

EVALUACION DE LA CALIDAD DE LA PROTEINA DE LA *Erythrina edulis* (BALU)

Gerardo Pérez, Cecilia de Martínez¹ y Estela Díaz¹

Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Química,
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

RESUMEN

Las semillas de *Erythrina edulis* (balú) contienen de 18 a 21% de proteína (N x 6.25), valor que se reduce a 14-15% al descontar la fracción correspondiente al nitrógeno no proteínico, que se extrae con ácido tricloroacético al 10%. Al ensayar dos esquemas de extracción diferentes, se observaron divergencias apreciables en la distribución de las fracciones proteínicas de la semilla. El análisis de aminoácidos indicó que el balú contiene cantidades similares o superiores a las determinadas en otras leguminosas, siendo la metionina el primer limitante y el triptofano, el segundo, según lo muestran los cálculos de cómputo químico y cómputo proteínico. La evaluación de la relación de eficiencia proteínica (REP) de las harinas tratadas térmicamente, mostró que el valor máximo se obtiene con 30 min de tratamiento. Tomados en conjunto, los resultados indican que la calidad de la proteína es baja.

Manuscrito modificado recibido: 5-3-79.

¹ Parte de este trabajo fue presentado como Tesis de Grado por Cecilia de Martínez y Estela Díaz.

INTRODUCCION

El presente trabajo fue motivado por el interés que existe actualmente en la búsqueda de nuevas fuentes de proteínas de bajo costo y buena aceptabilidad. Así, su propósito primordial fue evaluar la calidad de la proteína de una leguminosa de amplia distribución y de consumo popular en Colombia.

La especie *Erythrina edulis* (n. v.: balú, chachafruto, sachapuruto), perteneciente a la familia de las papilionáceas, se encuentra en altitudes medias (de 1,800 a 2,300 m sobre el nivel del mar) donde se utiliza como cultivo para sombra de los cafetales. Sus semillas son consumidas por la población campesina en forma de torta, de postre o simplemente cocidas, y sus vainas se utilizan a veces en la preparación de encurtidos. Los frutos se emplean también para el engorde de cerdos.

Esta leguminosa ha sido poco estudiada ya que, ajeno a su descripción botánica (1), sólo se ha efectuado el análisis de su composición porcentual (2) y la determinación del contenido de alcaloides de las semillas (3). En consideración a lo expuesto, nos pareció interesante realizar una caracterización química y nutricional de las semillas de esta leguminosa.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de la Muestra

Los frutos maduros, provenientes de San Antonio de Tena (Cundinamarca), se adquirieron en una plaza de mercado de Bogotá, y se sometieron al siguiente proceso. Primero, la semilla se separó manualmente de la vaina, se cortó y luego de secada a 50°C durante 24 h, se molió hasta obtener una harina tamizada a un grosor de 100 mallas. La cáscara y el germen se separaron previamente del cotiledón sólo al efectuar el análisis proximal de estos componentes.

Composición Porcentual

Las determinaciones del contenido de humedad, grasa, fibra cruda, cenizas y proteína (N x 6.25) se realizaron siguiendo las técnicas descritas por la AOAC (4).

Determinación de Nitrógeno no Proteínico

Para conocer con mayor exactitud el contenido de proteína real del balú se procedió a extraer el nitrógeno no proteínico (NNP) de la harina utilizando ácido tricloroacético (ATA) al 5^o/o, 10^o/o y 20^o/o, respectivamente, empleando en cada caso una relación muestra:solvente de 1:10 (p/v) con agitación continua durante dos horas y a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 3,500 rpm por 20 minutos y el residuo se extrajo tres veces más en las mismas condiciones. Los sobrenadantes se reunieron, se llevaron a volumen y se determinó su contenido de nitrógeno por el método de micro-Kjeldahl, según Steyermark (5).

Distribución de las Fracciones Proteínicas

Los ensayos preliminares de extracción permitieron establecer que las mejores condiciones para este propósito son aquellas en que se emplea una relación muestra:solvente de 1:10 (p/v) agitando continuamente, a temperatura ambiente, durante dos horas; la centrifugación se realizó en las condiciones ya descritas. La muestra fue extraída cuatro veces consecutivas con cada solvente. La extracción de las proteínas de la harina de balú se efectuó siguiendo dos esquemas diferentes. En el primero (I) se hizo una extracción inicial con acetona-H₂O 75:25 (v/v) y en el segundo (II), con ATA al 10^o/o; los residuos de estas extracciones fueron suspendidos en un volumen pequeño de agua desmineralizada y centrifugados de inmediato. Este lavado se repitió una vez más a fin de disminuir la posible interferencia de la acetona o del ATA en las etapas subsiguientes de extracción que se realizaron con los solventes y bajo las condiciones señaladas en la sección de Resultados.

Determinación de la Composición en Aminoácidos

La determinación de triptofano se llevó a cabo combinando la hidrólisis con pronasa (6) con la determinación colorimétrica usando para el caso p-dimetilaminobenzaldehído (7).

La determinación de los aminoácidos restantes se realizó mediante hidrólisis ácida de las muestras (8) procediéndose luego al análisis de los hidrolizados en un analizador de aminoácidos Beckman 120 C (9). La lisina disponible se evaluó empleando el método de Conkerton y Frampton (10).

Evaluación de la Calidad de la Proteína

Para este propósito se emplearon dos métodos: a) *In vitro*, calculando el cómputo químico (CQ) por el método de Mitchell y Block (11), el cómputo proteínico (CP) (12) y el índice de aminoácidos esenciales (IAE) según Oser (13). b) *In vivo*, determinando la razón de eficiencia proteínica (REP), para lo cual se utilizaron harinas crudas y tratadas en el autoclave (1,035 g/cm² a 110°C) durante 15, 30, 45 y 60 min, secándolas luego al vacío (a 50°C, 20 mm) durante 10 horas. Los ensayos para determinar la REP se realizaron de acuerdo al método de Campbell (14).

RESULTADOS Y DISCUSION

Composición Porcentual

El fruto de balú está constituido por una vaina (37.60/o) que contiene de 8 a 12 semillas que representan 62.40/o del total del fruto. Los datos obtenidos a partir de la semilla completa y de cada uno de sus constituyentes, se presentan en la Tabla 1. Según se observa, la semilla tiene un contenido de grasa cruda bastante bajo, mientras que el contenido de proteína cruda (N x 6.25) es relativamente alto. Los análisis realizados en diferentes muestras arrojaron valores que oscilan entre 18 y 21 g/100 g de muestra.

Los datos obtenidos concuerdan con los determinados por Góngora y Young (2) (Tabla 1).

Determinación de Nitrógeno no Proteínico (NNP)

El porcentaje de nitrógeno extraído con las diferentes soluciones de ácido tricloroacético (ATA) fue similar, ya que con ATA al 50/o se extrajo un 35.60/o del total de nitrógeno; con ATA al 100/o, 33.60/o, y con ATA al 200/o, 330/o. Por esta razón, escogimos ATA al 100/o como primer solvente en el segundo (II) esquema de extracción. Se observó además que el NNP (determinado con ATA al 100/o) depende del contenido de nitrógeno de la harina, ya que las muestras con 2.880/o de N presentaron 22.80/o del total de N como NNP, mientras que aquellas con 3.420/o de N, tenían 33.70/o del total de N como NNP. Esta variación posiblemente se deba a diferentes estados de madurez de las muestras analizadas.

TABLA 1

COMPOSICION PORCENTUAL DE LA SEMILLA DE *Erythrina edulis* Y DE SUS COMPONENTES

(g/100g de muestra)

Balú	Total	Humedad	Grasa	Fibra cruda	Cenizas	Proteína cruda (N x 6.25)	ELN
Completo	100	6.9	0.6	7.5	5.7	18.0	62.3
Cotiledón	90.5	6.0	0.6	4.1	5.7	17.2	76.4
Cáscara	9.4	9.9	0.6	39.4	1.5	11.7	36.9
Germen	0.1	—	—	—	—	25.1	—
Completo ^a	100	0	0.5	5.1	5.6	20.5	68.2

^a Datos calculados a partir de Góngora y Young (2).

Los valores de NNP en otras leguminosas (15) son generalmente inferiores a los del balú, con excepción de los determinados en *Canavalia ensiformis* que también son bastante altos (30^o/o). En consecuencia, el contenido de proteína real (14.2^o/o) de la semilla del balú, es bastante más bajo que el calculado a partir del nitrógeno (3.4^o/o); este hallazgo muestra la necesidad de determinar el NNP si se desea conocer con precisión el contenido de proteína.

Distribución de Fracciones Proteínicas

Los ensayos iniciales de extracción utilizando el esquema I se encaminaron a buscar la relación acetona:agua que mejor extrajera los polifenoles, compuestos que podrían insolubilizar las proteínas. Aunque la relación acetona:agua 75:25 (v/v) extrae más N que la relación 90:10 (v/v) (13.4^o/o vs 8.1^o/o), a juzgar por la intensidad de la coloración amarillo-rojiza de los extractos, la extracción de los polifenoles es más eficiente con la mezcla de mayor polaridad, lo que concuerda con los resultados de Lontie y Voets (16) al extraer los polifenoles de la cebada.

La distribución de las fracciones proteínicas obtenidas con la secuencia de extracción denominada esquema I, se indica en la Tabla 2. Los tres procesos sometidos a ensayo dentro del esquema difieren esencialmente en los solventes y condiciones empleados para obtener las glutelinas, que parecen ser extraídas más eficientemente por la mezcla etanol-NaOH a 60°C. Se observa que en los tres procesos, las albúminas constituyen la fracción más abundante mientras que las prolaminas son las más escasas. Las divergencias en el contenido de globulinas, determinadas por los procesos 1 y 2, son difíciles de explicar. Los resultados obtenidos usando el esquema II (Tabla 3) señalan como la fracción más abundante la correspondiente a las glutelinas, seguidas por las prolaminas observándose valores muy bajos para las albúminas y globulinas. Las notables diferencias que señalan los datos en las Tablas 2 y 3 revelan la marcada influencia del primer extractante (acetona acuosa o ATA) sobre el rendimiento de las fracciones extraídas posteriormente; se ha observado un comportamiento análogo al estudiar la distribución de las fracciones proteínicas en otras leguminosas (15). El brusco descenso observado en las albúminas al pasar del esquema I al II, así como los notorios incrementos en prolaminas y glutelinas podrían explicarse por una insolubilización de las albúminas debida al bajo pH (4.0–5.0) de los extractos acuosos obte-

TABLA 2

DISTRIBUCION DE FRACCIONES PROTEINICAS EXTRAIDAS
SEGUN EL ESQUEMA I

	Porcentaje de nitrógeno total extraído				
	Extracciones				
	1a.	2a.	3a.	4a.	Total
<i>Proceso No. 1</i>					
Acetona -H ₂ O 75:25 (v/v)	—	—	—	—	13.4
H ₂ O	35.9	6.5	1.5	0.8	44.7
Acetato de sodio 0.85 a un pH de 5.0	1.9	0.7	0.3	0.2	3.1
Etanol -H ₂ O (1) 60:40 (v/v)	0.5	0.1	0.1	0.3	1.0
Etanol -NaOH 0.2N ^a 60:40 (v/v)	4.5	5.5	7.5	9.5	27.0
Total extraído					89.2
<i>Proceso No. 2^b</i>					
Acetona -H ₂ O 75:25 (v/v)	—	—	—	—	12.4
H ₂ O	29.2	12.5	5.5	—	47.2
NaCl 1 ^o /o	8.7	5.9	0.6	—	15.2
Etanol -H ₂ O 70:30 (v/v)	0.6	0.0	0.0	—	0.6
HCl 0.1N	4.9	0.9	0.7	—	6.6
Total extraído					82.0
<i>Proceso No. 3^c</i>					
Acetona -H ₂ O 75:25 (v/v)	—	—	—	—	15.5
H ₂ O	—	—	—	—	33.4
NaCl 1 ^o /o	—	—	—	—	3.4
Etanol -H ₂ O 70:30 (v/v)	—	—	—	—	0.6
Etanol -NaOH 0.05N 70:30 (v/v)	—	—	—	—	12.4
Total extraído					65.3

^a Temperatura de extracción: 60-65°C.

^b Tiempo de agitación: 1 hora.

^c Las determinaciones de N se hicieron en los cuatro extractos reunidos.

nidos a partir de una harina tratada con ATA; estas proteínas permanecerían asociadas a la harina y sólo serían extraídas en las etapas posteriores sumándose a las prolaminas o glutelinas existentes.

TABLA 3
DISTRIBUCION DE FRACCIONES PROTEINICAS EXTRAIDAS SEGUN EL ESQUEMA II^a

Solvente	Muestra A						Muestra B	
	Concentración solución	Extracciones				Total	Concentración solución	Total
		1a.	2a.	3a.	4a.			
ATA al 10 ^o /o	10 ^o /o	—	—	—	—	22.80	10 ^o /o	33.70
H ₂ O		1.66	0.05	0.02	0.03	1.76	—	2.09
NaCl	5 ^o /o	1.50	2.80	2.20	1.70	8.20	1 ^o /o	8.45
Etanol-H ₂ O (v/v)	53:47 ^b	5.50	15.00	3.70	0.90	25.40	60:40 ^c	14.70
Etanol NaOH-1N 50:50 (v/v)	50:50 ^b	28.20	5.60	1.40	0.40	35.60	50:50 ^d	21.48
Total extraído						93.76		80.42

^a Los valores se expresan como ^o/o del total de nitrógeno.

^b Temperatura de extracción: 65^oC.

^c Temperatura de extracción: 60^oC.

^d Temperatura de extracción: 18^oC.

La marcada influencia del pH en la solubilidad de las proteínas de leguminosas ha sido observada ya por diversos investigadores (17-19); en consecuencia, creemos que la distribución en el esquema I refleja más adecuadamente la abundancia relativa de los diferentes tipos de proteína del balú. Es necesario tener en cuenta, sin embargo, que la fracción extraída con agua en el esquema I contiene cierta cantidad de globulinas, a cuya extracción ayudan las sales presentes en la harina. La presencia de estas globulinas se pone en evidencia por la aparición de un precipitado al dializar el extracto acuoso contra H₂O desmineralizada o al saturarlo al 50% con (NH₄)₂ SO₄.

Determinación de la Composición en Aminoácidos

En esta determinación se emplearon harinas crudas o sometidas a tratamiento en el autoclave durante 30 y 60 min, respectivamente; los valores obtenidos se muestran en la Tabla 4, en la que se incluyen, además, los análisis realizados en variedades colombianas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y arveja (*Pisum sativum*) (19) y los notificados por la FAO para la soya (*Glicine max*) y el haba (*Vicia faba*) (20).

En primer término se observa que el tratamiento térmico disminuye en mayor o menor grado los niveles de prácticamente todos los aminoácidos esenciales y de la gran mayoría de los no esenciales; las reducciones más notables (aproximadamente de 25%) las acusan la lisina, histidina e isoleucina cuyos contenidos en la harina cruda excedían en mucho a los de las otras especies. En segundo lugar, es interesante notar que con excepción de arginina y ácido glutámico, en general, la harina de balú cruda contiene mayores cantidades de aminoácidos que las otras leguminosas incluidas en la Tabla. No obstante, el triptofano, la metionina y la cisteína (de la que sólo se detectan trazas) son notoriamente bajos, tal como se observa en casi todas las leguminosas. La evaluación de la lisina disponible se realizó con harina cruda, tratada en autoclave durante 30 y 60 min, encontrándose que la primera contiene 364 mg de lisina/g N y las tratadas, 260 mg de lisina/g N; es notorio el descenso ocasionado por el tratamiento térmico que, en este caso, es de 29% respecto a la lisina disponible originalmente.

Evaluación de la Calidad de la Proteína

Los resultados obtenidos en la evaluación *in vitro* del balú se

TABLA 4

COMPOSICION EN AMINOACIDOS DE ALGUNAS LEGUMINOSAS

(g de AA/16 gN)

Aminoácido	Harina de balú			Frijol	Arveja	Soya	Haba
	Cruda	Autoclave					
		30 min	60 min				
Lisina	6.91	5.04	5.04	6.24	6.96	6.38	6.46
Histidina	5.84	4.26	4.32	2.50	2.38	2.53	2.37
Treonina	5.84	4.77	4.53	3.87	3.58	3.86	3.36
Valina	5.57	5.22	4.74	4.62	4.08	4.80	4.40
Metionina	1.31	1.18	1.17	1.17	0.88	1.26	0.74
Isoleucina	5.20	3.92	3.90	3.73	3.20	4.54	4.00
Leucina	8.24	7.58	7.22	6.51	6.37	7.78	7.09
Tirosina	5.50	4.62	4.45	2.70	3.34	3.14	3.20
Fenilalanina	4.99	6.13	6.24	4.72	4.22	4.94	4.32
Triptofano	0.66	0.61	0.61	0.56	0.74	1.28	N.D.
Arginina	5.63	6.08	5.63	5.87	9.46	7.23	8.90
Acido aspártico	19.47	15.97	15.18	11.10	11.06	11.70	11.23
Serina	5.71	5.36	4.54	5.57	4.75	5.12	4.48
Acido glutámico	17.42	13.89	12.94	16.27	18.42	18.70	15.07
Prolina	5.25	5.26	5.02	3.97	3.87	5.45	3.98
Glicina	5.44	4.37	3.94	3.31	4.14	4.18	4.13
Alanina	7.73	5.50	5.25	3.74	4.18	4.26	4.14
Cisteína	Trazas	Trazas	Trazas	N.D.	N.D.	1.33	0.80

N.D. = No determinado.

indican en la Tabla 5 donde se incluyen también el huevo y dos leguminosas de amplio consumo. Según se encontró, la metionina es el primer aminoácido limitante en las tres leguminosas, aunque en el balú su CQ es superior al del frijol y la arveja; el segundo aminoácido limitante es el triptofano, cuyo CQ en el balú es mayor que en el frijol y algo menor que en la arveja.

El índice de aminoácidos esenciales (IÁE) del balú (90) es muy superior al del frijol (64) y al de la arveja (59). El conjunto

TABLA 5

COMPARACION ENTRE EL COMPUTO QUIMICO, COMPUTO PROTEINICO E
INDICE DE AMINOACIDOS ESENCIALES DE ALGUNAS LEGUMINOSAS

		Lis.	His.	Treo.	Val.	Met.	Isoleu.	Leu.	Tir.	Fenil.	Trip.	IAE
Huevo	A	6.97	2.43	5.12	6.85	3.36	6.29	8.50	4.16	5.73	1.49	
Balú (<i>E. edulis</i>)	A	6.91	5.84	5.84	5.57	1.31	5.20	8.24	5.50	4.99	0.66	
	CQ	99	240	114	81	39	83	97	132	87	44	90
	CP	101	244	117	83	39	84	98	134	89	45	
Frijol (<i>P. vulgaris</i>)	A	6.24	—	3.87	4.22	1.17	3.73	6.51	2.70	4.72	0.56	
	CQ	89	—	76	67	35	59	77	65	82	38	64
	CP	133	—	113	101	51	89	114	96	123	55	
Arveja (<i>P. sativum</i>)	A	6.90	—	3.58	4.08	0.88	3.20	6.37	3.34	4.22	0.74	
	CQ	100	—	70	60	26	51	75	80	74	49	59
	CP	152	—	107	91	39	78	114	122	112	76	

A = g de AA/16 g N.

CQ = Cómputo químico para cada aminoácido considerado como limitante.

CP = Cómputo proteínico para cada aminoácido considerado como limitante.

IAE = Índice de aminoácidos esenciales.

de estos resultados indica que el balú tendría, *in vitro*, una calidad superior a la de los frijoles y las arvejas, leguminosas éstas que en la dieta familiar colombiana constituyen casi la totalidad del aporte en leguminosas.

Para la evaluación de la calidad *in vivo* se realizó un primer ensayo con harina cruda, ciñéndose en un todo al método de Campbell (14). En la primera semana se observaron pérdidas de peso individuales hasta de 14 g, y la muerte de un animal; en el curso de la segunda semana murió el resto de los animales cuyo consumo de alimento había sido mínimo.

Estos resultados, sumados a la presencia de factores tóxicos termolábiles propios de las leguminosas (21), condujeron a tratar térmicamente la harina de balú antes de evaluar la razón de eficiencia proteínica (REP).

Los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos se presentan en la Tabla 6. Se observa que el valor máximo de la REP se obtiene con la harina tratada durante 30 min, siendo inferior la calidad de la proteína de la harina sometida a tratamientos más cortos o más largos; el valor de 1.15 obtenido, comparado con

TABLA 6

RAZON DE EFICIENCIA PROTEINICA (REP) DE LA HARINA DE BALU SOMETIDA A TRATAMIENTO TERMICO

Dieta	Caseína	Balú	Balú	Balú	Balú
Tratamiento térmico (min)	—	15	30	45	60
Razón de eficiencia proteínica (REP) (PER)	2.63	1.04	1.21	1.17	0.96
REP corregido (Caseína 2.5)	2.5	0.98	1.15	1.11	0.91

los de otras leguminosas, es superior al del frijol rojo, que es de 0.88 (22) y al de las lentejas, 0.91 (23), y menor que los CEP de soya (2.32), cacahuete (1.58), arvejas (1.57), garbanzos (1.68) y mungo (2.12) citados en una compilación de la FAO (24).

En términos generales puede, pues, concluirse que la calidad de la proteína del balú es baja, y que para mejorarla sería necesario suplementarla con metionina y triptofano o con vegetales ricos en estos aminoácidos. Los cálculos teóricos hechos con mezclas binarias de ajonjolí-balú y dividivi (*Tara espinosa*)-balú indican que para la primera se alcanza el mejor cómputo según la FAO, con una relación de 75^o/o:25^o/o, y para la segunda, con una relación de 72^o/o:28^o/o.

La presencia de factores tóxicos termolábiles (lectinas e inhibidores de tripsina) en esta leguminosa (25) corrobora la necesidad del tratamiento térmico.

SUMMARY

EVALUATION OF THE PROTEIN QUALITY OF *Erythrina edulis* (BALU)

The protein content (N x 6.25) of the seeds of *Erythrina edulis* (balú) varies between 18-21^o/o; when the fraction corresponding to non-protein nitrogen is extracted with trichloroacetic acid (10^o/o), this value decreases to 14-15^o/o. Remarkable differences in the distribution of the protein fractions are observed when two schemes of extraction are assayed. The amino acid analysis shows that this legume has similar or higher amounts of most amino acids than those present in other leguminosae; the calculated chemical score and protein score show that methionine is the first limiting amino acid and tryptophan, the second. The protein efficiency ratio (PER) of thermally-treated flours has the highest value at 30 minutes of treatment (1.15).

AGRADECIMIENTOS

La determinación de la razón de eficiencia proteínica (REP) se llevó a cabo con la colaboración del Dr. Camilo Roza (Instituto Colombiano de Bienestar Familiar). El trabajo en su totalidad se realizó con el aporte financiero del Departamento de Química, Universidad Nacional, y del Fondo de Investigaciones Científicas Francisco José de Caldas (Colciencias).

BIBLIOGRAFIA

1. Pérez-Arbeláez, E. **Plantas Útiles de Colombia**. 3a. ed. Bogotá, Colombia, Librería Colombiana, 1956, 593 p.
2. Góngora, J. & N. Young. **Tabla de Composición de Alimentos Colombianos**. 1a. ed. Bogotá, Colombia, Instituto Nacional de Nutrición, 1953, 44 p.
3. Folkers, K. & K. Unna. Erythrina alkaloids. V. Comparative curare-like potencies of species of the genus Erythrina. **J. Am. Pharm. Assoc.**, **28**: 1019-1028, 1939.
4. Association of Official Agricultural Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 9th ed. Washington, D. C., The Association, 1960. (Proteína: Método 2036; humedad: Método 22008; cenizas: Método 22010; grasa: Método 22032, y fibra cruda: Método 22038).
5. Steyermark, A. L. **Quantitative Organic Microanalysis**. 2nd ed. New York, N. Y., Academic Press, Inc., 1961, 205 p.
6. Nomoto, M. & Y. Narahashi. A proteolytic enzyme of *Streptomyces griseus*. I. Purification of a protease of *Streptomyces griseus*. **J. Biochem. (Tokyo)**, **46**: 653-667, 1959.
7. Spies, J. R. & D. Chambers. Chemical determination of tryptophan. **Anal Chem.**, **20**: 30-39, 1948 (Método B).
8. Spackman, D. H. Accelerated system for the automatic analysis of amino acids. **Fed. Proc.**, **22**: 244, 1963.
9. **Beckman 120 C Amino Acid Analyzer Instruction Manual**. California. Spinco Division, 1969.
10. Conkerton, E. J. & V. L. Frampton. Reaction of gossypol with free epsilon-amino groups of lysine in proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, **81**: 130-134, 1959.
11. Mitchell, H. H. & R. J. Block. Some relationships between the amino acid contents of proteins and their nutritive values for the rat. **J. Biol. Chem.**, **163**: 599-620, 1949.
12. **Protein Requirements**. Report of a Joint FAO/WHO Expert Group. Published jointly by FAO and WHO. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1965, 71 p. (FAO Nutrition Meetings Report Series No. 37; WHO Technical Report Series No. 301).
13. Oser, B. L. Method for integrating essential amino acid content in the nutritional evaluation of protein. **J. Am. Dietet. Assoc.**, **27**: 396-402, 1951.
14. Campbell, J. A. Biological assay methods for protein evaluation (Chapter III, Appendix A: Method for determination of PER and NPR). En: **Evaluation of Protein Quality**. Washington, D. C., National Academy of Sciences-National Research Council, 1963, p. 31 (NAS-NRC

- Publication 1,100).
15. Pérez, G. **II Seminario Avanzado de Tecnología de Alimentos**. Bogotá, Colombia, Instituto de Investigaciones Tecnológicas, 1975.
 16. Lontie, R. & T. Voets. Contribution a l'étude des prolamines et de l'azote résiduel de l'orge. En: **European Brewery Convention**. Proceedings of the Congress. Rome, Italy, 1959, p. 27-36.
 17. Molina, M. R., C. E. Argueta & R. Bressani. Extraction of nitrogenous constituents from the Jack Bean (*Canavalia ensiformis*). **J. Agr. Food Chem.**, 22: 309-312, 1974.
 18. Pant, R. & D. R. P. Tulsiani. Solubility, amino acid composition and biological evaluation of proteins isolated from leguminous seeds. **J. Agr. Food Chem.**, 17: 361-366, 1969.
 19. Acevedo, F. Tesis de Grado. Bogotá, Colombia, Universidad Nacional, Departamento de Química, 1973.
 20. **Amino-Acid Content of Foods and Biological Data on Proteins**. Rome, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1970, p. 50 y 56. (FAO Nutritional Studies No. 24).
 21. Liener, I. E. (Ed.). **Toxic Constituents of Plant Foodstuffs**. New York, N. Y., Academic Press, Inc., 1969.
 22. Goyco, J. A. & C. F. Asenjo. The lactation value, a new index of protein evaluation. **J. Nutr.**, 85: 52-56, 1965.
 23. Nath, M.C. & N. Nath. Effect of methionine, vitamin B₁₂ and hydrolised glucose cycloacetacetate on protein nutritive value of *Lens esculenta* (lentil). **Indian J. Med. Res.**, 53: 1010, 1965.
 24. **Amino-Acid Content of Foods and Biological Data on Proteins**. Rome, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1970, p. 170-173. (FAO Nutritional Studies No. 24).
 25. Pérez, G. & M. I. de Sanabria. Resultados inéditos.