo observarse que éste presentó un mayor efecto inhibitor, obteniéndose soluciones protéicas de color amarillo y con una absorbancia mínima de 0.06%, al ser extraídas las proteínas con soluciones de metabisulfito a una concentración igual o mayor de 0.01M (figura 10).

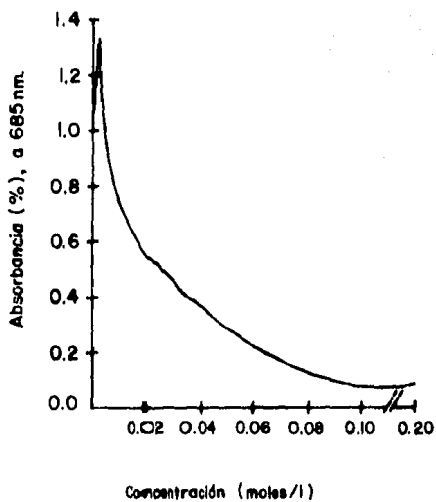


Figura 9. Efecto de la concentración de tetraborato de sodio en el desarrollo del color durante la extracción de las proteínas de ginseng.

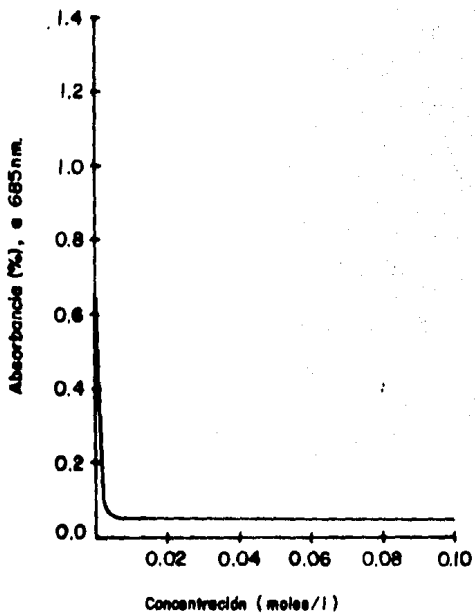


Figure 10. Efecto de la concentración de metabisulfito de sodio en el desarrollo del color durante la extracción de las proteínas de girasol.

2.3. Con ascorbato de sodio:

Al igual que el metabisulfito de sodio, el ascorbato mostró -- ser eficiente en la inhibición de la reacción de oxidación del ácido clorogénico, en concentraciones arriba de 0.01M (figura 11). Las soluciones protéicas tratadas con ascorbato de sodio en estas concentraciones, presentaron un color amarillo claro y una absorbancia mínima de 0.06%.

En base a los resultados anteriores, pude concluir que tanto el tetraborato como el metabisulfito y el ascorbato de sodio, ejercieron un efecto inhibitor sobre las reacciones de oxidación y/o polimerización del ácido clorogénico y de otros compuestos fenólicos, durante la extracción de las proteínas de girasol en medio alcalino. Los mecanismos probables de acción de estos reactivos se muestran en la figura 12.

El tetraborato de sodio actúa sobre compuestos aromáticos que contienen dos grupos hidroxilos vecinales, formando complejos de boro (Bedrosian et al, (49,50); de esta forma, los grupos -OH de los difenoles ya están comprometidos, impidiéndose así la formación de las quinonas. En base a la reacción descrita en la figura 12, se deduce que es necesaria una concentración mínima de 0.0024M de tetraborato de sodio para inhibir la oxida

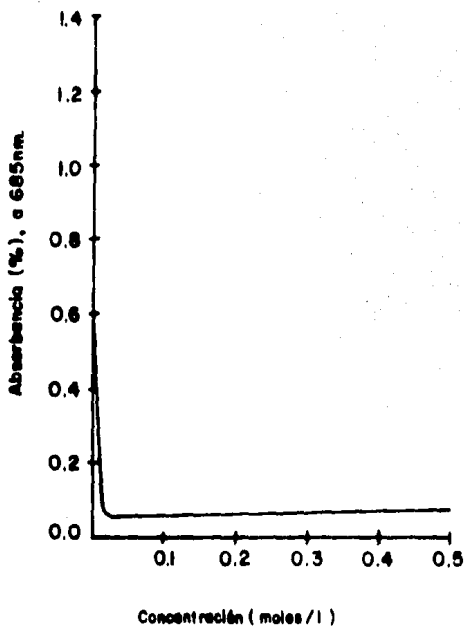
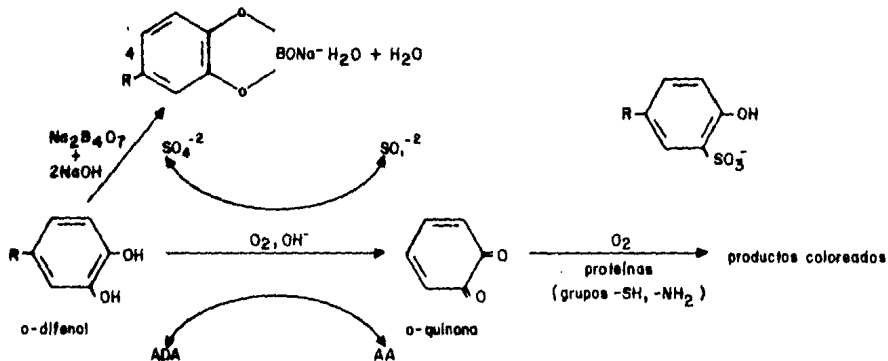


Figura II. Efecto de la concentración de asorbato de sodio en el desarrollo del color durante la extracción de las proteínas de girasol.



AA: ácido ascórbico
 ADA: ácido deshidroascórbico

Figura 12. Efecto inhibitor del tetraborato de sodio ($Na_2B_4O_7$), ácido ascórbico (AA) y metabisulfito de sodio ($Na_2S_2O_5 \rightarrow SO_3^{-2}$), sobre la reacción de oxidación de los o-difenoles.

ción del ácido clorogénico. Sin embargo, en el laboratorio sólo se obtuvieron resultados positivos al utilizar una concentración cerca de cincuenta veces mayor a la calculada; esto puede deberse a que, por impedimentos estéricos o por otros factores, sea necesario utilizar un exceso de tetraborato para que se lleve a cabo la reacción, o bien, que éste reaccione además con otros compuestos presentes en el sistema.

El ascorbato de sodio se oxida a ácido deshidro-ascórbico, reduciendo a su vez la o-quinona formada a su estructura original de o-difenol. El metabisulfito de sodio puede actuar también como agente reductor, en forma semejante al ascorbato de sodio, oxidándose a ión sulfato (SO_4^{-2}), o bien, se combina con las o-quinonas, dando lugar a derivados sulfonados, evitándose la formación de compuestos coloridos (51). Así, el efecto inhibitor del ascorbato y del metabisulfito de sodio, dependerá básicamente de la cantidad de oxígeno presente en el sistema durante la preparación del aislado protéico de girasol.

De acuerdo con los experimentos realizados en el laboratorio, se observó que el metabisulfito y el ascorbato de sodio presentaron mayor efecto inhibitor en comparación con el tetraborato de sodio, teniendo que utilizarse una concentración de tetraborato diez veces mayor a la del metabisulfito o del ascorbato, para obtenerse resultados similares.

2.4. Efecto de la concentración de reactivo sobre el rendimiento en la extracción de las protefnas:

En cada uno de los tratamientos con los diferentes reactivos, se determinó el índice de nitrógeno soluble, para determinar el rendimiento en la extracción de las protefnas. En general, se observó que hubo una disminución en el porcentaje de protefna soluble, en relación al metodo original, con el que se consigue un rendimiento máximo de 95% (figura 13). Este fenomeno pudo haberse debido a una posible interacción del reactivo con las protefnas, haciéndolas menos solubles. En el caso del tetraborato de sodio, existe también el efecto tamponante que este compuesto ejerce en soluciones a un pH de 9.5, lo que hizo necesario utilizar una mayor cantidad de NaOH para elevar el pH hasta 10.0. El aumento de la concentración de sales en la solución pudo haber provocado una disminución de la solubilidad de las protefnas, por el fenómeno conocido como "salting out"; esto, unido a los factores mencionados anteriormente, pudieron haber provocado los rendimientos bajos obtenidos en los tratamientos con tetraborato.

A partir de los resultados mencionados, pude concluir que los tratamientos con metabisulfito de sodio 0.01M y con ascorbato de sodio 0.01M, son los más adecuados para ser utilizados en -

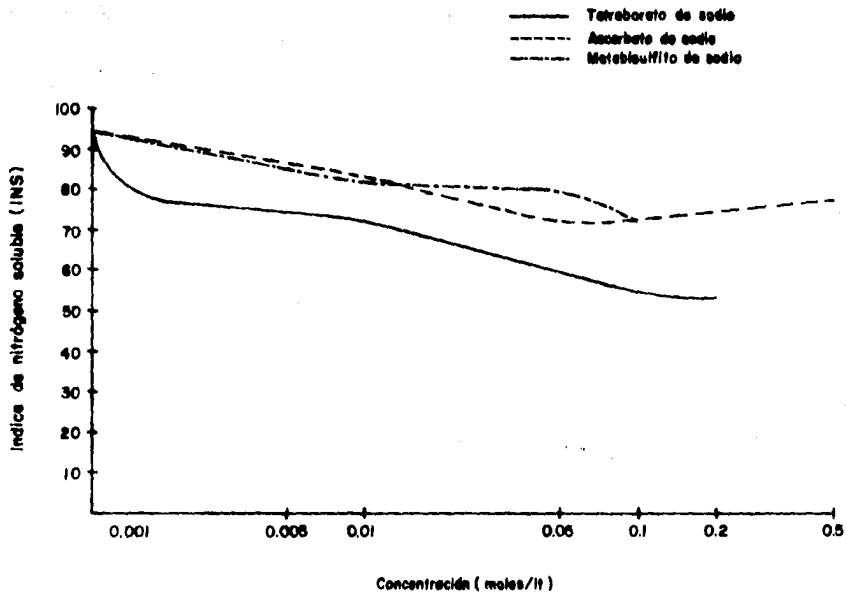


Figura 13. Efecto de la concentración de tetraborato, ascorbato y metabisulfito de sodio en la solubilidad de las proteínas de la harina desgrasada de girasol.

la preparación de aislados protéicos de girasol, debido a su elevada eficiencia en la inhibición del color verde, al mismo tiempo que producen rendimientos altos (superiores al 80%) en la extracción de las protefnas.

3. Aislados protéicos.

3.1. Composición química:

Los datos obtenidos en relación a la composición química del harina desgrasada de girasol y de los aislados protéicos preparados con los diversos métodos, son mostrados en las tablas 1 y 2. Se puede observar que no hubo cambios apreciables en la composición de los aislados protéicos obtenidos a partir de los diferentes tratamientos; del mismo modo, se comprobó que el metabisulfito y el ascorbato de sodio no afectaron la composición en aminoácidos de las protefnas de girasol.

3.2. Color:

El color del harina y de los aislados protéicos de girasol fué determinado subjetivamente mediante la Escala de Munsell, la cual hace una clasificación de acuerdo al color, así como al grado de claridad e intensidad del mismo. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Un aislado con características de co-

TABLA 1. COMPOSICION QUIMICA DEL HARINA DESGRASADA Y DE LOS AISLADOS PROTEICOS DE GIRASOL OBTENIDOS A PARTIR DE DIFERENTES TRATAMIENTOS.

MUESTRA	HARINA DESGRASADA	AISLADO PRO TEICO SIN TRATAMIENTO	AISLADO TRA TADO CON -- ASCORBATO 0.01M	AISLADO TRA TADO CON METABISULFI TO 0.01M
HUMEDAD (%)	10.43	7.48	7.93	7.05
CENIZAS (%) ^a	9.40	1.50	1.94	2.02
PROTEINA (%) ^{a, b}	55.19	96.60	97.14	96.15
GRASA (%) ^a	1.0	0.5	n.d. ^(c)	n.d.
FIBRA BRUTA (%) ^a	4.82	0.65	0.64	0.16
ACIDA CLO?GENICO (%) ^a	4.88	0.91	0.74	0.30

(a) En base seca

(b) % Protefca = %Nx6.25

(c) n.d. = no detectable

TABLA 2. COMPOSICION EN AMINOACIDOS DE LA HARINA DESGRASADA Y DE LOS AISLADOS PROTEICOS DE GIRASOL OBTENIDOS A PARTIR DE DIFERENTES TRATAMIENTOS ^a

MUESTRA	HDG	APG	APGA	APGM
	(g AMINOACIDO / 100g PROTEINA)			
ACIDO ASPARTICO	9.2	10.0	10.5	9.8
TREONINA	3.7	4.0	3.8	4.1
SERINA	3.8	4.0	4.3	3.8
ACIDO GLUTAMICO	22.3	20.9	20.5	21.8
PROLINA	4.3	4.6	4.7	4.3
GLICINA	5.8	4.6	5.2	4.4
ALANINA	4.5	4.3	4.3	4.5
MEDIA-CISTINA	3.6	2.3	2.1	2.0
VALINA	5.0	5.3	5.1	5.3
METIONINA	2.1	1.9	1.8	2.0
ISOLEUCINA	4.2	4.4	3.9	4.1
LEUCINA	8.0	9.0	8.6	8.8
TIROSINA	2.9	3.3	3.0	3.3
FENILALANINA	4.3	5.1	5.4	5.4
HISTIDINA	2.1	2.4	2.7	2.1
LISINA	3.6	3.2	3.4	3.4
AMONIO	2.4	2.4	1.9	2.4
ARGININA	8.2	8.3	8.4	8.4

HDG = Harina desgrasada de girasol.

APG = Aislado protéico de girasol sin tratamiento.

APGA = Aislado protéico de girasol tratado con ascorbato de sodio 0.01M

APGM = Aislado protéico de girasol tratado con metabisulfito de sodio 0.01M

a = Los cálculos del contenido de aminoácidos fueron realizados utilizándose el método de normalización interna.

TABLA 3. DETERMINACION DEL COLOR DEL HARINA DESGRASADA Y DE LOS AISLADOS PROTEICOS DE GIRASOL OBTENIDOS A PARTIR DE DIFERENTES TRATAMIENTOS, DE ACUERDO CON LA ESCALA DE MUNSELL

MUESTRA	COLOR	CLARIDAD	INTENSIDAD
HARINA DESGRASADA	5.0 _y	8.5	1.0
AISLADO PROTEICO SIN TRATAMIENTO	7.5 _{gy}	5.0	2.0
AISLADO TRATADO CON TETRABORATO DE SODIO:			
0.01M	2.5 _y	4.0	2.0
0.05M	5.0 _y	6.0	1.0
0.10M	2.5 _y	7.0	2.0
0.20M	5.0 _y	7.0	2.0
AISLADO TRATADO CON ASCORBATO DE SODIO:			
0.01M	5.0 _y	8.0	2.0
0.05M	2.5 _y	8.0	2.0
0.10M	10.0 _{Yr}	8.0	2.0
0.50M	5.0 _{Yr}	7.0	4.0
AISLADO TRATADO CON METABISULFITO DE SODIO:			
0.001M	7.5 _{gy}	6.0	2.0
0.01M	5.0 _y	7.0	2.0
0.05M	2.5 _y	7.0	2.0
0.1M	5.0 _y	8.0	2.0

Y: amarillo.

gy: verde-amarillo

Yr: amarillo-rojo

lor aceptables deberá ser de color amarillo, y con un grado ailto de claridad. De acuerdo con esto, las muestras que presentaron mejor color fueron las tratadas con ascorbato de sodio - 0.01 y 0.05M y con metabisulfito de sodio 0.1M. Los aislados obtenidos a partir de los tratamientos con tetraborato de soo-dio 0.1 y 0.2M y con metabisulfito de sodio 0.01 y 0.05M también fueron de color amarillo con un grado menor de claridad.

El color de algunas de las muestras también fue determinado objetivamente, utilizando el colorímetro Hunter, obteniéndose valores de L (luminosidad), a (+ amarillo, -verde) y b (rojo). - Con estos datos, se calculó la diferencia total de color, (ΔE), tomando como referencia el color del harina desgrasada de girasol. Los resultados correspondientes se muestran en la Tabla 4; a partir de los valores de L, pudimos apreciar que los aislados presentaron menos luminosidad, es decir, un color más opaco, que el harina; no obstante, los aislados tratados con - ascorbato y metabisulfito de sodio 0.01M tuvieron valores de L más altos que el del aislado proteico sin tratamiento, lo que significa una mejoría notable en el color. A partir de los valores de a y b, se observa que tanto el harina como los aislados tratados se encuentran en la región amarilla de color (de acuerdo a los valores en el Plano de Hunter), mientras que el

TABLA 4. COMPARACION DEL COLOR DEL HARINA Y AISLADOS PROTEICOS DE GIRASOL, UTILIZANDO EL COLORIMETRO HUNTER

MUESTRA	VALORES HUNTER			ΔE^a
	L	a	b	
HARINA DESGRASADA	77.0	+0.3	7.3	0.0
AISLADO PROTEICO SIN TRATAMIENTO	43.9	-4.7	4.1	33.6
AISLADO TRATADO CON ASCORBATO DE SODIO 0.01M	60.4	+2.3	12.4	17.5
AISLADO TRATADO CON METABISULFITO DE SODIO 0.01M	58.9	+1.4	11.2	18.6

^a ΔE (Diferencia total de color) = $(L_2 - L_1)^2 + (a_2 - a_1)^2 + (b_2 - b_1)^2$, tomando como referencia (L_1, a_1, b_1) el harina desgrasada de girasol.

aislado protéico sin tratamiento se localiza en la región del color verde. Los aislados obtenidos a partir de los tratamientos con ascorbato y metabisulfito de sodio presentaron una tonalidad rojiza ligeramente mayor a la del harina desgrasada de girasol. Los valores de ΔE nos demostraron que la diferencia de color entre el harina y los aislados tratados es mucho menor, en comparación con el aislado obtenido por el método convencional.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

1. Las condiciones óptimas para la extracción de las proteínas solubles de la harina desgrasada de girasol, preparada a partir de semillas de la variedad IAC-Anhandy, son:

pH:	10.0
proporción harina;solvente:	1:15 (p/v)
tiempo de agitación:	30 min.
temperatura:	30° C

En estas condiciones, se consiguen rendimientos en la extracción de hasta 95% del nitrógeno total.

2. Aislados protéicos de girasol, de color beige claro, pueden ser obtenidos al extraer las proteínas de la harina con soluciones de ascorbato de sodio 0.01M o de metabisulfito de sodio 0.01M, alcanzándose rendimientos de 80% o más de proteína soluble.
3. El tetraborato, ascorbato y metabisulfito de sodio, al utilizarse en concentraciones adecuadas, resultan ser efectivos en la inhibición de la reacción de oxidación del ácido clorogénico en medio alcalino. De estos reactivos, el tetraborato

borato presenta varios inconvenientes para su uso, tales - como: a) es necesaria una mayor concentración de reactivo para obtener un producto de color aceptable; b) el rendimiento es menor, y c) acualmente, su uso está prohibido en la industria de alimentos. Por otro lado, el ascorbato y el metabisulfito de sodio presentan las siguientes ventajas: a) son necesarias concentraciones mínimas de 0.01M - para obtener aislados de color satisfactorio; b) los rendimientos en la extracción son superiores al 80%; c) el ascorbato de sodio puede utilizarse sin restricciones en la industria de alimentos, mientras que el metabisulfito - debe usarse en forma limitada, de modo que el contenido de SO_2 residual en el alimento no sea mayor que 150ppm.

4. Es importante resaltar el hecho de que al ser producido un aislado protéico de girasol sin problemas de color, se eliminan las limitaciones existentes para su uso en la industria alimenticia, pudiendo utilizarse por sus propiedades de aereación y emulsificación, de absorción de agua y de grasa, o bien, como enriquecedor del contenido protéico de diversos productos.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Haiser, C.B. Jr.
Taxonomy of helianthus and origin of domesticated sunflower. En: Sunflower Science and Technology. J.F. Carter. Agronomy, a series of monographs. No. 19, Capitulo 2. -- American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, -- U.S.A., 1978.
- (2) Putt, E.D.
History and present world status. En: Sunflower Science and Technology. J.F. Carter. Agronomy, a series of monographs. No. 19, Capitulo 1. American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, U.S.A., 1978.
- (3) Beard, B.H.
The sunflower crop. Scientific American, 244 (5), 150-161, 1981.
- (4) Robertson, J.A. & Burns, E.E.
Use of sunflower seed in food products. CRC. Crit. Rev. Food Sei Nutr. 6 (2), 201-240, 1975.
- (5) Clandinin, D.R.
Sunflower seed oil meal. En: Processed plant protein - food-styffs. A.M. Altschul (ed). págs. 557-575. Academic Press, New York, 1958.

- (6) Sosulski, F. & Fleming, S.E.
Chemical, Functional and nutritional properties of
sunflower protein products. J.A.O.C.S. 54(2), 100A-104A,
1977.
- (7) Dorell, D.F.
Processing and utilization of oilseed sunflower. En: -
Sunflower, Science and Technology. J.F. Carter. Agronomy,
a series of monographs. No. 19, Capitulo 13. American So-
ciety of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, 1978.
- (8) Robertson & Burns, op. cit.
- (9) Sosulski, F.
Organoleptic and nutritional affects of phenolic compounds
on oilseed protein products: a review. J.A.O.C.S., 56(8),
711-715, 1979.
- (10) Maga, S.A.
Simple phenol and phenolic compounds in food flavor. C.R.C.
Crit. Rev. Food Sei. Nutr. 10(4), 323-372, 1978.
- (11) Sosulski, F., 1979 op. cit.
- (12) Maga J.A.N. op. cit.

- (13) Lansani, A., Cardillo, O.M. y Fedeli, E.
Studio del potere antiossidante dell'acido clorogenico
isolato dei semi di girasole.
Riv. It. Sost. Grase, 56(7), 273-275, 1978.
- (14) Mathew, A.G. & Parpia, H.A.B.
Food Browning as a polyphenol reaction. Adv. Food Res.,
19: 75-99, 1971.
- (15) Dorell, D.G.
Chlorogenic acid content of meal from cultivated and wild
sunflowers. Crop. Scienc. 16 (3), 422-424, 1976.
- (16) Sabir, M.A., Sosulski, F.W. & Kernan, J.A.
Phenolic constituents in sunflower flour. J. Agric., Food
Chem., 4(1), 63-71, 1978.
- (17) Clifford, M.N.
Chlorogenic acids - their complex nature and routine deter-
mination in coffee beans. Food Chem., 4(1), 63-71, 1978.
- (18) Feldman, J.R., Ryder, W.S. & Kung, J.I.
Importance of nonvolatile compounds to the flavor of coffee.
J. Agr. Food Chem. 17(4), 733-739, 1969.
- (19) Maga, J.A., op. cit.
- (20) Mathew, A.G. & Parpia H.A.B., op cit.

- (21) Sosulski, F.
Food uses of sunflower proteins. J.A.O.C.S., 56(3), 438-442, 1979a.
- (22) Mathew, A.G. & Parpia, H.A.B., op. cit.
- (23) Walker, John, R.L.
Enzymic browning in foods. Its chemistry and control. --
Food technology in New Zealand, 19-25, marzo, 1977.
- (24) Mathew, A.G. & Parpia, H.A.B., op. cit.
- (25) Bedrosian, L., Steinberg, M.P. & Nelson, A.I. Effect of borates and other inhibitors on enzymatic browning in apple tissue II. Mechanism. Food Technol., 14, 480-483, 1960.
- (26) Approved methods of the American Association of Cereal --
Chemists (AACC). Método 44-31, 7a. Ed., 1976.
- (27) AACC, Método 46-12, Método 46-12, op. cit.
- (28) Soest, Peter, J. van.
Colaborative study of acid-detergent fiber and lignin. --
J. of the A.O.A.C., 56(4), 781-784, 1973.

- (29) Bittoni, A., Sodini, G., Emmi, E, & Cardinali, F.
Método colorimétrico perla determinazione rápida dei cromogeni fenolici contenuti in farine, concentrati ed isolati di girasole. Rev. It. Sost. Grasse, 54 (10), 421-424, 1977.
- (30) Spackman, D.H., Stein, W.H. & Moore, S.
Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacidos. Anal. Chem., 30(3): 1190-1206, 1958.
- (31) Munsell. Farnsworth-Munsell 100-Hue Test for color vision. Munsell Color Company, Inc. Baltimore, Maryland, 1957.
- (32) Munsell Book of Color. Glossy Finish Collection. Munsell Color. Macbeth Division of Kollmorgen Corporation. Baltimore, Maryland, 1966.
- (33) Smith, A.K., & Johnsen, V.L.
Sunflower seed protein. Cereal Chem., 25: 399, 1948.
- (34) Gheyasuddin, S., Cater, C.M. & Mattil, K. F.
Preparation of a colourless sunflower protein isolate. Food Technol., 24(3): 36-37, 1970.

- (35) Gheyasuddin, S., Cater, C.M. & Mattil, K.F.
Effect of several variables on the extractability of sunflower seed proteins. J. Food Science. 35(4), 453-456. - 1970a.
- (36) Kilara, A. & Humbert, E.S.
Nitrogen extractability and moisture adsorption characteristics of sunflower seed products. J. Food Science, 37(5): 771-773, 1972.
- (37) Gheyasuddin, S. et al., 1970, op. cit.
- (38) Kilara, H. & Humbert, E.S., op. cit.
- (39) Sodini, G. & Canella, M. Acidic butanol removal of color-forming phenols from sunflower meal. J. Agric. Chem. 25(4): 822-825, 1977.
- (40) Rahma, E.H. & Narasinga Rao, M.S.
Removal of polyphenols from sunflower meal by various solvents. Effects on functional properties. J. Food Science. 46(5):1521-22, 1526, 1981.
- (41) Gheyasuddin, S. et. al. 1970a. op. cit.
- (42) Smith & Johnsen, op. cit.

- (43) Gheyasuddin, S. et al, 1970, op. cit.
- (44) Gheyasuddin, S. et al, 1970a. op. cit.
- (45) Kilara, H. & Humbert, E.S., op. cit.
- (46) Canella, M., Castriotta, G. & Sodini, G.
Proprietá funzionali di prodotti di girasole dopo estrazio
ne dei pigmenti fenolici con butanolo acido. Riv. It. Sost.
Grasse. 54(2):73-76, 1977.
- (47) Sodini, G. & Canella, M., op. cit.
- (48) Rahma, E.H. & Narasinga Rao, M.S., op. cit.
- (49) Bedrosian, K. et. al, 1960, op. cit.
- (50) Bedrosian, K., Nelson, A.I. & Steinberg, M.P.
Effect of borates and other inhibitors on enzumatic brow-
ning in apple tissue. Food Technol., 13. 722-726, 1959.
- (51) Hałasman, D.R.
The effect of sulfur dioxide on oxidasing enzyme systems
in plant tissues. J. Sci, Food Agric, 25:803, 1974.