

TRABAJOS DE INVESTIGACION

El valor nutritivo de las harinas de pescado y su relación con el contenido en lisina y metionina disponibles

MARÍA E. SAMBUCETTI¹ Y JUAN C. SANAHUJA

Departamento de Bromatología y Nutrición Experimental
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires

RESUMEN

Se presentan los resultados obtenidos en el análisis de varias muestras de concentrados proteicos de pescado, fabricados en la Argentina para uso animal, así como la de una muestra para uso humano preparada en Quinteros (Chile). En todos los casos se determinó el contenido en proteínas (N X 6.21), el porcentaje de lisina y metionina, total y disponible, el de cistina y la utilización proteica neta (NPU).

Los resultados obtenidos señalan que en todas las muestras analizadas el contenido en metionina total es muy similar, encontrándose en cambio diferencias significativas en los valores relativos a la disponibilidad de este aminoácido.

El NPU se correlaciona mejor con el contenido en metionina disponible que con el de metionina total.

Los resultados obtenidos permiten señalar que los factores que influyen el grado de disponibilidad de metionina y lisina son diferentes: la metionina aparece afectada principalmente por la temperatura del proceso; en cambio, la lisina sería afectada no sólo por la temperatura, sino también por otros factores: humedad, presencia de grupos carbonilos, etc.

¹ Este trabajo forma parte de las investigaciones que la Bioquímica María E. Sambucetti lleva a cabo para optar al grado de Doctora en Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Buenos Aires.

Recibido: 5-1-1969

INTRODUCCION

Actualmente se halla bien demostrado que el valor nutritivo de una proteína, calculado en base a su composición en aminoácidos, no siempre coincide con el determinado por métodos biológicos. Esta diferencia se acentúa en el caso de proteínas que han sido sometidas a determinados procesos tecnológicos que disminuyen el grado de aprovechamiento de algunos de sus aminoácidos esenciales.

Varias son las teorías que se han propuesto para explicar este hecho. Lea y Hannan (1), Mauron y Mottu (2, 3) y Evans y Butts (4) han estudiado los factores que influyen sobre la disponibilidad de los aminoácidos y en forma especial la reacción que afecta a la lisina cuando se halla en determinadas condiciones físico-químicas en presencia de glúcidos o lípidos. Como es sabido, el grupo ϵ -amino de este aminoácido reacciona con los grupos carbonilos reductores formando un complejo que no es atacado por las enzimas digestivas. Esta reacción, al parecer, es la responsable del menor grado de aprovechamiento de la lisina observable en algunos alimentos procesados.

Menos esclarecidos se hallan los mecanismos por los cuales es afectada la disponibilidad de otros aminoácidos.

Así, en el caso de la metionina, Donoso y col. (5) sugirieron la formación de compuestos azufrados absorbibles, pero no utilizables, para la síntesis proteínica. Horn y col. (6), por su parte, no lograron explicar la marcada disminución que se produce en la disponibilidad de los aminoácidos azufrados en alimentos ricos en glúcidos. Miller y col. (7) tampoco pudieron encontrar ningún mecanismo químico específico que permitiese explicar la menor disponibilidad de la metionina que observaron en algunos alimentos ricos en proteínas luego de sufrir determinados tipos de procesado.

Todas estas investigaciones estimularon paralelamente la búsqueda de métodos analíticos que permitiesen establecer el grado de disponibilidad o aprovechamiento de los aminoácidos en las proteínas alimenticias. Carpenter y col. (8, 9); en 1955, publicaron un método químico utilizable para la lisina. Esta técnica, que sufrió sucesivas modificaciones (10) (11), permite conocer el grado de disponibilidad de ese ami-

noácido mediante la reacción de sus grupos ϵ -amino libres con fluordinitrobenceno.

Para los otros aminoácidos sólo se dispone hasta el presente de métodos microbiológicos especialmente adaptados a esa finalidad. J. Ford (12) aprovechó la propiedad del *Streptococcus zymogenes* de poseer un marcado poder proteolítico, que le permite desarrollarse a expensas de una proteína intacta o ligeramente hidrolizada como única fuente exógena de nitrógeno. Como el grado de crecimiento de este microorganismo es dependiente de la presencia en la proteína de cierto aminoácidos: metionina, leucina, isoleucina, arginina, histidina, triptofano y valina, aquella propiedad permite ser aplicada para determinar la disponibilidad de estos aminoácidos en las proteínas alimenticias.

En este trabajo hemos determinado en qué medida la disponibilidad de la metionina y la lisina afecta al valor nutritivo de las harinas de pescado, cuyo estudio comenzamos previamente (13). Los resultados obtenidos revelaron la existencia de un alto grado de correlación entre el valor nutritivo de las mismas y su contenido en metionina disponible.

PARTE EXPERIMENTAL

Muestras: Material analizado

Se analizaron tres clases de harinas de pescado comerciales para uso animal, una muestra de harina de pescado para uso humano y una harina de merluza preparada experimentalmente en nuestro laboratorio por liofilización. El origen, la denominación de las muestras, así como también las materias primas usadas para su fabricación, se detallan a continuación.

- Harina D : Origen argentino (Mar del Plata), fabricada a base de merluza, para uso animal.
- Harina J : Origen argentino (Mar del Plata), fabricada a base de merluza, para uso animal.
- Harina I : Origen argentino (Mar del Plata), fabricada a base de anchoíta, para uso animal.
- Harina B₂ : Origen chileno (Quinteros), fabricada a base de merluza, para consumo humano.
- Harina ML: Origen argentino (Mar del Plata), obtenida

de "filet" de merluza, experimentalmente, por liofilización en nuestro laboratorio.

El procedimiento de fabricación fue similar para las harinas D, J, I: el pescado fue cocido a 93°C y luego prensado y secado por vapor indirecto, siendo finalmente molido.

Determinaciones efectuadas

Se determinó en todos los casos el valor nutritivo, el contenido proteínico, el contenido en lisina total y disponible, en metionina total y disponible y en cistina total.

METODOS

- a) *Valor nutritivo*: El valor nutritivo se determinó por el método de Miller y Bender (14) (Utilización Proteica Neta - NPU). Para la determinación del N corporal se utilizó la ecuación $y=2.76+0.0293X$, que expresa la relación N/H₂O en función de la edad de los animales. Esta ecuación ha sido determinada experimentalmente por nosotros para las ratas de la cepa Wistar de nuestro laboratorio con las que se realizaron las experiencias.
- b) *Lisina total*: Se determinó por el método microbiológico, según la técnica de Cottely y Basualdo (15).
- c) *Lisina disponible*: Se determinó por el método de Carpenter (10) con la modificación de Rao (11).
- d) *Cistina*: Se valoró por el método de Vassel (16).
- e) *Metionina total y disponible*: Se determinaron por el método microbiológico de J. E. Ford (12) modificado² de acuerdo a la siguiente técnica:

Las muestras fueron preparadas de acuerdo a la técnica original, pero usando como ayuda hidrolizante para la determinación del aminoácido disponible una solución de pepsina (1:10.000) al 2% en CIH 0.3N, seguido de una incubación a 56°C durante 3 horas (17). Se llevó luego a un volumen de 100 ml con H₂O destilada, conservándose los líquidos así obtenidos a -6°C. Antes de procederse a la determinación se ajustó el pH a 7.9, valor que demostró ser el más adecuado para la cepa utilizada.

² M. E. Sambucetti y Oscar A. Sudera. Comunicación personal.

Técnica: En tubos calibrados Baush & Lomb se colocaron por duplicado las siguientes cantidades de una solución standard de 1-metionina (20 μg por ml), 0; 0.5; 1; 1.5; 2 y 2.5 ml. Se agregó luego 3 ml de medio de cultivo en cada tubo y se completó con agua destilada hasta un volumen final de 7 ml. El volumen final fue ajustado de tal manera de poder realizar las lecturas en un espectrofotómetro Baush & Lomb Spectronic 20. Se realizó la misma operación con las muestras diluidas 1:10. En aquellos casos en que se suponía que la disponibilidad estaba muy disminuida, se usaron diluciones de 1:5 para la determinación del aminoácido disponible u otra que se adecuara más al standard. Una vez completado el volumen, los tubos se autoclavaron a vapor fluente durante 20 minutos.

Inóculo: Se usaron cultivos de 24 horas de *Streptococcus zymogenes* NCDO 592 en caldo para inóculo DIFCO. El repique se hizo a partir del cultivo stock en medio sólido hecho con medio basal suplementado con 150 mg de caseína, 15 mg de glutamato de sodio y 1.5 g de agar cada 100 ml. El cultivo de 24 hs se centrifugó decantándose el sobrenadante. El residuo se resuspendió en 10 ml de solución fisiológica estéril y de éstos se tomaron 5 ml que se llevaron a 100 ml con la misma solución. De esta suspensión se sembró, con jeringa especial, una gota en cada tubo de los standard y de las muestras, siguiéndose luego con la técnica original. El cálculo se realizó de acuerdo al sistema logarítmico (15) y los valores obtenidos con los tubos de predigestión enzimática se compararon con los obtenidos para el aminoácido total determinado según la técnica original previa hidrólisis ácida. Se obtuvo así la disponibilidad porcentual de la metionina.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos para las determinaciones de metionina total y disponible figuran en la Tabla 1.

Los valores de metionina total fueron similares en todas las harinas analizadas, entre 3.26 y 3.87 g/100 g de proteínas para las muestras I y D, respectivamente.

En cambio, se encontraron diferencias en el grado de disponibilidad: como puede observarse, la mayor disponibilidad

TABLA 1

CONTENIDO EN METIONINA TOTAL Y DISPONIBLE DE LAS
HARINAS DE PESCADO ANALIZADAS

Harinas	Proteínas % (N×6.25)	METIONINA		Disponibilidad %
		Total	Disponibile	
		g/16 g de N		
ML (3)	73.70	3.48 ± 0.33 ¹	3.48 ± 0.29	100.0
J (2)	66.60	3.47 ± 0.07	2.60 ± 0.02 ²	75.0
D (2)	66.10	3.87 ± 0.07	2.87 ± 0.02 ²	74.5
B ₂ (4)	76.75	3.39 ± 0.37	2.31 ± 0.06 ²	68.0
I (4)	61.70	3.26 ± 0.04	2.25 ± 0.02 ²	69.0

¹ Media ± D.S. de la media.

² Diferencia con el aminoácido total, altamente significativa ($p < 0.01$). Las cifras entre paréntesis indican el número de determinaciones efectuadas sobre cada muestra.

correspondió a la harina ML, preparada en el laboratorio por liofilización, en la cual el 100% del total de metionina se halla disponible. Valores inferiores se encontraron en las harinas de merluza para consumo animal, J y D, con un 75 y 74.5% de la disponibilidad, respectivamente, y en la I, fabricada a base de anchoíta, con una disponibilidad de sólo el 69%. La harina para consumo humano B₂ arrojó un valor inferior aún: 68%.

En la Tabla 2 se presenta el contenido en cistina de cada una de las harinas analizadas. Los valores oscilaron entre 1.61 y 1.96 g/100 g de proteína, valores correspondientes a las harinas ML y D, respectivamente.

En la Tabla 3 se pueden observar los valores de lisina total y disponible en las harinas analizadas.

Los valores más elevados de lisina total correspondieron a la harina ML con 11.10 g/100 g de proteína, siendo su disponibilidad del 74.5%. En las otras harinas se obtuvieron valores de lisina total menores, que oscilaron entre 9.75 y 8.86 g/100 g de proteína, que correspondieron a las harinas J y D. También resultaron inferiores a los de la harina ML los porcentajes de disponibilidad, que oscilaron entre 70.0 y 63.3% para

TABLA 2

CONTENIDO EN CISTINA DE LAS HARINAS DE PESCADO ANALIZADAS

Harinas	Cistina
	g/16 g de N
ML (3)	1.96 ± 0.05 ¹
J (4)	1.96 ± 0.05
D (2)	1.61 ± 0.09
B ₂ (2)	1.94 ± 0.12
I (2)	1.80 ± 0.02

¹ Media ± D.S. de la media.

Las cifras entre paréntesis indican el número de determinaciones efectuadas sobre cada muestra.

TABLA 3

CONTENIDO EN LISINA TOTAL Y DISPONIBLE DE LAS HARINAS DE PESCADO ANALIZADAS

Harinas	LISINA		Disponibilidad %
	Total	Disponible	
	g/16 g de N		
ML (2)	11.10 ± 0.00 ¹	8.25 ± 0.00 ²	74.5
J (4)	9.75 ± 0.15	6.60 ± 0.40 ³	67.7
D (3)	8.86 ± 0.58	7.20 ± 0.78	81.3
B ₂ (3)	9.63 ± 0.32	6.77 ± 0.15 ³	70.0
I (2)	8.90 ± 0.27	5.63 ± 0.06 ³	63.3

¹ Media ± D.S. de la media.

² Diferencia con el aminoácido total, altamente significativa ($p < 0.01$).

³ Diferencia con el aminoácido total probablemente significativa ($0.1 < p > 0.05$).

Las cifras entre paréntesis indican el número de determinaciones efectuadas sobre cada muestra.

TABLA 4

N.P.U. Y PORCENTAJE DE LOS REQUERIMIENTOS DE LISINA Y AMINOACIDOS AZUFRADOS DE LA RATA QUE CUBREN LAS HARINAS DE PESCADO ANALIZADAS

Harinas	N.P.U.	Cis.+Met. Totales	Cis.+Met. Disponible	Requerimientos cubiertos por Aminoácidos Azufrados ¹		Lisina Disponible	Requerimientos cubiertos por la Lisina disponible ²
				Aa. Totales	Aa. Dispon.		
		g/16 g de N		%		g/16 g de N	%
ML	76.3	5.44	5.44	87.7	87.7	8.25	100.0
J	70.5	5.43	4.66	87.5	75.0	6.60	92.0
D	70.0	5.48	4.48	84.4	72.3	7.20	100.0
B ₂	68.6	5.33	4.25	86.0	68.5	6.77	94.0
I	65.0	5.06	4.05	81.6	65.6	5.63	78.5

¹ Requerimientos de la rata: 6.2 g/16 g N, Allison (18)

² Requerimientos de la rata: 7.2 g/16 g N, Allison (18).

las harinas B₂ e I, respectivamente. Sólo la harina D presentó una disponibilidad superior: 81.3%.

En la Tabla 4 se señalan los valores del NPU de las muestras analizadas y el porcentaje que dé los requerimientos de lisina y aminoácidos azufrados para la rata cubren las harinas analizadas, en una dieta que contenga 10% de proteínas. Puede observarse que en todos los casos resulta limitante el total de aminoácidos azufrados disponibles, que cubren sólo entre el 65.6% y el 87.7% de los requerimientos (dietas I y ML, respectivamente). En cambio, la lisina disponible cubre entre el 82% para la harina I y el 100% en las harinas ML y D.

Como es de prever de acuerdo a esos valores, no existe correlación entre el NPU y el porcentaje de los requerimientos de lisina que cubre la lisina disponible de las muestras en estudio; en cambio, ese valor es altamente significativo ($r=0.96$) cuando se correlaciona el NPU con el porcentaje de los requerimientos de aminoácidos azufrados, que cubren los aminoácidos azufrados disponibles de las distintas harinas, o simplemente con el contenido de metionina disponible (Fig. 1). La correlación entre el NPU y el contenido de metionina disponible también es altamente significativa ($r=0.87$) (Fig. 2).

DISCUSION

En trabajos anteriores hemos ya señalado la falta de correlación entre el valor del NPU y el contenido de lisina disponible en las harinas de pescado (13), que se confirman por los resultados aquí presentados. A una conclusión similar llegó Yáñez y col. (19) trabajando con harinas de valor biológico semejante al de las analizadas por nosotros. Esta falta de correlación entre aquellos valores nos llevó a determinar la disponibilidad de la metionina, aminoácido cuyo aprovechamiento puede también resultar afectado por el tipo de procesado tal como lo señala la literatura (5) (6).

El mecanismo por el cual se deteriora la disponibilidad de este aminoácido no se halla aún suficientemente esclarecido. Donoso y col. (5) postularon la formación de cierto tipo de compuestos de azufre absorbibles, que no serán utilizables para la síntesis proteica. Horn y col. (6) utilizaron sis-

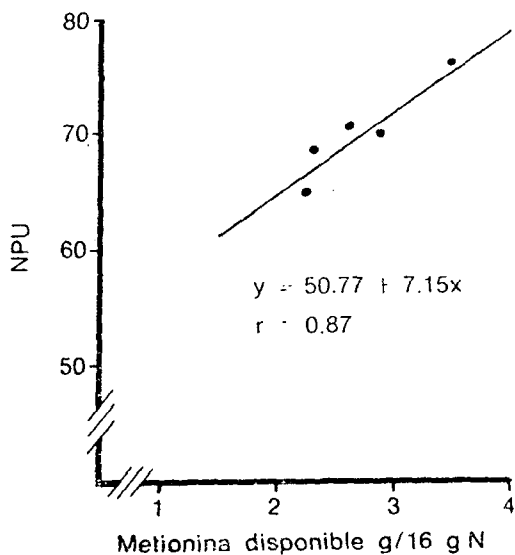


Figura 1

Relación entre NPU y metionina disponible de las harinas analizadas.

$$R = \frac{\text{Metionina disponible} + \text{cistina}}{6.2} \times 100$$

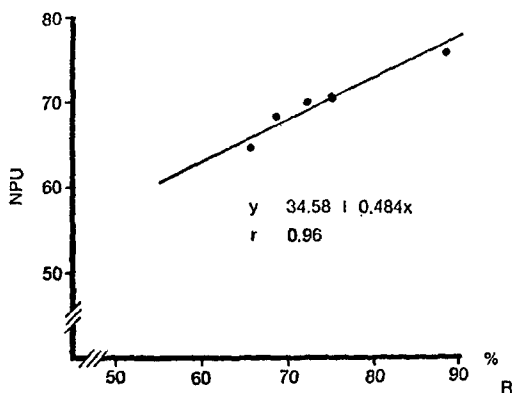


Figura 2

Relación entre el NPU y el porcentaje de los requerimientos de amino ácidos azufrados para la rata, cubiertos por la suma de cistina y metionina disponible.

temas artificiales de metionina y glucosa, pero no lograron explicar la marcada disminución que se produce en la disponibilidad de aquel aminoácido en alimentos ricos en glúcidos, ya que el complejo aislado, 1-deoxi 1-metionina D-fructosa, en el cual la metionina resultó inaprovechable en distinto grado, para diferentes microorganismos, sólo se podría formar cuando el aminoácido se encontrara en posición terminal de la cadena peptídica. Este compuesto sería similar a los formados en las experiencias de Miller y col. (7) cuando determinaron los cambios sufridos en bacalao desecado, sometido a diferentes condiciones de humedad y temperatura en presencia de glucosa. Los tratamientos experimentales a que estos autores sometieron las muestras en ausencia de glucosa fueron los que en sus condiciones aparecían como más similares a los que habían sufrido las harinas de pescado por nosotros analizadas. Miller comprobó que en esas condiciones la metionina, como así también el triptofano, la leucina y la lisina, disminuyeron su disponibilidad en proporción semejante y en relación con las condiciones de temperatura y humedad a las que fue sometida la proteína. Partiendo de esta última evidencia, no encontró "razón para postular ningún mecanismo específico para la metionina", ya que aminoácidos de cadena alifática, considerada inerte, como la leucina, sufrieron el proceso con la misma intensidad que aquellos que poseen grupos reactivos. Una explicación general de los cambios que sufren por calentamiento las proteínas en alta concentración, como sería el caso de las harinas de pescado, ha sido dada por Waterworth (20), que sugiere la posibilidad de formación de uniones intra e intermoleculares entre los aminoácidos. Tales uniones impedirían el ataque enzimático y la liberación de estos aminoácidos, incluyendo a aquellos no comprometidos directamente en la reacción.

Pese a esta falta de conocimiento del proceso químico que afecta a la metionina, queda claro, sin embargo, a través de las experiencias realizadas, que el valor biológico de las harinas de pescado, cuyos aminoácidos limitantes son los azufrados, es inferior aun al que podría calcularse en base al contenido total de los mismos. Este hecho obedecería a la disminución de la disponibilidad durante el procesado y estacionamiento.

Los resultados que hemos obtenido en nuestro trabajo apo-

yan esta presunción, pues en la totalidad de las harinas analizadas, si bien no se observaron diferencias en el contenido total de cistina ni de metionina, lo cual indicaría que el tratamiento tecnológico no ha sido de severidad extrema, apareció, sin embargo, disminuida en diferente proporción la disponibilidad de este último aminoácido, concurrentemente con las variaciones del valor biológico.

Como en estas harinas habíamos comprobado también una disminución en el grado de aprovechamiento de la lisina (13), nos pareció de importancia establecer si existe o no una correlación entre la disminución del aprovechamiento de los mencionados aminoácidos, máxime teniendo en cuenta que los procesos por los cuales se produce esa inactivación de ambos parecen no ser idénticos. En las Tablas 1 y 3 se puede observar que en las harinas de pescado obtenidas por procesos industriales, la disponibilidad porcentual de ambos aminoácidos es semejante, aunque en mayor grado en la muestra B₂ que en las harinas I, D o J.

Llama la atención el relativamente bajo grado de disponibilidad de la lisina y metionina encontrado en la muestra B₂, elaborada para consumo humano. Si se tiene en cuenta que las condiciones de elaboración de esta harina, en especial las relacionadas con la temperatura de secado, son mejores que las de las otras harinas para uso animal, la menor disponibilidad de ambos aminoácidos debe quizás imputarse al proceso de desgrasado, proceso al que únicamente esta muestra se vio sometida.

La similitud del grado de deterioro de estos dos aminoácidos observada en todas las muestras mencionadas coincide con los resultados que Miller y col (7) obtuvieron en sus experiencias en bacalao desecado, calentado a temperaturas superiores a 85°C. En cambio, en la muestra ML, correspondiente a la harina de merluza liofilizada, en cuya preparación la temperatura no excedió de los 70°C, los cambios sufridos en la disponibilidad de ambos aminoácidos fue diferente: para la metionina la disponibilidad se mantuvo en el 100% de su valor total; en cambio, la lisina presentó una disponibilidad sólo del 74.5%. El valor obtenido para la metionina —100% de aprovechamiento— coincide también con el publicado por los autores citados cuando trabajaban a temperaturas inferiores a 85°C.

Esta diferencia de comportamiento relacionada con la temperatura confirmaría que los mecanismos involucrados en las reacciones que afectan la disponibilidad de estos dos aminoácidos son diferentes; al parecer, para la metionina serían sólo dependientes de la temperatura y, en cambio, para la lisina se hallarían relacionados no sólo a este factor, sino también a otros que podrían ser la humedad, presencia de grupos carbonilos, etc.

De lo señalado por Miller y col. (7) surge la posibilidad de calcular la disponibilidad de la metionina sobre la base de la medida de la disponibilidad de lisina, de fácil determinación por métodos químicos. Los resultados aquí presentados señalan que ello puede ser erróneo en muestras procesadas a baja temperatura, en las que, como se ha visto, no existe correlación entre la disminución de la disponibilidad de estos dos aminoácidos.

Si bien los porcentajes de lisina y metionina aprovechables resultaron ser similares en las muestras elaboradas industrialmente, el elevado contenido de lisina total que poseen estas harinas, hace que en ningún caso, pese a su disponibilidad disminuida, este aminoácido se transforme en el limitante del valor biológico de la proteína. En cambio, el contenido total de aminoácidos azufrados (metionina total más cistina) aun en la muestra liofilizada en que el valor es máximo, apenas alcanza a cubrir los requerimientos de la rata. Como el contenido de los otros aminoácidos esenciales supera los correspondientes requerimientos, tal como lo comprobamos en nuestros trabajos anteriores (13), resulta claro que los aminoácidos azufrados son los limitantes del valor biológico. Sin embargo, si se comparan el contenido total de estos aminoácidos y el NPU de las harinas (Tabla 4), se observa una falta de correlación entre esos valores, conclusión similar a la que llegaron Miller y Carpenter (21).

En cambio (Fig. 1), cuando se correlaciona el NPU ya sea con el porcentaje de los requerimientos de aminoácidos azufrados cubiertos por la suma de metionina disponible y cistina, o con el total de metionina disponible (Fig. 2), los coeficientes de correlación entre esos valores son muy elevados. Ese alto grado de correlación permite afirmar que el contenido en metionina disponible es el factor limitante del valor biológico de las harinas de pescado analizadas.

La importancia que tienen los concentrados proteínicos de pescado para aliviar el problema del déficit de proteínas en la alimentación es permanentemente destacada desde todos los sectores. Los resultados obtenidos en este trabajo señalan que, para lograr un máximo efecto suplementario con esta fuente de proteínas, las harinas de pescado deben elaborarse a través de cuidadosos y apropiados procesos tecnológicos que afectan, en el menor grado posible, a sus aminoácidos esenciales, en especial lisina y metionina, que paradójicamente son los aminoácidos cuyo déficit en la alimentación alcanza a mayor número de personas en el mundo.

SUMMARY

Nutritive value of fish protein concentrates: its correlation with the available methionine and lysine content

In this paper were presented the results obtained in the analysis of some fish protein concentrates (FPC) for animal use, manufactured in Argentina. A sample manufactured in Quinteros (Chile) for human use was also studied. Nitrogen content, NPU, total and available lysine and methionine, and cystine were determined in all samples.

The results obtained reveals that in all the FPC analyzed total methionine content is very similar, being on the contrary, some important differences in the availability of this aminoacid.

The NPU correlates better with the percentage of available methionine that with the total methionine content.

On the basis of the results obtained it was assumed that the factors that influence the degree of availability of methionine and lysine are different: the former would be affected, principally by the temperature of processing and the latter, not only by temperature but also by other factors: humidity, the presence of carbonyl compounds, etc.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Lea, C. H. & R. S. Hennan.—Studies of the reaction between proteins and reducing sugars in the "dry" state. *Biochim. Biophys. Acta*, 3: 313, 1949.
- (2) Mauron, J., F. Mottu, E. Bujard & R. H. Egli.—The availability of lysine, methionine and tryptophan in condensed milk and milk powder. In vitro digestion studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, 59: 433, 1955.
- (3) Mauron, J. & F. Mottu.—Relationship between in vitro lysine availability and in vivo protein evaluation in milk powders. *Arch. Biochem. Biophys.*, 77: 312, 1958.
- (4) Evans, R. J. & H. A. Butts.—Inactivation of aminoacids by auto-claving. *Science*, 109: 569, 1949.

- (5) Donoso, G., O. A. M. Lewis, D. S. Miller & P. R. Payne.—Effect of heat treatment on the nutritive value of proteins: chemical and balance studies. *J. of Sc. of Food Agric.*, 3: 192, 1962.
- (6) Horn, J. M., H. Lichtenstein & M. Womack.—Availability of amino acids. A methionine fructose compound and its availability to microorganisms and rats. *J. of Agric. Food Chem.*, 16: 741, 1968.
- (7) Miller, E. L., K. J. Carpenter & C. K. Milner.—Availability of sulphur amino acids in protein foods. 3. Chemical and nutritional changes in heated cod muscle. *Br. J. Nutr.*, 19: 547, 1965.
- (8) Carpenter, K. J. & G. M. Ellinger.—The estimation of "available" lysine in protein concentrates. *Biochem. J.*, 61: XI, 1955.
- (9) Carpenter, K. J. & G. M. Ellinger.—Protein quality and "available lysine" in animal products. *Poultry Sci.*, 34: 1451, 1955.
- (10) Carpenter K. J.—Available lysine in protein concentrates. *Voeding.*, 19: 152, 1958.
- (11) Raghavendar Rao, S., F. L. Carter & V. L. Frampton.—Determination of available lysine in oilseed meal proteins. *Anal. Chem.*, 35: 1927, 1963.
- (12) Ford, J. E.—A microbiological method for assessing the nutritional value of proteins. 2. Measurement of available methionine, leucine, isoleucine, arginine, histidine, tryptophan and valine. *Brit. J. Nutr.*, 14: 485, 1960.
- (13) Sambucetti, M. E. & J. C. Sanahuja.—Estudio del valor nutritivo de las harinas de pescado de origen argentino, usadas en la alimentación animal. *Revista de Investigaciones Agropecuarias, INTA, Serie 1, Biología y Producción Animal, Vol. IV, N° 3, 1967. CARPAS 14/D. Tec. 12. Río de Janeiro, 1968.*
- (14) Miller, D. S. & A. E. Bender.—The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. *Br. J. Nutr.*, 9: 382, 1955.
- (15) Cottely, N. S. de & R. Basualdo.—Aplicación del análisis microbiológico a la determinación de aminoácidos en las proteínas alimenticias. I Jornada de Microbiología, Bs. As., 1968.
- (16) Vassel, B.—Método colorimétrico para la determinación de cistina y de cisteína. *J. Biol. Chem.*, 140: 323, 1941.
- (17) Ford, J. E.—A microbiological method for assessing the nutritional value of proteins. *Br. J. Nutr.*, 18: 449, 1964.
- (18) Allinson, J. B., R. W. Wannemacker, E. Middleton & T. Spoerlein. Dietary protein requirements and problems in supplementation. *Food Tech.*, 13: 597, 1959.
- (19) Yáñez, E., Ita Barja, F. Monckeberg, A. Maccioni & G. Donoso.—The fish protein concentrate story. 6. Quintero Fish Protein concentrate: Protein quality and use in foods. *Food Tech.*, 21: 1604, 1967.
- (20) Waterworth, D.—The nutritive quality and available aminoacid composition of some animal protein concentrates. *Br. J. Nutr.*, 18: 503, 1964.
- (21) Miller, E. L. & K. J. Carpenter.—Availability of sulphur amino acids in protein food. 1. Total sulphur amino acid content in relation to sulphur and nitrogen balance studies with the rat. *J. Sci. Food Agric.*, 11: 810, 1964.