

# Métodos Químicos Usados en el CIMMYT para Determinar la Calidad de Proteína de los Cereales

*Evangelina Villegas, Enrique Ortega y Reinald Bauer*



CENTRO INTERNACIONAL DE MEJORAMIENTO DE MAIZ Y TRIGO  
INTERNATIONAL MAIZE AND WHEAT IMPROVEMENT CENTER  
Londres 40 Apartado Postal 6-641 06600 México, D.F., México

# **Métodos Químicos Usados en el CIMMYT para Determinar la Calidad de Proteína de los Cereales**

*Evangelina Villegas\*, Enrique Ortega\* y Reinald Bauer\**



*\* Laboratorio de Calidad de Proteínas, Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo*

# Contenido

## Página

- 2 Introducción
- 3 Preparación de Muestras para Análisis de Endospermo
- 5 Determinación del Contenido de Nitrógeno Total por el Método de Micro-Kjeldahl
- 7 Determinación del Nitrógeno Total Utilizando el Autonalizador de Technicon
- 12 Determinación de Triptófano
- 15 Determinación de Lisina
- 19 Método de Capacidad de Ligamento del Colorante para Determinar la Calidad de Proteína en Maíz, Cebada y Triticale
- 22 Determinación de Zeína en Maíz
- 25 Prueba de Ninhidrina para Determinar Aminoácidos Libres en Maíz Harinoso— Opaco-2
- 27 Uso del Analizador de Aminoácidos
- 31 Fraccionamiento de Proteínas

## **Introducción**

El objetivo primordial de esta publicación es describir la metodología utilizada en el Laboratorio de Calidad de Proteínas del CIMMYT durante el desarrollo de maíz de alta calidad proteínica (maíz con el gene opaco-2) y en la selección de líneas de triticale y cebada con superior calidad nutricional. Dentro de las técnicas delineadas aquí se incluyen: a) pruebas preliminares rápidas (determinación de tritofano en endospermo de maíz, método de la capacidad de ligamento del colorante "DBC" en triticale y cebada, y determinación de nitrógeno total); b) pruebas específicas para fracciones proteínicas en el endospermo de maíz (método de zeína) y para detectar la presencia del gene opaco-2 en maíces harinosos (prueba de ninhidrina); c) análisis más elaborados como el método colorimétrico para determinar el contenido de lisina, el fraccionamiento de las proteínas del endospermo de maíz y la obtención de aminogramas completos mediante el analizador de aminoácidos.

## Preparación de Muestras para Análisis de Endospermo



**Eliminación de pericarpio y germen del grano de maíz para una muestra de endospermo.**

Para identificar rápidamente los materiales de maíz que contienen proteína de calidad superior, se recomienda analizar el endospermo de la muestra. Generalmente, la proteína del endospermo de maíz es deficiente en los aminoácidos lisina y triptofano, mientras que el germen tiene una composición relativamente constante y bien balanceada de aminoácidos, independientemente de su genealogía.

Cuando se analiza el grano completo, el pericarpio puede contener pigmentos que interfieren con las determinaciones colorimétricas, por lo tanto, para un análisis del grano completo se debe utilizar otro tipo de análisis, en particular el método de capacidad de ligamento del colorante (DBC) para obtener el índice de calidad (IC) de la proteína.

### Evaluación de familias genéticas de maíz

1. Tomar de 10 a 20 granos al azar, como representativos de cada mazorca.
2. Lavar cualquier vestigio de insecticida con agua destilada, si las semillas han sido tratadas.

3. Para el análisis del endospermo: remojar las semillas de 20 a 30 minutos; eliminar con pinzas y bisturí el pericarpio y el germen; y dejar secar el endospermo durante la noche.
4. Moler cada muestra, sea de endospermo o de grano completo, a través de una malla de 0.5 mm en el molino.
5. Desengrasar las muestras de endospermo con hexano en un extractor continuo tipo Soxhlet durante 4 horas y dejarlas secar al aire.

#### **Cereales de grano pequeño**

Si las muestras han sido tratadas se deberá eliminar el insecticida con agua destilada y dejarlas secar. Molerlas igual que en el caso de maíz.

## Determinación del Contenido de Nitrogeno Total por el Método de Micro-Kjeldahl



Destilación por arrastre de vapor y titulación del amonio.

El contenido de nitrógeno puede evaluarse mediante el método de micro-Kjeldahl<sup>1</sup> y el porcentaje de la proteína se calcula usando el factor de conversión 6.25 en caso de maíz, 5.83 para trigo y triticale.

### Equipo

1. Balanza analítica.
2. Matraces digestores de 30 ml.
3. Unidad digestora de micro-Kjeldahl.
4. Unidad destiladora de micro-Kjeldahl.
5. Autotransformador, variación de 0 a 140 voltios, Powerstat.\*
6. Matraz Erlenmeyer de 125 ml.
7. Microbureta de 5 ml.
8. Material de vidrio (pipetas, vasos, etc.)

\* La mención de una rama o producto específico comercial no implica, para el CIMMYT, la exclusión de otros que pueden resultar apropiados.

## Reactivos

1. Acido sulfúrico concentrado (98%);  $\sigma = 1.84$ , libre de nitrógeno.
2. Mezcla de catalizadores: 99.0 g de  $K_2SO_4$ ; 4.1 g de  $HgO$  y 0.8 g de  $CuSO_4$ , o pastillas de catalizador (7.5 mg Se + 1.5 g  $K_2SO_4$ ).
3. Solución de hidróxido de sodio-tiosulfato de sodio. Disolver 50 g de  $NaOH$  y 5 g de  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  en agua destilada y diluir a 100 ml.
4. Solución de ácido bórico al 4%.
5. Solución indicadora de rojo de metilo en verde de bromocresol (una parte de solución etanólica de rojo de metilo al 0.2% con 5 partes de solución etanólica de verde de bromocresol al 0.2%).
6. Solución de ácido clorhídrico 0.02N.
7. Peróxido de hidrógeno al 30%.

## Procedimiento

1. Pesar de 30 a 40 mg de muestra en un matraz de digestión. Añadir 1.5 g de la mezcla de catalizadores, o una pastilla catalizadora comercial, 2 ml de ácido sulfúrico concentrado y 2 ml de peróxido de hidrógeno al 30%.
2. Digerir durante 30 minutos, enfriar y añadir la mínima cantidad posible de agua destilada para disolver los sólidos formados. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
3. Transferir esta solución al aparato de destilación, asegurándose que no queda nada en el matraz lavándolo de 5 a 6 veces con 1 a 2 ml. de agua destilada.
4. Poner un matraz Erlenmeyer de 125 ml con 6 ml de solución de ácido bórico y 3 gotas de solución indicadora debajo del condensador, cuya terminal deberá quedar dentro de la solución.
5. Añadir al aparato de destilación 8 ml de solución de hidróxido de sodio-tiosulfato de sodio, y destilar hasta obtener 50 ml del destilado.
6. Titular con HCl hasta llegar al punto gris o la primera apariencia del color violeta.
7. Efectuar la determinación de un blanco, usando la misma cantidad de reactivos y el mismo proceso de digestión, destilación y titulación que para la determinación de la muestra.
8. Calcular el por ciento de nitrógeno.

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(\text{ml HCl en muestra} - \text{ml blanco}) \times \text{normalidad HCl} \times 14.007 \times 100}{\text{mg de muestra}}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ de N} \times \text{factor de conversión correspondiente}$$

## Referencias

1. A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 13th Ed. Pág. 858. 1980.



## Determinación del Nitrógeno Total Utilizando el Autoanalizador de Technicon

La determinación cuantitativa del nitrógeno total en granos de cereales involucra una digestión de la materia orgánica, para convertir el nitrógeno a la forma de amonio para el posterior análisis colorimétrico.

El amonio se puede determinar colorimétricamente, debido a la formación de un complejo fenólico azul, producto de la reacción en medio alcalino del sulfato ácido de amonio con el fenol y el hipoclorito.

### Equipo

1. Balanza analítica.
2. Tubos digestores de 17 x 150 mm, de 75 ml.
3. Jeringa automática de 2 ml.
4. Gradillas para digestión con capacidad de cuarenta tubos.
5. Digestores con capacidad de cuarenta tubos.
6. Reguladores de voltaje para mantener los digestores a temperatura constante de  $370 \pm 2^\circ\text{C}$ .
7. Agitador de tubos.
8. Autoanalizador, con los siguientes módulos:

- a) Muestreador. Tiene una pipeta automática que succiona alícuotas de la muestra a intervalos regulares, y un disco de cuarenta posiciones para soluciones digeridas. Las muestras se pueden analizar con un promedio de 50 por hora.
- b) Bomba de Aprovechamiento. La bomba es la base de todo el sistema autoanalizador y consta de una serie de rodillos de velocidad uniforme con capacidad de succión para los siete tubos calibrados con flujo. Estos tubos son de plástico, con marcas de colores en los extremos que indican su diámetro interno (D.I.) en pulgadas:

1)	Violeta	Drenaje (0.110 D.I.)	Blanco
----	---------	----------------------	--------

Para el lavado de la pipeta automática:

2)	Verde	Solución lavadora (0.073 D.I.)	Verde
----	-------	--------------------------------	-------

Para el baño de reacción:

3)	Verde	Hipoclorito de sodio (0.073 D.I.)	Verde
4)	Amarillo	Fenato de sodio diluido (0.056 D.I.)	Amarillo
5)	Azul	Hidróxido de sodio-EDTA (0.065 D.I.)	Azul
6)	Amarillo	Muestra (0.056 D.I.)	Amarillo
7)	Negro	Aire (0.090 D.I.)	Violeta

←————— Flujo —————→

- c) Baño de reacción. Las tuberías del 3 al 7 llegan a la cámara de reacción regulada por un termostato (conectada al regulador de voltaje) que mantiene una temperatura constante de  $38 \pm 1^\circ\text{C}$ . Esta cámara ha sido adaptada a las necesidades del laboratorio con una cubierta compuesta por dos bandejas de aluminio, y en su interior se encuentran tres focos de 10 watts, serpentines de vidrio de diferentes longitudes y termostato.
- d) Colorímetro. Consta de un sistema de flujo continuo y dos filtros rojos de 630 nm.
- e) Graficador. Recibe la señal del fotocolorímetro y registra el porcentaje de transmitancia de las muestras.

Todos los módulos descritos anteriormente están conectados a un regulador de voltaje, y éste a su vez a una línea de corriente alterna regulada a 110-115 voltios.

### Reactivos

1. Pastillas de catalizador comercial (7.5 mg Se + 1.5g K<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>).
2. Acido sulfúrico concentrado (98%).
3. Fenol alcalino (fenato de sodio concentrado):
  - a) Fenol: Disolver 243g de fenol en 33 ml de agua destilada en caliente y mediante agitación magnética.
  - b) Solución de hidróxido de sodio al 40% (200 g de hidróxido de sodio en 500 ml de agua destilada).
  - c) Utilizar un embudo de separación y agregar el fenol lentamente a la solución de hidróxido de sodio en un vaso de precipitados en baño de hielo y con agitación magnética constante.  
Nota: Guardar en un recipiente de polietileno oscuro.
4. Diluir fenato de sodio: Preparar una solución de 1:1 de fenato de sodio concentrado y agua destilada (prepararse el día que se va a utilizar, empleando un recipiente ambar).
5. Hidróxido de sodio-EDTA (200 g de hidróxido de sodio + 30 g de EDTA en un litro de agua destilada).
6. Hipoclorito de sodio al 13% con agua destilada. Se utiliza blanqueador comercial y como su potencia puede variar es necesario probar su concentración.
7. Solución de detergente orgánico (Brij) al 50% con agua destilada.
8. Solución lavadora: ácido sulfúrico 1.5 N más solución Brij 0.2% (125 ml de ácido sulfúrico concentrado y 6 ml de detergente orgánico al 50% en 3 litros de agua destilada).
9. Solución patrón de sulfato de amonio. Concentración: 1 mg N por ml.

10. Blanco de reactivos: En cada uno de los dos matraces de macro-Kjeldahl a utilizar se agregan 7 pastillas catalizadoras, 17 ml de ácido sulfúrico concentrado y 83 ml de agua destilada. Digerir durante 30 minutos aproximadamente; enfriar hasta llegar a una temperatura ambiente y preparar un litro utilizando la solución digerida de ambos matraces y agua destilada.
11. La curva de calibración se prepara de la siguiente manera:

Solución patrón (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 mg N por ml		Concentración de N (µg por ml)
0.0 ml	diluir a 250 ml con blanco de reactivo	0
0.2 ml	diluir a 100 ml con blanco de reactivo	2
0.4 ml	diluir a 100 ml con blanco de reactivo	4
0.6 ml	diluir a 100 ml con blanco de reactivo	6
0.8 ml	diluir a 100 ml con blanco de reactivo	8
1.0 ml	diluir a 100 ml con blanco de reactivo	10
1.2 ml	diluir a 100 ml con blanco de reactivo	12
1.4 ml	diluir a 100 ml con blanco de reactivo	14

### Procedimiento

#### Digestión de la muestra:

1. Se pesa la muestra en una bandejita de aluminio y se transfiere a un tubo de digestión. La cantidad de la muestra variará según su contenido de nitrógeno.
 

Maíz-endospermo	40 a 45 mg
Maíz-grano completo	30 a 35 mg
Trigo, triticale y cebada	30 a 35 mg
2. Se agrega una pastilla catalizadora y 2.5 ml de ácido sulfúrico concentrado, asegúrese de arrastrar todo el material al tubo digestor.
3. Se lleva a cabo la digestión durante 60 minutos a 370°C, con los tubos dentro de una campana de extracción. El tiempo de la digestión puede reducirse a 30 minutos agregando 2.0 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%.
4. Diluir la muestra digerida a 75 ml con agua destilada, mezclando hasta obtener una solución homogénea. Transferir una alícuota de esta solución en un tubo de ensayo para la determinación colorimétrica de nitrógeno.

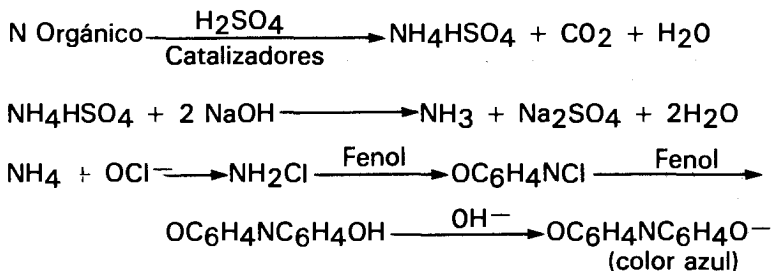
**Operación del aparato:**

1. Encender el autoanalizador una hora antes de utilizarlo, accionando el regulador del baño de reacción, el fotocolorímetro, y el graficador.
2. Se recomienda preparar la solución de fenato de sodio diariamente y filtrar las soluciones de hipoclorito de sodio y de hidróxido de sodio - EDTA.
3. A los 30 minutos de haber encendido el autoanalizador se colocan las tuberías en sus respectivos recipientes y se agregan los reactivos accionando la bomba de aprovisionamiento para eliminar el aire presente en las tuberías y establecer un flujo continuo en todo el sistema.
4. El graficador se pone a funcionar 20 minutos después de encendida la bomba de aprovisionamiento. Es necesario ajustar el graficador a cero y a  $99.5\% \pm 0.5$  del por ciento de transmitancia que muestra el fotocolorímetro.
5. Conectar el muestreador, para comenzar el análisis.



**Módulos del autoanalizador trabajando en forma sincronizada.**

Se puede mostrar el proceso completo mediante las siguientes reacciones:



### Cálculos:

Para obtener el por ciento de nitrógeno de la muestra se restan las lecturas de transmitancia de las lecturas de los blancos y la diferencia se multiplica por el factor obtenido en la curva de calibración. El resultado se divide entre el peso de la muestra en mg. Cada muestra es analizada en duplicado con una variación máxima aceptada de 0.08% de nitrógeno.

Esto se puede ver en la siguiente ecuación:

$$\%N = \frac{F (B - M)}{\text{mg de muestra}}$$

$$F = \text{Factor} = (\text{Relación de escala}) (\text{Dilución}) \frac{\text{Base de la curva}}{\text{Altura de la curva}}$$

B = Por ciento de la transmitancia del blanco

M = Por ciento de la transmitancia de la muestra

Para calcular el porcentaje de la proteína, se multiplica el % de nitrógeno por los siguientes factores:

Maíz y sorgo	6.25
Trigo, cebada y triticale	5.83

### Referencias

1. Ferrari, A., E. Catanzaro y F. Russo-Alesi. Nitrogen analysis by a continuous digestion system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 130:602-620. 1965.
2. Hofstader, R.A. Application of an autoanalyzer to the automation of some microchemical determinations. *Microchemical Journal* 10:444-445: 1966.

## Determinación de Triptofano



**Transferencia de una alícuota de hidrolizado para la determinación colorimétrica de triptofano.**

La lisina y el triptofano son dos aminoácidos esenciales que limitan el valor nutricional de la proteína del endospermo del maíz. Debido a la relación observada entre el contenido de estos dos aminoácidos en la proteína del endospermo del maíz opaco-2 (aprox. de 4 a 1)<sup>1</sup>, el contenido de triptofano se puede usar como parámetro para evaluar la calidad nutricional de esta proteína.

Varios métodos analíticos para la determinación del contenido de triptofano en las áreas de cromatografía de intercambio iónico, espectrofotometría y microbiología han sido estudiados de forma intensiva y se ha encontrado que son complicados y laboriosos, y por lo tanto inadecuados para evaluar gran número de muestras.

En el Laboratorio de Calidad de Proteínas del CIMMYT, se ha utilizado por varios años el método colorimétrico de Opienska-Blauth *et al* <sup>2</sup> modificado por Hernández y Bates.<sup>1</sup> Este método se basa en la reacción de Hopkins-Cole por medio de la cual, una molécula de ácido glioxílico y dos de triptofano forman un complejo colorido con un máximo de absorción de 560 nm. Utilizando este método se pueden analizar hasta 160 muestras por duplicado al día, satisfaciendo las necesidades del programa de mejoramiento de maíz.

### Equipo

1. Balanza analítica.
2. Estufa incubadora.
3. Agitador de tubos.
4. Jeringas automáticas de 5 ml.
5. Gradillas para 40 tubos.
6. Pipetas volumétricas de 1 ml y 3 ml.
7. Matraz aforado de 1 l.
8. Matraz Erlenmeyer de 1 l.
9. Tubos de ensayo de 13 x 100 mm con tapón de rosca.
10. Tubos de ensayo 16 x 150 mm.
11. Tubos de colorímetro calibrados.
12. Espectrofotómetro o colorímetro.
13. Potenciómetro.
14. Probetas graduadas de 1 l.
15. Centrifuga.

### Reactivos

1. Se disuelve 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). A cada frasco de ácido acético se debe hacer una prueba de desarrollo de color en presencia de triptofano, dado que algunos lotes de ácido acético libre de aldehídos no producen ácido glioxílico suficiente para reaccionar con el triptofano y formar un producto colorido. Este problema se ha solucionado en algunas ocasiones agregando de 2 a 4% de anhídrido acético; concentraciones más altas de anhídrido acético inhiben el desarrollo de color.<sup>3</sup>
2. Solución de ácido sulfúrico 30 N (Reactivo B). Mezclar los reactivos A y B volumen a volumen, aproximadamente una hora antes de utilizarlo. Esta solución contiene ácido glioxílico que generalmente se encuentra como impureza del ácido acético, y se forma también mezclando ácido acético conteniendo cloruro férrico con ácido sulfúrico. Este ácido glioxílico en presencia de triptofano (grupo indólico) produce un compuesto coloreado.

3. Solución de papaína. Disolver la enzima grado comercial en solución reguladora de acetato de sodio 0.1 N (4mg por ml), pH 7.0. Esta solución debe ser preparada unos minutos antes de uso.
4. Solución estándar de triptofano de 100  $\mu$ g/ml (para la preparación de la curva estándar).

### Procedimiento

1. Pesar entre 80-85 mg de cada muestra de endospermo de maíz desengrasada y pulverizada en un tubo de ensayo de 10 x 13 mm con tapón de rosca, y añadir 3 ml de solución de papaína. Agitar cuidadosamente los tubos asegurándose que la muestra quede totalmente mojada. Incluir dos tubos con solución de papaína para utilizarlos como blancos a través del procedimiento. Se incluyen en cada gradilla de 40 tubos dos muestras testigo en cantidad conocida de triptofano.
2. Colocar las muestras en una incubadora a  $63 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante 16 horas (en la noche).
3. Las muestras hidrolizadas se sacan de la estufa, se agitan, se dejan enfriar a temperatura ambiente ( $21-25^\circ\text{C}$ ) y se centrifugan a 2,500 rpm durante 5 minutos.
4. Se transfiere 1 ml del hidrolizado en tubos de ensayo con 4 ml de Reactivo C. Se agitan los tubos vigorosamente y se incuban a  $63 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 15 min, para máximo desarrollo del color.
5. Dejar enfriar las soluciones coloreadas y transferirlas a tubos calibrados. Leer la densidad óptica de las soluciones en un fotocolorímetro a 560 nm.
6. Preparar una curva estándar de triptofano con un rango de concentración de 0 a 35  $\mu$ g por ml.
7. El contenido de triptofano en la muestra se calcula a partir de la curva estándar y se reporta como gramos de triptofano en 100 gramos de proteína. El valor del por ciento de proteína de cada muestra se obtiene multiplicando el por ciento de nitrógeno obtenido previamente por el factor de 6.25.

### Referencias

1. Hernández, H. H. y L. S. Bates. "A modified method for rapid tryptophan analysis in maize". CIMMYT Research Bulletin No. 13, May 1969.
2. Opienska-Blauth, J., M. Charenzinski, y H. Berbec. "A new rapid method of determining tryptophan". Rep. Analytical Biochemistry 6:69. 1963.
3. Dalby, A. y C. Y. Tsai. Acetic anhydride requirement in the colorimetric determination of tryptophan. Anal. Biochem. 63:283-285. 1975.



## Determinación de Lisina



Extracción con acetato de etilo de los compuestos que interfieren en la determinación del  $\epsilon$ -dinitropiridil lisina.

Una limitante en la determinación de lisina en la proteína de los granos de cereales en programas de fitomejoramiento ha sido la falta de técnicas confiables que sean rápidas, reproducibles y de un costo relativamente moderado. Después de evaluar las ventajas y desventajas de varios métodos colorimétricos, el laboratorio del CIMMYT adoptó el método de Tsai, *et al*<sup>1</sup>, y modificado por Villegas<sup>2</sup>, para determinar el contenido de lisina en maíz. Con este método se pueden analizar hasta 60 muestras por duplicado al día.

Este método utiliza el compuesto 2-cloro-3, 5-dinitropiridina, que reacciona con el grupo  $\epsilon$ -amino de lisina, después de haber bloqueado con cobre los grupos  $\alpha$ -amino de los aminoácidos y de los péptidos de bajo peso molecular presentes en el hidrolizado proteínico. El  $\epsilon$ -dinitropiridil lisina formado es soluble en agua pero insoluble en acetato de etilo, lo que permite que los demás compuestos formados durante la reacción sean eliminados con ese solvente, suprimiendo también el exceso del reactivo 2-cloro-3, 5-dinitropiridina. La absorbancia de la solución acuosa de  $\epsilon$ -dinitropiridil-lisina se lee en un fotocolorímetro a 390 nm.

La determinación de lisina solamente se hace en aquellos materiales que se han seleccionado coloriméricamente porque presentan altos niveles de triptofano, o cuando se ha evaluado indirectamente el índice de calidad de la proteína ( $IC = DBC/\% \text{ Proteína}$ ) en muestras de grano completo de maíz. Este método, como otros métodos colorimétricos, puede ser aplicado con buenos resultados en maíces no pigmentados.

### Equipo

1. Balanza analítica.
2. Estufa incubadora.
3. Agitador de tubos.
4. Centrífuga.
5. Potenciómetro.
6. Colorímetro.
7. Gradillas para 40 tubos.
8. Tubos de colorímetro calibrados.
9. Tubos de ensayo 13 x 100 mm con tapón de rosca.
10. Tubos de ensayo de 16 x 150 mm.
11. Jeringa automática de 50 ml con tubo de polietileno.
12. Material de vidrio (pipetas, vasos, etc.)

### Reactivos

1. Solución de papaína: 4 mg de papaína por ml de solución reguladora de fosfato 0.03M con pH 7.4.
2. Solución reguladora de carbonato 0.05 M con pH 9.0.
3. Solución reguladora de boratos 0.05 M con pH 9.0.
4. Suspensión de fosfato de cobre:  
 Disolver 2.8 g de  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  en 100 ml de agua destilada (Reactivo A).  
 Disolver 13.6 g de  $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$  en 200 ml de agua destilada (Reactivo B).  
 Mezclar los reactivos A y B; centrifugar a 2,000 rpm durante 5 minutos y descartar el sobrenadante. El precipitado se lava 3 veces con 15 ml de solución reguladora de borato y al final se resuspende en 80 ml de solución reguladora. Este reactivo puede ser usado durante una semana.
5. Solución HCl, 1.2 N.
6. Mezcla de aminoácidos.

Cistina	20 mg	Fenilalanina	40 mg
Metionina	20 mg	Valina	40 mg
Histidina	30 mg	Arginina	50 mg
Alanina	30 mg	Serina	50 mg
Isoleucina	30 mg	Acido aspártico	60 mg
Treonina	30 mg	Acido glutámico	300 mg
Tirosina	30 mg	Leucina	80 mg
Glicina	40 mg	Prolina	20 mg

Disolver 100 mg de la mezcla de aminoácidos en 10 ml de solución reguladora de carbonato.

7. Solución al 3% en metanol de 2-cloro-3, 5-dinitropiridina (prepararla minutos antes de usarla).

### **Procedimiento**

1. Pesarse 100 mg de muestra pulverizada y desengrasada en un tubo de ensayo y adicionar 5 ml de solución de papaína. Asegurarse de que la muestra esté completamente mojada y agitar 2 veces durante la primera hora de incubación. Incluir blanco con solución de papaína.
2. Incubar a  $63 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 16 horas. Agitar y enfriar a temperatura ambiente, centrifugar a 2,500 rpm durante 5 minutos (una alícuota de este hidrolizado puede usarse también para la determinación de triptofano).
3. Transferir una alícuota de 1 ml del supernadante en tubos de centrifuga y añadir 0.5 ml de solución reguladora de carbonato y 0.5 ml de suspensión de fosfato de cobre.
4. Agitar la mezcla durante 5 minutos y centrifugar.
5. Transferir una alícuota de 1 ml del sobrenadante en un tubo de ensayo y añadir 0.1 ml de solución de 2-cloro-3, 5 dinitropiridina. Agitar vigorosamente.
6. Dejar reposar la mezcla durante dos horas a temperatura ambiente, agitando cada 30 minutos.
7. Añadir 5 ml de HCl - 1.2 N a cada tubo de ensayo y agitar vigorosamente.
8. Añadir 5 ml de acetato de etilo y mezclar bien invirtiendo los tubos al menos 10 veces; extraer la fase superior con una jeringa que tenga adaptado un tubo de polietileno. Este paso debe repetirse 3 veces.
9. Transferir la fase acuosa a tubos de colorímetro calibrados y leer en el fotocolorímetro a 390 nm, ajustar con el blanco.
10. Calcular el contenido de lisina de las muestras por comparación con la curva estándar y reportar en base a la proteína.

### **Curva estándar**

Preparar una curva estándar con un rango de 0 a 200  $\mu\text{g}$  de lisina por ml. Solución patrón de lisina: 62.5 mg de lisina monohidroclorhídrica en 20 ml de solución reguladora de carbonato (2500  $\mu\text{g}$  de lisina por ml.) Diluir la solución patrón de lisina de 0, 250, 500, 750 y 1000  $\mu\text{g}$  de lisina por ml. Agregar a 1 ml de las soluciones, 4 ml de la solución de papaína 4 mg/ml en la solución reguladora de fosfato. Transferir 1 ml de cada solución en tubos de centrifuga, añadir 0.5 ml de mezcla de aminoácidos y 0.5 ml de suspensión de fosfato de cobre. Continuar con el punto 4 del procedimiento.

## **Referencias**

1. Tsai, C.Y., L.W. Hansel y O.E. Nelson. "A colorimetric method of screening maize seeds for lysine content". *Cereal Chemistry* 49:572-579 (1972).
2. Villegas, E. y E.T. Mertz. "Screening techniques used at CIMMYT for protein quality maize". Technical Bulletin No. 20. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. México. 1970.

## Método de Capacidad de Ligamento del Colorante para Determinar la Calidad de Proteína en Maíz, Cebada y Triticale



Lectura del por ciento de trasmitancia en la evaluación del índice de calidad proteínica.

Este método se emplea comúnmente para determinar el contenido de proteínas en alimentos naturales, no alterados, tales como: cereales, semillas oleaginosas y leche. El método está basado en el hecho de que existe un porcentaje constante de grupos catiónicos disponibles, provenientes de los aminoácidos básicos, arginina, histidina y lisina, y de los grupos amino terminales de las cadenas de proteínas. Este método no puede utilizarse para determinar el contenido de proteína en materiales en los cuales el contenido de los grupos catiónicos disponibles ha sido alterado, ya sea por procesamiento o por mutaciones genéticas (como en el caso de granos de cereales cuyo contenido de lisina se ha elevado en la mutación).

En el laboratorio se está utilizando el método de ligamento del colorante (DBC), complementado con la determinación de nitrógeno por el método de Kjeldahl, para obtener un índice de calidad de proteína ( $IC = DBC / \% \text{ Proteína}$ ) en muestras de maíz, cebada y triticale). Hay correlación significativa entre el IC y el contenido de aminoácidos básicos, que permite identificar los materiales con alto contenido de lisina.

## Equipo

1. Balanza analítica con 0.1 mg de sensibilidad.
2. Molino con malla de 0.5 mm.
3. Agitador horizontal con capacidad para agitar 2 gradillas de 40 tubos.
4. Pipeta automática de 5 ml.
5. Tubos de cultivo de 10 x 130 mm con tapón de rosca.
6. Centrífuga con camisas metálicas para 64 tubos.
7. Fotocolorímetro "Udy-Model 101" o un espectrofotómetro con una celda de 0.1 cm y filtro de color de 475 nm.

## Reactivos

1. Solución colorante (cantidades requeridas para 1 litro de reactivo):
  - 2.00 g anaranjado de acilán GH (Bayer Co. 76113220)
  - 15.84 g ácido cítrico
  - 2.38 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro
  - 2.00 g ácido oxálico
  - 0.30 g timol

Entre los colorantes que se pueden utilizar se menciona: Acid Orange 10, Acid Orange 12 y Acid Orange (C.I. No. 15970). En medio ácido, estos colorantes reaccionan con los aminoácidos básicos de las proteínas: arginina, histidina y lisina.

### Preparación de solución colorante:

1. Solución ácido cítrico-oxálico (Reactivo A).
  - Disolver 237.6 g de ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) en aproximadamente 500 ml de agua destilada en un matraz volumétrico de 2 litros. Disolver 30 g de ácido oxálico en la solución y diluir en 2 litros con agua destilada.
2. Solución de fosfato de sodio-acilán (Reactivo B).
  - a) Disolver 44.7 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en aproximadamente 500 ml de agua destilada caliente.
  - b) Disolver 30 g del anaranjado de acilán (previamente secado a  $120^\circ\text{C}$  por dos horas) en la solución de fosfato en baño maría a aproximadamente  $80^\circ\text{C}$ .
  - c) Agregar 4.5 g timol (previamente pulverizado en un mortero de vidrio) y diluir a 2 litros con agua destilada.
3. Mezclar reactivo A y B y diluir con agua destilada a un volumen de 15 litros. Agitar vigorosamente y dejar reposar 24 horas. La solución colorante deberá tener un pH de 2.3.

### Solución colorante de referencia

Diluir la solución colorante con agua destilada 1:1 (v/v).

### Procedimiento

1. Pesar exactamente 100 mg de muestra molida en tubos de cultivo.
2. Agregar 5 ml de la solución colorante-reguladora de acilán, cuidando que la muestra se mezcle perfectamente con el colorante.
3. Colocar las gradillas en posición horizontal en un agitador y agitar durante 60 minutos, a temperatura ambiente entre 22 y 23°C, invertir las gradillas a los 30 minutos.
4. Centrifugar la muestra-solución colorante a 5,000 rpm durante 15 a 20 min. En caso de no disponer de centrifuga se puede filtrar con filtros de material inerte recomendados por Udy. <sup>2</sup>
5. Leer el por ciento de transmitancia en el colorímetro de Udy, previamente calentado y calibrado con la solución referencia para dar una lectura de 42.
6. Dividir el valor del por ciento de transmitancia (valor DBC) entre el de proteína de cada muestra, determinado por el método Kjeldahl para obtener el índice de calidad de la proteína (IC), que está significativamente correlacionado con el contenido de aminoácidos básicos (arginina, histidina y lisina).<sup>1</sup>

### Referencias

1. Mossberg, R. "New approaches to breeding for improved plant protein". International Atomic Energy Agency, Viena. 1969.
2. Udy, Doyle C. "Improved dye method for estimating protein". Journal of the American Oil Chemist Society 48 No. 1:29A-33A. 1971.

## Determinación de Zeína en Maíz

La zeína o prolamina es la fracción proteínica soluble en alcohol que forma el 50-60% de la proteína del endospermo del maíz normal. Su valor nutritivo es bajo debido a que dos aminoácidos esenciales (triptofano y lisina) no están presentes en su molécula. Dicha fracción proteínica se reduce notablemente a 20-35% al incorporarse el gene opaco-2 (o<sub>2</sub>) al maíz normal. Por lo tanto, existe una correlación negativa entre el contenido de zeína y el de lisina en el endospermo del maíz.<sup>1,2</sup>

La determinación de zeína se realiza en el laboratorio de calidad de proteínas del CIMMYT, en aquellos casos en los que la prueba colorimétrica de triptofano no es confiable como en el caso de los maíces coloreados que tienen alto contenido de pigmentos o materiales con dobles mutantes sugary-2/opaco-2 (su<sub>2</sub>o<sub>2</sub>) en donde el alto contenido de azúcares interfiere con el color final de la reacción. También ocurre esto cuando no se dispone del ácido acético de la calidad requerida (bajo contenido de aldehidos y alto contenido de ácido glioxílico) para la determinación del triptofano. Para poder determinar el contenido de lisina, utilizando este procedimiento, es necesario obtener una calibración estadística correlacionando la cantidad de lisina determinada por cromatografía de intercambio iónico y la cantidad de zeína.

En Illinois, EUA, se diseñó un método turbidimétrico rápido de zeína para determinar el contenido de lisina en maíz mediante la extracción de la zeína con 70% de etanol y acetato de sodio y su precipitación posterior con NaCl al 1%.<sup>2</sup> En Alemania se ha diseñado un método similar, en el cual la zeína se extrae usando butanol anhidro y se determina el nitrógeno soluble en el extracto y el nitrógeno residual en la muestra extraída del maíz. Ambos métodos han tenido buenos resultados en la evaluación de la calidad proteínica del maíz y pueden ser recomendados cuando no se puede determinar el triptofano. En el laboratorio del CIMMYT se ha usado el método de Paulis-Wall<sup>2</sup>, especialmente para la evaluación de muestras de grano completo.

### Equipo

1. Agitador horizontal.
2. Tubos para cultivo con tapón de rosca 14 x 150 mm.
3. Colorímetro.
4. Pipetas de 10 ml o jeringa automática.
5. Tubos calibrados para colorímetro.
6. Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.



7. Molino con malla de 0.5 mm.
8. Balanza analítica.
9. Centrífuga con cabezal para 64 tubos de 13 x 100 mm.
10. Gradillas para 40 tubos.

### Reactivos

1. Solución de alcohol etílico al 70% con 0.5% de acetato de sodio anhidro: 5 g de acetato de sodio anhidro en 1 litro de alcohol etílico al 70%.
2. Cloruro de sodio al 1%: 10 g de NaCl en 1 litro de agua destilada.

### Procedimiento

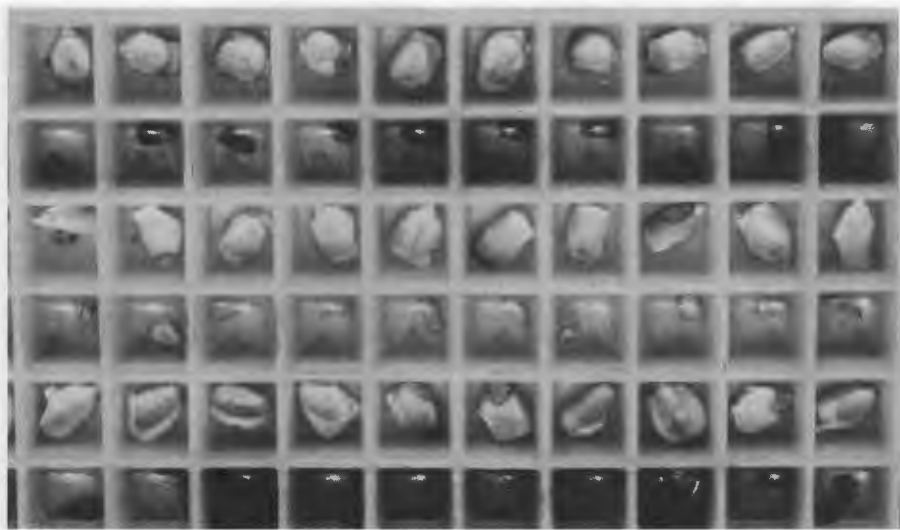
1. Pesar 100 mg de muestra finamente molida y sin desengrasar en tubos para cultivo con tapón de rosca con teflón.
2. Agregar 10 ml de la solución de etanol al 70% con 5% de acetato de sodio. Agitando muy bien para que la muestra quede perfectamente mojada.
3. Tapar los tubos perfectamente, poniendo primero un pedazo de polietileno y después el tapón de rosca.
4. Incluir dos muestras de maíz como testigo—una normal y otra de opaco-2.
5. Agitar durante 1 hora e invertir las gradillas a los 30 minutos.
6. Pasar a tubos de centrífuga y centrifugar a 2,500 rpm durante 10 minutos.
7. Utilizar una pipeta volumétrica para poner alícuotas de 2 ml en tubos calibrados del colorímetro.
8. Añadir vigorosamente 6 ml de NaCl 1% a la solución con una pipeta volumétrica o automática, para asegurar que la mezcla sea perfectamente homogénea.
9. Dejar reposar los tubos a temperatura ambiente exactamente una hora.
10. Eliminar las burbujas de aire en los tubos y leer la absorbancia en el colorímetro a 590 mn.
11. Seleccionar las muestras con los valores de densidad óptica más bajos. Dichos materiales tendrán el contenido de zeína más bajo y el de lisina más alto.

### Referencias

1. Frömberg, H.K., W. Christ y W.G. Pollmer. A rapid method based on butanol extraction for selecting high lysine maize (*Zea mays* L.) Crop Science 11:567-569. (1971).

2. Paulis, J., J.S. Wall, y W. Kwolek. A rapid turbidimetric analysis for zein in corn and its correlation with lysine content. *J. Agr. Food Chem.* 22 (2), 313 (1974).
3. Pollmer, W.G. y H.K. Frömberg. Estimating lysine content of maize (*Zea mays* L.) by means of alcoholic extraction. *Z. Pflanzenzücht.* 69, 50-57 (1973).

## Prueba de Ninhidrina para Determinar Aminoácidos Libres en Maíz Harinoso—Opaco-2



Los granos con el gene opaco-2 desarrollan un intenso color violeta en presencia de ninhidrina.

En 1974, investigadores de la Universidad de Purdue desarrollaron una prueba colorimétrica rápida para seleccionar líneas mutantes de maíz, sorgo y cebada con alto contenido de lisina. <sup>1</sup> Esta prueba está basada en la reacción de la ninhidrina con los aminoácidos libres encontrados en gran proporción en los granos con calidad proteínica superior. Los resultados de dicha prueba resultan afectados por la dureza del endospermo de los materiales. Sólo se pueden obtener resultados satisfactorios en materiales de endospermo suave por la rápida penetración de la ninhidrina.

En el Laboratorio de Calidad de Proteínas del CIMMYT, se está utilizando esta prueba, en forma cualitativa, en endospermo de maíz harinoso, cultivado en las zonas altas de Perú, Bolivia, Colombia y Ecuador. A dichos materiales se les ha incorporado el gene opaco-2 como parte del programa nacional de mejoramiento de maíz de esos países. Este procedimiento es no-destructivo y el resto del grano seleccionado por su reacción positiva a la ninhidrina puede ser sembrado para preservar material genético con calidad de proteínas.

## **Equipo**

1. Tabla de madera para cortar.
2. Equipo de disección.
3. Pipetas de 5 ml.
4. Bandejas de plástico para cubitos de hielo.

## **Reactivos**

Solución de ninhidrina con cloruro estanoso.

1. Disolver 400 mg de cloruro estanoso ( $\text{Sn Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) en 250 ml de solución reguladora de citrato de sodio: 4.3 g de ácido cítrico y 8.7 g de citrato de sodio, diluir a 250 ml con agua destilada y ajustar a pH 5.0 (Reactivo A).
2. Disolver 10 g de ninhidrina en 250 ml de Methyl Cellosolve (Reactivo B).
3. Mezclar los reactivos A y B. Esta solución se puede guardar refrigerada durante cinco días.

## **Procedimiento**

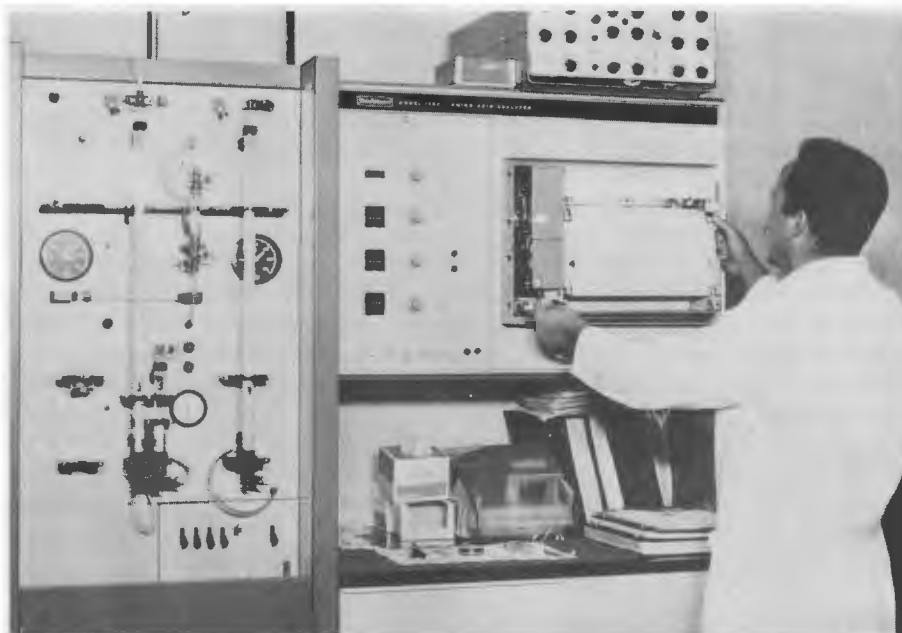
1. Cortar una sección del endospermo de cada grano por analizar (sin afectar el germen) y colocarlo en las bandejas de plástico. Colocar al lado el resto del grano conteniendo el germen, para su posterior identificación.
2. En forma semejante, colocar maíces testigo (un opaco y un normal) en la bandeja para comparación.
3. Cubrir perfectamente la sección de endospermo con 0.5 ml de la solución de ninhidrina.
4. Dejar reaccionar durante 30 minutos.
5. Seleccionar aquellos granos con reacción positiva (color violeta intenso) al compararlo con la muestra testigo de opaco-2.

Esta prueba ha sido de gran utilidad en una selección preliminar de alta calidad proteínica en maíces harinosos con gene opaco-2. El análisis cuantitativo de lisina o triptofano puede realizarse con las progenies de los granos seleccionados.

## **Referencias**

1. Mertz, E.T., P.S. Misra y R. Jambunathan. "A rapid ninhydrin color test for screening high lysine mutants of maize, sorghum, barley, and other cereal grains". Cereal Chemistry Vol. 51:304-307. 1974.

## Uso del Analizador de Aminoácidos



### Determinación de aminogramas por cromatografía de intercambio iónico.

El análisis completo de los aminoácidos (aminograma), se realiza únicamente en los materiales genéticos seleccionados en los programas de mejoramiento de maíz, trigo, triticale y cebada por su alto contenido de triptófano y/o lisina.

Aunque múltiples métodos para separar y cuantificar aminoácidos en las proteínas han sido descritos en literatura, el de mayor aceptación por su exactitud y reproductibilidad es el de cromatografía de intercambio iónico, proceso que actualmente se facilita con el uso de los analizadores automáticos de aminoácidos.<sup>4</sup>

Para cuantificar los diferentes aminoácidos se requiere hidrolizar totalmente la proteína de la muestra para preparar un hidrolizado con concentración de aminoácidos y pH adecuados y finalmente separar los componentes en columnas de intercambio con la resina apropiada. La hidrólisis de la muestra se realiza generalmente con HCl 6N a una temperatura de  $100 \pm 2^\circ \text{C}$  durante 24 horas.

Acidos orgánicos tales como el ácido p-toluensulfónico (p-TSA) también han sido utilizados satisfactoriamente como agentes hidrolíticos.<sup>1</sup> Este tipo de hidrólisis presenta la gran ventaja de ahorrar tiempo (aproximadamente 3 horas) al no tener que evaporar el cloro residual después de la hidrólisis con ácido clorhídrico.

En el laboratorio, para hacer análisis completos de aminoácidos se utiliza HCl 6N en la hidrólisis, mientras que, para determinar únicamente la lisina, la hidrólisis con p-TSA 3M ha resultado satisfactoria.

La separación de los aminoácidos liberados en la hidrólisis, se realiza utilizando dos columnas en el analizador Beckman Modelo 120C. En el caso de separación de los aminoácidos básicos arginina, histidina y lisina, se utiliza la columna corta de intercambio iónico, con resina (5 cm) del tipo Aminex A-5 (Biorad Co.) y una solución reguladora de pH 5.2. Para separar los aminoácidos ácidos y neutros se utiliza una columna más larga, con resina del tipo Aminex A-4 (50 cm) y dos diferentes soluciones reguladoras; una de pH 3.25, y otra de pH 4.25. La estimación cuantitativa de los aminoácidos separados se lleva a cabo ya sea por medio de un integrador electrónico conectado al analizador de aminoácidos, o calculando manualmente áreas bajo la curva para cada componente. Se debe hacer un análisis de la solución estándar de aminoácidos con concentración conocida para comparación.

### **Equipo**

1. Balanza analítica.
2. Viales de 20 x 70 y de 20 x 95 mm con tapón de rosca con teflón.
3. Tubos cónicos graduados para centrífuga con tapón de rosca.
4. Estufa con control de temperatura.
5. Analizador de aminoácidos Beckman, Modelo 120 C equipado con columnas larga y corta y las resinas correspondientes.
6. Rotoevaporador con bomba al vacío.
7. Material de vidrio (pipetas, vasos, matraces, etc.).
8. Cinta para prueba de pH con indicadores múltiples.
9. Potenciómetro con escala expandida.

### **Reactivos**

1. Acido clorhídrico 6N.
2. Acido p-toluensulfónico 3M.
3. Citrato de sodio.
4. Acido cítrico.
5. Hidróxido de sodio.
6. Acido caproico.
7. Cloruro estanoico.

8. Solución de ninhidrina al 2%.
9. Acetato de sodio.
10. Detergente orgánico.
11. Gas nitrógeno.
12. Methyl Cellosolve.
13. Acido acético.
14. Tioglicol al 25%.
15. Solución neutralizadora: 60 g NaOH, y 4.9 g citrato de sodio a 250 ml con agua destilada.
16. Soluciones reguladoras de citrato de sodio con pH de 2.2, 3.25, 4.25 y 5.20.<sup>2</sup>

Los reactivos específicos para cada separación de aminoácidos deben prepararse de acuerdo al manual del Analizador Beckman 120 C<sup>2</sup>, o el equipo utilizado.

### Procedimiento

Separación de aminoácidos básicos (por hidrólisis con p-TSA):

1. Pesar 25 mg de muestra finamente pulverizada y desengrasada en tubos cónicos de vidrio graduados.
2. Añadir 3 ml de p-TSA 3M asegurándose que la muestra quede completamente humedecida. Aplicar nitrógeno y tapar firmemente.
3. Incubar a una temperatura entre 95-100°C durante 26 horas. Enfriar a temperatura ambiente.
4. Añadir de 1.4 a 1.7 ml de solución neutralizadora. Agitar bien y asegurarse de que el valor del pH está entre 1.5 y 2.0.
5. Diluir a 10 ml con solución reguladora con pH 2.2.
6. Filtrar con milipore, o centrifugar a 9,000 rpm.
7. Inyectar alícuotas de 0.5 ml en la columna corta del analizador de aminoácidos. Eluir con la solución reguladora pH 5.20.
8. Solución estándar de aminoácidos básicos con concentración conocida (0.2  $\mu$ mol/ml) deben analizarse el mismo día.

Aminograma completo.

1. Pesar 25 mg de muestra finamente pulverizada y desengrasada en viales con tapón de rosca y teflón.
2. Añadir 5 ml de HCl 6N cuidando que toda la harina quede en contacto con el ácido.
3. Eliminar el aire por medio de la incorporación de nitrógeno y tapar firmemente.
4. Colocar en la estufa a  $100 \pm 3^\circ\text{C}$  por espacio de 24 horas.
5. Filtrar la muestra en milipore, lavando perfectamente con agua destilada.
6. Evaporar con vacío tres veces, y lavar los matraces con agua destilada cada vez.

