

ESTUDIO COMPARATIVO DE METODOS DE HIDROLISIS ENZIMATICA, PARA LIBERAR TRIFOANO EN PROTEINAS DE ALIMENTOS

Por MILENA MÓNARI e IRMA PENNACCHIOTTI

*Cátedra de Bromatología. Facultad de Química y Farmacia
Universidad de Chile, Santiago de (Chile)*

S U M M A R Y

The importance of triptophan in food value and the problems that are still encountered when it is measured prompted the comparison of different techniques of hydrolysis by means of which it can be freed from food protein. To wit: trypsin, and hydrolysis with papain in a neutral medium.

After it was thus isolated, triptophan was measured by the colorimetric technique of Spies and Chambers, using the internal standard variant.

The raw materials used were pure protein (casein), polenta (ground corn) and clams (*Ameghinospa* antigua).

Recuperation techniques were used to measure how much triptophan is destroyed during treatment.

The best results were obtained by hydrolysis with papain in an alkaline medium, which is recommended for adoption as the standard technique for the determination of triptophan. Hydrolysis with pepsin and trypsin is discarded, but hydrolysis with papain at pH 7 should be further studied before a conclusion is reached.

The use of an internal standard minimized the weight of errors of measurement on the precision of results.

INTRODUCCION.

El objeto de este trabajo ha sido efectuar un estudio crítico y a la vez comparativo, de métodos de hidrólisis enzimática para liberar triptófano en las proteínas de los alimentos y para poder cuantificarlo luego en su totalidad, por un método químico o microbiológico. En este trabajo se empleó el primero por ser más corto y fácil de reproducir.

Numerosas investigaciones referentes a métodos de hidrólisis ácida y alcalina para liberar triptófano de las proteínas, concluyen que éstas no son de ningún caso recomendables, ya que se produce una considerable destrucción de este aminoácido, además de una racemización como en el caso de la hidrólisis alcalina.

En cuanto a las publicaciones revisadas referentes a la hidrólisis enzimática, no se han encontrado más de dos o tres trabajos y más aún no son suficientemente completos como para llegar a conclusiones definitivas, como es el caso de las otras hidrólisis.

De la revisión realizada se desprende que los resultados de triptófano obtenidos para la hidrólisis enzimática, son más altos que para las hidrólisis ácida y alcalina.

De estas consideraciones se desprende la necesidad de realizar un estudio metódico y completo de la hidrólisis enzimática en lo que se refiere: 1) tipo de enzima; 2) temperatura; 3) pH del medio en que se realiza la hidrólisis y 4) tiempo de duración de la hidrólisis. En esta forma será posible contar con un método eficiente, comprobado y preciso para liberar la totalidad del triptófano de las proteínas.

En el presente trabajo se estudiaron 3 métodos de hidrólisis enzimática. El sustrato usado fue una proteína pura: caseína, común para los 3 tipos de hidrólisis. Una vez estudiados los tres métodos, se aplicaron a proteínas en dos tipos de alimentos: vegetal y animal.

REVISION BIBLIOGRAFICA.

Los diversos métodos de determinación de triptófano han llevado a diferentes autores a obtener resultados muy variados; por ejemplo, los valores de triptófano en caseína obtenidos cuando se determina por métodos químicos o microbiológicos que van del 1 por 100 al 2,4 por 100. Sin embargo, esta discrepancia de cifras, que a primera vista parece deberse a los diferentes métodos aplicados, viene de una etapa anterior a la de la cuantificación misma, y es la etapa de hidrólisis para liberar el triptófano de la proteína. Esto queda claro al observar que algunos autores obtienen diferentes resultados, cuando aplican un mismo método de valoración, pero métodos distintos de hidrólisis, como en el caso demostrado por HORN y JONES (1), WOOLEY y SEBRELL (2), quienes hacen un estudio comparativo de diferentes tipos de hidrólisis para liberar este aminoácido.

Los autores citados realizan: 1) hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio en diferentes condiciones; 2) hidrólisis enzimática usando diferentes enzimas, o combinación de éstas.

Estos autores concluyen que son las enzimáticas las que dan valores más altos y reproducibles de triptófano en proteínas puras o en alimentos.

GREENHUT (3) efectúa un estudio de hidrólisis enzimática con pancreatina, pero no compara con hidrólisis realizadas con otras enzimas.

De lo expuesto hasta aquí se puede deducir como lo han hecho SPIES y CHAMBERS (4), después de revisar los trabajos sobre este tema, que no se han hecho demostraciones críticas de los procedimientos de hidrólisis enzimática para liberar triptófano de proteínas, no implican destrucción del aminoácido.

Es necesario dejar en claro que, respecto a la hidrólisis ácida y alcalina, son sin lugar a dudas poco aconsejables para la liberación de este aminoácido, y a este respecto, prácticamente, todos los investigadores en este campo están de acuerdo en las siguientes conclusiones:

1.º La hidrólisis alcalina, además de una destrucción del triptófano, produce una racemización del aminoácido (5).

2.º La hidrólisis ácida ha demostrado que el l-triptófano pierde gran parte de su actividad. GREENHUT, demuestra que en ácido clorhídrico 2N durante dos horas, el triptófano pierde el 25 por 100 de su actividad (3).

Los estudios realizados para hidrólisis ácida y alcalina son numerosos, la mayoría muy completos y críticos, razón por la cual se consideran sus conclusiones como definitivas. No sucede lo mismo con la hidrólisis enzimática, en cuyo campo hay mucho que investigar.

Por este motivo, se pretende en este trabajo hacer un estudio exhaustivo y crítico sobre el mejor método enzimático a aplicar para la liberación de este importante aminoácido en los alimentos.

MATERIAL Y METODOS.

Material.

Se analizaron las siguientes muestras:

- I. Caseína "MERCK" para fines bioquímicos.
- II. Polenta (adquirida en el comercio de Santiago).
- III. Almejas (*Ameghinospa* antigua), se analizaron desecadas a 105° C., desgrasadas y luego pulverizadas.

La grasa de las muestras de almejas se extrajo con éter etílico en

agotador Soxhlet durante ocho horas (6). La extracción se realizó con el fin de eliminar las pequeñas cantidades de grasa con pigmentos liposolubles que dificultaban más tarde la lectura colorimétrica.

Para hidrolizar estas tres muestras se usaron las siguientes enzimas para fines bioquímicos:

1. Papaína "MERCK", 12.000 E/g.
2. Pepsina Hopkin y Williams; 1; 10.
3. Tripsina "MERCK": 1; 300.

Las curvas patrones se obtuvieron con dl-triptófano "Merck".

Todo el material de vidrio usado en este trabajo fue de clase "A".

Métodos.

En todas las muestras se determinó:

- a) *Humedad*, por desecación en estufa a 105° C. (6).
- b) *Nitrógeno total*. Se aplicó el método indicado por la A.O.A.C. (6).

Para convertir el nitrógeno total a proteína se empleó el factor 6.25 (7), en el caso de proteína animal, y 5.7 (7) para polenta.

- c) *Hidrólisis para liberar triptófano*.

A cada muestra se le aplicaron por quintuplicado los tres métodos de hidrólisis que se indican a continuación:

- A) *Hidrólisis con papaína en medio alcalino* (1).

En un matraz Erlenmeyer de 125 ml. se colocó una cantidad de muestra correspondiente a 1 g. de proteína y se suspendió en un volumen de 10 a 20 ml. de agua destilada; se agregó a continuación 17,5 ml. de hidróxido de sodio 0,05 N, 5 ml. de solución de papaína (1 g. en 50 ml. de agua, se agitó, se dejó reposar a 37° C. por 30 minutos, luego se filtró), se agregaron 5 gotas de cianuro de sodio al 5 por 100 como catalizador.

El matraz tapado se dejó toda la noche (16 horas) a 70° C.

Una vez realizada la hidrólisis se procedió a acidificar y a pasar una corriente de N durante quince minutos con el fin de inactivarse la enzima y eliminar el ácido cianhídrico, respectivamente.

La mezcla se filtró y se llevó a 100 ml.; la muestra así obtenida está lista para la determinación del triptófano. No es aconsejable mantener la muestra más de dos días en refrigerador, pues se ha comprobado que

se obtienen resultados más bajos que si se procede dentro del tiempo indicado.

B) *Hidrólisis con pepsina y tripsina (2).*

En un matraz de 125 ml. de tapa esmerilada, se suspendió una cantidad de material correspondiente a 1 g. de proteína en 50 ml. de ácido sulfúrico 0,1 N, agregándose 10 mg. de pepsina, y se mantuvo durante la noche (16 horas) a 37° C.

Una vez cumplido este tiempo se agregaron tres g. de fosfato ácido de potasio con 12 H₂O y se llevaron a pH 8.4.

Luego del ajuste de pH, se agregaron 50 mg. de tripsina, se tapó el matraz y se mantuvo tres días a 40° C. En este método es necesario trabajar con material muy limpio, destapándose sólo en el momento de usarse el material y reactivos y llamear la boca de los matraces antes de abrir o cerrar ya que la temperatura, el pH a que se trabaja y la presencia de proteínas proporcionan un medio en que proliferan hongos, lo lleva a valores erróneos. Al cabo del tiempo señalado, se filtraron y se llevaron al volumen deseado, según la cantidad de proteína y triptófano de la muestra.

C) *Hidrólisis con papaína en medio neutro pH 7.*

Se pesó la cantidad de sustancia correspondiente a 1 g. de proteína y se le agregó 40 ml. de una solución de papaína (4 mg./ml. de tampón, usándose como tampón fosfato de sodio pH 7 0.3 M). La solución de enzimas se preparó diariamente.

Las muestras tapadas se colocaron en un baño termorregulado a 65° C. con agitación por cuatro horas. Se mantuvieron dos horas más, a la misma temperatura, pero sin agitación, completándose así seis horas de hidrólisis.

METODO QUIMICO PARA VALORAR TRIPTOFANO.

En todas las muestras hidrolizadas se aplicó el método químico de SPIES y CHAMBERS (8), citado por estos autores como *método B*, para la cuantificación del triptófano liberado, aplicando los tres procedimientos de hidrólisis ya descritos. Se eligió el método B de una serie dados por ellos y que van de la letra A a la R, por ser más corto y recomendado también por otros autores (9) y con el cual se han obtenido buenos resultados.

Este método se basa en una reacción de coloración que se realiza en dos etapas:

1. La formación de un complejo de triptófano-aldehído (incoloro).
2. Oxidación del complejo, para obtener un color azul cuya intensidad se midió en un espectrofotómetro.

Reactivos.

Solución de H_2SO_4 23,8N. Se usó H_2SO_4 Merck p. a.

Solución de p-dimetilaminobenzaldehído (p-DAB) en H_2SO_4 2 N a razón de 3 g. de p-DAB en 100 ml. del ácido.

Solución de nitrito de sodio al 1 por 100 en agua. Antes de usarla se diluye 25 veces. La solución así obtenida debe ser usada el mismo día de su preparación. Se usó NO_2Na Hopkin y Williams Ltd. 98 por 100.

Es importante que los reactivos sean purísimos puesto que cualquier oxidante o metal presente puede conducir a una oxidación y dar, por lo tanto, una coloración azul que no corresponde a triptófano.

Método.

En una serie de 6 matraces o tubos de 20 ml. con tapa esmerilada, por duplicado se colocan los siguientes reactivos:

Ocho ml. de H_2SO_4 23,8 N.

Un ml. de p-DAB al 3 por 100 en H_2SO_4 2 N y las siguientes alícuotas de solución problema: ml.: 0,0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0.

Las alícuotas tomadas pueden variar según sea la cantidad de triptófano de la proteína de la muestra.

Estos volúmenes se completan a 10 ml. con H_2SO_4 2N, luego de agitar bien se dejan reposar en la oscuridad a 25° C. durante una hora.

Al cabo de este tiempo se agrega 0,1 ml. de $NaNO_2$ a cada tubo, luego se agita y se dejan en reposo en la oscuridad a 25° C. Cumplido este plazo se procede a leer al espectrofotómetro. Se vuelve a agregar 0,1 ml. del nitrito de sodio, se deja reposar otros treinta minutos y se vuelve a leer, con el fin de tener la seguridad de que el nitrito agregado ha sido suficiente para oxidar todo el complejo.

En este trabajo se usó el espectrofotómetro Zeiss, modelo PMQ 11. La longitud de onda a usar en este aparato se encontró haciendo un espectro de absorción para la muestra; el peak máximo resultó estar en 600 nm. Las muestras, por lo tanto, se leyeron a $\lambda = 600$ nm.

Curva standard.

En este estudio se usó un *método de standard interno*, que elimina una serie de errores, entre ellos, el hecho de que el triptófano puro da coloración distinta a la del triptófano en presencia de proteína y esto puede llevar a error. Con este método se evita este problema.

Para construir la curva standard, se trabajó con una serie por duplicado de 6 matraces o tubos graduados, en las mismas condiciones que para la solución problema, con la diferencia que a cada tubo se le agrega 0,2 ml. de una solución de dl-triptófano al 0,015 por 100 en agua, siendo el volumen final de 10,2 ml.

La recta standard resultó paralela a la recta problema y la diferencia entre las dos rectas corresponde a las 30 gammas de triptófano que hay en 0,2 ml de solución al 0,015 por 100 del aminoácido.

Pruebas de recuperación.

Las pruebas de recuperación se realizaron por cuadruplicado en los tres tipos de hidrólisis, usando caseína como proteína patrón. Con estas pruebas se pretendió estudiar si hay alguna destrucción de triptófano a medida que éste se va liberando, ya sea por el pH del medio, por acción de otros aminoácidos presentes en la solución (4), o bien por la temperatura y tiempo de la hidrólisis.

Estas pruebas se efectuaron en forma paralela en cada método de hidrólisis colocando en los matraces los mismos reactivos que para la hidrólisis, más 15 mg. de dl-triptófano.

Todas las etapas posteriores (hidrólisis y determinación química) fueron iguales que para la muestra problema y el standard.

Con las pruebas de recuperación se obtiene una curva cuya pendiente es diversa a las obtenidas para el standard y la muestra problema. En estas condiciones es posible expresar analíticamente el tanto por ciento de recuperación. No está demás señalar que la pendiente de estas curvas es directamente proporcional al coeficiente de absorbilidad molar.

Procedimiento estadístico (10) (11) ().*

Las determinaciones analíticas consistieron en grupos o arreglos de valores de la variable aleatoria Y_{jk} ($k = 1, m_j$), correspondientes a distintos valores de la variable controlada x_j ($j = 1, n$). Se calcularon las regresiones lineales, según el principio de mínimos cuadrados, entre los

(*) Los datos fueron procesados en el computador IBM 360/40 del Centro de Computación de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile, mediante el programa TAXIS en lenguaje F RTRAN IV/G (anexo).

valores x_j y las medias $w_j = \sum Y_{jk}/m_j$ de los arreglos. Los valores de varianza y desviación standard del parámetro β se calcularon según:

$$\sigma_{\beta^2} = \frac{\sigma^2}{n\sigma_x^2}$$

con:

$$\sigma^2 = \frac{N-2}{1} \left\{ \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{N} \right\} - \beta^2 \sigma_x^2$$

y

$$\sigma_x^2 = \frac{1}{N} \left\{ \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N} \right\}$$

Para docimar si la regresión lineal describe satisfactoriamente el fenómeno físico, se efectuó un análisis de varianza como sigue:

suma de cuadrados	grados de libertad	cuad. medio	F computado
$SSD = \sum_j^n (w_j - \hat{w}_j)^2 m_j$	N-2	$Q1 = \frac{SSD}{N-2}$	$F_c = \frac{Q1}{Q2}$
$SSW = \sum_j^n \sum_k^{m_j} (Y_{jk} - w_j)^2$	M-N	$Q2 = \frac{SSW}{M-N}$	
	$M = \sum_{j=1}^N m_j$		

\hat{w}_j ; valor de w estimado para x_j , según la ecuación de regresión, en donde $Q1/Q2$ se distribuye según F con $N_1 = N-2$ y $N_2 = M-N$ grados de libertad como la hipótesis de linealidad H_0 , es verdadera.

Se distinguen los siguientes casos:

(i) Si

$$F_c (N_2, N_1) \leq F.05 (N_1, N_2)$$

Se acepta H_0 y se rechazan H_1 . No hay razones para pensar que el modelo lineal no describe bien el fenómeno.

(ii) Si

$$F_c(N_1, N_2) \geq F_{.01}(N_1, N_2)$$

Se rechaza H_0 y se acepta H_1 . Hay razones para pensar que el modelo lineal no describe bien el fenómeno.

(iii)

$$F_{.05}(N_1, N_2) < F_c(N_1, N_2) < F_{.01}(N_1, N_2)$$

Hay duda. No hay razones para pensar ni lo uno ni lo otro. Es necesario poseer *más información para decidir*.

Procedimiento de cálculo.

1. *Contenido de triptófano.*—El contenido de triptófano en las proteínas estudiadas se calculó mediante la siguiente expresión (gráfico 1).

$$\frac{HG}{AD} = \frac{X}{100 \text{ g.}}; \text{ como } HG = 0,030 \text{ mg. de triptófano, entonces}$$

$$X = \frac{100 \cdot 0,030}{AD} \text{ (mg./100 mg. de proteína)}$$

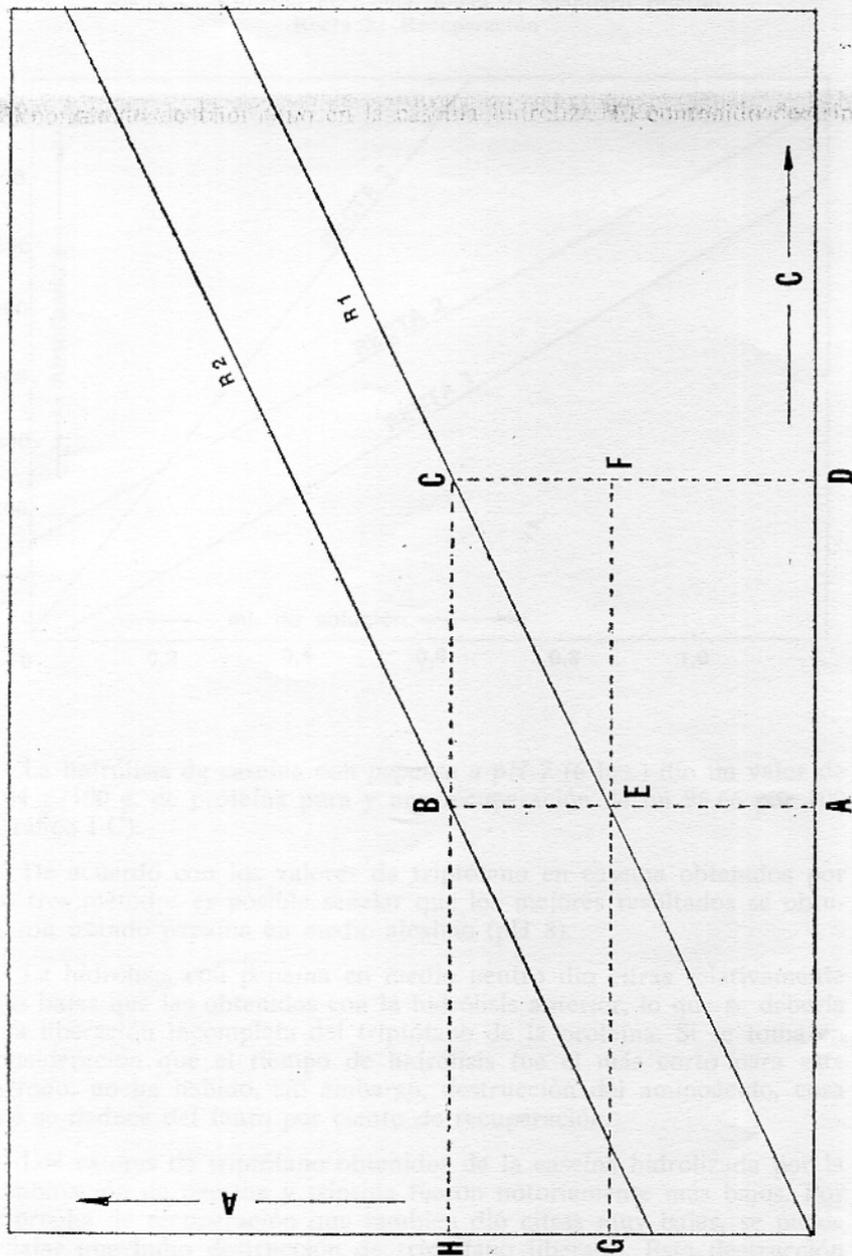
Para el cálculo de AD se utilizaron las ecuaciones ajustadas de las respectivas rectas.

2. *Recuperación.*

A partir del contenido de triptófano en la proteína y de la ecuación de la recta problema se predijo el valor teórico de los parámetros de la recta de recuperación. Comparando las pendientes de ésta y de aquella obtenida experimentalmente, se calculó un índice η , denominado de recuperación, y cuya expresión es:

$$\eta = \frac{\beta \text{ exp.}}{\beta \text{ exp.}} 100$$

GRAFICO 1.—Diagrama explicativo del procedimiento de cálculo en el método del standard interno

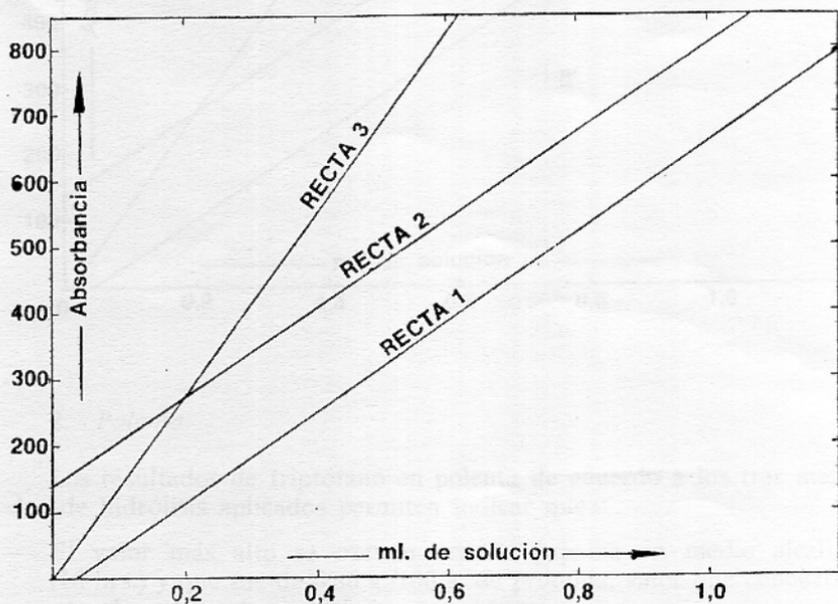


DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

1. *Caseína.*

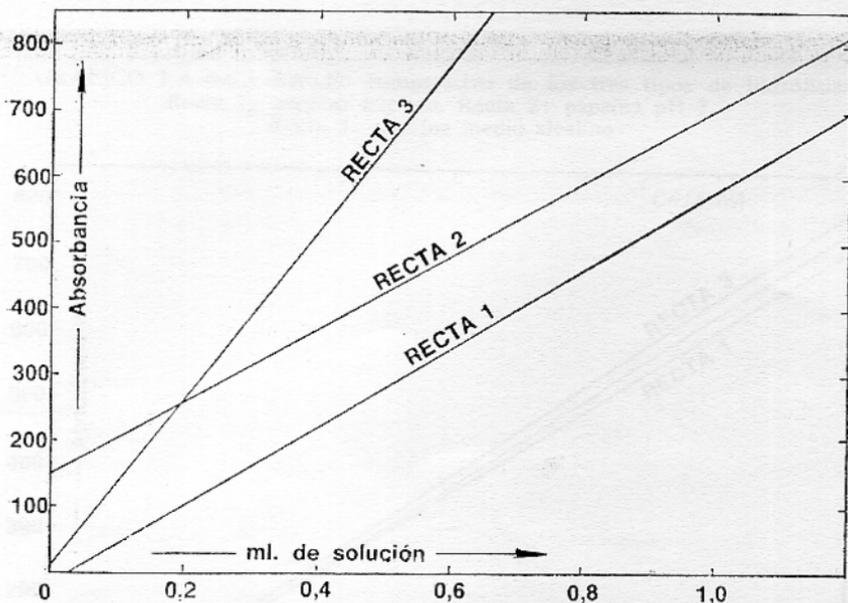
El contenido de triptófano en la caseína hidrolizada con *papaína en medio alcalino* (pH 8,16 hrs.) resultó ser de 1,51 g./100 g. de proteína, valor que es semejante al señalado por varios autores. La recuperación del triptófano agregado fue de 96,73 por 100. Este resultado indicaría que en las condiciones de trabajo, pH, temperatura, tiempo de acción de otros aminoácidos libres presentes, no provocan destrucción del triptófano (Gráfico I A).

GRAFICO 1A.—Hidrólisis de caseína con papaína en medio alcalino (16 hrs.).
Recta 1: Solución Problema. Recta 2: Standard Interno.
Recta 3: Recuperación



Para la caseína hidrolizada con *papaína y tripsina*, se obtuvo un valor de triptófano de 0,89 g./100 g. de proteína pura. La recuperación en este caso alcanzó sólo el 69 por 100, lo que indica que hubo destrucción del aminoácido librado durante el proceso (Gráfico I B).

GRAFICO 1B.—Hidrólisis de caseína con pepsina y tripsina
 Recta 1: Solución Problema. Recta 2: Standard Interno.
 Recta 3: Recuperación



La hidrólisis de caseína con *papaína* a pH 7 (6 hrs.) dio un valor de 1,44 g./100 g. de proteína pura y una recuperación de un 96,66 por 100 (Gráfico I C).

De acuerdo con los valores de triptófano en caseína obtenidos por los tres métodos es posible señalar que los mejores resultados se obtuvieron usando *papaína* en medio alcalino (pH 8).

La hidrólisis con *papaína* en medio neutro dio cifras relativamente más bajas que las obtenidas con la hidrólisis anterior, lo que se debería a la liberación incompleta del triptófano de la proteína. Si se toma en consideración que el tiempo de hidrólisis fue el más corto para este método, no ha habido, sin embargo, destrucción del aminoácido, cosa que se deduce del tanto por ciento de recuperación.

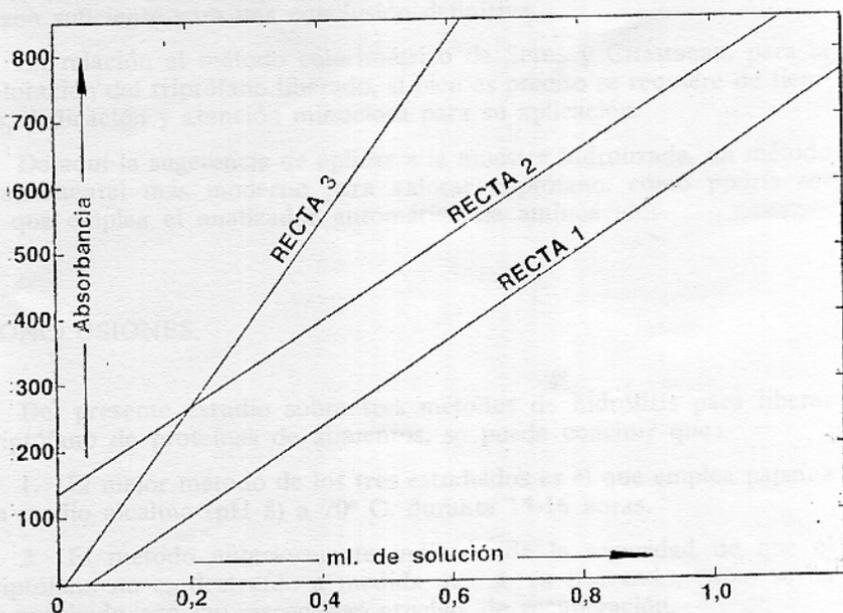
Los valores de triptófano obtenidos de la caseína hidrolizada por la combinación de pepsina y tripsina fueron notoriamente más bajos. Por la prueba de recuperación que también dio cifras muy bajas, se puede señalar que hubo destrucción de triptófano liberado. Esta destrucción

podría deberse a: 1.º Al medio ácido durante su primera etapa (H_2SO_4 0.1N) y 2.º Al largo tiempo de hidrólisis (72 hrs.) a pH 8.4.

GRAFICO 1C.—Hidrólisis de caseína con papaína en medio neutro.

Recta 1: Solución Problema. Recta 2: Standard Interno.

Recta 3: Recuperación



2. Polenta.

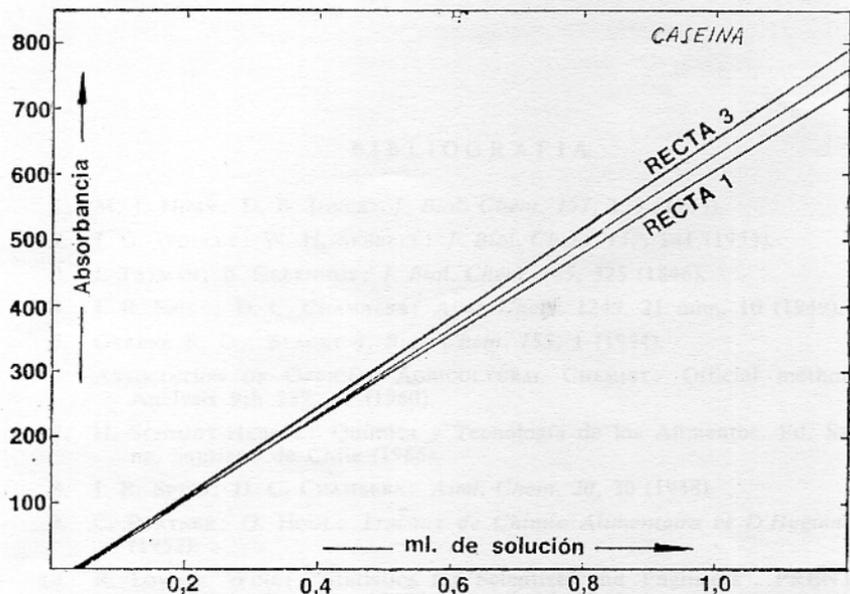
Los resultados de triptófano en polenta de acuerdo a los tres métodos de hidrólisis aplicados permiten indicar que:

- El valor más alto se obtuvo usando papaína en medio alcalino (16 hrs.) y que fue de 0,86 g./100 g. de proteína, valor que concuerda con el encontrado en trabajos anteriores,
- Al usar papaína en medio neutro, el valor fue semejante al anterior 0,83 por 100.
- El contenido más bajo se logró con la hidrólisis que empleó pepsina-tripsina, que dio un valor de 0,54 por 100.

Si se comparan los valores para polenta, con los de caseína, es im-

portante señalar que, es el mismo método el que da los mejores resultados, tanto para proteína pura (caseína) como para las proteínas que forman parte de los cereales (polenta); razón por la cual el método se hace más general.

GRAFICO 1 A-B-C.—Estudio comparativo de los tres tipos de hidrólisis.
 Recta 1: pepsina tripsina. Recta 2: papaína pH 7.
 Recta 3: papaína medio alcalino



3. Almejas.

En el caso de las almejas, también al igual que en los dos casos anteriores, se encontró que la hidrólisis con papaína en medio alcalino da el valor más alto de triptófano; 0,67 g./100 g. de proteína, lo que hace que el método pueda aplicarse a proteínas puras, proteínas de cereales y en proteínas animales.

A diferencia de los casos anteriormente discutidos, llama la atención que en las almejas, la hidrólisis con pepsina y tripsina da un valor más alto que con papaína a pH 7; 0,48 por 100 y 0,39 por 100, respectivamente.

Este método de papaína a pH 7 se ha usado hasta el presente sólo

para cereales y no usa activador de la papaína. Si bien ha dado buenos resultados para polenta en este trabajo y para otros cereales indicados en la literatura, puede que sea insuficiente para liberar la totalidad del triptófano de las proteínas en el caso de alimentos animales. Sería aconsejable estudiar este método en los alimentos recién mencionados, pues la investigación hecha de este método en almejas, es el primero realizado hasta el presente y aunque no dio resultados satisfactorios, no es razón suficiente para una conclusión definitiva.

En relación al método colorimétrico de SPIES y CHAMBERS, para la valoración del triptófano liberado, si bien es preciso se requiere de tiempo, dedicación y atención minuciosa para su aplicación.

De aquí la sugerencia de aplicar a la muestra hidrolizada, un método instrumental más moderno para valorar triptófano, como podría ser el que emplea el analizador automático de aminoácidos.

CONCLUSIONES.

Del presente estudio sobre tres métodos de hidrólisis para liberar triptófano de proteínas de alimentos, se puede concluir que:

1. El mejor método de los tres estudiados es el que emplea papaína en medio alcalino (pH 8) a 70° C. durante 14-16 horas.
2. El método anteriormente indicado da la seguridad de que el triptófano no es destruido a medida que se va liberando, como se ha comprobado con las respectivas pruebas de recuperación.
3. La técnica propuesta para este método presenta la ventaja de requerir equipos corrientes en los laboratorios de control y análisis de alimentos, y tiempo de hidrólisis relativamente corto.
4. Las cifras obtenidas para el triptófano de las proteínas hidrolizadas por este método son semejantes a las consideradas por varios autores como las más exactas.
5. De este estudio se puede deducir que el método de hidrólisis con papaína en medio alcalino, dio resultados muy satisfactorios tanto en caseína como en las proteínas de polenta y almejas. Esto coincide con las indicaciones de la literatura (12) sobre la determinación de muchas otras proteínas, tanto animales como vegetales, por lo cual este método es recomendable para su aplicación general.
6. Los resultados que se obtienen por hidrólisis con papaína en medio neutro parecen depender de la naturaleza de la proteína a hidrolizar.

7. No sería aconsejable la aplicación de la hidrólisis con pepsina y tripsina, pues da valores notablemente más bajos, además presenta el inconveniente de emplear muchos días (4 días) y fácil contaminación durante las etapas que se realizan en el período previo y la determinación colorimétrica.

8. La utilización del procedimiento del standard interno permitió minimizar el efecto de los errores de medición.

BIBLIOGRAFIA

1. M. J. HORN; D. B. JONES: *J. Biol. Chem.* 157, 153 (1945).
2. J. G. WOLLEY; W. H. SEBRELL: *J Biol. Chem.* 157, 141 (1954).
3. I. TATMAN; B. GREENHUT: *J. Biol. Chem.* 165, 325 (1846).
4. J. R. SPIES; D. C. CHAMBERS: *Anal. Chem.* 1249, 21 núm. 10 (1949).
5. GREENE R. D.; BLACK: *J. Biol. Chem.* 155, 1 (1944).
6. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMIST: Official methods of Analysis 9th 287, 43 (1960).
7. H. SCHMIDT-HEBBEL: *Química y Tecnología de los Alimentos*. Ed. Salesiana, Santiago de Chile (1966).
8. J. R. SPIES; D. C. CHAMBERS: *Anal. Chem.* 20, 30 (1948).
9. C. PORTNER; O. HOGL: *Travaux de Chimie Alimentaire et D'Hygiene*, 43, (1952).
10. R. LOWELL WINE: "Statistics for Scientists and Engineers". PRENTICE-HALL, Inc. Englewood Cliffs, N. Y. (1964).
11. Sir RONALD A. FISCHER; FRANK YATES: "Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research". Sixth ed. OLIVER AND BOYD, Tweeddale Court London 39 A Welbeck Street, W. 1 (1964).
12. PENNACCHIOTTI, M. I.: Estudio del valor aminoácido de leguminosas chilenas. Tesis para optar al título de profesor extraordinario de Bromatología. Universidad de Chile (1967).