

**INFLUENCIA FENOTIPICA Y TECNOLOGICA
DE LA SEMILLA DEL *Lupinus mutabilis* (Tarwi)
SOBRE LA DISPONIBILIDAD DE METIONINA
Y EL CONTENIDO DE AZUFRE**

*Manuel Oliveros¹, Hans Schoeneberger², Rainer Gross²
y Zelmira Reynoso³*

**Instituto de Nutrición, Institutos Nacionales de Salud,
Ministerio de Salud, Lima, Perú**

RESUMEN

Se estudió la influencia del procesamiento del *Lupinus mutabilis* sobre el contenido de metionina disponible y azufre, así como su variabilidad en semillas de diferentes regiones andinas. Además, se relacionaron los resultados de las determinaciones químicas de metionina disponible y azufre del lupino con su calidad proteínica expresada por el índice de eficiencia proteínica (PER).

Los resultados en los ecotipos y variedades de tarwi estudiados revelaron gran variabilidad en el contenido de metionina disponible y azufre. La fertilización con CaSO_4 (200 kg/ha) afectó el contenido de metionina disponible y azufre en las semillas de *Lupinus albus*. El desamargado tradicional con agua

Manuscrito modificado recibido: 29-7-82.

- 1 Instituto de Nutrición, Proyecto Lupino, Jirón Tizón y Bueno 276, Jesús María, Lima 11, Perú.
- 2 Agencia Alemana de Cooperación Técnica, Instituto de Nutrición, del Proyecto Lupino en referencia.
- 3 Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

del *Lupinus mutabilis* no tuvo efecto sobre el contenido de metionina disponible. La harina de tarwi sometida a extracción de aceite, y la harina desamargada con alcohol, disminuyen significativamente su contenido de metionina disponible y azufre (14 y 23%, respectivamente), siendo mayor este descenso durante la obtención del aislado proteínico (54%). Se encontraron altos coeficientes de correlación entre metionina disponible y PER ($r = 0.98$) en nuestras de lupino procesado, y mezclas de lupino con otras fuentes de proteína.

INTRODUCCION

El *Lupinus mutabilis* (tarwi o chocho) desempeñó un rol muy importante en el suministro de proteínas para la población de los países andinos. La influencia de la dominación española, sin embargo, cambió paulatinamente los hábitos alimenticios de la población, habiéndose desplazado casi totalmente su cultivo.

En los Andes del Perú existe gran cantidad de material genético del cultivo del tarwi. Por lo tanto, su recolección, evaluación y aplicación de tecnología apropiada, pueden proporcionar un recurso alimenticio de gran importancia para una población crónicamente mal alimentada, debido al alto porcentaje de proteínas y de grasa (40 y 20%, respectivamente) que contiene (1).

Como sucede con todas las leguminosas, el grano de *Lupinus mutabilis* es deficitario en los aminoácidos azufrados y, en consecuencia, el valor biológico de su proteína es menor. Además, a causa de la presencia de alcaloides en el grano, éste debe someterse a procesamiento previo a su consumo, lo que agravaría su déficit en metionina (1-3). Durante el procesamiento tecnológico de los alimentos, es factible que se reduzca el valor nutritivo de las proteínas debido, por ejemplo, a la oxidación de aminoácidos azufrados a formas químicas no aprovechables por el organismo (4).

Para determinar esta reducción, la cromatografía líquida de aminoácidos emplea equipos muy costosos y no distingue entre la metionina total y la disponible para el organismo. Asimismo, los ensayos biológicos con animales requieren mucho gasto en dinero y tiempo. Una alternativa económica y rápida que permite evaluar un elevado número de muestras es el método colorimétrico, previa hidrólisis enzimática, para la determinación de metionina disponible.

Los objetivos del presente estudio fueron determinar la influencia fenotípica y tecnológica del tarwi sobre la disponibilidad

de metionina. Luego, con miras a relacionar estos datos con los resultados *in vivo*, se realizaron ensayos paralelos para establecer el índice de eficiencia proteínica (PER). Finalmente, se determinó el contenido de azufre en las muestras de lupino a fin de comprobar si existe o no relación entre la metionina disponible, el azufre y el PER.

MATERIALES Y METODOS

Material

Se utilizaron semillas de *Lupinus mutabilis* provenientes del Banco de Germoplasma de la Universidad del Cusco, Instituto Nacional de Investigación y Promoción Agropecuaria (INIPA) de Huancayo, Perú, así como semillas de *Lupinus albus* procedentes del semillero de Campex, Chile. Los otros granos como *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus lunatus*, *Chenopodium quinoa*, *Zea mays*, *Avena sativa*, *Triticum* spp. y *Oryza* spp., fueron obtenidos en el mercado nacional. El tarwi se sometió a los siguientes procesamientos: desamargado tradicional del grano (5) a cuatro tiempos de cocción a 100°C (30, 40, 50 y 60 minutos) y a cuatro tiempos de lavado continuo con agua (0, 2, 3 y 4 días), desengrasado de la harina de lupino con hexano para la obtención de aceite (6), desamargado con alcohol (6), y obtención del aislado proteínico de lupino (7).

Metodología

Los métodos usados para la determinación de humedad y proteína fueron los de la AOAC (8). La determinación del índice de eficiencia proteínica (PER) aplicada en este ensayo, se basa también en las recomendaciones de la AOAC (8) y ha sido ampliamente descrita por Schoeneberger *et al.* (1). La determinación de metionina disponible se realizó según el método colorimétrico, previa hidrólisis enzimática, expuesto por Pieniazek *et al.* (4), y la del contenido de azufre total, por el método de Blanchar, Rehm y Caldwell (9). Antes de proceder a estos análisis se molieron las muestras en un molino de laboratorio marca Retsch, malla 0.75.

RESULTADOS Y DISCUSION

El contenido de proteína, metionina disponible y azufre en variedades de *Lupinus mutabilis* de diferente procedencia se expone en la Tabla 1. Según revelan los datos, en el grano del *Lupinus mutabilis* el contenido de proteína varía entre 41 y 47%, lo que significa que el grano de tarwi tiene casi el doble de proteína que otras leguminosas de grano. En la misma Tabla se aprecia que el contenido de metionina disponible y azufre de los ecotipos de *Lupinus mutabilis* oscila entre 0.45 y 0.92 g/100 g proteína, y entre 0.39 y 1.09 g/100 g proteína, respectivamente. Se puede notar que las variedades provenientes de Cusco y Huancayo muestran una menor variación en su contenido de metionina disponible, azufre y proteína que los ecotipos no sometidos a un proceso de fitomejoramiento. Esto demuestra que dentro de la especie de *Lupinus mutabilis* existe todavía un potencial muy promisorio para mejorar la calidad proteínica del grano.

Cabe mencionar que existe una correlación negativa entre el contenido de proteína y metionina disponible ($r = -0.45$, $P \leq 0.05$) y entre el contenido de proteína y azufre ($r = -0.65$, $P \leq 0.01$) de las variedades y ecotipos de *Lupinus mutabilis* sometidas a estudio. Ello indica que un grano con alto contenido de proteína presenta una calidad proteínica inferior, hecho que debe tenerse en cuenta en el fitomejoramiento, en caso se requiera aumentar el contenido proteínico. Los resultados de Munck (10) confirman esta observación para el caso de cereales.

Según la Tabla 2, el contenido de metionina disponible en la proteína del tarwi es notoriamente menor que en las otras leguminosas estudiadas. Los hallazgos de Gross (11) en sus estudios con ratas, revelaron que la calidad proteínica del lupino es inferior a la de muchas otras leguminosas, lo que confirma nuestros resultados *in vitro*. Sin embargo, este déficit de metionina en el lupino es solamente relativo ya que dado su alto contenido proteínico, la cantidad de metionina en la semilla es mayor en comparación con las otras leguminosas. Sólo el grano de soya constituye una excepción porque reúne un alto contenido de proteína con un buen contenido de metionina.

El uso de fertilizantes con azufre (CaSO_4) en cantidades de 200 kg/ha afecta el contenido de metionina disponible en semillas de *Lupinus albus* (Tabla 3). Estos resultados confirman los estudios de Gillespie, Glagrove y Randall (12), pero difieren de las observaciones de Herbert y Hill (13) en un estudio en macetas.

TABLA 1

CONTENIDO DE PROTEÍNA, METIONINA DISPONIBLE Y AZUFRE
EN VARIEDADES DE LUPINO DE DIFERENTE PROCEDENCIA

Procedencia	Variedad	Proteína (% o b.s.)	Metionina disponible (g/100 g proteína)	Azufre
	0012 - 05 - 05	41.3	0.92	1.09
	0620 - 05 - 09	44.1	0.73	0.86
	Epifanio Curso	45.5	0.80	0.65
<i>Lupinus</i>	0198 - 09 - 09	43.1	0.61	0.61
<i>mutabilis</i>	Trinidad Mancisidor	45.3	0.59	0.75
ecotipos	0313 - 09 - 09	47.1	0.59	0.84
	0.530 - 09 - 09	45.0	0.51	0.51
	Feliciano Gutiérrez	46.7	0.45	0.39
	Sicuaní	44.0	0.80	1.08
	Yunguyo	43.1	0.74	1.03
<i>Lupinus</i>	R ₄	43.7	0.77	0.99
<i>mutabilis</i>	H ₆	43.5	0.74	1.03
variedades	H ₁	42.2	0.70	1.07
Huancayo	H ₂	41.5	0.69	1.07
	R ₂	44.4	0.66	0.94
	SCG - 25	44.5	0.73	0.94
<i>Lupinus</i>	SCG - 9	43.7	0.69	0.99
<i>mutabilis</i>	SCG - 10	45.0	0.61	0.91
variedades	SCG - 8	41.7	0.56	0.97
Cusco	Cusco	43.2	0.66	0.92

Asimismo, se observa que el contenido de azufre en el grano de lupino aumenta luego de la fertilización con CaSO₄, debido probablemente no sólo al aumento de metionina, sino también al incremento de azufre no proteínico. Los resultados contradictorios existentes entre los diferentes estudios señalan que el aumento de aminoácidos azufrados en semillas parece depender no solamente de la fertilización, sino también de otros factores tales como el medio ambiente y la composición del suelo (12, 13).

TABLA 2

COMPARACION DEL CONTENIDO DE METIONINA DISPONIBLE
Y AZUFRE DE *Lupinus mutabilis* CON OTRAS LEGUMINOSAS

Muestra	Proteína (%o b.s.)	Metionina disponible		Azufre	
		(1)	(2)	(1)	(2)
Tarwi (<i>Lupinus mutabilis</i>)	43.3	0.70	0.30	0.99	0.43
(<i>Lupinus albus</i>)	38.5	0.61	0.25	0.74	0.26
Frejol Canario (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	24.9	1.14	0.28	1.28	0.32
Frejol Castilla (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	25.1	1.03	0.26	1.03	0.26
Pallar (<i>Phaseolus lunatus</i>)	24.1	1.08	0.26	0.85	0.20
Soya (<i>Glycine max</i>)	43.5	1.09	0.46	0.90	0.39

(1) g/100 g de proteína.

(2) g/100 g de semilla.

TABLA 3

CONTENIDO DE PROTEINA, METIONINA DISPONIBLE Y AZUFRE
EN *Lupinus albus* SOMETIDO A FERTILIZACION

Muestra	Aplicación	Proteína (%o b.s.)	Metionina disponible	Azufre
			(g/100 g proteína)	
<i>Lupinus albus</i>	Sin fertilización	38.5	0.61	0.74
Chile	Con CaSO ₄ al voleo	36.5	0.66	0.84
	Con CaSO ₄ en hilera	37.2	0.67	0.82

Para comprobar si el proceso de desamargado ocasiona una pérdida de metionina disponible, se le sometió a diferentes tiempos de cocción y lavado con agua (Tabla 4), pero los diversos tratamientos no produjeron mayor pérdida de metionina disponible. Según Gómez-Brenes *et al.* (14) y Hernández y Sotelo-López (15) el lavado y la cocción de *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus coccineus* tampoco afectaron el contenido de metionina. Si bien la cocción no afectó el contenido de azufre en el tarwi, la extracción de los alcaloides por lavado con agua se tradujo en una pérdida de azufre, probablemente inorgánico, debido a su mayor solubilidad en agua.

Al igual que otras leguminosas de grano, el de tarwi puede ser procesado en diferentes formas. La Tabla 5 muestra la influencia de su procesamiento sobre el contenido de metionina disponible y azufre. El proceso de desamargado tradicional del lupino (45 minutos de cocción y tres días de remojo en agua) sólo afectó ligeramente el contenido de metionina disponible. No obstante, el procesamiento industrial de extracción de aceite con hexano sí reduce marcadamente este valor, de 0.70 a 0.59 g/100 g proteína, lo que posiblemente se deba al calor que se desarrolló durante el tostado del grano, afectando la disponibilidad de aminoácidos azufrados. Asimismo, el desamargado con alcohol de la harina desengrasada de lupino, reduce el contenido de metionina disponible en 23% debido supuestamente al mismo efecto del calor y del lavado con alcohol. El contenido de metionina disponible en el aislado de proteína de lupino se ve afectado todavía en mayor proporción y es reducido hasta 0.32 g/100 g proteína. Esto significa una disminución del 54% debido a que durante su procesamiento gran parte de la metionina se ubica en la fracción insoluble, es decir en el residuo de este proceso. Rodríguez *et al.* (7) observaron el mismo efecto en *Lupinus mutabilis*, al igual que Ruiz y Hove (16) en *Lupinus angustifolius*, ambos siguiendo métodos de cromatografía líquida. En cuanto al contenido de azufre del tarwi procesado, la reducción es aún más marcada. Según lo expuesto, el *Lupinus mutabilis* es deficiente en aminoácidos azufrados, deficiencia que se agrava con cada procesamiento adicional a que se somete.

Para mejorar la calidad proteínica del tarwi es necesario balancear su proteína con metionina o con otras fuentes ricas en aminoácidos azufrados. En la Tabla 6 se muestran los resultados de la suplementación del lupino con metionina, y de la complementación con otras proteínas de origen vegetal. Es muy notorio el hecho de que con la mezcla con cereales el contenido de metionina disponible aumenta en la mezcla proteínica. Este incremento se ve

TABLA 4

EFFECTO DEL DESAMARGADO TRADICIONAL SOBRE EL CONTENIDO DE METIONINA DISPONIBLE Y AZUFRE EN *Lupinus mutabilis*

Remojo en agua (días)	Tiempo de cocción (min)	Proteína (%o b.s.)	Metionina disponible	Azufre
			(g/100 g proteína)	
0	0	43.7	0.70	0.99
	30	43.1	0.64	—
	40	43.1	0.61	—
	50	42.8	0.63	0.97
	60	41.8	0.69	—
	\bar{x}	42.7	0.64	—
2	30	48.7	0.63	—
	40	48.9	0.64	—
	50	48.9	0.66	0.74
	60	48.9	0.66	—
	\bar{x}	48.9	0.65	—
3	30	48.4	0.66	—
	40	48.1	0.59	—
	50	48.9	0.64	0.71
	60	48.7	0.64	—
	\bar{x}	48.5	0.63	—
4	30	48.8	0.61	—
	40	48.8	0.61	—
	50	48.7	0.66	0.72
	60	48.2	0.66	—
	\bar{x}	48.6	0.64	—

TABLA 5
CONTENIDO DE PROTEINA, METIONINA DISPONIBLE Y AZUFRE
EN *Lupinus mutabilis* SOMETIDO A DIFERENTES
PROCESAMIENTOS

Proceso	Proteína (% b.s.)	Metionina disponible	Azufre
		(g/100 g proteína)	
Crudo	43.3	0.70	0.99
45 minutos de cocción y 3 días de lavado	48.6	0.64	0.79
Desengrasado con hexano	55.3	0.59	0.75
Desengrasado y desamar- gado con alcohol	70.0	0.53	0.68
Aislado proteínico	98.2	0.32	0.53

TABLA 6
CONTENIDO DE METIONINA DISPONIBLE, AZUFRE Y PER
DE LUPINO (*Lupinus mutabilis*) SOLO Y CON OTRAS FUENTES
PROTEINICAS

Muestra	Metionina disponible	Azufre	PER*
	(g/100 g proteína)		
Lupino desamargado con agua	0.74	1.26	1.24
Lupino + 0.1% de metionina	1.75	1.37	2.03
Lupino + 0.2% de metionina	2.50	1.50	2.18
Lupino + 0.3% de metionina	3.34	1.68	2.24
Lupino desengrasado y desamargado	0.53	0.68	0.96
Aislado de lupino	0.32	0.53	0.46
Avena-lupino	1.85	1.71	2.16
Quinoa-lupino	1.64	1.68	2.19
Maíz-lupino	1.50	1.79	2.12
Arroz-lupino	1.48	1.60	2.08
Trigo-lupino	1.45	1.52	2.02
Papa-lupino	1.14	1.41	1.59

* Corregido de acuerdo a Campbell (18).
 Mezclas 50/50 en base a la proteína.

reflejado en los valores del índice de eficiencia proteínica (PER), comprobándose que los aminoácidos azufrados son los primeros aminoácidos limitantes. Por esta razón, la mezcla de la proteína del tarwi con la proteína de la papa, que también es ligeramente deficitaria en aminoácidos azufrados, resulta en un PER relativamente bajo.

Por otro lado, la mezcla de quinua-lupino tiene un contenido de metionina disponible menor que el de la mezcla de avena-lupino, pero sus valores de PER resultaron ser iguales.

Como revela la Figura 1, al aumentar el contenido de metionina disponible en una dieta hasta 1.74, el valor de PER acusa un incremento logarítmico. El aumento adicional de metionina ya no tendría efecto, porque un segundo aminoácido comenzaría a limitar el valor de la calidad proteínica. Llama la atención el hecho que la correlación entre el PER y la metionina disponible sea muy alta ($r = 0.98$), no habiéndose considerado el contenido de cisteína.

La relación PER-azufre para los 12 valores que figuran en la Tabla 6 fue lineal ($r = 0.94$, $P \leq 0.001$). Según la Figura 2, el análisis de regresión permite inferir que es posible estimar el valor de la eficiencia de la proteína del tarwi y de otras leguminosas a través de la determinación de azufre total, tal como lo sugirieron Miller y Naismith (17). La aglomeración de valores en la parte alta de la línea de regresión, refleja también el efecto de la existencia de un segundo aminoácido limitante, pero este efecto no es tan marcado como en el caso de la relación metionina disponible-PER, debido a que el azufre de la metionina solamente es una parte del azufre total.

Con la finalidad de cuantificar el contenido de metionina disponible a partir del contenido de azufre, se halló el coeficiente de correlación lineal ($r = 0.83$, $P \leq 0.001$) para este par de variables (Figura 3). Los resultados permiten estimar el contenido de metionina disponible de una muestra a partir de la determinación de azufre, con la ventaja de que la cuantificación de azufre es un método más sencillo.

Puede concluirse, pues, que desde el punto de vista de sencillez, el método colorimétrico para la determinación de metionina disponible se presta para predecir la calidad de proteínas deficientes en aminoácidos azufrados, como son las de leguminosas. Además, este método permite detectar pequeñas diferencias en la calidad, ya que existe una alta correlación entre la metionina disponible y el PER. No menos significativo, el método de metionina disponible no es solamente costoso, sino que también requiere una

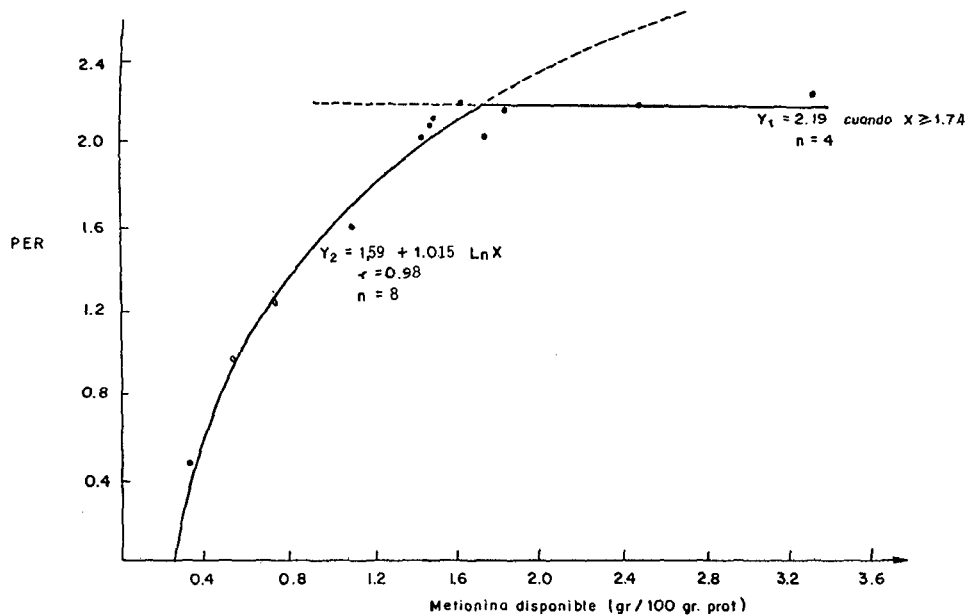


FIGURA 1

Relación PER-metionina disponible de *Lupinus mutabilis*, solo y con otras fuentes proteínicas

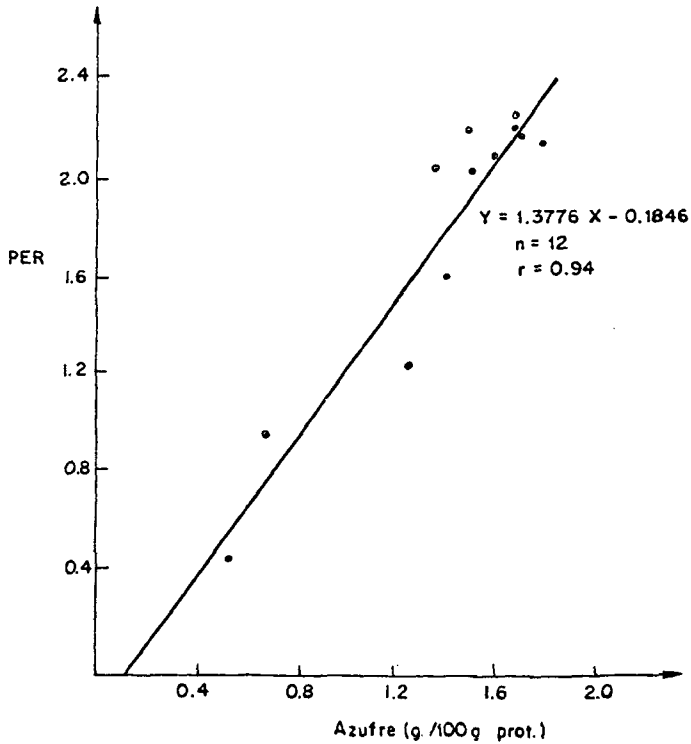


FIGURA 2

Relación PER-azufre de *Lupinus mutabilis*, solo y con otras fuentes proteínicas

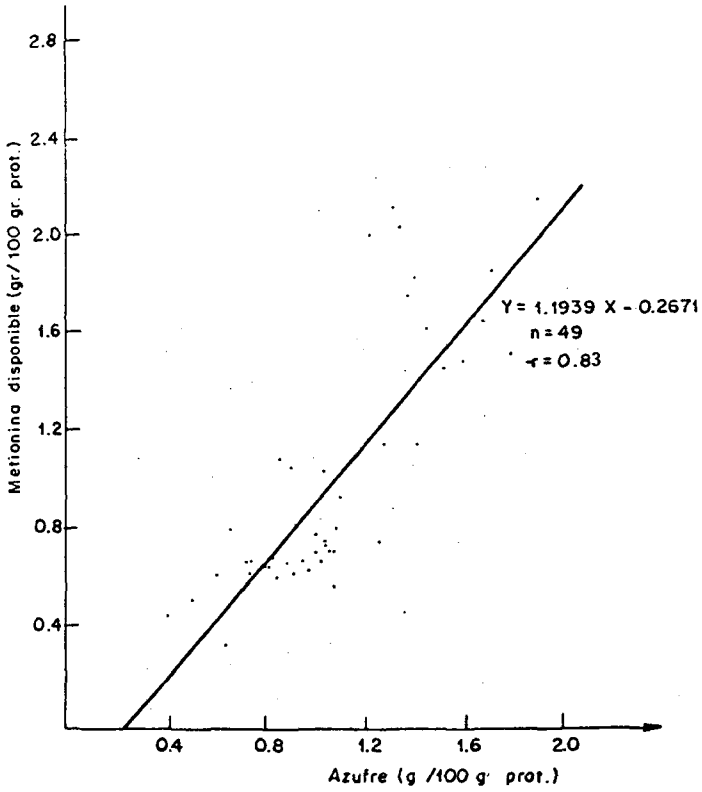


FIGURA 3

Relación metionina disponible-azufre de *Lupinus mutabilis*, solo y con otras fuentes proteínicas

cantidad muy pequeña de muestra, lo que es muy importante para el fitomejorador.

SUMMARY

PHENOTYPIC AND TECHNOLOGICAL INFLUENCE OF THE *Lupinus mutabilis* (Tarwi) SEED ON THE METHIONINE AND SULPHUR AVAILABILITY

The present study was carried out to determine the content of available methionine and sulphur in seed cultivars of *Lupinus mutabilis* from different Andean regions, and to study the influence of processing on methionine and sulphur contents. An additional objective was to evaluate interrelationships among these chemical characteristics and protein quality, as measured by the protein efficiency ratio (PER) method.

Results revealed a high variability in the content of available methionine and sulphur between the different ecotypes and varieties of *Lupinus mutabilis*.

Fertilization with CaSO_4 (200 kg/ha) did alter the content of available methionine and sulphur in *Lupinus albus* seeds. Traditional water-debittering of lupines did not affect the methionine content of the seeds, whereas oil-extraction and alcohol-debittering led to a decrease in available methionine (14 and 23% reduction, respectively). Production of a protein isolate further reduced the methionine content (54%). Regression analysis revealed a high correlation between available methionine and sulphur ($r = 0.83$), between sulphur and PER ($r = 0.98$) in the processed lupine samples, and lupine mixtures with other protein sources.

BIBLIOGRAFIA

1. Schoeneberger, H., R. Gross, H. D. Cremer & I. Elmadfa. Composition and protein quality of *Lupinus mutabilis*. *J. Nutr.*, **112**: 70-76, 1982.
2. Hill, G. D. The composition and nutritive value of lupin seed. *Nutr. Abst. Revs.*, **47** (8): 511-529, 1977.
3. Schoeneberger, H., O. Sam, R. Gross, H. D. Cremer & I. Elmadfa. Die Proteinqualität von *Lupinus albus* und *Lupinus mutabilis*. *N.* **25** 7: 667-674, 1981.
4. Pieniazek, D., M. Rakowska, W. Skilladziowa & Z. Grabarek. Estimation of available methionine and cysteine in proteins of food products by *in vivo* and *in vitro* methods. *Brit. J. Nutr.*, **34**: 175-190, 1975.

5. Bleitgen, R., R. Gross & U. Gross. Die Lupine - ein Beitrag zur Nahrungsversorgung in den Anden. 5. Z. *Ernaehrungsw.*, **18**: 104-111, 1979.
6. Hatzold, T., J. Gonzáles, M. Bocanegra, R. Gross & I. Elmadfa. Possibilities of lupine debittering through extraction with different solvents. In: **Agricultural and Nutritional Aspects of Lupines**. R. Gross and E.S. Bunting (Eds.). **GTZ Schriftenreihe Nr.**, 125, p. 333-349, 1982.
7. Rodríguez, T., T. Aliaga, H. Schoeneberger & R. Gross. Establecimiento de las condiciones óptimas a nivel de laboratorio y de planta piloto para la preparación de un aislado proteínico. **Arch. Latinoamer. Nutr.**, **41**: 782-795, 1981.
8. Association of Official Agricultural Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 11th. ed. Washington D. C., The Association, 1970.
9. Blanchar, R. W., G. Rehm & A. Caldwell. Sulphur in plant materials by digestion with nitric and perchloric acid. **Soil Sci. Soc. Amer. Proc.**, **65**: 71-72, 1965.
10. Munck, L. Improvement of nutritional value in cereals. **Hereditas**, **72**: 1-128, 1972.
11. Gross, R. Composition and protein quality of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*). Presentado en: **XII International Congress of Nutrition, San Diego, California, 16-21 August 1981**.
12. Gillespie, J., R. Glagrove & P. Randall. Effect of sulphur supply on the seed globulin composition of various species of lupin. **Aust. J. Plant Physiol.**, **15**: 641-650, 1978.
13. Herbert, S. & G. Hill. Effect of P, K and S fertilizers on the amino acid composition of *Lupinus angustifolius* C. V. Uniharvest seed. **Proc. Agron. Soc. New Zealand**, **6**: 65-67, 1976.
14. Gómez, B. F., L. Elías, M. Molina, G. de la Fuente & R. Bressani. Changes in chemical composition and nutritive value of common beans and other legumes during house cooking. In: Nutritional aspects of common beans and other legume seeds as animal and human foods. En: **Proceedings of a Meeting in Riberão Preto, Nov., 1973**, p. 93-108.
15. Hernández, M. & M. Sorelo-López. Calidad nutritiva del ayocote suplementado con metionina en diferentes etapas de cocción. **Arch. Latinoamer. Nutr.**, **30**: 99-116, 1980.
16. Ruiz, L. P. & E. L. Hove. Conditions affecting production of a protein isolate from lupin seed kernels. **J. Sci. Food Agr.**, **27**(7): 667-674, 1976.
17. Miller, D. & D. Naismith. A correlation between sulphur content and net dietary protein value. **Nature**, **158**(182): 1786-1787, 1958.
18. Campbell, I. A. Evaluation of protein in foods for regulatory purposes. **J. Agr. Food Chem.**, **8**: 323-327, 1960.