



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

COMPARACION DE DIFERENTES METODOS
QUIMICOS Y MICROBIOLOGICOS PARA LA
DETERMINACION DE TRIPTOFANO.

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a :

María de los Angeles Torres Castellanos



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.

CLASIFICACION 1979
AÑO Vol. 376
FECHA 343
PREC



JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA

PRESIDENTE	Prof. Ninfa Guerrero de Callejas
VOCAL	Prof. Enrique García Galeano
SECRETARIO	Prof. Angela Sotelo López
1er. SUPLENTE	Prof. Emilio Barragán Hernández
2do. SUPLENTE	Prof. Miguel Hernández Infante

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

División de Estudios Superiores, Facultad de Química U. N. A. M.

SUSTENTANTE

MARIA DE LOS ANGELES TORRES CASTELLANOS

ASESOR

M. en C. ANGELA SOTELO LOPEZ

A mis padres:

Procopio Torres Márquez
Angelina Castellanos de Torres
con todo cariño y mi eterno agradecimiento
a ellos debo, la realización de mis ideales.

A mi siempre novio José de Jesús
por el apoyo y cariño que siempre
me ha brindado.

A mis hermanos:
Hermelinda, Oscar, Ma. del Refugio,
Mago y Mario. Con el deseo de que
culminen favorablemente sus ilusiones,
anteponiendo a éstas el espíritu
combativo que caracteriza a
los triunfadores.

A mi maestra Angela Sotelo López
con admiración y cariño por su
valiosa enseñanza.

A Virginia Sousa de Ramírez
por su valioso apoyo.

A Miguel Hernández Infante
por sus útiles consejos.

CONTENIDO

- I.- INTRODUCCION
- II.- OBJETIVO
- III.- GENERALIDADES
- IV.- MATERIAL Y METODOS
- V.- RESULTADOS Y DISCUSION
- VI.- CONCLUSIONES
- VII.- BIBLIOGRAFIA

I

I N T R O D U C C I O N

La determinación de triptofano en alimentos es de gran importancia, por ser uno de los aminoácidos nutricionalmente esenciales para muchos animales y para el hombre que junto con la lisina y metionina, son limitantes en la dieta de nuestro país, la cual se encuentra integrada principalmente por maíz y frijol.

La composición de aminoácidos de muchas proteínas se ha reportado, pero la estimación del número de residuos de triptofano frecuentemente, se ha omitido. Esta situación es una reflexión de la dificultad asociada con la determinación cuantitativa de los residuos de triptofano en una proteína. (1)

El problema de análisis de triptofano no es su medición como aminoácido, ya que puede ser rápidamente determinado por métodos microbiológicos, espectrofotométricos, espectrofluorométricos, etc., sino en las dificultades manifestadas en la preparación de muestras para análisis, como hidrolizar todo el triptofano sin destruirlo. (2)

El triptofano a diferencia de la mayoría de los aminoácidos, es generalmente inestable por hidrólisis ácida, especialmente si están presentes carbohidratos durante la hidrólisis. (2 y 3) La hidrólisis alcalina no siempre hidroliza cuantitativamente este aminoácido, (1) ocasionalmente da valores exactos con modelos de péptidos y con algunas proteínas, pero pobres resultados son obtenidos generalmente por razones inexplicables. (4)

Con proteínas puras o péptidos las determinaciones de triptofano se realizan sin dificultad. Por análisis de estos compuestos por el método colorimétrico con p-dimetilaminobenzaldehído (DMAB) de acuerdo a Spies & Chambers (5) y recientemente modificado por Spies, (6) puede ser usado. El método espectrofotométrico de Bencze & Schmid (7) también se aplica a estos productos. Sin embargo, estos métodos no son adecuados para la determinación de triptofano en alimentos. (8)

Muchos métodos han sido ensayados para determinar triptofano, especialmente en la presencia de otros aminoácidos y constituyentes de productos biológicos. Tales métodos han usado hidrólisis ácida, alcalina o enzimática seguida por ensayos espectrofotométricos, espectrofluorométricos o biológi-

cos y combinaciones de estos procedimientos. (2)

Las dificultades que han sido encontradas con alimentos, se deben a la baja concentración de triptofano que ellos contienen; a su insolubilidad; a la presencia de carbohidratos y a la producción de colores anormales durante el análisis. (9)

Los métodos de análisis que se han usado, involucran análisis de la proteína intacta, o sea sin hidrolizar, o haciendo hidrólisis enzimática o alcalina.

II

O B J E T I V O

Encontrar la técnica más exacta y adecuada (rápida) para la determinación de triptofano en alimentos por comparación de diferentes métodos e hidrólisis.

III

GENERALIDADES

Uno de los problemas que en la actualidad se plantea, es el de asegurar una alimentación adecuada para la población en tan rápido crecimiento. Por lo que ha habido una gran tendencia hacia el mejoramiento de los recursos naturales.

La ingestión de proteínas y calorías o el consumo de proteínas que no suministran una provisión adecuada de todos los aminoácidos esenciales, es sin duda el principal problema en el mundo. Como las proteínas desempeñan una función primordial en todos los procesos vitales, los síntomas de deficiencia proteica en el hombre son variados y no necesariamente específicos ni característicos.

Los síntomas iniciales de deficiencia proteica son: pérdida de peso, lasitud, fatiga fácil, disminución de la resistencia a las enfermedades, convalecencia prolongada y en los niños, crecimiento lento y defectuoso. La carencia sostenida de proteínas, produce consecuencias de carácter más específico, baja concentración de las proteínas de la sangre (in-

clusive hemoglobina) edema y lesiones hepáticas.

Para obtener un estado nutricional deseable, es esencial el asegurar un adecuado abastecimiento de proteínas, además de los otros nutrientes. (10)

CALIDAD DE LAS PROTEINAS

Desde el punto de vista nutricional, vemos que las proteínas tienen diferentes valores nutricionales, lo que se debe a su contenido de aminoácidos, por lo que se ha propuesto una clasificación fundada en sus propiedades nutritivas con base a los trabajos de Osborne y Mendel y de otros investigadores. (10)

I.- Proteínas completas: Son aquellas que tienen todos los aminoácidos necesarios para el crecimiento y en cantidad adecuada. (11) Por lo que son capaces de mantener los procesos vitales y el crecimiento normal en organismos jóvenes, si se administran solas en la dieta de animales de laboratorio. Por regla general, son proteínas completas aquellas de origen animal como las de carne de res, pescado, aves, huevos y leche; con excepción de

la gelatina. La glicinina, proteína del frijol de soya, es completa, así como la glutenina del trigo, la glutelina del maíz y la excelsina de la nuez de Brasil y de la almendra.

II.- Proteínas intermedias: Parcialmente incompletas, son aquellas que proveen los aminoácidos para mantener la vida, pero no para el crecimiento normal. Ejemplos: la gliadina del trigo (carece de lisina), la hordeina de la cebada y la prolamina del centeno. (10)

III.- Proteínas incompletas: Son incapaces de mantener la vida y el crecimiento. Pertenecen a este grupo la mayor parte de las proteínas vegetales con excepción de la glicinina del frijol de soya. La zeína del maíz (carece de lisina y triptofano) y la gelatina de origen animal, son incompletas. (10, 11)

Las proteínas de alto valor biológico: son las que tienen todos los aminoácidos necesarios para la construcción de tejidos y que sus aminoácidos están balanceados.

Cuando una proteína es baja en algún aminoácido, se dice que éste es el "FACTOR LIMITANTE". (11)

"VALOR BIOLÓGICO"

La expresión "valor biológico", se emplea para indicar el porcentaje de nitrógeno absorbido que retiene el organismo para su sostén y crecimiento. El valor biológico de las proteínas alimenticias, depende en alto grado de su composición de aminoácidos. Las proteínas que no suministran todos los aminoácidos o que proporcionan algunos de ellos en cantidades subóptimas, no son tan útiles para sustentar el anabolismo proteínico del organismo, como otras proteínas que pueden suministrar una dotación completa de los aminoácidos esenciales y no esenciales. Por tanto, se considera que las proteínas tienen un alto valor biológico primordialmente sea su capacidad para suministrar todos los aminoácidos requeridos, para la formación de tejidos corporales, enzimas y hormonas. Sin embargo, además de su "integridad" estructural, intervienen otros factores para dar su valor a una proteína determinada. Probablemente el factor más importante sea la digestibilidad. En el ser humano adulto, una proteína debe ser digerida totalmente e hidrolizada en sus aminoácidos componentes

antes que éstos puedan ser absorbidos en la corriente sanguínea y aprovechados por el conjunto metabólico del organismo. En el caso de la hidrólisis incompleta de una proteína, sólo parte de los aminoácidos constituyentes llegan a ser aprovechados, en tanto que los otros, quedan encerrados en las moléculas proteínicas no digeridas o en fragmentos polipeptídicos parcialmente hidrolizados y finalmente son eliminados sin contribuir a la nutrición del individuo. (10)

Dentro de las proteínas de alto valor biológico se encuentran las de origen animal, que aumentando su producción y consumo, sería el método ideal para prevenir la mal nutrición del hombre. Ejemplo de estas proteínas son la caseína de la leche, la albúmina del huevo, proteínas del pescado, de la carne de res, de pollo, etc. Pero a excepción del pescado, todas son escasas y caras, por lo que la alternativa son las proteínas vegetales, de valor biológico más bajo. Ejemplos de ellas son las proteínas del trigo, la proteína del maíz, del arroz, del frijol, etc., por lo que este tipo de proteínas vegetales deben de suplementarse con otros alimentos que suministren los aminoácidos faltantes a fin de obtener una buena nutrición. (10, 12)

Ya se indicó anteriormente que las proteínas vegetales, son deficientes en uno o más aminoácidos, comparadas con proteínas de origen animal. Sin embargo, se pueden obtener productos de valores biológicos buenos, usando una mezcla de diferentes materiales. Ejemplo: cereal-leguminosa en proporciones adecuadas. Con estas mezclas de proteínas vegetales se han obtenido buenos resultados en ensayos de alimentación animal, en mediciones de balance de niños normales, y en la cura del Kwashiorkor. Es razonable suponer que si el alimento es efectivo para curarlo, también lo es para prevenirlo. (12)

✓ AMINOACIDOS NUTRICIONALMENTE ESENCIALES PARA EL HOMBRE

En el curso de la evolución, el organismo animal pierde la habilidad para sintetizar el carbón enlazante de algunos de los α -ceto ácidos. En efecto, los correspondientes α -aminoácidos, no pueden formarse por las reacciones vía transaminación. A estos aminoácidos que deben ser proporcionados en la dieta, se les ha dado el nombre de aminoácidos esenciales. (13)

Alrededor de 1938, se realizaron estudios destinados a determinar el valor nutricional de las proteínas, utilizando

mezclas de aminoácidos químicamente puros en vez de proteínas. Con el propósito de determinar el valor nutricional de aminoácidos, se omitieron uno por uno de la mezcla y al mismo tiempo se observó el efecto en el crecimiento. Al suprimir determinados aminoácidos se alteraba el crecimiento: la supresión de otros no producía efectos en esta función. En base a estos trabajos, los aminoácidos se clasificaron en: aquellos que el organismo era incapaz de sintetizar a velocidad adecuada, según las necesidades impuestas por el crecimiento, llamándolos aminoácidos esenciales; y aminoácidos no esenciales a aquellos que el organismo puede sintetizar a velocidad adecuada. Se descubrió que los aminoácidos necesarios para el crecimiento, son los esenciales para evitar la pérdida de nitrógeno en el organismo humano, a excepción de la arginina y la histidina. (10) Los aminoácidos esenciales para la dieta de personas adultas son 8 como se ve en la tabla 1, así como sus requerimientos. (10, 13)

11 12

T A B L A I

AMINOACIDOS ESENCIALES EN LA NUTRICION HUMANA

Aminoácidos esenciales	Cantidad que se recomien- da por día en gramos	Ingestión mínima por día (hombre) en gramos	Ingestión mínima por día (mujer) en gramos
L-fenilalanina	2.2	1.10	0.220
L-metionina	2.2	1.10	0.290
L-leucina	2.2	1.10	0.620
L-valina	1.6	0.80	0.650
L-lisina	1.6	0.80	0.500
L-isoleucina	1.4	0.70	0.450
L-treonina	1.0	0.50	0.310
L-triptofano	0.5	0.25	0.160

PROTEINAS EN ALIMENTOS

Aunque la proteína es una sustancia muy valiosa para animales y plantas, no es requerida o almacenada en grandes cantidades. La mayoría de los alimentos animales, contienen grasa y agua con otras sustancias en pequeñas cantidades, pero casi no hay carbohidratos en la carne, los alimentos vegetales contienen considerables cantidades de almidón y algo de fibra. La leche contiene algo de los tres nutrientes (proteínas, lípidos y carbohidratos), así como minerales y vitaminas. Aún los alimentos que son ricos en proteínas contienen alrededor de 16 a 33% de proteína en la mayoría de la carne, leguminosas secas, nueces y queso. La leche y el queso proveen varias proteínas a costo moderado, en comparación con carne, huevo y nueces.

Los alimentos ricos en proteínas son útiles en la dieta por tres propósitos principales:

- a).- Después de su digestión, las proteínas proporcionan mezclas de aminoácidos adecuados y esenciales para la construcción y mantenimiento de los tejidos del cuerpo.

b).- Las proteínas pueden proporcionar combustibles para necesidades energéticas.

c).- La mayoría de los alimentos ricos en proteínas también aportan valiosos minerales y vitaminas.

Los animales no pueden sobrevivir en una dieta solamente de carbohidratos y grasas, porque los tejidos se dañan por la carencia de aminoácidos que son necesarios para mantener el proceso de vida.

Lamentables demostraciones de esto se han visto entre las clases pobres en países de Asia, Africa y Latino-América, donde la dieta consiste principalmente, de alimentos con contenido alto en carbohidratos, con alimentos vegetales pobres en grasa que tienen algo de proteína (generalmente arroz, maíz o frijol), pero muy pequeña cantidad en proteína animal. En la mayoría de estas dietas, ambas las proteínas y las calorías, son suplidas en cantidades insuficientes y, la muerte por mal nutrición es común. (11)

Entre los factores que influyen en el equilibrio nitrogenado están:

- a).- Estado fisiológico del individuo.
- b).- Suficiencia del ingreso energético proveniente de carbohidratos y grasas.
- c).- Capacidad orgánica para adaptarse al nivel de ingreso.

Algunos de los estados fisiológicos aumentan las necesidades proteínicas: el embarazo y el crecimiento, se caracterizan por requerimientos proteínicos a los que se emplean para el anabolismo tisular; por lo tanto, en estos períodos, el equilibrio nitrogenado es positivo.

La suficiencia del ingreso energético establece la tasa de proteínas necesarias. Si el contenido de carbohidratos y grasas es suficiente para cubrir los requerimientos energéticos, no se usarán las proteínas para este fin. La preservación de las proteínas para su uso en el metabolismo energético se ha denominado "efecto de conservar proteínas" de carbohidratos y grasas.

El organismo posee gran capacidad para adaptarse a situaciones diversas, por ello trata de mantenerse el equilibrio del nitrógeno en individuos adultos aún cuando el ingreso de

este elemento varíe considerablemente. Al disminuir el ingreso, disminuye la excreción, en especial en la orina. De manera contraria, a ingresos mayores corresponde mayor excreción.

También se presenta pérdida excesiva de proteínas en los estados post-operatorios o en enfermedades, después de lesiones o durante períodos de recuperación subsecuentes a quemaduras extensas. Se sabe que tales períodos pueden reemplazarse a merced a un ingreso abundante de proteínas.

Parecería lógico que el ejercicio eleve las necesidades proteínicas, pero esto no ocurre así. Cuando las fuentes exógenas de calorías son suficientes para satisfacer el aumento de los requerimientos energéticos que ocasiona el ejercicio excepto la pérdida de nitrógeno por sudor, no se necesitan proteínas para este fin o muy pocas. Todo lo anterior es válido si se piensa que en el ejercicio el glucógeno es el compuesto básico empleado en la contracción muscular y no las proteínas.

Las necesidades mínimas promedio en términos de "proteína de referencia" se expresan en gramos por Kg de peso corporal. Tabla 2.

T A B L A 2

PROMEDIO DEL REQUERIMIENTO MINIMO RESPECTO A LA PROTEINA
DE REFERENCIA (F.A.O.)
(g/Kg de peso corporal)

EDADES	VARON	NIÑOS	MUJER
1 - 3		1.5	
4 - 6		1 - 14	
7 - 9		0.78	
10-12	0.70		0.75
13-15	0.76		0.60
16-19	0.53		0.38
20-24	0.37		0.35
25	0.35		0.35

(10)

Rose ha sugerido que la cantidad de proteína debe ser el doble de los valores mínimos. (10)

SUPLEMENTACION

Una proteína puede ser de bajo valor biológico por carecer de uno o más de los aminoácidos esenciales. No obstante, puede ser un alimento útil cuando lo completa otra proteína que proporcione los constituyentes faltantes. Si la segunda proteína de alta calidad suministra además cantidades suficientes de los aminoácidos carentes, la mezcla de ambas proteínas será de alto valor biológico.

La mayoría de los alimentos contiene una mezcla de proteínas de origen diferente y de distinta composición de aminoácidos. En nuestros hábitos alimentarios, existe la tendencia de mezclar algunas proteínas de alta calidad, con proteínas vegetales menos completas y menos costosas (macarrones con queso, pan y leche, etc.) De este modo, se ha venido practicando instintivamente el suplemento recíproco de proteínas, desde hace tiempo, aunque apenas en este siglo se ha reconocido su mecanismo químico-biológico y su importancia para

la nutrición.

No existe un mecanismo fisiológico para almacenar los distintos aminoácidos en el organismo y utilizarlos cuando puedan ser necesarios para la síntesis de una proteína especial: el suplemento eficaz ocurre únicamente cuando las proteínas deficientes y suplementarias se ingieren simultáneamente en un breve intervalo de tiempo. En años recientes, se ha presentado mayor atención al suplemento de proteínas de baja calidad con los aminoácidos en que son deficientes. (10)

Con el desarrollo de métodos de manufactura a gran escala, la suplementación de dietas pobres con aminoácidos sintéticos llega a ser una posibilidad práctica. Por ejemplo, metionina sintética análoga, puede ahora manufacturarse económicamente y, parece ser efectiva cuando se agrega a dietas en las que es un factor limitante. Otros aminoácidos sintéticos son aún caros.

Algunas personas han probado la efectividad de suplementación con aminoácidos, sobre infantes recuperándose de mal nutrición proteínica. Gómez et al. (1958), encontró que la

adición de lisina y triptofano aumentaron la absorción y retención de nitrógeno sobre una dieta de maíz y frijol.

Scrimshaw y sus colaboradores, usando una dieta en la cual el maíz fue la única fuente de proteína, encontró que triptofano y lisina causaron una marcada mejoría en la retención de nitrógeno; isoleucina causó un mayor aumento pero éste fue contrario por la adición de metionina. Es posible que un desequilibrio de aminoácidos se halla producido. Gaitonde et al. (1959), añadió lisina a la dieta de un grupo de infantes con severa mal nutrición proteínica, resultando aumentos en el peso del cuerpo y en concentraciones proteínicas del plasma en comparación con un grupo de control, en el cual no recibió el aminoácido, pero las diferencias no fueron satisfactoriamente significativas. (12)

Los granos de cereal y la mayoría de las leguminosas, contienen una proteína incompleta, pero mezclándolos en proporciones adecuadas, se obtiene una mezcla de aminoácidos proporcionados por los alimentos y resulta una proteína casi completamente adecuada. Aparentemente, cada una de las semillas proporciona todos los aminoácidos, pero algunos de ellos en proporciones inadecuadas para el crecimiento, así que ellos necesitan ser suplementados por alguna otra proteína en la

dieta, que tenga los aminoácidos esenciales que le faltan a la primera y en la cantidad suficiente. (11)

Una posible solución al problema del suministro proteico suficiente, es la fortificación de proteínas vegetales debidamente seleccionadas mediante un suplemento simultáneo, con pequeñas cantidades de proteínas animales. Sin embargo, es necesario decir que en la suplementación no es sólo necesario tomar en cuenta el contenido de proteínas y que el balance de aminoácidos sea el adecuado, sino que es preciso administrar un adecuado contenido de calorías. (10) *M*

Por todo lo anterior, se ve la necesidad de analizar el contenido de aminoácidos en los alimentos y, en base a ello, poder hacer una buena suplementación. Y para su análisis, el primer paso sería efectuar la hidrólisis de la proteína, seguida por su determinación.

ASPECTOS GENERALES DE HIDROLISIS

AGENTES HIDROLITICOS PARA PROTEINAS.

Una variedad de reactivos es capaz de hidrolizar el péptido unido en proteínas, incluyendo soluciones ácidas y álca-

lis (fuentes disponibles de hidrógeno e iones hidroxil), sólidos de intercambio ionico, poliestireno soluble en agua, ácido sulfónico y enzimas proteolíticas. Enzimas como pepsina y tripsina son capaces de aportar substancial rompimiento de proteínas bajo condiciones relativamente suaves de temperatura y pH. Sin embargo, la mayoría de las enzimas muestran una especificidad marcada con la cual atacan diferentes enlaces peptídicos de acuerdo a la naturaleza del enlace en la cadena polipeptídica y son inadecuadas para la preparación de hidrolizados totales de proteínas para análisis de aminoácidos. Una dificultad adicional es la prevención de las reacciones en cadena. Hill y Schmidt (1962) han mostrado que cuando una proteína es tratada sucesivamente con papaína, peptidasa purificada de riñón, leucina aminopeptidasa y prolidasa, substancialmente, todos los péptidos ligados se rompen y triptofano, glutamina y asparagina pueden obtenerse en altos rendimientos.

Se ha reportado que hidrólisis más rápidas se han realizado tratando la proteína con ácido fórmico concentrado, hirviendo anterior a la adición de HCl (Gurnani et al., 1955).

Esto se atribuye a la conversión de la proteína de la configuración de hélice o α a la forma β . El uso de ácido sulfuroso solo o en combinación con ácidos clorhídrico o sulfúrico, reduce la pérdida de triptofano durante la hidrólisis (Pedersen y Baker, 1954). Desafortunadamente, el ácido sulfuroso no es un reactivo prometedor para el uso de análisis de aminoácidos, debido al bajo grado de hidrólisis alcanzado bajo condiciones donde la destrucción del triptofano es mínima. (14)

✓ DESTRUCCION DE AMINOACIDOS BAJO CONDICIONES DE HIDROLISIS ACIDA

Estos amino e imino ácidos del tipo de glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina y prolina son muy estables en soluciones calientes de ácido clorhídrico (Martin y Synge, 1945; Harfenist, 1953). Valiosas recuperaciones de estos aminoácidos en hidrolizados de proteínas aumentan a un máximo con el aumento en el tiempo de calentamiento y entonces permanecen constantes (Smith and Stockell, 1954; Smith et al., 1954; Eastoe, 1955, 1963).

Los aminoácidos básicos, lisina, histidina y arginina son aparentemente estables, en solución ácida, aunque arginina se

descompone rápidamente en álcali. Muy poca destrucción de estos aminoácidos se ha encontrado.

Los aminoácidos aspártico y glutámico, parecen ser bastante estables bajo condiciones de hidrólisis ácida.

Los aminoácidos conteniendo azufre como cistina, cisteína y metionina, están sujetos a ser oxidados parcialmente durante la hidrólisis, especialmente cuando ésta se realiza con acceso al aire.

El triptofano es particularmente inestable y, es fácilmente destruido por ácido, por lo que la hidrólisis ácida resulta ser un fracaso para liberar triptofano de proteínas. (14)

✓ DESTRUCCION DE AMINOACIDOS BAJO CONDICIONES DE HIDROLISIS
ALCALINA

Los álcalis fuertes son agentes efectivos para la hidrólisis de proteínas, pero su uso es severamente limitado por el acompañamiento de destrucción rápida de algunos aminoácidos. La racemización de la actividad óptica de aminoácidos, también toma lugar extensivamente en soluciones alcalinas.

Arginina se destruye rápidamente por álcali con la formación de ornitina y amoniaco. Aún a 25°C la descomposición de arginina probablemente ocurre y a 70°C con NaOH 5N, toda la arginina es destruida rápidamente (Nottingham; 1955).

La serina, la treonina, la cistina, la cisteína y la metionina, se descomponen cuando se calientan en solución alcalina con formación de amoniaco. Estos aminoácidos son particularmente lábiles cuando se combina el péptido (Nicolet; 1931; Thor y Gortner, 1932; Nicolet et al., 1942). El máximo valor de aminoácidos liberados de proteínas por NaOH 5N es significativamente más bajo que con HCl 6N debido a estos efectos de descomposición (Nottingham, 1955). El uso de álcali es por lo tanto, inadecuado como un método general de hidrólisis anterior a análisis cuantitativos de aminoácidos. Recuperaciones óptimas de triptofano se obtienen después de hidrolizar con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 4N por 50-70 hrs. a 110°C, de acuerdo al procedimiento de Blackburn (1968). (14)

Pero la mayoría de los autores reportan racemización de triptofano producido por la hidrólisis alcalina usando NaOH ó $\text{Ba}(\text{OH})_2$.

AMINOACIDOS QUE REQUIEREN PROCEDIMIENTO ESPECIAL

La mayoría de los aminoácidos en las proteínas pueden de terminarse con exactitud razonable por medio de las reacciones colorimétricas con ninhidrina después de ser sometidos a hidrólisis con HCl 6N y separación por cromatografía de intercambio iónico. Existen otros aminoácidos para los cuales el método standard es más o menos inadecuado debido a su naturaleza inestable o a algunos otros aspectos de sus propiedades. Modificaciones adecuadas al procedimiento standard o donde sea necesario, es preciso para la cuantificación de estos ami noácidos. (14) Ejemplo representativo es el triptofano.

Por los problemas presentados en cuanto a hidrólisis y determinación de triptofano se vio la necesidad de hacer una revisión de trabajos realizados sobre el tema.

GENERALIDADES DEL TRIPTOFANO

El triptofano es el único aminoácido que contiene un núcleo indólico, este aminoácido heterocíclico es usualmente incluido con los compuestos aromáticos. Las proteínas que

contienen triptofano reaccionan con reactivos por el grupo in dol heterocíclico, (13)¹⁵ por lo que casi todos los métodos quí micos existentes determinan el grupo indólico y no el L-trip- tofano, que es el aminoácido que requiere nuestro organismo.

Este aminoácido es particularmente inestable y, es fácil mente destruido por ácido, aunque es más estable bajo condi- ciones alcalinas. En ácido caliente, su estabilidad puede ser reducida por la presencia de otros aminoácidos y puede también afectar su recuperación (Martin y Synge, 1945). El acceso de oxígeno también permite aumentar la descomposición.

En la presencia de carbohidratos, la destrucción es com- pleta en solución ácida (Lugg, 1938; Gordon et al., 1943). Entonces el triptofano no puede ser determinado exactamente en hidrolizados completos de proteína y requiere métodos espe ciales de análisis.

Una pequeña cantidad de triptofano puede resistir 20 hrs. de hidrólisis junto con un producto de descomposición, el cual se destruye más sobre un tiempo más prolongado de calentamien to con ácido (Nottmann et al., 1962). Esta sustancia puede

ser confundida por lisina (Canfield, 1963). (14)

MÉTODOS DE EVALUACION DE TRIPTOFANO

Los métodos de triptofano pueden dividirse en dos categorías:

- I) Los que involucran la proteína intacta.
- II) Los que involucran hidrólisis de la proteína antes de determinar triptofano.

I) Métodos de proteína intacta: Estos métodos no están demostrados aún para forrajes y particularmente para cereales por la insolubilidad de algunas proteínas y la producción de colores indeseables por las fracciones no proteicas del alimento; (Miller, 1967) (3, 15), además la inexactitud inherente natural, en estos métodos pueden dar valores altos aún con proteínas purificadas (Spies, 1967).

Con proteínas puras o péptidos las determinaciones de triptofano son generalmente realizadas sin dificultad. Analizando estos compuestos por el método colorimétrico con (DMAB) de acuerdo a Spies y Chambers (1949) y recientemente modifica

do por Spies y, no requiere hidrólisis de la proteína. El método espectrofotométrico de Bencze y Schmid, también se aplica a estos productos (8), pero es irreal con proteínas de bajo contenido de triptofano o con proteínas que tienen numerosos residuos de tirosina. (4) 26

El triptofano libre o en péptido, da productos coloridos con un número de reactivos, ejemplo: el ácido p-toluensulfónico (TSA), (DMAB), N-bromosuccinimida (no muy usado), (16) ²⁷ y estas reacciones han sido la base de ensayos fotométricos del contenido de triptofano en proteínas intactas, solubles. Existen evidencias que el color formado por el triptofano libre y el unido no son equivalentes. Evered ha mostrado que la N-acetil y N-benzoil triptofano dan más color que triptofano con el reactivo TSA. Shaw & Mc Farlane han mostrado que el DMAB también da más color con péptido ligado que con triptofano libre. Las condiciones necesarias para la formación de máximo color con DMAB en el procedimiento de Spies & Chambers, difieren de acuerdo a si el triptofano está libre o en péptido unido. (3) 

Se ha intentado el uso del método de Opienska-Blauth y colaboradores sobre extractos proteicos de cereales sin hidro

lizar. Desafortunadamente, algunas de las muestras dieron color pardusco y otras interferencias de la reacción de color. Además, el valor obtenido aun sin color pardo, varió considerablemente del método de Spies y Chambers. (17)

El procedimiento de Goodwin-Morton y de Edelhoeh, ha sido práctico para proteínas solubles, cuando la razón de tirosina a triptofano no es alta. (18)

El procedimiento de Gaitonde y Dovey se basa en la determinación de triptofano en la proteína intacta, haciéndolo reaccionar con ninhidrina bajo condiciones ácidas especiales. Ellos demostraron la exactitud de su método, usando ciertas proteínas puras; haciendo una simple corrección por interferencia de tirosina. Posteriormente, se mostró que este método es aplicable a extractos proteicos crudos de frijoles y otras semillas. (15)

Recientemente se ha reportado el uso de dicroísmo circular magnético (MCD) para la determinación de triptofano en proteínas intactas, a una absorbancia de 293 nm ha dado estimaciones exactas de triptofano en algunas proteínas. Se ha señalado que en comparación con otros métodos comunes el MCD

tiene la única ventaja de dar resultados exactos aún en casos en los cuales la razón tirosina-triptofano es alta y que los efectos conformacionales y el medio ambiente, no interfieren con la exactitud del método y, sólo se requieren pequeñas cantidades de muestra. Pero este método requiere equipo altamente especializado. Estos procedimientos tienen la desventaja de ser inaplicables, cuando la proteína es insoluble, como es frecuente el caso en el análisis de alimentos. La misma limitación se aplica a métodos diseñados para dar un derivado colorido de triptofano en la proteína intacta. (18, 19)

II) Métodos que involucran hidrólisis. Para análisis de triptofano en forraje, este procedimiento se recomienda a pesar del tedioso y problemático procedimiento especial de hidrólisis, necesario para liberarlo de proteínas. Métodos más recientes los cuales dependen del uso del TSA para la hidrólisis de la proteína, han probado ser satisfactorios para el análisis de proteínas puras pero no para alimento de ganado, por las dificultades que se han encontrado entre las cuales se presentan: la baja concentración de triptofano y la presencia de carbohidratos. (9) Por lo que surgió la necesidad de desarrollar otros métodos de hidrólisis:

a) Métodos alcalinos empleando NaOH. La hidrólisis básica, ocasionalmente da valores exactos con modelo de péptidos y con algunas proteínas, pero pobres resultados son obtenidos generalmente por razones inexplicables. (4)

La hidrólisis con NaOH, es inadecuada porque el triptofano libre y en péptido son destruidos. La presencia de agentes reductores e hidrólisis bajo una atmósfera inerte, ha mostrado prevenir la destrucción del triptofano libre, pero no son efectivos en la presencia de almidón. (3) Por ejemplo, triptofano no puede ser determinado colorimétricamente en el hidrolizado de maíz, realizado con NaOH conteniendo agentes protectores de triptofano (Spies, 1967) por su interferencia. (20)

Si se desea la hidrólisis completa para la determinación cromatográfica de triptofano, la hidrólisis alcalina ha mostrado ser el medio más prometedor de recuperación cuantitativa. Al usar NaOH se puede neutralizar con HCl dando NaCl que no interfiere en la cromatografía. (18) Por otro lado, la presencia de NaCl en la muestra no resultaría pesado en la mayoría de las muestras si se realizara determinación microbiológica de triptofano con *Lactobacillus arabinosus* puesto que: a) es capaz de tolerar grandes concentraciones de NaCl y b) la dilu

ción de las muestras en la mayoría de los casos reduce la concentración de NaCl por debajo del punto crítico. (21) En un estudio colaborativo sobre ensayos químicos para aminoácidos en hidrolizados de proteína Lesuk reportó que los iones cloruro, aumentaron la intensidad de color obtenido con triptofano, cuando se determinó por el método descrito por Spies y Chambers. Lesuk también observó que los iones cloruro aumentan el requerimiento de nitrito de sodio para dar máximo color. Pero este problema se eliminó con el empleo de sulfato de plata para remover interferencias de iones cloruro y bisulfito en la forma de cloruro de plata o sulfato de plata. (22)

Wooley et al, indicó que los resultados irregulares para triptofano se obtuvieron cuando NaOH 5N se usó para la hidró-lisis y sugirió que el alcance de racemización de l (-) trip-tofano puro es variable. (21, 5) Stokes et al; reportaron favorablemente sobre el uso de NaOH 5N a 121°C para la libera-ción y racemización de triptofano de proteínas, pero acentua-ron la importancia del tamaño de muestra y el tiempo de hidró-lisis.

La suposición de racemización completa de L(-)triptofano puro en presencia de álcali fuerte está injustificada particularmente cuando NaOH 5N es usada.

Se trató caseína con NaOH 5N para hidrolizarla y se determinó el triptofano con el método químico de Folin y Marenzi y por método microbiológico dando los métodos resultados altos. Este estudio en general, confirma la observación de Stokes et al, que, hidrólisis con NaOH 5N suministra un método adecuado y conveniente para la liberación y racemización de triptofano de proteínas.

Aunque los valores multiplicados por 2 para corregir por racemización pueden no ser absolutos, son consistentes y representativos. La aplicación indiscriminada de este método de preparación de muestras no es garantizado, sin embargo, ya que alguna destrucción de triptofano es indicada y ésta puede aumentar, dependiendo en la muestra que es analizada. (21)

b) Métodos alcalinos empleando $Ba(OH)_2$. Recientemente Miller tuvo éxito en el desarrollo de un método colorimétrico para determinar triptofano, usando DMAB, que pareció ser útil en análisis de rutina de alimentos y forrajes. Las pro-

teínas son hidrolizadas con $\text{Ba}(\text{OH})_2$, seguidas por precipitación de bario como sulfato de bario de una solución ácida antes de la adición de DMAB. Recuperaciones de triptofano añadido fueron encontradas en un intervalo de 80% para cereales (maíz, trigo) a 95% para proteínas purificadas de origen animal. (3, 8, 9)

Slump y Schreuder recientemente publicaron un método, eliminando el paso de precipitación de Miller. Usaron un buffer de pH bajo ($\text{pH} = 3.25$) para evitar precipitación de bario mientras eluía el hidrolizado de una columna de Sephadex G-25. Recuperaciones de triptofano añadido fueron altas (94 a 100%), 80 minutos fueron necesarios para resolver el pico de triptofano, limitando el número de muestras diarias. (23)

Según Miller, "el uso de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ en lugar de NaOH, acorta el tiempo de hidrólisis y se ha reportado que no causa destrucción de triptofano en la presencia de almidón. Una ventaja más del uso de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ es la fácil neutralización y remoción de iones bario, lo cual es particularmente importante cuando el triptofano es medido por ensayos microbiológicos. Una desventaja de la hidrólisis alcalina es que se lleva a ca

bo la racemización de aminoácidos. En todos los procedimientos microbiológicos, la racemización es asumida para ser completa sobre la base que, cuando triptofano libre es añadido para ensayo de proteína y llevado a través de los procedimientos de hidrólisis y ensayo. La recuperación es cercana a 50%, racemización incompleta no es de consecuencia cuando un procedimiento químico es usado para análisis en hidrolizados alcalinos.

El método de Spies & Chambers dio soluciones turbias y valores altos del blanco cuando se aplicó a trigo. La racemización del triptofano fue incompleta durante hidrólisis con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ bajo las condiciones descritas por Green & Black. La neutralización de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ con H_2SO_4 o por burbujear CO_2 , como es recomendado en una variedad de procedimientos, resultó en una considerable pérdida de triptofano por adsorción. (3) Green & Black, propusieron el uso de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ anhidro para la liberación de triptofano y obtuvieron sus resultados, multiplicando los valores ensayados por 2 para corregir la completa racemización supuesta. (21) Las condiciones usadas por Horn & Jones para la determinación colorimétrica con DMAB se encontraron lejos del óptimo de la producción máxima de color y dieron

resultados erróneos. (3) Robel, 1967; Miller, 1967; establecieron que triptofano fue absorbido durante la precipitación de carbonato de bario. (8, 24)

Krehl et al., demostraron que el tratamiento de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 5N resultó en una marcada destrucción de triptofano (41%), pero no así el de NaOH5N. El tratamiento con $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ al 14% causó poca destrucción de triptofano (18%). Krehl, et al., es evidente que resultados analíticos buenos se obtuvieron para el contenido de triptofano de caseína con NaOH5N ó $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 5N, aunque el método de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ es más largo y pesado que el tratamiento de NaOH. (21) Estas observaciones no van de acuerdo con el trabajo de Miller, E.L.

c) Métodos de hidrólisis enzimáticos. El uso de enzimas como agentes hidrolíticos, es una alternativa atractiva. La hidrólisis enzimática de proteínas ha sido usada pero no se ha demostrado que este procedimiento libere triptofano cuantitativamente de proteínas sin ninguna destrucción y que sea capaz de hidrolizar completamente, además la enzima puede contribuir a una porción significativa de triptofano. (3, 18, 5)

Cuando la muestra proteínica primero se digiere con enzimas proteolíticas tales como pronasa o papaína, el método de Spies & Chambers da resultados exactos, aun cuando la preparación sea de proteína cruda. Una variación del método fue usado con algunos productos alimenticios por Lombard y Delange con buenos resultados aparentemente. (17, 10)

Hidrólisis enzimáticas de proteínas pueden dar rendimientos cuantitativos de triptofano pero este método no puede ser generalmente válido (Hill & Schmidt, 1962)

d) Métodos de hidrólisis ácida. Si algún método de hidrólisis es para ser usado, la vía más conveniente puede ser modificar la hidrólisis ácida para rendir triptofano estable. Matsubara & Sasaki, 1969, han encontrado que la adición de mercaptanos (ácido tioglicólico 4%) a HCl6N en la ausencia de oxígeno aumenta la recuperación de triptofano cuando están presentes carbohidratos. Liu & Chang, 1971, han hecho recientemente la observación que el TSA es preferible a HCl, en términos de la estabilidad de triptofano. Su procedimiento es capaz de dar alrededor de 90% de recobro de triptofano en un hidrolizado de 22 hrs. de una proteína pura; sin embargo, si el contenido de carbohidratos de la muestra es apreciable, la

recuperación es disminuida. (16, 18, 24)

Un método rápido, simple y muy sencillo, fue reportado por Fischl usando ácido acético como el cromógeno. Este método se basa en la reacción de Adamkiewicz, desde que el ácido glioxfílico se presenta como una impureza en las preparaciones de ácido acético glacial.

Por la inseguridad de la presencia de esta impureza en cada frasco de ácido acético glacial, Opienska-Blauth y colaboradores, adicionaron pequeñas cantidades de cloruro férrico a ácido acético glacial para generar ácido glioxfílico en la presencia de H_2SO_4 . (17)

ASPECTOS GENERALES SOBRE DETERMINACIONES

En 1831, se reportaron derivados coloridos de proteínas (Tiedemann y Gmelin, 1831; Bernard, 1856). En los siguientes 70 años, muchas reacciones de varias proteínas fueron reportadas para dar color y aroma similar a los compuestos indólicos (Vickery y Schmidt, 1931). Por ejemplo, se forma un color rojo característico por reacción con un halógeno o ácido nitroso (Neumeister, 1890). Neumeister no supo la estructura del

compuesto responsable, pero infirió que contenía probablemente un anillo indólico; por conveniencia él lo llamó triptofano. Hopkins y Cole (1901), primero aislaron triptofano en un estudio sistemático. Para un ensayo característico usaron el color violeta reportado por Adamkiewicz (1875). Después de aislarlo, se desarrolló el interés por determinarlo en varias proteínas. Looney (1926) en relación a este dato, comentó la falta de consistencia de estos métodos.

La mayoría de los métodos explotaron la reactividad del anillo indólico para producir derivados coloridos para reaccionar con reactivos tales como: FeCl_3 , CuSO_4 , bromuro, nitrato de sodio e hipoclorito de sodio, usualmente en solución ácida. Mas tarde, los métodos incluyen reacción con nitrito de potasio y un aldehído alifático o aromático en HCl o H_2SO_4 concentrado. Uno de los procedimientos mas ampliamente usados ha sido para tratar triptofano con DMAB en H_2SO_4 y entonces, oxidar el producto con nitrito de sodio.

Desafortunadamente estos métodos son limitados en exactitud y tienden a ser tediosos. Trabajos posteriores han formado otros derivados coloridos, mientras que otros han usado las características naturales de absorción cerca del ultravioleta

para estimar triptofano espectrofotométricamente y espectrofluorométricamente. (Undenfriend, 1969; Bernstein et al., 1969; Weinryb & Steiner, 1969; Bhatnagar y Green, 1969; Edelhoeh, 1967). Es notable que el triptofano constituye alrededor de 1% de los residuos de aminoácidos en la mayoría de las proteínas (Smith, 1966). (2) El contenido de triptofano se puede determinar en autoanalizador de aminoácidos. (16)

Spies y Chambers (1949). Desafortunadamente el color rendido de triptofano libre y ligado, fueron diferentes (Shaw & Mc Farlane, 1940; Evered, 1961). Spies, 1967 mas tarde desarrolló un método el cual sobrellevó estos problemas, pero también necesitó hidrólisis de la muestra. (24)

Métodos químicos se basan en principio, en la habilidad del compuesto conteniendo núcleo indólico bajo reacciones cromogénicas con ciertos reactivos químicos (Folin y Ciocalteau, 1927; Lugg, 1937; Eckert; 1943; Spies y Chambers, 1949; Dickman y Crockett, 1956; Mrskos y Tovarek, 1960; Inglis y Leaver, 1964). Estos métodos químicos detectan compuestos indólicos rápida y totalmente bien, pero tienen desventajas definidas. De la intensidad final del color sobre el cual es

tos ensayos están basados y la velocidad a la cual desarrollan son afectados por materiales extraños no relacionados con triptofano, ellos no son estrictamente específicos para estos aminoácidos. (28)

El método de Spies y Chambers si se adiciona etanol aparentemente interfiere, con el color desarrollado con DMAB.

(17)

Bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobenzil, es un reactivo específico para residuos de triptofano en proteínas y péptidos. Aunque ha sido reportado que este reactivo reacciona con grupos -SH de proteínas a pH más altos (Horton, H.R. and Koshland 1965). (29) Este reactivo tiene una absorción espectral alta a 410 mu. Scoffone, Fontana y Rocchi, reportaron un reactivo halogenuro de sulfonilo el cual también pareció ser selectivo para triptofano y puede también servir como la base para un procedimiento cuantitativo. (4)

El triptofano reacciona con varios aldehídos para dar complejos coloridos en una oxidación suave. Usando formaldehído como un agente condensante, Fürth y Nobel encontraron

1.94 a 1.25% de triptofano en caseína, Fürth y Lieben encontraron 2%. Usando DMAB Thomas encontró 1.7%, Holm y Greenbank 2.24%, Komm y Böhringer 2.3%, y Jones, Gersdorff y Moeller 2.2%. Aislándolo, Hopkins y Cole obtuvieron 1.5% y Dakin, después de aislarlo por extracción con alcohol butílico 1.7%.

Para la terminación del trabajo de Sullivan, Millone y Everitt, Bates reportó una modificación del procedimiento de May y Rose por lo cual, con nitrito de sodio como un acelerador, el contenido de triptofano de proteínas puede determinarse muy ligeramente a temperatura ambiente. Empleando el procedimiento de Bates sobre caseína, encontramos un contenido de triptofano de 1.25%. Este valor fue obtenido por el uso de un filtro azul de cobalto para compensar más o menos el tono rojizo de triptofano standard. Se estuvo dudoso de la validez de los resultados bajos con el método de Bates, no sólo por el uso del filtro sino por los valores más altos que habían sido reportados en la literatura; ambos por aislamiento y por determinación colorimétrica (2.4%).

Por años ha sido una gran divergencia de descubrimientos en cuanto al contenido de triptofano de caseína, con valores

en el intervalo de 0.51 hasta 2.4%. Las causas de las variaciones probablemente, se encuentran en la alta reactividad del triptofano, su sensibilidad a exceso de reactivos y a agentes oxidantes, los cuales han sido usados, la fácil destrucción de triptofano por oxidación, las diferentes velocidades de desarrollo de color de triptofano libre y triptofano en caseína y los tiempos de variación con los cuales la comparación de color ha sido hecha. (30)

Los métodos microbiológicos también son laboriosos y, la mayoría de los que se han desarrollado para la determinación de triptofano, emplean organismos para los cuales este aminoácido sea un nutriente esencial para la bacteria, el cual incluye tamizado selectivo de *Clostridium perfringens* (Boyd, Logan y Tytell, 1948), *Lactobacillus arabinosus* (Henderson y Snell, 1948), *L. plantarum* (Mc Guire Schiaffino y Loy, 1960), *Leuconostoc mesenteroides* (Steele et al, 1949) y *Streptococcus faecalis* (Stokes et al., 1945). (2, 17)

Lactobacillus arabinosus 17-5, fue encontrado para exhibir una respuesta sensible y reproducible para L-triptofano. El indol y ácido antranílico, fueron activados, pero se pueden

separar del triptofano con extracción con eter. Estos principios han sido usados en el desarrollo de procedimientos microbiológicos, el cual parece ser real para la determinación de triptofano en proteínas y alimentos. (26)

Lyman et al., 1956, determinó triptofano en maíz y otros alimentos agrícolas por análisis microbiológico de sus hidrolizados alcalinos. Puesto que la determinación colorimétrica de triptofano en maíz presenta dificultades no establecidas en análisis similar de proteínas purificadas debido a su bajo contenido de triptofano ($<0.1\%$ y a la presencia de componentes no identificados los cuales interfieren en el análisis. (20)

Arthur Dalby y Chia-Yin Tsai, 1975, realizaron un trabajo para la determinación colorimétrica de triptofano, basado en los estudios realizados por Opienska-Blauth, et al., 1963; Hernández y Bates, 1969 y hacen modificaciones añadiendo anhídrido acético de 0-8% al ácido acético glacial con el fin de homogeneizar esta impureza que presenta cada frasco de ácido acético glacial en diferentes proporciones y obtener colores uniformes. Este trabajo es aplicable a cereales. (31)

Miller analiza cereales y alimentos para ganado, sometiénolos a una hidrólisis con $Ba(OH)_2$ y posterior determinación colorimétrica con DMAB. (3) Matheson, usa los mismos reactivos, su técnica se aplica a proteínas puras y forrajes. (24)

Knox et al., usó cromatografía de intercambio iónico para análisis de triptofano después de hidrolizar la muestra con $Ba(OH)_2$. (23) Joseph R. Spies, realiza hidrólisis con pronasa y el hidrolizado se trata con DMAB. (20,6) Spies y Chambers, emplean hidrólisis alcalina NaOH 5N, sólo se aplica a proteínas puras, hacen un estudio sobre los factores que influyen en la destrucción de triptofano. (5) Más tarde, emplean en lugar de nitrito de sodio (agente oxidante), luz para inducir la oxidación. (32)

Jaime Amaya et al., usa un procedimiento para determinar triptofano en legumbres y cereales, usando DMAB, después de efectuar hidrólisis con KOH 5N. (33)

Oelshlegel et al., reporta la hidrólisis alcalina con NaOH 6N y subsecuente análisis de triptofano en un autoanaliador, usando una columna de almidón con buffer de citratos. (27)

Hugli y Stanford Moore, realizan una hidrólisis alcalina con NaOH 4.2N a 135°C conteniendo almidón y reduce la presión a 50 um de Hg, posteriormente efectuan una cromatografía de intercambio ionico usando buffer de 0.21 N en sodio de pH=5.4, obteniéndose resultados de 100±3%. Hacen notar que los carbohidratos no interfieren en el procedimiento, por lo cual se puede aplicar a alimentos, han ensayado maíz y trigo.

Los detalles en el procedimiento los cuales hacen posible la completa recuperación de triptofano incluyen:

a) Adición de la muestra a pH = 4.25 en lugar de pH = 2.2 para evitar las pérdidas de triptofano en buffer de citratos a pH ácido.

b) El uso de NaOH en lugar de $Ba(OH)_2$ para evitar las pérdidas de triptofano por adsorción en $BaSO_4$ ó $BaCO_3$.

c) La inclusión de almidón como el principal antioxidante ensayado.

d) Cromatografía con un buffer el cual separa triptofano

de N- (DL-2-amino-2-carboxietil) -L-lisina, el cual se puede formar en cantidades significantes durante la hidrólisis alcalina. (18)

Wells determina triptofano en autonalizador. (1)

Greene y Black realizan un ensayo microbiológico para la determinación de triptofano en proteínas y alimentos con *Lactobacillus arabinosus* 17-5, posterior a la hidrólisis. Efectúan 2 tipos de hidrólisis; una enzimática empleando pancreatina y otra alcalina con $Ba(OH)_2$, los resultados obtenidos en ambas hidrólisis están de acuerdo a los reportados en la literatura. (26) Henderson y Snell hacen un estudio similar al de Greene y Black, sólo que usan NaOH 5N. (50) Gersoñ Ferreira Pinto, efectúa una hidrólisis enzimática con papaína y desarrollo colorimétrico con DMAB. Se aplica a cereales y leguminosas. (34)

Stokes et al., efectúan hidrólisis con NaOH 5N a 15 lbs por 10 hrs. y determinan triptofano microbiológicamente con *Streptococcus faecalis*. (35)

Penke y Kovács usan ácido mercaptoetanol sulfónico para hidrolizar y el contenido de triptofano se determina en auto-analizador. (16) Sólo es aplicable a proteínas puras y péptidos al igual que el método de Liu y Chang el cual emplea TSA 3N como agente hidrolítico en presencia de 0.2% de 3-(2 aminoetil)-indol, interfieren carbohidratos. (25)

Gaitonde y Dovey, analizan el contenido de triptofano en proteína intacta usando ninhidrina en una mezcla de ácido fórmico-ácido clorhídrico o triptofano libre en presencia de proteína, usando ninhidrina en una mezcla de ácido acético-ácido fosfórico; desarrollando un producto amarillo el cual se lee a 390 nm. (36) Ladaslav et al., adopta el método del ácido ninhidrínico (Gaitonde y Dovey) para determinar colorimétricamente el triptofano en extractos proteínicos de frijoles. (15)

Karkhanis et al., describen un procedimiento para determinar triptofano en residuos de proteínas, usando un reactivo de triptofano de Bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobenzil, posterior a la hidrólisis con urea a pH ácido. (29) Anteriormente Barman y Koshland (4) ya habían trabajado con estos reactivos.

José Madrid Concon, determina triptofano en extractos al calinos de proteínas de cereales, usando FeCl_3 en ácido acético glacial y solución de H_2SO_4 al 25.8 N. (17)

Sullivan y Hess realizan un estudio de varios procedimientos para la determinación de triptofano. (30)

Edelhock determina triptofano en proteínas puras disueltas en hidrocloruro de guanidina 6M. (37)

Oldrich K. Sebek determina triptofano microbiológicamente por medio de *Chromobacterium violaceum*. (28)

Bencze y Schmid determinan triptofano en proteína intacta, solamente la resuspenden en NaOH 0.1 N y leen la absorbancia a 282 μ , reportan pérdidas del 13.4% de triptofano, la longitud de onda a la cual leen tirosina es de 292 μ , lo cual presenta un inconveniente. (7)

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

Las materias primas y concentrados proteicos que se estudiaron fueron los siguientes:

I) Origen animal

- a) Lisozima
- b) Albúmina bovina
- c) Albúmina de huevo
- d) Caseína
- e) Peptona de caseína
- f) Casitone
- g) Leche Nido
- h) Meritene

II) Origen vegetal

- a) Proteína de soya
- b) Proteína de ajonjolí con cáscara
- c) Proteína mezcla soya-ajonjolí
- d) Muselina "harina de papa precocida"

- e) Maíz normal
- f) Maíz Opaco 2 endospermo blando
- g) Maíz Opaco 2 endospermo duro
- h) Harina de trigo
- i) Ayocote crudo
- j) Alubia cruda
- k) Frijol negro crudo
- l) Frijol negro cocido

III) Compuesto químico

- a) Indol

En los ensayos microbiológicos se utilizaron los siguientes microorganismos:
Lactobacillus plantarum (Lactobacillus arabinosus 17-5 ATCC-8014)
y Chrombacterium violaceum, los cuales se obtuvieron en el Centro de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

MÉTODOS

La determinación de proteína en las muestras se realizó por el método de Kjeldahl descrito en el A.O.A.C. (51)

El presente trabajo se dividió en dos puntos:

- a) ELECCION DE LA HIDROLISIS APROPIADA
- b) METODOS PARA DETERMINAR TRIPTOFANO

a) ELECCION DE HIDROLISIS

A continuación se muestran los métodos de hidrólisis empleados con una explicación resumida de las condiciones de hidrólisis:

+ 1.- Amaya, J., et al. (33)

KOH 5N, se burbujea nitrógeno por 10 seg., se calienta 3 horas a 15 lbs de presión, se neutraliza con HCl 5N a pH = 6, se centrifuga.

2.- INCAP (40)

Hidrólisis alcalina. NaOH 10N, 8 horas a 15 lbs de presión, se neutraliza con H₂SO₄ 10N a pH = 6.8 se afora, se guarda bajo tolueno en refrigeración.

3.- Oelshlegel, F.J., et al. (27) modificado.

NaOH 6M, tiodiglicol (agente protector), nitrógeno por 4 minutos (eliminar O₂), se calienta 20 horas a 15 lbs de presión, se lleva a pH = 9 con HCl, se filtra, se usa tubo de rosca con tapa de teflón.

- 4.- Udenfriend, Sidney. (38) modificado.
NaOH 5N, se calienta 20 horas a 15 lbs de presión, se neutraliza con H_2SO_4 5M, se centrifuga.
- 5.- Stokes, et al. (35)
NaOH 5N, 10 horas a 15 lbs de presión, se neutraliza y se centrifuga. En esta hidrólisis en lugar de ampolla cerrada se usó tubo de rosca con tapa de teflón.
- 6.- Stokes, et al. modificado por Krehl, et al. (21)
NaOH 5N, 5 horas a 15 lbs de presión.
- 7.- Hugli, T.E. y Moore, S. (18)
NaOH 4.2N, almidón, 1-octanol en tolueno (elimina la espuma), 24 horas a 135°C, se neutraliza y se centrifuga.
- 8.- El mismo procedimiento anterior, pero burbujeando nitrógeno por 4 minutos y realizando la hidrólisis a 3 diferentes tiempos: 15, 16 y 24 horas.
- 9.- Steele, B.F., et al. (41)
NaOH 4N, 15 horas a 15 lbs de presión, se neutraliza a pH = 6.8
- 10.- Moore, S. y Stein, W.A. (39) modificado.
NaOH 2.5N, almidón, se burbujea nitrógeno, 20 horas a 110°C, el hidrolizado antes de inyectarlo al apara

to se pasó por una resina de intercambio ionico Dowex 50 x 4 - 400 para eliminar sales.

11.- Green and Black modificado por Krehl, et al. (21)

$Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ al 14% por 7 horas a 15 lbs de presión.

12.- Slump, P., Schreuder, H.A.W. (8)

$Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$, 8.4 g en 16 ml H_2O por 8 horas a 15 lbs de presión, se acidifica con HCl a pH = 3-4.

13.- Yeoh, H.H. and Chew, M.Y. (47)

$Ba(OH)_2$ 4N, 50 horas a 110°C.

14.- Curtis, H.L., et al. (42)

Hidrólisis enzimática.

Solución enzimática: 0.01M tris (tripsina)-HCl, 0.15% de pronasa y 0.01M $CaCl_2$ (pH = 8.0).

Se toman 5 ml de esta solución y se añaden a 100 mg de muestra, se incuba a 37°C por 1.5 horas, en un baño de agua estacionario, se filtra y se afora a 35-50 ml con 0.12M tris-HCl (pH = 6.3).

15.- INCAP. (40) Hidrólisis enzimática.

Usa pepsina, tripsina y pancreatina a sus pH y temperaturas óptimas de actividad.

16.- Lombard y Lange. (43)

Hidrólisis enzimática parcial empleando papaína.

Papaína al 2%, buffer de fosfatos 0.4M, pH = 7.95 y NaCN al 5%, agitar, se incuban a 56°C por 18 a 20 horas, se enfrían, se aforan y se filtran o centrifugan.

17.- Akeson, W.B. y Stalermann, M. (44) Seleccionada.

A continuación se describe el procedimiento:

HIDROLISIS ENZIMÁTICA

Fundamento: Se basa en la hidrólisis enzimática de la muestra con pepsina y pancreatina a sus pH óptimos de actividad.

Reactivos

Buffer de fosfatos.- Soluciones Stock.

A: 0.2M solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

B: 0.2M solución de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

x ml de A + y ml B, diluidos a un volumen total de 200 ml.

Técnica

- 1) Pesar 500 mg de proteína de la muestra molida en matraces volumétricos de 50 ml. (por duplicado).
- 2) Añadir 10 ml. de una solución de pepsina al 0.3% en HCl 0.1N, incubar a temperatura ambiente durante 3 hrs. con agitación continua.
- 3) Añadir 10 ml. de NaOH 0.1N
- 4) Añadir 10 ml. de una solución de pancreatina "MERCK" al 0.4% en buffer de fosfatos pH = 8 y 0.1 ml. de mer-thiolate 1:1000 en solución alcohólica. Incubar a temperatura ambiente con agitación por 24 hrs.
- 5) Se afora con agua destilada y se centrifuga y si es necesario se filtra, del filtrado se toman alicuotas para la determinación de triptofano (44).

b) MÉTODOS PARA DETERMINAR TRIPTOFANOMétodo Fluorométrico

Se siguió el método descrito por Udenfriend S., con algunas modificaciones. (38, 46).

Fundamento

De todos los aminoácidos de las proteínas, solamente triptofano y tirosina exhiben apreciable fluorescencia en medios acuosos; la intensidad de fluorescencia del triptofano es gran de a un pH cercano a 11 y a 350 nm.

Equipo y Material

Espectrofotómetro con lámpara de fluorescencia, celdas de fluorescencia, tubos de ensaye, pipetas graduadas.

Reactivos

Na_2CO_3 0.3M

Técnica

Un ml. del hidrolizado conteniendo (de 4 a 18 ug de triptofano por ml.) se diluye a 10 ml. con Na_2CO_3 0.3M y la fluorescencia es ensayada a una longitud de onda de 350 nm con una excitabilidad (E) de 313 nm.

Curva Standard

Preparar una solución de 2 ug de triptofano por ml. de solución en Na_2CO_3 0.3 M. Tomar de aquí 1,2,3... 10 ml. en sus respectivos tubos y completar a 10 ml. con Na_2CO_3 0.3M; y leer fluorescencia a 350 nm con una E = 313. Se corre un blanco

contenido solo Na_2CO_3 0.3M.

Nota: Con el de mayor concentración ajustar a 100% de transmitancia.

Cálculos

Se grafica una curva standard %T vs ug triptofano/ml, en la cual se interpolan el %T de las muestras para obtener ug triptofano/ml.

$$\frac{\text{F.D.} * \left(\frac{\text{ml}}{\text{mg}}\right) \times \text{triptofano leído (ug/ml)} \times 100}{\% \text{ proteína}} = \frac{\text{mg triptofano}}{100 \text{ g proteína}}$$

(38, 46)

$$* \text{ Factor de dilución (FD)} = \frac{\text{aforo}_1 \times \text{aforo}_2}{\text{p. muestra (mg)} \times \text{alícuota}}$$

Método Colorimétrico ✓

Se siguió la técnica de Opienska-Blauth modificada por Hernández y Bates. (52)

Fundamento

Se basa en la hidrólisis enzimática de la muestra seguida de la determinación colorimétrica de triptofano al reaccionar con ácido glioxílico (generado por ácido acético en presencia de Fe^{+++} y H_2SO_4) para formar un cromóforo que tiene una

absorción máxima a 545 nm. (17)

Reactivos

- 1) Disolver 270 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 0.5 ml. de agua destilada y se afora a un litro con ácido acético glacial (Reactivo A)
- 2) Solución de H_2SO_4 30N (Reactivo B)
- 3) Mezclar los reactivos A y B (1:1 v/v), 1 a 2 horas antes de usarse (Reactivo C).

Nota: En cada frasco de ácido acético se debe hacer la prueba de desarrollo de color en presencia de triptofano.

Técnica

- 1) Se pipetea un ml. del hidrolizado (que contenga de 20 - 30 ug/ml.) a un tubo de ensaye que contenga 4 ml. de reactivo C. Se agita vigorosamente y se incuba a 65°C durante 15 minutos para que desarrolle el color.
- 2) Dejar enfriar las soluciones coloridas y transferirlas a tubos de colorímetro calibrados. Las lecturas se hacen en el espectrofotómetro Coleman modelo 6/35 a una longitud de onda de 545 nm.
- 3) Se prepara una curva standard con un intervalo de 0 a 40 ug/ml de L-triptofano.

4) El contenido de triptofano de la muestra se calcula a partir de la curva standard (absorbancia vs ug triptofano/ml) y se reporta en base a la proteína.

Método Microbiológico

Se siguió la técnica del Manual DIFCO (49)

Fundamento

Se basa en la hidrólisis enzimática de la proteína y posterior determinación de triptofano por el uso de una bacteria ácido láctica (*Lactobacillus plantarum*), debido a que el ácido láctico liberado en el medio es proporcional a la cantidad de triptofano presente y sirve como un índice de crecimiento bacterial, el cual es medido por titulación.

Equipo y Material.

Autoclave, potenciómetro, balanza analítica y granataria, centrífuga, agitador magnético, tubos de ensaye, matraces erlenmeyer y volumétricos, pipetas (graduadas, volumétricas y de Pasteur) bureta, magnetos.

Cepa de *Lactobacillus plantarum*.

Reactivos

Bacto - Micro Assay Culture Agar,

Bacto - Micro Inoculum Broth.

Bacto- Tryptophane Assay Medium

Solución isotónica de NaCl estéril.

L-triptofano.

Técnica

1) El medio de cultivo de *L. arabinosus* 17-5, se prepara por inoculación del Bacto - Micro Assay Culture Agar. Seguido por incubación a 35-37°C por 24-48 hrs., los tubos se almacenan en el refrigerador. Se transplantan mensualmente.

2) Se prepara Bacto - Micro Inoculum Broth y se distribuyen 10 ml. en cada tubo de ensaye (total 2), estos se inoculan con el cultivo anterior y se incuban a 35-37°C por 24 hrs.

3) Centrifugar las células bajo condiciones asepticas y el líquido sobrenadante se decanta. Las células se resuspenden en 10 ml. de NaCl isotónico estéril. La suspensión celular se diluye 1-100 con NaCl isotónico estéril (la suspensión debe ser ligeramente turbia).

4) Una gota de esta suspensión se usa para inocular cada uno de los tubos de ensaye.

Preparación de las muestras.

Del hidrolizado tomar una alícuota que contenga aproximadamente de 2 a 9 ug de triptofano (no mayor de 1 ml), se hace por duplicado, se lleva a un ml. con agua destilada, se adicio

na 5 ml. de medio Bacto-tryptophane Assay Medium. Se esteriliza en autoclave por 10 minutos a 15 lbs. de presión (sobreesterilización del medio, da resultados insatisfactorios), se enfrían y se inoculan con una gota de la suspensión anteriormente preparada y se incuban a 35-37°C por 72 horas y son ensayados por métodos acidimétricos (titulación con NaOH 0.1N).

Se corre un blanco (conteniendo sólo la solución enzimática ausente de muestra).

Nota: Es esencial que una curva standard se construya cada vez que un ensayo se corra.

Curva Standard

Se prepara con un intervalo de 0 a 10 ug de L-triptofano/ml, se lleva a 1 ml. con agua destilada y se trata igual que las muestras.

Preparación de reactivos

Solución standard de triptofano de 10 ug/ml.

Cálculos

Se grafica una curva standard. ml. de NaOH 0.1N vs ug triptofano/ml., en la cual se interpolan los datos de las muestras

una vez habiéndolos corregido por la lectura del blanco, para obtener μg de triptofano/ml.

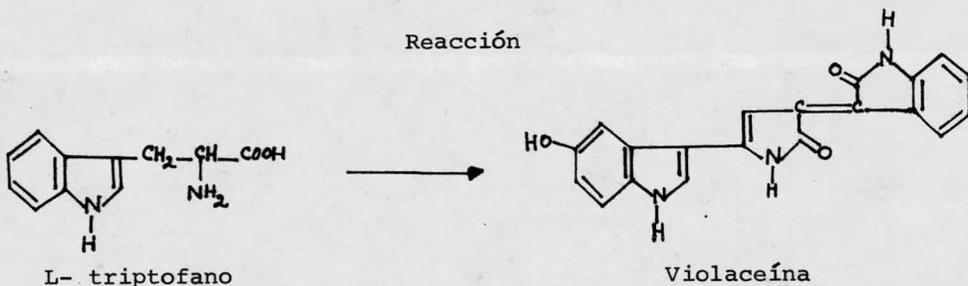
Método Microbiológico

El método seguido fue el de Oldrich K. Sebek con ligeras modificaciones (28)

Fundamento

Se basa en la capacidad de *Chromobacterium violaceum* para utilizar L-triptofano para la síntesis de un pigmento púrpura (violaceína), sirviendo así para la determinación cuantitativa de este aminoácido.

Reacción



Material y equipo

Potenciómetro Beckman

Agitador magnético Magne-4

International Refrigerated Centrifuge Model PR-6

Balanza granataria

Balanza analítica Mettler H18

Vortex - Genie Modelo K-550-G

Incubadora

Tubos de ensaye, pipetas (graduadas, volumétricas y Pasteur)
buretas, matraces erlenmeyer y magnetos.

Técnica

1) Medio para resembrar *C. violaceum*

Se pesa 0.1 g de peptona, 0.1 g de extracto de levadura, 3 g de agar y se lleva a 200 ml. con agua destilada, se ajusta el pH = 7 a 7.4, se esteriliza en tubos de ensaye, aproximadamente 10 ml. en cada tubo de ensaye y se resiembr por estría, se incuba a 35-37°C, se transfiere quincenalmente.

2) Se prepara un medio líquido conteniendo 5.0 g de peptona, 5.0 g de extracto de levadura y 8 g de glucosa; se lleva a un litro con agua destilada, se disuelve con calentamiento, se ajusta pH = 7 a 7.4, se esteriliza en matraces de 250 ml., se inocula y se incuba a 35-37°C toda la noche con agitación a 230-300 rev/min. y aereación usando un filtro millipore, se centrifuga, se lavan las células con 10 ml. de solución isotónica de NaCl y se resuspenden en 10 ml. de solución isotónica (células sin pigmento).

3) Medio sólido

200 mg Mg Cl₂

600 mg K₂ HPO₄

50 mg K_2SO_4

1 mg $FeSO_4$

14 g Agar

1.2 g de extracto de levadura

Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH=7.2 se reparte en matraces de 250 ml., se esteriliza por 15 min. a 15 lbs, se enfría a 42-44°C y se inocula con la solución anterior.

4) Inmediatamente se toman 20 ml. del medio sólido inoculado y se adiciona a cada caja petri, se dejan solidificar, se ponen cilindros en la superficie y, se pipetean las concentraciones del standard de 100 ug/ml y el problema; alternándolos en cada caja petri. La curva st se corre en otras cajas petri, se incuban a 35-37°C por 48 hrs. Se leen las zonas púrpura desarrolladas.

La curva st se realiza con 5 puntos, enumerados de A-E de 50, 80, 100, 150, 200 ug triptofano/ml, se corre un blanco con teniendo todos los reactivos excepto la muestra.

Cálculos

$$\text{Corrección st}_{50} = \frac{3 (A) + 2 (B) + (C) - E}{5}$$

$$\text{Corrección st}_{200} = \frac{3 (E) + 2 (D) + (C) - A}{5}$$

Una vez realizadas estas correcciones del punto superior e inferior, se realiza una curva st (mm vs μg triptofano/ml) con estos dos puntos y se saca el punto medio (st_{100}), se hace la corrección a cada muestra, por la diferencia de lecturas del st_{100} de la curva y del st_{100} de las muestras, posteriormente se interpolan los valores en la curva st , para obtener μg triptofano/ml.

Método automatizado

El método seguido fue el de Moore, S. y W.H. Stein (39)

Fundamento

Se basa en la determinación automática de triptofano al reaccionar con ninhidrina para formar un reactivo colorido púrpura, el cual tiene una absorción máxima a 570 nm.

Técnica

La determinación del contenido de triptofano se realizó en un autoanalizador de aminoácidos Perkin-Elmer modelo KLA-5 (39) Se les hizo la hidrólisis enzimática antes a las muestras (44)

Método Colorimétrico

Se siguió la técnica de M. V. Rama Dao., et al. (48)

Nota: Método modificado por el servicio de laboratorios del Instituto Nacional de Nutrición de Venezuela.

Fundamento

Se basa en la hidrólisis de la muestra con H_2SO_4 conteniendo p-dimetilamino benzaldehido y la determinación colorimétrica del triptofano posterior al desarrollo de color con nitrito de sodio a una longitud de onda de 590 nm.

Reactivos

- 1) Solución de H_2SO_4 16N
- 2) Solución de H_2SO_4 16N con DMAB al 0.3% (Se prepara al momento de usarse).
- 3) Solución de $NaNO_2$ al 0.35% (Se prepara al momento de usarse).

Técnica

1) Utilizar una muestra que contenga de 50 a 100 mcg de triptofano (25 mg de muestra para leguminosas) finamente molienda (malla 60). La muestra se desengrasa si tiene mucha grasa.

2) Colocar la muestra por triplicado en tubos de ensaye de 20 ml provistos de tapa de vidrio (unión esmerilada). Añadir al primero 10 ml de H_2SO_4 16N y a los dos restantes 10 ml

de H_2SO_4 con DMAB al 0.3%. Agitar fuertemente y dejar reposar durante 18 hrs.

3) Añadir a cada tubo 0.1 ml de $NaNO_2$ al 0.35%. Incubar los tubos tapados, en la obscuridad durante dos horas.

4) Filtrar el contenido de cada tubo a través de lana de vidrio. Leer la transmitancia a 590 nm usando el primer tubo como blanco (blanco de muestra)

5) Leer en la curva los mcg de triptofano correspondientes a las densidades Ópticas de las muestras.

Curva Standard

Se prepara una curva st de 25-125 ug/.25 ml, llevar a cabo el mismo procedimiento seguido para las muestras. Se prepara el blanco de la curva con todos los reactivos excepto el triptofano.

Cálculos

$$\frac{\text{mcg triptofano (leídos)} \times 100}{\text{Peso muestra (mg)}} = \frac{\text{mg triptofano}}{100 \text{ g.}}$$

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 3 se presentan las muestras seleccionadas para el estudio, así como el contenido de proteínas en 100 g de muestra, reportado en base húmeda.

Los métodos empleados para hacer el estudio fueron los siguientes:

- A Método Microbiológico empleando *Lactobacillus plantarum*
- B Método Microbiológico empleando *Chrombacterium violaceum*
- ✓ C Método Fluorométrico
- ✓ D Método de M.V. Rama Dao, et al. (H_2SO_4 -DMAB)
- ✓ E Método de Opienska-Blauth modificado por Hernández y Bates ($FeCl_3$)
- F Método del Autoanalizador de Aminoácidos.

En las tablas 4 y 5 se muestran los resultados obtenidos en las muestras de origen animal y del indol; en las tablas 6, 7 y 8 se muestran los resultados obtenidos en los concentrados proteicos y productos comerciales, en cereales y en leguminosas respectivamente, empleando 5 métodos diferentes de análisis.

En la tabla 9 se muestra la comparación de los diferentes métodos con el autoanalizador.

TABLA 3

ALIMENTOS Y CONCENTRADOS PROTEICOS DE ORIGEN
ANIMAL Y VEGETAL

MUESTRA	% PROTEINA BASE HUMEDA
Lisozima	88.0
Albumina bovina	90.0
Albumina de huevo	75.8
Caseina	91.2
Peptona de caseina	70.0
Casitone	78.7
Leche Nido	25.0
Meritene	32.8
Proteina de Soya	90.0
Proteina de ajonjolí con cáscara	70.3
Proteina mezcla soya-ajonjolí	90.0
Muselina "harina de papa precocida"	6.3
Maíz normal	9.6
Maíz opaco 2 endospermo blando	10.1
Maíz opaco 2 endospermo duro	10.6
Harina de trigo	11.4
Ayocote crudo	18.9
Alubia cruda	24.0
Frijol negro crudo	22.0
Frijol negro cocido	20.0

TABLA 4

PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL Y PRODUCTO QUIMICO

MUESTRAS		METODOS					Análisis de Variancia o Sheffé
		A	B	C	D	E	
Lisozima	n	13	15	14	9	9	
	\bar{x}	8.72	9.48	8.62	8.28	9.25	N.S.
	s	1.01	1.04	0.86	0.83	0.80	
Albúmina Bovina	n	10	7	10	8	8	
	\bar{x}	0.78	0.92	0.78	0.79	0.77	N.S.
	s	0.09	0.14	0.08	0.14	0.13	
Albúmina de Huevo	n	10	11	13	6	5	
	\bar{x}	1.20	1.36	1.36	1.37	1.26	N.S.
	s	0.20	0.18	0.17	0.05	0.06	
Indol		60-70%	100%	-	60-80%	-	

n = Número de determinaciones

\bar{x} = Promedio

s = Desviación estandar

TABLA 5

PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL

MUESTRA		METODOS					Análisis de Variancia o Sheffé
		A	B	C	D	E	
Caseína	n	10	5	10	6	5	N.S.
	\bar{x}	1.35	1.50	1.40	1.48	1.34	
	s	0.18	0.06	0.13	0.11	0.07	
Peptona de caseína	n	6	11	11	5	6	A=B=C=D E \neq BC
	\bar{x}	1.47	1.51	1.54	1.45	1.28	
	s	0.12	0.14	0.08	0.07	0.10	
Caseitone	n	10	11	12	5	10	N.S.
	\bar{x}	1.50	1.38	1.50	1.40	1.47	
	s	0.18	0.18	0.13	0.19	0.14	
Leche Nido	n	5	7	11	7	11	A=B=C=D E \neq D
	\bar{x}	1.62	1.61	1.61	1.70	1.42	
	s	0.07	0.12	0.19	0.07	0.14	
Meritene	n	10	14	12	5	5	A=B=C=E D \neq TODOS
	\bar{x}	1.35	1.41	1.42	1.86	1.40	
	s	0.12	0.23	0.15	0.05	0.12	

TABLA 6

CONCENTRADOS PROTEICOS Y PRODUCTO COMERCIAL

MUESTRA		METODOS					Análisis de Variancia o de Sheffé
		A	B	C	D	E	
Proteína de soya	n	10	11	12	6	6	
	\bar{x}	1.15	1.29	1.26	1.49	1.28	A=B=C=E D≠A y C
	s	0.15	0.10	0.16	0.09	0.10	
Proteína de ajon- jolí con cáscara	n	6	9	10	5	6	
	\bar{x}	1.56	1.50	1.55	1.72	1.57	A=B=C=E D≠B
	s	0.10	0.14	0.06	0.16	0.10	
Mezcla proteí- na de Soya- ajonjo lí	n	10	8	12	5	6	
	\bar{x}	1.21	1.27	1.33	1.55	1.22	A=B=C=E D≠TODOS
	s	0.10	0.10	0.14	0.03	0.15	
Muselina "harina de papa precoci- da"	n	7	10	12	6	11	
	\bar{x}	1.27	1.25	1.12	1.10	1.12	N. S.
	s	0.12	0.10	0.18	0.26	0.19	

TABLA 7

CEREALES

MUESTRAS		METODOS					Análisis de Variancia o de Sheffé
		A	B	C	D	E	
Maíz normal	n	9	8	12	-	-	N. S.
	\bar{x}	0.51	0.58	0.48			
	s	0.06	0.09	0.10			
Maíz opaco 2 endospermo blando	n	10	10	10	5	5	N. S.
	\bar{x}	0.77	0.78	0.78	0.75	0.77	
	s	0.06	0.11	0.10	0.13	0.05	
Maíz opaco 2 endospermo duro	n	9	9	10	-	-	N. S.
	\bar{x}	0.71	0.75	0.65			
	s	0.03	0.11	0.10			
Harina de trigo	n	10	11	12	5	6	A=B=C=D E≠A, B, C
	\bar{x}	1.07	1.10	1.04	1.26	1.45*	
	s	0.10	0.22	0.19	0.05	0.13	

* Diferente color del de la reacción con $FeCl_3$

TABLA 8

LEGUMINOSAS

MUESTRAS *		METODOS					Análisis de Variancia o de Sheffé
		A	B	C	D	E	
Ayocote crudo	n	9	14	14	8	7	
	\bar{x}	0.32	0.35	0.33	0.76	1.01	A=B=C D<E≠A, B, C
	s	0.10	0.08	0.07	0.13	0.06	
Alubia cruda	n	9	10	11	6	6	
	\bar{x}	0.46	0.58	0.60	0.87	0.98	A=B=C D=E≠A, B, C
	s	0.07	0.10	0.10	0.12	0.12	
Frijol negro crudo	n	10	11	11	9	8	
	\bar{x}	0.31	0.39	0.39	0.82	1.00	A=B=C D<E≠A, B, C
	s	0.10	0.13	0.08	0.13	0.08	
Frijol negro cocido	n	9	10	12	5	5	
	\bar{x}	0.45	0.44	0.44	1.17	0.82	A=B=C E<D≠A, B, C
	s	0.10	0.11	0.10	0.25	0.08	

* Estas muestras dan diferente color del de la reacción con $FeCl_3$

La hidrólisis seleccionada para aplicarla a todas las muestras fue la de Akeson y Stalermann, esta selección se hizo después de probar todas las hidrólisis que se mencionan en material y métodos.

Para averiguar cuál era el procedimiento de hidrólisis más efectivo se usaron sólo tres proteínas: lisozima, albúmina bovina y frijol negro crudo. Además, para conocer el efecto que el agente hidrolizante tuviera sobre el triptofano, se tomó como una muestra más L-triptofano.

Los métodos analíticos que se emplearon para comparar, fueron el del autoanalizador y el método microbiológico oficial (*Lactobacillus plantarum*).

A.- Hidrólisis alcalinas

Las hidrólisis alcalinas realizadas con KOH ó NaOH que se mencionan en material y métodos (pag. 50-51 del número 1 al 10) no dieron buenos resultados cuando los hidrolizados fueron medidos en autoanalizador pues en la mayoría de los casos, el pico de triptofano se mostraba encimado a otros aminoácidos o la cantidad detectada era muy baja comparada con los datos de la literatura. Esto se podría atribuir a:

- a) Una hidrólisis incompleta de la proteína
- b) A una parcial destrucción del triptofano, lo cual se demostró en algunos casos con la muestra de L-triptofano tratada en las mismas condiciones que las proteínas.
- c) A una contaminación de la resina con sales, que se manifestó en una pobre separación de los aminoácidos. Se trató de evitar esta contaminación pasando la muestra resultante a través de una resina Dowex 50x4-400.

En cambio por el método microbiológico sí fue posible hacer la medición de triptofano aunque en todos los casos dieron resultados bajos de triptofano, excepto cuando se usó la hidrólisis con NaOH 4.2N por 24 horas a 135°C.

B.- Hidrólisis enzimática

En general se obtuvieron mejores resultados que con la hidrólisis alcalina, excepto con papaína pero esto es debido a que esta enzima no llega a degradar totalmente hasta aminoácidos.

En la hidrólisis con tripsina propuesta por Curtis Hannah et al (42) se obtuvieron mejores resultados que con la papaína, pero los blancos dan lecturas muy altas. Esto mismo

se observó utilizando el método de hidrólisis del INCAP (40).

El método que dio mejores resultados y que fue el que se empleó en el estudio completo fue el método de Akesson y Stalermann (44) de digestibilidad empleando pepsina y pancreatina, por este procedimiento los resultados obtenidos de triptofano tanto en el autoanalizador como por el método microbiológico, fue de un intervalo de 90-100% con respecto a la literatura de la albúmina bovina. Sin embargo, en el frijol no dio buenos resultados. El blanco no interfiere en ninguno de los métodos porque su lectura es muy baja.

También en el caso de la hidrólisis enzimática se contaminaron las resinas del autoanalizador lo que dificultó su empleo para fines de comparación.

De lo anterior se puede decir que los métodos de hidrólisis alcalina deben de ser estudiados con más detenimiento puesto que a pesar de ser propuestos en diversos trabajos por muchos autores, todavía ofrece muchas dificultades su reproducibilidad.

Algunos autores (21,26) que emplean la hidrólisis alcalina obtienen un rendimiento del 50% del triptofano y ellos lo atribuyen a la racemización completa de este aminoácido.

El procedimiento que usan para dar sus resultados es de multiplicar por dos el resultado obtenido. Sin embargo, se sabe que las condiciones de trabajo pueden variar en cada experimento y es difícil asegurar que se obtiene una racemización completa siempre.

Además se puede observar en este trabajo que no se lograa la racemización completa del L-triptofano cuando se sometía el aminoácido a las condiciones de hidrólisis alcalina puesto que los rendimientos de este no bajaron al 50%, en tanto que en las muestras de proteína sí se obtenían resultados tan bajos.

La hidrólisis de Akeson y Stalerman se usó en todos los métodos a excepción del DMAB, que no requiere hidrólisis.

A los resultados obtenidos por los seis métodos estudiados, se les hizo el análisis de varianza y la prueba de Sheffé (prueba de T múltiple). (53) Los métodos que se compararon son: los dos microbiológicos, el fluorométrico, el del DMAB y el cloruro férrico. El del autoanализador no se comparó con todas las muestras debido a que sólo se hizo en seis muestras por las dificultades que se presentaron y se citaron antes.

En la tabla 4 aparecen los resultados para lisozima y pa

ra albúminas, bovina y de huevo; éstas son proteínas puras las cuales no tienen interferencia con otros compuestos, en los 3 casos no hay diferencia significativa entre los métodos usados en cada muestra y, los hidrolizados no son coloridos.

Se creyó conveniente meter indol como muestra para ver la sensibilidad de los métodos con respecto a éste ya que en algunos métodos es el anillo reaccionante responsable de la coloración (ejem. el método de DMAB), y se observó que no interfiere en los métodos fluorométrico, cloruro férrico y autoanализador. En el caso del microbiológico L.p. da un 60-70% de rendimiento para el microbiológico C.v. da el 100% de indol y para el del DMAB 60-80%. Esto significa que en estos métodos, se mide el indol además de triptofano, lo cual resulta importante sobre todo en aquellas muestras que pudieran contener compuestos indólicos.

En la tabla 5 se encuentran caseína, peptona de caseína, casitone, leche nido y meritene que es otra leche en polvo; en el caso de caseína y casitone el análisis de variancia mostró que no hay diferencia significativa entre los métodos y en el caso de peptona de caseína y leche nido de acuerdo con la prueba de Sheffé son iguales todos, excepto el del cloruro férrico que es menor y para meritene el que difiere es el del DMAB que dio resultado mayor.

En la tabla 6 aparecen proteínas de origen vegetal; proteínas de soya, ajonjolí y una mezcla 1:1 de las dos proteínas.

En todos los casos de acuerdo con la prueba de Sheffé el único que difiere es el método del DMAB. También aparece un producto comercial Muselina (harina de papa precocida), de acuerdo al análisis de variancia, no hay diferencia significativa entre los métodos.

En la tabla 7 aparecen los cereales; las muestras son: maíz normal, maíz opaco 2 endospermo blando, maíz opaco 2 endospermo duro y harina de trigo. Como se muestra en la tabla, los 3 maíces de acuerdo al análisis de variancia no hay diferencia significativa entre los métodos. Sin embargo, para la harina de trigo se encontró diferencia en el método del cloruro férrico, dando mayor lectura debido a que el color desarrollado por la muestra en este método (café) es diferente al desarrollado por el L-triptofano (violeta), lo que hace pensar que existen otros constituyentes de la muestra que interfieren en la determinación. El hidrolizado de esta muestra es colorido.

En la tabla 8 aparecen las leguminosas: ayocote, alubia, frijol negro crudo y frijol negro cocido. En todas las muestras no hay diferencia significativa en los 2 métodos micro-

biológicos y en el fluorométrico pero difieren de los resultados obtenidos por los métodos de DMAB y FeCl_3 ; siendo mayores los valores encontrados por estos métodos, esto es debido quizás a que no sólo se cuantifica triptofano sino también hay alguna interferencia con otros componentes que aparecen en estas muestras. En el caso del método de FeCl_3 las muestras dieron coloración diferente de la que se obtiene con la reacción característica del FeCl_3 (café en lugar de violeta). Los hidrolizados de estas muestras son fuertemente coloridos.

En la tabla 9 se muestran los resultados de los métodos comparados contra los del autoanalizador en las seis muestras que se hizo la determinación. Para este análisis estadístico se tiene como hipótesis que los valores obtenidos en el autoanalizador son los verídicos. De acuerdo con esta hipótesis en el caso de caseína no hay diferencia significativa entre los métodos. Y para las muestras de lisozima, albúmina de huevo, proteína de ajonjolí y mezcla 1:1 de proteína de soya-proteína de ajonjolí, con el único método que hubo diferencia fue con el de DMAB. En leche nido los dos métodos químicos, DMAB y FeCl_3 fueron diferentes a los otros métodos.

Estos resultados no pueden considerarse muy exactos pues to que la determinación en el autoanalizador sólo se hizo una vez debido a todos los problemas que hubo con el aparato.

CONCLUSIONES

- 1.- De los métodos químicos de hidrólisis no se pudo encontrar uno que fuera satisfactorio, la mayoría dió rendimientos bajos. Se requiere continuar el estudio para encontrar las condiciones óptimas de la hidrólisis.
- 2.- De las hidrólisis enzimáticas, el método de Akeson resultó ser el más adecuado ya que al comparar los resultados obtenidos con los reportados en la literatura de muestras protéicas como; lizozima y albúmina bovina dieron valores que oscilan entre el 90 y 100% de los registrados, además, fué por este método que se encontraron los valores más bajos para el blanco.
- 3.- El análisis estadístico muestra que no hay diferencia significativa entre los dos métodos microbiológicos y el fluorométrico que es el más simple de todos. Sin embargo, tiene como limitación que muestras muy coloridas interfieren en la determinación como ocurrió en las leguminosas.

- 4.- El método microbiológico que empleó *Chrombacterium violaceum*, no resultó adecuado en muestras que pudieran contener otros compuestos indólicos ya que también sintetiza violaceina a partir de estos. Esto podría ocurrir en material vegetal.
- 5.- El método de DMAB resultó ser el menos adecuado porque los resultados siempre fueron altos.
- 6.- El método de FeCl_3 es recomendable para cereales y otros concentrados proteicos que no sean coloridos.
- 7.- Se puede concluir que no fue posible encontrar un método general que sea aplicable a cualquier material. Continúan siendo los alimentos de origen vegetal coloridos (leguminosas) los que más dificultades presentan para la medición de triptofano por lo tanto de este trabajo se concluye que el método fluorométrico que es el más simple puede ser empleado con confianza en muestras no coloridas y el método microbiológico oficial es el recomendado para muestras coloridas.

V I I

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Wells, J.R.E., "Tryptophan Resolution with the Technicon AutoAnalyzer". *Analytical Biochemistry.*, 19, 448-453, 1967.
- 2.- Friedman, M., and Finley, J.W., "Methods of Tryptophan Analysis". *J. Agr. Food Chem.*, 19(4):626-631, 1971.
- 3.- Miller, E.L., "Determination of the Tryptophan Content of Feedingstuffs with Particular Reference to Cereals". *J. Sci. Fd. Agric.*, 18, 381-386, 1967.
- 4.- Barman, T.E., and Koshland, D.E., "A Colorimetric Procedure for the Quantitative Determination of Tryptophan Residues in Proteins". *Journal of Biological Chemistry.*, 242(24), 5771-5776, 1967.
- 5.- Spies, J.R., and Chambers, D.C., "Chemical Determination of Tryptophan in Proteins". *Analytical Chemistry.*, 21(10), 1249-1266, 1949.
- 6.- Spies, J.R., "Determination of Tryptophan in Proteins". *Anal. Chem.*, 39(10-12), 1412-1416, 1967.
- 7.- Bencze, W.L., and Schmid, K., "Determination of Tyrosine and Tryptophan in Proteins". *Anal. Chem.*, 29(8), 1193-1196, 1957.
- 8.- Slump, P., Schreuder, H.A.W., "Determination of Tryptophan in Foods". *Anal. Biochem.*, 27, 182-5, 1969.
- 9.- Westgarth, D.R., and Williams, A.P., "A Collaborative Study on the Determination of Tryptophan in Feedingstuffs", *J. Sci. Fd. Agric.*, 25, 571-575, 1974.
- 10.- Ostos Del Rio, A.M., "Medición de Triptofano en Materias Primas y Concentrados Proteicos". Tesis profesional. Facultad de Química. "UNAM", 1972.

- 11.- Bogert, L.J., Briggs, G.M., and Calloway, D.H., Nutrition and Physical Fitness., Editorial W.B. Saunders Company., 8ava. Ed., 1966, Philadelphia and London. ✓
- 12.- Waterlow, J.C., Cravioto, J., and Stephen, J.M.L., "Protein Malnutrition in Man". in Advances in Protein Chemistry., Vol. 15, pag. 156, 1960.
- ② Bioquímica
13.- White, A., Handler, P., Smith, E.L., Principles of Biochemistry., McGraw Hill Book Company., 4th Ed, 1968, Toronto. ✓
- 14.- Eastoe, J.E., "Analysis of Glycoproteins". Editado por: Alfred Gottschalk., Vol. 5, 1972.
- 15.- Sodek, Ladaslav., Vecchia, P.T.D., and Lima, M.L.G.P., "Rapid Determination of Tryptophan in Beans (*Phaseolus vulgaris*) by the Acid Ninhidrin Method". J. Agric. Food. Chem., 23(6), 1147, 1975. ✓
- 16.- Penke, B., Ferenczi, R. and Kovács, K., Tryptophan in Peptides and Proteins". Anal. Biochem., 60, 45-50, 1974. ✓
- 17.- Concon, J.M., "Rapid and Simple Method for the Determination of Tryptophan in Cereal Grains". Anal. Biochem., 67, 206-219, 1975. ✓
- 18.- Hugli. T.E., and Moore, Stanford., "Determination of the Tryptophan Content of Proteins by Ion Exchange Chromatography of Alkaline Hydrolysates". Journal of Biological Chemistry., 247(9), 2828-2834, 1972.
- 19.- Günter, Barth., Bunnemberg Edward., and Djerassi Carl., "Magnetic Circular Dicroism Studies XIX. Determination of the Tyrosine: Tryptophan Ratio in Proteins". Anal. Biochem., 48, 471-479, 1972.
- 20.- Spies, J.R., "Determination of Tryptophan in Corn (*Zea mays*)". J. Agric. Food. Chem., 16(3), 514-516, 1968.
- 21.- Krehl, W.A., Huerga, J., and Elvehjem, C.A., "The effect of Niacin on the utilization of Tryptophan". J. Biol. Chem., 164, 551-561, 1946.



- ✓ 22.- Spies, J.R., "Determination of Tryptophan with p-Dimethylaminobenzaldehyde". *Anal. Chem.*, 22(11), 1447-1449, 1950.
- ✓ 23.- Knox, Randy., Kohler, G.O., Palter, Rhoda., and Walker, H.G., "Determination of Tryptophan in Feeds". *Anal. Biochem.*, 36, 136-143, 1970.
- ✓ 24.- Matheson, N.A., "The Determination of Tryptophan in purified proteins and in feedingstuffs". *Br. J. Nutr.*, 31, 393, 1974.
- 25.- Liu, T.Y., and Chang, Y.H., "Hydrolysis of Proteins with p-toluensulfonic Acid". *J. Biol. Chem.*, 246(9), 2842-2848, 1971.
- 26.- Greene, R.D., and Black Archie., "The Microbiological Assay of Tryptophane in Proteins and Foods". *J. of Biol. Chem.*, 155, 1-8, 1944.
- 27.- Oelshlegel Jr., F.J., Schroeder, J.R., and Stahmann, M.A., "A Simple Procedure for Basic Hydrolysis of Proteins and Rapid Determination of Tryptophan Using a Starch Column". *Anal. Biochem.*, 34, 331-337, 1970.
- 28.- Sebek, O.K., "Microbiological Method for the Determination of L-Tryptophan". *Journal of Bacteriology.*, 90(4), 1026-1031, 1965.
- 29.- Karkhanis, Y.D., Carlo, D.J., and Zeltner, J., "A Simplified Procedure to Determine Tryptophan Residues in Proteins". *Anal. Biochem.*, 69(1), 55-60, 1975.
- 30.- Sullivan, M.X., and Hess, W.C., "A study of the various procedures for the estimation of Tryptophan". *J. Biol. Chem.*, 155, 441-446, 1944.
- ✓ 31.- Dalby, A., Tsai, Chia-Yin., "Acetic Anhydride Requirement in the Colorimetric Determination of Tryptophan". *Anal. Biochem.*, 63, 283-285, 1975.
- ✓ 32.- Spies, J.R., and Chambers, D.C., "Determination of Tryptophan with p-Dimethylaminobenzaldehyde Using Photochemical Development of color". *Anal. Chem.*, 22(9-12), 1209-1210, 1950.

- ✓ 33.- Amaya, F.J., Young, C.T., and Chichester, C.O., "Automated Determination of Tryptophan in Legumes and Cereals". *J. Agr. Food. Chem.*, 25(1), 139-143, 1977.
- ✓ 34.- Ferreira Pinto, G., "Dosagem do triptofano em alimentos". *Arch. Latinoam. Nutr.*, 22, 283-290, 1972.
- 35.- Stokes, J.L., Gunness, M., Dwyer, I.M., and Caswell, M.C., "Microbiological Method for the Determination of Amino Acids". *J. Biol. Chem.*, 160, 35-49, 1945.
- 36.- Gaitonde, M.K., and Dovey, T., "A Rapid and Direct Method for the Quantitative Determination of Tryptophan in the Intact Protein". *Biochem. J.*, 117, 907-911, 1970.
- 37.- Edelhoeh, H., "Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins". *Biochemistry.*, 6(7), 1948-1954, 1967.
- ✓ 38.- Udenfriend, S., "Fluorescence Assay in Biology and Medicine". Academic Press, London, New York, Vol. II, 162-165, 1962.
- 39.- Moore, S., y Stein, W.H., "Chromatographic determination of aminoacids by the use of automatic recording equipment" *Methods in enzymology*. Ed. Academic Press. New York and London, Vol. VI, pag. 819-830, 1963.
- 40.- Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) *Métodos de laboratorio, Análisis de Alimentos.*, Vol. I, 1964.
- 41.- Steele, B.F., Sauberlich, H.E., Reynolds, M.S., and Baumann, C.A., "Media for *Leuconostoc mesenteroides* P-60 and *Leuconostoc citrovorum* 8081". *J. Biol. Chem.*, 177, 533-544, 1949.
- 42.- Curtis Hannah, L., Rhodes, B.B., and Evans, I.M., "Examination and Modification of the Use of L-mesenteroides for Measurements of the Sulfur-Containing Aminoacids from *Vigna unguiculata*". *J. Agr. Food. Chem.*, 25(3), 620-623, 1977.

- 43.- Lombard, J.H., and Lange, D.J., "The Chemical Determination of Tryptophan in Foods and Mixed Diets". *J. Anal. Biochem.*, 10, 260-265, 1965.
- 44.- Akeson, W.B., and Stalermann, M., "Determinación de Digestibilidad de Proteínas in Vitro". *J. Nutrition.*, 83, 257-261, 1964.
- 45.- Colowick, S.P., and Kaplan, N.O., *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc. New York., Vol. I, pag. 143, 1955.
- 46.- Cornejo Barrera, Lucía., "Evaluación Nutricional de niños lactantes y preescolares". Tesis profesional. Facultad de Química. "UNAM", 1976.
- 47.- Yeoh, H.H., and Chew, M.Y., "Protein Content and amino acids composition of Cassava leaf". *Phytochemistry.*, 15, 1597-99, 1976.
- 48.- Rama Dao, M.V., Tara, M.R., and Kutty, CH., "Colorimetric Estimation of Tryptophan Content of Pulses". *Journal of Food Science & Technology.*, Vol. II, Nº 5, p. 213, 1974.
- 49.- Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical., Ninth Edition., Michigan, U.S.A., pag. 235, 1953.
- 50.- Henderson, L.M., and Snell, E.E., "A Uniform Medium for Determination of Amino Acids with Various Microorganisms". *J. Biol. Chem.*, 172, 15-29, 1948.
- 51.- Association of Official Agricultural Chemists. *Official Methods of Analysis*. Eleventh Edition., Washington, U.S.A. 1970.
- 52.- Hernández, H., Bates, L.S., "Modified Method for rapid Tryptophan analysis of maize". Folleto de investigación # 20. CIMMYT, 1971.
- 53.- Hollander, M., & Wolfe, D.A., *Nonparametric Statistical Methods.*, Wiley, New York. 1973.



Impresiones Lupita

MEDICINA No. 25

FRACC. COPILCO UNIVERSIDAD
CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.
TEL. 548-49-79