

2 Ej. No. 42



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

Facultad de Química

**Efecto del Alkali sobre la Disponibilidad del  
Tryptofano en Caseína y en Concentrado de  
Proteínas de Pescado**

**TESIS MANCOMUNADA**

Que para obtener el título de:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P r e s e n t a n :**

**Jorge Soriano Santos  
José Luis Gutiérrez Oviedo**

**1984**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

	página
I Introducción.	1
II Objetivo.	7
III Generalidades.	8
IV Diseño Experimental.	12
V Materiales y métodos.	14
5.1 Humedad.	14
5.2 Tratamiento alcalino de caseína y concentrado de proteínas de pescado con NaOH 0.1N y Ca(OH) <sub>2</sub> 0.1N.	15
5.3 Proteína cruda.	18
5.4 Preparación del hidrolizado de: caseína y CPP para la determinación del contenido de triptofano.	20
5.4.1 Hidrólisis alcalina y determinación de triptofano (Método de Miller).	20
5.4.2 Hidrólisis enzimática con pronasa a caseína y concentrado de proteínas de pescado. Determinación de Trp.	22
5.4.3 Determinación de L-triptofano.	25
5.5 Preparación de dietas.	26
5.6 Métodos estadísticos empleados.	34
VI Parte Experimental.	36
6.1 Hidrólisis enzimática de Trp "in vitro".	36
6.2 Disponibilidad de Trp "in vivo".	36
VII Resultados.	46
VIII Discusión.	69
IX Conclusiones.	76
A p é n d i c e .	78
B i b l i o g r a f í a .	79

## I. INTRODUCCION.

Los requerimientos nutricionales del ser humano, en sus diversos estados fisiológicos, fueron definidos a través de diferentes enfoques experimentales, inclusive en seres humanos directamente. Así, ácidos grasos, aminoácidos esenciales, carbohidratos, minerales y vitaminas además de agua, representan los nutrientes que se deben consumir en forma balanceada, para un funcionamiento normal del individuo. Por esta razón, ningún nutriente "ocupa el primer lugar en nutrición" (Lowenberg et al., 1970). Sin embargo, las proteínas son de primordial importancia por la relación que guardan con aspectos tecnológicos, nutricionales y político-económicos.

La calidad nutricional de las proteínas esta determinada por varios factores. Entre otros, depende de la proporción de aminoácidos presentes, de la cantidad de aminoácidos esenciales, de la disponibilidad de éstos y la digestibilidad de las proteínas (Meyer, 1960). En general, las proteínas de origen animal tienen mayor valor nutritivo. No obstante, los alimentos que las contienen son los más escasos, principalmente en los países en desarrollo. También, son los más difíciles de obtener, dados los altos costos de producción (Badui, 1981).

Las unidades estructurales de las proteínas, 20 amino

ácidos diferentes, son los responsables de muchas propiedades importantes de éstas. Nutricionalmente, para el hombre sólo 8 aminoácidos son motivo de consideración, ya que son esenciales para el ser humano y otras especies. Entre ellos destacan lisina, metionina y triptofano. Por su bajo contenido en alimentos de origen vegetal más consumidos (fuente de nitrógeno y base de la dieta del "mundo subdesarrollado", que comprende al 85% de la población mexicana (Castañón, 1981)).

El incremento acelerado de la inversión extranjera en la industria alimentaria, en México, se inicia en la década de los sesentas (Castañón, 1981). El aumento del consumo de productos industrializados, que lleva consigo esta expansión, modifica los patrones tradicionales de alimentación. Los procesos de transformación, además, alteran la calidad y características de los alimentos y en consecuencia, en muchos casos, agravan el problema nutricional. En estos casos, es probable que ocurran daños considerables en las proteínas (específicamente, pérdida y destrucción de aminoácidos, así como disminución de la digestibilidad de las proteínas). Algunos factores que intervienen en estos cambios son la temperatura, pH y sustancias presentes o ajenas a los alimentos.

El efecto inicial que se observa en proteínas sometidas a tratamientos térmicos es la desnaturalización (Priestley, 1979). En todos los casos, esto resultaba

benéfico para la calidad de las proteínas, puesto que se mejora su digestibilidad. No obstante, un calentamiento excesivo, por ejemplo 150°C durante 20 mins. a caseína o lisozima, provoca reacciones químicas, que promueven la descomposición de la mayoría de los aminoácidos. En el caso de la caseína todo el triptofano es destruido a 200 grados centígrados. Y, en el orden de descomposición de los aminoácidos (caseína a 230-250°C y 20 mins.) el triptofano es el segundo aminoácido más afectado (Fujimaki, et al., 1972). Esto ocurre en muestras relativamente puras, sin embargo, cuando están presentes otros compuestos (glucosa o linoleato de metilo) el número de posibles interacciones aumenta y el grado de descomposición también. Además del cambio en el contenido de aminoácidos de las proteínas, en algunos casos se generan D-isómeros (Hayase et al., 1979).

Por otro lado, la digestibilidad de las proteínas tratadas térmicamente, en presencia de glucosa o linoleato de metilo, disminuye considerablemente. La digestibilidad de caseína-glucosa y caseína-linoleato de metilo es de 17% y 71% respectivamente, cuando se somete a 180°C durante 20 mins., respecto a caseína no calentada (Hayase et al., 1979).

Los procesos alcalinos en proteínas y alimentos se conocen desde mucho tiempo atrás, la cocción alcalina del maíz (nixtamalización) es probablemente el más antiguo.

El desarrollo industrial permitió extender y diversificar su empleo, con la finalidad de aumentar el valor nutritivo de los alimentos, lograr ciertas "características tecnológicas" en las proteínas u obtener nuevos productos alimenticios. Algunos ejemplos de este tipo son los siguientes: solubilización y purificación de proteínas, para obtener aislados y concentrados proteínicos vegetales o animales; obtención de fibras de proteínas de soya, etc. Algunos otros han sido sugeridos, como la preservación de pescado o destrucción de aflatoxinas en granos y semillas con amoniaco gaseoso.

El uso de procesos alcalinos, sin embargo, da lugar a efectos indeseables asociados con modificaciones químicas en las proteínas. Estos efectos guardan una relación directa con la temperatura, pH y tiempo de exposición. Por ejemplo, el tratamiento de proteínas de soya con NaOH, reduce su digestibilidad, valor biológico y NPU (utilización neta de proteínas) usando ratas en estas determinaciones (De Groot y Slump, 1969). Lo anterior se explica por la destrucción de varios aminoácidos como metionina, treonina y lisina; formación de D-isómeros y modificaciones que dan lugar a la formación de nuevos residuos. Al tratar diferentes proteínas como -- lisozima, papaína, quimotripsinógeno y otras, con una solución 0.2M de NaOH a 40°C por 2 h, se forma lisinoalnina (Bohak, 1964).

En proteínas de semilla de girasol fueron identificados ornitina, lisinoalanina, aloisoleucina y lantionina después de ser expuestas a soluciones 0.05-1.0M de NaOH (5.0% p/v) y 55-80°C durante 1-18 h. La presencia de lisinoalanina y lantionina indican la formación de una red tridimensional rígida, que reduce el acceso a las proteínas durante la hidrólisis, a enzimas proteolíticas (Provensal et al., 1975). Una solución de triptofano -- (1 mg/ml de 5N de NaOH) a 100°C durante 18 h, genera el 14.14% del D-isómero, sin embargo, los aminoácidos en proteínas son fácilmente racemizados y los aminoácidos libres son racemizados con dificultad, con álcali (Spies y Chambers, 1949).

El problema de la racemización del triptofano y --- otros aminoácidos radica en que éstos no son utilizados en la síntesis de proteínas. Estos y sus metabolitos son excretados en las heces y la orina (Berg, 1953).

Ciertos animales pueden utilizar D-isómeros para síntesis de proteínas, vía inversión de configuración: la rata usa D-triptofano en un 100% (Phillips y Berg, 1954) el ratón y el pollo lo usan parcialmente, 50 y 20% respectivamente (Mc Ewan et al., 1980; Ohara et al., 1980). Y no es disponible en el caso del conejo (Loh y Berg, -- 1971).

Otras investigaciones muestran alteraciones renales (alargamiento citoplasmático y nuclear en células de la

porción recta del tubo proximal) en ratas alimentadas con una dieta que contiene 20% de proteínas tratadas con álcali. La inducción de toxicidad está correlacionada con la formación de lisinoalanina (Woodard y Short, 1973) Otros estudios no revelan efectos histiológicos adversos en similares circunstancias (Van Beek et al., 1974). En pollos y borregos alimentados con dietas que contienen proteínas tratadas con álcali se han observado deficiencias en su desarrollo, y en pollos, en altos niveles de alimentación se han observado efectos tóxicos (Whitaker y Tannenbaum, 1977).

Por otro lado, en un reciente trabajo (Tovar, 1981) se determinó la digestibilidad "in vitro" de triptofano en diversas proteínas, ricas en este aminoácido, tratadas con álcali, utilizando pronasa (proteasas de *Streptomyces griseus*) como agente hidrolítico. Sin embargo, no se han efectuado estudios donde se cuantifique D-triptofano en proteínas sometidas a tratamientos térmico-alcalinos.

## II. OBJETIVO.

1.- Evaluar la digestibilidad de triptofano "in vitro" en caseína y concentrado de proteínas de pescado (CPP)<sup>1</sup> y comparar los resultados obtenidos con caseína y CPP tratadas con álcali 0.1N de NaOH o Ca(OH)<sub>2</sub> a 85°C durante 4 h.

2.- Cuantificar el D-triptofano generado por los tratamientos alcalinos en caseína y CPP.

3.- Determinar la disponibilidad de triptofano "in vivo" en caseína y CPP tratadas con álcali y sin tratar, usando como modelo experimental pollos de 9 días de nacidos.

HIPOTESIS: el triptofano presente en caseína y CPP sufre cambios al ser tratados térmicamente caseína y CPP en soluciones de NaOH o Ca(OH)<sub>2</sub>, por lo que su actividad biológica decrece.

<sup>1</sup> Abreviaciones usadas: (CPP), concentrado de proteínas de pescado.

### III. GENERALIDADES.

El triptofano es importante como aminoácido esencial y como precursor de diversos compuestos que intervienen en el metabolismo celular (niacina y serotonina, principalmente). La niacina es una vitamina que puede formarse por una reacción secundaria del triptofano en el hígado. Grandes deficiencias de niacina y triptofano en la dieta causan pelagra, enfermedad carencial que provoca dermatitis, diarrea y demencia. La serotonina es un vasoconstrictor potente y estimulante de la contracción del músculo liso. También es un neurotransmisor que ejerce un efecto significativo en el metabolismo cerebral.

La exacta cuantificación del triptofano contenido en proteínas ofrece dificultades bien conocidas desde hace muchos años. Uno de los principales problemas radica en la preparación de las muestras (hidrólisis de proteínas) para su determinación. Más difícil aún es evaluar su aprovechamiento en organismos vivos, es decir, determinar su disponibilidad.

Aunque existen diversos métodos para la liberación del triptofano, todos están sujetos a desventajas o limitaciones técnicas, económicas o a una combinación de éstas --- (Hill y Schmidt, 1962; Mandino y Bongiovanni, 1970; Liu y Chang, 1971; Finley et al., 1975; Lischwe y Sung, 1977;

Torres, 1979). Se han utilizado para evaluarlo métodos microbiológicos y químicos (cromatografía de intercambio iónico, espectroscopía UV, espectrofluorometría, entre otros).

El triptofano es destruido durante la hidrólisis ácida particularmente en presencia de carbohidratos (Miller, -- 1967). Una fuerte afinidad de alfa cetoácidos por el --- triptofano fue reportada en un trabajo anterior (Olcott y Fraenkel, 1947). La serina es desaminada en medio ácido, para producir ácido pirúvico (Damodaran y Ramachandran, 1941) por lo que no es sorprendente encontrar una disminución en la recuperación del triptofano, en hidrólisis ácida de proteínas, con altos niveles de serina. La reacción del triptofano con ácido pirúvico, así como con carbohi-- dratos, forma una solución café oscura que depende de la cantidad de triptofano destruido (Gortner y Blish, 1915).

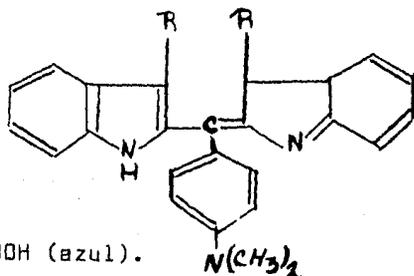
La estabilidad del triptofano fue confirmada bajo condiciones ácidas, cuando no esta presente cistina y en ausencia de oxígeno (Mondino y Bongiovanni, 1970). Cuando cistina y triptofano están presentes en condiciones de hidrólisis ácida, en ausencia de carbohidratos y metales se lleva a cabo una reacción de óxido-reducción. La destrucción del triptofano fue descrita, por su interacción con cistina durante hidrólisis ácida de proteínas, donde el ión "sulfenico" ( $^+SCH_2CH(NH_2)COOH$ ) proveniente de cistina -- es el principal responsable de la pérdida de triptofano

(Ohta y Nakai, 1979).

La información anterior fue considerada para seleccionar métodos alternos, como hidrólisis alcalina, usando  $Ba(OH)_2$ .

El uso de  $Ba(OH)_2$  produce mayor velocidad de hidrólisis (Warner, 1942) no causa destrucción del triptofano y es de fácil neutralización y eliminación de los iones bario. En la determinación de triptofano con el método de Miller (ver materiales y métodos) se obtiene alto porcentaje de recuperación de este aminoácido, 95% en proteínas purificadas. A pesar de esto, la hidrólisis alcalina promueve la recemización del triptofano y en su determinación se cuantifican los dos isómeros.

El color azul de p-dimetilaminobenzaldehído (p-DMAB) con triptofano es de los pigmentos más estables y parece ser el más adecuado para trabajos colorimétricos. Dos moléculas de triptofano se condensan con una de p-DMAB para dar el cromóforo que absorbe a 590 nm. El indol se condensa de forma similar con dos moléculas de p-DMAB para dar un cromóforo de color rojo, que absorbe a 540 nm (Friedman y Finley, 1971; Fearon, 1920).



R= H (rojo).

R=  $CH_2CH(NH_2)COOH$  (azul).

La hidrólisis de proteínas por métodos enzimáticos es otro camino que se puede seguir para la determinación de aminoácidos, evitando la destrucción y modificación del triptofano y otros aminoácidos.

La completa degradación enzimática de las proteínas fue estudiada por diversos investigadores desde principios de siglo, Hill y Schmidt (1962) desarrollaron un método para la completa hidrólisis de enlaces peptídicos con liberación cercana a las cantidades teóricas de triptofano y otros aminoácidos lábiles.

Casi todas las especies de proteasas poseen un substrato específico (Dixon y Webb, 1958) lo que limita el grado de hidrólisis de las proteínas hasta un 30%. En estos casos, de la digestión se obtienen poli y oligopéptidos en gran cantidad. Nomoto et al. (1960) encontraron que las proteasas de *Streptomyces griseus* (pronasa) son capaces de hidrolizar varios tipos de enlaces peptídicos en proteínas. De esta hidrólisis se obtienen hasta un 90% de aminoácidos libres.

#### IV. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se seleccionaron caseína y concentrado de proteínas - de pescado (CPP) para evaluar el efecto que ejerce el álcali, en la disponibilidad de este aminoácido; cabe señalar que dichas proteínas de origen animal, son ricas en - triptofano. Para dicho fin se propuso el siguiente esquema de trabajo:

a) Determinación de humedad y proteína cruda a los materiales de prueba; caseína y CPP.

b) Tratamiento alcalino de caseína y CPP con 0.1N de NaOH ó 0.1N de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  a  $85^\circ \text{C}^*$  por 4 hrs. (simulando el -- proceso de nixtamalización) obteniéndose así los si--- guientes tratamientos:

Caseína (NaOH)

Caseína ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ )

CPP (NaOH)

CPP ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ )

c) Evaluación de triptofano en los materiales tratados y sin tratar (hidrolizando con  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  o pronasa).

En el primer caso, se determinará el triptofano con -- p-dimetilaminobenzaldehido (p-DMAB). Cuando los materiales se hidrolicen con pronasa, se determinará triptofa

\* Todas las temperaturas se expresan en grado Celsius, - por consiguiente, se omitirá en adelante la letra C.

- no que sufra racemización (generación del D-isómero).
- e) La digestibilidad "in vitro" se evaluará para cada uno de los materiales protéicos mediante la relación entre el triptofano cuantificado por hidrólisis enzimática y el triptofano evaluado por hidrólisis con  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ .
- f) Determinación de la disponibilidad de triptofano en los materiales de prueba tratados con los diferentes álcalis y sin tratamiento alcalino, utilizando para ello - pollos como modelo experimental, alimentándolos por un lapso de 10 días (primer fase experimental). La disponibilidad de este aminoácido, se determinará indirectamente por el desarrollo de los pollos (ganancia en peso). Se tendrá una segunda fase experimental que será llamada fase de recuperación, ya que se añadirá triptofano a dietas con deficiencia en este aminoácido.

## V. MATERIALES Y METODOS.

### 5.1. HUMEDAD

#### A l i m e n t o s :

- Caseína

Droguería Cosmopolita S.A. Av. Revolución 1080 Mé  
xico, D.F.

- Concentrado de proteínas de pescado.

Strive Food Consultants LTD. Montreal, Canadá.

#### E q u i p o :

- Termobalanza Ohaus.

Los constituyentes de un alimento se determinan con referencia a la muestra seca, los demás componentes quedarán en una proporción superior a la que tenían a la muestra original. El agua retenida mediante fuerzas no químicas se llama agua no esencial, normalmente denominada humedad, el agua se determina -- por la pérdida de peso que sufre la muestra hasta - constancia de peso (Ayres, 1975).

La determinación del agua contenida tanto en los materiales de prueba, como en las diferentes dietas, se evaluó por termobalanza. Se colocó 10 g. de muestra en el plato del aparato, éste dió directamente - el porcentaje de agua contenido en ese alimento, mediante una escala graduada en % de humedad con una - precisión de 0.1%.

5.2. TRATAMIENTO ALCALINO DE CASEINA Y CONCENTRADO DE PROTEÍNAS DE PESCADO CON NaOH 0.1N y Ca(OH) 0.1N .

Se trataron los diferentes materiales con álcali, utilizando para dicho fin, un método que trata de emular el proceso de nixtamalización, que se utiliza en México para la elaboración de la tortilla.

A l i m e n t o s :

- Caseína
- Concentrado de proteínas de pescado.

R e a c t i v o s :

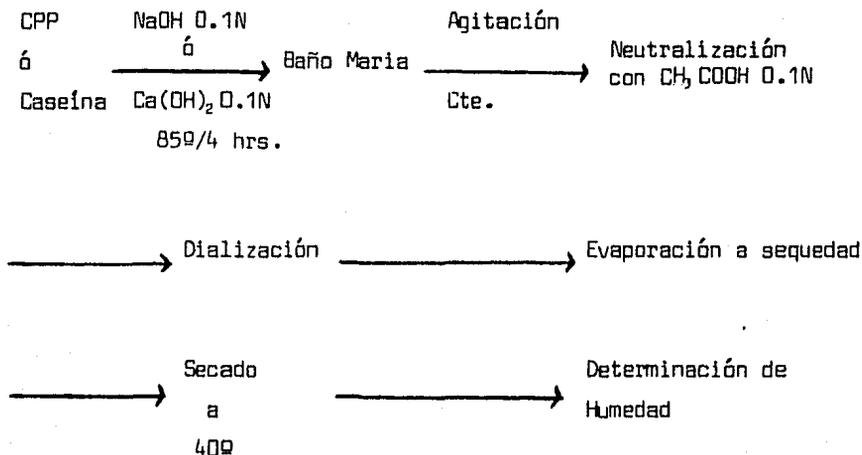
- NaOH 0.1N
- Ca(OH)<sub>2</sub> 0.1N

E q u i p o :

- Estufa de temperatura regulada LABCONCO.
- Molino tipo D MFG No. 20802  
Chuo Bueki Goshi Kaisha
- pH metro Beckman modelo R-76  
New Brunswick Scientific.

Se prepararon soluciones que tenían 7.0% de caseína NaOH 0.1N, utilizando la misma concentración para la solución 0.1N de Ca(OH)<sub>2</sub>. Para CPP la solución tuvo una concentración del 3.5% en 0.1N de NaOH ó 0.1N de Ca(OH)<sub>2</sub>, ya que a esta concentración se facilitó la dispersión del material de manera homogéneo. El tratamiento térmico para ambas proteínas se realizó a 85º durante 4 hrs., para todas las soluciones.

Inicialmente se pensó en seguir el proceso que a continuación se describe graficamente.



Como las soluciones eran muy diluidas, se tuvo - mucha dificultad para dializar volúmenes de alrededor de 20 litros y posteriormente evaporar a sequedad en matraces cuya capacidad máxima era 1 litro, entonces, se optó por seguir el procedimiento que a continuación se describe:

- a) La solución de caseína en Ca(OH)<sub>2</sub> 0.1N se calentó a fuego directo (previo calentamiento del álcali a 85º) observándose una dispersión total de caseína en la solución a ésta temperatura (lo que no sucedía si se calentaba la solución a la misma temperatura pero en baño maria ya que se formaba un grumo difícil de lavar) después de 4 horas de tratamiento se filtro sobre gase doble. El mate--

rial así obtenido se lavó con agua desionizada hasta que el lavado no dió reacción alcalina con la fenolftaleína.

El material tratado se colocó en charolas a la estufa a 40° durante 24 hrs; posteriormente y como paso final se llevó a una molienda hasta obtener un tamaño de partícula homogéneo.

- b) El CPP tratado con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  bajo las mismas condiciones arriba señaladas se dispersó muy finamente en la solución sin formación de grumos, con la característica de que al filtrar se obtuvo un material chicloso que fue muy difícil de secar.
- c) El tratamiento de caseína con  $\text{NaOH}$  0.1N sucedió con una disolución total de la proteína a 85° por 4 hrs. Se precipitó la proteína en frío con ácido acético 1.0 N a pH 3.5, filtrándose después en gasa y lavando el precipitado con agua desionizada hasta que el lavado no dió reacción alcalina con la fenolftaleína y el líquido madre fue nuevamente tratado con ácido acético y filtrado nuevamente. Se llevó a la estufa en charolas a 40° teniendo como característica la formación de un gel difícil de manejar. Posteriormente se llevó una molienda.
- d) El CPP con  $\text{NaOH}$  0.1N bajo las mismas condiciones de trabajo arriba señaladas. Se precipitó con ácido acético 1.0N a pH 4.7, en este caso se obtuvo -

una partícula muy fina fácil de secar y finalmente se llevó, también, a una molienda.

### 5.3. PROTEINA CRUDA.

#### Alimentos :

- Caseína, Caseína (NaOH), Caseína (Ca(OH)<sub>2</sub>).
- CPP, CPP(NaOH), CPP(Ca(OH)<sub>2</sub>).

#### Reactivos :

- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc.
- Mezcla de selenio (SeO<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>) Merck.
- NaOH 40%
- H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2%
- HCl 0.1N
- Sol. alcoholica de rojo de metilo 0.2% y  
sol. acuosa de azul de metileno 0.1% partes iguales

#### Equipo :

- Aparato Mikrokjeldahl. Duran Scott Mains (sin número de modelo).
- Balanza analítica. Sartorius cap. max. 160 g.

Fue determinada tanto en caseína y CPP sin tratamiento alcalino como en las proteínas tratadas con los dos diferentes álcalis por el método mikrokjeldahl (Pearson, 1981).

El contenido de nitrógeno amigeno en alimentos, es convertido en sales de amonio (sulfatos) por digestión de la muestra con ácido sulfúrico concentrado. Esta digestión también oxida el hidrógeno y carbón a dióxido de carbono y agua. El sulfato de po-

tasio es usado para evaluar el punto de ebullición de la mezcla de digestión y el cobre o selenio se usa como catalizador.

El amoniaco es liberado de sus sales por alcalinización de la solución con hidróxido de sodio concentrado y es destilado en ácido bórico y finalmente es titulado con un ácido valorado.

Procedimiento :

1.- La muestra totalmente homogénea (20-30 mg de proteína) se digiere en matraces (30-35 ml) usando 0.8 g de mezcla de selenio y 2 ml de ácido sulfúrico concentrado.

2.- La solución digerida, es diluída y transferida al aparato microkjeldahl, usando un mínimo volumen de agua.

3.- Se alcaliniza la solución que ya se encuentra en el evaporador del aparato, con 15 ml de NaOH 40% y el amoniaco liberado se destila en 10 ml de ácido bórico al 2% con 4 gotas del indicador por 5 a 10 mins.

4.- Se prepara un blanco siguiendo el mismo procedimiento, excepto la adición de la muestra.

5.- El destilado es titulado con HCl 0.1N. El contenido de proteína cruda en alimentos, se calcula multiplicando el porcentaje de nitrógeno por un factor apropiado (para estas proteínas se utilizó 6.25).

% de proteína = % N X factor .

5.4. PREPARACION DEL HIDROLIZADO DE CASEINA Y CPP PARA LA DETERMINACION DEL CONTENIDO DE TRIPTOFANO.

5.4.1. HIDROLISIS ALCALINA Y DETERMINACION DE TRIPTOFANO (METODO DE MILLER. 1967).

A l i m e n t o s :

- Caseína, Caseína(NaOH), Caseína(Ca(OH)<sub>2</sub>).
- CPP, CPP(NaOH), CPP(Ca(OH)<sub>2</sub>).

R e a c t i v o s :

- Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O
- HCl 6.0N
- L-triptofano anhidro grado sigma USA.
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro 175 g/l

E q u i p o :

- Autoclave LABCONCO
- Centrífuga IEC HT. Internacional equipment Co.

La hidrólisis para la liberación del triptofano se aplicó a caseína y a CPP con tratamiento térmico-alkalino y sin él, utilizando para este fin Ba(OH)<sub>2</sub> y un estándar interno como se describe a continuación. El propósito del estándar interno, es para cuantificar el daño provocado al triptofano, durante el tratamiento de hidrólisis. Se asume, que es el mismo daño que sufre el triptofano contenido en la proteína en cuestión, que se tomó en cuenta para la cuantificación del aminoácido en cada material.

0.2-2.0 g de proteína  
15.4 g de  $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$   
9.0 ml de agua  
si se trata del estandar interno:  
7.0 ml de agua y 2.0 ml de sol.  
estandar de Trp. (1.0 mg/ml).

↓  
autoclave 15 psi 7 h.

↓  
neutralización con HCl 6.0N.

↓  
Centrifugación con 40 ml de  
sol. de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para eliminar  
iones bario.

↓  
Llevar a 100 ml o  
si se trata de estandar interno:  
llevar a 200 ml.

DETERMINACION DE TRIPTOFANO. El análisis del hidrolizado se realizó como se indica en la tabla 5.1. Debe notarse que es esencial para la determinación y para un número de análisis hechos al mismo tiempo de adición de los reactivos en intervalos iguales de tiempo:

- 1.- se comparó contra un blanco preparado con una alícuota de 2 ml de agua desionizada y la misma secuencia de --- reactivos.
- 2.- Una curva estandar se construyó para la determinación de absorbancia producida por el cromóforo azul producido por 2 ml de alícuota de soluciones conteniendo de 0.5 a 3.0 mg de Trp/100 ml siguiendo el mismo procedimiento.
- 3.- El contenido aparente del triptofano del material de prueba se corrigió por el porcentaje de recuperación del triptofano añadido al estandar interno.

Tabla 5.1 Diagrama de tiempos de adición de reactivos para la deter-  
minación del triptofano.

MUESTRA	A	A'	A''	B	B'	B''	C	C'	C''
Alicuota del hidrolizado ml.	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Adición 5.0 ml pDMAB al tiempo	0	1	3	5	7	9	11	13	15
Adición 0.2 ml de NaNO <sub>2</sub> al tiempo	20	21	23	25	27	29	31	33	35
Filtrar al tiempo	24	25	27	29	31	33	35	37	39
Leer Abs. 590 nm al tiempo	40	41	43	45	47	49	51	53	55

- Cada literal denota una muestra diferente.
- Literal con ' o '' son muestra problema.
- Literal sola estandar interno.
- pDMAB 0.5% en HCl conc.
- NaNO<sub>2</sub> 0.2% en agua.

5.4.2. HIROLISIS ENZIMATICA CON PRONASA A CASEINA, CONCENTRADO DE PROTEINAS DE PESCADO Y DETERMINACION DE TRIPTOFANO (RAYNER Y FOX, 1976).

A l i m e n t o s :

- Caseína, Caseína(NaOH), Caseína(Ca(OH)<sub>2</sub>).
- CPP, CPP(NaOH), CPP(Ca(OH)<sub>2</sub>).

R e a c t i v o s ;

- Pronasa (proteasas de Strp. griseus).  
actividad: 45000 PUK/gm.  
Calbiochem-Behring Corp. La joya Calif.
- Sol. reguladora de boratos 0.04M pH 8.
- Sol. reguladora de citratos pH 2.2.

- Ac. pícrico 1%
- $\text{NH}_4\text{OH}$  3M
- L-trp anhidro. Sigma USA.

E q u i p o :

- Resina de intercambio catiónico. AG W-X8.  
The Dow Chemical Co. Midland, Michigan, USA.
- Autoanalizador Beckman 120 B
- Baño de agua. Mod. R-76. New Brunswick Scientific.

La hidrólisis enzimática (digestibilidad "in vitro") se llevó a cabo en las muestras de prueba tratadas con álcali y las no tratadas bajo las siguientes condiciones:

1.- 70 mg del material de prueba; 12.5 mg de pronasa y 15 ml de sol. reguladora de boratos (pH 8.0) ajustando con 0.1M de NaOH.

2.- Incubación a  $40^{\circ}$  por 48 h en un baño con agitación -- constante.

3.- Después de la incubación se tomó 5 ml del hidrolizado agregandosele 10 ml de ác. pícrico 1%, para precipitar, se centrifugó a 2000 g por 30 min y 10 ml de la solución se pasó por una columna de intercambio catiónico de 9 X 1.2 cm AG W-X8, lavando con agua desionizada hasta que se eliminó totalmente el ác. pícrico.

4.- Los aminoácidos se eluyeron con 20 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  3M y 40 ml de agua desionizada.

El método original sugiere evaporar el eluido, usando un baño de  $45^{\circ}$  y agregar al residuo seco 5 ml de sol. reguladora de citratos (pH 2.2) para ser evaluado por un analizador de aminoácidos.

- Ac. pícrico 1%
- $\text{NH}_4\text{OH}$  3M
- L-trp anhidro. Sigma USA.

E q u i p o :

- Resina de intercambio catiónico. AG W-X8.  
The Dow Chemical Co. Midland, Michigan, USA.
- Autoanalizador Beckman 120 B
- Baño de agua. Mod. R-76. New Brunswick Scientific.

La hidrólisis enzimática (digestibilidad "in vitro") se llevó a cabo en las muestras de prueba tratadas con álcali y las no tratadas bajo las siguientes condiciones:

- 1.- 70 mg del material de prueba; 12.5 mg de pronasa y 15 ml de sol. reguladora de boratos (pH 8.0) ajustando con 0.1M de NaOH.
- 2.- Incubación a 40<sup>o</sup> por 48 h en un baño con agitación -- constante.
- 3.- Después de la incubación se tomó 5 ml del hidrolizado agregandosele 10 ml de ác. pícrico 1%, para precipitar, se centrifugó a 2000 g por 30 min y 10 ml de la solución se pasó por una columna de intercambio catiónico de 9 X 1.2 cm AG W-X8, lavando con agua desionizada hasta que se eliminó totalmente el ác. pícrico.
- 4.- Los aminoácidos se eluyeron con 20 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  3M y 40 ml de agua desionizada.

El método original sugiere evaporar el eluido, usando un baño de 45<sup>o</sup> y agregar al residuo seco 5 ml de sol. reguladora de citratos (pH 2.2) para ser evaluado por un analizador de aminoácidos.

Como no se contaba con dicho equipo, se modificó el procedimiento (como se describe adelante), aunque posteriormente y cuando se contó con el equipo necesario se analizaron las muestras en el autoanalizador pudiendo hacer una comparación entre los valores obtenidos por la modificación con los valores dados por el aparato.

MODIFICACION:

5.- Se pasaron soluciones estandar de triptofano a través de la columna que contenían 1.0, 2.0 y 3.0 mg de triptofano por cada ml, con el objeto de observar el porcentaje de recuperación del triptofano pasado por la columna y así poder construir una curva estandar, siguiendo exactamente el proceso anterior y determinando el triptofano por el método de Miller obteniéndose una recuperación del aminoácido del  $97.8\% \pm 2.2$ .

6.- El residuo seco resultado de la evaporación de la hidrólisis enzimática (aminoácidos libres) se aforó a 10 ml con agua.

7.- De la solución anterior se tomó 2 ml de alícuota para cuantificar el triptofano por el método de Miller.

8.- Para llevar al analizador de aminoácidos de los 10 ml del aforo se tomó 2 ml, se evaporaron a sequedad, reconstituyéndose nuevamente con 2 ml. de solución reguladora de citrato pH 2.2.

9.- Se efectuó un blanco enzimático para conocer la cantidad de triptofano liberado por autohidrólisis de pronasa.

#### 5.4.3. DETERMINACION DE L-TRIPTOFANO.

##### Reactivos :

- Sol. enzimática (L-triptofanasa) 4 mg/ml en sol. reguladora de fosfatos pH 8.3
- Sol. reguladora de fosfatos pH 8.3
- Sol. de piridoxal fosfato 1 mg en 5 ml de agua destilada (coenzima).
- Tolueno
- Sol. de L-triptofano 100 ug de Trp/ml.
- p-DMAB al 2.45% en alcohol-HCl (15:1).

Se incuban a 37<sup>o</sup> durante 10 min, la enzima 0.2 ml y coenzima 0.1 ml en solución reguladora se agrega, considerando el volumen de la muestra problema o solución de L-triptofano (para la curva patrón) para completar 2 ml, una vez agregados éstos en el siguiente paso. Ya que se agregó -- la muestra problema o solución patrón de L-triptofano, se agrega a la mezcla de reacción 1 ml de tolueno y se llevó a cabo la reacción durante 30 min exactamente a 37<sup>o</sup>. La reacción enzimática se detiene con baño de hielo. Cuando concluyó la reacción se extrajo el indol liberado en la capa de tolueno por agitación, seguida de una centrifugación a 8<sup>o</sup> para la precipitación de la enzima y separación de -- las capas. Y el triptofano se determinó con p-DMAB, 0.7 ml de alícuota por 4.5 ml de p-DMAB.

Se hacen blancos de enzima y reactivos y se restan del problema.

## 5.5 PREPARACION DE DIETAS.

### A l i m e n t o s :

- Caseína, Caseína(NaOH), Caseína(Ca(OH)<sub>2</sub>)  
CPP, CPP(NaOH), CPP(Ca(OH)<sub>2</sub>)
- Gelatina comercial sin especificaciones.
- Hidrolizado de caseína.  
ICN Nutr. Bioch. Cleaveland.
- Aceite de maíz "Mazola"
- Almidón "Maicena"

### R e a c t i v o s :

- Vitaminas  
Productos Roche S. A. de C. V.  
Av. Universidad No. 902  
Sta. Cruz Atoyac
- L-trp anhidro grado Sigma USA
- L-leucina Sigma de México S. A.
- L-valina R.A. Suiza.
- L-metionina anhidro grado Sigma USA.
- L-lisina-HCl Merck Dinamarca
- L-cysteína Merck Dinamarca
- L-isoleucina Merck Dinamarca
- L-glicina Merck Dinamarca
- Cloruro de colina Comsolmex S. A.

La composición de las dietas experimentales, usadas en este trabajo, se prepararon de acuerdo a la composición de la dieta basal que presenta Ohara et al. (1980) tabla 5.2, en un experimento donde se utilizó pollos.

Se preparó una dieta basal tabla 5.3, en la que se mezclaron todos los ingredientes excepto la fuente de nitrógeno y vitaminas. El fin de preparar una dieta basal, fue para que todas las dietas de prueba presentaran la misma

Tabla 5.2. Composición de dieta basal.

I n g r e d i e n t e	%
Proteína	19.13
Trp	var
Aceíte de maíz	15.00
Mezcla de minerales	5.37
Celulosa	3.00
NaHCO <sub>3</sub>	1.00
Cloruro de colina	0.20
Mezcla de vitaminas	0.20
Almidón	c.b.p. 100

composición de los ingredientes no variables, ya que las dietas, deben ser isoprotéicas e isocalóricas. La composición de minerales tabla 5.4 se realizó homogeneizando cada uno de los componentes en una mezcladora. La mezcla de vitaminas tabla 5.5, que se reporta en este trabajo se preparó de acuerdo al Nutrient Requirements of Poultry --- (1977).

A partir de la dieta basal se pensaba preparar dietas a tres niveles de triptofano, que cubrían el 33, 66 y 100% de los requerimientos del pollo, para que este aminoácido (al 15% en dieta) tablas 5.6 y 5.7. Se deseaba preparar dietas con un nivel de proteína de 20.3% en dieta. Sin embargo, en la elaboración de dietas, no se estimó la pureza de la caseína hidrolizada y la humedad del almidón, quedando diluidos los componentes de la dieta. Por ésto el contenido de triptofano en las dietas fue 0.045, 0,091 y ---- 0.136% y el de proteína de 19.56%.

Tabla 5.3. Composición de dieta basal:

INGREDIENTES	g/para preparar 100 g de alimento
Aceite de maíz	13.62
Mezcla de minerales	4.87
Celulosa	2.72
NaHCO <sub>3</sub>	0.91
Almidón	44.20
Humedad	8.35

Tabla 5.4. Mezcla de minerales.\*

INGREDIENTES	g/Kg de alimento
CaCO <sub>3</sub>	2.81
CaHPO <sub>4</sub>	26.29
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.43
MgSO <sub>4</sub>	1.60
Fe(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.51
ZnCl <sub>2</sub>	0.19
KI	0.019
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.038
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.013
CoSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.0009
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.61
NaCl	8.24
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.0084

\* De acuerdo a Ohara et al. (1980).

Tabla 5.5. Mezcla de vitaminas.<sup>1</sup>

V i t a m i n a	mg/Kg de alimento	
Vitamina A <sup>2</sup>	0.486	(1413 UI)
Vitamina D <sup>3</sup>	0.0047	(188 ICU) <sup>4</sup>
Vitamina E <sup>5</sup>	14.023	(21 UI)
Vitamina K	0.4706	
Tiamina	1.694	
Riboflavina	3.388	
Ac. pantoténico	9.411	
Niacina	25.41	
Piridoxina	2.824	
Biotina	0.141	
Colina	0.122 <sup>6</sup>	
Folacina	0.517	
Vitamina B <sub>12</sub>	0.0085	

<sup>1</sup> De acuerdo al Nutriente Requirement of Poultry (1977).

<sup>2</sup> Acetato de retinol.

<sup>3</sup> Colecalciferol.

<sup>4</sup> ICU International Chick Unit.

<sup>5</sup> D-~~α~~ tocoferol.

<sup>6</sup> g/100 g de alimento.

La composición general de las dietas se presenta en la tabla 5.8. Se usaron como fuente de triptofano proteínas tratadas con álcali y sin tratar, cuya composición puede observarse en la tabla 5.9.

Tabla 5.6 Composición de las dietas experimentales<sup>1</sup>.

Ingredientes	g/100 g de alimento								
	Caseína sin tratar			Caseína(NaOH)			Caseína(Ca(OH) <sub>2</sub> )		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Fuente de Trp									
Material protéico	4.25	8.50	12.75	4.66	9.32	13.98	4.60	9.13	13.71
Caseína-hidrolizada <sup>2</sup>	11.87	11.87	11.87	11.87	11.87	11.87	11.87	11.87	11.87
Gelatina	10.60	6.90	2.51	10.73	6.52	1.91	10.86	6.74	1.98
Aminoácidos <sup>3</sup> :									
Gly	0.284	0.27	0.254	0.282	0.269	0.25	0.284	0.271	0.253
Gly	0.244	----	-----	-----	-----	0.277	-----	-----	0.280
Met	0.125	----	-----	0.135	0.029	-----	0.136	0.029	-----
Mezcla de vitaminas <sup>4</sup>	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26
Dieta basal	72.37	72.31	72.36	72.06	71.73	71.45	71.99	71.70	71.65

<sup>1</sup> A, B, C: 0.045, 0.091 y 0.136 g de Trp/100 g de alimento, respectivamente.

<sup>2</sup> Aporta 5.03 g de sal y cenizas totales/100 g de alimento.

<sup>3</sup> De acuerdo a "Modification of Illinois Reference Standard Amino Acid Mixture" Sasse y Baker (1973).

<sup>4</sup> Ver tabla 5.5. Mezcla de vitaminas.

Tabla 5.7 Composición de las dietas experimentales<sup>1</sup>.

Ingredientes	g/100 g de alimento											
	Fuente de Trp			Dieta con L-Trp			CPP(NaOH)			CPP(Ca(OH) <sub>2</sub> )		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C			
Material protéico	0.045	0.091	0.136	3.68	7.4	11.1	3.79	7.59	11.37			
Caseína Hidrolizada <sup>2</sup>	11.87	11.87	11.87	11.87	11.87	11.87	11.87	11.87	11.87			
Gelatina	13.31	13.28	13.24	11.95	7.98	4.43	11.43	7.79	4.17			
Aminoácidos <sup>3</sup> :												
Val	0.086	0.086	0.086	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
Leu	0.240	0.240	0.240	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
Ileu	0.670	0.670	0.670	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
Met	0.255	0.255	0.255	0.16	0.094	0.028	0.178	0.11	0.043			
Cys	0.317	0.317	0.317	0.266	0.234	0.202	0.266	0.233	0.199			
Lys	0.192	0.192	0.192	-----	-----	-----	-----	-----	-----			
Mezcla de vitaminas <sup>4</sup>	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26			
Dieta basal	73.36	73.34	73.34	71.81	72.16	72.11	72.20	72.15	72.09			

<sup>1</sup> A, B Y C: 0.045, 0.091 y 0.136 g de Trp/100 g de alimento, respectivamente.

<sup>2</sup> Aporta 5.03 g de sal y cenizas totales/100 g de alimento.

<sup>3</sup> De acuerdo a "Modification of Illinois Reference Standard Amino Acid Mixture" Sasase y Baker (1973).

<sup>4</sup> Ver tabla 5.5 Mezcla de vitaminas.

Tabla 5.8 Composición general de las dietas.

I n g r e d i e n t e s	%
Proteína	19.56
Aceite de maíz	13.62
Mezcla de minerales	4.87
Celulosa	2.72
NaHCO <sub>3</sub>	0.91
Mezcla de vitaminas	0.26
Almidón	44.20
Humedad	8.35
NaCl de hidrolizado de caseína	5.03
Material no cuantificado	0.48

Tabla 5.9 Composición de los materiales protéicos<sup>1</sup>.

Material	Humedad	Proteína cruda	Triptofano
		g/100 g de muestra	
Caseína	7.3	88.6 ± 1.33	1.19 ± 0.07
Caseína hidrolizada <sup>2</sup>	4.0	50.6	0.32 ± 0.012
Caseína (NaOH)	7.3	82.4 ± 1.14	1.17 ± 0.01
Caseína (Ca(OH) <sub>2</sub> )	7.3	82.5 ± 1.47	1.19 ± 0.04
CPP (NaOH)	9.1	87.7 ± 0.73	1.40 ± 0.04
CPP (Ca(OH) <sub>2</sub> )	9.1	87.3 ± 0.5	1.37 ± 0.02
Gelatina	9.0	88.7 ± 1.6	0.05 ± 0.00

<sup>1</sup> En todos los casos el número de réplicas fue 3.

<sup>2</sup> Hidrolizado de caseína de ICN Nutr. Bioch. Cleaveland -- Oh. Nitrógeno de aminoácidos 6.1% X 6.25 de acuerdo a la etiqueta.

La preparación de las dietas se realizó de la siguiente manera: el nivel de triptofano para cada dieta lo aportó el material protéico tratado previamente con álcali o sin dicho tratamiento, ya que se evaluó el contenido de triptofano de cada uno de los materiales. El nivel de 18.22% de proteína se alcanzó mediante la adición de hidrolizado de caseína y gelatina, ambos libres de triptofano. A pesar de que se detectó una cantidad muy pequeña de triptofano en gelatina, este valor no se tomó en cuenta para la formulación de las dietas. El hidrolizado de caseína es un producto comercial libre de triptofano según especificaciones del fabricante. Como se buscó además que no se tuviera deficiencias de aminoácidos esenciales (ver apéndice 1) se tomó en cuenta el perfil de aminoácidos de las proteínas con el fin de observar si la combinación de proteínas, en diferentes proporciones, aportaban la cantidad necesaria de aminoácidos esenciales.

Se vió entonces que existía una deficiencia en algunos aminoácidos esenciales principalmente cisteína y metionina y algunos otros, no siendo los mismos para todas las dietas por lo que esta deficiencia se cubrió con la adición de aminoácidos libres, satisfaciéndose los requerimientos de los pollos para esos nutrientes. Se adicionó entonces la mezcla de vitaminas y la cantidad necesaria de la dieta basal para completar a 100 g de alimento.

Inicialmente se pensó en preparar dietas cuya fuente

de triptofano fuera la proteína sin tratamiento o la proteína tratada con el álcali, para que la primera sirviera como patrón de comparación. En el caso de la dieta con CPP esto no fue posible ya que por error todo el material fue sometido a tratamiento con los álcalis. Por esta razón y como alternativa, se preparó una dieta al mismo nivel de proteína y demás ingredientes pero donde la fuente de triptofano -- fue el L-triptofano adicionado al hidrolizado de caseína y gelatina. Esta dieta se utilizó como patrón de comparación para todos los tratamientos.

Se trabajó también con una dieta comercial, que se administró durante los primeros siete días de vida de los pollos. Esta fue analizada, los valores obtenidos se expresan en %: proteína cruda 19.3; grasa 2.7; fibra cruda 12.7; humedad 19.5; cenizas 8.3 y extracto libre de nitrógeno --- 47.4 por diferencia.

## 5.6 METODOS ESTADISTICOS EMPLEADOS.

Se usó análisis de varianza y diferencia de rangos para determinar si existía diferencia significativa en el -- triptofano evaluado en los materiales protéicos.

La actividad biológica se evaluó relacionando las pendientes de las ecuaciones de regresión lineal obtenidas con nivel de triptofano en dieta vs. ganancia en peso de los pollos o cantidad de triptofano consumido por pollo por día en cada nivel de triptofano en dieta vs. la ganancia en peso de los

pollos.

La dieta con L-triptofano se consideró como 100% de actividad biológica.

actividad

$$= \frac{\text{Pendiente de regresión lineal de la dieta problema} \times 100}{\text{Pendiente de regresión lineal de la dieta patrón.}}$$

biológica

## VI. PARTE EXPERIMENTAL.

### 6.1 HIDROLISIS ENZIMATICA DE TRIPTOFANO "IN VITRO".

Una vez que se evaluó el contenido de triptofano en cada uno de los materiales, la digestibilidad se evaluó de la siguiente manera:

- 1) Trp liberado con pronasa X 100 / Trp liberado con  $Ba(OH)_2$  usando p-DMAB en ambos casos.
- 2) L-Trp liberado con pronasa X 100 (usando L-triptofanasa)/ Trp liberado con  $Ba(OH)_2$  usando p-DMAB en ambos casos.
- 3) Trp liberado con pronasa X 100 (por autoanализador)/ Trp liberado con  $Ba(OH)_2$ .

Se determinó también D-trp generado por el tratamiento alcalino, por diferencia entre el triptofano total y L-triptofano.

### 6.2 DISPONIBILIDAD DE TRIPTOFANO "IN VIVO".

La disponibilidad de triptofano "in vivo" se determinó indirectamente como una medida del desarrollo del animal experimental y el consumo de triptofano, cuantificando alimento consumido y peso ganado por los pollos.

En este experimento se trabajó con 200 pollos machos -- White Leghorn de un día de nacidos (adquiridos en Avícola Monroy de Calz. de la Viga 190 Bis México, D. F.).

Fueron alimentados con una formulación comercial para pollos por un período de siete días. Durante este lapso se

mantuvieron a 30° mediante calentadores eléctricos, dentro de un área conseguida por bastidores de alambre fig. 6.1. En todo el experimento se usó luz artificial las 24 h del día, condición semejante a la empleada en granjas. Al término de este período se pesaron los pollos y del total, 76 fueron seleccionados, tomando como base el peso medio: -----  
74.8 ± 4.0 g.

Los pollos seleccionados fueron divididos en grupos de acuerdo al tipo de dieta, considerando el nivel de triptofano en dieta y el material protéico de prueba utilizado (tabla 6.1). Por ejemplo, con caseína(NaOH) se prepararon 3 dietas a diferentes niveles de triptofano, 0.045, 0.091 y 0.136% en dieta, mismos en todos los materiales protéicos cada dieta se evaluó en 4 pollos (la prueba se deseaba llevar a cabo con 6 pollos, sin embargo, al no contar con equipo y materiales suficientes el número de pollos se redujo a 4) de tal manera que a cada material protéico de prueba fue asignado 12 pollos, haciendo un total, para los 6 materiales protéicos, de 72 pollos.

Se usaron jaulas para ratas por falta de recursos económicos y no disponer de jaulas especiales para pollos, adaptándoseles comederos especialmente diseñados por nosotros -- donde la pérdida de alimento fue mínima, así como bebederos según se indica en la figuras 6.2 y 6.3. Se trató en lo posible que todos los animales de prueba estuvieran bajo -- las mismas condiciones ambientales: luz, humedad y tempera-

Fig. 6.1 Lote de pollos machos de los cuales se obtuvieron 76 únicamente para los diver sos grupos experimentales.



Fig. 6.2 Jaula y comedero diseñado para el experimento, los bordes de la lata fueron recubiertos con cinta para evitar -- cortadas en el pollo.

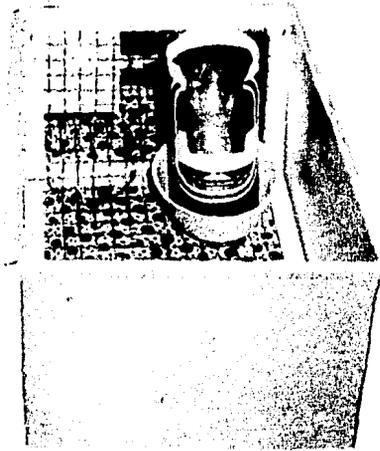
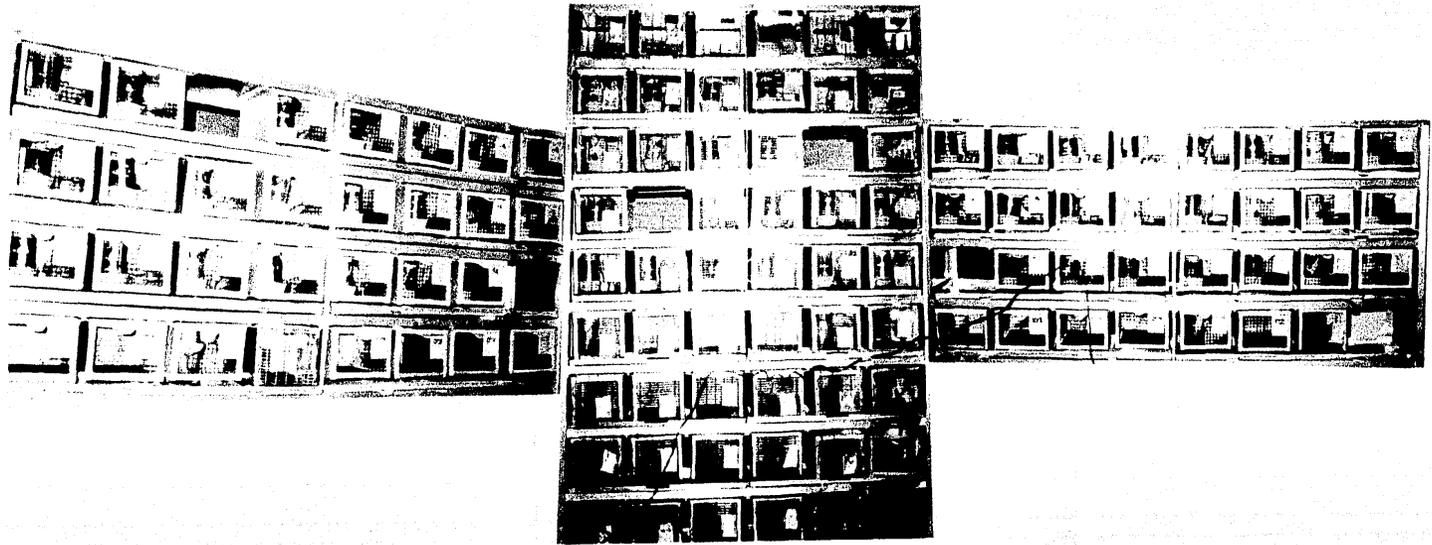


Fig. 63. Anaqueles con jaulas usados en la prueba biológica.



tura.

Los animales fueron distribuidos en los anaqueles como se indica en la figura 6.4. Los grupos de pollos que corresponden a las dietas con los diferentes niveles de triptofano se colocaron al azar en los anaqueles. Por ejemplo, los pollos alimentados con dietas de 0.045% de triptofano ocuparon el nivel superior, marcado en la figura 6.4 con --- " > " (24 jaulas) y las 24 jaulas se dividieron en 6 grupos considerando los diferentes materiales de prueba, distribuyéndose al azar, en cada caso (fig. 6.5).

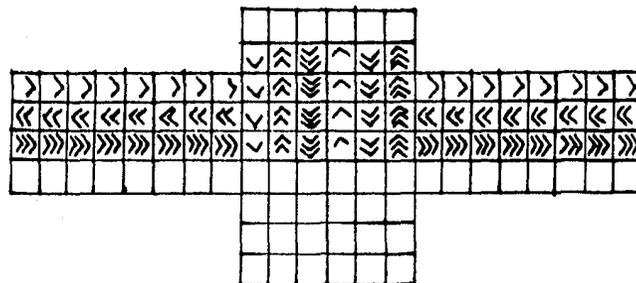
Los pollos fueron colocados de mayor a menor peso como lo indican las flechas de la fig. 6.4 con el fin de que para todas las dietas se tuvieran cuatro pollos de peso intermedio y cuatro pollos de menor peso, como lo indica la tabla 6.1.

Esta distribución de los pollos resultó complicada, debido a las limitaciones de los anaqueles, pues se buscó no -- introducir variables incontrolables. Lo ideal hubiera sido contar con anaqueles de 3 niveles con 24 jaulas cada uno.

La distribución de las dietas se indica en la figura 6.5

Los pollos fueron alimentados, con las dietas experimentales durante diez días (primera fase experimental). En el día 11 (fase de recuperación) se agregó triptofano a las -- dietas con el fin de comprobar que el único factor limitante en el desarrollo de los pollos fue la deficiencia de triptfano, ya que las dietas se llevaron al 100% de los requeri-

Fig. 6.4 Distribución de los pollos y distribución de las dietas con diferentes niveles de triptofano, en los anaqueles.



Niveles:

▸ 0.045% Trp

▹ 0.135% Trp

▹▹ 0.091% Trp



Tabla 6.1. Distribución de los animales de prueba a las diferentes dietas y pesos medios iniciales.

Fuente de Trp en dieta	% de Trp en dieta.		
	0.045	0.091	0.136
	No. de pollos (pesos medios en g)		
Caseína	4(69.0 $\pm$ 2.2)	4(72.5 $\pm$ 1.3)	4(73.6 $\pm$ 0.8)
Caseína(NaOH)	4(72.5 $\pm$ 1.8)	4(67.5 $\pm$ 1.8)	4(78.8 $\pm$ 1.0)
Caseína(Ca(OH) <sub>2</sub> )	4(70.9 $\pm$ 1.3)	4(70.8 $\pm$ 1.7)	4(81.4 $\pm$ 1.7)
Dieta con L-Trp	4(69.0 $\pm$ 1.7)	4(62.6 $\pm$ 1.5)	4(73.4 $\pm$ 1.0)
CPP(NaOH)	4(71.6 $\pm$ 1.7)	4(69.4 $\pm$ 2.2)	4(67.8 $\pm$ 0.6)
CPP(Ca(OH) <sub>2</sub> )	4(69.2 $\pm$ 1.7)	4(71.6 $\pm$ 1.8)	4(80.6 $\pm$ 1.3)
Total de pollos	24	24	24

mientos del aminoácido. El experimento continuó 5 días más y se determinó ganancia en peso de los animales, consumo de alimento y alimento desperdiciado en ambos períodos. La cantidad de triptofano agregado finalmente se presenta en el cuadro 6.2.

Tabla 6.2. Triptofano agregado a las dietas para los últimos 5 días de prueba<sup>1</sup>.

Tratamiento	% de Trp en dieta inicial					
	0.045		0.091		0.136 <sup>2</sup>	
	A	T	A	T	A	T
Caseína	0.106	0.151	0.061	0.152	0.017	0.153
Caseína (NaOH)	0.10	0.145	0.050	0.141	-----	-----
Caseína (Ca(OH) <sub>2</sub> )	0.113	0.158	0.079	0.170	0.045	0.181
CPP(Ca(OH) <sub>2</sub> )	0.105	0.150	0.061	0.152	0.016	0.152
L-Trp	0.100	0.145	0.050	0.141	0.00	0.136

<sup>1</sup> A= Trp agregado; T=Trp total ambos expresados como:  
g Trp/100 g de alimento.

<sup>2</sup> La dieta que contenía caseína-NaOH al 0.136% de Trp fue  
insuficiente.

## VII RESULTADOS.

Las tablas 7.1 y 7.2, muestran las curvas patrón utilizadas en la determinación del contenido de triptofano en los diferentes alimentos usados en el experimento, utilizando para la hidrólisis:  $Ba(OH)_2$  y L-triptofanasa respectivamente. La tabla 7.3, muestra la especificidad de la L-triptofanasa utilizada para la liberación del L-triptofano.

Tabla 7.1 Curva patrón para la determinación de triptofano con p-DMAB<sup>1</sup>.

mg de Trp/100 ml	Abs. 590 nm	ec. y coef. de correlación.
3.0	0.5485	Y= 0.209X - 0.0894 r= 0.9954
1.0	0.1965	
0.6	0.0535	

<sup>1</sup> Se da el resultado de 3 réplicas.

En la tabla 7.4, se presentan los resultados obtenidos de la determinación de triptofano en hidrolizados enzimáticos y alcalinos de caseína y CPP tratados y sin tratamientos.

En la hidrólisis con  $Ba(OH)_2$  y enzimática con pronasa (Triptofano total) no existe diferencias significativas en el contenido de triptofano entre proteína sin tratar y las proteínas tratadas respectivas con un nivel de significan-

Tabla 7.2. Curva patrón para la determinación de L-Trp con ---  
L-triptofanasa en hidrolizados enzimáticos<sup>1</sup>.

ug L-Trp	Abs. 540 nm	ec. y coef. de correlación
05	0.04	Y= 0.00796X + 0.002 r= 0.9928
10	0.087	
15	0.113	
20	0.165	

<sup>1</sup> Se da el resultado de 3 réplicas.

Tabla 7.3 Especificidad de la triptofanasa<sup>1</sup>.

ug Trp	Abs. 540 nm	Actividad
20 L-Trp	0.165	100
20 DL-Trp	0.085	51.51
15 L-Trp	0.113	100
15 DL-Trp	0.056	49.55

<sup>1</sup> Se da el resultado de 3 réplicas.

cia = 0.01.

En el contenido de L-triptofano de hidrolizados enzimáticos se observan diferencias significativas entre las proteínas sin tratar y las proteínas tratadas respectivas, al mismo nivel de significancia (0.01). En caseína sin tratar el contenido de L-triptofano es mayor que en caseína (NaOH) y caseína (Ca(OH)<sub>2</sub>). No se observó diferencia significativa en el contenido de triptofano entre estos últimos a un nivel de significancia 0.01. El contenido de L-triptofano de CPP(NaOH) es significativamente menor que CPP(Ca(OH)<sub>2</sub>) y CPP sin tratar. Entre estas dos últimas proteínas no se observó diferencia significativa en el contenido

Tabla 7.4 Determinación de triptofano<sup>1</sup>.

Tratamientos	Hidrólisis básica	Hidrólisis enzimática			
		Trp total <sup>2</sup>	Trp total <sup>3</sup>	L-Trp <sup>4</sup>	D-Trp <sup>5</sup>
		g de Trp/ 100 g de proteína			
Caseína	1.19 $\pm$ 0.07	1.06 $\pm$ 0.01	1.25	0.97 $\pm$ 0.01	0.09 - 0.28
Caseína(NaOH)	1.17 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.12	0.93	0.80 $\pm$ 0.03	0.13 - 0.18
Caseína(Ca(OH) <sub>2</sub> )	1.19 $\pm$ 0.04	1.04 $\pm$ 0.21	1.23	0.85 $\pm$ 0.03	0.19 - 0.38
CPP	1.37 $\pm$ 0.01	0.86 $\pm$ 0.18	0.93	0.89 $\pm$ 0.08	0.00 - 0.04
CPP(NaOH)	1.40 $\pm$ 0.04	0.82 $\pm$ 0.06	0.49	0.19 $\pm$ 0.06	0.30 - 0.63
CPP(Ca(OH) <sub>2</sub> )	1.37 $\pm$ 0.02	0.87 $\pm$ 0.21	1.12	0.80 $\pm$ 0.05	0.07 - 0.32

<sup>1</sup> Media y desviación estandar de 3 réplicas en todos los casos excepto en el método de intercambio iónico.

<sup>2</sup> Determinación con p-DMAB.

<sup>3</sup> Determinación con analizador de aminoácidos.

<sup>4</sup> Determinación con L-triptofanasa.

<sup>5</sup> D-Trp fue determinado por diferencia entre Trp total - L-triptofanasa, se indican los límites mínimo y máximo de este enantiómero del método de medición de Trp.

de L-triptofano, con el mismo nivel de significancia.

En proteínas tratadas y sin tratar, el contenido de Trp es significativamente diferente en función del tipo de método empleado para su determinación. En hidrolizados proteicos empleando  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  el contenido de Trp es significativamente mayor, que ambos hidrolizados de pronasa respectivos, excepto en hidrolizados de caseína ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), donde no se observó diferencia significativa en el contenido de triptofano usando hidrólisis básica o hidrólisis enzimática (triptofano total) 1.19 y 1.04 g de Trp/100 de proteína respectivamente.

En proteínas hidrolizadas con pronasa se observaron diferencias significativas entre triptofano total y L-Trp. En ambas proteínas (caseína y CPP) tratados con NaOH, es significativamente menor L-Trp que triptofano total con un nivel de significancia 0.01. En el resto de los casos, -- proteínas sin tratar y tratadas con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , no existe diferencia significativa entre L-Trp y triptofano total.

En la tabla 7.5 se muestran los resultados de la disponibilidad "in vitro" de triptofano en todas las proteínas usadas.

La digestibilidad de triptofano en proteínas sin tratar es similar cuando se calcula usando los datos de L-Trp y Trp total. En ambas proteínas tratadas la digestibilidad de triptofano calculada con L-Trp es mayor que la digestibilidad de Trp calculada con Trp total.

Tabla 7.5 Digestibilidad de Trp "in vitro".

Tratamiento	A	B	C
	%		
Caseína	89.17	81.51	105.04
Caseína(NaOH)	83.69	68.38	79.49
Caseína(Ca(OH) <sub>2</sub> )	87.22	71.43	103.36
CPP	63.24	64.96	67.88
CPP(NaOH)	57.95	13.57	35.00
CPP(Ca(OH) <sub>2</sub> )	63.48	58.39	81.75

La digestibilidad calculada con Trp determinado por analizador de aminoácidos se muestra en la columna C. Aquí se observa en ambas proteínas tratadas con NaOH y un decremento menor en ambas proteínas tratadas con Ca(OH)<sub>2</sub>.

En la tabla 7.6 se presenta el consumo de alimento de los animales de prueba en las dos fases del experimento. En todos los casos el consumo de alimento es mayor durante la segunda fase del experimento, últimos 5 días ( donde el contenido de Trp se aumenta hasta el 100% de los requerimientos de Trp en los pollos) excepto en caseína(Ca(OH)<sub>2</sub>) y caseína(NaOH) donde en este último tratamiento hay un ligero decremento en el consumo de alimento, respecto a -- los primeros 10 días. El incremento en el consumo de alimento en los dos primeros niveles de triptofano: 0.045 y - 0.091%, respecto a la primera fase del experimento. En -- los grupos correspondientes a las dietas con caseína, ca-- seína(Ca(OH)<sub>2</sub>), CPP(NaOH) y L-Trp el consumo de alimento es directamente proporcional al nivel de triptofano en dieta. En caseína(NaOH) el consumo de alimento es menor en

Tabla 7.6 Alimento consumido por pollo por día.

Tratamientos	0.045% Trp		0.091% Trp		0.136% Trp	
	1	2	1	2	1	2
				g		
Caseína	7.31	10.65	11.28	14.70	14.99	15.20
Caseína(NaOH)	9.06	12.65	13.60	14.70	13.40	12.40
Caseína(Ca(OH) <sub>2</sub> )	9.46	11.30	10.04	13.85	14.23	9.33
CPP(NaOH)	6.96	-----	8.00	-----	11.44	-----
CPP(Ca(OH) <sub>2</sub> )	7.82	11.40	10.51	15.00	5.80	-X-
Dieta con L-Trp (patrón)	7.80	9.30	8.98	14.30	15.56	18.00

<sup>1</sup> Primeros 10 días del experimento.

<sup>2</sup> Últimos 5 días del experimento (después de agregar Trp).

--- grupo de pollos donde no se efectuó la 2da. fase experimental por dieta insuficiente.

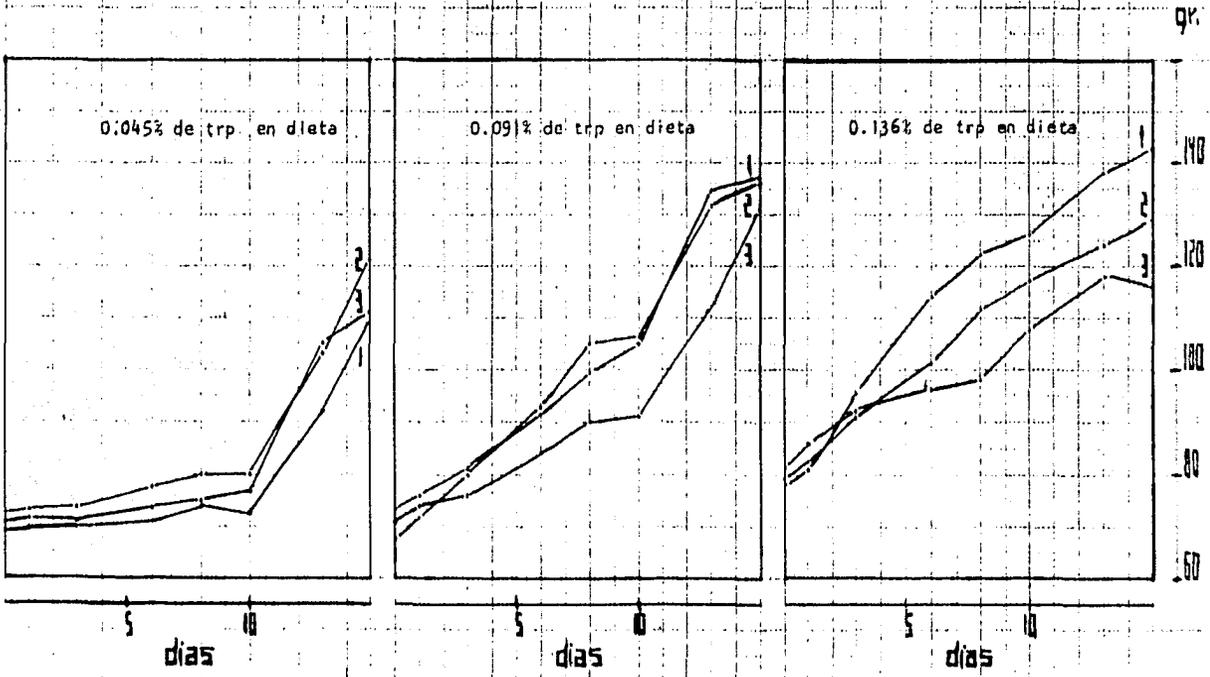
-X- 100% de mortalidad.

el nivel más bajo de triptofano y permanece más o menos -- constante en los niveles 0.091 y 0.136%. En el caso de -- CPP(Ca(OH)<sub>2</sub>) el consumo de alimento es menor en los pollos a los que se administró la dieta con mayor contenido de Trp - proveniente del material protéico tratado con álcali y es más alto en el nivel 0.091%.

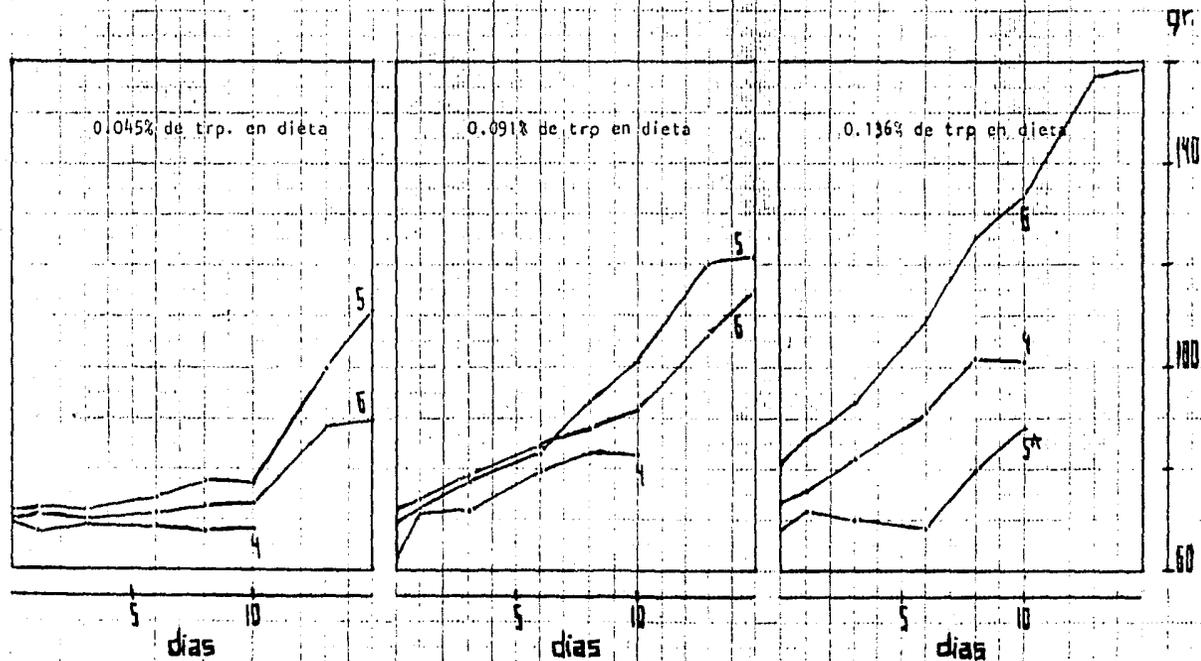
En la tabla 7.7 se muestra el peso ganado por pollo, - por día ( grafs. 1 y 2) de todos los tratamientos usados, - durante las dos fases del experimento. En la segunda fase del experimento el desarrollo de los pollos fue mayor respecto a los niveles 0.045 y 0.091% de Trp en dieta, similar a lo que ocurre con el consumo de alimento. Los grupos de pollos que corresponden a dietas con mayor contenido de triptofano, 0.136% en dieta, ganaron menos peso por día después de agregar Trp a las dietas. Los pollos que corresponden a las dietas con 0.136% de Trp en dieta, que contenían caseína(NaOH) y L-Trp presentan el mismo decre-- mento a pesar de que no se agregó Trp a las dietas. En to dos los tratamientos, a medida que el nivel de triptofano en dieta aumenta, se observa una tendencia de los animales a ganar más peso por día, excepto en los pollos alimenta-- dos con una dieta que contenía caseína(NaOH) y CPP(Ca(OH)<sub>2</sub>) donde el peso permanece constante y hay disminución de peso respectivamente, en el nivel más alto de Trp.

Los pollos correspondientes a la dieta con CPP(NaOH) al nivel 0.045% de Trp perdieron peso durante los primeros 10

Gráfica 1. Crecimiento de los pollos alimentados con: 1<sup>o</sup> Caseína sin tratar; 2<sup>o</sup> Caseína (NaOH); 3<sup>o</sup> Caseína (Ca(OH)<sub>2</sub>); a) dietas con 0.045% de trp.; b) dietas con 0.091% de trp.; c) dietas con 0.136% de trp. Gramos de peso ganado/pollo vs tiempo (días).



Gráfica 2. Crecimiento de los pollos alimentados con 4 CPP (NaOH); 5 CPP (Ca(OH)<sub>2</sub>); 6 Control. Nivel de Trp en dieta: A(0.045%); B(0.136%); C(0.091%). Gramos de peso ganado/pollo vs tiempo (días). Sólo se trabajó durante los primeros 10 días en el grupo de pollos alimentados con 4 CPP (NaOH).



- 54 -

\*interrupción del experimento (100% de mortalidad)

Tabla 7.7 Peso ganado por pollo por día en dos periodos experimentales.

Tratamientos	0.045% Trp		0.091% Trp		0.136% Trp	
	1	2	1	2	1	2
				g/día		
Caseína	0.35	7.45	3.25	6.30	4.72	3.45
Caseína(NaOH)	0.73	8.25	3.80	6.20	3.79	2.60
Caseína(Ca(OH) <sub>2</sub> )	0.59	2.75	2.05	8.10	2.63	1.60
CPP(NaOH)	-0.12	----	1.19	----	2.74	----
CPP(Ca(OH) <sub>2</sub> )	0.57	6.70	2.64	5.15	1.49	-X-
Dieta con L-Trp (patrón)	0.38	3.30	2.02	4.60	5.24	5.05

<sup>1</sup> Primeros 10 días del experimento.

<sup>2</sup> Ultimos 5 días del experimento (después de agregar Trp).

--- grupo de pollos donde no se efectuó la 2da. fase experimental por dieta insuficiente.

-X- 100% de mortalidad.

días del experimento. En la dieta con CPP(Ca(OH)<sub>2</sub>) al nivel 0.136% de Trp, los animales aumentaron de peso los primeros 5 días del experimento. A partir de este día se observó un decremento considerable de peso en los pollos, -- hasta la muerte de los animales. Este comportamiento de los animales a lo largo de todo el experimento no se observa en la tabla ya que sólo se reporta la diferencia en peso entre el último y primer día de la prueba.

El peso medio final de los pollos en las dos fases de la prueba biológica de los tres niveles de triptofano en dieta se muestran en la tabla 7.8.

En la primera fase del experimento el peso alcanzado -- por los pollos es directamente proporcional al nivel de -- triptofano en dieta, excepto en el grupo de pollos correspondientes a dietas con CPP(Ca(OH)<sub>2</sub>) donde el peso final de los pollos es mayor en el nivel 0.091% de triptofano en dieta y el peso es similar en los niveles 0.045 y 0.136% de Trp en dieta.

En la segunda fase del experimento, después de agregar Trp a las dietas de recuperación de los pollos es mayor -- cuando se trata de animales que originalmente se administró dietas a un nivel de Trp intermedio, 0.091% . Especialmente en pollos alimentados con dietas que contenían caseína(NaOH) y caseína(Ca(OH)<sub>2</sub>) donde el peso final fue el más alto en todo el grupo.

En la tabla 7.9 aparecen los datos de Trp ingerido en

Tabla 7.8 Pesos medios alcanzados al finalizar cada una de las fases experimentales del ensayo biológico.

Tratamientos	Trp en dieta	Pesos finales	
		1	2
	%	g	
Caseína	0.045	72.5 ± 3.3	109.8 ± 14.9
	0.091	105.0 ± 7.7	136.5 ± 14.7
	0.136	125.8 ± 23.0	143.0 ± 33.3
Caseína (NaOH)	0.045	79.8 ± 4.9	121.0 ± 4.1
	0.091	105.5 ± 3.5	136.5 ± 13.5
	0.136	116.7 ± 13.0	129.7 ± 17.8
Caseína (Ca(OH) <sub>2</sub> )	0.045	76.8 ± 3.2	90.5 ± 9.7
	0.091	91.3 ± 5.0	131.8 ± 7.8
	0.136	107.7 ± 16.4	115.7 ± 10.9
CPP (NaOH)	0.045	67.8 ± 3.3	-----
	0.091	74.5 ± 11.1	-----
	0.136	100.8 ± 3.9	-----
CPP (Ca(OH) <sub>2</sub> )	0.045	77.3 ± 5.4	110.8 ± 12.0
	0.091	95.8 ± 12.7	121.5 ± 23.3
	0.136	82.7 ± 30.4	-X-
Dieta con L-Trp (patrón)	0.045	73.0 ± 5.6	89.7 ± 8.0
	0.091	91.8 ± 8.5	114.8 ± 12.6
	0.136	133.0 ± 15.4	158.3 ± 20.9

<sup>1</sup> primeros 10 días del experimento.

<sup>2</sup> últimos 5 días del experimento.

--- grupo de pollos donde no se efectuó la 2da. fase experimental por dieta insuficiente.

-X- 100% de mortalidad.

Tabla 7.9 Consumo de triptofano por pollo por día.

Tratamientos	0.045% Trp		0.091% Trp		0.136% Trp	
	1	2	1	2	1	2
Caseína	3.29	16.08	10.26	22.34 <sup>mg</sup>	20.37	23.26
Caseína(NaOH)	4.10	18.34	12.38	20.73	18.22	16.86
Caseína(Ca(OH) <sub>2</sub> )	4.26	18.08	9.14	23.54	19.35	16.89
CPP(NaOH)	3.13	-----	7.28	-----	15.56	-----
CPP(Ca(OH) <sub>2</sub> )	3.52	17.10	9.56	22.80	7.89	-X-
Dieta con L-Trp (patrón)	3.51	13.95	8.17	21.45	21.16	27.00

<sup>1</sup> Primeros 10 días del experimento.

<sup>2</sup> Últimos 5 días del experimento (después de agregar Trp).

--- Grupo de pollos donde no se efectuó la 2da. fase experimental por dieta insuficiente

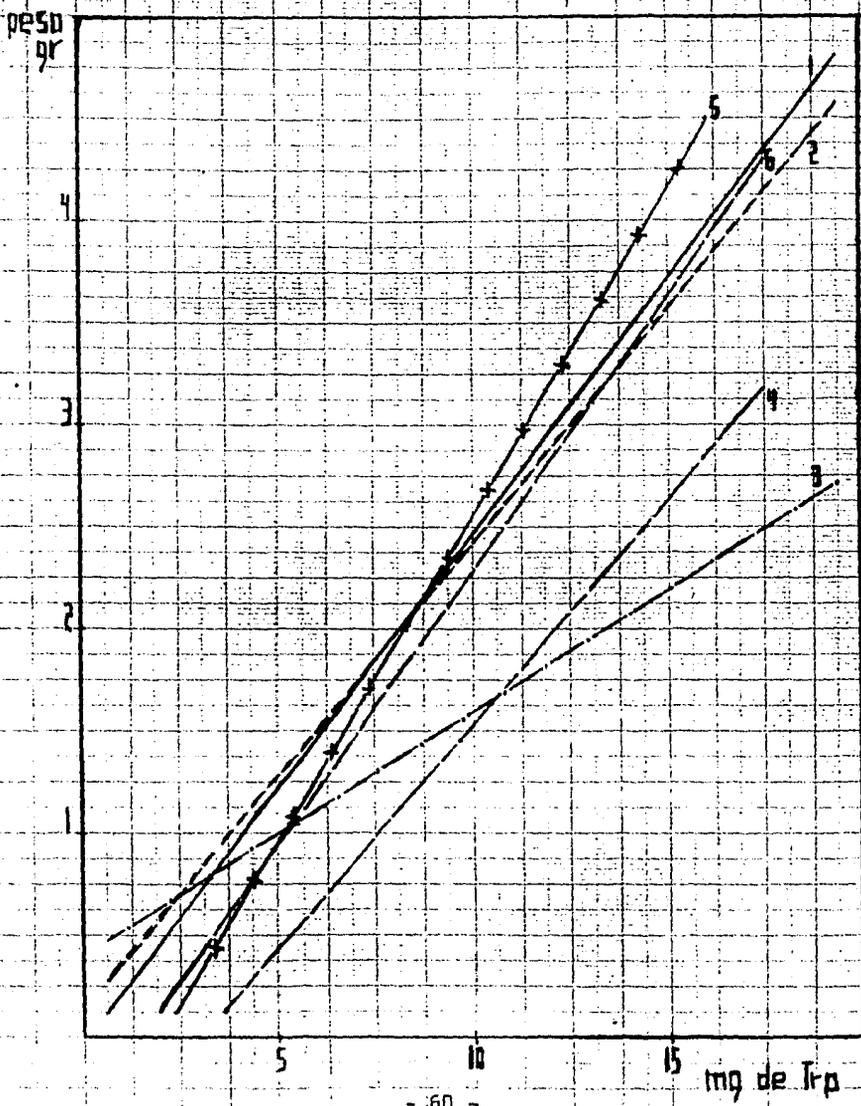
-X- 100% de mortalidad.

las diferentes dietas a los 3 niveles de Trp a lo largo de toda la prueba biológica. El consumo de Trp está en relación directa del consumo de alimento y del nivel de Trp en dieta. La actividad biológica se muestra en la tabla 7.10 donde se observa que caseína y dieta con L-Trp muestran datos de actividad biológica muy cercanas (gráf. 3). En caseína(NaOH) y CPP(NaOH) los valores son practicamente iguales. La actividad biológica más baja lo presentan caseína con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y el más alto CPP( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) cuya actividad biológica es en realidad la eficiencia de Trp, es decir, el peso ganado por unidad de Trp consumido. En el caso de CPP con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  la actividad biológica de 117% significa que la eficiencia de Trp en cada punto o nivel de este aminoácido en dieta es mayor respecto a L-Trp. Graficando (gráf 4) se observaría que la recta esta calculada practicamente con los dos primeros puntos, puesto que, el tercer punto (0.136% de Trp) cae entre los puntos mencionados, es decir, en ese grupo de pollos hay menor desarrollo porque consumen menos alimento.

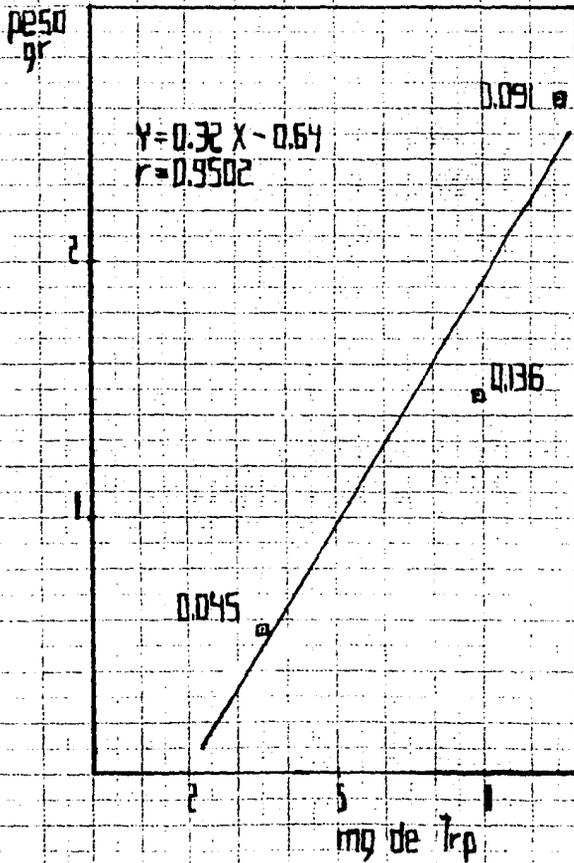
En la tabla 7.11 se presenta la actividad biológica de las proteínas relacionando las pendientes de las rectas -- con la recta de L-Trp (gráfica 5). Observandose de estas relaciones un decremento marcado en la actividad biológica de proteínas tratadas con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , especialmente en ----- CPP( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ).

En proteínas tratadas con NaOH la disminución en la ac

Grafica 3. Regresión lineal entre gr. de peso ganado/pollo/día vs mg de triptofano consumido/pollo/día. Pollos alimentados con dietas de: 1. Caseína sin tratar; 2. Caseína (NaOH); 3. Caseína (Ca(OH)<sub>2</sub>); 4. CPP (NaOH); 5. CPP (Ca(OH)<sub>2</sub>); 6. Control.



Gráfica 4. Regresión lineal entre gr de peso ganado/pollo/día vs mg de triptofano consumido/pollo/día. Pollos alimentados con dietas de CPP(NaOH)



Gráfica 5. Regresión lineal entre gr de peso ganado/pollo/día vs nivel de triptofano en dieta. Pollos alimentados con dietas de: 1. Caseína sin tratar; 2. Caseína (NaOH); 3. Caseína (Ca(OH)<sub>2</sub>); 4. CPP (NaOH); 5. CPP (Ca(OH)<sub>2</sub>); 6. Control.

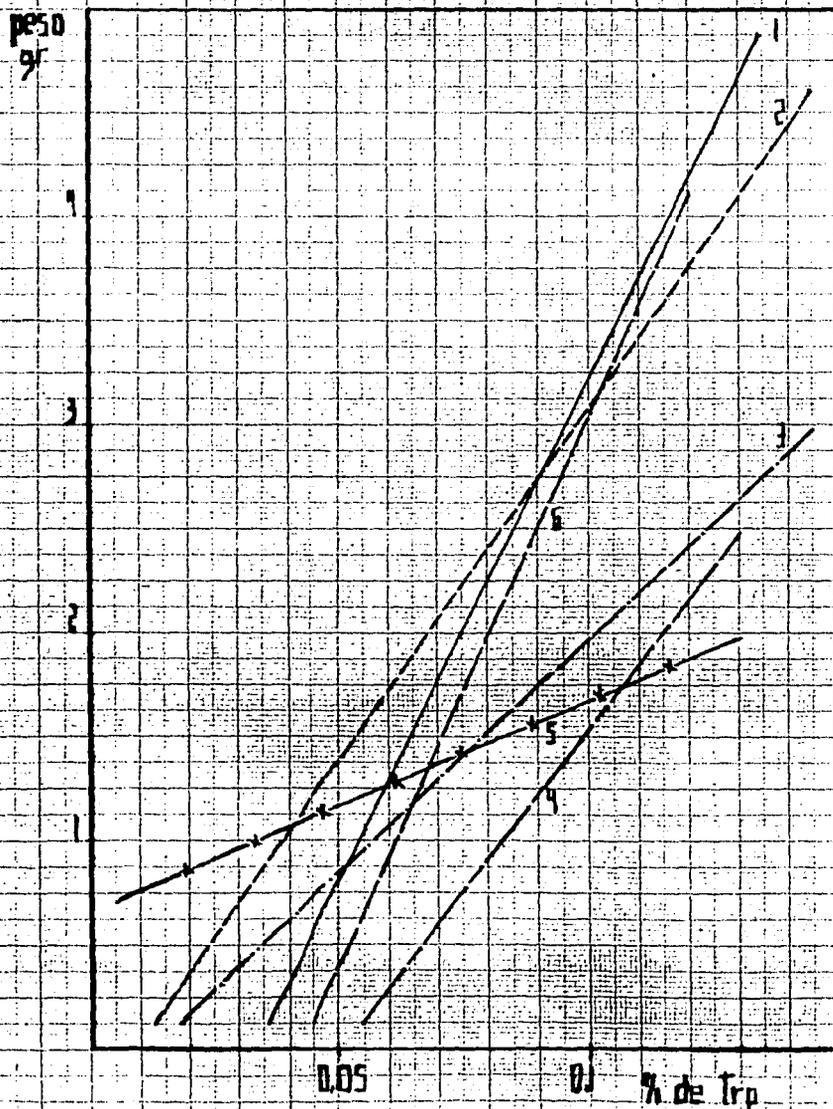


Tabla 7.10 Regresión lineal entre peso ganado contra triptofano consumido y su actividad biológica<sup>1</sup>.

Tratamiento	Trp en dieta	A	B	Ec. y coef. de correlación <sup>2</sup>	Actividad biológica
	%	mg	g		%
Caseína	0.045	3.29	0.35	$Y = 0.25X - 0.03$	92.02
	0.091	10.26	3.25	$r = 0.9575$	
	0.136	20.37	4.72		
Caseína (NaOH)	0.045	4.1	0.73	$Y = 0.23X + 0.15$	84.26
	0.091	12.38	3.8	$r = 0.9102$	
	0.136	18.22	3.79		
Caseína (Ca(OH) <sub>2</sub> )	0.045	4.26	0.59	$Y = 0.12X + 0.41$	45.73
	0.091	9.14	2.05	$r = 0.9025$	
	0.136	19.35	2.63		
CPP (NaOH)	0.045	3.13	-0.12	$Y = 0.22X - 0.67$	83.15
	0.091	7.28	1.19	$r = 0.9900$	
	0.136	15.56	2.74		
CPP (Ca(OH) <sub>2</sub> )	0.045	3.52	0.57	$Y = 0.32X - 0.64$	117.30
	0.091	9.56	2.64	$r = 0.9502$	
	0.136	7.89	1.49		
Dieta con L-Trp (patrón)	0.045	3.51	0.38	$Y = 0.27X - 0.40$	100.00
	0.091	8.17	2.02	$r = 0.9968$	
	0.136	21.16	5.24		

<sup>1</sup> A= trp consumido/pollo/día.

B= peso ganado/pollo/día.

<sup>2</sup> X= Trp consumido; Y= peso ganado.

Tabla 7.11 Regresión lineal entre peso ganado contra nivel de Trp en dieta y su actividad biológica.

Tratamientos	dieta		Ec. y coef. <sup>1</sup> de correlación	Actividad biológica
	%	g		
Caseína	0.045	0.35	Y= 48.1X - 1.6 r= 0.9837	90.14
	0.091	3.25		
	0.136	4.72		
Caseína(NaOH)	0.45	0.73	Y= 33.75 - 0.29 r= 9.8678	63.27
	0.091	3.80		
	0.136	3.79		
Caseína(Ca(OH) <sub>2</sub> )	0.045	0.59	Y= 22.45X - 0.28 r= 0.9718	42.08
	0.091	2.05		
	0.136	2.63		
CPP(NaOH)	0.045	-0.12	Y= 31.42X - 1.6 r= 0.9985	58.90
	0.091	1.19		
	0.136	2.74		
CPP(Ca(OH) <sub>2</sub> )	0.045	0.57	Y= 10.24X + 0.64 r= 0.4492	19.19
	0.091	2.64		
	0.136	1.49		
Dieta con L-Trp (patrón)	0.045	0.38	Y= 53.34X - 2.3 r= 0.9816	100.00
	0.091	2.02		
	0.136	5.24		

B: peso ganado/pollo/día.

<sup>1</sup> X= nivel de Trp; Y= peso ganado.

tividad biológica es grande pero no tan extrema como en el caso de los materiales protéicos mencionados, donde la actividad biológica decrece por debajo del 50%.

En la tabla 7.12 se ve que la eficiencia de triptofano en CPP(Ca(OH)<sub>2</sub>) es mayor que en L-Trp sólo en los niveles 0.045 y 0.091. En el nivel de triptofano más alto ésto se invierte.

En los niveles de triptofano en dieta de 0.045 y 0.091 la eficiencia de este aminoácido tiende a ser mayor en los materiales de prueba que en el patrón de comparación (dieta con L-Trp).

Sin embargo en el nivel 0.136 la eficiencia es menor en todos los casos respecto a L-Trp al mismo nivel de este aminoácido.

Los pollos de cada uno de estos grupos, a pesar de consumir mayor cantidad de triptofano, no se desarrollaron -- proporcionalmente, lo que hizo que su actividad biológica disminuyera.

En la segunda fase de la prueba biológica se observó un incremento considerable en la eficiencia de triptofano en los pollos correspondientes al nivel 0.045% de este aminoácido de cada una de las dietas. En el grupo de pollos que corresponden al nivel medio la eficiencia de triptofano -- disminuyó ligeramente, excepto en caseína(Ca(OH)<sub>2</sub>) donde se observó un ligero aumento. Los animales que presentan el nivel más alto de triptofano en dieta, 0.136, la efici-

Tabla 7.12 Eficiencia de triptofano en las dietas y en ambos periodos .

Tratamientos	1		2	
	Trp en dieta	Eficiencia de Trp	Trp en dieta	Eficiencia de Trp
	%	g/mg	%	g/mg
Caseína	0.045	0.106	0.151	0.463
	0.091	0.317	0.152	0.282
	0.136	0.232	0.153	0.148
Caseína(NaOH)	0.045	0.178	0.145	0.450
	0.091	0.307	0.141	0.299
	0.136	0.208	0.136	0.154
Caseína(Ca(OH) <sub>2</sub> )	0.045	0.138	0.160	0.152
	0.091	0.224	0.170	0.344
	0.136	0.136	0.180	0.095
CPP(NaOH)	0.045	0.038	-----	-----
	0.091	0.136	-----	-----
	0.136	0.176	-----	-----
CPP(Ca(OH) <sub>2</sub> )	0.045	0.162	0.150	0.392
	0.091	0.276	0.152	0.226
	0.136	0.189	0.152	-X-
Dieta con L-Trp (patrón)	0.045	0.108	0.145	0.337
	0.091	0.247	0.141	0.214
	0.136	0.248	0.136	0.187

\* g de peso ganado/ mg de Trp consumido.

1 primeros 10 días del experimento.

2 últimos 5 días del experimento.

--- grupo de pollos donde no se efectuó la 2da. fase experimental por dieta insuficiente.

-X- 100% de mortalidad.

encia de triptofano disminuyó marcadamente en todos los ca  
sos.

En la tabla 7.13 se presenta la mortalidad de los animal  
es durante las dos fases del experimento, en las diferent  
es dietas a los niveles de triptofano indicados. La mort  
alidad en ambas fases de la prueba fue similar. En gener  
al, a medida que el nivel de triptofano en dieta aumenta  
en los materiales de prueba, se incrementa también el númer  
o de muertes.

En los niveles de triptofano en dieta 0.045, 0.091 y --  
0.136% se registraron 1, 3 y 5 animales muertos, respectiv  
amente. En total se registró mortalidad de 16.6% en pol  
los alimentados con dietas que contenían proteínas tratad  
as.

Tabla 7.13 Mortalidad de los pollos durante el ensayo biológico.

Tratamiento	Nivel	1	2	Total
		Número de pollos		
Caseína	0.045	----	----	0
	0.091	----	----	0
	0.136	----	----	0
Caseína (NaOH)	0.045	----	----	0
	0.091	1	1	2
	0.136	----	1	1
Caseína (Ca(OH) <sub>2</sub> )	0.045	----	----	0
	0.091	----	1	1
	0.136	----	----	0
CPP (NaOH)	0.045	----	****	
	0.091	----	****	
	0.136	----	****	
CPP (Ca(OH) <sub>2</sub> )	0.045	----	----	0
	0.091	----	----	0
	0.136	2	2	4
Dieta con L-Trp (patrón)	0.045	1	----	1
	0.091	----	----	0
	0.136	----	----	0

<sup>1</sup> primeros 10 días del experimento.

<sup>2</sup> últimos 5 días del experimento.

\*\* no se continuó el experimento con estos pollos.

## VIII. DISCUSION.

A pesar de que se realizaron tratamientos térmico-alcalinos en las proteínas, éstos no son tan drásticos como para observar destrucción del triptofano. Por esta razón no se encontraron diferencias significativas en el contenido de este aminoácido en las proteínas después de ser tratadas con álcali. Sin embargo, en caseína ambos tratamientos alcalinos provocan racemización de triptofano --- en la misma proporción ya que se encontraron diferencias significativas en el contenido de L-triptofano en las proteínas después de ser tratadas. En el caso de CPP sólo se observó la racemización cuando se llevó a cabo el tratamiento con NaOH. En el resto de los casos, caseína, -- CPP sin tratar y CPP tratado con NaOH, las diferencias entre triptofano total y L-triptofano no son significativas por lo que el valor reportado es despreciable. El valor calculado del D-triptofano se reportó como un rango, don-  
de un límite fue calculado por la diferencia entre L-triptofano y triptofano total determinado con p-DMAB. El --- otro límite fue calculado por la diferencia entre L-triptofano y triptofano total determinado con autoanalizador de aminoácidos. Este límite debe considerarse con precaución, ya que por falta de recursos, no se hicieron réplicas en la determinación de triptofano total y no se reali

zó el análisis estadístico correspondiente, para decidir si las diferencias observadas fueron significativas o no.

La digestibilidad del triptofano depende de la digestibilidad de las proteínas, es decir, cuando la digestibilidad de una proteína es alta, la cantidad de aminoácidos libres que se obtiene después de la digestión también es alta. Por esta razón, la digestibilidad de triptofano en caseína fue mayor que la digestibilidad de triptofano en CPP. Además los procesos alcalinos en proteínas provocan disminución en la digestibilidad de ésta (De Groot y Slump, 1969), por lo que la digestibilidad del triptofano en proteínas tratadas con álcali puede disminuir, como es el caso de caseína y CPP tratados con NaOH.

En la prueba biológica los pollos mostraron una tendencia a consumir más alimento a medida que el nivel de triptofano en dieta se incrementó. En un trabajo anterior (Ohara et al., 1980) observaron el mismo comportamiento cuando administraron a pollos, dietas con diferentes niveles de triptofano. Este comportamiento de los animales hace pensar que el triptofano desempeña una función en la regulación del apetito, ya que a niveles muy bajos, 0.045% en dieta, el consumo de alimento en los pollos se inhibió y se incrementó gradualmente cuando el nivel de triptofano en dieta se elevó hasta un 0.15%. Que la disminución del consumo de alimento se debió simplemente, al desequilibrio que se generó cuando se

elaboró la dieta carente en un aminoácido esencial y que podría a su vez tener exceso de otros. En particular en pollos puede presentarse muerte, disminución de peso o -- disminución del consumo de alimento, si se presentan este tipo de desequilibrios en la dieta administrada (Mahler y Cordes, 1971; Nutrient Requirements of Poultry, 1977).

El consumo de alimento en los pollos se elevó considerablemente cuando se agregó triptofano a las dietas deficientes en este aminoácido. En los pollos alimentados originalmente con dietas de un nivel intermedio de este aminoácido, 0.091 g de triptofano/ 100 g de dieta, el consumo de alimento se regularizó en un periodo relativamente corto, 5 días, comparable al de los pollos alimentados desde el primer día, con dietas de mayor contenido de --- triptofano. Sin embargo, los animales alimentados con -- dietas muy deficientes en este aminoácido, 0.045 g de --- triptofano/ 100 g de alimento (30% de los requerimientos) una vez cubierta esta deficiencia, el consumo de alimento se incrementó pero sin alcanzar los niveles de consumo registrado en el resto de los pollos en el mismo período de tiempo. A pesar de esto, la "eficiencia metabólica" es mayor en este grupo de pollos, es decir, el alimento que consumen repercute en mayor medida en el desarrollo de los animales (peso ganado). En un período más largo es probable que el consumo de alimento sea uniforme o simi-- lar en todos los grupos de pollos.

La eficiencia de triptofano en la primera fase de la prueba biológica tendió a ser mayor en los pollos alimentados con dietas al 0.091% de triptofano. En los pollos se observa una tendencia a comer para satisfacer, primero sus requerimientos energéticos (Nutrient Requirements of Poultry, 1977). Resulta difícil definir los requerimientos energéticos porque depende de muchos factores propios del animal, como raza, edad, sexo, estado fisiológico, -- etc. y externos como ambiente en que se desarrolla, principalmente la temperatura, entre otros. En el caso de -- los pollos alimentados con dietas al 0.136% de triptofano la eficiencia de este aminoácido decrece, probablemente, porque hay sobreconsumo de alimento para satisfacer sus requerimientos energéticos y nutrientes como triptofano no pueden ser aprovechados en la misma medida en que se consumen.

En caseína se registró la máxima eficiencia de triptofano 0.463 g de peso ganado/ mg de triptofano consumido, cuando el nivel de este aminoácido fue de 0.15% en dieta. Por arriba de este nivel la eficiencia decrece.

La disponibilidad puede ser expresada en forma cuantitativa, cuando solamente un aminoácido está limitando la velocidad de desarrollo de sistemas biológicos en términos de ese aminoácido (Schweigert, 1948).

En las mismas proteínas cuando se evaluó disponibilidad de triptofano en pollos se observó que el tratamiento

con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  produce más daño en este aminoácido que el tratamiento con  $\text{NaOH}$ , contrario a lo que sucedió en el experimento "in vitro".

La diferencia en los resultados obtenidos en ambas --- pruebas se debe entre otras causas a que la prueba enzimá tica se evaluó el daño exclusivamente al triptofano y en el experimento biológico interfieren en la disponibilidad de triptofano, el daño provocado por el álcali al resto de los aminoácidos de las proteínas tratadas ya que ésta fue determinada indirectamente por el desarrollo de los pollos y por tanto de la calidad del alimento que consu-- men.

En el grupo de pollos correspondientes a la dieta con L-triptofano al más bajo nivel, se registró un pollo muerto. Sin embargo, su muerte se debió a que no ingirió alimento y presentó diarrea desde el primer día. La mortalidad fue mayor en los grupos de animales donde el nivel de proteína tratada en dieta fue más alto. En otro trabajo ya citado (Uhara et al., 1980) se encontró una mortalidad en pollos alimentados con dietas que contenían L-, DL-, y D-triptofano de 0.1, 11.1 y 7.8% respectivamente. Aunque las causas de mortalidad no fueron conocidas, existe una correlación entre mortalidad y D o DL-triptofano en dieta independientemente de que se dieron dietas con aminoáci-- dos como fuente de nitrógeno exclusivamente.

La mortalidad observada en el presente trabajo se po--

dría relacionar con varios factores: entre otros, la generación de D-triptofano, producción de lisinoalanina --- (aminoácido generado por tratamientos alcalinos, identificado cualitativamente en las proteínas tratadas). Es probable que en proteínas tratadas con  $\text{Ca(OH)}_2$  el contenido de calcio se haya incrementado por arriba de 3.75% en dieta. A estos niveles el calcio interfiere con la utilización de Mg, Mn y Zn. Además de dar lugar a modificaciones organolépticas en la dieta, específicamente en el sabor de ésta. Las causas de mortalidad en el experimento no fueron bien identificadas.

La digestibilidad biológica de triptofano en caseína "in vitro" tiene una correlación con el valor biológico o disponibilidad "in vivo". Sin embargo, en los demás casos no existe una correlación entre ambos valores de disponibilidad obtenidas por los métodos empleados. En el caso de la disponibilidad de triptofano "in vitro" caseína y CPP tratadas con NaOH presentaron valores inferiores a las proteínas respectivas tratadas con  $\text{Ca(OH)}_2$ . Cuando la disponibilidad de triptofano se determina "in vivo" la disponibilidad de este aminoácido se invierte ya que en caseína y CPP tratadas con  $\text{Ca(OH)}_2$  la disponibilidad de triptofano es menor que para las proteínas tratadas con NaOH.

Estas diferencias observadas se deben probablemente a que en la disponibilidad de triptofano evaluada por el mé

todo "in vivo" existen otros factores independientes a este aminoácido ya que, los tratamientos alcalinos pueden hacer no disponible o limitante alguno o algunos aminoácidos diferentes del triptofano. Recordemos que la disponibilidad puede evaluarse cuando solamente un aminoácido regula el desarrollo del animal y en este caso no podemos que los daños por el tratamiento a otros aminoácidos no influyan en el desarrollo de los animales.

Lo anterior se podría confirmar al realizar tratamientos alcalinos en gelatina y preparar dietas con esta proteína tratada y sin tratar, agregando L-triptofano y -- otros aminoácidos. Evaluar la calidad de la proteína en animales y determinar que si hay diferencias, se debieron al daño provocado por el tratamiento a la proteína ( a -- otros aminoácidos diferentes del triptofano).

## IX. CONCLUSIONES.

1.- Se determinó digestibilidad de triptofano "in vitro" con enzimas digestivas (pronasa) en caseína y CPP tratadas con 0.1N de NaOH y 0.1N de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  a  $85^\circ$  por 4 h y en caseína y CPP sin tratamiento alcalino. Sólo cuando caseína y CPP fueron sometidos a tratamiento alcalino con NaOH la digestibilidad de triptofano "in vitro", evaluado por diferentes métodos, disminuyó considerablemente en menor grado, también se encontró disminución en la digestibilidad de triptofano "in vitro" en caseína tratada con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

2.- Se encontró racemización generada por ambos tratamientos alcalinos en caseína. En CPP sólo se observó racemización de este aminoácido cuando el tratamiento se hizo con NaOH. Y fue en este material protéico donde se detectó el mayor daño, generandose 50% del D-isómero.

3.- La disponibilidad de triptofano "in vivo" se determinó midiendo la actividad biológica de este aminoácido en caseína, caseína tratada con NaOH o  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , CPP tratado con NaOH y CPP tratado con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Cuando las proteínas se sometieron a tratamientos alcalinos la disponibilidad de triptofano "in vivo" disminuyó en todos los

casos. El mayor decremento en la disponibilidad de este aminoácido se observó en los materiales protéicos tratados con  $\text{Ca(OH)}_2$ , particularmente en CPP.

APENDICE 1.

REQUERIMIENTOS DE AMINOACIDOS PARA POLLOS.

Según "Modification of Illinois of Reference Standard Amino Acid Mixture" Sasse y Baker (1973).

Aminoácido	% en dieta.
Arginina	0.95
Histidina	0.33
Lisina*	0.91
Tirosina	0.45
Triptofano*	0.15
Fenilalanina*	0.50
Metionina*	0.35
Cistina	0.35
Treonina*	0.65
Leucina *	1.00
Isoleucina*	0.60
Valina*	0.69
Prolina	0.40
Glicina*	0.60
Acido glutámico	12.00

\* Esencial para esta especie.

En la preparación de las dietas se consideraron los perfiles de aminoácidos teóricos, lo ideal hubiera sido determinar el contenido de aminoácidos de cada uno de los materiales protéicos usados para tener datos reales. Sin embargo, como no se disponía de un analizador de aminoácidos esto no fue posible, se consideró los reportes de la literatura, aunque no representan los valores reales de los materiales experimentales. De acuerdo a la cantidad de material protéico usado en la preparación de las dietas se determinó la cantidad de aminoácidos proporcionados. En el caso de los aminoácidos esenciales que no cubrían los requerimientos en pollos, se agregó la cantidad necesaria para cubrir esta deficiencia, como aminoácido libre.

## BIBLIOGRAFIA.

Ayres, H. G. (1975). Análisis químico cuantitativo. HARLA, S. A. - de C. V., México, D. F., 220.

Badúí, D. S. (1981). Química de los alimentos. Alhambra Mexicana México, D. F., 3, 140-145.

Berg, C. P. (1953). Physiology of D-amino acids. *Physio Rev.* 33, 145-189.

Bohak, Z. (1964).  $N^{\epsilon}$ -(DL-2-amino-2-carboxyethyl)-L-lysine, a new acid formed on alkaline treatment of proteins. *J. Biol. Chem.* 239, 2878-2887.

Castañón, M. J. (1981/1982). Problemas de alimentación y nutrición en el tercer mundo. Problemas del desarrollo. Instituto de Investigaciones Económicas U.N.A.M. 12 (Núms. 47/48), 9-24.

Damodaran, M. and Ramachandran, B. V. (1941). 13. Enzymatic proteolysis. 14. Amino acids of casein phosphopeptone. *Biochem. J.* 35, 122-134.

Dean, W. F. and Scott, H. M. (1965). The development of an amino acid reference diet for the early growth of chicks. *Poultry Sci.* 44, 803-808.

De Groot, A. P. and Slump, P. (1969). Effects of severe alkali -- treatment of protein on amino acid composition and nutritive value. *J. Nutrition.* 98, 45-56.

Dixon, M. and Webb, E. C. (1958). *Enzyme*. Longmans Green and Co., London, p. 252.

Fearon, W. R. (1920). A study of some biochemical tests. No. 2 The Adamkiewicz protein reaction. The mechanism of the Hopkins-Cole test for tryptophan. A new colour test for glyoxilic acid. *Bioch. J.* 14, 548-564.

Finley, J. W., Johnston, P. H. and Friedman, M. (1975). A potential improved tryptophan of food proteins in the presence of carbohydrates. Protein nutritional quality of foods and feeds. Part 1. Assay methods biological, biochemical and chemical. Edited by Mendel Friedman, Marcel Dekker Inc. New York. 23, 453-462.

Friedman, M. and Finley, J. W. (1971). Methods of tryptophan analysis. *J. Agr. Food Chem.* 19, 626-631.

Fujimaki, M., Hayase, F. y Kato, H. (1972). Studies on roasting -- changes of proteins. Part I . Changes of casein and lysozyme durin roasting. *Agr. Biol. Chem.* 36(3) 416-425.

Gortner, R. A. and Blish, M. J. (1915). On the origin of humin formed by the acid hydrolysis of protein. *J. Amer. Chem. Soc.* 37, 1630-1636.

Gunsalus, I. C., Galeener, C. G. and Stamer, J. R. (1955). Tryptophanase from *E. coli*. *Methods in enzymology.* Ch. ii, 31, 238-247.

Hayase, F., Kato, H. and Fujimaki, M. (1979). Racemization of aminoacid residues in casein roasted with glucose and/or methyl linoleate *Agric. Biol. Chem* 43, 2459-2465.

Hill, R. L. and Schmidt, W. R. (1962). The complete enzymatic hydrolysis of proteins. *J. Biol. Chem.* 237, 389-396.

Lischwe, M. A. and Sung, M. T. (1977). Use of N-chlorosuccinimide-urea for the selective cleavage of tryptophanyl peptide bonds in proteins. *J. Biol. Chem* 252, 4976-4980.

Liu, T. Y. and Chang, Y. H. (1971). Hydrolysis of proteins with p-toluenesulfonic acid. Determination of tryptophan. J. Biol. Chem. 246. 2842-2848.

Loh, H. H. and Berg, C. P. (1971). Production of D-kynurenine and other metabolites from D-tryptophan by the intact rabbit and rabbit tissue. J. Nutr. 101, 465-475.

Lowenberg, M. E., Todhunter, E. N., Wilson, E. D., Feeney, M. C. and Savage, J. R. (1970). Los alimentos y el hombre. Ed. Limusa-Wiley - S. A. México, 1<sup>a</sup> ed. cap. I, 22.

Mc. Ewan, K. and Carpenter, J. K. (1980). The nutritional value of supplementary D-tryptophan for growing mice. Nutrition Reports International. 21, 279-283.

Mahler, H. R. and Cordes, E. H. (1971). Química biológica. Ediciones Omega, Barcelona, 1<sup>a</sup> ed., 16, 718-720.

Major, E. J. and Batterham, E. S. (1981). Availability of lysine in protein concentrates as determined by slope-ratio assay with rat, - pig and chemical assays. Br. J. Nutr. 46, 513-519.

Meyer, L. H. (1960). Food chemistry. Reinhold Publishing Co. New York. cap. IV, p. 136-138.

Miller, E. L. (1967). Determination of the tryptophan content of feedingstuffs with particular reference to cereals. J. Sci. Fd. Agric. 18, 381-386.

Mondino, A. and Bongiovanni, G. (1970). An experimental study of amino acid degradation under open flask hydrolytic conditions. J. --- Chromatof. 52, 405-413.

Nomoto, M., Narahashi, Y. and Murakami, M. (1960). A proteolytic enzyme of *Streptomyces griseus*. J. Biochem. 48, 593-602.

Nutrient requirements of poultry (1977). 7th. Revised Edition. -- National Academy of Sciences Washington D. C.

Dhara, I., Otsuka, S., Yugari, Y. and Arioshi, S. (1980). Comparison of the nutritive values of L-, DL- and tryptophan in the rat and chick. J. Nutr. 100, 634-640.

Ohta, T. and Nakai, T. (1979). Reaction of cystine with tryptophan under the conditions of acid hydrolysis of proteins. Mechanism of action of cystine. Agric. Biol. Chem. 43, 2419-2423.

Olcott, S. and Fraenkel-Conrat, H. (1947). Formation and loss of cysteine during acid hydrolysis of proteins. Role of Tryptophan. J. Biol. Chem. 171, 583-594.

Pearson, D. (1976). The chemical analysis of foods. 7th. ed. Churchill Livingstone. p. 11-13.

Phillips, W. A. and Berg, C. P. (1954). Effect upon growth of the D-isomers in synthetic mixtures of the essential amino acids. J. Nutr. 53, 481-498.

Priestley, R. J. (1979). Effects of heating on foodstuffs. Applied Science Publishers Ltd. London, Ch. 1. p. 31-33.

Provansal, M. M. P., Cuq, J. L. A., and Cheftel, J. L. (1975). Chemical and nutritional modifications of sunflower proteins due to alkaline processing. Formation of amino acids cross-links and isomerization of lysine residues. J. Agric. Food Chem. 23, 938-943.

Rayner, C. J. and Fox, M. (1976). Amino acid digestibility studies of autoclaved rapeseed meals using an "in vitro" enzymatic procedure. J. Sci. Fd. Agric. 27, 643-648.

Sasse, C. E. and Baker, D. H. (1973). Availability of sulfur amino acids in corn gluten meal for growing chicks. J. Anim. Sci. 37, ---- 1351-1355.

Schweigert, B. S. (1948). Availability of tryptophan from various products for growth of chicks. Arch. Biochem. Biophys. 19, 265-272.

Spies, J. R. and Chambers, D. C. (1949). Chemical determination of tryptophan in proteins. Anal. Chem. 21, 1249-1266.

Torres Castellanos Ma. de los Angeles (1979). Tesis: Comparaciones de diferentes métodos químicos y microbiológicos para la determinación de triptofano. Fac. de Química U.N.A.M.

Tovar, L. R. (1981). The effects of treatment with alkali on the nutritional characteristics of proteins. Doctoral Dissertation, University of California, Berkley.

Van Esck, L., Fearon, V. J. and De Groot, A. P. (1974). Nutritional effects of alkali-treated soy protein in rats. J. Nutr. 104, ---- 1630-1636.

Warner, R. C. (1942). The alkaline hydrolysis of egg albumin. J. Biol. Chem. 142, 741.

Whitaker, J. R. y Tannenbaum, S. R. (1977). Food proteins. AVI Publishing Co. Inc. Westport Connecticut. Chap. XVII, 401-420.

Woodard, J. C. and Short, D. D. (1973). Toxicity of alkali-treated soy protein in rats. J. Nutr. 103, 596-574.