

## OBTENCION DE HARINA Y CONCENTRADO PROTEINICO DE SEMILLAS DE *Melilotus albus*. ESTUDIO DE LA CALIDAD DE LA PROTEINA

*Sara I. L. de Mucciarelli*,<sup>1</sup> *Mirta L. de Arellano*,<sup>2</sup> *Manuela M. de Pedernera*,<sup>2</sup> *José A. Cid*<sup>3</sup> y *Carola E. Guardia*<sup>3</sup>

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia,  
Universidad Nacional de San Luis, República Argentina

### RESUMEN

El planteamiento del presente trabajo fue determinar la calidad nutritiva de harina y concentrado proteínico obtenidos a partir de semillas de *Melilotus albus* (trébol blanco).

En una primera etapa se estudió la harina, y el análisis de aminoácidos mostró a la metionina como primer limitante, con un cómputo químico (CQ)

---

Manuscrito modificado recibido: 27-10-83.

- 1 Profesora Titular Efectiva de Ensayo y Valoración de Medicamentos, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis, Chacabuco y Pedernera (5700), San Luis, Argentina.
- 2 Jefes de Trabajos Prácticos de Ensayo y Valoración de Medicamentos, e integrante del Proyecto No. 8002 de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de San Luis, Argentina, respectivamente.
- 3 Jefes de Trabajos Prácticos de Bromatología, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la citada Universidad e integrante del Proyecto arriba mencionado.

de 25, la treonina fue el segundo limitante (CQ = 55), y el valor biológico (VB) fue de 27. Se hicieron estudios de suplementación a distintos niveles de metionina, encontrándose que el mejor aprovechamiento se logra mediante el agregado de 0.30/o. El nuevo VB obtenido en estas condiciones fue de 60.

Se determinó también el índice de eficiencia proteínica (PER) el cual, corregido con respecto a la caseína, fue de 1.4.

En experimentos sucesivos se aisló la proteína previo estudio de las mejores condiciones en lo que se refiere a pH, de solubilización y precipitación, consiguiéndose eliminar los compuestos cumarínicos presentes en la harina. Con el aislado proteínico suplementado se realizaron nuevas experiencias biológicas, obteniéndose en estas condiciones un mejor aprovechamiento, con un PER de 2.4, y un VB de 69.

El estudio se completó con ensayos de inocuidad realizados con ratas de ambos sexos, alimentadas con dietas experimentales y una dieta control durante 60 días.

Los parámetros determinados revelaron que el concentrado proteínico purificado, administrado en el tiempo y condiciones en que se llevó a cabo el ensayo, no ocasionaron signos evidentes de toxicidad.

## INTRODUCCION

El propósito del estudio que aquí se describe fue evaluar la calidad de la proteína de las semillas de trébol blanco (*Melilotus albus*).

Esta leguminosa es una forrajera que se siembra juntamente con plantas propias del invierno, generalmente, centeno. Son plantas melíferas y de abono que mejoran la estructura del suelo por el tipo de raíz, pivotante y profunda, con buena adaptación en regiones semiáridas y resistentes a suelos arenosos y alcalinos. Se encuentra muy difundida en la Provincia de San Luis, en donde las condiciones para su cultivo son óptimas.

El trébol blanco ha sido poco estudiado, y ajeno a su descripción botánica (1), no hemos encontrado publicaciones que se refieran a la calidad de su proteína.

El estudio que seguidamente se describe comprendió la caracterización química y nutricional de la harina obtenida a partir de semillas, con y sin suplementación con DL-metionina, y del aislado proteínico suplementado con el aminoácido citado. Se completó con algunos ensayos de inocuidad.

## MATERIALES Y METODOS

*Preparación de las Muestras*

1. La harina sometida a estudio, se obtuvo por molienda de semillas de *Melilotus albus* previamente secadas durante 24 horas a 50°C. Luego el producto se cernió en un tamiz No. 2; se obtuvo así una harina de color amarillo claro, aromática. Las semillas nos fueron generosamente proporcionadas por la Dirección de Agricultura de la Provincia de San Luis.
2. Los concentrados proteínicos fueron obtenidos por extracción en medio alcalino y precipitación en medio ácido (2, 3). Los mejores resultados se obtuvieron a un pH de extracción de 9 y a un pH de precipitación de 4, y la extracción se realizó en la relación de 1:20.

*Métodos Analíticos*

Se determinó el contenido de humedad, extracto etéreo, cenizas totales y fibra cruda de acuerdo a las técnicas descritas por la AOAC (4).

Además, se valoraron azúcares reductores y no reductores (5), almidón (6), proteínas por mineralización mediante el procedimiento de Kjeldahl, con posterior determinación de nitrógeno usando electrodo ión selectivo (7). Para convertir el dato de nitrógeno en proteína se usó el factor 6.25. Se evaluó también el nitrógeno no proteínico mediante el uso de solución de ácido tricloroacético al 100/o (8).

La determinación de hierro y cobre se hizo sometiendo la muestra de harina humectada con glicerina-álcohol 1:1 a una temperatura de 600°C durante una noche, y posteriormente fueron cuantificados por espectrofotometría de absorción atómica, usando el espectrofotómetro AROLAB S.A.I.Y.C. modelo M.K. 4 (9).

La cuantificación de fósforo se llevó a cabo por espectrofotometría en base a la formación de azul de molibdeno (10), con previa destrucción de materia orgánica nítrico-sulfúrico y el calcio, por el método del ácido cloranílico (11). Ajeno a ello, se determinaron dos vitaminas: ácido ascórbico por el método de Roe y Kuether (12), y niacina por el método microbiológico (13).

El contenido de aminoácidos se estableció en muestras desengrasadas durante seis horas con éter de petróleo y en caliente. La

muestra fue hidrolizada con HCl 6.N en ampollas, evacuadas y selladas a 110°C durante 22 horas, y la cuantificación final se hizo en un analizador de aminoácidos Beckman modelo 112-CL. El triptofano se analizó utilizando la técnica descrita por Lombard y Lange (14).

Con los datos obtenidos se efectuó el cálculo de cómputo químico (CQ) para aminoácidos esenciales (15).

### *Evaluación de la Calidad de la Proteína Mediante Ensayos Biológicos*

La utilización proteínica neta (NPU) y la digestibilidad se determinaron según las técnicas de Miller y Bender (16), usándose para el caso ratas cepa Wistar de 30 días de edad y pesos comprendidos entre 45 y 55 g. La experiencia se llevó a cabo en grupos de cuatro animales cada uno; dos grupos para las dietas estudiadas y uno para la dieta libre de proteína. Las dietas sometidas a investigación fueron preparadas de acuerdo a Sambucetti, Gallegos y Sanahuja (17). Los animales se mantuvieron en jaulas individuales y se les suministró agua y dieta *ad libitum*. El valor biológico se calculó como:  $VB = NPU/digestibilidad$ .

El índice de eficiencia proteínica (PER) se determinó siguiendo el método de Campbell (18).

### *Ensayos de Inocuidad*

Aprovechando la experiencia para determinar el PER, a los dos grupos de 10 ratas cada uno (cinco machos y cinco hembras) se les siguió alimentando por 30 días más; uno, de referencia, cuyo aporte proteínico lo suministraba la caseína, y el otro, experimental, en cuyo caso el 100/o de proteína fue aportado por harina de *M. albus* o por el concentrado proteínico obtenido a partir de la misma.

Al término del ensayo los animales se sacrificaron por punción cardíaca, extrayéndoseles sangre y algunos órganos. En sangre total, usando un "pool" de ratas hembra y macho, correspondiente al lote experimental y control, se determinó el hematocrito (micro hematocrito). Seguidamente, se obtuvo el peso individual de algunos órganos: hígado, riñón, bazo, páncreas y suprarrenales y se estudió individualmente la composición porcentual del hígado: agua (método indirecto), grasa (extracción en Soxhlet con éter etílico), y proteína por el método de Kjeldahl con deter-

minación final de nitrógeno por potenciometría (7), usando 6.25 como factor de conversión. Se hizo también el estudio histológico de cortes de hígado y bazo, los que fueron fijados por líquido de Bouin débil, con un tiempo de fijación de 6 horas; se deshidrató y realizó inclusión en parafina, haciéndose cortes con un espesor de tres a cuatro micras; la coloración usada fue hematoxilina-eosina.

### *Investigación de Factores Tóxicos*

Se investigó la presencia de cumarina común en el género *Melilotus* por cromatografía en capa delgada, usando como soporte MN-silica gel G/UV<sub>254</sub>; solvente de corrida benceno-dioxano-acético (120:20:1). La investigación de compuestos cumarínicos con actividad anticoagulante fue realizada por método biológico, mediante la determinación de tiempo de protrombina (19).

La actividad antitriptica se investigó aplicando la técnica propuesta por Bouzas y Bertoni (20).

Por otra parte, la actividad hemaglutinante fue determinada por el procedimiento de Jaffé y Brucher (21), para lo cual se obtuvieron extractos, suspendiéndose la harina en NaCl al 10/o en la proporción de 1:5.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### *1. Estudio de la Harina Cruda de Melilotus albus*

a) *Sin suplementación* — En la Tabla 1 se detallan los resultados obtenidos en la determinación química porcentual; es de destacar el alto contenido de proteína, del total de N (5.9 g/100 g), 180/o del cual era no proteínico. También cabe subrayar el contenido de fósforo y calcio.

La composición en aminoácidos de la harina estudiada se consigna en la Tabla 2. En ella se incluyen también los valores de CQ y el contenido de aminoácidos esenciales de la proteína de huevo.

El contenido de lisina fue muy bueno, con un CQ igual a 109, tomando como referencia la proteína del huevo, y también es de destacar el buen contenido de triptofano, cuyo CQ fue igual a 75. Según se encontró, la metionina es el primer aminoácido limitante presentando un CQ de 25. Como era de prever, la harina usada como fuente de proteína en las dietas sometidas a estudio

TABLA 1

COMPOSICION QUIMICA DE LA HARINA DE *Melilotus albus*

Humedad	9.57 g/100 g
Proteína	36.87 g/100 g
Extracto etéreo	8.35 g/100 g
Cenizas totales	3.70 g/100 g
Fibra cruda	7.46 g/100 g
Azúcares reductores, como maltosa	2.76 g/100 g
Azúcares no reductores, como sacarosa	0.83 g/100 g
Almidón	27.00 g/100 g
Acido ascórbico	47.00 mg/100 g
Niacina	3.20 mg/100 g
Fósforo	565.00 mg/100 g
Hierro	6.25 mg/100 g
Cobre	1.40 mg/100 g
Calcio	200.00 mg/100 g

arrojó valores bajos de utilización proteínica neta (NPU) y de valor biológico (VB), según datos consignados en la Tabla 3, en la que se presenta también la digestibilidad. La investigación de hemaglutininas fue negativa en las condiciones en que se llevó a cabo el ensayo. La concentración de factores antitripticos fue baja: 6 UTI/mg proteína (unidades de tripsina inhibidas por mg de proteína).

b) *Suplementada al 0.30/o con DL-metionina* – Se ensayó la suplementación de la harina con metionina a distintos niveles, obteniéndose el mejor valor nutritivo al nivel de 0.30/o.

Con la harina así suplementada se realizaron distintas experiencias *in vivo*. En la Tabla 3, por ejemplo, se dan los valores de NPU, digestibilidad, valor biológico y PER, observándose que en este último ensayo se obtuvo un valor de 1.61 en contraste a uno de caseína de 2.90, de modo que, corregido, fue igual a 1.40 (véase la Tabla). Es de mencionar el aumento del valor biológico conseguido con la suplementación.

La investigación de cumarina en la harina, usando un extracto clorofórmico, reveló su presencia en la semilla. Probamos si se habían formado compuestos cumarínicos con actividad anticoagu-

TABLA 2

CONTENIDO DE AMINOACIDOS DE HARINA Y CONCENTRADO  
 PROTEINICO DE *Melilotus albus* Y VALORES DE COMPUTO QUIMICO

Aminoácido	Proteína de huevo g/16 g N	Harina de <i>M. albus</i> g/16 g N	Cómputo químico	Concentrado proteínico de <i>M. albus</i> g/16 g N	Cómputo químico
Isoleucina	6.29	3.75	59	3.88	62
Leucina	8.50	7.07	83	7.21	85
Lisina	6.40	6.96	109	6.50	101
Metionina	3.36	0.84	25	0.94	28
Cistina	2.40	1.70	71	1.52	63
Fenilalanina	5.73	4.23	74	4.20	73
Tirosina	4.20	2.93	70	2.10	50
Treonina	5.12	2.83	55	2.40	47
Triptofano	1.49	1.12	75	1.18	79
Valina	6.85	4.20	61	4.21	61
Arginina		10.89		11.20	
Alanina		3.71		3.20	
Ac. Aspártico		10.44		8.02	
Ac. Glutámico		17.21		14.42	
Glicina		4.69		3.51	
Prolina		3.25		4.50	
Serina		3.42		3.50	
Histidina		3.44		3.46	

lante, alimentando dos lotes de ratas cepa Wistar como sigue: uno, con dieta a base de caseína, y el otro, con la elaborada a base de la harina sometida a estudio; la experiencia consistió en determinar el tiempo de protrombina. El lote control acusó una media de 12.2 segundos con una desviación estándar de  $\pm 0.009$ ; para el lote problema, la media fue de 12.98, con una desviación estándar de  $\pm 0.077$ ; ( $P < 0.05$ ). Al expresar los resultados en términos de porcentaje, los valores fluctuaron entre 78 y 85%, siendo los valores normales de 85 a 110% (22).

El ensayo de inocuidad con los dos grupos de ratas que reci-

TABLA 3

CALIDAD BIOLÓGICA DE LA HARINA DE *M. albus*, DE HARINA DE  
*M. albus* SUPLEMENTADA AL 0.30% CON METIONINA, Y DEL  
CONCENTRADO PROTEINICO SUPLEMENTADO

Fuente de proteína	PER* $\bar{x} \pm DE$	NPU $\bar{x} \pm DE$	Digestibilidad $\bar{x} \pm DE$	Valor biológico
Harina de <i>M. albus</i>	—	22.7 $\pm$ 1.20	82.4 $\pm$ 3.84	27
Harina de <i>M. albus</i> + 0.30% met.	1.4 $\pm$ 0.48	50.4 $\pm$ 2.10	83.7 $\pm$ 1.70	60
Conc. proteínico + 0.30% met.	2.4 $\pm$ 0.58	57.2 $\pm$ 2.58	83.5 $\pm$ 1.30	69

\* PER corregido con respecto a la caseína, que se llevó a 2.50.

bieron la dieta control a base de caseína, y la dieta bajo investigación permitió detectar signos de toxicidad. El peso de los animales, el de algunos órganos y los valores del hematocrito se detallan en la Tabla 4. Se deduce que la alimentación con la dieta experimental iniciada al destete y mantenida durante 60 días, provocó hipertrofia del hígado, páncreas, riñón y suprarrenales, con diferencias significativas con respecto al lote testigo. Se aprecia también un sensible aumento del índice páncreas/bazo, anormalidad que Jaffé y Vega atribuyen a la presencia de inhibidores de la tripsina (23). En el caso de la harina investigada por nosotros, el fenómeno no sería atribuible a la presencia de este antinutriente, pues se encontró en baja concentración, sino más bien a la presencia de derivados cumarínicos tóxicos.

En cuanto a la composición química porcentual de hígado, los datos obtenidos no revelan diferencias significativas (Tabla 5).

En el estudio histológico de bazo e hígado se apreció que el primero presenta características normales, no observándose alteraciones en las células ni en los sinusoides distribuidos en toda la

TABLA 4

PESO DE HIGADO, BAZO, PANCREAS, SUPRARRENALES Y RIÑÓN DE RATAS MACHO Y HEMBRA ALIMENTADAS DURANTE 60 DIAS CON UNA DIETA A BASE DE HARINA DE *M. albus* SUPLEMENTADA AL 0.30/o CON METIONINA, Y CON LA DIETA CONTROL

	Sexo	Dietas	
		Experimental	Control
Peso de las ratas	Macho	170.400 ± 6.920 <sup>a**</sup>	229.400 ± 8.500
	Hembra	148.200 ± 6.000 <sup>**</sup>	192.000 ± 7.100
Hígado g/100 g rata	Macho	6.100 ± 0.180 <sup>**</sup>	4.020 ± 0.220
	Hembra	6.240 ± 0.160 <sup>**</sup>	4.000 ± 0.230
Bazo g/100 g rata	Macho	0.150 ± 0.050 <sup>**</sup>	0.280 ± 0.020
	Hembra	0.133 ± 0.004 <sup>*</sup>	0.200 ± 0.020
Páncreas g/100 g rata	Macho	0.120 ± 0.010 <sup>*</sup>	0.053 ± 0.040
	Hembra	0.110 ± 0.010 <sup>*</sup>	0.049 ± 0.020
Riñón g/100 g rata	Macho	0.520 ± 0.030 <sup>**</sup>	0.370 ± 0.020
	Hembra	0.460 ± 0.020 <sup>**</sup>	0.360 ± 0.030
Suprarrenales mg/100 g rata	Macho	15.000 ± 0.500 <sup>**</sup>	9.020 ± 0.040
	Hembra	13.120 ± 0.850 <sup>*</sup>	10.500 ± 0.450
<i>Valores del hematocrito</i>			
	Macho	540/o	470/o
	Hembra	510/o	450/o

<sup>a</sup> Media ± desviación estándar.

<sup>\*</sup> Diferencia significativa respecto al lote control,  $P < 0.01$  calculado por la prueba de "t" de Student.

<sup>\*\*</sup> Diferencia altamente significativa respecto al lote control,  $P < 0.001$  calculado por la prueba de "t" de Student.

TABLA 5

COMPOSICION DEL HIGADO DE RATAS MACHO Y HEMBRA ALIMENTADAS CON DIETA A BASE DE HARINA Y CONCENTRADO PROTEINICO DE *M. albus*, SUPLEMENTADAS AL 0.3°/o CON METIONINA, Y CON LA DIETA CONTROL (g/100 g de hígado)

Dieta	Agua		Grasa		Proteína	
	M	H	M	H	M	H
Harina de <i>M. albus</i> + 0.3°/o Met.	69.50 ± 0.30*	71.90 ± 0.70	4.40 ± 0.21	4.30 ± 0.20	21.20 ± 1.50	20.80 ± 0.40
Concentrado proteínico de <i>M. albus</i> + 0.3°/o Met.	69.10 ± 0.30	70.00 ± 0.45	4.80 ± 0.18	4.50 ± 0.11	20.70 ± 0.23	21.40 ± 0.53
Dieta control	69.45 ± 0.30	71.00 ± 0.65	4.70 ± 0.26	4.50 ± 0.22	20.70 ± 0.50	20.50 ± 0.50

\* Media ± desviación estándar.

pulpa roja. En cuanto al hígado, el tejido hepático acusó algunas alteraciones, tanto a nivel parenquimatoso, como estromático y vasculo sanguíneo. El núcleo de los hepatocitos tiene características normales, pero el citoplasma está ocupado por numerosos gránulos y vacuolas, signos evidentes de lisis o ruptura. Además, se observa hipertrofia celular. Distribuidos en todo el tejido existen depósitos con afinidad tintoreal acidófila formada por sangre extravasada. El aspecto de éstas formaciones sugiere que las hemorragias se produjeron antes del sacrificio, y no durante la extracción del material.

## 2. *Obtención y Estudio de Concentrados Proteínicos (CP), Obtenidos a Partir de Harina de Melilotus albus*

El método usado para la obtención de concentrados proteínicos permitió la extracción del 80% del nitrógeno presente en la harina; y del nitrógeno extraído, el 90% precipitó a un pH de 4. El rendimiento final en porcentaje de nitrógeno, como concentrado proteínico, respecto del original en la harina, fue de 70%. El contenido proteínico del concentrado obtenido es de 90.60 a 96.25 g/100 g. La experiencia, cabe aclarar, fue llevada a cabo a nivel de laboratorio. Como modificación al método propuesto por Bertoni y Cattaneo (2) y por Kaba y Sanahuja (3), fue necesario suspender el precipitado en una mezcla de cloroformo-alcohol (1:1.5) con agitación mecánica durante 15 min, centrifugarlo, y lavarlo con alcohol hasta llegar a una reacción negativa de compuestos cumarínicos en los líquidos de lavado (tres bastaron para ese propósito).

El concentrado proteínico convenientemente secado y molido es de color blanco grisáceo. Sobre el material así obtenido se practicó la determinación de aminoácidos. Los valores resultantes se incluyen en la Tabla 2, donde estos datos se comparan con los señalados en la misma Tabla para los que se obtuvo con la harina completa. Se deduce así que la concentración original no fue mayormente afectada por el procedimiento de extracción.

Con este CP se preparó la dieta (17) a la cual se le agregó 0.30% de metionina, y con ella se hicieron los ensayos biológicos.

En la Tabla 3 se consignan los valores de PER, NPU, digestibilidad y valor biológico. De los datos obtenidos se infiere que el CP es mejor aprovechado, siendo muy notable el aumento de PER, que de 1.40 para la harina suplementada, pasó a ser de 2.40; am-

TABLA 6

**PESO DE HIGADO, BAZO, PANCREAS, SUPRARRENALES Y RIÑON DE RATAS MACHO Y HEMBRA ALIMENTADAS DURANTE 60 DIAS CON UNA DIETA A BASE DE CONCENTRADO PROTEINICO SUPLEMENTADA AL 0.3% CON METIONINA, Y CON LA DIETA CONTROL**

	Sexo	Dietas	
		Experimental	Control
Peso de las ratas	Macho	176.160 ± 8.700*	159.900 ± 7.420
	Hembra	149.800 ± 6.600	159.000 ± 3.000
Hígado g/100 g rata	Macho	3.810 ± 0.240	3.860 ± 0.360
	Hembra	4.100 ± 0.180	4.020 ± 0.160
Bazo g/100 g rata	Macho	0.160 ± 0.011	0.170 ± 0.020
	Hembra	0.160 ± 0.030	0.160 ± 0.020
Páncreas g/100 g rata	Macho	0.063 ± 0.010	0.064 ± 0.060
	Hembra	0.064 ± 0.010	0.059 ± 0.003
Riñón g/100 g rata	Macho	0.410 ± 0.023	0.390 ± 0.020
	Hembra	0.410 ± 0.020	0.440 ± 0.120
Suprarrenales mg/100 g rata	Macho	7.550 ± 0.230	7.220 ± 0.380
	Hembra	8.320 ± 0.250	8.100 ± 0.180
<i>Valores del hematocrito</i>			
	Macho	50% <i>o</i>	51% <i>o</i>
	Hembra	50% <i>o</i>	49% <i>o</i>

\* Media ± desviación estándar.

bos valores fueron corregidos con respecto a la caseína, que se llevó a 2.50

Los ensayos de inocuidad realizados de acuerdo al esquema ya citado, nos permitieron deducir —en base a algunos datos experimentales, por ejemplo, peso de órganos, valores de hematocrito (Tabla 6) y composición porcentual de hígado (Tabla 5)— que la dieta sometida a estudio, administrada durante 60 días a ratas de 21 días no provocó modificaciones significativas.

En cuanto al estudio histológico, pudimos apreciar lo siguiente. El *bazo*, por ejemplo era normal, apareciendo sangre sólo sobre el tejido linfático y en pequeña cantidad, encontrándose la mayor proporción sanguínea en la pulpa roja dentro de los senos esplénicos. *Hígado*. Este órgano mostró a la observación al microscopio, hepatocitos normales. Los vasos sanguíneos no acusaban alteraciones.

Estos resultados, por consiguiente, nos permitieron inferir que el proceso de extracción proteínica redujo la presencia de factores tóxicos.

En términos generales podemos, pues, concluir que el concentrado proteínico purificado y convenientemente suplementado con metionina, puede ser un buen recurso alimenticio.

#### SUMMARY

##### OBTENTION OF A FLOUR AND A PROTEIN CONCENTRATE FROM *Melilotus albus* SEEDS. STUDY ON PROTEIN QUALITY

The present research was carried out to determine the nutritive quality of the flour and protein concentrate from *Melilotus albus* (white clover) seeds.

The flour was studied first. The protein analysis showed methionine to be the first limiting amino acid with a chemical score of 25, with threonine as the second. The biological value obtained was 27. Supplementation studies were performed with different levels of methionine and it was found that the 0.30/o level resulted in the best net performance. The biological value obtained under these conditions was 60. The protein efficiency ratio (PER) was also determined, with a value of 1.40 after being corrected with respect to casein.

The protein was isolated after studying the pH optimum solubility and precipitation conditions until the flour coumarin compounds were eliminated. Further biological experiments were carried out with the supplemented isolated protein. Under these conditions, a PER value of 2.4 and a biological

value of 69 were obtained.

No toxicity was observed in rats of both sexes by administration of the protein concentrate during 60 days, at least in the parameters studied during this period.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Lic. Luis Scardapane, de la Cátedra de Histología de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (República Argentina), la realización del estudio histológico.

El trabajo, en su totalidad, se llevó a cabo con el aporte financiero de la Subsecretaría de Ciencia y Tecnología (SUBCYT) y de la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de San Luis.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Burkart, A. **Las Leguminosas Argentinas**. Buenos Aires, Acme Agency, 1952.
2. Bertoni, M. H. & P. Cattaneo. Aislamiento de proteínas de harina integral de semilla de lino. **Anales Asoc. Quim. Argentina**, **60**: 363, 1970.
3. Kaba, H. & J. C. Sanahuja. Evaluación nutricional de concentrados proteicos de porotos (*Phaseolus vulgaris*) y de lentejas (*Lens esculenta*). **Arch. Latinoamer. Nutr.**, **28**: 169, 1978.
4. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 12th. ed. Washington, D. C., The Association, 1975.
5. Hart, F. L. & H. J. Fisher. **Análisis Moderno de los Alimentos**. Zaragoza, España, Editorial Acribia, 1971, p. 88.
6. Montes, A. L. **Bromatología**. Tomo II. Buenos Aires, Editorial Universitaria de Buenos Aires, 1969, p. 90.
7. Bremner, J. M. & M. A. Tabatabai. Use of an ammonia electrode for determination of ammonium in Kjeldahl analysis of soils. **Comm. in Soil Sci. and Plant. Anal.**, **3**(2): 159, 1972.
8. Pérez, G., C. Martínez & E. Díaz. Evaluación de la calidad de la proteína de la *Erythrina edulis* (Balu). **Arch. Latinoamer. Nutr.**, **29**: 193-207, 1979.
9. Información Técnica ARO No. 4003. Buenos Aires.
10. Jacobs, M. B. **Chemical Analysis of Food and Food Products**. New York, N. Y., R. Kriger Publishing Co. Inc., 1973, p. 754.

11. Welcher, J. F. (Ed.) **Standard Methods of Chemical Analysis**. Vol. IIIB, 6th ed. New Jersey, N. J., D. Van Nostrand Company, Inc., 1966, p. 1110.
12. Strohecker, R. & H. M. Henning. **Análisis de Vitaminas. Métodos Comprobados**. Madrid, Editorial Montalvo, 1967, p. 296.
13. Carrera, P. A. & R. N. Basualdo. Estudios de métodos microbiológicos para la determinación de vitaminas hidrosolubles en oleaginosas. **Rev. Asoc. Bioquim. Arg. (ABA)**, **192-193**: 74-85, 1975.
14. Lombard, J. H. & D. J. de Lange. The chemical determination of tryptophan in food and mixed diets. **Anal. Biochem.**, **10**: 260-265, 1965.
15. Mitchell, H. H. & R. J. Block. Some relationship between the amino acid contents of proteins and their nutritive values for rats. **Biol. Chem.**, **163**: 599-620, 1949.
16. Miller, D. S. & A. E. Bender. The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. **Brit. J. Nutr.**, **9**: 382-388, 1955.
17. Sambucetti, M. E., G. Gallegos & J. C. Sanahuja. Estudio de la proteína extraída de semilla de lino. Valor nutritivo e inocuidad. **Arch. Latinoamer. Nutr.**, **20**: 119-133, 1970.
18. Campbell, J. A. Biological assay methods for protein evaluation. (Chapter III, Appendix A: Method for Determination of PER and NPR). En: **Evaluation of Protein Quality**. Washington, D. C., National Academy of Sciences-National Research Council, 1963, p. 31 (NAS-NRC Publication 1.100).
19. Eichelberger, J. W. **Métodos de Laboratorio en Coagulación Sanguínea**. Madrid, Edit. ATIKA, S. A., 1966, p. 29.
20. Bouzas, J. D. & M. H. Bertoní. Evaluación de la actividad antitriptica de productos de soja. Ajuste del método con sustrato sintético. Presentado en: **I Congreso Latinoamericano de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Buenos Aires, Argentina, noviembre de 1979** (Corresponde al Trabajo No. 117).
21. Jaffé, M. G. & O. Brucher. Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemaglutininas de frijoles (*Phaseolus vulgaris*). **Arch. Latinoamer. Nutr.**, **22**: 267-281, 1972.
22. Balcells Gorina, A. **La Clínica y el Laboratorio**. Barcelona, Edit. Marín S. A., 1973, p. 195.
23. Jaffé, W. G. & C. L. Vega. Heat-labile growth-inhibiting factors in beans (*Phaseolus vulgaris*). **J. Nutrition**, **94**: 203-210, 1968.