

Obtención y caracterización de aislados proteicos de colza

Por N. Gonçalves¹, J. Vioque, A. Clemente, R. Sánchez-Vioque, J. Bautista² y F. Millán

Departamento de Fisiología y Tecnología de Productos Vegetales. Instituto de la Grasa, C.S.I.C. Apdo. 1078, 41012 - Sevilla, España.

1. L'école Nationale des Ingenieurs des Techniques des Industries Agricoles et Alimentaires (ENITIAA), Nantes, Francia.

2. Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología. Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España.

RESUMEN

Obtención y caracterización de aislados proteicos de colza.

Se ha diseñado un proceso de obtención de aislados proteicos a partir de harina de colza desengrasada. El método incluye la extracción básica de las proteínas solubles seguido de una precipitación ácida en el punto isoeléctrico. El precipitado es lavado con agua (pH 4.5), etanol y acetona, obteniéndose un aislado proteico con un 86% de proteína y reduciéndose el contenido en polifenoles y azúcares solubles en más de un 90% respecto a la harina desengrasada. El aislado final presenta unas características físico-químicas que lo hacen atractivo para su uso en alimentación y obtención de hidrolizados proteicos.

PALABRAS-CLAVE: Aislado proteico – Características físico-químicas – Colza.

SUMMARY

Obtention and characterization of rapeseed protein isolates.

A method for the obtention of protein isolates from defatted rapeseed flour has been designed. The process includes a basic extraction followed by a precipitation at the isoelectric point of the proteins. The precipitate is washed with water (pH 4.5), ethanol and acetone, obtaining a protein isolate with 86% of protein and reducing the contents in polyphenols and soluble sugars in more than 90% with respect to the defatted flour. The final product have physico-chemical characteristics that make it attractive to be used as food and for the obtention of protein hydrolyzates.

KEY-WORDS: Physico-chemical characteristics – Protein isolate – Rapeseed.

1. INTRODUCCIÓN

En España y particularmente en Andalucía se produce una gran cantidad de residuos agroindustriales ricos en proteínas, del orden del millón de Tm/año (Boletín de Información Agraria y Pesquera, 1996).

La presencia de compuestos indeseables o antinutricionales junto con las proteínas en dichos subproductos, hacen que este tipo de residuo no se aproveche de forma adecuada. Estos residuos representan una de las reservas con mayor potencial de aplicación para la industria alimentaria, industria de las fermentaciones (como fuente de nitrógeno), producción de piensos compuestos, etc. Para ello es preciso desarrollar procesos adecuados que potencien la calidad de las proteínas constituyentes.

La colza (*Brassica oleracea* L.) es una fuente importante de grasa vegetal en el mundo, ocupando el cuarto lugar tras la soja, algodón y girasol. En España, la producción de colza ha ido en aumento en los últimos años, alcanzando las 100.000 Ha cultivadas en 1995, de las cuales el 50% están localizadas en Andalucía (Anuario de Estadística Agraria, 1996). La finalidad principal de su cultivo es la obtención del aceite. Como subproducto de la extracción del aceite se obtiene un residuo que, genéricamente, recibe el nombre de torta. Este residuo desengrasado tiene un contenido proteico que puede oscilar entre el 34% y el 50%, siendo equilibrado respecto a su composición aminoacídica. Así pues, la harina de colza desengrasada (HCD) presenta un alto contenido en proteínas que la hacen interesante para su utilización en la elaboración de aislados proteicos (Tzeng *et al.*, 1990; Simbaya *et al.*, 1995).

En los últimos años se están intentando desarrollar un gran número de procesos de hidrólisis de proteínas a escala comercial (Parrado *et al.*, 1993a; Parrado *et al.*, 1993b; Bautista *et al.*, 1996). La utilización racional de la HCD como residuo para la producción de hidrolizados proteicos exige la extracción previa de su fracción proteica siendo necesario optimizar la obtención del aislado proteico a partir de la harina desengrasada. Este tipo de hidrolizados proteicos constituyen una aplicación potencial para este tipo de aislados.

En este trabajo se describe un sistema de obtención de aislados proteicos de colza como paso previo para el inicio de la obtención de hidrolizados proteicos y se discuten las características físico-químicas de la harina y de los aislados proteicos obtenidos.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Material

Como materia prima se utilizó harina de colza desengrasada industrialmente, con bajo contenido en ácido erúico y glucosinolatos, suministrada por la empresa Koiposol Semillas. Proteasa, α -amilasa y amiloglucosidasa fueron proporcionadas por Sigma (St Louis, MO, U.S.A.).

2.2. Determinación de humedad, cenizas y grasas

Se determinaron de acuerdo con los métodos estándar de la A.O.A.C. (1980).

2.3. Determinación de contenido en fibras

El contenido en fibra total se determinó mediante el método enzimático-gravimétrico (Lee *et al.*, 1992). Las muestras (1 g) se homogeneizaron en 40 ml de Mes 50 mM, Tris 50 mM, pH 8.2 y sucesivamente se digirieron con 50 μ l de una solución de α -amilasa termoestable (15 min a 95° C), 100 μ l de una solución de proteasa, 50 mg/ml (30 min a 60° C) y 300 μ l de una solución de amiloglucosidasa (30 min a 60° C). Tras la digestión, las muestras se filtraron por filtros con tamaño de poro de 40-60 μ m y el residuo insoluble se pesó y secó determinándose el contenido proteico y de cenizas. El porcentaje en fibra total se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Fibra total (\%)} = \frac{[\text{residuo insoluble (g)} - \text{proteína (g)} - \text{cenizas (g)}]}{\text{muestra (g)}} \times 100.$$

2.4. Determinación de lípidos libres

Para la extracción de los lípidos libres, la harina o el aislado se extrajo con hexano durante seis horas a temperatura ambiente con una relación harina:disolvente 1:10 (p:v).

2.5. Determinación de lípidos asociados

Los lípidos asociados se extrajeron siguiendo el método de Nash *et al.* (1967). Para ello, el aislado proteico fue extraído con etanol del 86% en proporción 1:25 (p:v) a T ambiente durante 36 horas.

2.6. Determinación de azúcares solubles

La cantidad de azúcares solubles fue determinada mediante el método de Dubois *et al.* (1956). Para ello, 5 g de la harina desengrasada fueron extraídos con 200 ml de etanol del 95% mediante agitación durante dos horas a temperatura ambiente. Tras centrifugar a

4000 x g durante 15 min, el sobrenadante fue filtrado a través de papel Whatman n.º 1. Los azúcares solubles se estimaron colorimétricamente usando una curva estándar de glucosa.

2.7. Determinación de polifenoles

Se realizó a partir de un extracto etanólico obtenido de forma similar al utilizado para la determinación de los azúcares solubles. El volumen de etanol se redujo a 25 ml mediante concentración en vacío. La muestra se filtró por papel Whatman n.º 1, utilizándose alícuotas para medir la absorbancia a 324 nm. La cantidad de compuestos fenólicos se determinó como equivalentes de ácido clorogénico (Moore *et al.*, 1948).

2.8. Determinación de sólidos disueltos

Los sólidos disueltos se determinaron por gravimetría llevando a sequedad un extracto etanólico del 95%.

2.9. Absorción del agua

Se determinó de acuerdo con Sosulski (1962). Para ello las muestras (3 g) se mezclaron con 25 ml de agua y se agitaron 6 veces durante 1 min a intervalos de 10 min. La mezcla se centrifugó a 1000xg durante 25 min, el sobrenadante se desechó y el residuo se calentó en un horno a 50° C durante 25 min para eliminar el resto del agua no absorbida. A continuación el residuo se pesó y la absorción de agua se expresó como gramos de agua absorbida por 100 gramos de muestra.

2.10. Absorción de aceite

Se siguió el método de Lin *et al.* (1974). Para ello, muestras de 0.5 g se mezclaron con 6 ml de aceite de colza y se dejaron en reposo durante 30 min. La mezcla se centrifugó a 1600xg durante 25 min y se midió el volumen del sobrenadante. Los resultados se expresaron como gramos de grasa absorbida por 100 g de muestra.

2.11. Contenido en nitrógeno no proteico

La determinación del nitrógeno no proteico se realizó mediante el método de Bhatti *et al.* (1973). Para ello la harina fue extraída con etanol del 70% en una proporción 1:40 (p:v). Se agitó durante una hora a temperatura ambiente y se centrifugó a 4000xg durante 10 min. En el sobrenadante se determinó el contenido en nitrógeno por el método de Kjeldahl (AOAC 1975).

2.12. Contenido en nitrógeno proteico

La determinación de nitrógeno total se realizó según el método de Kjeldahl (AOAC 1975). El contenido en nitrógeno proteico se obtuvo por la diferencia con el no proteico. Se utilizó el factor 6.25 para obtener las cantidades proteicas correspondientes.

2.13. Digestibilidad proteica *in vitro*

Se evaluó de acuerdo al método de Hsu *et al.* (1997). Las soluciones proteicas (6.25 mg/ml en agua destilada) se ajustaron a pH 8 con NaOH 0.1N agitando durante dos horas a 37° C en un baño. La mezcla de proteasas (1.6 mg tripsina, 3.1 mg quimiotripsina y 1.3 mg peptidasa/ml) se mantuvo en hielo y se ajustó también a pH 8 con 0.1N NaOH. La solución de enzimas se añadió a la de proteínas en una relación 1:10 (v:v), registrándose la disminución de pH tras un período de 10 min. El porcentaje de digestibilidad proteica (Y) se calculó a partir de la ecuación $Y=210.47-18.1X$, donde X representa el valor de pH tras 10 min (Hsu *et al.*, 1977).

2.14. Análisis de aminoácidos

Las muestras (10 mg) se hidrolizaron con 4 ml de HCl 6N. Las soluciones se incubaron en atmósfera de nitrógeno durante 24h a 100° C. Los aminoácidos se determinaron mediante hidrólisis ácida, tras derivatización con dietil etoximetilnemalonato, mediante HPLC de acuerdo con el método de Alaiz *et al.* (1992), usando el ácido D,L- α -aminobutírico como estándar interno. Las pérdidas de aminoácidos sensibles a la hidrólisis ácida se consideraron para una cuantificación precisa. El equipo de HPLC consistió en un multi-sistema Model 600E con un detector 484 UV-Vis (Waters, Milford, MA). La separación se realizó con una columna de fase reversa 300 x 3.9 mm I.D. (Nova-pack C₁₈, 4 μ , Waters) utilizando un sistema de gradiente binario. Los solventes usados fueron (A) 25 mM acetato de sodio con 0.02% azida sódica (pH 6) y (B) acetonitrilo. Los solventes se inyectaron en la columna con un flujo de 0.9 ml/min de la siguiente forma: tiempo 0-3, min, gradiente lineal de A:B (91:9) a A:B (86:14); 3-13 min, elución con A:B (86:14); 13-30 min, gradiente lineal de A:B (86:14) a A:B (69:31); 30-35 min, elución con A:B (69:31). La columna se mantuvo a 18° C con un controlador de temperatura (Julabo F10).

2.15. Determinación del punto isoelectrico

La harina desengrasada de colza se extrajo tres veces con NaOH 0.2% en una relación 1:10 (p:v). Los extractos se centrifugaron a 4000xg durante 20 min. Se reunieron los sobrenadantes y se determinó el

nitrógeno total. A continuación se tomaron alícuotas que se llevaron a diferentes pHs desde 2.5 hasta 6.5 a intervalos de 0.5 unidades de pH. Se centrifugaron estas alícuotas a 4000xg durante 20 min. y se recuperaron los sobrenadantes en los que se determinó el nitrógeno. Con estos valores, referidos al extracto alcalino de partida, se determinó el punto isoelectrico.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención del aislado proteico

En la figura 1 se muestra el sistema de obtención de aislado de proteínas de colza. La HCD recibe primero un pretratamiento con el objeto de reducir los contenidos de compuestos no deseables en el producto final tales como fibras, azúcares reductores, polifenoles, sales o lípidos. Dicho tratamiento consiste en cuatro lavados con agua, seguido de un proceso de flotación-sedimentación. A continuación se realizan dos lavados con etanol al 20%, para disminuir los contenidos en polifenoles.

El concentrado proteico así obtenido es extraído en medio básico usando NaOH al 0.2% o H₂SO₃ al 0.25%. Con estas soluciones se extraen aproximadamente el 60% de las proteínas (Tabla I). En general, el rendimiento obtenido con los distintos sistemas probados es inferior al obtenido con otros productos, que ronda el 75%. Probablemente, el tratamiento previo para la extracción del aceite desnaturaliza parcialmente las proteínas, provocando un descenso de su solubilidad debido a la aparición en la superficie de grupos hidrófobos y a la agregación de moléculas desplegadas.

Cuando se extraen las proteínas con NaOH en una relación 1:10, el rendimiento de la primera extracción es menor que usando la relación 1:20, debido probablemente a su alta viscosidad.

Aunque el rendimiento del proceso es menor con H₂SO₃ mejora el proceso de extracción desde un punto de vista de la calidad del aislado obtenido, impidiendo la formación de puentes disulfuro. Además, éste se oxida en lugar de los polifenoles previniendo la formación de quinonas y el oscurecimiento del aislado proteico.

A continuación, las proteínas solubles así extraídas se precipitan llevando la solución al punto isoelectrico de éstas (pH 5). El rendimiento de esta precipitación se aproxima al 60% debido a que la colza presenta proteínas con un amplio rango de pI, obteniéndose a pH 5 una cantidad elevada de compuestos proteicos en solución.

El precipitado obtenido es lavado sucesivamente con agua, etanol y acetona para eliminar los restos de compuestos solubles no proteicos que pudieran quedar en el mismo, obteniéndose un aislado de proteínas que es filtrado y secado, pudiendo ser utilizado directamente en la producción de hidrolizados proteicos.

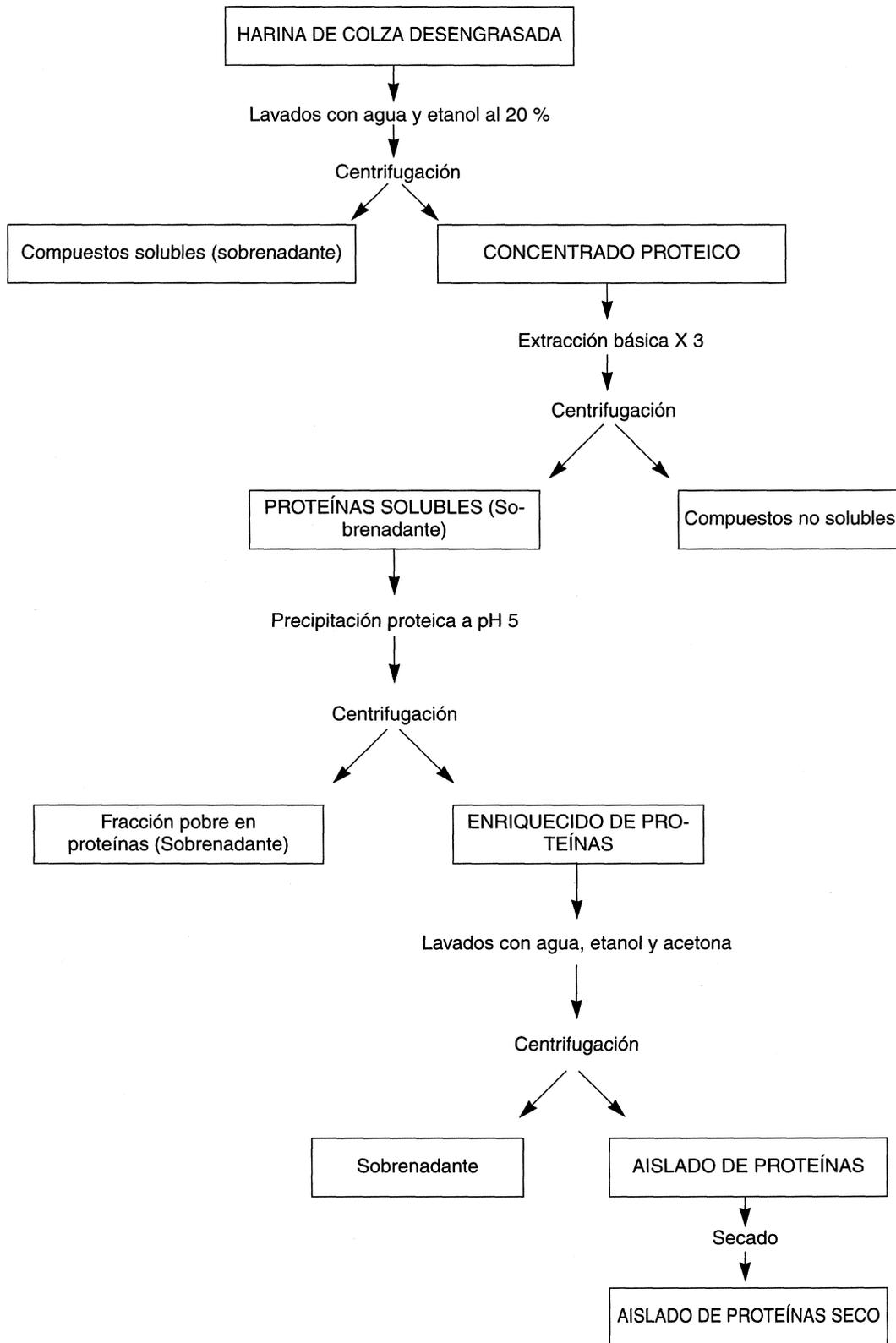


Figura 1
Proceso de obtención de un aislado proteico de colza

Tabla I
Extracción de las proteínas de la colza

Extracciones	0.2% NaOH, pH 12	0.2% NaOH, pH 12	0.25% SO ₃ H ₂ , pH 10.5
Relación harina: líquido de extracción (p:v)	1:10	1:20	1:10
Primera	34.7	45.0	41.8
Segunda	18.0	10.9	7.2
Tercera	7.1	3.0	1.6
Total	59.8	58.9	50.6

Los valores se expresan en % referidos al material original.

Cada valor representa la media \pm desviación estándar de tres medidas.

3.2. Caracterización físico-química de la harina de colza y del aislado proteico

En la tabla II se muestran las características generales de la HCD así como de los aislados proteicos lavados con agua o con agua, etanol y acetona.

El componente mayoritario de la HCD son las proteínas (31.4%) seguidas de las fibras (29.5%). Así mismo, los sólidos disueltos (13%) y los azúcares solubles (4.9%) se encuentran en cantidades significativas. La concentración de lípidos es muy baja ya que han sido extraídos previamente. La presencia de compuestos no deseables en el aislado proteico como son las fibras, azúcares solubles, polifenoles o sólidos disueltos, que pueden reaccionar con las proteínas, disminuyendo la calidad de las mismas, hacen deseable su eliminación para el aprovechamiento adecuado de las proteínas.

La humedad de la harina usada es del 4.4%. Este valor permite almacenar la harina hasta su uso sin riesgo de que sufra alteraciones químicas o de que crezcan microorganismos.

El contenido en fibras (celulosa, hemicelulosa y lignina) es alto en relación a otras oleaginosas. Esto se debe al tamaño pequeño de la semilla respecto a la cáscara, rica en fibras. En el proceso de extracción del aceite no se elimina la cáscara ya que el germen está unido a ella. La eliminación de las fibras tiene dos aspectos positivos, permite ampliar el espectro de utilización de la HCD a animales no rumiantes y reduce los fenómenos de absorción inespecífica de las proteasas sobre la fibra, optimizándose el proceso hidrolítico.

Con el método de obtención de aislados proteicos descrito se reducen los lípidos libres a valores indetectables y los lípidos asociados en más de un 50%. Los lípidos presentes en el aislado proteico pueden interactuar con las proteínas produciendo olores rancios así como sabores amargos o astringentes. Así mismo, pueden incrementar la retención de los compuestos resultantes de la propia oxidación lipídica, reduciendo el valor nutricional de las proteínas.

Con el método descrito, los contenidos en azúcares se reducen en más de un 90% en el aislado proteico final. Los azúcares constituyen otra fracción cuya eliminación es positiva, ya que pueden interactuar con las proteínas mediante la reacción de Maillard produciendo bases de Schiff. Estas bases derivan a compuestos como cetosaminas o aldosaaminas disminuyendo la biodisponibilidad de estos aminoácidos esenciales. Además, los azúcares disminuyen las posibilidades de utilización de las proteínas al caramelizar a alta temperatura. También, desde un punto de vista dietético, es interesante limitar su ingestión.

Los sólidos disueltos están representados principalmente por aldehídos, cetonas, alcoholes y fenoles que, al reaccionar con las proteínas, producen olores indeseables. Los contenidos en sólidos disueltos se reducen en más de un 95% en el caso del aislado lavado con agua, etanol y acetona.

Los contenidos en polifenoles se han reducido también en más de un 90% en los aislados obtenidos. La eliminación de los polifenoles es deseable ya que, en presencia de oxígeno, pueden oxidarse a las quinonas correspondientes que pueden reaccionar con residuos aminoacídicos produciendo un aislado proteico de color parduzco.

La absorción de agua y aceite son importantes características funcionales que afectan a la calidad del alimento. La primera mejora la textura del alimento, aunque altos niveles de absorción de agua no tienen por qué ser positivos, ya que un material con una alta absorción puede embeber una desproporcionada cantidad de agua y deshidratar otros componentes del sistema. Los valores inferiores observados en los aislados proteicos son debidos a la disminución en compuestos más higroscópicos, como los azúcares. Los valores obtenidos para esta variedad de colza son beneficiosos y se encuentran dentro del rango determinado para otras variedades (Mansour *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1994).

Tabla II
Características de la harina desengrasada y de los aislados proteicos de colza

	Harina original	Aislado proteico lavado con agua	Aislado proteico lavado con agua acetona y alcohol
Humedad	4.4	2.1	11.7
Cenizas	7.0	-	-
Fibras	29.5	-	-
Riqueza grasa	1.3	-	-
Lípidos libres	0.83	0	0
Lípidos asociados	2.2	-	1
Azúcares solubles	4.9	0.3	0.3
Sólidos disueltos	13.0	0.2	0.05
Polifenoles	2.0	0.14	0.05
Absorción de agua	352.7	253.5	207.4
Absorción de grasa	149.8	284.1	128.7
Riqueza no proteica	31.4	-	86.0
Nitrógeno no proteico	0.57	-	-
Digestibilidad	84.2	-	91.6
Color		Negro	Gris claro

Los valores se expresan en % referidos al material original.

La absorción de aceite es también un parámetro positivo, ya que la grasa absorbida protege frente a la desnaturalización térmica. Los aminoácidos hidrófobos van a ser los principales puntos de interacción entre lípidos y proteínas. Los valores detectados para esta variedad entran dentro del rango observado para los aislados de colza (Mansour *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1994).

El punto isoelectrico es ácido, centrado alrededor de pH 5 (figura 2). Este valor es similar al observado en otras variedades de colza (Mahajan *et al.*, 1995).

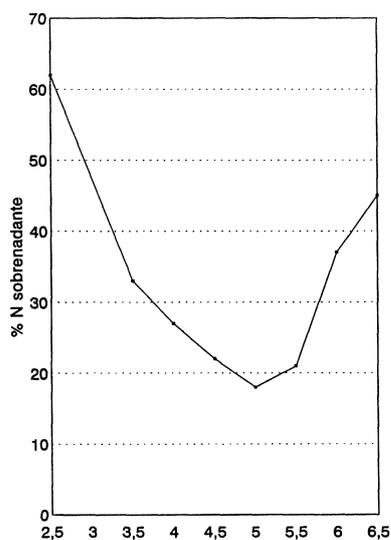


Figura 2
Punto isoelectrico de las proteínas de colza

Por último, los valores obtenidos para la digestibilidad *in vitro* son bastante altos, sobrepasando el 90% en el aislado lavado con agua, alcohol y acetona.

3.3. Composición aminoacídica

Se ha determinado la composición en aminoácidos de la harina de colza (tabla III). Los contenidos en fenilalanina, tirosina y lisina están por debajo de las recomendaciones de la FAO (1985), aunque los valores en aminoácidos azufrados sí cumplen los requisitos de la FAO. Así pues, si la HCD es utilizada como materia prima para la obtención de aislados, deben tenerse en cuenta estas deficiencias aminoacídicas y su corrección, por ejemplo, suplementando la HCD con otros alimentos no deficitarios en estos aminoácidos o con aporte artificial de los mismos. Así mismo, sería de interés intentar incrementar las cantidades de estos aminoácidos limitantes en la colza, bien por mejora genética clásica o mediante técnicas de biología molecular, por ejemplo, incrementando la expresión de proteínas más ricas en los aminoácidos deficitarios.

3.4. Clasificación de las proteínas de colza

Las proteínas constituyentes del extracto proteico se clasificaron de acuerdo al método de Osborne *et al.* (1897) (tabla IV). Así, las proteínas más abundantes son las solubles en agua o albúminas con un 49.4% seguidas de las globulinas, proteínas solubles en NaCl 1M,

Tabla III
Composición de aminoácidos

	g/ 100g de aa	g/ 100 g de proteínas	g/ 100 g de proteínas FAO (1985)
Aspártico	9.3	8.3	
Glutámico	18.5	18.3	
Serina	6.8	4.8	
Histidina	2.6	2.7	
Glicina	10.5	5.3	
Treonina	5.4	4.4	3.4
Arginina	6.4	7.5	
Alanina	6.5	3.9	
Prolina	5.3	4.1	
Tirosina	2.1	2.6	
Valina	4.3	3.4	3.5
Metionina	2.3	2.3	2.5 ^a
Cistina	1.4	2.3	
Isoleucina	3.2	2.8	2.8
Leucina	7.3	6.4	6.6
Fenilalanina	3.2	3.5	6.3 ^b
Lisina	4.9	4.8	5.8

Cada valor representa la media \pm desviación estándar de tres medidas.

^aMetionina + cisteína. ^bTirosina + fenilalanina.

que representan un 31.6%. En menor cantidad se encuentran las prolaminas, extraídas con alcohol al 70%, y las glutelinas extraídas con NaOH a pH11.

Tabla IV
Clasificación de Osborne de las proteínas de colza

Proteína	Contenido
Albúminas	49.4
Globulinas	31.6
Prolaminas	0.4
Glutelinas	18.6

Los valores se expresan en % referidos al material original. Cada valor representa la media \pm desviación estándar de tres medidas.

4. CONCLUSIONES

Se ha puesto a punto un sistema de obtención de aislados proteicos a partir de harina de colza desengrasada que consiste en una extracción de las proteínas solubles a pH básico y una precipitación posterior de las mismas al pH ácido. Con el método diseñado se reducen en más de un 90% los contenidos en sustancias indeseables para el aislado proteico, como azúcares, fenoles y otros en relación a la harina original.

El aislado proteico final tiene una riqueza en proteínas del 86%, una digestibilidad *in vitro* del 91.6% y unos valores de absorción de agua y aceite que proporcionan un producto deseable para su uso en alimentación, pudiendo utilizarse como materia prima para la obtención de hidrolizados proteicos.

Este método puede hacerse extensible a otros materiales procedentes de la extracción del aceite con

un contenido elevado de proteínas de buena calidad, tales como la harina de girasol desengrasada o semillas de leguminosas no utilizadas para consumo directo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto de investigación ALI 95-0734 del Plan Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alaiz, M., Navarro, J., Girón, J. y Vioque, E. (1992). –«Amino acid analysis by high performance liquid chromatography after derivatization with diethylethoxymethylene-malonate»– *Journal Chromatography* **591**, 181-186.
- Anuario de Estadística Agraria (1996).– Ed. Servicio Técnico del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- AOAC (1975). –«Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of Analysis, 12 edn.,»– Washington DC.
- Bautista, J., Hernández-Pinzón, I., Alaiz, M., Parrado, J. y Millán, F. (1996). –«Low molecular weight sunflower protein hydrolysate with a low concentration in aromatic amino acids»– *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 967-971.
- Bhatty, R. (1973). –«Extraction of nonprotein nitrogen from oil seed meal with different solvents»– *Cereal Chemistry* **50**, 329-336.
- Boletín de Información Agraria y Pesquera (1996). –Ed. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. y Smith, F. (1956). –«Colorimetric method for determination of sugars and related substances»– *Analytical Chemistry* **28**, 350-356.
- FAO/WHO/ONU (1985) –«Energy and protein requirements. Report of a joint meeting»– WHO, Geneva, technical report series N 724.
- Hsu, H., Vavak, D., Satterlee, L. y Miller, G. (1977). –«A multienzyme technique for estimating protein digestibility»– *Journal Food Science* **42**, 1269-1273.
- Lee, S., Prosky, L. y De Vries, J. (1992). –«Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods - enzymatic- gravimetric method, MES-Tris buffer: collaborative study.»– *Journal American Office Analytical Chemistry International* **75**, 395-416.
- Lin, M.J., Humbert, E. S., Sosulski, F. W. (1974). –«Certain functional properties of sunflower meal products.»– *Journal Food Science* **39**, 368-370.
- Mahajan, A. y Dua, S. (1995). –«Functional properties of rapeseed protein isolates.»– *Journal Food Science Technology* **32**, 162-165.
- Mansour, E. H., Peredi, J. y Dworschak, E. (1992). –«Preparation and functional properties of rapeseed protein products»– *Acta Alimentaria* **21**, 293-305.
- Moore, R., Mc Dermott, D. y Wood, T. (1948). –«Determination of chlorogenic acid in coffee»– *Analytical Chemistry* **28**, 620-624.
- Nash, A. M., Eldridge, A. C. y Wolf, W. J. (1967). –«Fractionation and characterization of alcohol extractables associated with soybean proteins. Nonprotein components.»– *Journal Agriculture Food Chemistry* **15**, 102-108.
- Osborne, T. B. y Campbell, G. T. (1897). –«The proteins of the sunflower seed»– *Journal American Chemical Society* **19**, 487.
- Parrado, J., Millán, F., Fernández-Pinzón, I., Bautista, J. y Machado, A. (1993 a) –«Characterization of enzymatic sunflower protein hydrolysates»– *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 1821-1825.
- Parrado, J., Millán, F., Hernández-Pinzón, I., Bautista, J. y Machado, A. (1993 b) –«Sunflower peptones: use as nitrogen source for the formulation of fermentation media»– *Process Biochemistry* **28**, 109-113.
- Simbaya, J., Slominsky, B. A., Rakow, G., Campbell, L. D., Downey, R. K. y Bell, J. M. (1995). –«Quality characteristics of yellow-seeded Brassica seed meals: protein, carbohydrates, and dietary fiber components»– *Journal Agriculture Food Chemistry* **43**, 2062-2066.
- Sosulski, F. (1962). –«The centrifuge method for determining flour absorption in hard red spring wheats»– *Cereal Chemistry* **39**, 344-350.
- Tzeng, Y. M., Diosaday, L. L. y Rubin, L. J. (1990). –«Production of canola protein materials by alkaline extraction, precipitation, and membrane processing»– *Journal of Food Science* **55**, 1147-1156.
- Xu, L. y Diosaday, L. L. (1994) –«Functional properties of chinese rapeseed protein isolates»– *Journal of Food Science* **59**, 1127-1130.

Recibido: Julio 1997
Aceptado: Septiembre 1997