

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Handwritten signature

ESTUDO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS PROTEÍNAS
DO GERGELIM (Sesamum indicum, L.)

MARISA JOSEFINA GUERRA
Licenciada em Biologia

Orientador:

Prof. Dr. Young Kun Park

Dissertação apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de
Mestre em Ciência em Tecnologia de Alimentos.

Handwritten number 01
BIBLIOTECA CENTRAL

1974

À meus pais

Carmem Sabina e Constantino

À minhas irmãs

Elba e Helimenas

Com carinho ao

Doutor Elbio Ventura Modernell

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Young Kun Park pela sua orientação durante a realização deste trabalho.

Ao Doutor André Tosello, Diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas e do Curso de Pós-Graduação.

À Organização dos Estados Americanos, patrocinadora do Curso.

Ao Doutor Werner Jaffé pelo apoio e incentivo, e ao Instituto Nacional de Nutrición de Venezuela.

Ao pessoal da Seção de Química do Instituto Agronômico de Campinas e da Seção de Bioquímica do Instituto de Tecnologia de Alimentos, pelo auxílio na execução dos trabalhos experimentais.

A meus amigos e colegas Eng^{os} Ramón Hinojosa e Pedro Luís Antunes por sua valiosa ajuda tanto física como moral.

Aos professores, companheiros e colegas, e a todas as pessoas que contribuíram para a execução deste trabalho.

...)))((((...

C O N T E Ú D O

página

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3. MATERIAIS.....	15
4. MÉTODOS.....	16
4.1. Preparação da Amostra.....	16
4.2. Extração do Óleo.....	16
4.3. Preparação das Frações de Farinha de Gergelim.....	16
4.4. Análises.....	16
4.4.1. Umidade.....	17
4.4.2. Nitrogênio Total.....	17
4.4.3. Proteínas.....	17
4.4.4. Óleo.....	17
4.4.5. Cinzas.....	17
4.4.6. Fibra Crua.....	17
4.5. Método de Extração da Proteína.....	18
4.5.1. Extração da Proteína com Sais Minerais a Diferentes Concentrações.....	18
4.6. Fatores que Afetam a Solubilidade do Nitrogênio.....	19
4.6.1. Efeito do pH.....	19
4.6.2. Efeito do Tempo de Extração.....	19
4.6.3. Efeito da Relação Farinha-Solvente.....	20
4.6.4. Efeito da Temperatura.....	20
4.6.5. Efeito de Diferentes Sais a Diferentes Concentrações.....	20
4.6.6. Efeito da Natureza de Vários Ácidos.....	20
4.7. Preparação de um Concentrado Protéico de Farinha de Gerge lim.....	20

4.8.	Preparação de Proteína Isolada de Farinha de Gergelim.....	21
4.9.	Preparação das Amostras para Eletroforese.....	21
4.9.1.	Eletroforese das Proteínas em Acetato de Celulose.....	21
4.9.2.	Eletroforese em Gel com Dodecil Sulfato Sódio (SDS) poliacrilamida.....	22
4.10.	Determinação de Aminoácidos.....	23
4.11.	Determinação da Digestibilidade Enzimática.....	24
5.	RESULTADOS.....	25
5.1.	Análises Químicas.....	25
5.2.	Obtenção de Várias Frações de Farinha de Gergelim.....	25
5.3.	Fatores que Afetam a Solubilidade das Proteínas.....	25
5.3.1.	Efeito de pH.....	25
5.3.2.	Efeito de Diferentes Soluções Salinas a Diferentes Concentrações.....	26
5.3.3.	Outros Fatores.....	26
5.4.	Conteúdo de Aminoácidos.....	26
5.5.	Digestibilidade Enzimática.....	26
5.6.	Eletroforese das Proteínas em Acetato de Celulose.....	27
5.7.	Eletroforese em Gel de SDS-poliacrilamida.....	27
6.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	46
6.1.	Análises.....	46
6.2.	Frações Obtidas da Farinha de Gergelim.....	47
6.3.	Fatores que Afetam a Solubilidade do Nitrogênio.....	48
6.3.1.	Efeito do pH.....	48
6.3.2.	Efeito de Diferentes Sais em Diferentes Concentrações.....	49
6.3.3.	Efeito do Tempo.....	49
6.3.4.	Efeito da Temperatura.....	50
6.3.5.	Efeito da Relação Farinha:Solvente.....	50
6.4.	Composição em Aminoácidos.....	50
6.5.	Digestibilidade Enzimática.....	51
6.6.	Eletroforese em Acetato de Celulose.....	52
6.7.	Eletroforese em Gel de SDS-poliacrilamida.....	52

página

7. CONCLUSÕES.....	54
8. BIBLIOGRAFIA.....	55
AGRADECIMENTO	

RESUMO

As características físico-químicas das proteínas de gergelim em amostras foram estudadas na variedade Venezuela 51 as quais foram extraídas com solvente (hexano) até um conteúdo de óleo menor do que 1%. A farinha foi classificada por peneira de malha de 50 mesh. A fração grossa foi classificada como fração corticada e o pó fino como fração descorticada.

Foram feitas as análises de umidade, proteína, cinza, óleo e fibra crua, bem como estudadas as características de solubilidade em meio aquoso e em diferentes faixas de pH. Encontrou-se que a menor solubilidade das proteínas está em pH de 4,5-4,7, aumentando com o aumento de acidez e da alcalinidade. Observou-se que a solubilidade das proteínas de gergelim, em diferentes soluções salinas, é baixa na zona de pH inferior a 4, aumentando até um máximo no pH 9,0.

Extrações, usando-se diferentes relações de farinha:solvente, demonstraram que a mais eficiente na extração de proteínas do gergelim é a relação de 1:15 (p/v). Determinou-se que o efeito do tempo de extração, na solubilidade das proteínas, apresentou-se ótimo em torno de 30 minutos. Também demonstrou-se que ao aumentar a temperatura até 60°C aumenta a solubilidade das proteínas, logo diminuindo, possivelmente pela parcial desnaturação das mesmas.

Por eletroforese em película fina de acetato de celulose foi possível a separação de 5 tipos diferentes de proteínas. Por eletroforese em gel de SDS (dodecil sulfato de sódio) -poliacrilamida foram separadas oito frações de proteínas determinando-se os respectivos pesos moleculares e encontrando-se um máximo de 65.000 e um mínimo de 17.000.

Estabelecidas as condições de máxima e mínima solubilidade, aproximadamente 90% do nitrogênio solúvel foi extraído com as soluções salinas a pH 8,0 à temperatura ambiente. As soluções aquosas a pH 8 apresentaram um efeito menor para a extração das proteínas. As proteínas foram isoladas por extração a pH 8 e precipitação a pH 4,5-4,6. Logrou-se a obtenção de um concentrado protéico com aproximadamente 50% de proteínas e um isolado com cerca de 80% de proteínas.

Também foi estudada a digestibilidade enzimática com pepsina e pancreatina, do isolado, concentrado e a fração descorticada, encontrando-se até 95% de digestibilidade, o que representaria um material prático para o consumo humano.

SUMMARY

Physical-chemistry characteristics of protein from sesame samples of Venezuela 51 variety were studied after extraction with solvent (hexane) until the oil content was less than 1%. The protein flour was classified with by passing through a 50 mesh screen. The coarse fraction was classified as corticated fraction and the fine powder as decorticated fraction.

Analyses of water content, ashes, oil content and cruder fiber content were studied as well as the solubility characteristics in aqueous systems of different pH. The optimum pH range was found to be 4.5-4.7, increasing with the increase of acidity and alkalinity. It was also observed that the solubility of sesame protein at different salt solutions is low at the pH zone lower than 4.0, increasing to a maximum at pH 9.0. Extraction using different ratios of flour-solvent showed that the most efficient ratio for sesame protein extraction is 1:15 (w/v). The optimum extractions time, according to the solubility of the protein was determined to be 30 minutes. It was also demonstrated that when the temperature is increased to 60°C the protein solubility increases and then decreases, possibly due to the partial denaturation of the protein.

Five different types of proteins were separated by electrophoresis in cellulose acetate film. Eight protein fractions were separate by gel electrophoresis using SDS (sodium dodecyl sulfate) polyacrilamide and the molecular weights were determined and found to have a maximum of 65,000 and a minimum of 17,000.

After the conditions of minimum and maximum solubility were established, approximately 90% of the soluble nitrogen were extracted by salt solutions of pH 8.0 at ambient temperature. The aqueous solutions of pH 8.0 gave a lower yield for protein extractions.

The proteins were isolated by extraction at pH 8 and precipitation at pH 4.5-4.6. A protein concentrate was obtained with about 50% protein content and the protein isolate had about 80% protein.

The enzymatic digestibility was studied using pepsin and pancreatine from the isolate, the concentrate and the decorticated fraction. Ninety five percent was digestible which represents a adequate material for human consumption.

1. INTRODUÇÃO

As sementes oleaginosas representam o maior potencial atual para aumentar a disponibilidade de proteínas para o consumo humano. Se todas as proteínas das sementes oleaginosas, atualmente cultivadas no mundo, fossem aproveitadas para esse fim, haveria um acréscimo de 20 a 25 milhões de toneladas de proteínas as existentes atualmente. O reconhecimento desse fato tem estimulado um grande interesse por parte dos pesquisadores e dos industriais, os quais preocupam-se em obter as proteínas dessas sementes e desenvolver novos métodos de produzir concentrados e isolados protéicos.

O gergelim (Sesamum indicum, L.) é uma dessas sementes oleaginosas, apresentando a seguinte classificação botânica:

Ramo	Fanerógamo
Sub-ramo	Angiospermas
Classe	Dicotiledôneos
Ordem	Tubiflorales
Família	Pedaliaceas
Gênero	Sesamum
Espécie	Sesamum indicum L.

Esta planta é cultivada na Índia a mais de 2.000 anos, crescendo extensivamente em áreas tropicais e sub-tropicais da Ásia, países do Mediterrâneo, América do Sul e América Central. Nos Estados Unidos o cultivo foi posterior, porém, vem apresentando um grande incremento após terem sido desenvolvidas variedades indeiscentes e adaptáveis à colheita mecanizada (39).

Os componentes valiosos da semente de gergelim são o óleo e a proteína, os quais tem sido avaliados para as diferentes variedades (32), bem como suas qualidades. Em decorrência dos resultados obtidos, uma grande importância tem sido dada a esta cultura em muitos países do mundo, nos últimos anos.

A farinha de gergelim é uma interessante fonte de proteína, principalmente por conter um alto nível de aminoácidos sulfurados (de modo particular a metionina), em comparação com outras sementes oleaginosas (10), embora seja o

conteúdo de lisina relativamente baixo. As tortas obtidas como sub-produto da extração do óleo da semente de gergelim, tem sido suficientemente utilizadas como ingrediente de rações e concentrados para animais, (9, 13, 36), especialmente no arraçoamento de aves, suínos e bovinos. Entretanto não tem sido igualmente utilizadas, em escala significativa, na alimentação humana, devido ao fato de possuir algumas características indesejáveis.

A presença da cutícula na farinha é o principal fator limitante para o seu uso (69), já que esta, produz uma cor escura e um sabor picante na farinha. A presença da cutícula e da epiderme na torta, eleva apreciavelmente o teor de oxalato de cálcio, fibra crua, fitato (37) e em alguns casos, selênio (24) na farinha.

Numerosos métodos para descuticular o gergelim têm sido mencionados na literatura (57), e a aplicação destes métodos permite obter uma farinha com boa aceitabilidade e alto valor nutritivo, podendo inclusive ser empregada na alimentação de crianças (8, 14, 21, 23, 30). Ocorre entretanto, que estas farinhas apresentam elevado custo de produção, limitando conseqüentemente o seu uso, já que na atualidade a maioria dos estudos são conduzidos para a obtenção de proteínas de alta qualidade, a baixo custo.

Na Venezuela, o gergelim ocupa o primeiro lugar na produção de sementes oleaginosas e é o quarto produto agrícola em importância.

A produção nacional de gergelim nesse país nos últimos anos, segundo dados estatísticos do "Ministério de Agricultura y Cria" (4) foi o seguinte:

<u>Ano</u>	<u>Produção</u> (toneladas métricas)
1970	125.639
1971	93.937
1972	59.245
1973	98.438

Esta cultura constitui-se na oleaginosa mais importante como fonte potencial de proteína. A torta que se obtém como sub-produto, após a extração do óleo, é utilizada principalmente como ingrediente na elaboração de alimentos concentrados para animais.

Se uma parte do total produzido fosse convertida em farinha para consumo humano, significaria uma apreciável elevação em nossas fontes de proteína para consumo dos grupos mais vulneráveis da população.

Pesquisas foram realizadas por Jaffé et al. (25) sobre a composição bromatológica da farinha de gergelim, proveniente de diversas variedades cultivadas na Venezuela, a fim de selecionar a de composição mais adequada para a produção de frações comestíveis. Estudos de seu valor biológico e ensaios de suplementação da proteína de farinha de gergelim também foram objeto da atenção destes pesquisadores. A farinha de gergelim tem sido incluída em muitas formulações de alimentos para consumo humano, porém os estudos relativos às suas propriedades físicas e químicas não são muito numerosos. Os primeiros estudos, somente dão resultados qualitativos, e foram feitos por Jones e Gersdorff (28) em 1927; os mais recentes são devidos a Nath e Giri (45-47) em 1957, tendo entre tanto como base, os trabalhos de Jones e Gersdorff (28). Deve-se notar que em nenhum destes estudos os autores preocuparam-se com a extração, preparo, caracterização e isolamento das proteínas de gergelim, aspectos que vêm a constituir o objetivo do presente trabalho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O trabalho mais antigo sobre a proteína da torta prensada da semente de gergelim foi realizado por RETTHAUSEU segundo a citação de JONES e GERSDORFF (28). Ele determinou a composição elementar das proteínas, as quais foram obtidas da torta por extração com solução de cloreto de sódio e também com hidróxido de sódio em solução aquosa.

JONES e GERSDORFF (28) obtiveram duas globulinas por extração da farinha desengordurada com solução aquosa de cloreto de sódio. A α - globulina foi obtida como cristais e a β - globulina como um pó amorfo. Eles encontraram que a farinha continha aproximadamente quatro vezes mais α - globulina que β - globulina. Determinaram os amino-ácidos em cada uma das globulinas e encontraram arginina, histidina, lisina, cistina, triptofano e tirosina.

ALMQUIST e GRAU (2) foram os primeiros em demonstrar a deficiência de lisina na farinha de gergelim, usando-a como alimento em experiências com frangos. Eles observaram que quando a proteína de gergelim era suplementada com lisina ou proteínas relativamente ricas em lisina (soja, farinha de peixe, etc.) o crescimento dos frangos era satisfatório.

GRAU et ALMQUIST (20) demonstraram por métodos químicos e biológicos, que a metionina também estava presente na farinha de gergelim.

SWINGLE (66) deu uma lista de referências e assinalou o alto valor nutritivo da semente de gergelim como fonte de óleo e proteína.

LAL e RAJACOPALAN (35) estudaram a relação suplementar de proteínas de gergelim com farinha de outras sementes oleaginosas e encontraram um valor biológico bastante alto quando suplementaram farinha de soja, gergelim e amendoim em comparação com o valor biológico da farinha de gergelim individualmente. Também confirmaram a deficiência de lisina na farinha de gergelim.

KINMAN e STARK (32) apontaram dados mostrando a composição química do gergelim sendo que esta é afetada pela variedade e o tipo de solo do local onde se cultiva.

GRACI et al. (19) apresentaram dados do teste "bench-scale" mostrando a preparação do material e as condições de extração requeridas para o eficiente

fracionamento da semente de gergelim pelo processo filtração-extração.

LYMAN et al. (38) investigaram os aminoácidos essenciais da semente de gergelim, usando métodos microbiológicos e encontraram arginina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina. Eles concluíram que a torta de gergelim era uma fonte de metionina e triptofano. Sendo o aminoácido limitante a lisina, tendo sido isto comprovado anteriormente por outros autores (ALMQUIST & GRAU (2)), e (LAL & RAJAGOPALAN (35)).

KUPPUSWAMY et al. (34) dão várias indicações para a suplementação com a proteína de gergelim em dietas de vegetais pobres em proteína com base em diferentes cereais.

NATH e GIRI (45-47) foram os primeiros em estudar a semente de gergelim do ponto de vista físico e químico. Encontraram as melhores condições para a extração das proteínas da farinha de gergelim. A extração máxima da proteína foi obtida com farinha desengordurada em solução de cloreto de sódio a 10%, durante 2 horas a 45°C. Também determinaram o fracionamento das proteínas por diferentes procedimentos, fizeram estudo eletroforético de todas as proteínas, e as frações separadas foram identificadas. Usando salting-out com sulfato de amônio obtiveram frações não homogêneas. Também encontraram que o método de diluição e precipitação fracional foi o mais adequado para isolar as frações de proteínas (46). Por diluição com água do extrato de farinha em cloreto de sódio 10% e precipitações sucessivas, foi isolada a fração maior. NATH e GIRI (46) encontraram por eletroforese que essa fração agia como uma proteína homogênea em todos os valores de PH (3,0-12,0), exceto para o pH 4,0 e 4,25 nos quais duas ou três faixas foram observadas. Devido a sua mobilidade eletroforética esta fração foi identificada como a α - globulina de JONES et al. (28).

RAMACHANDRAN (53) determinou o conteúdo de arginina em tortas de gergelim de sementes de diferentes variedades. Usando o método Colorimétrico de Mac Pherson e determinações gravimétricas, encontrou um valor médio de 3,9 g./100g.

CALDWELL (10) fez uma revisão bibliográfica sobre a produção, cultivo, processamento, composição e usos da semente de gergelim. Assinalou que a proteína da semente de gergelim é deficiente no aminoácido lisina (ALMQUIST (2)), LAL & RAJAGOPALAN (35)), LYMAN et al. (38)) e se constitui em uma fonte muito boa de metionina.

JOSEPH et al. (29) encontrou um valor de coeficiente de eficiência proteica de 1,53 para as proteínas da farinha de gergelim comparado com 1,47 para as proteínas de amendoim. Eles encontraram (utilizando ratos) que as proteínas de gergelim suplementam as proteínas de amendoim. Também suplementaram a proteína de gergelim com lisina e encontraram para um nível de 4,2% de lisina um coeficiente de eficiência da proteína (PER) de 2,14. Previamente ALMQUIST e GRAU (2) haviam demonstrado que a farinha de gergelim é particularmente valorizada suplementando a farinha de soja em dietas para frangos.

BRESSANI et al. (8) assinala o uso da torta da farinha de gergelim como ingrediente na elaboração de alimentos ricos em proteína para suplementação de dietas de consumo humano.

SQUIBB et al., (62) fizeram uma mistura de proteínas vegetais conhecido como INCAP mistura 8. Esta continha 35% de farinha de gergelim. A mistura deu um bom crescimento e eficiência de utilização do alimento com ratos e pintos, similar a obtida com proteína de origem animal.

VENTURA e LIMA (68) apresentam as características de sedimentação e de difusão da globulina maior (fração - I) da semente de gergelim, a qual foi obtida por diálise contendo 95% do componente principal. As medidas da difusão e sedimentação indicaram que essa proteína tinha um peso molecular de aproximadamente 450.000 e uma relação fracionada de 1,50.

ALTSCHUL (3) sugeriu que devido a seu alto conteúdo de metionina, a farinha de gergelim podia ser usada para balancear o baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados em farinha de soja. Comprovando que as farinhas de gergelim e soja são mutuamente complementares quando cada uma fornece 50% da proteína da dieta.

Trabalhos prévios feitos por CARTER et al. (11) referem-se aos efeitos do processamento sobre a composição da semente de gergelim e a farinha. Eles usaram o conteúdo de lisina disponível determinada pelo conteúdo de grupos ϵ -aminados livres para avaliar a qualidade da proteína de farinha prensada e de farinha extraída com hexano (variedade mexicana).

Os autores encontraram que os valores de lisina da proteína de gergelim obtida por extração com solvente foi muito maior que os valores obtidos para farinha prensada (expeller). Pela tamizagem separam o endosperma e o espermoderma.

A tamizagem nas farinhas extraídas por solvente, foi efetivo para reduzir o conteúdo de oxalato, ainda que alguns fragmentos de epiderme passaram através da peneira de 60 mesh.

Os processos de descorticação reduzem o conteúdo de oxalato, cálcio, açúcar e sílica. Também são dados os resultados do conteúdo de umidade, óleo, cinza, fibra, fósforo total, fósforo como fitato, silicatos (SiO_2), nitrogênio, lisina e metionina.

SCRIMSHAW et al. (56) usaram misturas de proteínas vegetais com 35% de farinha de gergelim contendo 33 e 18% de óleo, para o tratamento de Kwashiorkor.

BRESSANI et al. (9) dão a conhecer a utilização da farinha da torta de gergelim no desenvolvimento de rações práticas para aves.

JOSEPH et al. (30) estudaram a possibilidade de usar alimentos proteicos vegetais para tratamento e prevenção do síndrome de Kwashiorkor e incluem a proteína da farinha de gergelim para a preparação destes alimentos.

DANIEL et al. (14) substituíram o leite em pó por farinha de sementes oleaginosas e isolados proteicos, e encontraram que uma mistura de soja e gergelim mostrou um incremento significativo no PER (2,59 - 2,62) em comparação com outras fontes de proteínas vegetais também usadas.

JOHNSON e RAYMOND (27) publicaram uma revisão da composição e usos da semente de gergelim.

SABRY et al. (54) avaliaram a qualidade da proteína da farinha de gergelim usando "Score Chemical Simplificado" (SCS), relação da eficiência da proteína (PER), relação líquida da proteína (NPR), eficiência de retenção proteica (PRE) e utilização líquida da proteína (NPU). Coincidindo com outros autores (ALMQUIST, (2), LAL e RAJACOPALAN (35), LYMAN et al. (38), CALDWELL (10) encontrou um elevado valor nutritivo da proteína, sendo limitante em lisina. Para determinar a quantidade e a qualidade da proteína usou a porcentagem de calorias líquidas provenientes da proteína da dieta (N.D.P. cal %) e porcentagem de proteína completa (% CP).

SALEM e BEKHERT (55) usaram a eletroforese em papel para a separação das proteínas da semente de gergelim. A extração foi feita com tampão borax-ftalato (0,1 M pH 8,6). Localizando 4 proteínas as quais designaram como α -globulina,

β -globulina, fração 1 e fração 4. As faixas isoladas e purificadas foram hidrolizadas por ácido e base determinando qualitativamente os aminoácidos. Também estudaram o valor nutricional indicando que a proteína é de um alto padrão.

GUGGENHEIM e SHLOMO (22) prepararam uma mistura de proteínas vegetais com 35% de farinha de gergelim desengordurada. Seu valor biológico (BV) foi 74 e a relação de eficiência protéica (PER) foi 2,9. A dieta tinha 37,8% de proteína. Comparação desta, com a proteína do ovo como padrão de referência da FAO, sugere que os aminoácidos limitantes foram a metionina, seguida do triptofano.

HOWE et al. (23) descreveram o efeito da suplementação com aminoácidos sobre a qualidade de um concentrado protéico a base de proteínas vegetais e que contém farinha de gergelim. Eles encontraram que de todos os aminoácidos, só a lisina incrementa marcadamente a qualidade da proteína da farinha de gergelim. Uma mistura com 60% de farinha de gergelim e 40% de farinha de peixe deu igual valor que a caseína, com respeito à qualidade protéica.

KRISNA MURTI (33) preparou um hidrolizado de proteína, baseado na farinha de gergelim desengordurada e torta de mostarda, que tem sido usado no tratamento da desnutrição protéica. Essencialmente o processo consistiu em isolar a proteína da farinha desengordurada por peptização e precipitação isoelétrica; a proteína isolada foi digerida enzimaticamente por papaína, e o digerido foi concentrado sob pressão reduzida. O produto final é um pó de cor marrom claro, que tem a maioria dos aminoácidos essenciais. Experiências com ratos indicaram que o produto é comparável à caseína comercial e se a este suplementarmos a lisina pode-se ter a elevação do valor biológico.

NATARAJAN and CAMA (44) apresentam estudos sobre as sementes de gergelim que foram processadas sob diferentes condições de aquecimento e tratamento com vapor para a eficiente remoção do óleo e solvente.

SMITH e SCOTT (59) encontraram baixo nível de lisina no plasma de frangos que consumiram uma dieta à base de farinha de gergelim, comprovando o demonstrado anteriormente (ALMQUIST (2), LAL e RAJOCOPALAN (35), LYMAN et al. (38), CALDWELL (10), SABRY et al. (54), que a lisina é o primeiro aminoácido limitante na proteína desta farinha. Comparando as farinhas com e sem suplementação do primeiro aminoácido limitante, encontraram um aumento na utilização de todos os aminoácidos para síntese de proteínas.

LEASE (36) baseado na hipótese de (OBERLEAS et al.(48) que a diferença no aproveitamento entre a proteína animal e a proteína vegetal é devido ao conteúdo de fitato da proteína vegetal, encontrou que autoclavando a farinha de gergelim durante duas horas, aumentava significativamente o peso dos frangos que consumiam dietas à base desta farinha, em comparação com aqueles que consumiram a farinha sem autoclavar. De acordo com os resultados ele indica a possibilidade de um complexo proteína-ácido fítico, o qual é desprendido autoclavando-se a farinha.

O'DELL e SAVAGE (49) determinaram as necessidades de lisina em frangos que consumiram uma dieta a base de farinha de gergelim. Levaram a uma deficiência de lisina, adicionando um excesso de arginina. Quando adicionaram lisina até um nível adequado, mais um excesso de arginina, esta não afetou a velocidade de crescimento dos frangos.

PARPIA e SUBRAMANIAN (51) discutem as vantagens de usar a farinha desengordurada da semente de gergelim como fonte de metionina e triptofano para suplementar outras farinhas e preparar alimentos ricos em proteínas. Enumeram os obstáculos para o uso da farinha em misturas de proteínas. Também mostram as possibilidades de tirar as cutículas das sementes por curto período de tratamento.

SRINIVAS et al. (64) apresentam estudos sobre a composição de aminoácidos e o valor nutritivo das proteínas de uma mistura microatomizada que contém farinha de gergelim entre seus componentes, e que foi usada no tratamento e prevenção do Síndrome de Kwashiorkor em crianças e pré-escolares.

TASKER et al. (67) prepararam misturas de proteínas usando farinhas de sementes oleaginosas (incluindo 20% de gergelim) desengorduradas e microatomizadas e estudaram sua "vida de prateleira" e o valor nutritivo. Tais misturas podem ser usadas para a alimentação de crianças pós lactentes e crianças pré-escolares. A farinha de gergelim foi obtida de sementes descascadas e microatomizadas até passar por uma peneira de 200 mesh.

CUCA et al. (13) estudaram pela primeira vez o efeito dos níveis de cálcio em dietas de farinha de gergelim que continham um alto nível de cálcio em relação à outras fontes de proteínas. Utilizando frangos, também estudaram os efeitos de EDTA e zinco sobre a farinha de gergelim. Saliente-se que McCALL et

al. (42) indicaram a diminuição do valor biológico das proteínas das plantas, por formação de complexos da proteína com o zinco ou com o cálcio.

CUCA et al. (12) estudaram a suplementação da farinha de gergelim em rações para aves, descobrindo que é necessária a suplementação com 0,4-0,5% de lisina ou com farinha de soja para um bom crescimento e a alimentação eficiente.

EVANS et al. (17) determinaram o efeito do enriquecimento sobre o valor nutritivo (em relação à caseína) da farinha de gergelim. Em experiências com ratos alimentados com farinha de gergelim como única fonte de proteína, o valor nutritivo da proteína foi de 47%. O enriquecimento com 0,2% de lisina elevou este valor a 94%, enquanto que o enriquecimento com 0,2% de lisina mais 0,1% de isoleucina, mais 0,1% de metionina elevou o valor nutritivo para 102%. O valor nutritivo da proteína (PNV) de uma mistura 1:1 de proteína de gergelim e soja foi quase o mesmo da caseína. A proteína da soja é rica em lisina mas é deficiente em metionina, pelo que se suplementa com farinha de gergelim.

LEASE e WILLIAMS (36) estudaram a capacidade de ligação das proteínas da farinha de gergelim ao zinco por testes "in vitro" e "in vivo".

NARAYANA et al. (43) determinaram o efeito do tempo de armazenamento sobre a proteína da semente, a farinha gordurosa e a farinha desengordurada de gergelim. Armazenando-se à temperatura ambiente com bastante ventilação, periodicamente analisando o conteúdo de proteína, encontraram que depois de 450 dias de armazenamento, o conteúdo de proteína permaneceu quase constante, apesar das mudanças ocorridas em outros componentes analisados.

AWAIS et al. (6) peneiraram a 60 mesh a farinha obtida de sementes de gergelim depois de desengordurada. O conteúdo de proteína e o valor de utilização líquida da proteína (NPUst) da farinha foi de 42,5% e 44,9% respectivamente. O NPU da farinha foi aumentado por suplementação. Fazendo duas misturas diferentes encontraram: (1) farinha de gergelim (37%), farinha de bengal (37%) e proteína concentrada de peixe (26%) (NPUst 86,3); (2) farinha de gergelim (37%), farinha de grão de bengal (37%) e leite desnatado em pó (26%) (NPUst 78,5). Sendo a farinha de gergelim um excelente suplemento para cereais indígenas.

GUTTIKAR et al. (22) demonstraram as possibilidades de usar alimentos de origem vegetal ricos em proteínas para a preparação de misturas de proteínas processadas que podem ser usadas como suplementos efetivos de dietas pobres em

proteínas. A proteína de gergelim apresentou-se como boa fonte para suplementar outras farinhas, sobretudo cereais deficientes em metionina.

VILLEGAS et al. (69) estimaram a qualidade da proteína de gergelim baseando-se na digestibilidade com pepsina e pancreatina e sobre a determinação da utilização de seus aminoácidos essenciais por microrganismos. Eles prepararam 6 amostras de farinha de gergelim por métodos diferentes, considerando a extração de óleo e o tratamento por aquecimento a fim de obter materiais práticos para consumo humano. Os resultados obtidos em ambos os testes dão informações razoáveis do comportamento da proteína de gergelim para uso como alimento. Encontraram que a disponibilidade da metionina é melhor quando se aplica tratamento com calor úmido à proteína. Todas as amostras deram uma disponibilidade de lisina abaixo de 50% quando se fez hidrólise ácida. Eles concluíram que o conteúdo relativamente baixo de lisina da farinha deve ser tomado em consideração para misturas de proteína. A farinha poderia ser considerada principalmente como uma fonte de metionina.

Estudos feitos por DE ZACHI et al. (16) apresentaram dados sobre a composição química e o conteúdo de aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas de sete variedades de sementes de gergelim e de oito amostras de farinha de torta de gergelim. Os resultados dos estudos revelaram diferenças significativas entre as diversas variedades quanto ao conteúdo de óleo. Também consideraram o método de processamento como um fator importante já que segundo o resultado deste estudo, as farinhas de torta de gergelim produzidas pelo processo de extração com solvente contêm menos gordura que as obtidas pelo método de prensa, sendo maior a sua concentração de proteína e de outros componentes. Ao estudar os minerais eles concluíram que a torta de gergelim constitui uma boa fonte de cálcio e fósforo, porém não determinaram se estes se encontram presentes em uma forma fácil de ser utilizada pelo organismo. Quanto às vitaminas estudadas, a torta de gergelim é uma boa fonte de niacina, mas não de tiamina, nem de riboflavina. No estudo dos aminoácidos essenciais eles encontraram um conteúdo similar entre as variedades. Coincidindo com outros autores, assinalaram que a proteína da torta da semente de gergelim é deficiente no aminoácido lisina. Por este motivo, assinalaram a possibilidade de desenvolver rações de alto valor nutritivo, à base de farinha de torta de gergelim, sempre que este produto se combine com pequenas quantidades de farinha de peixe, de feijão de soja ou de

outro produto de alto conteúdo em lisina.

SREEKANTIAH et al. (63) estudaram a produção do hidrolizado protéico de farinha de gergelim desengordurada com enzimas proteolíticas de fungos, e encontraram que a farinha de gergelim requer uma concentração de enzima de 0,25% para obter uma hidrólise completa em 5 horas a 45°C. O produto obtido pela digestão enzimática é comparável em sua composição química aos alimentos pré-digeridos preparados de soja. A hidrólise enzimática aumenta o conteúdo de proteína solúvel da farinha de gergelim de 7,21% a 64,14%. Liofilizando e hidrolizando, o conteúdo de proteína foi de 60%.

SHIKH et al. (58) prepararam um concentrado protéico contendo 72% de proteína a partir de torta comercial de semente de gergelim, sendo que quando foi suplementado com concentrado protéico de peixe ou de leite em pó desnatado com iguais quantidades de proteínas de quaisquer das fontes, a utilização bruta da proteína e a relação de eficiência da proteína foram aumentadas, aproximando-se ao nível da proteína animal usada.

SHAMANTHAKA et al. (57) obtiveram uma farinha branca livre de sabor picante, com baixo conteúdo de fibra e ácido oxálico a partir de sementes sem casca; o conteúdo de proteína e a qualidade nutricional desta farinha foi superior a da torta de gergelim comercial. Também encontraram que o tratamento pelo calor durante a operação de expeller tinha efeito benéfico sobre a proteína de gergelim.

JAFFÉ e CHÁVEZ (24) apresentaram resultados de ensaios analíticos sobre diferentes frações obtidas mediante moagem, tamizagem e separação por ar de tortas de gergelim. Eles observaram nas frações finas, uma redução do conteúdo de fibra e aumento das proteínas, mas não foi possível reduzir o conteúdo de ácido oxálico. Também encontraram importantes variações na composição bromatológica de diferentes lotes de sementes de gergelim, especialmente no conteúdo de proteínas, fibra, oxalato e lisina, sugerindo a possibilidade de selecionar a matéria de composição mais adequada para a produção de frações comestíveis. Além disso fazendo ensaios biológicos suplementando as proteínas do gergelim e as proteínas de farinha de peixe, eles discutem a possibilidade de produzir um alimento utilizável na nutrição infantil.

SUBRAMANIAN e SASTRY (65) publicaram uma revisão discutindo a importância

do gergelim como semente oleaginosa e fonte de proteína, desenvolvimento de produtos de gergelim descascado, composição química e aminoácidos essenciais das proteínas de gergelim, efeito do processamento sobre a disponibilidade da lisina, valor nutritivo das proteínas da farinha de gergelim, o efeito da suplementação com lisina, valor suplementar das proteínas de gergelim com outras proteínas vegetais. Produção de farinha com sementes descascadas, produção de isolado de proteínas. Custo de produtos e potencialidade para mercados.

KHIDIR e KHATTAB (31) durante três anos fizeram estudo sobre o desenvolvimento da proteína nas sementes de gergelim, demonstrando que tem uma acumulação gradual mas não tem apreciável incremento após as sementes ultrapassarem 27 dias de idade.

LYON (39) fornece valores sobre a composição, propriedades, processamento e uso do gergelim. Ele comparou o conteúdo de aminoácidos essenciais da proteína de gergelim com o padrão de referência de necessidades de aminoácidos essenciais da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO). Sendo, a farinha de gergelim particularmente de alto conteúdo de metionina, 2,5-4,0% e um conteúdo total de aminoácidos sulfurados de 3,8-5,5%, ele, analisando cinco variedades dos E.E.U.U., México e Brasil, encontrou deficiência somente em lisina e um pouco em isoleucina. Também mostrou o efeito de três tratamentos: 1) extraíndo parte do óleo por pré-prensado e o restante por extração com solvente; 2) extraíndo o óleo em um expeller a alta pressão e temperatura, sob condições similares às usadas comercialmente; 3) as amostras foram pré-prensadas e extraídas como no primeiro caso, mas foram umedecidas e aquecidas por uma hora a 121°C. A digestibilidade enzimática foi afetada muito pouco, porém a disponibilidade da metionina foi aumentada pelo tratamento com calor. A disponibilidade de lisina não foi afetada grandemente pelo tratamento com calor.

No JAPÃO (25) publicou-se uma patente na qual as sementes de gergelim são extraídas com água e o extrato é combinado (misturado) com bicarbonato de sódio e concentrado por aquecimento. Depois a temperatura é elevada rapidamente até 80-100°C para produzir a coagulação do produto. O produto é lavado e combina-se com um agente emulsionante, temperos e agentes aromatizantes produzindo uma pasta alimentícia de alto valor nutricional.

PROTEIN ADVISORY GROUP (PAG) (52) fornece detalhes para o processamento

da semente de gergelim para produzir uma farinha comestível, bem como, os reque
rimentos ou propriedades físicas e químicas das sementes usadas como matéria
prima. Nas especificações para a farinha completa, desengordurada, comestível,
são consideradas com referências: composição química, características físicas,
características organolépticas, considerações sanitárias, contaminação por inse
tos e roedores; matérias estranhas tais como areia e pó; considerações nutricio
nais; considerações toxicológicas, incluindo limites máximos para aflatoxina
e conteúdo de selênio. Também descrevem as manipulações, armazenamento e embla
gem do produto.

3. MATERIAIS

Amostras Utilizadas

a) Sementes de gergelim da variedade Venezuela 51, cultivadas em Campinas (Fazenda Santa Elisa, Instituto Agronômico).

b) Torta de sementes de gergelim processadas por uma empresa venezuelana de óleos, correspondente à extração por prensa (expeller). A torta tinha cor marrom escuro e consistia de um pó grosso, com um conteúdo de óleo de 8%. Esta amostra só foi utilizada para determinar sua composição química e o nitrogênio solúvel a diferentes pH.

Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram do tipo analítico das marcas: Merck, Baker, Sigma, Ecibra, Teagen, Carlo Erba.

As soluções foram preparadas pelas formas usuais. Usaram-se os materiais de vidro utilizados usualmente em laboratório, tais como buretas, tubos de ensaio, beakers, etc.

Equipamentos

Potenciômetro H-5 Horiba

Fotocolorímetro Spetronic 20, Bauch & Lomb

Centrífuga Refrigerada Modelo B-20, International Equipment 60

Jogo de peneiras Produtest, (40-100 mesh)

Liofilizador, New Brunswick Scientific, CO. INC. Model. XB60-50

Banho-maria, Soc. Fabbe Ltda. Model L69 com temperatura controlada

Agitador, Rotary Shaker

Moinho, Stein Laboratory, Modelo L2

Analizador de aminoácidos, Beckman, Model 120C

Além dos outros equipamentos de uso comum no Laboratório, como balança analítica, estufa, dessecador, etc.

4. MÉTODOS

4.1. Preparação da Amostra

As sementes limpas foram moídas, em moinho "Stein Laboratory" modelo L2. As sementes moídas e a torta prensada foram extraídas com solvente (hexano).

4.2. Extração do Óleo

As amostras de gergelim extraídas em prensa (expeller) e as amostras moídas no laboratório, foram extraídas com Hexano (hexano normal P.A.) durante 30 minutos com agitação lenta à temperatura ambiente, sendo feita a extração repetidamente até ficar com menos de 1% de óleo.

O excesso de solvente foi eliminado a temperatura ambiente.

4.3. Preparação das Frações de Farinha de Gergelim

As farinhas desengorduradas foram peneiradas em "Granutest" de 50 mesh, sendo separadas em duas frações; uma fração fina representando 55% que foi chamada de fração descorticada, e uma fração grossa equivalente a 45% que foi designada como fração corticada.

A farinha desengordurada sem tamizagem foi designada de integral.

Pesou-se uma quantidade bem homogênea da farinha desengordurada, e depois da tamizagem calculou-se as porcentagens correspondentes de cada fração.

4.4. Análises

Nas amostras de farinha de gergelim, uma vez classificadas, foram feitas as análises de umidade, proteínas, cinzas, óleo e fibra crua.

Todas as análises foram feitas em duplicatas ou triplicatas, cujos valores médios estão apresentados nas tabelas.

4.4.1. Umidade

A umidade foi feita segundo o método AOAC (5). As amostras foram pesadas em cápsulas de porcelanas e levadas à estufa a 110°C até obtenção de peso constante. Transferidas para um dessecador até alcançar a temperatura ambiente, em seguida foram pesadas e, por diferença, calculou-se a porcentagem de umidade.

4.4.2. Nitrogênio Total

O nitrogênio total foi determinado usando-se o aparelho micro-Kjeldahl, segundo AOAC (5).

4.4.3. Proteínas

Utilizou-se o método micro-Kjeldahl, AOAC (5). Nos cálculos usou-se o fator 6,25 para a conversão de nitrogênio total à proteína.

4.4.4. Óleo

Determinou-se segundo método descrito em AOAC (5) utilizando o aparelho de extração contínua de Goldfish. A extração etérea foi de 6 horas com refluxo contínuo através da amostra.

4.4.5. Cinzas

A determinação foi feita segundo AOAC (5). Após pesagem, as amostras foram levadas em cápsulas a uma mufla a 200°C e aquecidas lentamente para haver uma carbonização uniforme. Quando todo o material foi carbonizado, elevou-se a temperatura da mufla para 550°C. As cápsulas com material incinerado foram levadas a um dessecador até chegar à temperatura ambiente, pesadas e, por diferença, calculou-se a porcentagem de cinza na amostra original.

4.4.6. Fibra Crua

Seguiu-se o método do AOAC (5). A amostra foi submetida à digestão ácida

e digestão alcalina durante 30 minutos, lavou-se até a neutralidade e secou-se a 80° em estufa; depois incinerou-se em mufla a 525°C. Por diferença de peso calculou-se o conteúdo de fibra.

4.5. Método de Extração da Proteína

A extração das proteínas a partir da farinha de gergelim foi feita seguindo as condições recomendadas por Mattil (41) a temperatura ambiente, durante 30 minutos, usando uma relação farinha-solvente de 1:20 (P:V), no caso de outras condições, estas serão especificadas. O pH de extração pré-determinado foi obtido pela adição de solução de NaOH 0,5 N ou HCl 0,5 N; o pH foi reajustado depois de 30 minutos de agitação lenta. Completou-se o volume da solução e fez-se um reajuste final de pH. Depois centrifugou-se 8.000 RPM (8200 g) por 15 minutos, eliminando qualquer material floculento por filtração do sobrenadante através de papel de filtro Whatman nº1. Neste extrato determinou-se nitrogênio, utilizando-se o método de micro-Kjeldahl (5).

4.5.1. Extração da Proteína com Sais Minerais a Diferentes Concentrações

A fração descascada foi suspensa em solução de cloreto de sódio a diferentes concentrações (P/V) como solvente numa relação 1:15 (P:V), o pH foi ajustado a 8,0 com NaOH 0,5 M, e agitou-se lentamente a temperatura ambiente durante duas horas. Reajustou-se o pH, completou-se o volume e centrifugou-se durante 15 minutos a 8.000 RPM (8.200 g).

No líquido sobrenadante foi determinado o conteúdo de nitrogênio por semi-micro-Kjeldahl. Outra parte do líquido sobrenadante foi dializada durante 4 horas contra água corrente a temperatura ambiente e durante 48 horas contra água destilada a temperatura de geladeira (8°C). Em seguida as amostras foram liofilizadas, e do pó foi feita electroforese em S D S - poliacrilamina, como se segue em 4.9.2.

A extração foi feita segundo as condições utilizadas por Jones and Gersdorff (28) e Ventura and Lima (68). O solvente utilizado foi tampão (KH_2PO_4 0,029 M, K_2HPO_4 0,021 M, NaCl 10% (P/V)) pH 7,0. A relação farinha-solvente foi de 1:30 (P:V), agitando-se durante 5 horas lentamente a temperatura ambiente;

depois se centrifugou à 8.000 RPM (8.200 g) durante 15 minutos. No líquido sobrenadante determinou-se o nitrogênio segundo semi-micro-Kjeldahl (5). A proteína extraída com tampão foi dializada em sacos de celofane durante 48 horas contra água destilada à temperatura de geladeira.

A amostra dializada bem homogênea foi separada em duas porções; uma foi liofilizada, a outra foi separada por centrifugação durante 15 minutos a 2.000 RPM (2.050 g) e o líquido sobrenadante e o precipitado foram liofilizados separadamente. Fez-se electroforese em todas as amostras liofilizadas, em SDS poliacrilamida, seguindo a técnica indicada em 4.9.2.

4.6. Fatores que Afetam a Solubilidade do Nitrogênio

Para estudar os fatores que afetam a solubilidade do nitrogênio utilizou-se a fração descorticada, não se considerando o efeito do tamanho das partículas.

4.6.1. Efeito do pH

Para estudar o efeito do pH sobre a solubilidade de nitrogênio seguiu-se a técnica indicada para extração da proteína em 4.5.

a) O solvente utilizado foi água e o pH foi reajustado constantemente durante o tempo de agitação a faixa de pH foi de 2 até 12.

b) Os solventes utilizados foram: cloreto de sódio 0,5 M, cloreto de cálcio 1 M; sulfato de sódio 0,25 M e fosfato de sódio dibásico 0,25 M. Ajustou-se o pH a 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0. Calculou-se o nitrogênio solúvel baseado no conteúdo total de nitrogênio da amostra utilizada e no volume total de solvente.

4.6.2. Efeito do Tempo de Extração

Para o estudo do tempo de extração sobre a solubilidade do nitrogênio seguiu-se o método indicado para extração da proteína (41). Geralmente o tempo é "estimado" depois de mais ou menos 15 minutos que se necessita para alcançar o pH desejado. Considerou-se o tempo de extração com agitação depois que o pH 8,0 foi alcançado, não incluindo os 15 minutos da centrifugação. Os tempos de extração foram 10, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos. Calculou-se o nitrogênio solúvel ba

seado no nitrogênio total da amostra e o volume total de solvente.

4.6.3. Efeito da Relação Farinha-Solvente

Foi feito seguindo o mesmo método de extração de proteína descrito em 4.4; o pH foi ajustado a 8,0. Fizeram-se múltiplas extrações usando as relações: (P:V) 1:5; 1:10; 1:15 e 1:25.

4.6.4. Efeito da Temperatura

Seguindo-se o mesmo método da extração das proteínas descrito em 4.4, de pois de ajustar o pH 8,0 durante 30 minutos de extração as amostras foram colocadas nos diferentes ambientes com a temperatura correspondente a 10°C (geladeira), 30; 37; 50; 55; 60 e 70°C em banho-maria com controle de temperatura.

4.6.5. Efeito de diferentes sais a diferentes concentrações

Para estudar o efeito de vários sais a diferentes concentrações sobre a solubilidade do nitrogênio usou-se NaCl, CaCl₂, Na₂HPO₄ e Na₂SO₃ em solução aquosa, as concentrações usadas foram entre 0,2 - 1 M. As amostras foram extraídas seguindo o método indicado em 4.4 com solução salina como solvente, usando a relação farinha: solvente 1:20 (P:V) e ajustando a pH 8,0 com NaOH 0,5 N. O nitrogênio solúvel foi calculado baseando-se no total de nitrogênio da amostra e o volume total do solvente.

4.6.6. Efeito da Natureza de Vários Ácidos

Para determinar o efeito de alguns ácidos sobre a solubilidade do nitrogênio (proteína), o pH foi ajustado para 2,0 utilizando ácido sulfúrico, ácido clorídrico e ácido fosfórico, todos na concentração 1,0 N. As condições de extração foram as mesmas indicadas para extração de proteínas descritas em 4.4.

4.7. Preparação de um Concentrado Protéico de Farinha de Gergelim

Pesou-se uma quantidade de amostra descascada e utilizando-a relação fari

nha: solvente 1:15 (p:v), foi feita a extração aquosa. O pH foi ajustado a 4,5 - 4,6 (mínima solubilidade) com HCL 1,0 N e 0,5 N. A mistura foi agitada durante 30 minutos reajustando o pH cada 5 minutos. Centrifugou-se durante 20 minutos a 3.000 RPM (3.075 g). O líquido sobrenadante foi descartado e o precipitado que correspondia ao concentrado de proteína, foi seco em estufa a menos de 50°C.

4.8. Preparação de Proteína Isolada de Farinha de Gergelim

A proteína da fração descascada foi extraída a pH 8,0 em solução aquosa em uma relação farinha: solvente 1: 15 (p:v), durante 30 minutos com agitação constante. Em seguida, centrifugou-se durante 20 minutos a 8.000 RPM (8.200 g) e o precipitado foi descartado. O líquido sobrenadante foi ajustado ao pH de mínima solubilidade (pH 4,5) com HCL 1,0 N, precipitando as proteínas e deixou-se 30 minutos em repouso. A proteína precipitada foi separada por centrifugação durante 15 minutos a 2.000 RPM (2.050 g). A proteína isolada foi secada a 50°C em estufa.

4.9. Preparação das Amostras para Eletroforese

Previamente à eletroforese, fez-se a extração da proteína em solução aquosa a pH 8,0 e em cloreto de sódio 1M, cloreto de cálcio 1M; Na_2HPO_4 0,3M e Na_2SO_3 0,4M. Utilizou-se a relação farinha: solvente (P:V) 1:15.

A solução obtida depois da centrifugação (15 min a 8.000rpm), foi dializada em sacos de celofane contra água corrente durante 6 horas a temperatura ambiente e contra água destilada a temperatura da geladeira durante 48 horas. A amostra dializada, foi seca por liofilização.

4.9.1. Eletroforese das proteínas em acetato de celulose

A amostra liofilizada foi dissolvida em tampão tris-glicina pH 9.5 (30 mg em 3,0 ml de tampão). Para uma concentração de 10 mg/ml.

A eletroforese foi feita em acetato de celulose aplicando 10 μl de amostra (Aplicador Beckmam Pat. U.S. Nº 2868020) em Millipore, em tampão tris-glicina pH 9,5 e as bandas (tiras) de acetato de celulose foram submetidas a um

potencial de 160 volts e 10 mA por uma hora. Fez-se a revelação com PONCEAU'S (5 mim) e lavagem com solução de ácido acético, 5% (40). Junto com as amostras foi feito um padrão de sangue humano e uma de soja.

4.9.2. Eletroforese em gel com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) poliacrilamida

Utilizou-se o método de Weber e Osborn (70) de determinação de peso molecular por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio (SDS) poliacrilamida.

As amostras (liofilizadas) e as proteínas padrões (purificadas) de peso molecular conhecido: lisozima, tripsina, albumina de soro bovino e albumina de ovo, em uma concentração de 1 mg/ml foram incubadas a 37°C durante 16 horas em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0, 1% em SDS (dodecil sulfato de sódio), e 1% em β - mercapto-etanol.

A solução dos géis foi preparada com acrilamida (13,5 ml) tampão "gel" (15 ml) (7,8g NaH_2PO_4 e 2g SDS em 1l H_2O), persulfato de amônio 1,5 ml e N,N,N',N' - tetra metiletilenodiamina 0,01 ml, esta foi colocada nos tubos de vidro e deixou-se polimerizar durante 1 hora.

Em tubos de ensaio foram colocados 10 microlitros de azul de bromo fenol, 0,1 ml de sacarose 40 % e 0,1 ml da solução de proteína preparada previamente. Desta solução colocaram-se 50 μl sobre o gel de SDS-poliacrilamida.

A eletroforese em gel foi feita no aparelho construído no laboratório baseado nos trabalhos de Davis (15) e Orstein (50). As amostras colocadas nos tubos com gel foram colocadas na célula de eletroforese; foi usado tampão "gel" diluído 1:1 com água destilada, e aplicou-se 8 mA por gel durante 4 horas. Após medir o comprimento do gel e a migração do corante (azul de bromofenol), os géis são removidos dos tubos de eletroforese e colocados em tubos de ensaio com TCA 50% para fixar as proteínas durante 15 horas aproximadamente.

A coloração é feita com azul de coomassie em TCA 20% durante 2 horas. A descoloração se fez por lavagem contínua com ácido acético 7% durante 3 dias. Após a descoloração completa, mediu-se o comprimento de gel e a migração das proteínas e se calculou a mobilidade. Pela seguinte fórmula:

$$\text{mobilidade} = \frac{\text{migração do corante}}{\text{migração da proteína}}$$

As mobilidades são graficadas contra os pesos moleculares conhecidos (das proteínas padrões: lisozima, tripsina, albumina de ovo e albumina de soro bovino) em escala semilogarítmica. Com as mobilidades das amostras calcularam-se os pesos moleculares por regressão na curva padrão, feita nas mesmas condições que as amostras.

4.10. Determinação de Aminoácidos

Para determinar o conteúdo de aminoácidos usou-se o método de hidrólise das proteínas descrito por Figueiredo (18) e a análise dos aminoácidos foi feita pelo método de intercâmbio iônico de Spackman et al. (60) com o Analizador Beckman Modelo 120C.

A hidrólise foi feita numa ampola especial de vidro, na qual foi pesada a amostra (0,03-0,04g) adicionando-se, a seguir, ácido clorídrico 6 N (2 ml).

A ampola foi fechada em chama (bico de Bunsen) sob vácuo. Colocou-se a ampola em estufa a 110°C durante 22 horas. Retirou-se da estufa e deixou-se esfriar. Removeu-se o topo da ampola, e o hidrolisado foi transferido para uma placa de Petri e a ampola foi lavada com álcool 70%. Evaporou-se o solvente e a água, a vácuo e a temperatura ambiente, num dessecador contendo hidróxido de sódio. Depois de seco, o hidrolisado foi lavado com tampão citrato de sódio pH 2,2, e filtrou-se através de papel de filtro, Wathman nº 1.

A amostra foi colocada no analizador, para a análise se injetou 200 µl com seringa especial (unimetrics).

Com exceção do triptofânio, que é destruído pela hidrólise ácida, os demais aminoácidos foram determinados, quantitativamente e qualitativamente.

Os aminoácidos ácidos e neutros foram separados em uma coluna de 56 cm de comprimento por 0,9 cm de diâmetro usando-se tampão pH 3,28 e em seguida tampão de pH 4,25, com resinas P.A.15 de Beckman, para aminoácidos de reação ácida ou neutra. Os aminoácidos básicos foram separados em uma coluna de 7 cm de comprimento por 0,9 cm de diâmetro usando tampão pH 5,28, com resina P.A; 35 de Beckman, para aminoácido de reação básica.

4.11. Determinação da Digestibilidade Enzimática

A digestibilidade foi determinada pelo método desenvolvido por Akeson e Stahamann (1) e modificado por Villegas et al. (69); as hidrólises enzimáticas se fizeram com pepsina seguida de pancreatina até completar a hidrólise. A hidrólise enzimática da pepsina foi feita sob as seguintes condições: relação enzima-substrato 1: 40 durante 4 horas, e esta foi seguida por 20 horas de tratamento com pancreatina a pH 8,0 em uma relação enzima-substrato de 1:120.

A digestibilidade da proteína do gergelim foi determinada da seguinte maneira: pesou-se a amostra em uma quantidade equivalente a 0,5 g de proteína que foi dispersada em 15 ml de uma solução de ácido clorídrico 0,1 N; foram agregadas 0,015 g de pepsina, e depois de 4 horas de agitação constante a 37°C o pH da suspensão foi levado a 8,0 com uma solução de NaOH 0,5 N e se agregou 0,008g de pancreatina suspendida em tampão fosfato pH 8,0. Agregou-se 0,1 ml de solução alcóolica de mertiolate (50 ppm).

A suspensão foi incubada a 37°C durante 22 horas com agitação constante (Shaker). A enzima foi inativada por aquecimento a 100°C durante 2 Min. As proteínas não digeridas foram precipitadas com TCA-30%.

A mistura da digestão foi centrifugada por 15 min a 2000 RPM (2.050 g). Da solução sobrenadante usou-se 5 ml para determinar o conteúdo de nitrogênio pelo método de Kjeldahl. Com o conteúdo de nitrogênio da amostra e o nitrogênio digerido, calculou-se a digestibilidade pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de digestibilidade} = \frac{(\% \text{ N digerido})}{(\% \text{ N amostra})} \times 100$$

5. RESULTADOS

5.1. Análises Químicas

Nos quadros 1 e 2 se apresentam as análises efetuadas na farinha de gergelim da variedade Venezuela 51, integral, e das frações corticada e descorticada; também da farinha integral obtida comercialmente.

As análises efetuadas seguindo os métodos descritos em 4.4.1 a 4.4.6 foram as seguintes: % de proteína (N x 6,25), cinzas, fibra, gordura e umidade.

No concentrado, fizeram-se todas as análises anteriores exceto gordura.

No isolado, fizeram-se as análises indicadas exceto fibra e gordura.

5.2. Obtenção de Várias Frações de Farinha de Gergelim

No quadro 3 apresentam-se os resultados correspondentes ao rendimento da farinha depois de ser peneirada a 60 e 50 mesh, como está descrito em 4.3. As frações da farinha extraídas com solvente que são retidas pela peneira de 50 mesh, consistem principalmente de espermoderma, enquanto que a fração que é retida pela peneira de 60 mesh é uma mistura de farinha de cotilédones, e fragmentos finamente divididos de espermoderma e endosperma. O material que passa através dos dois tipos de peneiras é considerado principalmente como farinha de cotilédones.

5.3. Fatores que Afetam a Solubilidade das Proteínas

5.3.1. Efeito de pH

A solubilidade dos produtos nitrogênados da farinha de gergelim a diferentes pH em solução aquosa e em sais, é dada nas figuras 1, 2 e 3. A partir do estudo das curvas de solubilidade - pH, foi possível determinar as condições de pH para a extração das proteínas da farinha empregando o método descrito em 4.6,1. e para precipita-las a partir dos extratos.

5.3.2. Efeito de Diferentes Soluções Salinas a Diferentes Concentrações

Na figura 4 e 5 são apresentados os resultados do efeito de diferentes soluções salinas a diferentes concentrações iônicas sobre a extração do nitrogênio, e o efeito de diferentes soluções aquosas de cloreto de sódio (em porcentagem (P/V)) pelo método descrito em 4.6.5. Os sais utilizados foram NaCl, CaCl₂, Na₂SO₃ e Na₂HPO₄.

5.3.3. Outros Fatores

Nos quadros 4, 5 e 6 são dados os resultados correspondentes a alguns dos fatores que afetam a solubilidade das proteínas. Foram considerados: efeito do tempo, temperatura e relação farinha:solvente (conforme foi descrita em 4.6.2, 4.6.3 e 4.6.4), sobre a extração da proteína. De acordo com os resultados obtidos foram selecionadas as melhores condições para a extração da proteína.

Todos os resultados foram calculados considerando-se o nitrogênio total como nitrogênio proteico, e de acordo com o volume total de solvente, depois de ajustar o pH correspondente. Calcula-se o nitrogênio solúvel tomando-se em conta o valor de nitrogênio num volume conhecido do líquido sobrenadante depois da centrifugação.

5.4. Conteúdo de Aminoácidos

Os resultados obtidos usando o método descrito em 4.10 para o conteúdo de aminoácidos da farinha de gergelim integral, das frações corticada e descortificada, concentrado e isolado proteico são apresentadas no quadro 7 e 8, e expressos em miligramas de aminoácidos por 100 gramas de amostra.

No quadro 9 são apresentados os aminoácidos essenciais da proteína de gergelim, comparando-se com a proteína padrão da FAO, os aminoácidos são expressos em gramas por 16 gramas de nitrogênio.

5.5. Digestibilidade Enzimática

O método empregado na determinação da digestibilidade enzimática foi descrito em 4.11.

Os resultados da digestibilidade da proteína de gergelim são expressos no quadro 9, como a quantidade de nitrogênio solúvel referido ao nitrogênio total presente na amostra.

5.6. Eletroforese das Proteínas em Acetato de Celulose

Os resultados da figura 6 correspondem à eletroforese das amostras em acetato de celulose feita pelo método descrito em 4.9.1. Observam-se as diferentes bandas obtidas quando a proteína do gergelim é extraída com água e sais, e se comparam com as bandas bem características de um padrão de sangue humano e um de farinha de soja.

5.7. Eletroforese em Gel de SDS-poliacrilamida

Na figura 7 e na foto 1, são apresentados os resultados da eletroforese em Gel SDS-poliacrilamida para a obtenção das mobilidades eletroforéticas das proteínas padrão: lisosima, tripsina, albumina de ovo e albumina de soro bovino. A curva padrão foi feita nas mesmas condições que as amostras, segundo o método indicado em 4.9.2, calculando-se as mobilidades eletroforéticas; o peso molecular dos padrões foi tomado da literatura (70), e o das amostras calculou-se por interpolação na curva padrão.

Nas fotos 2, 3, 4 e 5 apresentam-se os resultados da eletroforese em Gel SDS-poliacrilamida. Sendo que a foto 2 corresponde a proteína extraída da farinha de gergelim com tampão (KH_2PO_4 0,029M, K_2HPO_4 0,021M, NaCl 10% (P/V)) pH 7.

A foto 3 corresponde à proteína extraída com diferentes sais e na concentração onde a extração foi maior.

Na foto 4 observam-se os resultados para a extração da proteína a pH 8 com água e solução de NaCl em uma concentração de 1M.

Na foto 5 a extração foi feita com NaCl nas concentrações 8, 10, 12 e 14% (P/V), e com um tempo maior de extração que o utilizado na extração com NaCl correspondente à foto 3. Em todas as eletroforeses realizadas, foram calculadas as mobilidades eletroforéticas das diferentes bandas de proteína e os respectivos pesos moleculares. Os resultados são dados no quadro 11.

QUADRO 1

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FARINHA DE GERGELIM EXTRAÍDA COM SOLVENTE^(a)

(expressa em porcentagem)

Amostras	Umidade	Componentes ^b			
		Proteína (Nx6,25)	Fibra Crúa	Cinzas	Óleo
Fração Corticada	6,3	34,5	8,3	5,8	0,58
Fração Descorticada	6,2	39,7	3,4	12,4	0,62
Farinha Integral	5,7	38,3	5,5	9,9	0,71
Farinha Integral (comercial)	7,2	43,2	6,6	11,3	0,89

a - hexano

b - em base livre de umidade

QUADRO 2

COMPOSIÇÃO DO ISOLADO E O CONCENTRADO PROTÉICO OBTIDO DA FARINHA DE GERGELIM DESENGORDURADA^a

(expressa em porcentagem)

Amostra	Umidade	Componentes ^b		
		Proteína ^c	Fibra Crúa	Cinza
Isolado	7,0	79,1	-	6,1
Concentrado	6,1	46,3	3,2	10,1

a - com solvente (hexano)

b - em base livre de umidade

c - (N x 6,25)

QUADRO 3

CLASSIFICAÇÃO DA FARINHA^a DE GERGELIM POR PENEIRAGEM

Amostra	% Farinha 50 mesh	% Farinha 60 mesh
Fração descorticada ^b	56,9	50,1
Fração corticada ^c	41,1	49,8

a - desengordurada com hexano

b - constituída por espermoderma, epidermis externa, cutícula e algo de endosperma

c - constituída por cotilédones, endosperma e algo de espermoderma

QUADRO 4

EFEITO DO TEMPO NA EXTRAÇÃO^a DO NITROGÊNIO

Tempo (min.)	Nitrogênio extraído ^b (%)
15	50,7
30	49,4
45	48,7
60	46,3
90	43,1

a - Extração a pH 8

b - Baseado no conteúdo total de nitrogênio na amostra de farinha.

QUADRO 5

EFEITO DA TEMPERATURA NA EXTRAÇÃO^a DO NITROGÊNIO

Temperatura (°C)	Nitrogênio extraído ^b (%)
10	26,7
30	37,8
37	43,7
50	51,7
55	53,6
60	63,7
70	54,2

a - pH 8

b - A porcentagem de nitrogênio extraído é baseada no nitrogênio total presente na amostra de farinha.

QUADRO 6

EFEITO DA RELAÇÃO FARINHA: SOLVENTE NA
EXTRAÇÃO^a DO NITROGÊNIO

Farinha: Solvente (g:ml)	Nitrogênio extraído ^b (%)
1: 5	31,97
1:10	37,22
1:15	59,72
1:20	43,85
1:25	53,92

a - Extração a pH 8

b - A porcentagem de nitrogênio extraído (ou solúvel) é baseada no nitrogênio total presente na amostra de farinha.

QUADRO 7

COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS NA PROTEÍNA DA FARINHA DE GERGELIM

(Expressos em mg/100 g amostra original)

Aminoácidos	Descortiado	Cortiado	Isolado	Integral	Concentrado
Lisina	1.048	869	1.829	1.010	967
Histidina	791	684	1.446	955	796
Amônia	3.426	2.422	5.515	2.848	2.160
Arginina	3.540	2.870	6.484	3.521	3.890
Ácido aspártico	2.850	2.582	5.586	2.550	3.287
Treonina	1.065	974	2.710	1.034	1.312
Serina	1.326	1.259	2.636	1.276	1.765
Ácido glutâmico	7.155	6.200	13.387	6.561	9.118
Prolina	1.582	1.401	3.043	1.388	1.773
Glicina	1.884	1.876	3.785	1.722	2.230
Alanina	1.622	1.582	3.209	1.564	1.956
Meia cistina	-	1.259	3.347	1.383	2.160
Valina	3.597	1.541	3.332	1.376	2.079
Metionina	1.201	739	2.572	702	1.240
Isoleucina	1.179	781	1.884	829	1.208
Leucina	2.184	1.631	3.862	1.739	2.310
Tirosina	742	994	2.494	1.134	1.354
Fenilalanina	1.557	1.212	2.853	1.308	1.669

QUADRO 8

AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS ENCONTRADOS NA PROTEÍNA DA
FARINHA DE GERGELIM

(expressos em gramas de aminoácido/16 gramas N.)

Aminoácidos	Fração corti- cada	Fração descor- ticada	Farinha Integral	Isolado	Concen- trado	Valores médios da Lite- ratura	Proteína de Referência da FAO ^a
Lisina	2,6	2,8	2,5	2,8	2,2	2,7	4,2
Metionina	2,2	3,2	2,2	3,5	2,9	2,3	2,2
Treonina	2,9	2,9	2,9	3,7	3,1	3,6	2,6
Isoleucina	2,3	3,2	2,3	2,6	2,8	4,2	4,2
Leucina	4,9	5,9	4,8	5,3	5,3	6,5	4,8
Valina	4,6	4,9	3,8	4,5	4,8	4,8	4,2
Fenilalanina	3,6	4,2	3,6	3,9	3,8	4,6	2,8

a - de FAO - Protein Requirements, 1957 (Roma).

QUADRO 9

DIGESTIBILIDADE DA PROTEÍNA DE GERGELIM

Amostra	% Digestibilidade
	($\frac{\text{N Solúvel}}{\text{N Total}} \times 100$)
Fração corticada	62,21
Fração descorticada	80,8
Isolado	96,4
Concentrado	87,7
Farinha integral	75,5

QUADRO 10

DETERMINAÇÃO DE PESOS MOLECULARES POR ELETROFORESE EM GEL DE SOS-
POLIACRILAMIDA DAS PROTEÍNAS DE GERGELIM EXTRAÍDAS COM ÁGUA
E SOLUÇÕES DE DIFERENTES SAIS

Solução de extração ^a	Nº de repetições	Pelo molecular das frações obtidas							
		1	2	3	4	5	6	7	8
NaCl 1M	5	-	50.000	31.500	27.800	25.000	21.000	20.000	18.250
CaCl ₂ 1M	4	65.000	50.000	32.000	28.800	26.500	21.000	20.400	18.000
Na ₂ SO ₃ 0,4 M	4	60.000	50.560	30.500	28.000	25.000	21.600	19.800	17.500
Na ₂ HPO ₄ 0,3 M	4	63.000	51.000	31.160	28.500	25.500	21.850	20.550	17.900
Água	5	-	-	31.000	28.000	25.000	21.000	20.000	17.500
Água pH 10	3	-	50.000	30.000	28.000	26.600	22.000	19.500	16.800
NaCl 1M pH 10	2	-	52.000	32.000	28.800	24.500	21.000	20.200	-
NaCl 8%	2	-	-	30.500	28.000	26.800	23.000	20.000	-
NaCl 10%	3	62.000	49.800	30.000	27.900	26.500	23.100	20.500	17.800
NaCl 12%	2	61.000	50.000	31.000	28.200	26.800	23.100	20.800	17.500
NaCl 14%	2	62.500	51.000	31.000	27.500	26.600	22.500	20.000	18.000
* Tampão ^b pH 7	2	-	50.000	30.000	29.000	26.500	22.100	20.000	18.500
Tampão ^c pH 7	2	-	51.000	30.000	28.000	25.800	23.000	20.300	17.000
Tampão ^d pH 7	2	-	-	32.000	28.000	26.000	22.200	-	-

* Tampão (KH₂PO₄ 0,029M; K₂HPO₄ 0,021M; NaCl 10%).

a - o pH de extração da proteína foi 8,0 nos casos não assinalados.

b - amostra dializada e liofilizada.

c - eletroforese da proteína precipitada e liofilizada.

d - eletroforese da proteína sobrenadante liofilizada obtida em c.

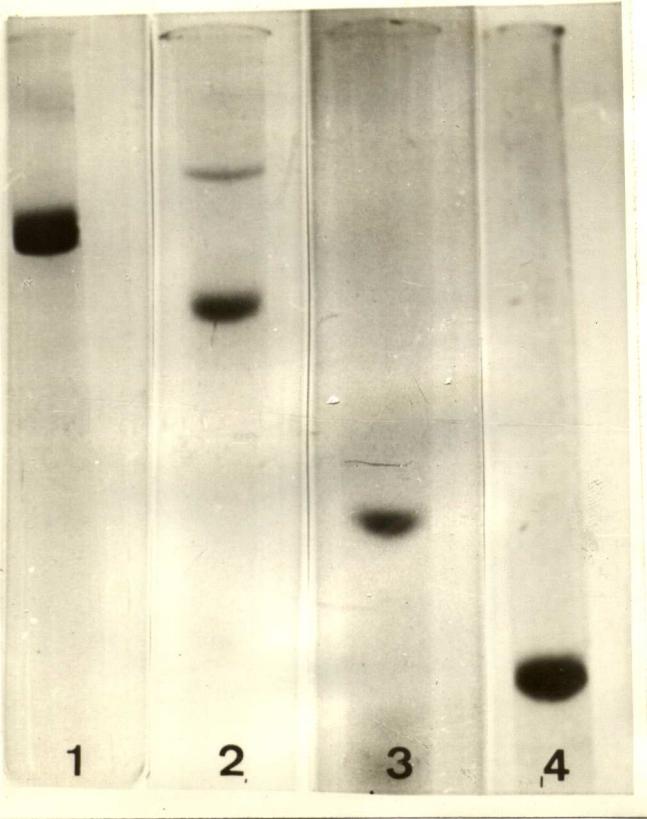


Foto 1: Separação por eletroforese em SDS-poliacrilamida das proteínas padrões para determinação dos pesos moleculares:

1. albumina de soro bovino (69.000)
2. albumina de ovo (43.000)
3. tripsina (23.300)
4. lisozima (14.000)

Foto 2: Eletroforese em SDS-poliacrilamida das proteínas da farinha de gergelim, extraídas com tampão (KH_2PO_4 0,029 M; K_2HPO_4 0,021 M; NaCl 10% (p/v)) pH 7.

1. Proteínas de sobrenadante liofilizada (obtida em 2)
2. Proteínas precipitadas e liofilizadas
3. Amostra dializada e liofilizada

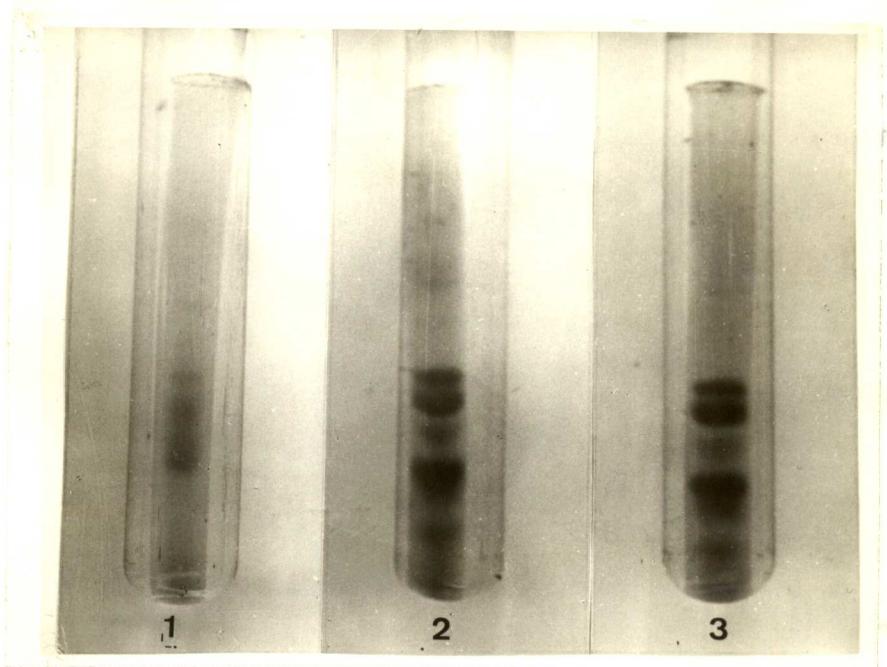


Foto 3: Eletroforese em SDS-poliacrilamida das proteínas de farinha de gergelim:

1. Extraídas com solução de Na_2HPO_4 -0,3M
2. " " " " Na_2SO_3 -0,4M
3. " " " " CaCl - 1 M
4. " " " " NaCl - 1 M

todas as soluções de extração foram acertadas a pH 8,0.

Foto 4: Eletroforese em SDS-poliacrilamida das proteínas de farinha de gergelim:

1. Extração com água a pH 8,0
2. Extração com água a pH 10,0
3. Extração com solução de Na-1M a pH 8,0





Foto 5: Eletroforese em SDS-poliacrilamida das proteínas de farinha de gergelim, extraídas com solução de NaCl a diferentes concentrações (p/v):

1. 8%
2. 10%
3. 12%
4. 14%

FIGURA Nº 1
SOLUBILIDADE DAS PROTEINAS DE GERGELIM
EM DIFERENTES pH

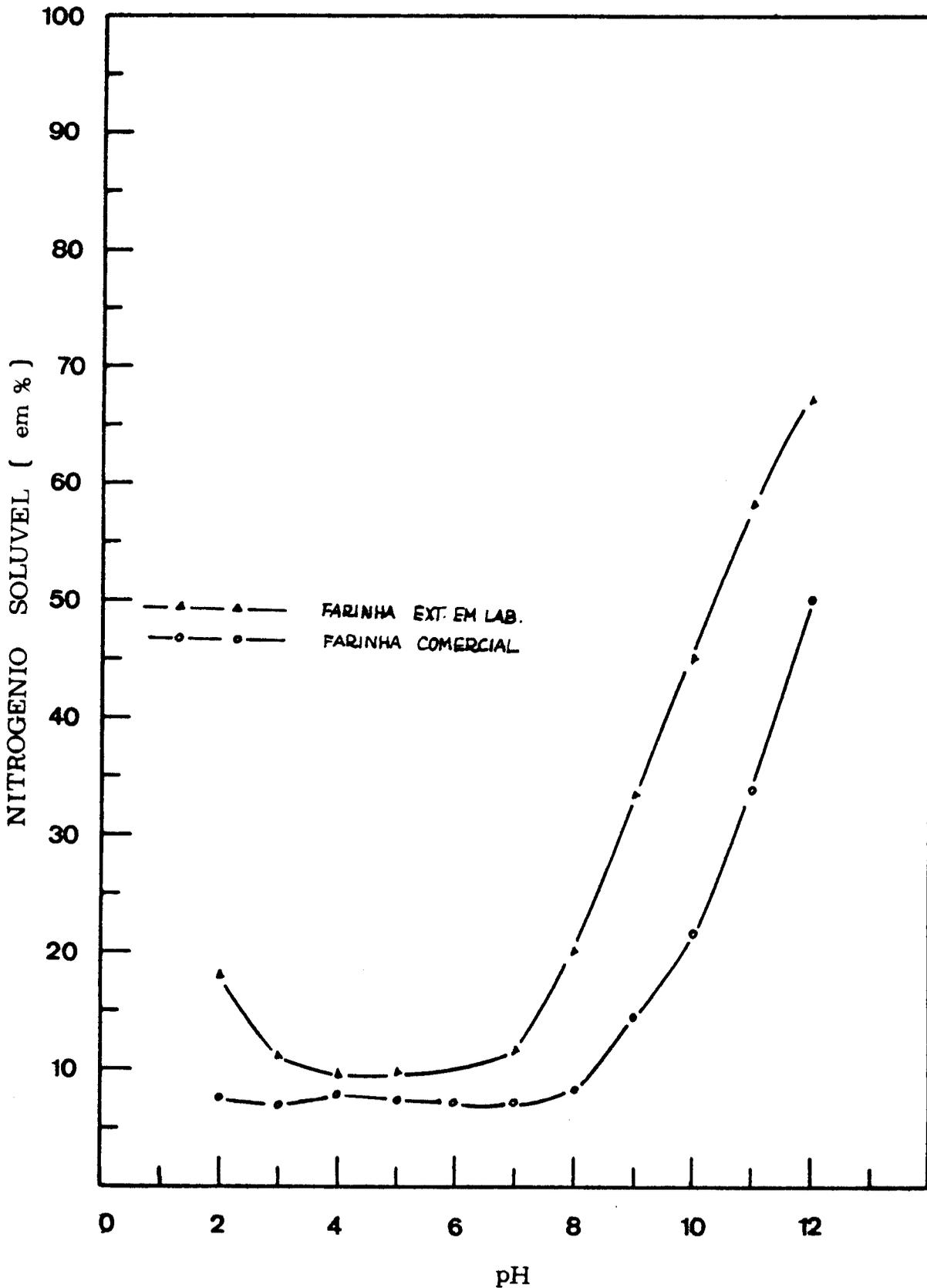


FIGURA Nº 2
SOLUBILIDADE DAS PROTEINAS DE GERGELIM
EM DIFERENTES pH

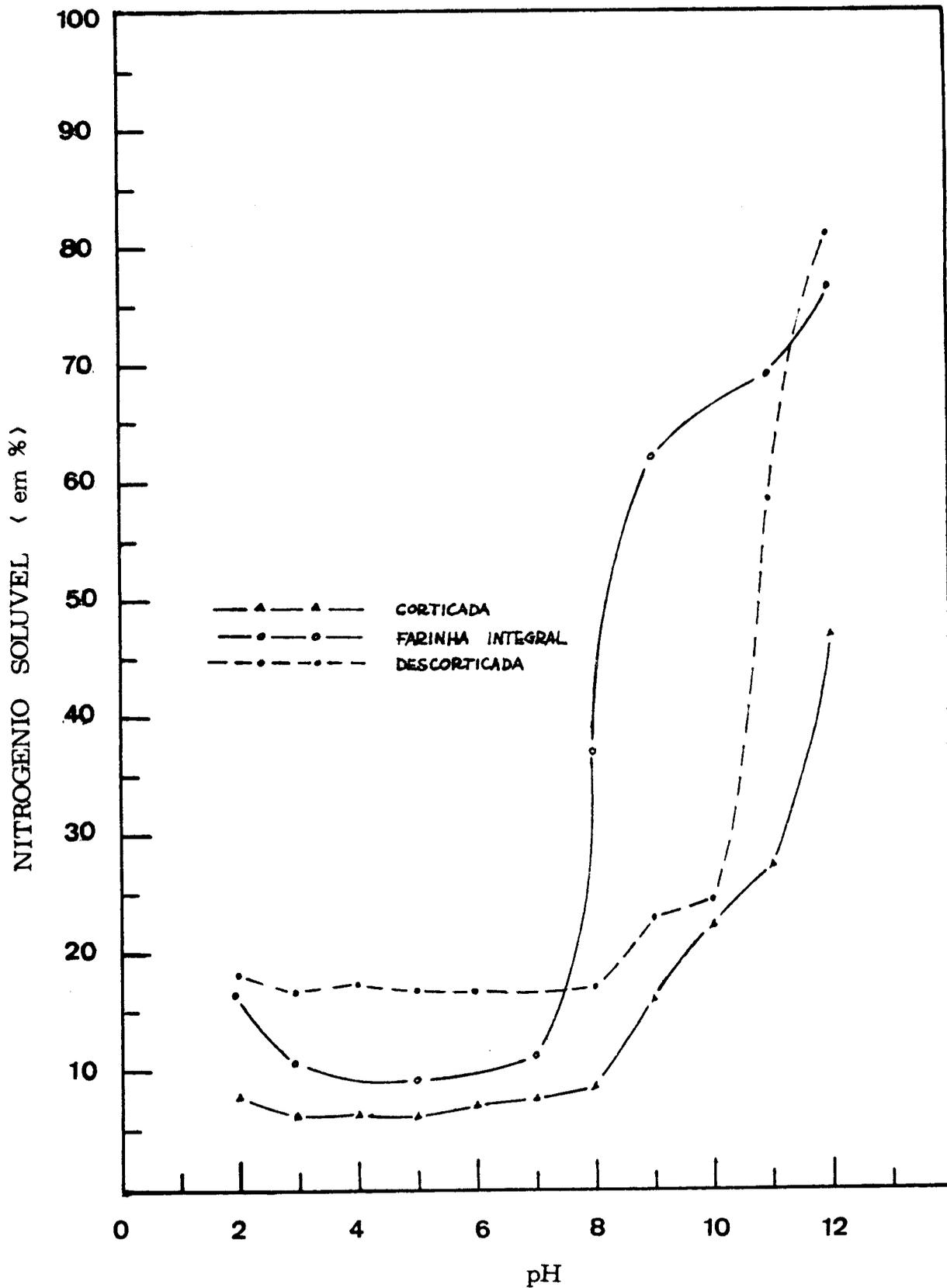


FIGURA Nº 3
SOLUBILIDADE DAS PROTEINAS DE GERGELIM
EM SOLUÇÕES DE DIFERENTES SAIS

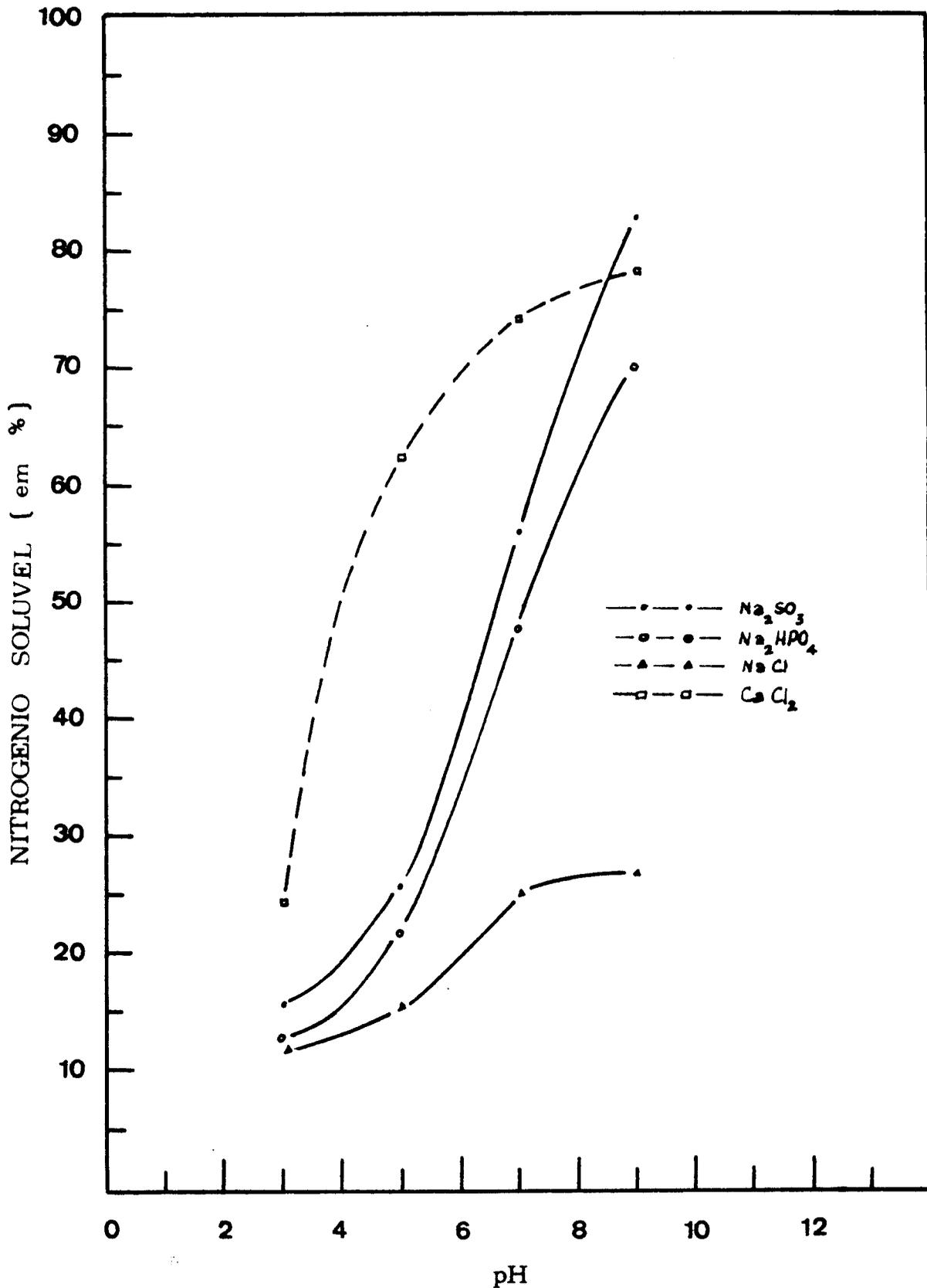


FIGURA Nº 4

SOLUBILIDADE DAS PROTEINAS DE GERGELIM EM DIFERENTES
SOLUÇÕES SALINAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (pH 8.0)

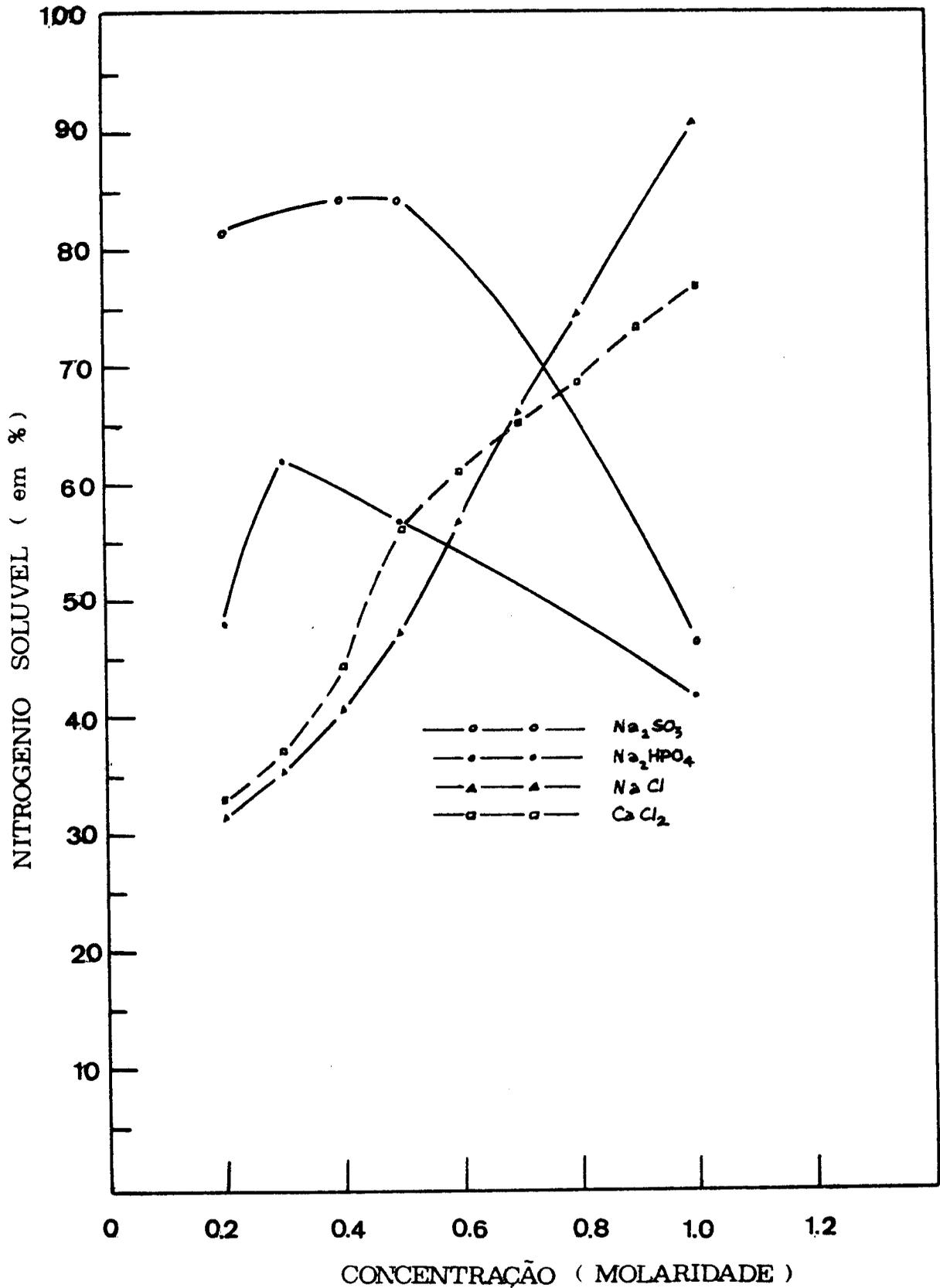


FIGURA Nº 5

SOLUBILIDADE DAS PROTEINAS DE GERGELIM

EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl (p/v)

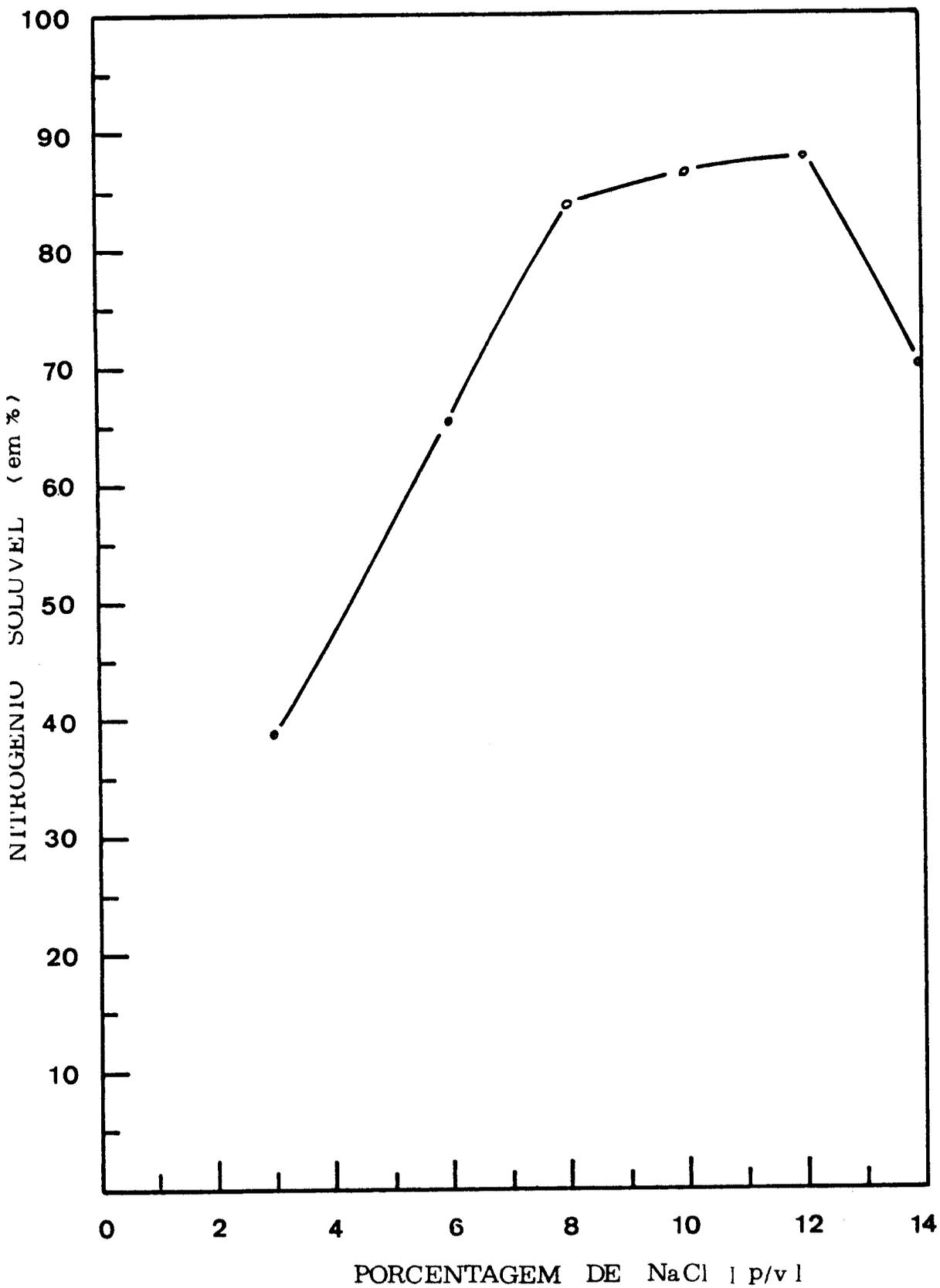


FIGURA Nº 6

ELETROFORESE DA PROTEÍNA DE GERGELIM EXTRAÍDA COM
SOLUÇÕES SALINAS E SOLUÇÕES AQUOSAS (pH 8.0)

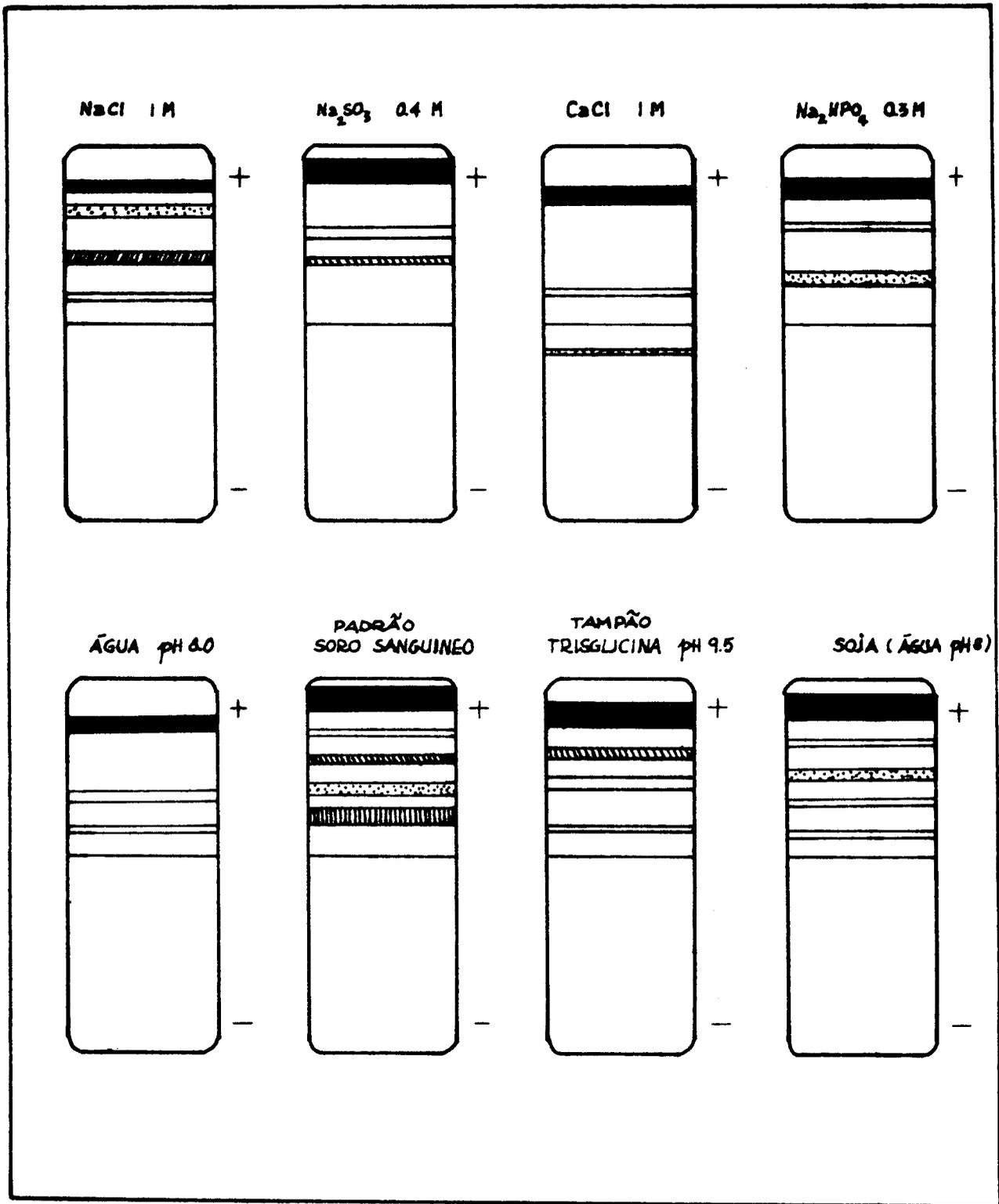
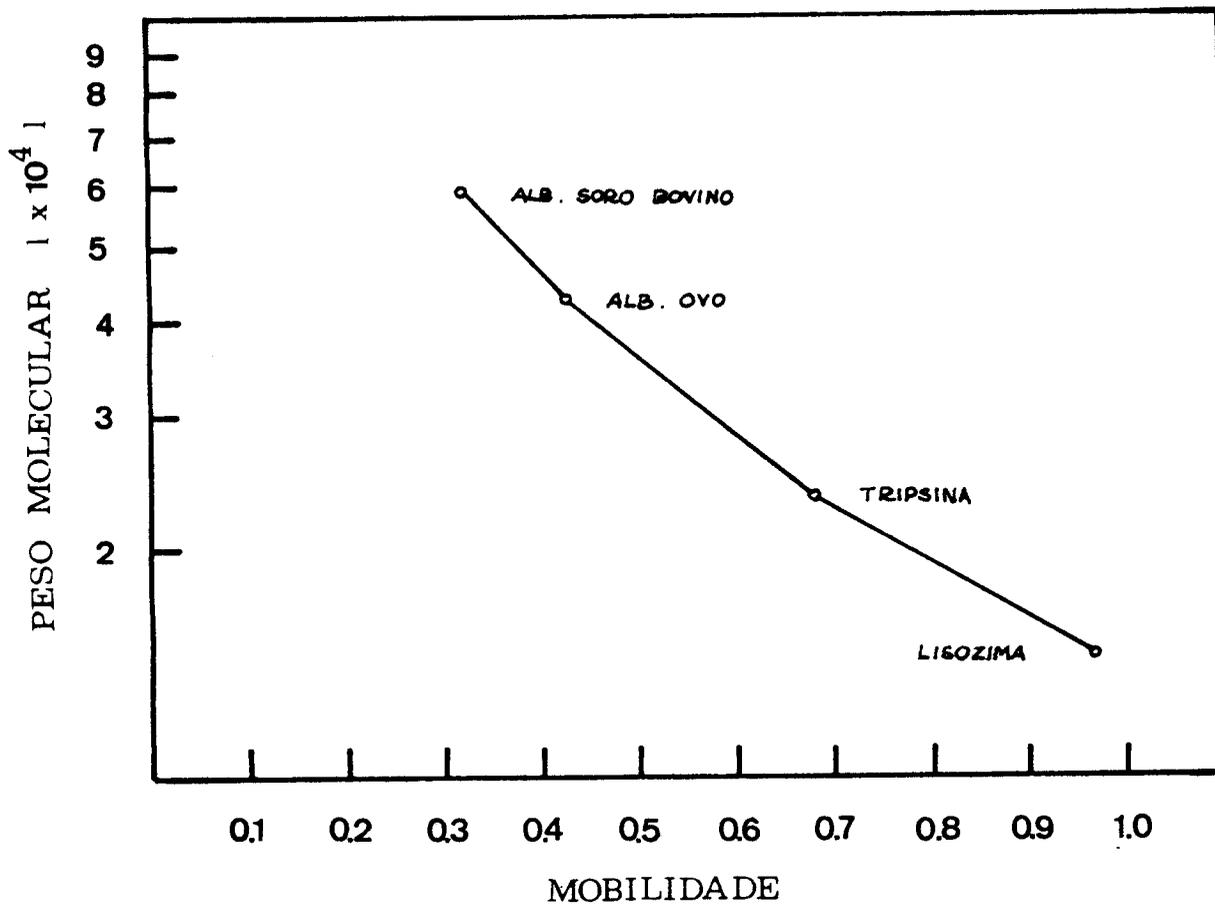


FIGURA Nº 7
DETERMINAÇÃO DE PESO MOLECULAR
CURVA PADRÃO



6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1. Análises

As análises químicas efetuadas no gergelim segundo a descrição feita em 5.1, assinalam resultados similares aos encontrados por outros pesquisadores (11, 16, 25) quanto à umidade, cinzas e fibra, observando-se somente algumas diferenças no conteúdo de proteínas.

A farinha obtida no laboratório foi da variedade Venezuela 51 cultivada em Campinas (Brasil). O conteúdo de proteína (38,3%) foi menor que o valor reportado por Jaffé e Chavez (25) para a mesma variedade cultivada na Venezuela (42,7%), e o valor reportado por De zaghi (16) para essa variedade cultivada na Guatemala foi 45,1%. Como tem sido demonstrado por Kinman e Stark (32) a composição química do gergelim depende da variedade, e numa mesma variedade, depende do lugar onde é cultivado.

A fração descorticada (descascada) tem um conteúdo de proteínas de 39,7%, sendo maior que o valor para a fração corticada (34,5%), e portanto ligeiramente mais elevada que a farinha integral (38,3%).

A análise do conteúdo de fibras na farinha integral mostrou (quadro 1) que praticamente não há diferença entre o comercial e a extraída no laboratório. Uma variação importante no conteúdo de fibras é apresentada nas frações corticadas e descorticadas. Assim, a fração corticada tem o dobro em fibras que a fração descorticada (3,4%), que por sua vez é quase a metade que o da farinha integral. Estas diferenças indicam que é possível elevar o conteúdo de proteínas e reduzir o teor de fibra crua a valores inferiores a 3,5%, seguindo o processo de moagem e peneiragem. Este valor é aceitável em um produto que pode ser utilizado para consumo humano.

Os resultados analíticos relativos ao conteúdo de proteína do concentrado e do isolado protéico (quadro 2) obtidos da fração descorticada, demonstram que é possível se obter mais do dobro da porcentagem de proteína da farinha integral original no isolado, e um pouco menos no concentrado.

Os únicos valores encontrados na literatura para obtenção de concentrado de proteína de gergelim, são os dados por Shikh et al. (58) que prepararam um concentrado com 72% de proteína, em condições semelhantes à obtenção do isolado.

A denominação de concentrado protéico e isolado se fez de acordo com o tipo de técnica empregada (descrita em 4.7 e 4.8) na obtenção e seguindo a definição de Spensley et al. (61) o qual assinala que um "concentrado protéico" é um material protéico obtido de farinha desengordurada, por um processo posterior da extração dos carboidratos solúveis da farinha. O "isolado protéico" contém em sua maioria somente proteína. Como é observado, o concentrado protéico tem somente 47% de proteínas, e o isolado protéico tem 79,1%, caindo bem nesta denominação.

O isolado e o concentrado têm um alto conteúdo de proteína, porém, são mais difíceis de serem obtidos e de custo mais elevado. Assim, parece mais conveniente a produção de uma farinha comestível que contenha um pouco mais de proteína que as tortas residuais da extração do óleo e que sejam de menor custo de produção. Neste caso comparando o conteúdo de fibra e proteína do concentrado (quadro 2) com o da fração descorticada (quadro 1) pode-se assinalar que esta porção seria mais adequada como farinha comestível, como ingrediente para preparação de alimentos dietéticos, e para suplementação de alimentos à base de cereais para alimentação de crianças.

De conformidade com o que foi exposto anteriormente, por moagem e tamizagem, consegue-se obter uma redução significativa do conteúdo de fibra, sendo que concentração de proteínas aumenta simultaneamente. Mesmo que não se alcance um conteúdo de proteínas igual ao do concentrado e ao do isolado, as diferenças não são muito acentuadas, podendo terem utilização semelhante.

Farinhas com alto conteúdo de proteína, tais como soja e amendoim (61), são utilizadas para produzir carnes texturizadas por processos de extrusão, e para fortificação de alimentos à base de cereais, a exemplo do pão.

A farinha de gergelim, o concentrado e o isolado com alto conteúdo protéico, poderiam ter um uso semelhante.

6.2. Frações Obtidas da Farinha de Gergelim

Os dados apresentados no quadro 3 representam o rendimento da farinha de gergelim depois da peneiragem, como é indicado em 5.2, sendo esta uma forma de elevar a qualidade da farinha, eliminando frações fibrosas da farinha extraída com solvente. Assim, por peneiragem a 50 ou 60 mesh, eliminam-se a cutícula e

a epiderme externa, apesar de que uma pequena fração da epiderme consegue pas sar através da peneira.

As percentagens de ambas as frações obtidas pela peneiragem a 50 ou 60 mesh praticamente não têm grande diferença. Pode-se notar que a fração cortica da representa uma percentagem bastante elevada (40 a 50%) da farinha, e contém 25% de proteína. Por conter um alto teor em fibra (8,3%), pode ser comercializa da somente depois de um tratamento adequado. Assim, poderia ter o mesmo uso que a fração descorticada, principalmente como um constituinte de alimentos para ru minantes ou como fertilizante para a agricultura.

6.3. Fatores que Afetam a Solubilidade do Nitrogênio

São discutidos os resultados indicados em 5.3 e obtidos como descrito em 4.6.

6.3.1. Efeito do pH

Ao estudar a solubilidade da proteína em solução aquosa a diferentes pH como se indica em 5.3.1 (fig. 1 e 2), encontrou-se que o ponto de mínima solu bilidade está entre 3,0 e 6,0. Depois de posteriores experimentos obteve-se a mínima solubilidade como sendo a pH 4,4-4,7. Também encontrou-se que a solubi lidade do nitrogênio aumenta, ao aumentar a acidez e a alcalinidade, afastando -se do ponto isoelétrico.

A solubilidade da fração descorticada é diferente para cada solução sali na utilizada (fig. 3). Em solução de NaCl 0,5 M, ocorre uma baixa solubilidade no lado ácido, aumentando a pH 4, e até pH 6 e condições mais alcalinas. A solu bilidade em solução de CaCl₂ 1M é baixa em pH^{'s} ácidos, observando-se solubili dade máxima a pH 9,0.

Assim, em geral, as curvas de solubilidade tendem a aumentar, começando desde pH 4 até um máximo de solubilidade em pH 9.

Igualmente, as proteínas da farinha mostram baixa solubilidade a pH infe riores a 5 para sulfito de sódio e fosfato dibásico de sódio 0,25 M. As curvas de solubilidade das frações obtidas da farinha de gergelim, são similares às da farinha integral.

Portanto, deste ponto de vista, a proteína de gergelim é mais solúvel em soluções salinas que em água a pH inferior a 7, mas tem a mesma solubilidade em soluções aquosas e salinas a pH's elevados (geralmente maior que 10,0).

6.3.2. Efeito de Diferentes Sais em Diferentes Concentrações

De acordo com as indicações dadas em 5.3.3. nas figuras 4 e 5 sumarizam-se os efeitos de vários sais sobre a solubilidade do nitrogênio.

O cloreto de sódio é o sal eficiente na extração do nitrogênio, a concentração de 0,8 M ou superiores, alcançando um máximo de 90,1% em uma concentração de 1,0 M. Não sendo recomendável a extração com uma concentração muito alta de NaCl, a pH alcalino, já que a proteína extraída apresenta uma cor escura, o que lhe confere um aspecto não atraente.

Com soluções de cloreto de cálcio a uma concentração de 0,8 M ou superior, obtêm-se extrações acima de 60%. O fosfato de sódio dibásico e sulfito de sódio, extraem mais de 50% do nitrogênio solúvel da farinha de gergelim, na faixa de concentrações de 0,2-0,5 M. O fosfato de sódio dibásico alcança a extração máxima de 60% em torno de 0,3 M de concentração; com sulfito de sódio a essa mesma concentração, a extração foi superior a 80%. Existe assim um contraste na extração, já que com cloreto de sódio e cloreto de cálcio na mesma faixa de concentração (0,2-0,5 M), a solubilidade não alcança a 50%.

É interessante que a alta solubilidade das proteínas da farinha de gergelim em fosfato de sódio dibásico e sulfito de sódio, está em contraste com a escassa solubilidade das proteínas de semente de girassol (segundo as mesmas condições de extração), conforme os dados obtidos por Mattil (41).

6.3.3. Efeito do Tempo

De acordo com os resultados descritos em 5.4 e no quadro 4, a máxima solubilidade do nitrogênio (50,7%) é alcançada em 45 minutos e praticamente não tem variação até 1 hora de extração. Assim seguindo-se as indicações de Mattil (41) e de acordo com os resultados, escolheu-se um tempo de 30 minutos como tempo ótimo para extração da proteína.

Jones e Gersdorff (28) fizeram extrações da proteína de gergelim a dife

rentes tempos, com soluções de NaCl a diferentes concentrações e encontraram uma extração máxima com NaCl a 10%, durante 1 hora (36,75%). À medida que aumentaram o tempo de extração, diminuía o nitrogênio extraído, indicando que a medida que se prolonga o tempo de extração, diminui a solubilidade do nitrogênio, já que a proteína começa a desnaturar-se por um prolongado contato com a solução salina.

6.3.4. Efeito da Temperatura

Dos resultados apresentados no quadro 5, descritos em 5.3, pode-se dizer que ao aumentar a temperatura, aumenta a solubilidade do nitrogênio até 60°C. Aos 70°C observa-se uma diminuição da solubilidade, possivelmente por coagulação parcial da proteína. Isto está de acordo com as observações de Jones e Gersdorff (28), os quais através de testes de coagulação, encontraram três frações distintas de proteínas em extratos de farinha de gergelim, sendo que a primeira fração coagulava a 68°C e as outras coagulavam a 88 e 98°C.

6.3.5. Efeito da Relação Farinha:Solvente

No quadro 6, observa-se que a relação farinha:solvente de 1:15 (P:V), foi a mais eficiente para a extração do nitrogênio, recuperando-se 59,7%. Quando a relação farinha:solvente é menor, a quantidade de extrato que se recupera é muito pequena, seja por filtração ou centrifugação, porque a farinha de gergelim absorve de 3 a 6 vezes seu peso em solvente, o qual não pode ser recuperado como parte da solução separável, mesmo porque essa quantidade não separável depende da eficiência das técnicas de separação usadas.

6.4. Composição em Aminoácidos

Os dados sobre a composição em aminoácidos da proteína de gergelim como indicou-se em 5.4 são apresentados nos quadros 7 e 8, indicando que tais proteínas são ricas em metionina e cistina, porém são deficientes em lisina, coincidindo com os valores reportados por Carter (11), De Zaghi e Bressani (16) e Villegas et al. (69).

A análise de aminoácidos do isolado mostram um incremento em todos os

aminoácidos, ao se comparar com a farinha integral, enquanto que no concentrado verifica-se um incremento em todos os aminoácidos, à exceção da lisina e da histidina (quadro 7). Na fração descorticada, o conteúdo dos aminoácidos é ligeiramente maior que na farinha integral, excetuando-se a histidina e a tirosina, que se encontram em uma quantidade ligeiramente menor.

Na fração corticada todos os aminoácidos estão numa quantidade menor, comparativamente aos encontrados na farinha integral, exceção feita à prolina e à glicina.

A lisina é o aminoácido que se encontra em menor quantidade na proteína do gergelim, comparando-a com a proteína padrão da FAO. Isto igualmente está de acordo com outros valores referidos na literatura (17, 63), podendo-se reafirmar que a lisina é o aminoácido essencial limitante na proteína de gergelim, a qual constitui-se em uma boa fonte de aminoácidos sulfurados (10, 16).

Observa-se também que na fração descorticada, o concentrado e o isolado obtidos da torta de gergelim, as proteínas são superiores à proteína de referência da FAO em treonina, leucina, fenilalanina e valina.

O conteúdo de metionina da proteína das frações de farinha de gergelim, o isolado e o concentrado, é equivalente àquela da proteína de referência da FAO, a não ser na farinha integral na qual se observa certa redução. Assim, a farinha integral desengordurada continha somente 2,2% de metionina, enquanto que o valor médio encontrado na literatura foi de 2,34%. Por conseguinte, com uma seleção cuidadosa da matéria prima, pode-se obter um produto com suficiente conteúdo de metionina, comparável à proteína de referência da FAO.

6.5. Digestibilidade Enzimática

Pode-se observar (quadro 10) que a fração corticada apresenta o menor valor de digestibilidade protéica; aqui o efeito pode ser atribuído ao fato de que esta fração contém a parte fibrosa da semente, incluindo a proteína da parede celular, a qual é menos suscetível ao ataque enzimático.

A digestibilidade da proteína aumentou de 75,5% na farinha integral para 96,44% no isolado, valor que é comparável com a digestibilidade da caseína.

Os valores encontrados para digestibilidade enzimática da proteína coincidem com os relatados por Villegas (69) os quais foram confirmados por ensaios "in vivo".

6.6. Eletroforese em Acetato de Celulose

Conforme se indicou nos resultados (fig. 6), a eletroforese em acetato de celulose (Millipore) da proteína da farinha de gergelim, indica uma faixa maior das 4 bandas obtidas, quando a proteína é extraída com cloreto de sódio 1M e com sulfito de sódio 0,4 M, quando são obtidas somente 3 bandas. A extração com cloreto de cálcio 1M revela um componente de pouca mobilidade, que migra para o cátodo.

Na extração com fosfato dibásico de sódio 0,3M, obtêm-se 3 bandas de mobilidade similar às extraídas com sulfito de sódio 0,4 M, todavia com a diferença que o componente de maior mobilidade está em menor quantidade. Quando a proteína foi extraída com água a pH 8,0, foram separadas 3 bandas, sendo o maior componente o de maior mobilidade. Com tampão tris-glicina pH 9,5 como solvente de extração, foram obtidas 4 faixas, sendo aparentemente idênticas às aquelas obtidas com cloreto de sódio 1M, com a diferença entretanto, que se encontram em menor quantidade, com exceção do componente de maior mobilidade.

Jones e Gersdorff (28) isolaram duas globulinas diferentes, por extração da proteína com cloreto de sódio 10%. A α - globulina era 4 vezes maior que a β - globulina. Além das globulinas eles isolaram uma primeira fração tendo denominado fração I a fração maior.

Nath e Giri (45-47) isolaram a fração I como o maior componente, e por mobilidade eletroforética, a identificaram como α - globulina de Jones e Gersdorff (28).

Neste estudo, o maior número de frações foi obtido com soluções salinas ; permitindo-se concluir que a maioria das proteínas da farinha de gergelim são globulinas.

6.7. Eletroforese em Gel de SDS-poliacrilamida

Davis (15) e Ornstein (50) demonstraram que o fracionamento das proteínas nativas sobre gel de poliácrlamida não depende somente da carga, mas também do peso molecular das mesmas. A ligação de íons de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e β - mercaptoetanol à proteína, e o princípio utilizado para o fracionamento das proteínas em forma linear em eletroforese sobre gel de poliácrlamida.

Assume-se que as cargas de cada proteína é totalmente mudada por ligação de anions SDS, resultando em moléculas carregadas negativamente. Os resultados apresentados nas fotos 1 - 5 mostram claramente um alto grau de reproducibilidade na determinação da mobilidade eletroforética das diferentes frações.

Em quase todos os casos foram obtidas, 7 faixas correspondentes às cadeias de polipeptídeos (fotos 2 - 5) com pesos moleculares bastante precisos (quadro 10). Com estes resultados pode-se assumir que a técnica de Shapiro et al. modificada por Weber et al (70) permite uma precisão de pesos moleculares com erro máximo de $\pm 10\%$, para cadeias de polipeptídeos com peso molecular entre 15.000 e 100.000.

As cadeias de polipeptídeos separadas das proteínas de gergelim têm pesos moleculares entre 65.000 e 16.000.

A extração com sais permite a obtenção de até 8 faixas correspondentes as diferentes cadeias de polipeptídeos. No caso da extração com água, somente conseguimos extrair 5 componentes que também se encontram em menores quantidades. Quando as proteínas foram extraídas com tampão (descrito em 4.10), a amostra liofilizada apresenta um número de faixas (foto 2) onde as quantidades são similares às aquelas em que a proteína foi precipitada e liofilizada. Entretanto a eletroforese das proteínas do líquido sobrenadante correspondente, também liofilizado, apresenta mobilidades eletroforéticas e faixas bastante parecidas com as obtidas quando a extração foi feita com água a pH 8 (foto 4). Confirmou-se uma vez mais que as proteínas do gergelim que estão em maior quantidade são as mais solúveis em soluções salinas, ou seja, do tipo globulinas.

As mobilidades eletroforéticas praticamente foram iguais, não apresentando diferenças significativas nos pesos moleculares correspondentes a cada fração, quando se utilizaram diferentes solventes para a extração das proteínas, pelo que, se considerou o valor do peso molecular como sendo o correspondente a cada cadeia de polipeptídeos das proteínas separadas em SDS - poliácridamida.

7. CONCLUSÕES

1. A farinha integral desengordurada da variedade de gergelim estudada (Venezuela 51), cultivada no Brasil, apresenta um conteúdo de proteína relativamente menor, com respeito ao valor médio dado por outros autores para a mesma variedade cultivada em outros países, sendo todas procedentes da Venezuela. Estas diferenças são devido possivelmente a variações ecológicas, já que anteriormente foram reportadas diferenças por variações na constituição genética em condições de cultivo similares.

2. Pode-se obter uma redução significativa no conteúdo de fibra e um aumento no conteúdo de proteína, mediante moagem e peneiragem adequadas da torta desengordurada com solvente.

3. As soluções de sais neutras foram as melhores para extração das proteínas de gergelim, indicando que a maior parte das proteínas são globulinas.

4. A proteína da farinha de gergelim pode ser extraída eficientemente em meio aquoso sempre que o pH for maior que 9.

5. A proteína isolada e o concentrado preparado sob diferentes condições de pH variam em aparência física, não sendo recomendado extração a pH maior que 10 já que o produto tem uma cor escura, de aspecto não atraente.

6. O concentrado e o isolado tem um conteúdo de aminoácidos superior ou similar à proteína padrão da FAO, com excessão da lisina que é limitante na proteína do gergelim. A farinha, o isolado e o concentrado podem ser considerados como uma fonte de metionina.

7. A proteína de gergelim quando fracionada apresenta 8 frações proteicas (cadeias de polipeptídeos) as quais tem um peso molecular entre 65.000 e 17.000.

8. BIBLIOGRAFIA

1. AKESON, W. R. & STAHAMANN, M. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. J. Nutr., 83: 257-261, 1964.
2. ALMQUIST, H. J. & GRAU, C. R. Mutual supplementary effect of the proteins of soybean and sesame meals. Poultry Sci., 23: 341-343, 1944.
3. ALTSCHUL, A. M. Progress in Meeting Protein needs of infants and Preschool children. Washington, D. C., National Academy of Sciences, 1961. p. 517.
4. ANUARIO ESTADISTICO AGROPECUARIO 1972. Caracas. Ministerio Agricultura y Cría, 1973.
5. AOAC. Official methods of analysis of Association of Official Agriculture Chemists. Washington, D. C. 10th. ed., 1965.
6. AWAIS, M.; SHAIKH, I. & MAQSOOD, A. Nutritional properties of sesame flour prepared from indigenous sesame seed cake. Pakistan J. Sci. Ind. Res., 11: 384-387, 1968.
7. BENDER, A. Evaluation of nivel of protein products. Oxford, Pergamon press, 1968. p. 43.
8. BRESSANI, R.; AGUIRRE, A. & SCRIMSHAW, N. S. All vegetable protein mixtures for human feeding. II. The nutritive value of corn, sorghum, rice and buck-wheat substituted for limetreated corn. INCAP vegetable mixture light. J. Nutr., 69: 351-355, 1957.
9. _____.; BRAHAM, J., & ARROYANE, R. Desarrollo de una ración práctica para la alimentacion de pollos. 1. Uso de harinas de algodón y ajonjolí. Turrialba, 13: 213-220, 1963.

10. CALDWELL, R. W. Sesame meal. In: ALTSCHUL, A. M. Processed plant protein. New York, Academic press, 1958. p. 535-556.
11. CARTER, F. L.; CIRINO, V. O. & ALLEN, L. E. Effect of processing on the compositions of sesame seed and meal. J. Amer. Oil Chem. Soc., 38: 148-150, 1961.
12. CUCA, M. & SUNDE, M. L. Amino acid supplementation of a sesame meal diet. Poultry Sci. 46 (6): 11512-1516, 1967.
13. _____ & _____. The availability of calcium from Mexican and Californian sesame meals. Poultry Sci., 46: (4), 994-1002, 1967.
14. DANIEL, V. A. et al. Mutual and amino acid supplementation of proteins. II. Nutritive value of the proteins of blends of wheat groundnut, soya bean, bengal gram, sesame and skim powder fortified with limiting essential amino acids. J. Nutr. Dietet., 1: 293-296, 1964.
15. DAVIS, J. B. Disc eletrophocesis. II Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121 (2): 404-427, 1964.
16. DE ZAGHI, S. & BRESSANI, R. Uso de recursos alimentícios centroamericanos para el fomento de la industria animal. II. Composición química de la semilla y de la harina de torta de ajonjolí (Sesamun indicum). II Turrialba., 19 (1): 34-38, 1969.
17. EVANS, R. J. & BANDEMER, S. H. Nutritive values of some oilseed proteins. Cereal Chem., 44 (5): 417-426, 1967.
18. FIGUEIREDO, I. B. Métodos de hidrólise das proteínas em alimentos para determinação de aminoácidos. Coletanea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, 3: 41-55, 1969/70.
19. GRACI, A. V. et al. Filtration extraction of sesame seed on a bench scale. J. Am. Oil Chem. Soc. 33: 645-650, 1956.

20. GRAU, C. R. & ALMQUIST, H. J. The methionine content of feedstuff proteins. Arch. Biochem., 6: 287-294, 1945.
21. GUGGENHEIM, K. & SHLOMO, S. Protein rich mixture based on vegetable foods available in middle Eastern Countries. J. Agr. Food Chem. 13 (2): 148-151, 1965.
22. GUTTIKAR, M. N. et al. Studies on processed protein foods based on blends of groundnut, bengal gram, soya bean and sesame flours and fortified with minerals and vitamins. J. Nutr. & Dietet; 5: 110-120, 1968.
23. HOWE, E. E.; GILFILLAN, E. W. & MILNER, M. H. Amino acid supplementation of protein concentrates as related to world protein supply. Am. J. Clin. Nutrition, 16: 321-326, 1965.
24. JAFFÉ, W. G.; CHÁVEZ, J. F. & KOIFMANN, B. Estudios preliminares sobre la toxicidad de muestras de ajonjolí con alto contenido de selenio. Arch. Latinoamer. Nutr., 14: 7-23, 1964.
25. _____ & _____. El posible uso de la harina de ajonjolí para fines comestibles. Arch. Latinoamer. Nutr., 11: 31-48, 1971.
26. JAPÃO. pat. 4815618. Takasago Perfumary Co. Ltd. Oilseed protein pastes. 1973. (cf. FSTA, 5 (11): 39, 1973).
27. JOHNSON, R. H. & RAYMOND, W. D. The chemical composition of some tropical food plants. III. Sesame seed. Trop. Sci., 6 (3): 173-175, 1964.
28. JONES, D. B. & GERSDORFF, C. E. F. Proteins of sesame seed, *Sesamum indicum*. Biol. Chem., 75: 213-225, 1927.
29. JOSEPH, K. et al. Supplementary values of the proteins of bengal gram (*Cicer arietinum*) and sesame to peanut proteins. Food. Sci., 7: 186-187, 1958.

30. JOSEPH, K. et al. The supplementary value of certain processed protein foods based on of groundnut, soya-bean, sesame chick-pea (*Cicer arietinum*) flours and skin milk powder to a maize tapioca diet. *Brit. J. Nutr.*, 16: 49-57, 1962.
31. KHIDIR, M. O. & KHATTAB, H. H. Oil, protein and dry matter development in sesame seed. *Expl. Agric.*, 8: 61-65, 1972.
32. KINMAN, M. L. & STARK, S. M. Yield and Chemical composition of sesame (*Sesamun indicum*), as affected by variety and location grown. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 31: 104-108, 1954.
33. KRISHNA MURTI, C. R. Oil cake meal for preparation of protein hidrolysate. *Biotech. and Bioeng.* 7: 285-293, 1965.
34. KUPPUSWAMY, S. et al. The nutritive value of the proteins of Indian multipurpose food. *Food Sci.*, 6: 84-89, 1957.
35. LAL, B. M. & RAJAGOPALAN, R. Studies on mutual supplementation in vegatable proteins. *Ind. J. Med. Res.*, 41 (2): 173-183, 1953.
36. LEASE, J. G. & WILLIAMS, W. P. Availability of zinc and comparison of in vitro and in vivo zinc uptake of certain oil seed meals. *Poultry Sci.*, 46 (1): 233-241, 1967.
37. LEASE, J. G. The effect of autoclaving sesame meal on its phytic acid content and on the availability of its zinc to the chick. *Poultry Sci.*, 45 (2): 237-241, 1966.
38. LYMAN, C. M., KUIKAN, K. A. & HALE, F. Essential-amino-acid content of farm needs. *J. Agric. Food Chem.*, 4: 1008-1013, 1956.
39. LYON, C. K. Sesame: current Knowledge of composition and use. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 49: 245-248, 1972.

40. MANUAL OF CELLOGEL ELECTROPHORESIS AND IMMUNOTECHNIQUES. Milano, Italy, Chemetron.
41. MATTIL, K. F. The functional requirements of proteins for foods. J. Amer. Oil Chem. Soc., 48: 477-480, 1971.
42. MC-CALL, J. T.; MASON, J. V. & DAVIS, G. K. Effect of source and level of dietary protein on the toxicity of zinc to the rat. J. Nutr., 74: 51-57, 1961.
43. NARAYANA, C. et. al. Storage behavior of sesame seed, oil, and cake. Indian Oil Soap. J. 32 (11): 297-304, 1967.
44. NATARAJAN, S. & CAMA, H. R. Nutritive value of differently processed sesame meals and the effect of supplementation of the meals with lysine and methionine. J. Nutr. Dietet, 2: 61-64, 1965.
45. NATH, R. & GIRI, K. V. Physico-chemical investigations on indigenous seed proteins. I. Studies on solubilization of nitrogenous constituents of sesamum indicum its proteins by electrophoresis. J. Sci. Ind. Res., 16c: 5-8, 1957.
46. _____ & _____. Physico-chemical investigations seed proteins. II. Fractionation, isolation and electrophoretic characterization of sesame globulins. J. Sci. Ind. Res., 16c: 51-58, 1957.
47. _____ & _____. Physico-chemical investigations on indigenous seed proteins. III. Amino acid composition of sesame seed globulins. J. Sci. Ind. Res., 16c: 228-230, 1957.
48. OBERLEAS, D; MUHRER, M. E. & O'DELL, B. L. Effects of phytic acid on zinc availability and paraketosis in swine. J. Animal Sci., 21: 27-61, 1962.

49. O'DELL, B. L. & SAVAGE, J. E. Arginine lysine antagonism in the chick and its relation-ship to dietary cation. J. Nutr., 90: 364-370, 1966.
50. ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis. I background and theory. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121 (2): 321-346, 1964.
51. PARPIA, H. A. & SUBRAMANIAN, N. Plant protein. Advances in Chemistry Series. Washington, American Chemical Society, 1966. 57, p. 112-132.
52. PROTEIN ADVISORY GROUP. Guideline on the preparation of defatted edible sesame flour. PAG Bulletin., 3 (1): 10-14, 1973.
53. RAMACHANDRAN, B. V. Arginine content of oilseed cake. J. Sci. Ind. Res., 16c: 70-71, 1957.
54. SABRY, Z. I.; MORRISON, A. B. & CAMPBELL, J. A. Evaluation of protein in foods. X. A comparison of methods for assessing the protein contribution of five Middle Eastern meals. J. Assoc. Offic. Agr. Chem., 47 (2): 377-380, 1964.
55. SALEM, H. M. & BEKHEIT, M. Biochemical studies on sesame seed proteins. Pakistan J. Sci.; 16 (3): 105-114, 1964.
56. SCRIMSHAW, N. S. et al. All vegetable protein mixtures for human feeding. V. Clinical trials with INCAP mixtures 8 and 9 and with corn and beans. Amer. J. Clin. Nutr.; 9: 196-205, 1961.
57. SHAMANTHAKA, M. C. et al. Studies on the wet dehulling of sesame seed to obtain superior grade protein concentrates. J. Amer. Oil Chem.Soc., 46: 592A-596A, 1969.
58. SHIKH, I. A. et al. Nutritional properties of sesame seed protein concentrate prepared from commercial sesame seed cake. Pakistan. J. Sci. Ind. Res., 12: 41-42, 1969.

59. SMITH, R. E. & SCOTT, H. M. Use of free amino acid concentrations in blood plasma in evaluating the amino acid adequacy of intact proteins for chick growth. II. Free amino acid patterns of blood plasma of chicks fed sesame and raw, heated and overheated soybean meals. *J. Nutr.* 69: 343-50, 1969.
60. SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H. & MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, 30: 1190-1206, 1958.
61. SPENSLEY, P. C.; HALLIDAY, D. & ORR, E. The prospects for non-conventional protein resources. *Trop. Sci.*, 14 (3): 203-233, 1972.
62. SQUIBB, R. L. et al. All vegetable protein mixtures for human feeding. I. Use of rats and baby chicks for evaluating corn-based vegetable mixtures. *J. Nutr.*, 69: 343-350, 1959.
63. SREEKANTIAH, K. R. et al. Enzymic processing of vegetable protein foods. *Food Techn.*, 23 (1055-1094): 69-108, 1969.
64. SRINIVAS, H. et al. Studies on micro-atomised protein food based on blends of low fat groundnut, soya and sesame flours and skim milk powder and fortified with vitamins, calcium salts and limiting amino acids. II. Amino acid composition and nutritive value of the proteins. *J. Nutr. Dietet.*, 3: 42-46, 1966.
65. SUBRAMANIAN, N. & SASTRY, M. C. Potencial of dehulled sesame products for the nutritional improvement of diets. *Pahalavi Med. J.*, 2 (1): 88-11, 1971.
66. SWINGLE, M. K. Sesame a list of references. U. S. Dpt. Agr. Library, List (20), 1945.
67. TASKER, P. K. et al. Studies on micro atomised protein foods based on blends of low fat groundnut, soya and sesame flours and skim milk

powder and limiting amino acids. I. Preparation, chemical composition and shelf life. J. Nutr. Dietet., 3: 38-42, 1966.

68. VENTURA, M. & LIMA, H. Sesame seed proteins: I. Sedimentation and diffusion characteristics of major globulin. Anais Acad. Brasil. Ciencia., 35 (1): 55-60, 1960.
69. VILLEGAS, A. M.; GONZÁLES, A. & CALDERÓN, R. Microbiological and enzymatic evaluation of sesame protein. Cereal Chem. 45 (5): 379-385, 1968.
70. WEBER, K. & OSBORN, M. The realibility of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244 (16): 4.406-4.412, 1969.
71. YERMANO, D. M.; SALEEB, W. & CAVANAGH, G. C. The sesame plant as a source of protein and other nutrients. J. Amer. Oil Chem. Soc. 48: 831-834, 1971.