

Grado de concordancia entre la digestibilidad de proteínas animales y vegetales medidas *in vivo* e *in vitro* y su efecto sobre el cómputo químico

Diamela Carias¹, Anna M. Cioccia² y Patricio Hevia³

Laboratorio de Nutrición, Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela

RESUMEN. La determinación de la digestibilidad proteica de un alimento es un factor importante en la estimación de su calidad proteica por el método del cómputo químico. Debido a que la digestibilidad proteica se puede determinar por varios métodos, en este estudio se compararon tres métodos *in vitro* (pH drop, pH stat y digestibilidad a la pepsina) con dos métodos *in vivo* (digestibilidad verdadera y digestibilidad aparente en ratas) en la determinación de la digestibilidad proteica de dos proteínas de origen animal: caseína y harina de pescado y cuatro proteínas de origen vegetal: soya, trigo, maíz y caraotas. Los resultados mostraron que cuando las proteínas del alimento evaluado tienen una digestibilidad alta, los métodos *in vivo* e *in vitro* concuerdan. Sin embargo, cuando la digestibilidad es baja, este acuerdo es mucho menor e incide notablemente en el cómputo químico de las proteínas estudiadas. Así por ejemplo, cuando el cómputo químico de las proteínas estudiadas se corrigió por la digestibilidad medida *in vivo* los resultados en orden decreciente fueron: caseína 83.56, soya 76.11, caraotas-maíz 58.14, harina de pescado 55.25, caraotas (*Phaseolus vulgaris*) 47.93, maíz 46.06 y trigo 32.77. En contraste, cuando se utilizó la digestibilidad medida por el método de la pepsina para corregir el cómputo, la calidad de la harina de pescado medida en esta forma pasó al último lugar. En general, estos resultados indican que para proteínas no convencionales o proteínas conocidas pero que se han sometido a procesamiento los mejores métodos para determinar su digestibilidad son los métodos *in vivo*.

SUMMARY Agreement between the protein digestibility of animal and vegetable proteins measured *in vivo* and *in vitro* and its effect on the chemical score. Protein digestibility is a key factor in the determination of protein quality using the chemical score. Since there are several methods available for determining protein digestibility the purpose of this study was to compare three methods *in vitro* (pH drop, pH stat and pepsin digestibility) and two methods *in vivo* (true and apparent digestibility in rats) in the determination of the protein digestibility of: casein, soy protein isolate, fish meal, black beans, corn meal and wheat flour. The results showed that in the case of highly digestible proteins all methods agreed very well. However, this agreement was much less apparent in the case of proteins with digestibilities below 85%. As a result, the chemical score of these proteins varied substantially depending upon the method used to determine its digestibility. Thus, when the chemical score of the proteins analyzed was corrected by the true protein digestibility measured in rats, they ranked as: casein 83.56, soy 76.11, corn-beans mixtures (1:1) 58.14, fish meal 55.25, black beans 47.93, corn meal 46.06 and wheat flour 32.77. In contrast, when the chemical score of these proteins was corrected by the pepsin digestibility method, the lowest quality was assigned to fish meal. In summary, this results pointed out that for non conventional proteins or for known proteins which have been subjected to processing, protein digestibility should be measured *in vivo*.

INTRODUCCION

Aunque en la actualidad, el concepto de calidad proteica es esencialmente el mismo que definió Mitchel (1) y que se basa en el nitrógeno que un organismo es capaz de retener a partir de la proteína consumida, la forma de determinarla ha cambia-

do radicalmente. Así, las proposiciones más recientes, basadas en los altos requerimientos de la rata por algunos aminoácidos presentes en bajas concentraciones en las proteínas vegetales, (2,3) establecen que el cómputo químico, un método realizado totalmente *in vitro*, debe reemplazar a los métodos *in vivo* que había prevalecido como los únicos válidos desde principios de este siglo.

El cómputo químico no es un método nuevo, también fue propuesto por Block y Mitchell(4) y fue criticado por años debido a que la concentración aminoacídica de un alimento no refleja necesariamente su disponibilidad *in vivo*. Esto, se

1 Investigador
2 Profesor Asociado
3 Profesor Titular y autor para correspondencia

demostró en el caso de la lisina, cuya disponibilidad disminuye notablemente con el tratamiento térmico (5), situación que probablemente se extiende a otros aminoácidos. Asimismo, la disponibilidad de los aminoácidos se afecta por compuestos tóxicos naturalmente presentes en los alimentos (6), por la estructura propia de las proteínas (7) e incluso su utilización puede variar de acuerdo a la proporción de los aminoácidos dentro de una proteína, como se ha demostrado por los antagonismos existentes entre algunos de ellos (8).

Con el fin de obviar en parte los problemas asociados con el cómputo químico se ha propuesto que la concentración aminoacídica del alimento evaluado, sea corregida por su digestibilidad, ya que ésta refleja un poco mejor, la biodisponibilidad de los aminoácidos (9-11). Para ello, se utiliza la digestibilidad verdadera, determinada en experimentos con ratas (2,3) ya que se ha establecido que la digestibilidad de las proteínas es similar en la rata y el humano (12,13).

Sin embargo, con el fin de reducir el tiempo, el costo y la cantidad del alimento necesario para determinar la digestibilidad proteica, se han desarrollado procedimientos *in vitro* que correlacionan altamente con los métodos *in vivo* (13). Entre estos el de la pepsina (14) es ampliamente utilizado y da resultados muy satisfactorios, pero requiere de incubaciones relativamente largas del producto con las enzimas, así como de la determinación del nitrógeno que se solubiliza por la acción de estas enzimas. Por estas razones, se han estandarizado dos métodos rápidos para predecir digestibilidad que utilizan una mezcla de tres enzimas (tripsina, quimiotripsina y peptidasa) y que se basan en la disminución del pH en la suspensión del alimento ocasionada por los protones liberados durante la proteólisis. Debido a la alta correlación entre el pH y la digestibilidad *in vivo* para las proteínas estudiadas por esos dos métodos, la simple medición del pH, en el caso del pH drop (15), o midiendo la cantidad de NaOH consumida para mantener el pH constante, en el caso del método pH stat (16), permite tener un estimado de la digestibilidad de la proteína.

Los valores de digestibilidad *in vitro* obtenidos con el método pH drop presentan altas correlaciones con los de digestibilidad proteica aparente en ratas, en investigaciones realizadas para una variedad de proteínas vegetales (15). Igualmente, la digestibilidad *in vitro* obtenida por el método pH stat correlacionó bien con valores de digestibilidad verdadera en ensayos con ratas (16); tanto para proteínas de origen vegetal ($r=0,85$), como para proteínas de origen animal ($r=0,92$). Este último método, resultó además, altamente reproducible en una investigación interlaboratorio donde participaron seis laboratorios (17).

Sin embargo, también se ha reportado que tanto el método del pH drop como el método del pH stat no concuerdan con los resultados de digestibilidad *in vivo* para una variedad de alimentos y forrajes (13,18,19). Básicamente, hasta ahora las proteínas estudiadas por estos dos métodos, han sido en general, altamente digestibles, de manera que poco se sabe del funcionamiento de estos métodos para proteínas de baja

digestibilidad, como proteínas vegetales del tipo leguminosas o de productos procesados (13).

De acuerdo con lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la utilidad de los métodos del pH drop, pH stat y pepsina en la estimación de la digestibilidad de seis proteínas, cuatro de origen vegetal: soya, trigo, maíz y caraotas negras (*Phaseolus vulgaris*) y dos de origen animal: caseína y harina de pescado. Para ello, los valores obtenidos con los métodos *in vitro*, se compararon con los obtenidos en un ensayo con ratas que permitió establecer la digestibilidad verdadera y aparente de estos mismos alimentos.

MATERIALES Y METODOS

Muestras: Se estudiaron cinco fuentes de proteína de origen vegetal: harina de maíz, harina de trigo (ambas obtenidas en un mercado local), harina de caraotas negras (*Phaseolus vulgaris*) preparada en el laboratorio, mezcla caraota-maíz (1:1), y aislado proteico de soya (SUPRO 620 Protein Technologies International). También se incluyeron dos fuentes de origen animal: caseína (ANRC) y harina de pescado (obtenida de una empresa procesadora de atún).

Para la preparación de la harina de caraotas, aproximadamente 5 Kg. de caraotas negras fueron remojadas durante una noche en 8 litros de agua. Seguidamente fueron sometidas a un proceso de cocción en autoclave, a 121°C y 115 lb de presión por 20 minutos. Luego los granos fueron secados en estufa a 70°C por 48 horas y se molieron en un molino de martillo.

Digestibilidad *in vivo*: Para el ensayo biológico se utilizaron 40 ratas machos de la cepa «Sprague-Dawley» de 21 días de edad, las cuales fueron distribuidas aleatoriamente en 8 grupos de 5 ratas cada uno con promedios y desviaciones de peso similares. Inicialmente los animales se sometieron a un proceso de acondicionamiento por tres días consumiendo una dieta control a base de caseína suplementada con metionina (20). Posteriormente fueron alimentados con las dietas experimentales (Tabla 1) que contenían las diferentes proteínas a estudiar a un nivel del 10% a excepción del maíz que se utiliza al 8%, por un período de 12 días. Además se incluyó un grupo de ratas que consumió una dieta libre de proteína, con el fin de determinar la digestibilidad verdadera de las proteínas en estudio.

Durante los últimos tres días del experimento, se colectaron las heces, que fueron secadas y molidas para determinar su contenido de nitrógeno por el método de Hevia y Cioccia (21). Con estos datos y el nitrógeno consumido, determinado con la misma metodología, se calculó la digestibilidad aparente y verdadera según las recomendaciones de Mc Donald y Crampton (22).

TABLA 1
COMPOSICION DE LA DIETA CONTROL Y DE LAS
DIETAS EXPERIMENTALES

Ingredientes	g/100 g de dieta
Proteína ¹	10.0
Aceite de maíz	5.0
Mezcla de minerales ²	3.5
Mezcla de vitaminas ²	1.0
Bitartrato de colina	0.2
Almidón de maíz	c.s.p. 100

¹ Caseína suplementada con metionina en el caso de la dieta control y aislado proteico de soya, harina de maíz, harina de trigo, harina de caraota, mezcla caraotas-maíz (1:1) y harina de pescado para las dietas experimentales. Estas proteínas fueron incorporadas a expensas del almidón para aportar el 10% de proteína en la dieta. La excepción fue la dieta con maíz cuyo nivel de proteína fue de 8%. La concentración proteica de los productos utilizados en base húmeda fue: caseína 92%, aislado de soya 86%, harina de pescado 74%, harina de caraotas 24%, mezcla caraota maíz (1:1) 16%, harina de trigo 13% y harina de maíz 9%.

² Mezclas AIN (20).

Digestibilidad *in vitro*: Se utilizaron los métodos del pH drop, pH stat, y el método de la pepsina descritos por Hsu y col (15), Pedersen y Eggum (16) y Akesson y Stahmann (14), respectivamente. Todas estas determinaciones se realizaron por cuadruplicados.

Cómputo químico: Se calculó como el cociente entre la concentración de amino ácidos presentes en la proteína en estudio (mgAA/ mgN) (23) y el requerimiento aminoácido de niños de tres a cuatro meses (24). Los resultados se expresaron como el porcentaje del primer aminoácido limitante en cada una de las proteínas estudiadas.

Análisis estadísticos: Los resultados se analizaron usando análisis de varianza y de correlación. Las medias se compararon con el método de los rangos múltiples de Duncan. El nivel de significancia se fijó al 5% (25). Los cálculos se realizaron con el paquete estadístico BMDP de la BMDP Statistical Software Inc.

RESULTADOS Y DISCUSION

La digestibilidad proteica de las muestras de soya, caseína, trigo, maíz, mezcla caraota-maíz (1:1), caraotas y harina de pescado determinadas *in vivo* en ratas e *in vitro* por los tres métodos enzimáticos, se muestra en la Tabla 2.

De esta Tabla podemos observar que el estudio con ratas indicó que la digestibilidad verdadera de todas las proteínas analizadas fue mayor que su digestibilidad aparente. Esto era de esperarse, ya que la digestibilidad aparente no considera las pérdidas obligatorias de nitrógeno en las heces, que aquí se determinaron en base a la excreción de nitrógeno del grupo apteico y que en promedio alcanzó a 11.2 ± 1.25 mg de nitrógeno por día.

La Tabla 2 también muestra que para las proteínas de soya, caseína, trigo y maíz, se obtuvieron los valores más altos de digestibilidad proteica, independientemente de si el método utilizado para su determinación fuera *in vivo* (91-97%) o *in vitro* (92-98%). Asimismo se observa que en general, en el caso de estas proteínas, los valores obtenidos por los métodos del pH drop y el pH stat resultaron muy similares a los de su digestibilidad verdadera. En contraste, los valores obtenidos por el método de la pepsina, fueron menores a los obtenidos con los otros métodos enzimáticos y muy similares a los resultados de digestibilidad aparente medida en el ensayo con ratas. Además, los resultados obtenidos para la digestibilidad de estas proteínas coinciden con los reportados por la literatura (19,26,27).

TABLA 2
DIGESTIBILIDAD DE PROTEINAS DE ORIGEN VEGETAL Y ANIMAL DETERMINADA *IN VIVO* EN RATAS E *IN VITRO* POR LOS METODOS PH DROP, PH STAT Y PEPSINA

Proteína	In vivo		In Vitro		
	Verdadera	Aparente	pH drop	pH stat	Pepsina
Caseína	97.16 ^{aV}	94.76 ^{bV}	97.03 ^{aV}	97.88 ^{aY}	93.95 ^{bY}
Soya	96.69 ^{aV}	94.73 ^{bV}	94.62 ^{abVW}	94.21 ^{abX}	93.03 ^{bVW}
Maíz	95.97 ^{aVW}	91.94 ^{bW}	95.22 ^{aVW}	94.08 ^{abX}	92.44 ^{bW}
Trigo	94.54 ^{bW}	91.10 ^{cW}	94.02 ^{bW}	96.12 ^{aW}	93.78 ^{bY}
Caraotas-maíz	84.48 ^{aX}	81.68 ^{bX}	83.76 ^{bW}	86.61 ^{aY}	86.09 ^{aX}
Caraotas	79.08 ^{aY}	75.85 ^{bY}	77.73 ^{bY}	82.81 ^{aZ}	75.52 ^{bY}
H. pescado	68.05 ^{cZ}	65.35 ^{dZ}	75.92 ^{bY}	82.13 ^{aZ}	38.73 ^{eZ}

La tabla muestra la media de 5 ratas en el caso de la digestibilidad *in vivo* y de cuatro réplicas en el caso de la digestibilidad *in vitro*. Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes con $\alpha=0.05$ de acuerdo el método Duncan. Letras (a-e) comparan medias entre métodos y letras (v-z) comparan medias entre proteínas.

Adicionalmente, la Tabla 2 muestra que comparativamente con las otras proteínas estudiadas, la mezcla caraota-maíz presentó valores intermedios de digestibilidad y su digestibilidad proteica medida *in vitro*, independientemente del método empleado, fue similar a la de su digestibilidad verdadera medida en ratas.

La digestibilidad de la harina de caraotas medida por todos los métodos empleados, resultó menor que todas las proteínas anteriores y en este caso aunque en general se aprecia un buen acuerdo entre todos los métodos, de los métodos *in vitro*, sólo el obtenido con el pH stat resultó semejante a la digestibilidad verdadera medida en ratas. Los demás métodos *in vitro*, arrojaron resultados más bajos y semejantes a la digestibilidad aparente medida *in vivo*. También vale la pena destacar que los valores de digestibilidad obtenidos para esta proteína por los diferentes métodos, coinciden con los reportados por la literatura (6,26).

Como se puede apreciar en la Tabla 2, la digestibilidad más baja de todas las proteínas estudiadas, fue la de la harina de pescado. En este caso, llama la atención que en contraste con los resultados obtenidos con las proteínas anteriores, hubo un desacuerdo importante entre los métodos, y que este desacuerdo afectó mucho más drásticamente a los que se basan en determinaciones *in vitro*. Así, comparativamente con los métodos *in vivo*, tanto el método del pH stat como el del pH drop sobrestimaron la digestibilidad proteica de este producto mientras que el método de la pepsina la subestimó notablemente, indicando que los métodos *in vitro* no son apropiados para estimar la digestibilidad de proteínas de baja digestibilidad como es el caso de esta harina de pescado, que es un producto que fue sometido a un severo tratamiento térmico.

La subestimación de la digestibilidad de la harina de pescado cuando se utiliza el método de la pepsina, indica que el aparato digestivo de la rata es mucho más efectivo que la mezcla de pepsina y pancreatina utilizada en este ensayo *in vitro*, para digerir esta proteína. La sobrestimación de la digestibilidad por parte de los métodos pH drop y pH stat para este tipo de proteínas, es más difícil de explicar pero puede deberse a que estos métodos están diseñados exclusivamente para proteínas de alta digestibilidad y las propias ecuaciones diseñadas para el cálculo de la digestibilidad limitan su uso. Así, si en el corto tiempo que duran estos ensayos, el pH no cambia o no hay utilización de hidróxido de sodio debido a una insuficiente hidrólisis de enlaces peptídicos, el método del pH stat predeciría una digestibilidad de 79.28% y el pH drop de 66% ya que estos son los interceptos de las curvas utilizadas en la estimación de la digestibilidad (15,16).

En la Tabla 2, las proteínas estudiadas, se ordenaron en forma decreciente, de acuerdo a su porcentaje de digestibilidad medida *in vivo* y este orden fue idéntico en el caso de la digestibilidad tanto verdadera como aparente. Sin embargo, este orden no se mantuvo igual en el caso de las determinaciones *in vitro* así por ejemplo, el método del pH stat que en general arrojó los resultados más altos de digestibilidad, ubicó

a la proteína del trigo en segundo lugar y a la soya y el maíz compartiendo el tercer lugar. El pH drop no detectó diferencias entre las harinas de caraotas y la de pescado mientras que el método de la pepsina que en general arrojó resultados más bajos que los demás métodos ubicó al trigo sobre el maíz.

La Tabla 3 muestra que de acuerdo con la información reportada en la literatura (15,16), los coeficientes de correlación entre la digestibilidad media *in vitro* por los tres métodos aquí empleados y la digestibilidad *in vivo* fueron muy altos. Estos resultados sin embargo, contrastan muy claramente con la discusión anterior y confirman que el análisis de correlación aunque útil para detectar tendencias, no resulta apropiado para comparar métodos analíticos (27).

TABLA 3
CORRELACION (r) ENTRE LA DIGESTIBILIDAD
PROTEICA *IN VIVO* Y LA DETERMINADA *IN VITRO*
POR LOS METODOS PH DROP, PH STAT Y PEPSINA

Digestibilidad <i>in vitro</i>	Digestibilidad <i>in vivo</i>	
	Verdadera	Aparente
pH Drop	0.938	0.935
pH Stat	0.918	0.920
Pepsina	0.931	0.929

Las observaciones anteriores las confirma la Figura 1 que muestra la relación entre la digestibilidad verdadera de las siete proteínas estudiadas (eje x) y la digestibilidad de las mismas proteínas determinada en ratas sin corregir por el nitrógeno endógeno (digestibilidad aparente) así como por los tres métodos enzimáticos. En esta figura se aprecia que tal como indica el estudio de correlación, en todos los casos a medida que aumenta la digestibilidad verdadera también aumenta la digestibilidad determinada por los demás métodos. Sin embargo, la figura también muestra que a pesar que la concordancia entre los métodos es buena cuando la digestibilidad es igual o mayor que 85%, esta se pierde en forma notable cuando la digestibilidad es más baja.

FIGURA 1
Digestibilidad verdadera de las 7 proteínas analizadas
vs la digestibilidad de las mismas determinada por los
demás métodos

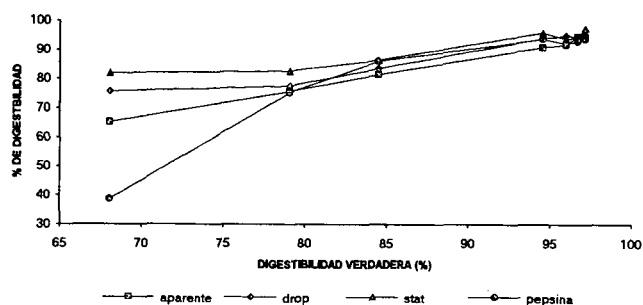


TABLA 4
 COMPUTO QUIMICO (CQ) Y COMPUTO QUIMICO CORREGIDO POR LA DIGESTIBILIDAD PROTEICA DETERMINADA IN VIVO (VERDADERA Y APARENTE) E IN VITRO (PH DROP, PH STAT Y PEPSINA) ESTIMADO TEORICAMENTE PARA NIÑOS DE 3 A 4 MESES DE EDAD

Proteína	CQ	CQ x Dig. Verdadera	CQ x Dig. Aparente	CQ x pH Drop	CQ x pH Stat	CQ x Pepsina
	%	%	%	%	%	%
Caseína	86.00	83.56	81.49	83.45	84.18	80.80
H. Pescado	81.20	55.25	53.06	61.64	66.69	31.45
Soya	78.72	76.11	74.57	74.49	74.16	73.23
Car-Maíz	68.82	58.14	56.21	57.64	59.61	59.25
Caraotas	60.61	47.93	45.97	47.11	50.19	45.77
Maíz	48.00	46.06	44.13	45.71	45.16	44.37
Trigo	34.67	32.77	31.58	32.60	33.32	32.51

La tabla muestra el porcentaje de los requerimientos aminoacídicos de niños de 3-4 meses que satisface el primer aminoácido limitante en cada una de las proteínas estudiadas. El aminoácido limitante de la caseína y la soya fue la treonina, del maíz y el trigo fue la lisina, las caraotas y la mezcla caraotas-maíz (1:1) fueron los aminoácidos azufrados y de la harina de pescado fue la leucina. La composición aminoacídica de las proteínas y los requerimientos se obtuvieron de las referencias 23 y 24 respectivamente.

La Tabla 4 muestra el cómputo químico de las proteínas estudiadas, calculado para niños de 3 a 4 meses, sin corregir y corregido por su digestibilidad, medida por todos los métodos utilizados. Para el cálculo del cómputo químico se recomienda utilizar los requerimientos de niños de 2-5 años (2,28). Sin embargo en este estudio se escogieron los requerimientos de niños de 3-4 meses, ya que este grupo etario es el que tiene las más altas exigencias aminoacídicas, con lo cual la importancia de la digestibilidad resulta más aparente.

En la Tabla 4 se observa que en contraste con los datos de digestibilidad (Tabla 2), el cómputo químico de las dos proteínas animales fue mayor que el de las proteínas vegetales. Sin embargo cuando el cómputo químico se corrigió por la digestibilidad, este orden no se mantuvo siempre así. Por ejemplo, cuando la digestibilidad se determinó in vivo la calidad proteica tanto de la soya como de la mezcla de caraotas-maíz resultaron más alta que la de la harina de pescado, pero la harina de pescado fue superior a todas las demás proteínas vegetales. En contraste, la Tabla 4 muestra que cuando la digestibilidad se determinó por los métodos del PH drop o el pH stat el orden del cómputo químico de las proteínas fue idéntico al obtenido sin corregir por digestibilidad, a excepción de la soya cuya calidad fue intermedia entre las dos proteínas de origen animal, mientras que el método de la pepsina le asignó a la harina de pescado una calidad proteica menor que a todas las proteínas estudiadas.

En líneas generales, estos resultados muestran que la digestibilidad es un factor de corrección crítico en la determinación de la calidad proteica por el método del cómputo químico. Esto lo soporta el hecho que proteínas con un buen

perfil aminoacídico como son las proteínas del pescado, pueden perder completamente esta característica nutricional por la reducción en su digestibilidad, atribuible en este caso al energético tratamiento térmico utilizado para la obtención de la harina. Sin embargo, estos resultados también muestran que el método escogido para determinar la digestibilidad es de vital importancia ya que puede cambiar completamente el valor de calidad obtenido, particularmente en el caso de proteínas de baja digestibilidad.

De estos resultados se concluye que si el objetivo es establecer la digestibilidad de una proteína no convencional, o de una proteína conocida pero que se ha sometido a operaciones energéticas durante su procesamiento, el mejor método es utilizar animales de experimentación en lugar de mezclas de enzimas que tratan de imitar el proceso de digestión fisiológico.

REFERENCIAS

1. Mitchell H. A method of determining the biological value of proteins. *J. Biol Chem* 58: 873-922, 1923.
2. FAO/WHO. Report of joint FAO/WHO Expert Consultation Committee on Protein Quality Evaluation. Bethesda, MD. 1989.
3. Young, V.R. & P.L. Pellet. Protein evaluation, amino acid scoring and the Food and Drug Administration's proposed food labeling regulations. *J. Nutr.* 121: 145-150, 1991.
4. Block, R.J. & H.H. Mitchell. The correlation of the amino acid composition of proteins with their nutritive value. *Nutr. Abstr. Rev.* 16: 249-278. 1946.
5. Carpenter, K.J. Estimation of the available lysine in animal protein foods. *Biochem J.* 77:604-610. 1960.

6. Liener I.E. Legume toxins in relation to protein digestibility. A review. *J. Food Sci.* 41: 1076-1081. 1976.
7. Levy Benshimol A. & R.A. García. Biological digestibility of the globulinic fraction of *Phaseolus vulgaris* seeds in mice. *Nutr. Rept. Intl.* 34: 509-520. 1986.
8. Millán, N.; O. Brito & P. Hevia. Calidad nutricional de las proteínas de soya y caseína dañadas térmicamente y determinada *in vivo* por un método enzimático. *Arch. Lat. Nutr.* 34: 708-723. 1984.
9. Kies, C. Bioavailability: A factor in protein quality. *J. Agric. Food Chem* 29:453-440. 1981.
10. Harper, A.E. Mc Collum and directions in the evaluation of protein quality. *J. Agric Food Chem* 29:429-435. 1981.
11. Von der Decker, A. Experimental studies on the quality of food proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 74: 213-220. 1983.
12. Sarwar, G. & F. MC Dnough. Review of quality evaluation methods. Evaluation of protein digestibility corrected amino acid score for assessing protein quality of foods. *J. Assoc. Anal.Chem* 73:347-356. 1990.
13. Boisen, S. & B.O. Eggum. Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple stomach animals. *Nutrition Research Reviews* 4: 141-162. 1991.
14. Akeson, W.R. & M.A. Stahmann. A pepsin-pancreatin digest index of protein quality. *J. Nutr* 83: 257. 1964.
15. Hsu, H.W., D.D. Vavac, L.D. Saterlee & G.A. Miller. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Science* 42: 1269-1273. 1977.
16. Pedersen, B. & B.O. Eggum. Prediction of protein digestibility by *in vitro* enzymatic pH stat procedure. *Tierphysiol. Tierenahr. Futtermittelkd.* 49: 265-277. 1983.
17. Mc Donough, F.E., G. Sarwar, F.H. Steinke, P. Slump, S. García & J. Boisen. *In vitro* assay for protein digestibility: Interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73: 622-625. 1990.
18. Wolzak, A., R. Bressani & R. Brenes-Gómez. A comparison of *in vivo* and *in vitro* estimates of protein digestibility of native and thermally processed vegetable proteins. *Plant Foods for Human Nutr.* 31: 31-43. 1981.
19. Bodwell, C.E., L.D. Satterlee & L.R. Hackler. Protein digestibility of the sane protein preparations by human and rat assays and by *in vitro* enzymic digestion methods. *Am J Clin. Nutr.* 33:677-686. 1980.
20. American Institute of Nutrition. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.* 107: 1340-1348. 1977.
21. Hevia, P. & A.M. Cioccia. Application of a colorimetric method to the determination of nitrogen in nutritional studies with rats and humans. *Nutr. Rep. Int.* 38(6): 1129-1136. 1988.
22. Lloyd, L.E.; B.E. McDonald & Crampton. Coefficients of apparent digestibility. En: *Fundamentals of Nutrition*. Segunda Edición. Freeman & Co. Publisher. 1978.
23. Orr, M.L. & B.K. Watt. Amino acid content of foods. Home Economics Research Report N° 4. United States Department of Agriculture. Washington D.C. 1968.
24. Recommended Dietary Allowances. 10th Edition. National Academy Press. Washington D.C. 1989.
25. Steel, R.G.D. & J.H. Torrie. Principle and Procedure of Statistics. New York McGraw-Hill. 1960.
26. Pellet, P.L. Protein requirements in humans. *Amer J. Clin. Nutr.* 51: 723-737. 1990.
27. Bland J.M. & D.G. Altman. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet*. February 307-310. 1986.
28. Henley, E.C. & J.M. Kuster. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring. *Food Tech.* 48: 74-77. 1994.

Reecibido: 14-04-1994

Aceptado : 22-09-1994.