

VALORACION DE LISINA Y TRIPTOFANO EN DIFERENTES VARIEDADES DE MAIZ NORMAL Y OPACO-2

- * LEILA ARÉVALO R.
- * MARINA RUIZ S.
- ** SALOMÓN FERREIRA A.
- *** GUILLERMO RIVEROS

I—INTRODUCCION

El maíz es uno de los cultivos más importantes de América, por el área cultivada, el valor de la cosecha y su amplia utilización en la alimentación (1). Se ha establecido que alrededor del 70% del suministro mundial de proteínas es de origen vegetal y aproximadamente el 30% es de origen animal.

Los cereales, son los alimentos de principal consumo en la gran mayoría de los países en desarrollo y aportan a la dieta promedio colombiana el 80% de las calorías totales y el 70% de las proteínas requeridas.

El desarrollo de los híbridos del maíz, con un alto contenido de aminoácidos esenciales, presenta nuevas posibilidades y esperanzas para reducir las deficiencias nutricionales de las familias de bajos ingresos en los países subdesarrollados, en los cuales el maíz representa una parte muy importante en la alimentación.

En la actualidad se conocen genes recesivos cuya incorporación a variedades corrientes permiten mejorar sustancialmente la calidad de las proteínas en dichas variedades.

* Estudiantes de Tesis.

** Profesor Asociado - Departamento de Farmacia.

*** Fisiólogo Vegetal - Instituto Colombiano Agropecuario, ICA.

Debido a las grandes ventajas que presentan los maíces mejorados, éstos han venido desplazando progresivamente los maíces criollos. Varios países iberoamericanos, entre ellos Colombia, han venido realizando estudios de mejoramiento con el propósito de obtener maíces con mejores características nutricionales, que permitan el consumo adecuado de proteínas y aminoácidos por medio de la adición de este importante ingrediente en la dieta diaria.

Herramienta valiosa en estos estudios son los métodos analíticos que permiten establecer en corto tiempo los cambios en el contenido de aminoácidos, de los maíces mejorados.

Numerosas investigaciones han demostrado que el contenido de los aminoácidos lisina y triptofano son factores limitantes en la calidad de las proteínas del maíz (2, 3).

El presente trabajo tiene por objeto adaptar y evaluar varios métodos de análisis en la determinación del contenido de lisina y triptofano en los siguientes híbridos de maíz:

1. ICA H - 208 TuO - Medellín (Opaco amarillo)
2. ICA H - 208 Tur - Montería (Opaco amarillo)
3. ICA H - 255 TuO - Medellín (Opaco blanco)
4. ICA H - 207 TuO - Medellín (Normal)
5. ICA H - 253 Tur - Montería (Normal)

Se denomina maíz normal al híbrido que no ha sido mejorado y el contenido de aminoácidos y maíz opaco al híbrido con un alto contenido de lisina y triptofano.

Los resultados obtenidos permitirán establecer cuál híbrido estudiado presenta mayor contenido de lisina y triptofano.

Con base en estos resultados se establecerán las variaciones de el contenido de estos aminoácidos cuando el híbrido se cultiva en climas diferentes.

II — REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Generalidades.

El maíz, una de las plantas de importancia económica, tuvo su origen en América. La historia documentada del maíz se limita a los años que siguieron al descubrimiento de América (4). Evidentemente la primera referencia de la planta data del 5 de noviembre de 1492 día en que los españoles enviados por Colón a explorar el interior de

la isla de Cuba regresaron hablando de "una clase de grano que llamaban maíz, de buen sabor tanto cocido como crudo o molido".

Cuando Colón descubrió a América ya se cultivaba en el continente este cereal.

2.2. *Herencia en el maíz.*

Se conoce más acerca de la genética del maíz que acerca de cualquier otra planta o animal de utilidad económica. Desgraciadamente la mayoría de los caracteres estudiados han sido defectos producidos por genes recesivos de escasa importancia económica.

Emerson y colaboradores (5) y Hayes y colaboradores (6) han publicado resúmenes bastante completos sobre la herencia de algunos caracteres del maíz; mientras Rhoades (7), se ha ocupado de la citogenética en este cereal.

2.3. *Métodos de mejoramiento del maíz.*

El mejoramiento genético del maíz se hace con el objeto de aumentar el rendimiento sistemático de la cosecha con intervención en la ascendencia de la semilla (8). El genetista percibe diferencias de importancia en el material vegetal existente y elige y multiplica los tipos más convenientes. En términos generales los diferentes sistemas para mejorar el maíz son los siguientes: 1. La selección en masa; 2. La selección en mazorca por surco; 3. Las selecciones recurrentes o hibridación varietal, y 4. Hibridación entre líneas endocriadas.

2.4. *Composición química.*

En general el maíz contiene los siguientes materiales orgánicos e inorgánicos (9):

1. Proteínas
2. Lípidos
3. Vitaminas
4. Glúcidos
5. Minerales
6. Almidón
7. Dextrina
8. Carbohidratos.

De los análisis químicos realizados en el ICA con diferentes clases de granos de maíz, se encontraron los siguientes resultados, los cuales indican que los principales constituyentes de los granos de maíz son los carbohidratos y que además contiene cantidades apreciables de proteínas y grasas (10).

	Promedio g/100 g	Desviación estándar	Coficiente variabilidad
Humedad	12.01	1.49	12.42
Proteínas totales	9.77	0.79	8.11
Grasa	4.12	0.55	13.45
Fibra	2.44	0.41	16.95
Cenizas	1.87	0.65	34.68
Elementos no nitrogenados	67.79	2.67	3.82

2.4.1. *Proteínas.*

La calidad de las proteínas es tan importante como la cantidad. El grano de maíz contiene dos clases de proteínas. De las proteínas que se encuentran en el endospermo la mayor cantidad corresponde a zeína. La zeína carece de los aminoácidos lisina y triptofano, los cuales son esenciales para la alimentación humana y animal. La otra clase de proteína, que se encuentra tanto en el endospermo como en el germen, contiene triptofano y lisina y está biológicamente equilibrada (11, 12).

2.4.2. *Lípidos.*

La grasa del maíz es un subproducto valioso de la industria de grasas y tiene un alto valor energético para la alimentación del ganado (13).

Dentro de los lípidos, la sustancia principal es el aceite.

2.4.3. *Vitaminas.*

Las principales vitaminas encontradas en el maíz son las siguientes: (14, 15).

A	60 U.I.
B ₁	0.31 mg/100 g
B ₂	0.10 mg/100 g
Niacina	0.23 mg/100 g
Acido ascórbico	0.05 mg/100 g

2.4.4. Glúcidos.

Harrar (16) determinó el contenido de carbohidratos del maíz y los resultados fueron:

	g/100 g
Azúcares totales	1.59
Goma	1.92
Fibra	3.30

2.4.5. Minerales.

De los análisis realizados en las cenizas de los granos se han encontrado diferentes compuestos inorgánicos, cuyas proporciones son las siguientes: (10)

Compuesto	(g/100 g) Cenizas
Calcio expresado como óxido de calcio	2.2
Potasio expresado como óxido de potasio	29.8
Sodio expresado como óxido de sodio	1.1
Magnesio expresado como óxido de magnesio	15.5
Hierro expresado como óxido férrico	0.8
Fósforo expresado como pentóxido de fósforo	45.6
Azufre expresado como anhídrido sulfúrico	0.8
Silicio expresado como anhídrido silico	2.1
Cloro expresado como cloruro	0.9

2.5. Conceptos genéticos y agronómicos del maíz opaco.

2.5.1. Conceptos genéticos.

Desde principios de este siglo los químicos Mendel y Osborne (17, 18) llamaron la atención sobre la baja calidad de la proteína del maíz para la alimentación de los animales monogástricos, debido al bajo contenido de dos aminoácidos esenciales: lisina y triptofano.

En 1934 en la estación experimental de Connecticut, Estados Unidos, Singleton y Jones (19), descubrieron el mutante opaco-2 en el maíz. En esta descripción se analizó la modificación fenotípica del grano, al convertirse éste de endospermo duro en endospermo harinoso.

En 1954, Mertz, Bates y Nelson (20) en la Universidad de Purdue, Indiana, U.S.A., revelaron los cambios químicos que causa en el maíz la presencia del gene opaco-2, especialmente en el mayor aumento en la cantidad de lisina y triptofano (21).

En el maíz hay principalmente cuatro clases de proteínas; globulina, albúmina, prolaminas (zeína) y glutelinas. La zeína es una proteína de pobre calidad y constituye más de la mitad del contenido de proteínas del maíz normal (22).

El gene opaco-2 disminuye el contenido de zeína en el grano hasta en un 50%; es decir, reduce considerablemente la proteína de baja calidad con aumento de las de buena calidad. En los maíces con el gene opaco-2 hay un mejor balance de los aminoácidos, lo cual resulta en un mejoramiento de la proteína del maíz.

En marzo de 1965 se sembraron en Colombia algunos granos de maíz con gene opaco-2. Este material sirvió para un programa de conversión de las líneas de los mejores híbridos del ICA, en híbridos con gene opaco es decir con un alto contenido de lisina y triptofano.

El sistema de mejoramiento utilizado fue el de retrocruzamientos. La recuperación del genotipo de las líneas colombianas se ha hecho semestralmente, con el fin de restaurarles su adaptación y buenos rendimientos.

La disponibilidad de un método rápido y confiable para detectar la lisina y el triptofano de los progenies de los diferentes cruzamientos es una gran ayuda para acelerar el proceso de mejoramiento del maíz en cuanto a calidad de proteínas se refiere.

Los híbridos ICA H 207 (amarillo) e ICA H 253 (blanco), transformados en opacos se registraron en el Ministerio de Agricultura en 1969 y se distribuyeron comercialmente como ICA H 255 e ICA H 208 blanco y amarillo, respectivamente (23).

En la primera generación de retrocruzamiento con opaco-2 los híbridos mencionados perdieron hasta 31% de rendimiento (24).

2.8. Valor nutritivo del maíz opaco-2.

El grano de maíz tiene tres clases fundamentales de nutrientes: proteínas, grasas y carbohidratos. Estos no están uniformemente distribuidos en el grano de maíz. La envoltura está constituida princi-

palmente por fibra, el endospermo por carbohidratos y proteínas y el embrión por proteínas y grasas (25, 26, 27, 28).

La proteína del maíz normal es deficiente en los aminoácidos esenciales; no así las variedades obtenidas de maíz con gene opaco-2. Esta proteína, según publicaciones referentes al valor biológico, tiene un valor muy similar al de la caseína (29, 30, 31, 32).

Algunos experimentos con maíz opaco-2 en alimentación de animales han demostrado su valor nutritivo superior al del maíz común (33).

También se han hecho estudios sobre el valor nutritivo en seres humanos y se ha logrado establecer que la proteína del maíz opaco-2 puede ser utilizada eficientemente en niños desnutridos y es capaz de restablecer el déficit ocasionado por la desnutrición.

El incremento de lisina y triptofano en el maíz opaco permite que el patrón general de la proteína se asemeje más al patrón ideal de aminoácidos formulado por la FAO, para una proteína de óptima calidad. Dichos cambios deben reflejarse en una mejor utilización de esta proteína y por consiguiente se traduce en una mayor promoción de crecimiento cuando dicha proteína se administra como la única fuente a animales de experimentación.

Una de las pruebas más utilizadas para medir la capacidad de promover el crecimiento en la evaluación de calidad de las proteínas, es la conocida con el nombre de Razón de Eficiencia Proteica, PER, que permite medir la cantidad de gramos en incremento de peso inducida por cada gramo de proteína ingerida, comparándola con el resultado obtenido, utilizando una fuente proteica de conocida calidad (34, 35).

La proteína de maíz opaco-2 es bien balanceada, capaz de promover crecimiento en el animal en forma satisfactoria y además produce una retención de proteína tisular bastante aceptable.

Nutricionistas del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá han dado una guía, que ayuda a calcular la cantidad de alimento necesario por persona diariamente y su requerimiento de calorías y proteínas.

Trescientos cincuenta gramos de maíz pueden suplir al menos el 45% de las calorías y cerca del 62% de las proteínas requeridas por el hombre diariamente (36, 37, 38, 39, 40, 41).

III — MATERIALES Y METODOS

3.1. *Muestras de maíz.*

En el trabajo se utilizaron muestras de maíces normales y con gene opaco-2 así:

- NORMALES:** ICA H-253 Turipaná - Montería
ICA H-207 Tulio Ospina - Medellín
- OPACOS:** ICA H-208 Tulio Ospina - Medellín
ICA H-208 Turipaná - Montería
ICA H-255 Tulio Ospina - Medellín.

Las muestras anteriores fueron suministradas por el Laboratorio de Fisiología Vegetal del ICA, Tibaitatá. Es de mencionar que la mayor parte de las colecciones se hicieron en los campos de cultivo directamente y durante la época de la cosecha, que en muchas partes de Colombia tiene lugar dos veces al año. Se procuró obtener en cada caso, un mínimo de quince mazorcas e incluir en dicho número la mayor variación posible de planta y tipo de mazorca que se presentaron. Estas se catalogaron, secaron y fotografiaron tan pronto como se recibieron en la granja de Tibaitatá. Se tomaron los datos referentes a las características del grano y de la mazorca, luego fueron cuarteadas y seleccionadas para tomar las muestras para análisis.

Después se colocaron en recipientes de vidrio para el análisis de los factores propuestos, los cuales se describen a continuación:

3.1.1. *Características de la mazorca.*

Se hizo el estudio de las características externas de las mazorcas. Las mediciones y observaciones se realizaron en diez mazorcas de cada variedad. En cada caso se determinó la longitud, el diámetro de la parte media, el número de hileras y el ángulo de conicidad de la mazorca, el diámetro del pedúnculo, la anchura, grosor, longitud, depresión y dureza del grano.

3.2. *Análisis químico bromatológico.*

Se efectuaron los siguientes análisis químicos fundamentales en cada una de las muestras previamente seleccionadas:

- a. Determinación del contenido de humedad
- b. Nitrógeno
- c. Contenido de proteínas totales
- d. Grasa
- e. Fibra cruda
- f. Cenizas.

Las técnicas utilizadas son las de uso oficial del ICA, incluidas en el A. O. A. C. (42).

3.3. *Análisis de los minerales.*

Se realizaron los análisis de minerales de mayor importancia nutricional tales como: fósforo, calcio, hierro, magnesio, potasio y sodio con ayuda de un espectrofotómetro de absorción atómica, Perkin Elmer, mod. 203, operando siempre en las condiciones adecuadas de acuerdo al manual del instrumento.

3.4. *Análisis del almidón.*

El método empleado se basa en la rotación específica del almidón en medio clorhídrico, utilizando un polarímetro para medir la rotación angular producida (43).

3.5. *Análisis de aminoácidos.*

Se analizaron los aminoácidos lisina y triptofano por los métodos microbiológico y espectrofotométrico.

3.5.1. *Análisis de lisina por el método microbiológico.*

El ensayo microbiológico (44) de aminoácidos se basa en los mismos principios en los cuales se basa la valoración microbiológica de las vitaminas, es decir, en la propiedad que tienen las bacterias lácticas de alimentarse de aminoácidos y vitaminas, con producción de ácido láctico a pH óptimo de 6 a 7. Teniendo un medio basal, el cual debe contener la cantidad de nutrientes requeridos por el microorganismo que se usará en el ensayo. Valorando el ácido producido, con NaOH 0,1 N se puede determinar cuantitativamente el aminoácido correspondiente.

3.5.2. *Análisis de triptofano por el método microbiológico.*

Como el triptofano se destruye por hidrólisis ácida es necesario hacer una hidrólisis enzimática para liberarlo y hacer con este hidrolizado el análisis correspondiente.

El método a seguir es el mismo utilizado para el análisis de lisina. Se utiliza el mismo microorganismo. En la preparación del medio basal debe omitirse la presencia del triptofano, sustituyéndolo por 100 mg. de lisina. La hidrólisis enzimática se efectúa así: tomar 5 g de muestra molida y desengrasada con n-hexano, adicionar 10 ml de solución de pronasa, la cual contiene 0.480 g de pronasa en 160 ml de buffer de fosfatos de pH 7.6. Mantener la muestra bajo agitación constante, a 35°C y durante 48 horas. Llevar a volumen en un frasco

volumétrico de 100 ml, filtrar y tomar una alícuota de 25 ml, llevar a pH 6.8 con ayuda de un potenciómetro y diluir a 250 ml con agua bidestilada. Para la preparación de las soluciones patrones tomar concentraciones entre 0 y 10 mcg/ml para el triptofano. Seguir el mismo procedimiento descrito para el análisis de lisina.

3.5.3. *Análisis del triptofano por el método espectrofotométrico.*

Se ha observado una relación entre el contenido de lisina y triptofano en la fracción de zeína y una relación con todo el endospermo. Se considera que el valor del contenido de triptofano puede servir como parámetro para la evaluación del maíz.

El trabajo mencionado ha demostrado la factibilidad de hacer una determinación rápida del contenido de triptofano y el establecimiento de un método para relacionar el contenido de triptofano y de lisina en proteína.

Para la determinación de triptofano en proteínas se han utilizado métodos microbiológicos, varias técnicas cromatográficas, análisis espectrofotométricos y valoraciones químicas, después de hacer hidrólisis alcalinas o enzimáticas (45, 46, 47). Infortunadamente la mayoría de estos métodos requieren un equipo especial y personal muy adiestrado.

Opienska - Blauth y col. modificaron algunos métodos, para uso en material biológico (48). Se ha seleccionado este método por su simplicidad y adaptabilidad en la valoración rutinaria de este aminoácido en el maíz. Se hicieron algunas modificaciones necesarias. La hidrólisis se hizo con solución de papaína.

a. *Procedimiento.*

Las muestras se prepararon según la técnica descrita por Mertz y Bressani (49) y Bates (50).

La curva de calibración se realiza operando en las mismas condiciones empleadas para el problema y con concentraciones de 0 a 50 mcg por ml, utilizando DL - triptofano reactivo.

b. *Correlación de lisina.*

Hernández y Bates (51) encontraron una alta correlación ($r = 0.85$) entre el contenido de lisina y triptofano en endospermo de maíz, utilizando la fórmula de regresión $y = 0.3301 + 4.0745 x$, donde y = porcentaje de lisina en proteína y x = porcentaje de triptofano en proteína. Se calculó la relación de porcentaje de lisina y triptofano en proteína, utilizando la fórmula descrita anteriormente.

1.5.4. Análisis de lisina por el método espectrofotométrico.

Teoría del método.

La importancia de lisina aprovechable (lisina residual) en la cual el grupo epsilon amino está libre, es bien reconocido en química de proteínas y nutrición. El reactivo 1-fluoro, 2-4-dinitrobenzenceno, FDNB, se ha usado para determinar los grupos epsilon amino libres y α amino libres de las proteínas (52, 53) y para estudiar el papel funcional de los grupos amino en la actividad biológica de las proteínas (54, 55). Carpenter (56) desarrolló un método que incluye el uso del FDNB para determinar la lisina aprovechable en alimentos proteínicos y observar una correlación entre la lisina aprovechable y el valor biológico de la proteína (57, 58) conclusión esta que ha sido corroborada por otros investigadores (59, 60). Sin embargo el FDNB exige una técnica laboriosa y requiere bastante tiempo para el análisis de rutina de proteínas. Además el FDNB no es específico para los grupos epsilon amino de lisina, porque también reacciona con grupos α amino libres y la tirosina de las proteínas.

El reactivo ácido 2, 4, 6 trinitro-bencen-sulfónico, TNBS, es conveniente por su especificidad para reaccionar con los grupos amino epsilon (61, 62, 63) y ofrece un procedimiento simple para medir la cantidad de lisina aprovechable en las proteínas. Habeed (64) ha desarrollado un método para determinar los grupos amino de las proteínas. Recientemente, Haynes y colaboradores (65) usaron TNBS para estudiar la esencialidad del papel que juegan los grupos amino en la actividad de ciertos inhibidores de proteasas.

Los resultados se reportaron según las condiciones de pH y temperatura de acuerdo a la literatura (62, 64, 66) así como las demás variables, tales como concentración de reactivos (sodio, bicarbonato y TNBS), tiempo de reacción y de hidrólisis de la TNP proteína. La especificidad de la técnica descrita para los grupos epsilon amino de las proteínas reside en la extracción del TNP-aminoácido con éter, mientras la epsilon-TNP-lisina permanece en la fase acuosa, donde se puede determinar espectrofotométricamente. Un estudio de la influencia de las condiciones hidrolíticas en la recuperación de la epsilon-TNP-lisina de alimento proteínico, revela que un período de hidrólisis de una hora, a 120°C., con ácido clorhídrico 6 N, es suficiente para análisis cuantitativo.

Para el análisis de la lisina no fue necesario hacer una hidrólisis anterior al análisis mismo, pues el método del TNBS incluye una

hidrólisis suficiente. Por lo tanto se tomó una muestra de polvo de maíz desengrasado.

IV — RESULTADOS Y CONCLUSIONES

4.1. *Características de la mazorca.*

Las plantas de maíz opaco son vigorosas, con resistencia moderada a enfermedades. La mazorca es grande y el grano de tipo harinoso. La característica de ser más harinoso que el maíz común amarillo lo hace más absorbente del agua. El maíz opaco-2 tiene mazorca cilíndrica de granos blancos y amarillos y la planta es moderadamente alta. Se ha encontrado que el maíz opaco-2 tiene un germen o embrión relativamente más grande y endospermo más suave que el maíz común.

En la Tabla número I pueden observarse las características de la mazorca en las variedades de maíz normal y con gene opaco-2, utilizadas en el trabajo.

TABLA NUMERO I
CARACTERISTICAS DE LA MAZORCA

Variedad	L cm	DPM mm	Nº H	A. C.	DP mm	AG mm	LG mm	EG mm	DG	D
ICA H 207	19.5	36	12.3	60	8	3.0	8	2.0	2	1
ICA H 208	16.2	40	11.7	70	10	2.5	7	2.0	2	4
Turipaná										
ICA H 255	18.5	44	10.3	55	9	3.0	5	1.8	1	4
ICA H 208	13.5	38	14.3	63	7	2.7	6	2.0	4	4
T. Ospina										
ICA H 253	18.3	39	12.1	75	8	2.8	7.5	2.0	1	1

L = Longitud

DPM = Diámetro promedio de la parte media de la mazorca

Nº H = Número de hileras

A.C. = Angulo de conicidad

DP = Diámetro del pedúnculo.

AG = Anchura del grano

LG = Longitud del grano

EG = Espesor del grano

DG = Depresión del grano

D = Dureza

Según las dimensiones anteriores podemos concluir que el tamaño de la mazorca es mayor para el maíz normal y menor para el maíz opaco. De estos valores el menor corresponde a la variedad ICA H 108 Tulio Ospina.

En cuanto al diámetro promedio de la mazorca, DPM, el menor valor corresponde al maíz ICA H 207, el máximo corresponde a la variedad ICA H 255.

En el número de hileras, se presenta un máximo valor para el maíz ICA H 208 Tulio Ospina y la variación de este parámetro en los opacos varía desde 10.3 hasta 14.3; la diferencia entre estas variedades de maíz opaco, de la misma variedad es de 2.6 hileras. El valor mínimo de estas variedades corresponde al opaco ICA H 255.

Según los valores de dureza, se puede apreciar que el grano de maíz opaco es blando para las tres variedades y existe una gran diferencia con el maíz normal puesto que este sí es duro y su valor corresponde a 1.

Al observar las dimensiones de los granos se puede apreciar un tamaño más o menos uniforme, cuyos valores promedios oscilan así: anchura del grano 2.8 mm; longitud 6.7 mm y espesor 1.96 mm.

La variedad ICA H 208 cultivada en un clima más cálido (Turin) tiende a producir mazorcas más largas, más gruesas, con mayor ángulo de conicidad, mayor diámetro de pedúnculo y con granos más largos.

2. Análisis bromatológicos.

En las Tablas números II y III se anotan los resultados obtenidos en los análisis realizados a las variedades de maíz con gene opaco-2 y normal.

Para mayor claridad es necesario tener en cuenta los siguientes conceptos:

Materia parcialmente seca: MPS, se refiere a una muestra secada a 60°C y equilibrada con la humedad ambiente.

Muestra fresca: MF, se refiere al material recién cosechado que ha sido almacenado, curado o conservado.

Así el porcentaje de los análisis reportados sobre muestra fresca, MF, se obtiene del producto entre la materia parcialmente seca y el porcentaje calculado en la muestra parcialmente seca, %MPS.

TABLA NUMERO II

Contenido de humedad, proteínas, nitrógeno, fibra, cenizas, grasa y almidón expresados como porcentaje en peso de materia seca

Variedad	Humedad g/100 g	Proteínas g/100 g	Nitrógeno g/100 g	Fibra g/100 g	Cenizas g/100 g	Grasa g/100 g	Almidón g/100 g
ICA H 208	10.8	9.56	1.53	2.78	1.06	4.17	68.29
T. Ospina							
ICA H 208	12.5	9.25	1.47	1.60	2.05	4.03	68.42
Turipaná							
ICA H 255	11.2	9.81	1.57	2.09	2.20	3.47	65.40
T. Ospina							
ICA H 207	10.8	9.43	1.51	3.47	1.43	4.12	73.60
ICA H 253	10.4	8.31	1.33	2.27	1.88	4.35	70.24

TABLA NUMERO III

Contenido de minerales: calcio, fósforo, hierro, magnesio, potasio y sodio

Variedad	Calcio g/100 g	Fósforo g/100 g	Hierro g/100 g	Magnesio g/100 g	Potasio g/100 g	Sodio g/100 g
ICA H 208	0.008	0.15	0.012	0.014	0.004	0.003
T. Ospina						
ICA H 208	0.019	0.31	0.012	0.016	0.005	0.016
Turipaná						
ICA H 255	0.011	0.32	0.008	0.034	0.008	0.014
T. Ospina						
ICA H 207	0.013	0.30	0.008	0.007	0.002	0.006
ICA H 253	0.008	0.29	0.012	0.016	0.003	0.007

Los valores consignados en las tablas son el promedio de cuatro determinaciones. Puede observarse que el porcentaje de humedad de

las variedades normales (ICA H 207 e ICA H 253) y con gene opaco-2 no es muy diferente, fluctúa entre 10.4 y 12.5%.

El contenido de proteínas totales es aproximadamente 1.30% mayor en las variedades de maíz opaco (ICA H 208 Tulio Ospina, ICA H 208 Turipaná, ICA H 255 Tulio Ospina). El mismo comportamiento se observa en relación al contenido de nitrógeno.

La variedad ICA H 208 cultivada en clima más cálido (Turipaná) presenta menor contenido de proteínas totales que la misma variedad cultivada a menor temperatura (Tulio Ospina).

El maíz ICA H 208 de Turipaná contiene el más alto porcentaje de fibra y el ICA H 207 el más bajo.

Las variedades de maíz opaco demuestran tener mayor contenido de elementos inorgánicos (calcio, hierro, fósforo, potasio y sodio) que las variedades normales.

El fósforo es el elemento inorgánico presente en mayor proporción. El orden de importancia de los elementos, en relación con su contenido, en orden descendente, para las variedades con gene opaco-2 es fósforo, magnesio, calcio, sodio, hierro y potasio. Como se ve, el orden de importancia del calcio y del magnesio en las variedades del maíz opaco se invierte pasando a ser más abundante el magnesio que el calcio. El sodio en el maíz opaco avanza y pasa a ocupar el nivel del hierro. El resto de la ordenación sigue igual para el contenido de fósforo y el menor para el potasio.

La variedad de maíz con mayor contenido de minerales corresponde al ICA H 208 Turipaná, luego al maíz ICA H 255 Tulio Ospina, y las variedades de menor contenido las de maíz normal ICA H 207 e ICA H 253.

Esta diferencia en cuanto al contenido de minerales influye notablemente en el comportamiento enzimático afectando así la cadena de los ácidos DNA y RNA, ocurriendo un mejoramiento en las propiedades genéticas de las variedades de maíz.

Los porcentajes del contenido de grasa de las diferentes variedades son similares.

El contenido de almidón corresponde al mayor porcentaje de su composición en todas las muestras. Estos valores están muy próximos en las variedades de maíz opaco y son menores que los de las variedades normales.

4.3. *Determinación del contenido de lisina por el método microbiológico.*

TABLA NUMERO IV

Contenidos de lisina en las diferentes variedades de maíz obtenidos por el método microbiológico.

Variedad	NaOH 0.1 N ml	Concentración de lisina ppm	MPS g/100 g	MF g/100 g
ICA H 208 T. Ospina	3.00	63.2	0.56	0.44
ICA H 208 Turipaná	3.25	69.7	0.62	0.54
ICA H 255 T. Ospina	3.20	68.4	0.59	0.52
ICA H 207	2.20	42.1	0.37	0.32
ICA H 253	2.00	36.8	0.32	0.28

Los resultados anteriores son el promedio de tres determinaciones. Están comprendidos, como puede observarse, dentro del intervalo de las concentraciones empleadas para elaborar la curva patrón. De los datos presentados en la Tabla número IV y de la gráfica de calibración para la valoración de lisina por el método microbiológico podemos concluir que a medida que aumenta la cantidad de lisina adicionada al medio de cultivo del *Leuconostoc*, aumenta la cantidad de hidróxido de sodio empleado en la titulación del ácido láctico producido por el microorganismo. Además se observa que en ausencia total de lisina el microorganismo presenta algún crecimiento lo cual se traduce en que la curva no comienza en el cruce de los ejes de coordenadas. Sin embargo este crecimiento es mínimo.

La gráfica presenta una relación lineal entre el volumen de NaOH 0.1 N gastado y la cantidad de lisina (ppm) en el medio entre 0.0 y unas 170 ppm de lisina.

En la determinación de lisina se observa una marcada diferencia entre las variedades normales y con gene opaco-2. Este fenómeno se debe a la diferente composición genética de los híbridos, a la influencia de la calidad del suelo, de los fertilizantes, de las condiciones climáticas, etc.

El contenido mínimo de lisina corresponde a la variedad ICA H 253, variedad normal y el máximo valor corresponde a la variedad

ICA H 208 Turipaná (opaco), siguen en orden decreciente la variedad ICA H 255 de Tulio Ospina.

La relación del contenido promedio de lisina en las variedades de maíz opaco y maíz normal analizadas es de 1.7:1. Este mayor contenido de lisina en el maíz opaco le confiere su gran importancia nutricional debido a que la lisina es un aminoácido limitante en el maíz normal.

La variedad ICA H 208 cultivada en clima más cálido (Turipaná) presenta mayor contenido de lisina.

La valoración de lisina por el método microbiológico resultó reproducible, los datos obtenidos por este análisis pueden considerarse de mucha precisión, en el proceso del análisis debe tenerse mucha asepsia con el objeto de evitar contaminaciones y no obtener resultados falsos.

4.4. Valoración de triptofano por el método microbiológico.

El contenido de triptofano en las muestras analizadas por el método microbiológico y expresado como porcentaje en peso de materia parcialmente seca y de materia fresca, puede observarse en la Tabla número V.

TABLA NUMERO V

Contenido de triptofano en las muestras analizadas por el método microbiológico.

Variedad	NaOH 0.1 N ml	Concentración triptofano ppm	MPS g/100 g	MF g/100 g
ICA H 208 T. Ospina	1.5	1.38	0.110	0.097
ICA H 208 Turipaná	2.8	2.77	0.135	0.153
ICA H 255 T. Ospina	2.2	2.33	0.120	0.105
ICA H 207	1.0	0.85	0.660	0.053
ICA H 253	1.2	0.92	0.085	0.075

Los resultados anteriores nos permiten concluir que la cantidad de triptofano encontrada en el análisis por el método microbiológico es considerablemente superior en el maíz con gene opaco-2 en relación con el contenido de este aminoácido en las variedades de maíz normal

(1.6:1). Esto pone de manifiesto el valor nutricional de este maíz si se tiene en cuenta que el triptofano es un aminoácido esencial limitante en el maíz normal. La variedad ICA H 208 cultivada en mayor temperatura (Turipaná) presenta mayor contenido de triptofano.

4.5. Valoración de lisina por el método colorimétrico.

El contenido de lisina en las muestras analizadas por el método espectrofotométrico puede observarse en la Tabla número VI.

T A B L A N U M E R O V I

Variedad	Absorbancia 345 milímicras	Lisina g/100 g MPS
ICA H 208	0.39	0.51
T. Ospina		
ICA H 208	0.47	0.58
Turipaná		
ICA H 255	0.42	0.53
T. Ospina		
ICA H 207	0.22	0.28
ICA H 253	0.19	0.25

El contenido de lisina encontrado en el análisis por el método espectrofotométrico es superior en las variedades de maíz opaco-2 y específicamente en el maíz ICA H 208 Turipaná, que el contenido encontrado en el maíz normal.

Por este método también se comprueba el mayor valor nutricional del maíz opaco-2.

La relación de contenido promedio de lisina es de 2.04, 2.32 y 2.12:1 entre las variedades de maíz opaco y maíz normal.

En cuanto al método puede decirse que el reactivo TNBS no es fácil de encontrar en el mercado, porque presenta dificultades en su importación. El método presenta ventajas en cuanto a la hidrólisis porque el tiempo es mínimo y no exige un tratamiento previo de las muestras de maíz. Sin embargo exige una técnica laboriosa y requiere bastante tiempo para el análisis de rutina de las proteínas. Además el TNBS no es específico para los grupos epsilon amino de lisina, puesto que también reacciona con los grupos alfa amino libres y la tirosina de las proteínas. El blanco debe prepararse de forma diferente a la empleada para el análisis de las muestras de maíz. Se aconseja agregar el ácido clorhídrico antes del TNBS, con el propósito de

evitar una mayor formación de ácido pítico producto hidrolítico de la reacción. Este se remueve con las extracciones etéreas y se elimina la interferencia en la lectura.

La relación de contenido promedio de lisina de maíz normal y opaco es de 1:2 para la variedad ICA H 208 Tulio Ospina, 1:2,3 para la variedad ICA H 208 Turipaná, 1:2,12 para la variedad ICA H 255 Tulio Ospina.

La variedad ICA H 208 cultivada en clima más cálido (Turipaná) presenta mayor contenido de lisina que la misma variedad cultivada a menor temperatura (Tulio Ospina).

4.6. Valoración del contenido de triptofano por el método espectrofotométrico.

El contenido de triptofano en las muestras analizadas por el método espectrofotométrico puede observarse en la Tabla número VII.

TABLA NUMERO VII

Contenidos de triptofano en las muestras obtenidas por el método espectrofotométrico.

Variedad	Absorbancia 545 milímicras	Triptofano g/100 g MPS
ICA H 208 T. Ospina	0.333	0.104
ICA H 208 Turipaná	0.403	0.126
ICA H 255 T. Ospina	0.379	0.118
ICA H 207	0.175	0.055
ICA H 253	0.202	0.064

Según estos resultados las variedades de maíz con gene opaco presentan un mayor contenido de triptofano que las variedades normales. El método es efectivo y rápido, fácil de operar y los resultados son reproducibles.

Estos resultados son el promedio de 10 determinaciones para cada muestra.

Comparando estos resultados con los obtenidos por el método microbiológico, podemos concluir que estos valores son tan reprodu-

cibles como los obtenidos por el método microbiológico. El método es más fácil de efectuar. Los valores obtenidos son menores que los obtenidos por el método microbiológico.

4.7. *Correlación de los contenidos de lisina y triptofano en proteína.*

En la Tabla número VIII puede observarse la correlación de los contenidos de lisina y triptofano calculados por medio de la fórmula de Opienska y colaboradores (48), basados en los resultados de contenido de triptofano obtenidos por el método espectrofotométrico.

T A B L A N U M E R O V I I I

Relación del contenido de triptofano y el contenido de lisina en proteína.

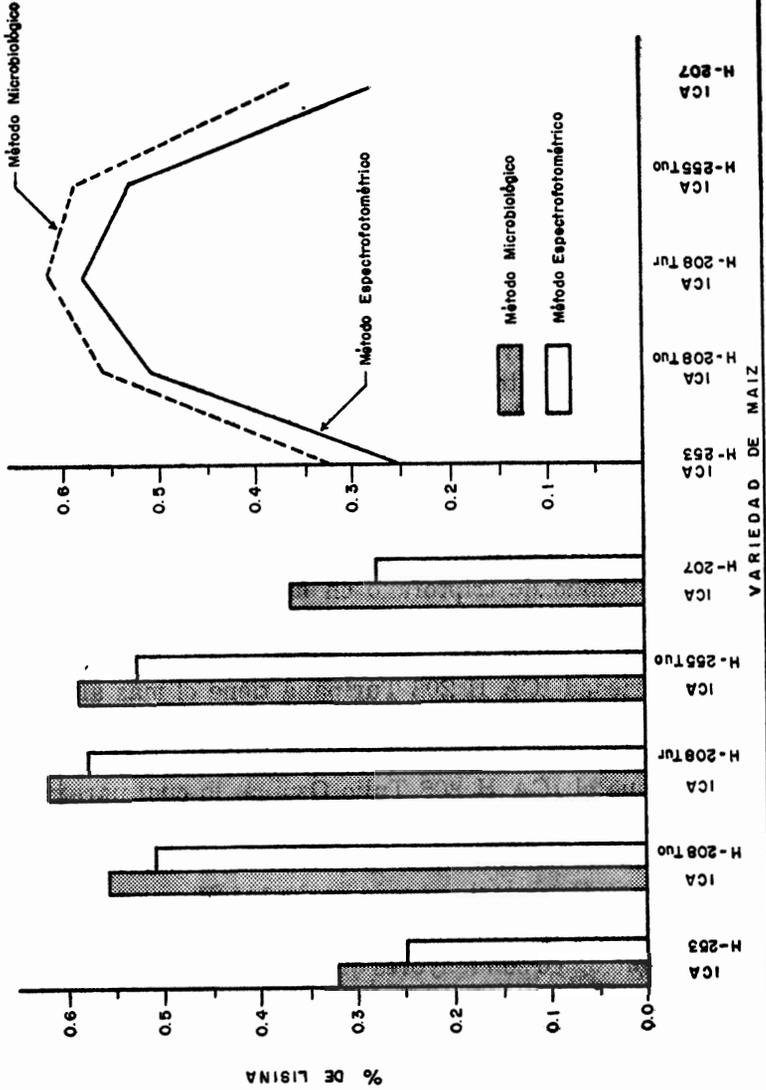
Variedad	Lisina en proteína g/100 g	Triptofano en proteína g/100 g
ICA H 208	4.84	1.10
T. Ospina		
ICA H 208	5.50	1.35
Turipaná		
ICA H 255	4.89	1.20
T. Ospina		
ICA H 207	3.50	0.87
ICA H 253	3.35	0.25

De acuerdo a los resultados anteriores podemos concluir que el contenido de lisina en proteína es mayor que el contenido de triptofano en proteína. Los contenidos de lisina y triptofano en proteína son mayores en las variedades de maíz opaco que en las variedades normales. La influencia del clima puede observarse también en los resultados pues presenta un mayor contenido de proteína el cultivado en clima más cálido el de Turipaná (ICA H 208).

Las Figuras números 1 y 2 presentan una comparación de los resultados de contenido de lisina y triptofano obtenidos por los métodos microbiológico y espectrofotométrico.

FIGURA Nº 1

COMPARACION DEL CONTENIDO DE LISINA EN DIFERENTES VARIETADES DE MAIZ

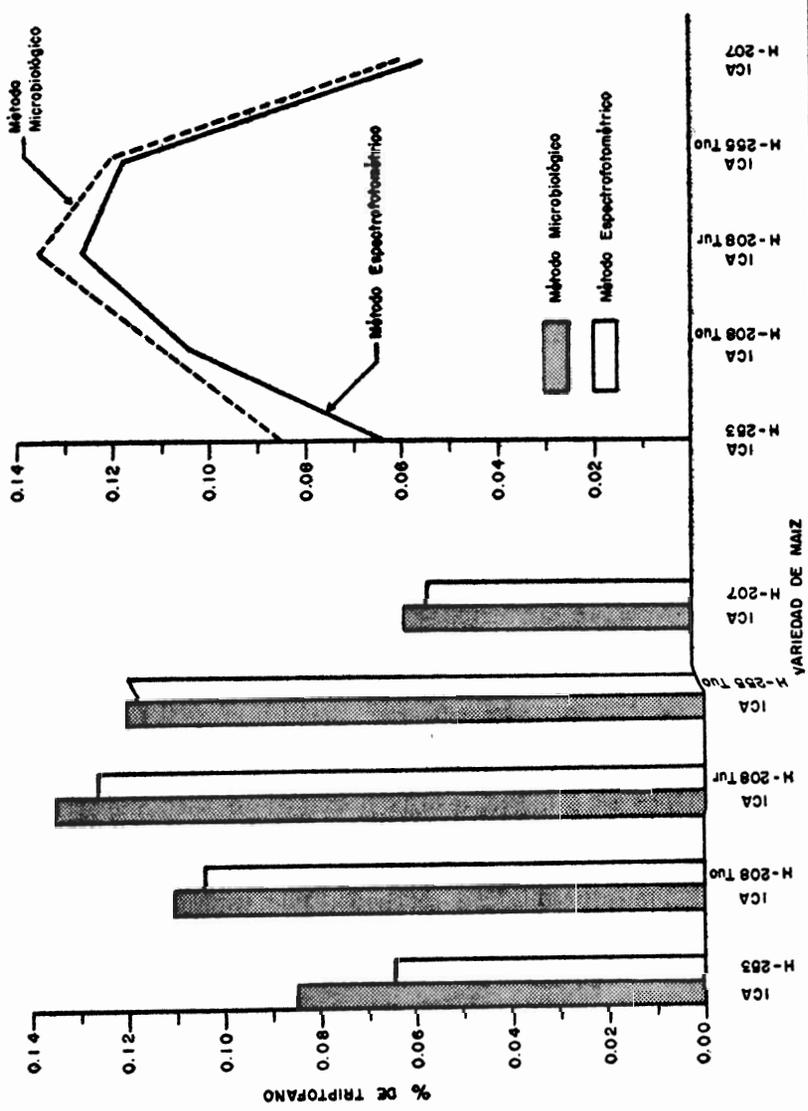


Combinando las conclusiones parciales incluidas en cada parte del trabajo podemos hacer las siguientes consideraciones:

1. El contenido de lisina es mayor en las variedades de maíz opaco que en las de maíz normal analizadas (Figura número 1).
2. La relación del contenido promedio de lisina en las variedades normales y en las variedades de maíz opaco es de 1:1,85.
3. La variedad ICA H 208 de Turipaná presenta el mayor contenido de lisina de las variedades cultivadas.
4. Entre los maíces opacos el ICA H 208 Turipaná tiene un 10,71% más que la variedad ICA H 208 Tulio Ospina, lo cual parece indicar que la variedad cultivada a mayor temperatura contiene más lisina.
5. Los valores del contenido de lisina por el método microbiológico son un poco mayores que los encontrados por el método espectrofotométrico. Esto podría indicar que el método biológico se acerca más al contenido real utilizable de lisina puesto que permite que el microorganismo utilice el aminoácido para su metabolismo.
6. Para trabajos de precisión se aconseja utilizar el método microbiológico y para trabajos de rutina se aconseja emplear el método espectrofotométrico.
7. El contenido de triptofano en las variedades de maíz opaco es mayor que el encontrado en las variedades normales analizadas (Figura número 2).
8. La variedad ICA H 208 Turipaná tiene el más alto contenido de triptofano.
9. La variedad ICA H 208 Turipaná tiene un 12,27% más de triptofano que el ICA H 208 Tulio Ospina, lo cual parece indicar que la mayor temperatura favorece la producción de triptofano.
10. La relación del contenido promedio de triptofano en las variedades de maíz normal y opaco es de 1:1,81.
11. Los valores de contenido de triptofano obtenidos por el método microbiológico son mayores que los obtenidos por el método espectrofotométrico. Esto puede deberse a la mayor sensibilidad del método biológico frente al método espectrofotométrico y hace al maíz opaco más importante desde el punto de vista nutricional.
12. Para trabajos de precisión se aconseja utilizar el método microbiológico, y para trabajos de rutina se aconseja el método espectrofotométrico.

FIGURA Nº 2

COMPARACION DEL CONTENIDO DE TRIPTOFANO EN DIFERENTES VARIETADES DE MAIZ



13. Se aconseja continuar el estudio del contenido de lisina y triptofano en distintas variedades de maíz opaco y el efecto que las condiciones ecológicas y genéticas puedan tener sobre el contenido de estos aminoácidos.
14. Se aconseja adelantar el estudio de estos aminoácidos en procesos de obtención de alimentos en los cuales se utiliza maíz opaco como materia prima.

RESUMEN

El trabajo presenta los resultados obtenidos en el análisis del contenido de lisina y triptofano en dos variedades de maíz normal y tres variedades de maíz opaco (gene opaco-2), utilizando un método espectrofotométrico y un método microbiológico. Se incluyen las características de las mazorcas y los análisis bromatológicos del maíz. Entre las variedades estudiadas la ICA H 208 presentó el más alto contenido de triptofano y lisina.

Los contenidos de lisina y triptofano encontrados por el método microbiológico fueron ligeramente mayores a los encontrados por el método espectrofotométrico.

Para trabajos de rutina se recomienda utilizar el método espectrofotométrico y para trabajos de precisión se recomienda utilizar el método microbiológico.

SUMMARY

This paper shows the results obtained in the determination of the lysine and triptophan contents in two varieties of normal corn and three varieties of opac corn (opaque gene-2), using a spectrophotometric and a microbiological methods. The ears characteristics and the bromatological analysis data are also included.

Amon the five varieties the ICA H 208 showed the highest lysine and tryptophan contents.

The amounts of lysine and tryptophan found by the microbiological method were slightly greater than those found by the spectrophotometrical method.

The spectrophotometrical method may be recommended for routine analysis and the microbiological method for precision analysis.

V — REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ARIAS, F. E. *Selección recurrente fenotípica por número de mazorcas y rendimientos por planta en un cruzamiento intervarietal de maíz*, Tesis de Grado, Instituto Tecnológico Agrícola, Pasto, 1970.
2. PINSTROP, P. A. *La factibilidad de introducir maíz opaco-2 para el consumo humano en Colombia*, Centro Internacional de Agricultura Tropical, folleto técnico N° 1, mayo 1, 1971.
3. CHACÓN, M. I., MIRANDA, S. *Contenido de triptófano, metionina, treonina y lisina aprovechable de diversas variedades de maíces híbridos comerciales chilenos*, Anales de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de Chile, 20, 1971.
4. BERCAW, L. O., HANNAY, A. M. y col. *Corn in the development of the civilization of the Americas*, A selected and Annotated Bibliography, U. S. Dept. Agr. Bul, 87, 1940.
5. EMERSON, R. A., BEADLE, G. W. y col. *A summary of linkage studies in maize*, Cornell Agr. Exp. Sta. Men., 160, 1935.
6. HAYER, H. K., IMMER, F. R. y col. *Methods of plant breeding*, McGraw-Hill, 1955.
7. RHOADES, M. M. *The cytogenetics of maize*, Corn and corn improvement, Academic Press, 1955.
8. HOPKINS, G., SMITH, L. H. y col. *The structure of the corn kernel and the composition of its different parts*, Agr. Exp. Sta. Bul. 87-1907, Directions for the breeding of corn, including methods for the prevention of inbreeding, Agr. Exp. Sta. Bul., 100.
9. WINTON, A. L., WINTON, K. B. *The structure and composition of foods*, 1, 74, 1932.
10. HERRERA, H. y col. *Análisis químicos bromatológicos de algunas materias primas colombianas empleadas en nutrición animal*, ICA, 1970.
11. TKACHUK, R. y col. *Aminoacid composition of cereal and oil seed meals*, Cereal Chem., 46, 206, 1969.
12. TELLO, N., ALVAREZ, N. *A study on the improvement of the aminoacid balance of corn protein*, Cereal Chem., 42, 468, 1965.
13. Instituto Nacional de Nutrición, *Tabla de composición de alimentos colombianos*, 3ª edición, 57, 1967.
14. FLYNN, L. M. *Relation between protein content of corn and concentration of aminoacids and nicotinic acid*, Cereal Chem., 31, 217, 1954.
15. BLESSIN, J. A. y col. *Carotenoids of corn and sorghum*, Determination of Xanthophylls and carotenes in corn gluten fractions, Cereal Chem., 41, 543, 1964.
16. HARRAR, J. C. *Food for the future*, Sci., 122, (3164), 313-316, 1930.
17. CASSALET, C. *Aspectos agronómicos del maíz opaco*, Primer Seminario Nacional de Maíz Opaco, Bogotá, D. E., octubre, 1970.

18. OSBORNE, T. B., MENDELL, L. B. *Aminoacid in nutrition and growth*, J. Biol. Chem., 17, 325-349, 1914.
19. EMERSON, R. A., BEADLE, G. W. y col. *A summary of linkage studies in maize*. Cornell Univ. Agro. Expt. Sta. Ment., N° 180, 1935.
20. MERTZ, E. T., BATES, L. S. y col. *Mutant gene that changes protein composition and increase lisine content of maiz endosperm*. Science, 145, 279-280, 1954.
21. NELSON, O. E., MERTZ, E. T. y col. *Second mutant gene affecting the aminoacid pattern of maize endosperm proteins*. Science, 150, 1469, 1965.
22. HOGAN, A. G. *Corn as source of protein and for growing animals*. Jour. Biol. Chem., 17, 325-349, 1917.
23. CASSALETTI, C. *Conceptos agronómicos del maíz opaco*, I Seminario Nacional del maíz opaco, Bogotá, 1970.
24. PINTRUP, P. *Maíz opaco en Colombia*, Ciat. Folleto técnico N° 1, 21, 1971.
25. CONRAD, J. H. *Review of non-ruminant papers presented at annual meeting of the American Society of Animal Science*, Feedstuff, 40, 14, 1968.
26. FROST, H. C. *High lysine corn and CPC International*. Paper presented at Funk Bros, Seed Co. & CPC. International Symposium on high lysine corn. Cedar Rapids, Iowa, may 6-7, 1969.
27. MERTZ, E. T. *Chemical and nutritional properties of high lysine corn*. Paper presented at Funk Bros, Seed Co. and CPC International Symposium on high lysine corn. Cedar rapids, Iowa, may 6-7, 1969.
28. MERTZ, E. T., NELSON, O. E. *Opaque-2 maize: A new source of high quality protein*, Poultry and Livestock Comment, 23 (1), 1-3, 1966.
29. MERTZ, E. T. *Proc. of the high lisyne corn conference*, Corn Industries Foundation, pp 12-18, june 21, 1966.
30. BRESSANI, R. *Proc. of the high lisyne corn conference*, Corn Industries Foundation, pp 34-39, june 21, 1966.
31. BRESSANI, R., ALVARADO, J. y col. *Evaluación en niños de la calidad de la proteína de maíz opaco-2*, Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Aceptado para publicación. Nutr., 19, 129, 1969.
32. PRADILLA, A. G., HARPSTEAD, D. y col. *Ensayos analíticos y biológicos de la proteína de maíz modificada por el gene opaco-2*, Antioquia médica, 19, 201, 1966.
33. MANNER, J. H., POND, W. C. y col. *Nutritive value of Colombian Flury-2 vs. Colombian opaque-2 and normal corn for rats and swive*. Animal science.
34. MERTZ, E. T., NELSON, O. E. *Proceedings of the lysine corn*, june 21-22, 1966.
35. GÓMEZ, L. M., PRADILLA, F. A. *Manuscrito en preparación*.
36. BRESSANI, R. *Protein quality of opaque-2 maize in children*. Proc. high lysine corn Conf., Purdue University, Lafayette, Ind., june, 1966. Washington, D. C., Corn Refiners Assoc. Inc. 1966.
37. CLARK, H. E. *Opaque-2 corns as a source of protein for adult human subjects*. Proc. high lysine corn Conf., Purdue Univ., Lafayette, Ind., june 1966. Wash-

- ington, D. C., Corn Refiners Assoc., Inc. 1966, pp 40, Protein Advisory Group (WHO/FAO/UNICEF) Nutr. Doc. R. 10/Add. 107, august, 1966.
38. CLARK, H. E., ALLEN, P. E. *Nitrogen balances of adults consuming opaque-2 Maize protein*. Am. J. Clin. Nutr., 20, (8), 825, 1967.
39. CLARK, H. E. *Meeting protein requirements of man*, J. Am. Dietet. Assoc., 52, (6), 475, 1967.
40. PRADILLA, A. *Feeding of opaque-2 corn to malnourished children*. Paper presented at the American Society of Agronomy Meeting, nov. 10, 1968.
41. BRESSANI, R., ELÍAS, L. G. *Protein quality of opaque-2 corn evaluation-in-rats*, J. Nutr., 97, 173, 1969.
42. *Official methods of analysis*. Association of Official Agricultural Chemistry. Edit. Board Washington, D. C., 9th ed.
43. WINTON, A., WINTON, K. *The analysis of foods*, 1th ed. John Willey and Sons, Inc. New York, 1945.
44. BARTON, E. C. *The microbiological assay of the vitamin B, complex and aminoacid*. Edit. Pitman Publishing Corporation, New York, 121, 1969.
45. SPIES, J. R., CHAMBERS, D. *Chemical determination of tryptophan*, Anal. Chem., 20, 30, 1948.
46. SPIES, J. R. *Chemical determinations of tryptophan in proteins*, Anal. Chem., 21, 1249, 1949.
47. SPIES, J. R. *Determination of tryptophan in maize*, J. Agric. Fd. Chem., 16, 514, 1968.
48. OPIENSKA-BLAUTH, J. *References M. Charezynski and H. Berbec*. Anal. Biochem., 6, 69, 1963.
49. MERTZ, E. T., BRESSANI, R. *Studies on corn proteins*, Cereal Chemistry, 34, 63, 1957.
50. BATES, L. S. *Proceedings of the high lysine corn conference*, Purdue University, p. 61, june 21-22, 1966.
51. HERNÁNDEZ, H., BATES, L. S. *A modified method for rapid tryptophan analysis of maize*, Research Bulletin N° 13, may, 1969. Centro Internacional de mejoramiento de maíz y trigo, CIMMYT, Méjico.
52. SANGER, F. *Biochem., J.* 39, 507, 1945.
53. PORTER, R. R., SANGER, F. J., *Biochem.*, 42, 287, 1948.
54. MASSEY, V., HARTLEY, B. S. *Biochem. Biophys. Acta* 20, 361, 1956.
55. BLASS, J., RAYMOND, M. *Soc. Chem. Biol.*, 42, 491, 1960.
56. CARPENTER, K. J. *J. Biochem.*, 77, 604, 1960.
57. BOYNE, H. W., CARPENTER, K. J. A. A. J., *Soc. Food Agr.*, 12, 832, 1961.
58. CARPENTER, K. J., MARCH, B. E. *Brit Nutr.*, 15, 403, 1961.
59. LAKADE, M. L., EVANS, R. J. *Can. J. Biochem.*, 44, 648, 1966.
60. BOCTOR, A. M., HANPER, A. E. *J. Nutr.*, 94, 259, 1968.
61. OKUYAMA, T., SATAKE, K. *J. Biochem.*, 47, 454, 1960.
62. SATAKE, K., OKUYAMA, T. y col. *J. Biochem.*, 47, 654, 1960.
63. KOTAKY, A., SATAKE, K. *J. Biochem.*, 56, 299, 1964.
64. HABEED, A. F. *Anal. Biochem.*, 14, 328, 1966.
65. HAYNES, R., OSUGA, D. T. y col. *Biochemistry*, 6, 541, 1967.
66. MOKRASCH, L. C. *Anal. Biochem.*, 18, 64, 1967.