

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**



**LA LISINA EN LOS ALIMENTOS, IMPORTAN-  
CIA, METODOS DE CUANTEO Y NUEVAS  
FUENTES.**

**GUSTAVO CUEVAS PALLARES**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**1 9 7 7**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

KRAB

Tesis 1977  
ABG ~~14-1977~~ ~~1977~~  
FECHA  
REC 116 114



QUIMICA

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. ENRIQUE GARCIA GALIANO  
VOCAL: Profa. ANGELA SOTELO LOPEZ  
SECRETARIO: Prof. MIGUEL HERNANDEZ INFANTE  
1er. SUPLENTE: Prof. EMILIO BARRAGAN HERNANDEZ  
2do. SUPLENTE: Profa. MAGDALENA OLIVA GONZALEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

FACULTAD DE QUIMICA DE LA UNAM

SUSTENTANTE:

GUSTAVO CUEVAS PALLARES

ASESOR DEL TEMA:

Q.F.B. MIGUEL HERNANDEZ INFANTE



A AQUEL QUE ME DIO LA EXISTENCIA,  
porque todo se lo debo

A MI MADRE DEL CIELO,  
por su intercesión y ayuda

A MIS PADRES,  
por su protección, estímulo y consejo

A MI NOVIA,  
María Teresa

A MIS HERMANOS,  
Eduardo, Juan Manuel, Esperanza, Cristina, José Luis, Alejandro,  
Guillermo, Patricia, Jorge, Susana y Sergio

A LA UNIVERSIDAD,  
por todo lo que me enseñó

A MIS MAESTROS,  
especialmente al maestro Miguel Hernández I.

A MIS COMPAÑEROS

## INDICE

I. INTRODUCCION	3
II. PROTEINAS Y AMINOACIDOS	4
III. AMINOACIDOS ESENCIALES	17
IV. LA LISINA	29
V. DETERMINACION DE LISINA	36
VI. DETERMINACION DE LISINA DISPONIBLE	43
VII. ALTERNATIVAS PARA INCREMENTAR EL CONTENIDO DE LISINA EN LOS ALIMENTOS	49
VIII. CONCLUSIONES	61
IX. BIBLIOGRAFIA	64

INTRODUCCION

La alimentación a nivel mundial se presenta en la actualidad poco uniforme, existiendo países que son considerados de buena nutrición, en los que el aporte calórico-proteico es suficiente y a base de alimentos de origen animal y países de mala nutrición, en los cuales el consumo es escaso y a base de alimentos de origen vegetal que en general tienen una proteína de baja calidad que es deficiente en algunos aminoácidos esenciales, principalmente los azufrados y la lisina; provocando en última instancia una desnutrición de tipo proteico, en tanto que la calórica se produce por un consumo insuficiente de alimentos.

Nuestro país queda incluido dentro de los países de mala nutrición, ya que su alimentación es a base de frijol, maíz, trigo, tubérculos, chile, etc.; y, debido al mayor consumo que se hace de los cereales, el principal aminoácido limitante en su dieta es la lisina, por lo cual se considera muy importante conocer qué papel tiene, bioquímicamente, este aminoácido y, lo que es más práctico, conocer qué otros alimentos son bajos en él para no provocar un mayor desbalance (imbalance), y qué fuentes (además de las de origen animal) pueden compensar esta deficiencia, contribuyendo así, en gran parte, al mejoramiento nutricional del país.

## PROTEINAS Y AMINOACIDOS

Las proteínas representan el grupo de sustancias químicas de mayor importancia en la estructura y la fisiología celulares. En general, llenan dos tipos de funciones, las estructurales y las energéticas; estas últimas, aunque secundarias, contribuyen al sostenimiento del organismo, ya que se liberan 4 Kcal por gramo de proteína metabolizada. Estructuralmente, las proteínas forman la masa principal de las células y de todos los tejidos animales, como el músculo, las vísceras y aún estructuras en que la parte proteica es menos ostensible, como el hueso, que tiene 30 por ciento de proteína indispensable para su estabilidad y su funcionamiento. El aspecto estructural es, en ocasiones, la función esencial de determinadas proteínas; tal es el caso de las escleroproteínas, proteínas insolubles que forman el sostén de muchos tejidos y órganos como las colágenas del tejido conjuntivo o las queratinas de las formaciones epidérmicas representadas por el cabello, el cuerno, las uñas, etc.

Sin embargo, aparte de llenar funciones estructurales y formar la masa protoplásmica, las proteínas llenan cometidos definidos en relación con actividades específicas, entre las cuales destacan las siguientes: -

- 1) La reproducción de las células y el traspasso de las características hereditarias depende de las nucleoproteínas, especies químicas de distribución universal en los seres vivientes.
- 2) La actividad enzimática de las células está a cargo de proteínas que ejercen acción catalítica y determinan así la velocidad y el sentido del metabolismo; es posible que todas las proteínas que forman la estructura de una célula al mismo tiempo tengan a su cargo cierta función enzimática.
- 3) El transporte de oxígeno en los mamíferos se lleva a cabo por medio de la hemoglobina, cromoproteína presente en los glóbulos rojos de la sangre que tiene la capacidad de fijar oxígeno molecular.
- 4) Ciertas hormonas, especialmente las hipofisiarias, son proteínas o polipéptidos; otras, como las hormonas tiroideas, representan, químicamente, sustancias derivadas de los aminoácidos.
- 5) Los anticuerpos, de gran importancia en los mecanismos de defensa a las infecciones, pertenecen al grupo de proteínas plasmáticas llamadas globulinas.
- 6) Las proteínas contráctiles, que tienen la propiedad de acortarse y alargarse, como la miosina de los músculos. (1)

Las proteínas están compuestas de la misma manera que los carbohidratos y los lípidos, por C, O e H, pero, además, contienen siempre N y, en la gran mayoría de los casos, azufre. Muy a menudo, en diversas sustan -

cias proteínicas se encuentran otros elementos como P, Zn, Fe, Co. Sin embargo, desde el punto de vista de la composición, no elemental sino es estructural, lo más importante es que las proteínas están formadas por la unión de  $\alpha$ -aminoácidos, moléculas que tienen en el mismo carbono, el primero de su cadena, un grupo amino  $NH_2$ , y un grupo carboxilo  $COOH$ . Aun que se han aislado varias decenas de compuestos con estas características, los que intervienen en la formación estructural de las proteínas son poco más de una veintena. Aun así, la probabilidad de combinaciones de unos 20 aminoácidos agrupados en distinto número u orden es prácticamente infinito. Esto confiere a las proteínas la posibilidad de formar especies químicas distintas, de acuerdo con la secuencia con la que se dispongan sus aminoácidos. Hay casos sencillos, como algunos polipéptidos con acción hormonal, por ejemplo, la ocitocina, secretada por la neurohipófisis, está formada por 8 diferentes aminoácidos y tiene un peso molecular de cerca de 300,000 a 400,000; mientras que otras alcanzan varios millones. (1)

### CONFORMACION

Cada proteína posee, por lo menos, una conformación tridimensional en la cual es estable y activa en condiciones biológicas de temperatura y de pH; ésta es su conformación nativa.

La conformación de una cadena polipeptídica viene determinada automáticamente por el tamaño, la forma y la polaridad de los grupos R de sus aminoácidos, así como por la secuencia aminoacídica. Los grupos R se hallan lo bastante próximos para que puedan ejercer acciones entre sí, o con el solvente, que limiten la libre rotación de los enlaces sencillos del esqueleto de la cadena polipeptídica. Otras limitaciones en la conformación de la cadena polipeptídica son las que imponen la naturaleza rígida y casi planar del enlace peptídico y la existencia de enlaces cruzados -S-S- covalentes.

El análisis mediante rayos X de las proteínas globulares muestra que sus cadenas están plegadas de modo compacto y dejan poco espacio en el interior para moléculas de agua. Todos o casi todos los grupos R polares de las proteínas globulares se hallan sobre la superficie y están hidratados; los restos hidrófobos permanecen ocultos en el interior.

La estructura cuaternaria de las proteínas oligoméricas está determinada también por la secuencia aminoacídica primaria de los protómeros -

componentes. Las proteínas oligoméricas, tales como la hemoglobina y las enzimas alostéricas tienen propiedades de autoensamblaje. La construcción de las grandes proteínas a partir de cierto número de cadenas polipeptídicas separadas reduce al mínimo las consecuencias de los errores en la biosíntesis de proteínas, conserva el material genético y hace posibles interacciones reguladoras, como en el caso de las enzimas reguladoras. -

(2)

## CLASIFICACION DE LAS PROTEINAS

### 1.- Conforme a la estructura

#### a) Proteínas fibrosas.

Estas proteínas están asociadas a elementos celulares y a menudo su función es servir de soporte a estructuras específicas de la célula. Antiguamente se llamaron albuminoides o esclerinas. Son ejemplos de esta clase de proteínas, la lana, la fibroína de la seda, el colágeno (tejido conjuntivo), miocina (músculo), queratina (cabello) y fibrina (coágulo de la sangre). Estas proteínas son muy insolubles en medios acuosos y tienen altos pesos moleculares, que no pueden ser determinados con exactitud por las dificultades con que se tropieza en su purificación. Aparecen como fibras formadas por moléculas lineales ordenadas más o menos en dirección paralela al eje de la fibra. Son amorfas y algunas pueden estirarse y contraerse. La fibrina humana tiene de dimensiones moleculares  $38 \times 700 \text{ \AA}$ .

#### b) Proteínas globulares.

En contraposición a las proteínas fibrosas, las proteínas globulares son solubles en medios acuosos y pueden aislarse en estado cristalino. Aunque no necesariamente esféricas, tienen menos asimetría que las proteínas fibrosas.

Las cadenas están entrettejidas en una manera única y se mantienen unidas en una estructura tridimensional, en virtud de enlaces de hidrógeno relativamente débiles, o por enlaces disulfuro covalentes. (3)

### 2.- Conforme a la solubilidad

#### a) Albúminas.

Son proteínas solubles en agua que pueden precipitarse de sus soluciones que poseen altas concentraciones de sales. La disminución de solubilidad en presencia de altas concentraciones de sales se debe a que -

las moléculas de sal y las de proteína entran en competencia por las moléculas de agua, y a una disminución de la carga sobre las moléculas de proteína. Son ejemplos de esta clase de proteínas la albúmina del huevo, la del suero, la lactoalbúmina y la leucosina (se encuentra en el trigo).

b) Globulinas.

A diferencia de las albúminas, estas proteínas son en general insolubles en agua exenta de sales y solubles en soluciones diluidas de ellas. Son ejemplos de esta clase de proteínas las globulinas del suero, la ovoglobulina, el miocinógeno, la edestina (de la semilla de cáñamo), la amandina (de las almendras) y la excelsina (de la nuez del Brasil).

c) Glutelinas.

Estas proteínas son insolubles en soluciones acuosas neutras, pero solubles en ácidos o álcalis diluidos. Son ejemplos la glutenina (del trigo) y la orizenina (del arroz).

d) Gliadinas (prolaminas).

Son proteínas solubles en etanol de 70-80% e insolubles en agua o en etanol absoluto. Son ejemplos la gliadina (del trigo), la hordeína (de la cebada) y la zeína (del maíz).

e) Histonas.

Más básicas que la mayoría de las proteínas, muestran tendencia a formar complejos con compuestos acídicos de la célula. Ejemplos son la globina (hemoglobina), la histona del timo y la escombrona (de la cebo-lla).

f) Protaminas.

Comparadas con la mayoría de las proteínas, son moléculas relativamente pequeñas. Son solubles en agua y de carácter básico. Se encuentran asociadas con ácidos nucleicos de la esperma de peces. Son ejemplos la salmina (del salmón), la esturina (del esturión), la clupeína (del arenque) y la ciprinina (de la carpa). (3)

3.- Conforme a la mitad no proteínica (Conjugadas)

a) Nucleoproteínas.

Además de las nucleohistonas y las nucleoprotaminas hay un tercer grupo de proteínas capaces de enlazar ácidos nucleicos. Estas nucleoproteínas no son básicas y retienen al ácido nucleico por enlaces de valencia secundarios. Ocurren en microorganismos y son solubles en solución salina isotónica.

b) Glucoproteínas.



Esta clase de proteínas se caracterizan por tener una mitad de carbohidratos, entre otros hexosas, hexosaminas y ácidos hexurónicos; son ejemplos la mucina (de la saliva), el oseomucoide (del hueso) y el tendomucoide (del tendón).

c) Fosfoproteínas.

Ejemplos de fosfoproteínas son la caseína (de la leche) y la vitelina (yema del huevo).

d) Cromoproteínas.

Son proteínas pigmentadas a causa del grupo no proteínico prostético. Entre ellas figuran la hemoglobina, la ceruloplasmina (complejo con Cu), la hemocianina (con Cu), la oxidasa del ácido ascórbico (con Cu) y la ferritina (complejo con Fe).

e) Deshidrogenasas.

Son enzimas proteínicas conjugadas, que poseen actividad oxidativa por la presencia en ellas de grupos prostéticos como NAD, NADP, FMN y FAD. (3)

#### 4.- Conforme al estado de degradación

a) Naturales.

Las proteínas en un estado que se presume es idéntico al estado en que se encuentra en la célula viva y que poseen una estructura única, requisito para la actividad biológica, se llaman proteínas naturales.

b) Desnaturalizadas.

Una proteína cuyo estado natural único ha sido desorganizado de tal modo que la configuración tridimensional original se ha convertido en la de una espiral al azar, se dice que es una proteína desnaturalizada. En este proceso no se han perdido grupos químicos de la molécula original.

c) Proteínas derivadas.

Son productos resultantes de alteraciones en la proteína original, de tal índole que suponen eliminación de residuos de aminoácidos o de fragmentos mayores (polipéptidos). En algunos casos este cambio no trae consigo desnaturalización o pérdida de actividad biológica. De hecho, la conversión de pepsinógeno en pepsina significa el cambio de una proteína inactiva en una enzima activa. (3)

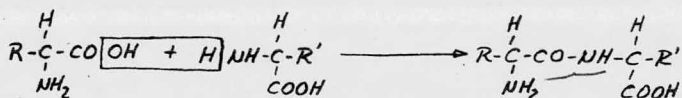
#### 5.- Por su función biológica

a) Enzimas: ribonucleasa, citocromo c, tripsina.

- b) Proteínas de reserva: ovoalbúmina, caseína, ferritina, gliadina, zeína.
- c) Proteínas transportadoras: hemoglobina, hemocianina, mioglobina, seralbúmina,  $\beta_1$ -lipoproteína, globulina que liga hierro, ceruloplasmina.
- d) Proteínas contráctiles: miosina, actina, dineína.
- e) Proteínas protectoras en la sangre de los vertebrados: anticuerpos, complemento, fibrinógeno, trombina.
- f) Toxinas: toxina de "Clostridium botulinum", toxina diftérica, venenos de serpiente, ricina.
- g) Hormonas: insulina, hormona adrenocorticotrópica, hormona del crecimiento.
- h) Proteínas estructurales: proteínas de recubrimiento viral, glucoproteínas.
- i) Proteínas estructurales de la membrana:  $\alpha$ -queratina, esclerona, fibroína, colágeno, elastina, mucoproteínas. (2)

## LOS ENLACES

En la molécula de proteína los aminoácidos están unidos por enlaces entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro, con la liberación de agua:



El enlace entre dos aminoácidos,  $-\text{CO}-\text{NH}-$ , es llamado enlace "peptídico". Cuando son involucrados dos aminoácidos, el compuesto resultante se llama "dipéptido". La disponibilidad de un grupo amino y un grupo carboxilo en el dipéptido hace posible mayores combinaciones con otros aminoácidos (o el mismo), así que podemos construir tripéptidos, tetrapéptidos, etc.; es decir, formar "polipéptidos". Los grandes polipéptidos sintéticos de "cadena lineal" se asemejan a las proteínas en sus propiedades químicas y físicas.

Esta teoría del polipéptido de la estructura de las proteínas es, sin embargo, solo una explicación parcial. La evidencia que se ha acumulado recientemente está por la existencia, dentro de la molécula de proteína, de grandes sistemas de "anillos" hechos de muchos aminoácidos. Para ilustrar esto, puede citarse el trabajo de Du Vigneaud sobre oxitocina y vasopresina, dos hormonas polipeptídicas localizadas en el lóbulo

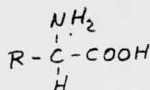


Estos enlaces sirven para mantener unidos grandes polipéptidos ("agregación"). La ruptura de estos enlaces provoca la "disgregación" en unidades polipeptídicas más pequeñas (o desenvolvimiento de la cadena polipeptídica enrollada).

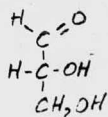
El proceso de desnaturalización comprende el rompimiento de los enlaces de hidrógeno. La función del enlace de hidrógeno en términos de la célula viva puede ser importante, ya que el proceso de agregación o disgregación de proteínas es acompañado por cambios en las propiedades físicas tales como la viscosidad y la actividad osmótica. (4)

### LOS AMINOACIDOS

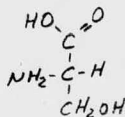
La fórmula general para todos los aminoácidos naturales, puede representarse así:



Debido a que el grupo amino se encuentra en el átomo de carbono adyacente al grupo carboxilo (el carbono  $-\alpha$ ), los aminoácidos que tienen esta fórmula general se conocen como alfa ( $\alpha$ ) aminoácidos. Es evidente que si R en esta fórmula no es H, el átomo de carbono alfa es asimétrico, por lo tanto pueden existir dos compuestos que tengan la misma fórmula, uno tendría la fórmula mostrada y el otro sería el enantioformo o isómero especular del primer compuesto. Está demostrado que los aminoácidos de las proteínas naturales tienen la misma configuración. Tomando como referencia al D-gliceraldehído, los aminoácidos naturales, tienen la configuración opuesta L. Esta relación puede representarse así para el aminoácido serina: (5)



D-gliceraldehído



L-serina

### CLASIFICACION DE LOS AMINOACIDOS

a) Acidos monoaminomonocarboxílicos alifáticos

1. Glicina (o glicocola) (ácido  $\alpha$ -aminoacético)
2. Alanina (ácido  $\alpha$ -aminopropiónico)
3. Valina (ácido  $\alpha$ -aminoisovalérico)
4. Leucina (ácido  $\alpha$ -aminoisocaproico)

5. Isoleucina (ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -metil- $\beta$ -etilpropiónico)
- b) Aminoácidos aromáticos
  6. Fenil alanina (ácido  $\beta$ -fenil- $\alpha$ -aminopropiónico)
  7. Tirosina (p-hidroxifenilalanina)
  8. Triptófano (ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -3-indolpropiónico)
- c) Hidroxiaminoácidos
  9. Serina (ácido  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminopropiónico)
  10. Treonina (ácido  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminobutírico)
- d) Aminoácidos acídicos o dicarboxílicos
  11. Acido aspártico (ácido  $\alpha$ -aminosuccínico)
  12. Acido glutámico (ácido  $\alpha$ -amino glutámico)
- e) Aminoácidos del tipo amida de ácido
  13. Asparagina (amida del ácido aspártico)
  14. Glutamina (amida del ácido glutámico)
- f) Aminoácidos básicos
  15. Lisina (ácido  $\alpha$ - $\epsilon$ -diaminocaproico)
  16. Arginina (ácido  $\delta$ -guanidil- $\alpha$ -aminovalérico)
  17. Histidina ( $\beta$ -4-imidazolilalanina)
- g) Aminoácidos con contenido de azufre
  18. Metionina (ácido  $\gamma$ -metiltiol- $\alpha$ -aminobutírico)
  19. Cistina (ácido di- $\beta$ -tio- $\alpha$ -aminopropiónico)
  - 19a. Cisteína (ácido  $\beta$ -tio- $\alpha$ -aminopropiónico)
- h) Aminoácidos secundarios
  20. Prolina (ácido pirrolidina- $\alpha$ -carboxílico)
  - 20a. Hidroxiprolina (ácido 4-hidroxipirrolidina- $\alpha$ -carboxílico)

#### Otros aminoácidos.

Los siguientes aminoácidos no se encuentran formando parte de la estructura usual de las proteínas, pero son, o bien productos del metabolismo y se encuentran en estado libre, o forman parte de la estructura de péptidos especiales:  $\beta$ -alanina, fosfoserina, ergotionina, hidroxilisina (en la gelatina y en el embrión de ternero, en forma del ester fosfato), ornitina, citrulina, homocisteína, cistationina, ácido  $\beta$ -aminobutírico, ácido  $\gamma$ -aminoisobutírico, dihidroxifenilalanina. (3)

#### PROPIEDADES GENERALES

Los aminoácidos son sustancias incoloras, relativamente solubles en

agua (excepción hecha de la cistina, la tirosina y la leucina) y poco solubles o insolubles en los disolventes orgánicos. Su forma cristalina, - que a veces es característica, permite su identificación.

Al disolverse en el agua, los aminoácidos con un solo grupo amino y un grupo carboxílico dan soluciones de reacción neutra y se comportan como electrólitos débiles. Los demás, cuando hay un predominio de grupos -básicos frente a los grupos ácidos, dan reacción alcalina, o cuando ocurre lo contrario dan reacción ácida. (6)

## REACCIONES

### Formación de ésteres.

Los aminoácidos pueden condensarse con alcoholes dando ésteres. Es -tos ésteres que poseen un grupo amino libre, son básicos y dan sales con facilidad. Sirven para la separación e identificación de algunos aminoá -cidos. (6)

### Condensación con cloruros de ácidos.

Por su grupo amino los aminoácidos se combinan con cloruros de áci -dos, dando compuestos fácilmente cristalizables. Entre los cloruros de -ácido más empleados se encuentran los del ácido  $\beta$ -naftalensulfónico y -del ácido 3,5-dinitrobenzoico. (6)

### Desaminación.

Cuando un aminoácido se trata con ácido nitroso el grupo amínico es reemplazado por un grupo alcohólico, poniéndose en libertad nitrógeno. - El desprendimiento de nitrógeno es cuantitativo y su medida permite dosificar los aminoácidos. La reacción constituye la base del método de Van Slyke. (6)

### Descarboxilación.

Por calentamiento en solventes inertes algunos aminoácidos pierden - el grupo carboxilo, desprendiéndose anhídrido carbónico y transformándo -se en una amina. Varias aminas de importancia biológica se originan por una reacción similar, por acción de enzimas. (6)

### Acción del formol.

Si la solución de un aminoácido se trata con formol, éste se condensa en el grupo amínico neutralizándolo y el compuesto formado se comporta como un ácido y no como un anfólito. En esta reacción compleja se forman de preferencia hidroximetil derivados. Se ha comprobado que los gru -

pos imino, amida, hidroxilo, sulfhidrilo, guanidino, etc., pueden también combinarse con el formol. Esta reacción constituye la base del método de Sørensen para la determinación cuantitativa de los aminoácidos. - (6)

Acción de la ninhidrina.

Los aminoácidos en solución acuosa, calentados con ninhidrina o hidrato de tricetohidrindeno, se descomponen con liberación cuantitativa de anhídrido carbónico y amoníaco. Esta reacción constituye la base del método de Van Slyke y Millon para la valoración de los aminoácidos. (6)

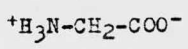
Reacción coloreada general de los aminoácidos con ninhidrina.

Durante el calentamiento de los aminoácidos con ninhidrina, si la solución tiene un pH mayor de 4, se produce una coloración violeta o violeta azulada. Esta reacción es una de las más generales de los aminoácidos, aunque los polipéptidos, proteínas y otros compuestos aminados también la dan. Es una reacción muy sensible y se utiliza corrientemente para investigar aminoácidos y polipéptidos en los cromatogramas en papel. El color producido sirve también para la determinación cuantitativa de los mismos. La coloración de esta reacción se originaría por condensación de la forma enólica del alcohol ninhidrínico formado, durante la etapa de descarboxilación, con una molécula de ninhidrina y otra de amoníaco, formando un colorante. (6)

LOS AMINOACIDOS COMO ELECTROLITOS

Los aminoácidos son anfólitos, se comportan como ácidos y bases débiles ya que contienen al menos un grupo carboxilo y un grupo amino. Cada grupo tiene su valor de pK característico, y convencionalmente estos son designados pK<sub>1</sub>, pK<sub>2</sub>, etc., empezando con el grupo titulado en la región más ácida.

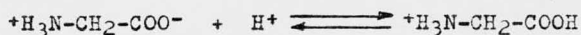
Un ácido monoaminomonocarboxílico, como la glicina, en solución acuosa da iones dipolares, también llamados "zwitterions", en que ambos grupos, ácido y básico, están ionizados.



Sin embargo, la molécula es eléctricamente neutra, ya que el número de cargas positivas es igual al número de cargas negativas. En esta condición, se dice que la molécula es isoeléctrica. El pH al cual un ion dipolar no emigra en un campo eléctrico es llamado "punto isoeléctrico". En agua y en ausencia de otros solutos, este pH también es el "punto isoió-

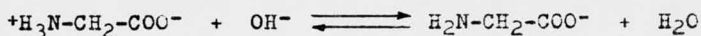
nico", es decir, el pH en el que el número de cationes es igual al número de aniones. En soluciones salinas o en soluciones que contienen otros iones que aquellos derivados del anfólito, alguno de los grupos ionizables del anfólito puede ser neutralizado eléctricamente por los demás iones presentes. Bajo estas circunstancias habrá diferencias entre el valor para el punto isoeléctrico y para el punto isoiónico. Esto es de importancia particularmente para las proteínas.

La adición de iones hidrógeno a la molécula isoeléctrica, descrita arriba, produce un cambio de carga, ya que la ionización del grupo carboxilato se reprime y la molécula adquiere una carga neta positiva.



El ion dipolar ha aceptado un protón, y ahora la forma predominante es una molécula cargada positivamente.

Correspondientemente, la adición de una base al ion dipolar elimina un protón del grupo amonio, dejando la molécula con una carga neta negativa.



Es más fácil considerar los aminoácidos isoeléctricos como sales que están completamente ionizadas y neutralizados internamente por sus propios grupos amino y carboxilo, que contemplarlos como ácidos en el sentido convencional.

El concepto de que bajo condiciones isoeléctricas los aminoácidos están ionizados y no poseen carga neta está apoyado en el testimonio presentado por Bjerrum en 1923. Sin embargo, se creyó por muchos años después que lo opuesto era verdad, que un aminoácido isoeléctrico, tal como la glicina, era indisociable y tenía la estructura  $H_2N-CH_2-COOH$  en solución acuosa. La evidencia de que los aminoácidos son iones dipolares es ahora abrumadora e incluye los puntos siguientes:

1. En general, los aminoácidos isoeléctricos son solubles en agua y otros solventes polares, e insolubles en solventes no polares tales como éter, cloroformo, benceno, etc. Los compuestos no iónicos de estructura similar son solubles usualmente en solventes no polares y escasamente solubles en agua.

2. Los  $\alpha$ -aminoácidos funden con descomposición arriba de los  $200^\circ C$ , y muchos aún arriba de  $300^\circ C$ . La gran mayoría de los compuestos orgánicos no iónicos estructuralmente similares tienen puntos de fusión mucho más bajos.

3. El formaldehído se combina con los grupos amino no cargados para



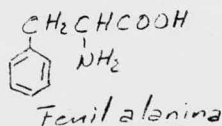
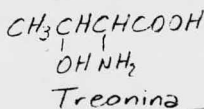
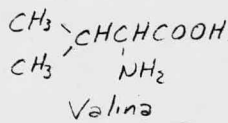
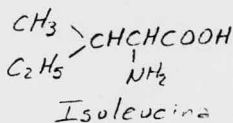
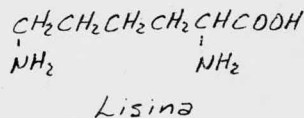
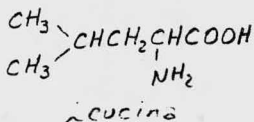
formar derivados básicos débiles. En la titulación de aminoácidos con ba se en la presencia de formaldehído, solo se altera aquel pK que pueda - adscribirse al grupo amino en la base de la estructura del ion dipolar.

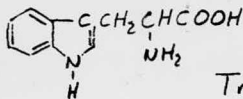
(7)

AMINOACIDOS ESENCIALES

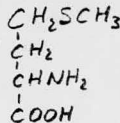
Mientras que las plantas son capaces de utilizar fuentes inorgánicas de nitrógeno, tales como amoníaco, nitratos y nitritos; el hombre y otros animales superiores están, la mayor parte, dependiendo de una fuente de aminoácidos para construir sus proteínas corporales. Aunque algunas bacterias pueden utilizar nitrógeno atmosférico, estos organismos están en una escala baja de la vida y alejados del hombre. Los animales superiores están dependiendo directa o indirectamente de las proteínas vegetales. Frecuentemente esta proteína vegetal es consumida por un animal, que es digerida y sintetizada en sus proteínas, y se extiende al hombre después de pasar a través de uno o más animales. Por tanto, los grandes peces reciben alimentos vegetales por medio de una larga cadena de animales marinos inferiores más pequeños hasta uno diminuto que verdaderamente come el alimento vegetal.

Cada célula viva contiene proteínas. En realidad el término "proteína", viene de la raíz griega que significa "ser primero". En la síntesis humana de las proteínas que constituyen los tejidos corporales se requiere la presencia de aminoácidos. En las proteínas corporales hay aproximadamente 20 aminoácidos diferentes; se requieren en la dieta 8 de ellos (leucina, isoleucina, lisina, valina, treonina, triptófano, fenil alanina y metionina), ya que, como se ha demostrado, el hombre es capaz de sintetizar solamente los restantes aminoácidos; debido a esto, a los que no son sintetizados por el hombre se les llama "aminoácidos esenciales".





Triptófano



Metionina

El grupo amino de algunos aminoácidos participa con su nitrógeno en la síntesis de cualquier aminoácido cuyo esqueleto de carbono esté formado. La alimentación humana debe suplir los aminoácidos necesarios para la formación de las proteínas. Debe permitir la síntesis ocasional de aminoácidos no esenciales, así como la suplementación en cantidades adecuadas de los aminoácidos esenciales que no se pueden sintetizar. (8), - (9)

Las proteínas que contienen todos los aminoácidos esenciales en cantidades significativas son de Valor Biológico alto. Las proteínas que son bajas, o deficientes, en uno o más aminoácidos esenciales, son de bajo Valor Biológico. La mayoría de las proteínas de fuentes animales (carne y productos lácteos) son de alto Valor Biológico, y las proteínas vegetales, en general, son de bajo Valor Biológico. (10)

El verdadero valor comparativo de las diferentes proteínas depende de sus diversas composiciones por aminoácidos, y sobre todo de su contenido en aminoácidos esenciales. En una mezcla, una proteína de mala calidad, carente de ciertos aminoácidos esenciales, puede ser suplementada por una buena proteína que contiene los aminoácidos ausentes de la otra, a fin de lograr una nutrición adecuada, pero ambas proteínas deben ser suministradas a la vez, ya que el cuerpo tiene una capacidad de almacenamiento muy limitada y todos los aminoácidos se necesitan para la síntesis proteínica diaria.

Al suplementar las proteínas vegetales incompletas con los aminoácidos esenciales que le faltan (los cuales a menudo son lisina y metionina), estas proteínas pueden resultar totalmente adecuadas. (11)

W.C. Rose (12) alimentó ratas jóvenes con mezclas de aminoácidos, en lugar de proteínas, y de estas mezclas separaba oportunamente los aminoácidos cuya función fisiológica y alimenticia quería poner de manifiesto. Como fenómeno medible utilizó el crecimiento de los animales. De estos ensayos resultó que los aminoácidos pueden clasificarse en tres grupos, de acuerdo a su actividad específica:

- 1o. Los que son indispensables para el crecimiento (aminoácidos esenciales).
- 2o. Los que no son indispensables para el crecimiento, pero que, no

obstante, lo aceleran.

30. Los que no ejercen influencia en el crecimiento (aminoácidos - prescindibles).

Los aminoácidos esenciales no pueden ser sintetizados por el organismo o, al menos, se forman en cantidad insuficiente en los procesos del metabolismo intermediario. Por eso el organismo está supeditado, en este terreno, a la aportación alimenticia.

La falta de un aminoácido esencial motiva un trastorno general en el metabolismo proteico, puesto que la formación de las proteínas orgánicas está restringida y condicionada por el aporte de este aminoácido. Si falta en la alimentación un aminoácido esencial, entonces el organismo se ve obligado a desintegrar sus proteínas propias para adquirir el aminoácido en cuestión. La consecuencia de esto es un balance nitrogenado negativo y una pérdida de peso corporal. Los síntomas de la carencia son, posteriormente, pérdida de apetito y alteraciones de la córnea y del cristalino. Junto a estos síntomas generales de carencia de un aminoácido esencial se encuentran también otros típicos, que son los fenómenos especiales de carencia.

En la síntesis bioquímica de las proteínas corporales deben existir todos los aminoácidos esenciales. Sin la presencia de cinco aminoácidos esenciales, por ejemplo, en una mezcla con la que se alimentan ratas durante una hora, se dejan luego ayunar otra hora y se alimentan de nuevo durante la siguiente con esos cinco aminoácidos solamente, y continuando repetidas veces este tratamiento, aquellos animales sufren una pérdida de peso como signo de la síntesis inhibida de las proteínas del cuerpo. Por el contrario, ganan peso en seguida si se les administran simultáneamente todos los aminoácidos esenciales.

En la tabla se expresan las necesidades humanas en aminoácidos esenciales.

Necesidades en aminoácidos esenciales en el adulto

(Según W. C. Rose)

<u>aminoácido</u>	<u>cantidad necesaria mínima (g/día)</u>	<u>aporte ideal (g/día)</u>
isoleucina	0.70	1.4
leucina	1.10	2.2
lisina	0.80	1.6
metionina	1.10	2.2
fenil alanina	1.10	2.2

}	treonina	0.50	1.0
	triptófano	0.25	0.5
	valina	0.80	1.6

(12)

### EL PATRON DE REFERENCIA

El valor nutricional de cualquier proteína o mezcla de aminoácidos para un animal, debe relacionarse con sus necesidades individuales de crecimiento y manutención. La edad, sexo, convalecencia, enfermedad, estado con respecto a la preñez, lactancia, historia nutricional, etc., son factores de importancia en la determinación de requerimientos individuales. En vista de las muchas variables obviamente es inválido hacer la suposición general de que el requerimiento de aminoácidos de un sector específico de la población puede servir como un criterio universal para la evaluación de las proteínas en la dieta. Por esta razón, parece preferible adoptar como patrón, una proteína animal de valor nutricional óptimo, de acuerdo a un criterio biológico. En la amplia gama de alimentos, la única designada específicamente como una lógica elección, para la alimentación, parecería ser la leche humana. Esta ha sido recomendada por Kuhnau (1949), Nehring y Schwerdtfeger (1951) y otros, como patrón. Sin embargo, Oser (1951), Mitchell y Block (1946) y la FAO han preferido adoptar como referencia patrón la proteína del huevo entero (13). Esta es utilizada casi completamente por la rata, el perro y el hombre y no mejora significativamente su Valor Biológico por suplementación con cualquiera de los aminoácidos. La adopción de una proteína ideal como un patrón trae como consecuencia la suposición corolaria de que el porcentaje en exceso de un aminoácido esencial en una proteína, con respecto a su porcentaje en el patrón, puede ignorarse. En otras palabras, el valor de la proteína animal en este sentido se considera como igual, pero no mayor que el patrón. (14)

### INDICE DE AMINOACIDOS ESENCIALES (Indice AAE)

Un sistema de estimación de proteínas de la dieta, que se basa en que la eficiencia de utilización es función del producto de los aminoácidos esenciales que están disponibles en el sitio de síntesis, es el Índice de Aminoácidos Esenciales (Indice AAE), que se define como la media geométrica de los promedios de los aminoácidos esenciales en la proteína

alimenticia con relación a su contenido en una proteína de referencia altamente nutritiva, como la del huevo entero. La aplicación de la ecuación es como sigue:

$$\text{Valor Biológico} = 1.09 (\text{AAE}) - 11.7$$

y conduce a un acuerdo entre los valores biológicos predichos y los observados. (1.09 y 11.7 son datos empíricos de correlación).

El Índice AAE no solo integra todos los aminoácidos esenciales en el cálculo, sino que permite la estimación del efecto de la suplementación de aminoácidos o proteínas sobre los valores biológicos.

La tabla de Índice AAE siguiente está referida a la de composición de la proteína de huevo:

Contenido de aminoácidos esenciales de la proteína del huevo entero

<u>aminoácido</u>	<u>Block y Bolling</u>	<u>Orr y Watt</u>
leucina	9.2 %	8.8 %
lisina	7.0	6.4
treonina	4.3	4.98
fenil alanina	6.3	5.78
isoleucina	7.7	6.6
valina	7.2	7.42
triptófano	1.5	1.65
metionina	4.0	3.14

Índice de aminoácidos esenciales y valores biológicos de proteínas alimenticias

<u>Descripción<sup>a</sup></u>	<u>Índice AAE<sup>b</sup></u>	<u>VB predicho<sup>c</sup></u>
<b>Leche</b>		
De vaca, entera, descremada, evaporada o seca	88	84
Humana	87	83
<b>Productos lácteos</b>		
Suero de manteca	88	84
Caseína	88	84
queso cheddar, otros quesos maduros <sup>d</sup> , y alimentos de queso procesado	86	82
Cottage	86	82
queso crema	82	77
Lactoalbúmina	89	85

*calculado de los datos de Orr y Watt*

Suero, secado	69	61
Huevos, pollo		
Entero, crudo o seco	(100)	97
Blancos, crudos o secos (clara)	95	92
Yema, cruda o seca	93	89
Carne		
De res, fresca o enlatada <sup>e</sup>	84	80
De cordero, fresca o enlatada <sup>e</sup>	84	78
De puerco, fresca o enlatada <sup>e</sup>	83	79
Jamón y otros curados, frescos, cocidos o enlatados	81	77
De ternera, fresca o enlatada	83	79
Aves		
Pollo, músculo sin piel	82	78
Pato, músculo sin piel	82	78
Pescados y mariscos		
Pescado, fresco o enlatado	80	76
Mariscos, camarón, fresco o enlatado	67	61
Otros mariscos	76	71
Harina de pescado	77	73
Gelatina	25	16
Molleja, pollo	75	70
Corazón	86	82
Riñón	86	82
Hígado	89	85
Salchicha conteniendo hígado	83	78
Otras salchichas	77	72
Lengua, fresca o ahumada	82	77
Legumbres, semillas y sus productos		
Frijoles, incluyendo judías, frijol blanco, pinto, rojo y otros	80	75
Fresco	80	75
Cocido con puerco, enlatado	65	60
Cocido con salsa de tomate, enlatado	73	68
Negro ("Phaseolus mungo")	80	76
Garbanzo ("Cicer arietinum")	77	72
Lenteja ("Lens culinaris")	71	65
Haba ("Phaseolus lunatus")	78	74
Cacahuete, harina, pasta	69	64

Chícharo ("Fisum sativum")	81	77
Soya y harina ("Glycine max")	83	78
Leche de soya	86	82
Nueces comunes		
Almendras ("Prunus amygdalus")	64	58
Nuez de Brasil ("Bertholletia excelsa")	69	64
Coco	68	63
Avellana ("Corylus spp.")	68	62
Nuez de nogal ("Juglans regia")	70	65
Semillas y harina		
Semilla del algodón y harina ("Gossypium spp")	72	67
Semilla de ajonjolí y harina ("Sesamum indicum")	73	68
Girasol ("Helianthus annuus")	71	66
Granos y sus productos		
Cebada ("Hordeum vulgare")	66	60
Pan: hecho con harina de trigo refinada	64	58
Trigo sarraceno ("Fagopyrum esculentum")	73	68
Maíz, harina, sémola ("Zea mays")	67	61
Productos de maíz		
Hojuelas	60	54
Germen	73	67
Gluten	63	57
Maíz machacado	68	62
Tortilla	66	60
Zeína	31	22
Mijo perlado ("Pennisetum glaucum")	75	70
Avena ("Avena sativa")	72	67
Arroz ("Oryza sativa")	73	68
Centeno ("Secale cereale"), grano entero y harinas de extracciones diferentes	68	62
Sorgo ("Sorghum vulgare")	70	65
Trigo ("Triticum aestivum"): grano entero y harina de grano entero	64	58
Harina blanca	61	54
Productos de trigo		
Salvado	71	66
Germen	74	69
Glúten	60	54



Macarrones o spaghetti	55	48
Tallarines (conteniendo sólidos de huevo)	67	61
Trigo desmenuzado	65	59
Vegetales: semillas inmaduras		
Maíz ("Zea mays")	72	66
Garbanzo ("Cicer arietinum")	79	74
Judía ("Phaseolus lunatus")	84	79
Chícharo ("Fisum sativum")	64	58
Vegetales frondosos		
Col ("Brassica oleracea var. capitata")	56	49
Espinaca ("Spinacia oleracea")	82	77
Nabo ("Brassica rapa")	76	71
Raíces feculentas y tubérculos		
Mandioca, raíz y harina ("Manihot esculenta")	54	47
Papas ("solanum tuberosum")	65	59
Camotes ("Ipomoea vatatas")	82	78
Otros vegetales		
Espárrago ("Asparagus officinalis")	62	56
Betabel ("Beta vulgaris")	39	31
Brócoli ("Brassica oleracea var. botrytis")	73	68
Zanahoria ("Daucus carota")	59	52
Coliflor ("Brassica oleracea var. botrytis")	73	68
Berenjena ("Solanum melongena")	57	50
Calabaza ("Cucurbita pepo")	54	47
Tomate y jitomate ("Lycopersicon esculentum y L. esculentum cerasiforme")	48	41
Alimentos diversos		
Levadura de panificación	80	76
Levadura para bebidas	83	79
Levadura ("Saccharomyces cerevisiae")	82	77
Levadura Torula ("Torulopsis utilis")	88	85

<sup>a</sup>Registrado por Orr y Watt (1957)

<sup>b</sup>Calculado de los datos de Orr y Watt (1957)

<sup>c</sup>VB = 1.09 (AAB) - 11.73

<sup>d</sup>Incluye clases tales como Azul, Limburger y Suizo

<sup>e</sup>Basado en datos de muchos cortes

Es importante conocer qué alimentos son deficientes en aminoácidos - esenciales y, específicamente, en cuál o cuáles de ellos lo son, así como también aquéllos que son ricos en algún aminoácido. La siguiente tabla muestra estos datos; en ella las abreviaturas significan: Lis - Lisina, i-Leu - Isoleucina, Tre - Treonina, Val - Valina, Leu - Leucina, Tri - Triptófano, Met - Metionina, Ala - Fenil Alanina.

<u>Alimentos</u>	<u>Deficiente en</u>	<u>Rico en</u>
<b>Cereales</b>		
Avena	Lis	
Arroz blanco	Lis, Tre	
Cebada	Lis, i-Leu	
Centeno	Lis, Tri, Met	i-Leu
Maíz en grano o harina	Lis, Tri	Leu
Corn Flakes	Lis, Tri	i-Leu
Pinole	Lis, Val, Tri, Met	Leu
Tortilla	Lis, Tri	Leu
Trigo (promedio)	Lis, Met	
Harina de trigo 70-80%	Lis, Met	
Pan	Lis	
<b>Leguminosas y oleaginosas</b>		
Ajonjolí	Lis	Tri
Alverjón	Met	Lis
Almendras	Lis, Tre	
Alubia	Val, Met	Tre, Ala
Cacao	Met	
Cacahuete	Lis, Met	
Frijol	Met	
Garbanzo	Met	
Haba seca	Met	i-Leu, Leu
Lenteja	Met	
Nuez de nogal	Lis, Met	
Piñón	Lis, Tri, Met	
Soya	Met	
Semilla de calabaza	Lis, Met	
<b>Verduras</b>		
Acelgas	Lis, Met	
Berro	Met	

Betabel	Lis, i-Leu, Val, Leu, Met, Ala	
Calabaza	Met	
Cebolla	i-Leu, Val, Tre, Leu, Met, Ala	
Col	Lis, i-Leu, Val, Tri, Met	
Chicharos	Met	Ala
Chile (promedio)	Lis, Val, Leu, Tri, Met	
Chile poblano	Lis, Val, Leu, Tri, Met	
Chile jalapeño	Lis, Val, Leu, Tri, Met	
Chile seco	Lis, Val, Leu, Tri, Met	
Ejotes	Met	
Elote	Val, Tri, Met, Ala	Leu
Espinaca		Tre, Leu, Ala
Huauzontle	Val, Leu, Met	Tri
Hongos	i-Leu, Val, Leu, Met, Ala	
Jitomate	Lis, i-Leu, Tre, Val, Leu, Met, Ala	
Lechuga	Tri	
Malva	Met	Tri
Nabo	Lis, i-Leu, Val, Leu, Met, Ala	
Nopales	Tri, Met	
Pepino	i-Leu, Val, Leu, Tri, Met, Ala	
Rábano	Tri	
Romeritos	Lis, Val, Met	
Zanahoria	i-Leu, Tri, Met, Ala	
<b>Raíces feculentas</b>		
Camote	Lis	Tri
Malanga	Lis, i-Leu, Met	
Papa	Met	Tri
<b>Frutas frescas</b>		
Chabacano	Lis, i-Leu, Tre, Val, Leu, Tri, Met, Ala	
Dátil	Lis, i-Leu, Val, Leu, Tri, Met, Ala	
Durazno	i-Leu, Leu, Tri, Ala	Met
Fresa	i-Leu, Val, Met, Ala	
Guayaba	i-Leu, Tre, Val, Leu, Met,	

	Ala	
Higo	i-Leu, Leu, Met, Ala	
Mango	i-Leu, Tre, Val, Leu, Met	Lis, Ala
Manzana	Met, Ala	
Mandarina	Lis, i-Leu, Tre, Val, Leu, Tri, Met, Ala	
Mamey	i-Leu, Tre, Val, Leu, Met, Ala	Lis
Melón	Lis, i-Leu, Tre, Val, Leu, Tri, Met, Ala	
Naranja (jugo)	Lis, i-Leu, Tre, Val, Leu, Tri, Met, Ala	
Piña	Lis, i-Leu, Tre, Val, Leu, Met, Ala	
Plátano	i-Leu	
Papaya	i-Leu, Tre, Val, Leu, Met, Ala	
Sandía	Lis, Tri	
Toronja	Lis, i-Leu, Tre, Val, Leu, Tri, Met	
Tuna	Met	
Uva	Lis, i-Leu, Val, Tri, Met Ala	
<b>Carnes y Vísceras</b>		
Cerdo		Lis
Carnero		Lis
Chicharrón	i-Leu, Val, Leu, Tri, Met, Ala	Lis
Chorizo		Lis, i-Leu, Tre
Grenetina	i-Leu, Tre, Val, Leu, Tri, Met, Ala	
Hígado(promedio)		Lis, Leu
Res		Lis
Salchicha	Tri	Lis
Pollo		Lis
Pato	Tri	Lis
Guajolote (pavo)	Tri	Lis
Conejo	Tri	Lis
Iguana		Lis, i-Leu, Tre Leu

Pescados y mariscos

Ajolotes	Met	Lis
Atún (enlatado)	i-Leu, Tre, Leu	Lis
Camarón		Lis
Carpa asada		Lis, i-Leu, Tre
Pescado (enlatado)		Lis
Pescado fresco (todos los tipos)		Lis
Pescado salado	Tri	Lis, Met
Pulpos o moluscos	Val	Lis, Tre
Salmón (enlatado)		Lis

Leche y derivados

Leche fresca de vaca		Lis, Leu
Leche pasteurizada	Tri	Leu, Ala
Leche evaporada		Lis, Leu
Leche en polvo		Leu
Leche humana	Tri	
Quesos, todos los tipos	Tri	Lis, Val, Leu
Queso Cottage		Lis, Leu
Queso crema		Lis, Leu, Ala
Queso Cheddar		Lis, i-Leu, Leu
Requesón		Lis, i-Leu, Tre Leu, Tri

Bebidas

Pulque	i-Leu, Tre, Val, Leu, Tri, Met	
--------	-----------------------------------	--

Huevos

Huevo fresco o desecado	-Patrón de referencia-	
-------------------------	------------------------	--

(15)

LA LISINA

## Nomenclatura

ácido 2,6-diaminohexanoico

ácido  $\alpha$ ,  $\epsilon$ -diaminocaproico

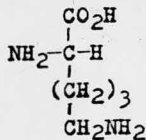
## Fórmula empírica

 $C_6H_{14}O_2N_2$  ; C 49.29%, H 9.65%, O 21.89%, N 19.16%

## Peso molecular

146.19

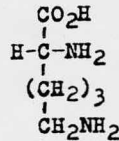
## Estructura y designación de estereoisómeros



L-Lisina

l(+)-Lisina

d-Lisina



D-Lisina

d(-)-Lisina

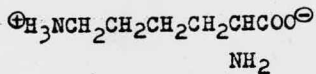
l-Lisina

(16)

## Símbolo de tres letras

Lis

## Fórmula



## Punto isoelectrico

9.74

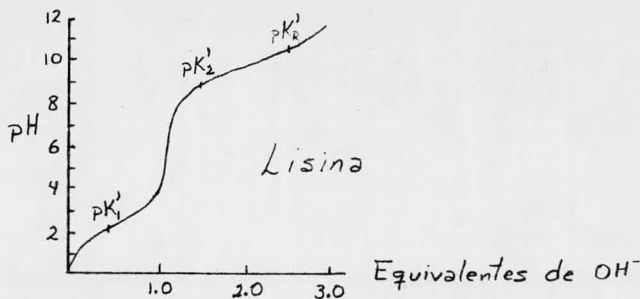
(17)

## Valores de pK'

pK <sub>1</sub> '	pK <sub>2</sub> '	pK <sub>3</sub> '
$\alpha$ -COOH	$\alpha$ -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	grupo R
2.18	8.95	10.53

## Curva de valoración

Las curvas de valoración de los aminoácidos con grupos R que se ioni



zan (tal como la lisina), son complejas, puesto que la curva correspondiente a la disociación del grupo R se superpone a las curvas de valoración de los grupos  $\alpha$ -amino y  $\alpha$ -carboxilo.

Rotación específica en agua

	$[\alpha]_D^{25}$	
L-Lisina	+13.5	
D-Lisina	-13.5	(2)

## HISTORIA

En 1889 Drechsel obtuvo lisina, aunque en ese momento no se enteró de ello. Hidrolizó caseína en HCl y cristalizó el clorhidrato del ácido L-glutámico. El licor madre se diluyó con agua. El precipitado fue removido, lavado y descompuesto por agitación con  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ . El filtrado del fosfotungstato de bario fue liberado del exceso de iones bario, permaneciendo una sustancia cristalina separada, que se pensó sería el clorhidrato de una base fuerte, se trató con carbonato de plata y se produjo un filtrado sumamente alcalino. Obtuvo muy probablemente una mezcla de los clorhidratos de lisina, histidina y arginina. Para aislar la lisina trató la mezcla con cloruro platínico.

Al año siguiente Drechsel adicionó nitrato de plata al hidrolizado cloruro-proteína libre, separando una sal de composición  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{AgNO}_3 \cdot \text{HNO}_3$ . Tratando este material con  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  hubo producción de urea, un fenómeno que impresionó tanto a Drechsel que designó a ese material básico "Lisitina", del griego "liberación", descripción reservada al origen de la urea de esta fuente desconocida entonces. Cinco años después Hedin demostró que la lisitina es una mezcla de lisina y arginina.

El siguiente reporte del laboratorio de Drechsel apareció en 1891 ba

jo la firma de Siegfried, el cual se interesaba principalmente por el -  
cloroplatinato cristalizado antes por Drechsel, con la siguiente composi-  
ción  $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot C_2H_5OH \cdot PtCl_6$ . Se observó que la base libre de este com-  
puesto se combinaba con dos equivalentes de HCl, lo cual indicaba la pre-  
sencia de al menos dos grupos básicos en la molécula. También Siegfried  
puso en claro que el nuevo compuesto básico estaba presente en varias -  
proteínas.

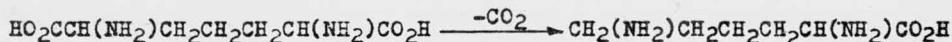
El nombre "lisina" fue dado finalmente a esta base en un artículo de  
Drechsel, en 1891, en el cual se sugirió que podría tratarse de un ácido  
diaminocaproico. En 1899 Larrow determinó que la lisina aislada por hi-  
drólisis ácida era ópticamente activa y relativamente independiente de -  
la concentración del HCl; esto significaba que el aminoácido poseía un -  
centro de asimetría óptica, de tal modo que el compuesto representaba un  
 $\alpha$ -aminoácido.

La síntesis de lisina por Fischer y Weigert en 1902, dió la eviden-  
cia final sobre la estructura del compuesto.

La inconveniencia del método de Drechsel, además de su alto costo, -  
lo movieron a que intentara el aislamiento del aminoácido de la sal de -  
bario de su derivado dibenzoilo. Kossel rechazó ambos procedimientos y -  
sugirió el uso de la sal de monopicrato. Este fué y ha sido desde enton-  
ces, el procedimiento usado con más frecuencia para aislar lisina en -  
gran cantidad de un hidrolizado proteico. La observación de Kossel y Kut-  
scher de que las prolaminas producían poca o ninguna lisina en la hidró-  
lisis, sentó las bases para el trabajo preliminar sobre nutrición experi-  
mental, en el que el uso de estas proteínas en la dieta de animales reve-  
ló la naturaleza esencial de este aminoácido para el crecimiento.

Procedimientos más recientes para el aislamiento de lisina incluyen  
aquellos de Bergmann y Zervas y de Kurtz. En el primero se reflujo gela-  
tina con HCl 6N. El método de Kurtz envuelve la eliminación preliminar -  
de arginina como flavianato y la conversión de los aminoácidos restantes  
a sus sales de cobre.

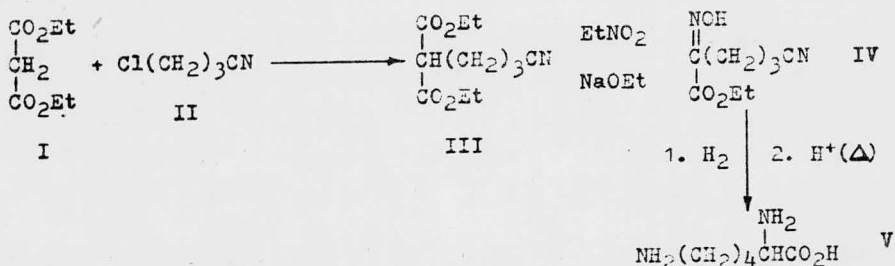
Un interesante proceso biológico comprende la descarboxilación enzi-  
mática del ácido  $\alpha, \epsilon$ -diaminopimélico. El procedimiento comercial em-  
pleado por Charles Pfizer Co. para la preparación del compuesto, abarca  
una reacción de fermentación con una cepa de "Escherichia coli"; la reac-  
ción básica involucrada es



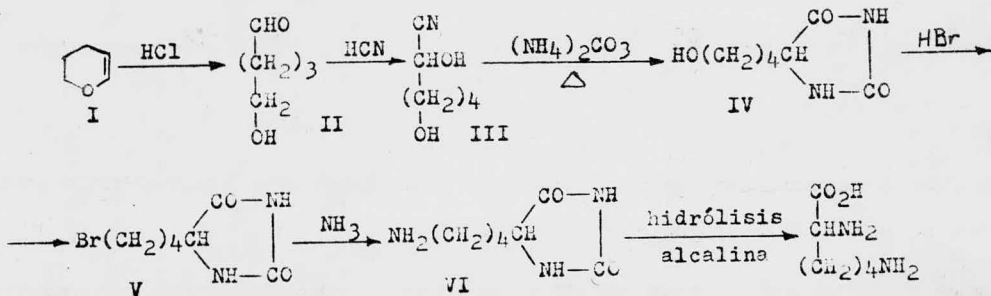


SINTESIS

Desde 1902, Fischer y Weigert realizaron la primera síntesis de lisina. Esta se efectuó por una condensación inicial de ester malónico (I) - con  $\gamma$ -clorobutironitrilo (II), seguida por tratamiento del ester  $\gamma$ -cía nopropropilmalónico (III) con nitrito de etilo, en presencia de etóxido de sodio, que produjo  $\alpha$ -oximino- $\delta$ -cianovalerato; la reducción de éste con sodio en solución de etanol, seguida de hidrólisis, condujo a la lisina (15.5% de rendimiento). (16)

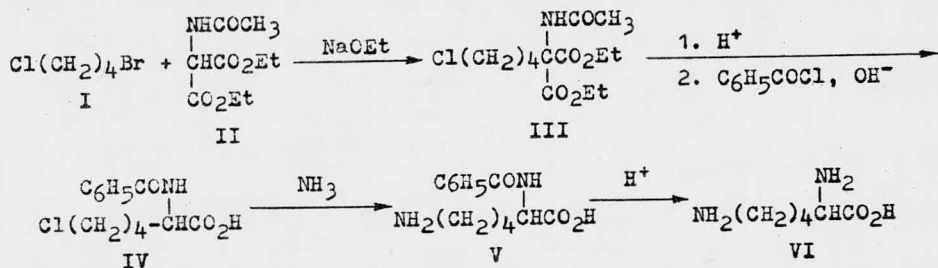


Gaudry, en 1948, describió una excelente y económica síntesis de lisina, por medio de una cianhidrina. La materia prima, dihidropropano (I), fue convertida a  $\delta$ -hidroxivaleraldehído (II) por acción de HCl caliente y diluido. El tratamiento de (II) con cianuro de hidrógeno produjo nitrilo  $\alpha, \epsilon$ -dihidroxicaproico (III), el cual, después de reaccionar con carbonato de amonio, dió 5-(4-hidroxbutil)hidantoina (IV). Este compuesto fue transformado al correspondiente halo derivado (V) por tratamiento con haluro de hidrógeno. La amonólisis de (V), sucedida por hidrólisis alcalina del producto de aminación (VI), condujo a la lisina (40-46% de rendimiento). (16)

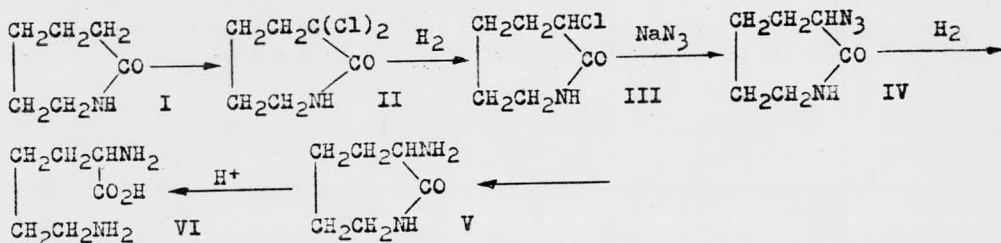


Un procedimiento que da un rendimiento alto de lisina (como 55%) fue descrito por Servigne y Szervasi. La materia prima fue 1-bromo-4-clorobu

tano (I). Los dos átomos de halógeno son de una reactividad bastante diferente, como se atestigua por el hecho de que la condensación con dietilacetamidomalonato (II) resultó en la formación de dietil  $\delta$ -clorobutilacetamidomalonato (III). La hidrólisis ácida de (III) produjo ácido  $\alpha$ -amino- $\epsilon$ -cloro-n-caproico que no fue aislado como tal sino como el derivado  $\alpha$ -benzoilo (IV) después de benzoilación "in situ" en un medio débilmente alcalino. Un tratamiento con  $\text{NH}_3$  a temperatura alta, convirtió a (IV) en  $\alpha$ -benzoil-DL-lisina (V). La hidrólisis de (V) con HCl concentrado, seguido por neutralización parcial de la mezcla de reacción, permitió el aislamiento del clorhidrato de lisina (VI). (16)



Una nueva ruta para síntesis de lisina ha sido descrita por Brenner y Rickenbacher. La caprolactama (I) fue tratada sucesivamente con oxiclo- ruro de fósforo, pentacloruro de fósforo y cloruro de sulfurilo, después de lo cual se formó  $\alpha, \alpha$ -diclorocaprolactama (II). La acción controlada de Ni Raney sobre (II) produjo  $\alpha$ -monoclorocaprolactama (III), que fue convertida a  $\alpha$ -azidocaprolactama (IV) por tratamiento con azida de so- dio, y luego, pasando por reducción con Ni Raney, a  $\alpha$ -aminocaprolactama (V). La hidrólisis ácida de (V) produjo DL-lisina, que se aisló con un - rendimiento de aproximadamente 50%. (16)



## PROPIEDADES QUIMICAS

1) La lisina, al ser tratada con HCl, puede formar el monoclorhidrato en la posición  $\alpha$  o en la  $\epsilon$ .

2) Puede metilarse bien en un solo grupo ( $\alpha$  o  $\epsilon$ ) o en los dos grupos.

3) Puede adicionar bien una sola molécula de cloruro de acetilo o de anhídrido acético (en  $\alpha$  o  $\epsilon$ ) o 2 moléculas de uno y otro.

4) El  $\text{HNO}_2$  a  $8^\circ$  descompone el grupo  $\alpha$ -amino liberando nitrógeno; en el caso de la lisina, se pueden descomponer los dos grupos  $\text{NH}_2$  a  $32^\circ$ , dando el oxiácido correspondiente y al cabo de 5 minutos la reacción es cuantitativa.

5) Con el formaldehído el carácter básico del grupo amino se destruye porque se reemplaza su H por un grupo metileno y entonces queda el grupo carboxilo manifestándose con todo su carácter ácido.

6) Reacciona con las bases debido a la presencia del grupo carboxilo, produciendo el lisinato de sodio.

7) Produce ésteres con alcohol y HCl.

8) Los haluros de acilo pueden formarse a partir de lisina con tal de que se proteja previamente el grupo amino, por ejemplo, mediante acetilación. El grupo protector (COCH) se puede eliminar por tratamiento con HCl.

9) Calentando lisina con hidróxido bórico desprende  $\text{CO}_2$  y produce ca daverina.

10) Se deshidrata para dar dicetopiperacinas, las cuales producen péptidos, cuando se hierve con HCl.

11) La reacción con ninhidrina en caliente y en soluciones neutras o débilmente ácidas descompone la lisina produciendo  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  y el siguiente aldehído inferior, tomando una coloración azul. (18)

12) El cloroaurato se obtiene de una solución fuertemente clorhídrica con cloruro de oro.

13) Para diferenciar la arginina y la histidina de la lisina se tratan las soluciones acuosas con nitrato de plata y agua de barita, la lisina no precipita y tampoco lo hace con acetato de plomo, tanino y yoduro bismuto potásico. Pero sí precipita con ácido fosfowolfrámico, cloruro mercuríco y agua de barita o nitrato mercuríco y lejía de sosa.

14) Por destilación seca produce algo de penta metileno diamina; también se produce este cuerpo por acción de algunas bacterias.

- 15) No da coloración con el reactivo de Nessler.
- 16) Con sales cúpricas da un precipitado en láminas azul obscuro, fusible a  $210^{\circ}\text{C}$  con descomposición.
- 17) Con ácido picrolónico da un precipitado en agujas que funde a  $-246-252^{\circ}\text{C}$ .
- 18) Con cloruro de benzoilo da precipitado el isómero dL en láminas incoloras fusibles a  $145-146^{\circ}\text{C}$ .
- 19) Con fenil hidantoína la dextro da un precipitado voluminoso no cristalino que funde a  $183-184^{\circ}\text{C}$  y la dL que funde a  $196^{\circ}\text{C}$ . (19)
- 20) Reacción de Bratton Marshall, con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etileno diamino. No presenta coloración alguna siendo en este caso negativo.

21) Con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  más pequeña cantidad de cloruro estano la lisina en caliente da coloración blanca, con alcohol da un ligero precipitado blanco.

22) La lisina con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y pequeña cantidad de difenilamina calentando un poco da coloración café amarillenta, agregando alcohol la coloración es café.

23) Con el reactivo de ácido selenioso en frío la lisina presenta color amarillo naranja, en caliente rosada.

La producción de compuestos coloreados la atribuye Levine a la acción oxidante del ácido selenioso y también estableció que un precipitado rojizo acompañado o siguiendo a la primera reacción coloreada se debe a la reducción del ácido selenioso con la liberación del selenio meta loide.

24) El monoclorhidrato de lisina, acidulado ligeramente con HCl, agregándole ninhidrina e hirviendo unos cuantos minutos presenta reacción negativa al agregarle reactivo de Antrona.

25) Al ser tratada la lisina con las sales de zinc, por ejemplo con  $\text{ZnSO}_4$ , no forma precipitado alguno.

26) La lisina presenta reacción negativa si al ser hervida unos minutos con ninhidrina se le agrega solución de p-hidroxidifenilo. Cuando la reacción es positiva al ser tratada con ninhidrina se forma el aldehído inferior del aminoácido y para dosificar este aldehído se emplea el p-hidroxidifenilo, el cual se copula con el aldehído produciéndose color violeta intenso.

## DETERMINACION DE LISINA

El análisis de material proteico para lisina es frecuentemente parte de un largo y extenso sistema analítico para muchos aminoácidos, como con los analizadores corrientes de aminoácidos que emplean cromatografía en columna por intercambio de iones. Otros métodos abarcan colorimetría, microbiología, cromatografía en papel o técnicas enzimáticas, y pueden requerir fraccionación previa de la muestra. (21)

### CROMATOGRAFIA DE GASES

El espectro completo de aminoácidos puede determinarse por métodos de intercambio de iones. Desde 1970 han llegado a ser aprovechables una variedad de instrumentaciones automatizadas excelentes. El método de intercambio de iones permite el análisis de un solo aminoácido o simultáneamente para 20, de proteínas naturales, en un rango de tiempo de 10 min - 60 min. (22)

Este tipo de cromatografía de gases puede mejorarse si se aumenta la altura de la columna a 12 pies y se disminuye la temperatura y el arrastre; con esto se logra mayor exactitud y precisión (un 50%). (23)

Un buen analizador de aminoácidos es el EEL 193 (Evans Electroselectium Limited, UK). (24)

### CROMATOGRAFIA DE GAS-LIQUIDO (CGL)

El CGL ofrece un método excelente para análisis de lisina. El método requiere la conversión de lisina a su éster volátil N-trifluoracetil n-butyl y analizar con temperatura programada. (22)

El paso de preparación (conversión al éster) requiere 30 min. La separación cromatográfica lleva menos de 25 min. Una alícuota de los aminoácidos en la muestra a pH 1 se pasa a través de una pequeña columna de resina intercambiadora de cationes en la forma  $H^+$ . Los aminoácidos son retenidos en la columna y eluidos cuantitativamente usando hidróxido de amonio. Los aminoácidos son esterificados con HCl 3N en N-butanol. Los n-butyl ésteres se forman por calentamiento de la mezcla por 15 min a  $100^{\circ}C$ . Entonces los ésteres son acilados con anhídrido trifluoroacético por calentamiento de la mezcla a  $150^{\circ}C$  por 5 min. La preparación total de derivados requiere 30 min. La técnica es exacta, simple y barata. (25)

Recientemente se ha desarrollado un método corto y sencillo de formación de derivados y aplicado particularmente al suero sanguíneo, por Jellum et al. (26)

Dentro de los métodos de precisión hay uno rápido, requiere un mínimo de equipo y es de una seguridad muy grande. Además tiene la gran ventaja de que el proceso puede ser suspendido temporalmente, guardando las preparaciones. A continuación se describe dicho procedimiento:

- 1) Se colocan 0.500 g de harina en tubos de cultivo con tapa de Teflon.
- 2) Se añaden 10 ml de HCl 6N (acuoso) y se cierra estrechamente.
- 3) Se calienta en horno a 110°C por 24-48 hr. Estos hidrolizados pueden guardarse a 4°C al menos 7 semanas.
- 4) Se enfría el hidrolizado a temperatura ambiente. Se filtra el líquido en matraz volumétrico de 25 ml a través de papel filtro Whatman 40, se lava el residuo negro con HCl 0.1N acuoso y se afora el filtrado.
- 5) Se pipetea 8-15 ml de hidrolizado en un matraz Erlenmeyer de 50 ml con conexión de 19/38. Puede añadirse monoclóridato de lisina (2 ml en HCl 0.1 N acuoso, 0.60 mg/ml) a una muestra por duplicado para la calibración. Se reduce el volumen a 2 ml en una plancha caliente; luego se evapora casi a sequedad al vacío en un evaporador rotatorio y baño de glicerina (85°C). Tales preparaciones pueden guardarse a 4°C por varios días.
- 6) Se esterifica el grupo -COOH, añadiendo 4 ml de cloruro de tionilo etanólico (SOCl<sub>2</sub>, 5% v/v, preparado añadiendo SOCl<sub>2</sub> lentamente a etanol anhidro frío en un baño de acetona-CO<sub>2</sub> sólido).
- 7) Se refluxa 45 min sobre una plancha caliente bajo condensador vertical de aire (18 pulgadas de largo) con juntas lubricadas con vaselina.
- 8) Se evapora a sequedad en evaporador rotatorio con baño de glicerina a 85°C, se puede guardar menos de 8 hr a 4°C antes de proceder al paso 9.
- 9) Después que los matraces del paso 8 se han enfriado a temperatura ambiente, se disuelve la muestra en 1.8 ml de etanol anhidro que contenga el estándar de fenantreno (0.66 mg/ml). El fenantreno total por muestra es de 1.20 mg.
- 10) Se añade Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.2 g), se agita y se espera 10 min o más.
- 11) Se añaden 0.2 ml de pivaldehído (guardar a 4°C). Se tapan los matrazes con corcho y hoja de aluminio. Se deja reposar 90 min en un horno a 50°C para completar la formación de derivados de lisina.

12) Se decanta en un frasco pequeño con tapa.

13) Cromatografía de gases. Para guardar más de 6 hr después de los pasos 11 y 12, se coloca a 4° en la oscuridad. Normalmente 1.0  $\mu$ l de muestra es suficiente para la cromatografía. Las condiciones óptimas para la cromatografía se dan en la siguiente tabla.

Condiciones óptimas de la Cromatografía

Temperatura de la columna	200-210°C
Temperatura del inyector	225°C
Temperatura del detector	225°C
Flujo de hidrógeno (para el detector)	35 ml/min
Flujo de aire (para el detector)	350 ml/min
Acarreador de gas (Nitrógeno)	15 ml/min, 22-30 psi
Sensibilidad del electrómetro	2 x 10 <sup>-11</sup> A/mV
Integrador digital electrónico	
Atenuador	10
Ancho del pico, ½ altura	30 seg
Sensibilidad de inclinación	0.5 $\mu$ V/seg
Corrección promedio de vaselina	1.5 $\mu$ V/seg
Velocidad de conteo	125 Hz/mV
Muestra	1.0 $\mu$ l
Tiempo de retención (para el pico máximo)	
Lisina	6-8 min
Fenantreno (estandar interno)	11-13 min

Un operador puede fácilmente realizar las cromatografías de 4-6 muestras por hora. (21)

MÉTODOS COLORIMÉTRICOS

Dentro de estos métodos el más utilizado para medir lisina es el que usa ninhidrina como reactivo.

Un artículo reciente (27) reportó una relación lineal entre la densidad óptica (DO) y la concentración de lisina en el rango de 0-3.5  $\mu$ moles por 6.4 ml de alicuota. Se realiza una curva estandar con lisina estandar, buffer de pH 3.1 y ninhidrina ácida. Para ello se pipetea alicuotas de 2 ml de buffer y soluciones estandar de lisina por triplicado en tubos de tres tamaños: 127 x 12.7 mm, 152 x 15.9 mm y 152 x 25.4 mm. Se

añaden alicuotas de 4 ml de ninhidrina ácida y las soluciones se mezclan; entonces los tubos se tapan con papel aluminio y se colocan en agua hirviendo fuertemente por 15 min exactamente. Las soluciones producidas se enfrían en agua corriente por 15 min, y las densidades ópticas se leen contra agua destilada en celdas de 1 cm con un espectrofotómetro. La longitud de onda usada fue de 440 nm.

Concentración de lisina estandar y densidades ópticas obtenidas en tres tubos de prueba

Aminoácido ( $\mu$ moles/6 ml)	Densidad óptica		
	127 x 12.7 mm	152 x 15.9 mm	152 x 25.4 mm
0	0.022	0.022	0.024
0.25	0.211	0.206	0.201
0.5	0.366	0.346	0.320
1.0	0.630	0.575	0.495
1.5	0.800	0.747	0.686
2.0	0.917	0.892	0.887
2.5	1.097	1.097	1.113

Los datos muestran una relación sigmoidea entre la DO y la concentración de lisina, e ilustra que la forma precisa de la curva está influenciada por el diámetro de los tubos usados para desarrollar el color.

Hay dos ventajas potenciales de la ninhidrina ácida sobre la ninhidrina amortiguada con acetato convencional. Los colores producidos con ninhidrina amortiguada con acetato convencional son similares para lisina y ornitina. Además, varios compuestos que producen intenso color por reacción con ninhidrina amortiguada dan poco o ningún color con ninhidrina ácida (la ornitina desarrolla cinco o seis veces más color con ninhidrina ácida que una solución equimolar de lisina). (28), (29)

En la selección de mutantes ricos en lisina del maíz, sorgo, cebada y otros granos se usa una mezcla de buffer - ninhidrina seca. Las semillas cortadas longitudinalmente se cubren con agua y la mezcla en tubos, luego se calienta a ebullición y se deja reposar 5 min. La intensidad de color por ninhidrina es mucho mayor en los tubos que contienen los mutantes ricos en lisina que en los tubos conteniendo granos normales. Comparaciones cuantitativas demostraron que los mutantes ricos en lisina contienen 3-4 veces más moléculas solubles en agua que reaccionan con ninhidrina por 100 mg de proteína que sus equivalentes normales. (30), (31)



Otro método de determinación del contenido de lisina es el de la técnica del enlace-colorido, recomendable para cereales. Se usa Naranja G como colorante. El contenido de lisina determinado por este método está correlacionado ( $r = 0.863$  y  $0.844$  respectivamente, para las cosechas de centeno de 1970 y 1971) con el contenido de lisina determinado microbiológicamente. (32), (33)

Un método espectrofotométrico rápido para determinación de lisina en granos de cereal usa como reactivo dinitrobenzensulfonato de sodio (DNBS). La absorbancia de la solución ácida del derivado DNBS es leída a 385 nm. El reactivo es sensible y específico para lisina libre o unida a proteínas, bajo ciertas condiciones. Para arroz el medio de reacción es una solución de urea-fosfato- $HgCl_2$  (pH 10.5); la reacción es por 1 hr a 60°C. Para otros granos, el medio de reacción es urea-fosfato-cloruro de nilmercúrico (CFM) en solución (pH 12.3); la reacción es a 40°C por 1 hr. Las interferencias se eliminan por extracción con éter después de desarrollar el color, acidificación y adición de ácido fórmico y los agentes enmascarantes de sulfhidrilo,  $HgCl_2$  o CFM. Para el análisis son usados extractos con NaOH de proteínas de los cereales. Los resultados están de acuerdo con los obtenidos con el analizador de intercambio de iones (34).

#### METODOS ENZIMATICOS

Un método exacto y seguro, automatizado, ha sido desarrollado para la determinación de lisina en hidrolizados de grano. La enzima L-lisina descarboxilasa cataliza específicamente removiendo el grupo carboxilo de la L-lisina, produciendo una amina y  $CO_2$ . El  $CO_2$  producido es dializado selectivamente en una corriente de carbonato con fenoltaleína por un dializador que contiene una membrana de diálisis para  $CO_2$  gaseoso. Se hidrolizan muestras de grano (250 mg) por 20 hr en 25 ml de HCl 6N a 110°C. Las alícuotas se evaporan a sequedad bajo  $N_2$ , con poco calor. Las muestras se redisuelven en agua libre de  $CO_2$  y la enzima es suspendida en buffer de fosfato pH 6.5. Los análisis se hacen a 30/hr con una proporción de muestra a lavado de 4:1. Se desarrolla una curva estándar con rango de 0-90 ppm de lisina, a amplia escala sobre el registrador. De la altura comparativa de cada pico de la muestra contra la curva estándar puede calcularse el % de lisina en la muestra original. La precisión es buena y los resultados están de acuerdo con los datos obtenidos por el método clásico con intercambio de iones. (22), (35)

La determinación de N por el método de micro-Kjeldahl, en conjunción con la estimación enzimática de lisina, produce resultados exactos para plantas individuales, debido a la pequeña cantidad de material requerido para el análisis; pero el método es muy caro y no apropiado para grandes series. (32)

#### OTROS METODOS

Turbidimétrico.- El contenido de lisina varía considerablemente entre las diferentes clases de solubilidad de las proteínas de cereales. Por tanto, la proporción de proteína deficiente en lisina a la proteína total puede servir como índice del valor nutricional proteico en cereales. En maíces normales y altos en lisina se ha establecido una correlación inversa (-0.86) entre el contenido de lisina total del grano y la cantidad de zeína (una proteína baja en lisina). La zeína se precipita de extractos de harina de maíz, con 70% de etanol y 0.5% de acetato de sodio, por adición de solución salina y se mide turbidimétricamente. Este procedimiento, simple, rápido y barato es usado con buen éxito para estimar lisina en gran número de muestras de maíz diferentes genéticamente, en su composición y en propiedades físicas. Ya que el valor nutricional de la proteína en otros granos, tales como sorgo y cebada, es también reducido, por el contenido de prolamina y glutelina soluble en alcohol, el método puede extenderse a ellos. (31), (36)

Visual.- Para trigo, centeno y cebada se puede recurrir a un método visual. Se forman semicírculos de muestras de grano (con un 10% de humedad) sobre portaobjetos. A cada lote se añaden 5 gotas de reactivo (98.6 ml de una solución al 0.6% de ninhidrina pura + 1.4 ml de ácido acético glacial; puede guardarse 5 días en botella de color ámbar). Las muestras tratadas se dejan reposar hasta el día siguiente en luz indirecta a 20-21°C, y la intensidad de la coloración es medida. Se compara con estándares de contenido de lisina conocido. Los coeficientes de correlación entre valores obtenidos electroforéticamente y los obtenidos por este método son 0.926, 0.968 y 0.910 (para trigo, cebada y centeno). El método permite la estimación de 200-500 muestras en 8 hr. (37)

Electroforesis.- La estimación de proteína en el hidrolizado con HCl, en conjunción con la estimación de lisina por electroforesis, tiene una ventaja sobre otros métodos y es de que ambos análisis pueden hacerse en el mismo hidrolizado; ya que el contenido de lisina está en rela -

ción con el contenido de proteína no es necesario pesar y ambos métodos son tan sensibles que pueden aplicarse a porciones del grano. (32)

DAB.- Para distinciones finas entre muestras de maíz rico en lisina, un analizador automático de aminoácidos es inapreciable, pero cuando se tienen un gran número de muestras se requiere de rapidez sin pérdida de la confiabilidad. Esta rapidez ha sido mejorada usando ácido L-2,4-diaminobutírico (DAB) como estándar interno. Además la reducción es posible - incrementando el pH o la fuerza iónica del buffer. (38)

Furosina.- La furosina, que está formada de fructosa-lisina o lactulosa-lisina (galactosafructolisina), durante la hidrólisis con HCl, llega a ser un útil indicador del daño de la lisina en productos lácteos. - El rendimiento más alto en furosina se obtiene por hidrólisis del material de prueba con HCl 7.8 N por 18 hr. La furosina es fácilmente detectable por cromatografía de intercambio de iones, apareciendo en el cromatograma después de la arginina. (39)

Endospermo.- Existen métodos de separación de proteínas de las semillas de las plantas que no son satisfactorios para estudiar alimentos vegetales para ganado. Se han desarrollado nuevos micrométodos para la determinación de lisina y nitrógeno  $\alpha$ -amino total en hidrolizados, que son exactos y aplicables a trabajos de rutina. La composición de aminoácidos de la semilla entera es dependiente (90%) de los componentes proteicos del endospermo triploide. La selección para la calidad proteica - (por lisina) puede hacerse con 1 mm de endospermo cortado. (40)

## DETERMINACION DE LISINA DISPONIBLE

Los procedimientos comunes para lisina disponible están basados en la modificación de los grupos  $\epsilon$ -amino con 1-fluor-2,4-dinitrobenzenceno (FDNB) o ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfónico (TNBS). El método más reciente está basado en la modificación del grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina con compuestos activados de vinilo, tales como acrilato de metilo, seguido por hidrólisis ácida y cromatografía por intercambio iónico o un analizador de aminoácidos. El procedimiento con acrilato de metilo para lisina disponible complementa los métodos usados normalmente y puede tener ventajas en algunas aplicaciones.

El valor nutritivo de una proteína alimenticia depende no solo de su contenido de aminoácidos esenciales, sino también de su disponibilidad fisiológica. Los aminoácidos no están disponibles si se encuentran en regiones de una proteína protegidos (química o físicamente) de la acción de enzimas proteolíticas, o si están unidos a otras mitades químicas a través de enlaces que no se rompan fácilmente en la digestión.

El enlace cruzado es probablemente el mecanismo químico más importante que restringe la utilización biológica. Debido a su grupo  $\epsilon$ -amino, la lisina es particularmente susceptible a reacción lateral, formando un enlace cruzado no disponible. Por más de 15 años las disponibilidades químicas y biológicas de la lisina han sido estudiadas ampliamente.

La lisina llega a enlazarse secundariamente, como resultado de reacción química del grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina, que incluye lo siguiente: Primero, la lisina puede ser ocultada en una proteína en una secuencia particular o conformación que es lenta para hidrolizar o no es hidrolizada por las proteasas animales. Tal lisina puede o no aparecer como disponible químicamente por los métodos de hidrólisis y aún ser totalmente in disponible nutricionalmente. Segundo, la lisina puede tener enlace cruzado con un residuo aspártico o glutámico en otra proteína o en la misma molécula. Aunque el enlace se parezca a un enlace peptídico "normal" no es hidrolizado por las proteasas intestinales. Los grupos aspártico- o glutámico-lisina permanecen después de la proteólisis y aparecen como no utilizables nutricionalmente. La unión aspártico- o glutámico-lisina es rota por hidrólisis ácida que produce lisina y ácido aspártico o glutámico. Otra reacción de la lisina es el enlace cruzado con residuos de dehidroalanina. La dehidroalanina reacciona con el grupo  $\epsilon$ -amino para formar lisinalanina. Una razón más común para la pérdida de lisina disponi-

ble puede ser la reacción con carbohidratos. (41)

Pomeranz y Miller (42) han estudiado métodos de cromatografía en papel, enzimáticos y microbiológicos para determinación de lisina.

Los principios de los métodos químicos usados comúnmente, con FDNB y TNBS, para lisina disponible, son los mismos. Primero se dejan reaccionar los compuestos con la cadena lateral lisil bajo condiciones suaves. Después la proteína es hidrolizada, y los productos de hidrólisis son extraídos con éter para quitar el exceso de reactivo. Finalmente los derivados son medidos espectrofotométricamente.

El método FDNB está basado en el trabajo de Carpenter y Bjarnason (43), pero han sido empleadas varias modificaciones para purificar la  $\epsilon$ -dinitrofenil-(DNP)-lisina que resulta, especialmente por intercambio iónico y otros procesos cromatográficos. En algunos casos, ninguna purificación adicional es necesaria. Blom et al (44) delinearon tres procesos de detección para DNP-lisina: a) Fotometría directa del color amarillo; b) Medición polarográfica basada en la reducción del grupo nitro por la acción en el electrodo de mercurio; y c) Fotometría del producto de reacción con ninhidrina. Kakade y Liener (45) reportaron que se necesita solamente 1 hr para el análisis con TNBS, contra 16 hr que necesita el FDNB. Varios autores han comparado estos métodos con proteínas puras y encontrado que están bastante de acuerdo con las determinaciones biológicas de lisina disponible. (41)

El método de Carpenter (1960) (46) ha sido muy satisfactorio para la determinación de la calidad nutricional de proteínas alimenticias de origen animal, pero no así para proteínas vegetales. En parte, esto ha sido debido a la destrucción de los grupos dinitrofenil cuando la hidrólisis ácida es hecha en la presencia de carbohidratos y, en parte, a la interferencia de pigmentos vegetales. Roach, Sanderson & Williams (1967) (47) invirtieron el procedimiento, determinando la lisina no modificada que queda después de la dinitrofenilación y la hidrólisis, y su método ha tenido muy buen éxito en la evaluación de material vegetal. La N-dinitrofenilación no tiene virtud especial de eliminar los grupos amino libres de los residuos de lisina, por lo que se pensó que la desaminación tradicional con ácido nitroso puede tener ventajas en que el reactivo tiene una molécula mucho más pequeña que el FDNB, y es, por lo tanto, menos probable que sufra impedimento estérico. Además actúa a pH diferente al usado durante la dinitrofenilación y puede, por tanto, detectar diferentes formas de enlace químico de los grupos amino. Semejante razonamiento ha con

ducido a otros investigadores al uso de reacciones con acrilonitrilo en presencia de trietilamina. (48)

Otro reactivo utilizado para reaccionar con los grupos  $\epsilon$ -amino libres es el Gosipol (2,2'-di-1,6,7-trihidroxi-3-metil-5-isopropil-8-aldehidonaftil). La cantidad de grupos  $\epsilon$ -amino de lisina en proteínas, que están libres para reaccionar con FDNB es reducida cuando las proteínas son expuestas a reacción con gosipol. La reducción en los grupos reactivos  $\epsilon$ -amino de lisina se incrementa cuando el pH de la mezcla de reacción es aumentado.

Esta reacción es de importancia para Estados Unidos (y algunos otros países), porque los 3 millones de toneladas de orujo de algodón que producen anualmente, constituyen una fuente principal de lisina en la alimentación de animales monogástricos (el gosipol se halla naturalmente en la semilla del algodón y puede bajar la disponibilidad de lisina). (49), (50)

El FDNB se ha usado para medir la disponibilidad de lisina en carne y en albúmina de huevo, antes y después de tratamiento con calor en presencia de glucosa; habiendo una alta correlación entre la lisina consumida y el peso ganado en ratas. (51)

En alimentos para ganado y cereales (trigo, cebada, mijo, maíz, maíz tostado como cereal de desayuno) es necesaria la prontitud en la determinación de lisina disponible, por lo que se han desarrollado procesos cromatográficos automatizados con FDNB, o semiautomáticos. (52), (53)

Se ha hecho una comparación entre los métodos de Carpenter y Erbersdobler en 10 concentrados diferentes de proteína. El método de Carpenter depende de la exposición del alimento proteico a exceso de FDNB y etanol al 60%, seguido de hidrólisis; el método de Erbersdobler es similar aparte del uso de metanol en vez de etanol. Las mediciones colorimétricas fueron realizadas a 360 y 435 nm. La concordancia entre los dos métodos fue buena, aunque se sugiere que la dinitrofenilación se lograría mejor en la presencia de etanol que en metanol. (54), (55)

De los procedimientos accesibles para la estimación química de lisina disponible en productos lácteos deshidratados, el más comúnmente usado comprende la di- o trinitrofenilación de los grupos  $\epsilon$ -amino libres, seguido por hidrólisis ácida y separación del mono derivado colorido. La aplicación de éstos métodos a proteínas de leche pura producen buenos resultados, pero las dificultades se encuentran con los productos lácteos, debido a la presencia de grandes cantidades de lactosa. Estos procedi -

mientos han sido modificados para permitir su uso de rutina en leche deshidratada, suero y concentrados proteicos de suero. (56)

Un método de teñido o coloración de enlace, que emplea colorante Remazol azul brillante R y que no es afectado por interferencia de lactosa, ha sido aplicado a suero pulverizado. La exactitud de este método depende de la relación proteína-colorante del producto investigado. Para cereales (y también leche) se usa Naranja Acido 10 y Naranja Acido 12. Los colorantes no se combinan en cantidades equivalentes y la proporción enlace-colorante varía de acuerdo al alimento examinado. El Naranja Acido 10 se considera el mejor colorante para evaluación de calidad proteica y está siendo usado en un procedimiento de coloración de enlaces modificado para la determinación de lisina disponible. (56), (57)

Los ensayos microbiológicos, con "Tetrahymena pyriformis", para evaluar la disponibilidad de lisina, han dado valores más bajos que el método de FDNB; se efectuaron sobre harina de carne, y los resultados hicieron pensar que otros factores deben haber influenciado el ensayo, además de la indisponibilidad de los aminoácidos. (51), (58), (59)

Otro método confiable y seguro está basado en el uso de espectroscopía RMN<sup>19</sup>F. Los grupos  $\epsilon$ -amino no sustituidos son trifluoroacetilados con S-etil-trifluoroacetato en solución de dimetil sulfóxido, y el conjunto se determina con las técnicas estandar de RMN<sup>19</sup>F. (56), (60)

Un método para medir lisina que está disponible químicamente, consiste en alquilación de los grupos  $\epsilon$ -amino con acrilato de metilo, hidrolizando y estimando la lisina que no reaccionó (no disponible) por análisis de aminoácidos. La disminución en el contenido de lisina es inferida a la medición de lisina químicamente disponible. Los productos de modificación del grupo  $\epsilon$ -amino no podrían, sin embargo, ser estimados directamente. El sulfo etil vinilo (EVS) alquila los grupos  $\epsilon$ -amino en 6-12 hr a pH 9-10; los productos eluyen en 57 y 118 min (son dos), bien definidos de otros aminoácidos básicos. (61)

Otros reactivos usados son la O-metil isourea y el borohidruro de sodio, sustituyendo al FDNB. (62)

Las fuentes de error más comunes para estos métodos son: muestreo, dinitrofenilación, hidrólisis, cromatografía, etc; sobre todo la primera. (63)



## PROCEDIMIENTOS PARA EVITAR LA PERDIDA DE LISINA DISPONIBLE EN ALGUNOS ALIMENTOS

*Antes poner pag 61 y 62*

Diversos alimentos ven disminuido su contenido de lisina disponible debido a varios factores, como pueden ser los de procesamiento, almacenamiento, etc. He aquí unos ejemplos importantes de este fenómeno y unas de sus posibles soluciones.

Alimentos infantiles: uno de los aspectos más importantes de este tipo de alimentos es el de los efectos del almacenamiento y el secado sobre el contenido de lisina. Así, en lo que respecta a alimentos con 1% de humedad, las pérdidas de lisina disponible son menores del 15% después de 3 meses a 37°C, pero con más de 90 días se tienen serios deterioros. En cuanto al secado debe tomarse en cuenta que, si bien el alza en la temperatura acorta el ciclo, el contenido de lisina disponible se reduce un 53% en carne y 40% en fruta. (64), (65)

Centeno: el cocido del pan y las galletas elaboradas con este cereal no ha de ser excesivo porque se ha visto que la lisina total disminuye 11% y la lisina disponible 28%, con respecto a la harina del mismo. (66)

Jamón: ha de tomarse en cuenta que la lisina disponible es mayor en jamones con curado intenso (76%) que con curado suave (60% de la lisina total), ello se debe a que la mayor cantidad de sal en el curado intenso absorbe agua y así eleva la proporción de lisina disponible. (67)

Leche descremada: en este caso se ha observado un vínculo estrecho entre la cristalización de lactosa y la reducción de lisina disponible, durante el almacenamiento. Se tienen pérdidas de 21.8-22.9% (4 semanas) a 30°C. Por esto ha de procurarse que el almacenamiento dure el menor tiempo posible. (68)

Soya: esta leguminosa es rica en lisina, pero varios productos de ella, como la pasta de soya fermentada o grano coagulado, disminuyen su contenido cuando se someten a calentamiento, disminuyendo en mayor proporción la lisina disponible que la total. Estas pérdidas se evitan en gran manera por la adición de agua. (69), (70)

Suero: la alta calidad de las proteínas del suero y sus contenidos excepcionalmente altos de lisina crean la necesidad de una nueva industria de procesamiento de suero deshidratado. La lisina disponible en él es de 3.83 a 7.86 g/100 g de proteína. Los sueros secados por aspersión generalmente tienen contenidos superiores de lisina que los polvos secados por rodillo. En los polvos secados por aspersión, el contenido de lisina disminuye si el concentrado de suero es mantenido por 24 hr a 61°C



o por 40 hr a 10°C (en vez de 8 hr a 61°C ó 15 hr a 10°C) después del -  
secado. Durante el secado con rodillo, las pérdidas de lisina aumentan -  
con el incremento del tiempo de contacto con el tambor. Otro de los fac -  
tores que influyen en la pérdida de lisina son: contenido de humedad, -  
contenido y estado físico de la lactosa y almacenamiento. Con almacenaje  
por 11 meses a temperatura ambiente, el decremento en lisina total y dis  
ponible es de 4.38 y 17.8% para el polvo secado con rodillo y de 6.80 y  
18.5%, respectivamente, para el polvo secado por aspersión. Tomando en -  
cuenta estas situaciones han de juzgarse los casos concretos, procurando  
evitar almacenamientos prolongados, exceso de humedad, presencia de lac -  
tosa, etc., atendiendo a las circunstancias y requerimientos especifi -  
cos. En cuanto a los tratamientos del suero, las pérdidas de lisina son  
menores cuando las proteínas del suero son concentradas por ultrafiltra -  
ción (otros métodos son por electrodiálisis, penetración de la gel ó tra -  
tamiento con polifosfato). (71), (72), (73), (74)

Algunos de los alimentos más consumidos en el mundo, como son los cereales, son deficientes en lisina; esta deficiencia abarca también a otros alimentos de origen vegetal, que a su vez son los más accesibles y económicos para una mayor parte de la población. Debido a esto es de vital importancia encontrar la forma de mejorar su calidad. Se han ideado diversos procedimientos para lograr esto, como son el mejoramiento genético, la elaboración de concentrados proteínicos, la combinación con otro alimento rico en lisina y la adición del aminoácido. Vamos a analizar las ventajas y desventajas de estos métodos, así como su aplicación práctica en determinados alimentos, puntualizando los logros alcanzados en investigaciones recientes.

#### MEJORAMIENTO GENETICO

Esta alternativa conduce a logros permanentes y muy beneficiosos, empleada con éxito en cereales, transforma granos pobres en lisina en fuentes suficientemente ricas. Las investigaciones contemporáneas, al respecto, han sido alentadas en todo el mundo y se tienen esperanzas de estos estudios agro-biológicos, además de los éxitos ya alcanzados (por ejemplo el del maíz Opaco 2 o el triticale). Desgraciadamente estos procesos son largos, requieren de años de arduas experimentaciones; son costosos por el mismo tiempo que requieren y los equipos humano y técnicos empleados. Hay un campo amplísimo en esta área de la investigación genética, falta mucho por hacer, pero ya se tiene una sólida base, se han obtenido resultados satisfactorios; vamos a sintetizarlos, sin agotarlos, en las páginas siguientes (se sigue un orden alfabético).

##### a) Arroz.-

El Instituto Internacional de Investigación del Arroz dirige sus esfuerzos al mejoramiento de la proteína del arroz, seleccionando variedades con alto contenido de lisina. (75), (76)

Un incremento en el contenido proteínico del arroz molido de 8.14 a 9.90% en la variedad IR8 y de 9.90 a 13.0% en la variedad IR480-5-9, debido a la aplicación de abono nitrogenado, no tiene efecto significativo sobre el contenido de lisina de la proteína y tiene poco efecto sobre la digestibilidad y el valor biológico. (77)

b) Avena.-

Existen tres nuevas variedades mejoradas de avena, llamadas NP-101, Rápida y Kent. De ellas la de mayor contenido proteínico es la Rápida, con 14.2%, comparado al 7.8% de una muestra comercial. Aunque se ha encontrado que hay una posible relación inversa entre el contenido proteínico y el contenido de lisina. (78)

c) Cebada.-

Una de las variedades de cebada más favorecidas por su riqueza en lisina es la "Hiprolly", aunque actualmente se están investigando otras nuevas como la C17115, Riso 1508, Maris Mink, principalmente, y mutantes como el 29 y el 86. (79)

Los estudios para mejoramiento de cebada se han dirigido hacia el suministro de nitrógeno en forma de abonos. Por lo que respecta a variedades normales (Nudinka, Villa, Asse), un incremento de abono nitrogenado, de 130-160 Kg N/Ha., aumenta en 4-26% el contenido de lisina. Las variedades ricas en lisina mantienen constante tal contenido, con el incremento en los niveles del N de fertilización, a excepción de la cebada "Riso 1508", la que alcanza un contenido alto pero a expensas de un gran decremento en ácido glutámico y prolina. (80), (81), (82)

Las variedades ricas en lisina contienen una proporción menor de la proteína baja en lisina, que es la prolamina. La relación prolamina:glutelina de los mutantes ricos en lisina es aproximadamente 1:1, contra 2:1 de las variedades normales. (83)

Además de este factor agrícola-nutricional, se ha investigado la heredabilidad del carácter "rico en lisina", analizando la recombinación entre el gen de lisina elevada y un gen simple para enlazar almidón en el endospermo. (84)

d) Maíz.-

Este cereal es el de mayor consumo en la dieta básica del mexicano, por lo cual le dedicaremos especial interés.

El hecho de que el maíz constituya el alimento básico de muchas familias de bajos ingresos, no sólo en México, sino en numerosas regiones del mundo, ofrece un método prometedor para remediar anteriores deficiencias proteínicas sin introducir ninguna modificación en la dieta habitual y sin ningún otro requisito que el de cambiar las variedades de maíz con sumidas.

Los resultados del perfeccionamiento y la introducción inicial del -

maíz rico en lisina, prometen un considerable incremento en la producción de alimentos de las zonas donde se consume maíz, y también abren posibilidades de una amplia gama de ventajas de largo alcance mediante el mejoramiento de la nutrición de los seres humanos y el ganado en diversas zonas del mundo menos desarrollado. (85)

Uno de los problemas fundamentales de la investigación ha sido el de obtener variedades de maíz con alto contenido de lisina del tipo y la calidad tradicionales preferidas en las diversas regiones consumidoras de maíz. El maíz rico en lisina descubierto originalmente tiene características inaceptables para los habitantes de la mayoría de las regiones de consumo de maíz. (86)

En 1963, el Dr. E.T. Mertz y sus colaboradores en la Universidad de Purdue, descubrieron que el gen mutante "Opaco 2" del maíz modificaba el equilibrio de aminoácidos en la proteína del endospermo del grano. Esto dió por resultado mayores cantidades de lisina y triptófano, abriendo interesantes perspectivas para botánicos, productores y especialistas en nutrición humana y animal. (87)

Los ensayos de alimentación con maíz Opaco 2 confirmaron que los animales, particularmente los jóvenes, podían aumentar de peso con una rapidez tres veces y media mayor que si se los alimenta con maíz normal. (88)

A principios de 1970 se tropezó con diversos problemas técnicos que debían ser solucionados para que los agricultores de América Latina pudieran producir maíz de alta calidad. Los problemas principales eran:

1) Los mutantes originales Opaco 2 y Harinoso 2 fueron identificados en variedades de maíz adaptadas ecológicamente al clima templado del "cinturón de maíz" de los Estados Unidos. Por lo tanto, no eran adecuados para la producción directa en las regiones tropicales y subtropicales en las que podían producir precisamente las mayores ventajas.

2) Los nombres descriptivos "Opaco 2" y "Harinoso 2" indican la apariencia física opaca, sin brillo y similar a la tiza de los granos en que por primera vez se aislaron e identificaron estos mutantes. Estas características representaban un obstáculo para los agricultores acostumbrados a producir el tipo de maíz duro y hendido, de aspecto limpio, terso y lustroso.

3) El grano de este maíz mutante tiene un endospermo blando y menos denso, con un menor peso específico que reduce el rendimiento en 10-15%.

4) Se hallaron indicios de que los mutantes eran más susceptibles a los ataques de insectos y a enfermedades y, en consecuencia, resultaban

más difíciles de almacenar.

5) El único método cierto para identificar el maíz de alta calidad era el análisis químico del grano para determinar la presencia de lisina y triptófano. En consecuencia, era necesario contar con una técnica analítica simple, exacta y rápida que permitiera medir la proporción de estos aminoácidos en cantidades muy reducidas de endospermo del grano.

(89), (90)

Se ha dado especial importancia al logro de un elevado contenido proteínico en todas las poblaciones estudiadas. De esta manera, se logra automáticamente un desarrollo paralelo de las versiones normales y de alta calidad proteínica de todas las poblaciones y variedades superiores con diferentes tipos de granos procedentes de las zonas tropicales, templadas y de gran altura de los distintos países.

A medida que se desarrolla el proceso de conversión del Opaco 2, se logra acumular información sobre las tendencias generales de los efectos sobre los materiales convertidos, de la siguiente manera:

1) La transferencia del gen Opaco 2 a las variedades normales de maíz duro y hendido cambia la apariencia física del grano normal y lo convierte en un grano opaco, sin brillo y con características análogas a las de la tiza. Esto se puede superar mediante una posterior labor de cruzamiento y selección. (91)

2) Se produce una considerable decoloración, especialmente en los tipos de grano amarillo. Sin embargo, el grado de decoloración varía considerablemente según los distintos antecedentes genéticos. (92)

3) Hay un aumento en el contenido de lisina y triptófano. (93)

4) El porcentaje de proteína en el endospermo de los materiales convertidos con el gen Opaco 2 tiende generalmente a disminuir. Esta disminución puede oscilar entre el 3 y el 35%. Sin embargo, algunos materiales no siguen esta tendencia, sino que tienden a mantener el mismo contenido de proteínas o, por el contrario, a registrar un ligero aumento. (94)

5) En general, los granos de Opaco 2 tienen menor densidad que los normales. En algunas combinaciones genéticas la disminución en el peso resulta despreciable. (95)

Si bien algunas de estas tendencias resultan en general desfavorables para los productores, las posibilidades de variaciones genéticas son tantas que permiten combinar rápidamente las proteínas de calidad y otras características vegetales convenientes mediante procedimientos de

selección eficaces.

(88), (96), (97), (98), (99)

Históricamente, el maíz es uno de los cultivos en los que más influye el lugar donde se produce y las características del medio que lo rodea. Sin embargo, para que las ventajas del maíz con elevado contenido proteínico se difundan, dicha característica debe incorporarse a variedades que puedan alcanzar un alto rendimiento en muchos lugares distintos.

Mediante la selección de la progenie y de todos los materiales hibridantes procedentes de seis lugares de México de diferente latitud y altitud, y la asistencia de colaboradores que efectuaron selecciones en Colombia, Egipto, Nigeria, Tailandia y los Estados Unidos, se está efectuando un rápido progreso hacia la meta de ampliar los límites de adaptación de las poblaciones hibridantes. (88), (100), (101)

El maíz Opaco 2 ya ha podido ser adaptado a diferentes regiones climáticas, gracias a la valiosa colaboración del CIMMYT, centro internacional que tiene su sede en nuestro país.

Debido a las diferentes plagas y enfermedades que se registran en los distintos medios, se están haciendo grandes esfuerzos por obtener por selección un tipo dotado de una resistencia generalizada, lo cual se ha logrado en parte al conseguir que el Opaco 2 sea menos susceptible a estos agentes nocivos. Entomólogos y patólogos han producido invasiones artificiales de insectos y enfermedades para acelerar este proceso y hacerlo más eficaz. (88), (101)

En cuanto al tipo de planta en las tierras bajas tropicales las plantas de maíz alcanzan demasiada altura, lo cual da por resultado una pérdida de rendimiento porque las plantas tienden a caer y porque gran parte de los hidratos de carbono sintetizados durante el crecimiento son utilizados por los tallos altos y no por las semillas. Algo similar sucede con aquellas plantas que producen demasiado follaje.

Se están haciendo considerables progresos en la tarea de reducir la altura de la planta de maíz tropical por medio de selecciones para obtener plantas de poca altura (enanas) o bien incorporando en las poblaciones, por cruzamiento, genes que reducen la altura de la planta. Las variedades y poblaciones resultantes pueden cultivarse con mayor densidad de siembra y responden a niveles más elevados de fertilizantes sin caerse. En este año (1977) algunas regiones del país han logrado mejores rendimientos en sus cosechas debido a la utilización de este tipo de plantas enanas. (88), (101)

Otro objetivo genético de importancia fundamental para poder adoptar

con éxito el maíz de alto contenido proteínico es la producción de una amplia variedad de tipos de grano duro y hendido, de endospermo duro, del tipo de los utilizados en diversas partes del mundo.

Los estudios genéticos han demostrado que el gen Opaco 2, utilizado para la obtención de un grano con alto contenido de proteínas, es un factor genético simple y, por lo tanto, se puede manipular y mantener fácilmente en un programa de reproducción. Sin embargo, para poder obtener este alto contenido de proteínas con un grano duro y vítreo, es preciso acumular muchos genes modificantes o genes de escaso efecto individual que puedan combinarse en número suficiente dentro de una familia o variedad determinada para producir el tipo de grano perseguido. (102)

Los genetistas han podido efectuar rápidos progresos hacia esta meta utilizando poblaciones basadas en materiales genéticos muy diferentes. Sin embargo, las poblaciones varían considerablemente en las frecuencias de los genes modificantes útiles que contienen. Esta variación seguirá imponiendo limitaciones a los genetistas en relación con la rapidez con que puedan convertir a algunas de las poblaciones en formas de endospermo duro y alto contenido proteínico. (103)

Se han producido tipos de endospermo duro cuyo grano tiene un peso específico equivalente al del maíz normal de tipo duro y hendido. Algunas de las familias de maíz de alto contenido de proteínas que se han convertido en formas de endospermo duro demuestran que se puede resolver el problema de que las fuentes genéticas del alto contenido de proteínas traían aparejada una mayor susceptibilidad a las plagas y enfermedades.

En mayo de 1972 se recolectó la primera muestra de semilla a granel de una población de maíz portadora del gen Opaco 2, de grano de endospermo duro. El maíz era resistente a muchas enfermedades comunes, de maduración intermedia, y tenía posibilidades de alto rendimiento en los trópicos. (88), (104), (105), (106), (107), (108), (109), (110)

De esta manera se pueden observar las grandes ventajas que se tienen con la producción de un maíz como el Opaco 2, con respecto al normal. Puede ser esta la clave para remediar la deficiencia nutritiva de extensas poblaciones consumidoras de este cereal. Con los logros alcanzados hasta el momento se está ya sustituyendo esta planta de mayor calidad, sin variar los hábitos o preferencias locales.

En cuanto al análisis químico del maíz Opaco 2 se han ideado técnicas simples de colorimetría para la estimación de los porcentajes de proteína, lisina y triptófano en el endospermo. Estas técnicas permiten a -



los técnicos de laboratorio examinar rápidamente grandes números de muestras de endospermo con un equipo simple y poco costoso. Las técnicas son fáciles de aprender y los resultados son reproducibles. (111)

Una técnica rápida para determinar el contenido de lisina del endospermo de granos sueltos de maíz, sin afectar su capacidad de germinar, - consiste en extraer dos o tres pequeñas muestras de endospermo de un único grano sin dañar el embrión. Esta pequeñísima cantidad de endospermo - es suficiente para evaluar el contenido mediante una técnica colorimétrica.

Determinadas muestras de ensayo, así como los mejores materiales seleccionados en el programa de cruza, son sometidos a pruebas estrictas para determinar las proporciones totales de aminoácidos en la proteína - de su endospermo. Para tal fin se utiliza un analizador automático de aminoácidos de tipo comercial corriente. Este procedimiento es necesario como herramienta de investigación, pero los programas prácticos de reproducción no exigen este costoso equipo, que requiere servicios de mantenimiento frecuentes y complicados. (101), (112), (113), (114), (115)

Por último vamos a hablar sobre los estudios biológicos del maíz Opa co 2. Las investigaciones efectuadas indican que los granos de maíz, para tener un valor nutritivo óptimo deben presentar no sólo mayores cantidades de lisina y triptófano sino también un equilibrio adecuado entre - estos aminoácidos.

Los estudios biológicos se han efectuado sobre ratas, ratones comunes, ratones de campo y pollos. Los resultados indican que es más importante un equilibrio correcto entre el porcentaje de proteína del endospermo y las cantidades de lisina y triptófano en dicha proteína, que la presencia de grandes cantidades de una o de otro. Los genetistas están - adecuando ahora sus criterios de selección con objeto de producir líneas con un mínimo del 10% de proteína y de 4.0% de lisina en éstas. Ello reducirá en gran medida el número de muestras necesarias para los estudios dietéticos. (88), (92), (116), (117), (118), (119), (120), (121)

#### e) Sorgo.-

Un paso significativo hacia el mejoramiento de la calidad nutricional del grano de sorgo es la identificación del mutante rico en lisina y la determinación del mecanismo de herencia de mejoramiento del contenido de lisina. La calidad nutricional de las líneas ricas en lisina - es mucho mayor que la del sorgo normal. Hay dos variedades harinosas de



origen etíope ricas en lisina, IS11167 y IS11758. En Botswana se tiene - sorgo con 2.4-2.8 g de lisina/16 g N. Una variedad enana de Sudán tiene pocos cuerpos proteicos (en el molde proteico visto al microscopio electrónico, están encajados cuerpos de cafrina que es baja en lisina) en el endospermo; esta variedad contiene 3.01 g de lisina/100 g de proteína. - Los cálculos de heredabilidad y progreso genético, bajo selección para - los caracteres químicos y de la semilla, indican que pueden hacerse mejoras sustanciales de la lisina en el sorgo. (122), (123), (124), (125), (126), (127), (128)

f) Trigo.-

Tal vez, éste sea el alimento sobre el que se han realizado más - investigaciones para mejorar su calidad nutricional. Se tiene una serie de mutantes que mejoran dicha calidad y así se han obtenido variedades - bien adaptadas como Sharbati Sonora, Svenno, Nortino, Mangla, April Berarded, NapHal, Sonora 64, Pak 70, Nayab 70, Mexi Pak 65, Indus 66, Atlas 66, C591, C273, CI7796, C306, CA82, H-68, HD1659, PV18, W12 (de origen - mexicano, paquistaní, sueco, etíope, hindú, principalmente).

La lisina varía en estos trigos mejorados de 0.26 a 0.60% de muestra o de 2.43 a 4.29% de proteína. (129)

La variedad CI7796, de origen etíope, muestra adaptabilidad y será - usada como progenitor rico en proteína y para multiplicación. (130) (131), (132), (133)

g) Triticale.-

El contenido de lisina en este híbrido es de 1.6 a 6.6, en base - seca. El coeficiente de correlación entre los contenidos de proteína y - lisina es de 0.406. (134)

## CONCENTRADOS PROTEINICOS

Los concentrados proteicos de origen animal y vegetal pueden ser uti - lizados para suplementar alimentos de bajo valor nutritivo con el fin de elevar su valor biológico. Esto es muy conveniente por el aumento en la cantidad y calidad de la proteína del alimento suplementado, sólo que los procesos de elaboración de dichos concentrados son difíciles y costosos.

Dentro de estas posibles fuentes de lisina para alimentación humana se encuentran las siguientes: proteína de pescado, harinolina (*Gossypium* sp.), alfalfa deshidratada (*Medicago sativa*), proteína de colza, alga -

spirulina deshidratada (Spirulina máxima), torta de ajonjolí (*Sesamum indicum*), levaduras que crecen en petróleo Bel I F 6-43, Bel I-IV-70a, Bel I-X-70 (*Candida* sp.), micelio de hongo (*Streptomyces aureofaciens*), caseína, albúmina de huevo deshidratada. De estos concentrados los más ricos en lisina son las levaduras del petróleo, la spirulina y la harina de pescado. (135)

Las proteínas de colza pueden ser aisladas y concentradas por dos métodos de extracción con HCl y/o NaOH. El rendimiento llega a ser del 61%. El extracto acuoso es rico en lisina y tiene una capacidad de emulsificación mayor que los otros extractos o concentrados. Así puede obtenerse harina de colza que al reemplazar otra harina en el cocimiento del pan, provoca una reducción del volumen en 10-20% (el reemplazo es del 5%). El volumen de la hogaza puede restablecerse añadiendo 0.5% de una preparación con diglicérido. (136)

En cuanto a la torta de semilla de algodón (harinolina) existe un problema en lo que respecta a la interferencia del pigmento glandular (gospol) con la lisina disponible. El PER y el índice nutricional de la harina de semilla de algodón libre de gospol se reduce ligeramente por la adición del pigmento tratado con amoníaco, pero si se añade este pigmento sin haberlo tratado, causa pérdida de peso y muerte en los animales. (137)

El procesamiento de la harina de sésamo (ajonjolí) envuelve el uso de un tratamiento con lejía caliente en la semilla para su descascarado, seguido de un secado, prensado y extracción con solvente. La digestibilidad enzimática de la proteína es mejorada como resultado del descascaramiento y la lisina presente en la harina inhibe totalmente la estabilidad al tratamiento con calor, siendo las pérdidas mínimas. La suplementación de la harina con lisina a un nivel óptimo de 1.25 g de L-lisina HCl /100 g de harina, recobra el valor nutritivo de la proteína, haciéndolo comparable al de la leche en polvo. (138)

#### COMBINACION CON OTRO ALIMENTO RICO EN LISINA

Este es uno de los recursos más frecuentados porque no requiere de ningún proceso de mejoramiento o elaboración, sino solamente recurrir a una fuente rica en lisina que fortifique al alimento de baja calidad (esta fuente, por lo general, es un producto natural ya sea vegetal o animal). Por supuesto no todas las suplementaciones dan buenos resultados,

esto depende de diversos factores que hay que tomar en cuenta.

Entre los alimentos que se pueden enriquecer están las galletas. Se pueden fabricar galletas ricas en proteína, por medio de harina de trigo y de cacahuate, suplementadas con harina rica en lisina tal como harina de soya, germen de trigo y chícharo. La cocción afecta el PER de las galletas, por lo que ésta debe ser a una temperatura baja. Una buena proporción de proteína es de 15.5% y de 3.3% en azúcares reductores (de esta manera el PER disminuye sólo 13%). (139)

La lenteja puede ser usada para estos propósitos, ya que su contenido de lisina es similar al de los productos de origen animal, excediendo al de los cereales por 2-2.5x. La composición cualitativa no depende del año de la cosecha o del método de procesamiento. El año de cosecha tiene una influencia considerable sobre el contenido de aminoácidos libres, pero varias propiedades o métodos de procesamiento tienen poco efecto. (140)

Los microorganismos que producen lisina se pueden usar en el enriquecimiento de alimentos y de forraje; por ejemplo, los de "lactobacillus" que producen 72 microgramos de lisina por ml y dan buenos resultados al ser inoculados en maíz, mientras que los mutantes de "L. bulgaricus" se usan para incrementar el contenido de lisina en leche de soya fermentada (4-14%). Se considera que estos mutantes pueden usarse también en la elaboración de productos tales como yoghurt, crema agria, mantequilla y col fermentada. (141)

La composición en aminoácidos de las nueces es bastante parecida, excepto para los anacardos y los cacahuates, los que contienen una cantidad apreciablemente mayor de lisina que las almendras y avellanas. Con todos ellos pueden hacerse tortas (24% de nuez, 20% de huevo, 49% de azúcar y 7% de harina) ricas en lisina. (142)

Un alimento rico en lisina, que puede ser usado en suplementaciones, es el queso y, a su vez, él mismo puede ver aumentado su contenido de lisina por medio de la maduración (con 7 semanas se logra un apreciable aumento). Para los quesos procesados es conveniente una menor temperatura (75°C) y un pH más bajo (5.4-5.8) porque de lo contrario se tiene un menor contenido en lisina. Además la emulsificación de las sales 24 horas antes del proceso reduce dicho contenido en 32-42%. (143), (144), (145)

## ADICION DEL AMINOACIDO

El principal inconveniente de este procedimiento es el costo. Habría que hacer un balance para ver si este método se recomendaría para un alimento en especial, ya que pudiera ser que se logaran los mismos fines - con una suplementación y a un costo menor. Por lo demás ha dado buenos - resultados en algunos alimentos y si se lograra obtener lisina comercialmente a bajo precio se resolverían muchos problemas, con el mejoramiento nutricional consiguiente de los consumidores de bajos recursos. Veamos - unos ejemplos de adición de lisina.

### a) Arroz.-

Se ha podido enriquecer el arroz por medio de un baño con una solución que contiene L-lisina al arroz pulido. (146)

### b) Búlgaros.-

Se pueden fortificar a un nivel de 0.10%. El PER, en ratas, se ve incrementado con el suministro de búlgaro fortificado; pero la lisina de be agregarse antes del cocido para evitar pérdidas que pueden llegar a - ser hasta de 65% o más. Para determinar monoclóhidrato de L-lisina en - búlgaros comerciales puede emplearse ninhidrina como reactivo. (143)

(147)

### c) Forraje.-

Indirectamente, puede mejorarse la alimentación humana, si al forraje de los animales, como el cerdo, se les añade un concentrado de lisina; lo cual origina una mejor eficiencia en la utilización de dicho forraje y un aumento en la calidad de la canal. (148)

### d) Pasta.-

Los aditivos usados comúnmente en las pastas no contienen lisina. Es posible añadir este aminoácido esencial usando extractos de proteína de soya rica en lisina. Los extractos se añaden a la pasta en una cantidad de 4% por unidad de harina. De esta manera se mejora la resistencia en 48.7%, lo que da como resultado un mayor tiempo de cocción; la acidez permanece invariable y sólo se observa un ligero deterioro en el color, pero esta deficiencia se subsana usando vasijas revestidas de Teflón y - agitando vigorosamente durante la cocción. (149)

### e) Trigo.-

En Corea el millesal (grano de trigo procesado) constituye un vehi

culo potencial de aprovisionamiento de lisina en el sistema alimenticio. El milssal es un grano de trigo pulido, gelatinizado parcialmente y presado. El proceso de fortificación envuelve el remojo de granos de trigo limpios y sin salvado en una solución de clorhidrato de lisina. El método no tiene efecto sobre la apariencia y el sabor. Con milssal fortificado se mejora sensiblemente la velocidad de crecimiento y la relación de eficiencia proteínica en ratas. La estabilidad se mantiene durante el almacenaje por 90 días a 10-20°C y 30 días a 37°C. (150), (151)

## CONCLUSIONES

Uno de los problemas más graves que aquejan a la humanidad es el hambre. La carencia de alimentos siempre la han resentido los pueblos de todas las latitudes y todas las épocas, desde los hindúes hasta los norteamericanos, desde los judíos bíblicos hasta los romanos del Imperio.

Antiguamente, y aún en la actualidad, el remedio para esta situación era la elevación de la producción alimenticia (sólo en cantidad) y, entonces, la solución de tan vital problema dependía del poderío económico del pueblo afectado, así las grandes naciones podían producir más en sus tierras o bien importar los víveres necesarios de otros países, mientras que los pueblos de bajos recursos, al no poder adquirir mayores sustentos continuaban en la misma o más crítica situación.

Pero la tierra es limitada y, aun suponiendo que todos los pueblos explotaran al máximo sus fuentes de abastecimiento de alimentos, en las tierras y los mares, llegaría un momento en que se tendría una "saturación", no pudiéndose explotar ya más tierras, viéndose así detenida la producción de alimentos.

Por estas razones los científicos han enfocado el problema desde otro punto de vista. En vez de elevar la cantidad de alimentos, mejorar la calidad de los mismos, es la solución que han propuesto. De esta manera disminuye la explotación exhaustiva de los recursos y se combate eficazmente el problema del hambre.

El mejoramiento de la calidad de los alimentos está íntimamente ligado al mejoramiento de la calidad proteínica, ya que las proteínas son, nutricionalmente hablando, los principales componentes de los alimentos.

Asimismo, la calidad de las proteínas depende de la proporción y equilibrio de aminoácidos esenciales que contengan. Los alimentos de origen animal son, en general, de mejor calidad que los de origen vegetal, es decir, contienen mayor cantidad de aminoácidos esenciales.

Dentro de los ocho aminoácidos esenciales hay uno que reviste gran importancia, es la lisina.

La dieta alimenticia de buena parte de la humanidad es a base de alimentos vegetales, ya que resulta prohibitivo, para muchos, el consumo de alimentos animales (carne, huevo, leche) ricos en proteínas; y es por ello que se tiene un elevado índice de desnutrición, como consecuencia de un aporte raquítico de proteínas de buena calidad (ricas en lisina) en la dieta habitual de esa gran masa de hambrientos.

De los alimentos más extendidos tenemos el maíz, el trigo y el arroz; tanto así que se asocian con las culturas americana, europea y asiática, respectivamente. Pues estos alimentos básicos son deficientes en lisina y, por lo tanto, de baja calidad nutricional. He ahí la importancia enorme de mejorar la calidad nutritiva de estos alimentos, elevando su contenido en aminoácidos esenciales y, particularmente, de lisina.

Dicho mejoramiento, por elevación del contenido de lisina, se ha pretendido llevar a cabo por diferentes medios, siendo los de mejores resultados la adición directa del aminoácido o la producción de mutantes que originen plantas resistentes y con semillas ricas en proteína. Aún se está en una etapa de investigación, pero ya se han tenido éxitos relevantes, sobre todo en el maíz, donde se encontraron los genes "Opaco 2" y "Harinoso 2" ricos en lisina, y en el trigo al ser cruzado con el centeno (este híbrido es el Triticale); gracias a la labor desarrollada por el Centro de Investigación y Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), con sede en México y con alcances internacionales.

Los problemas que se han tenido que enfrentar los agricultores y genetistas para la adaptación de las variedades ricas en lisina, han sido múltiples y complejos, pero es realmente asombroso el avance que se ha obtenido en unos cuantos años de investigación y aplicación en los diferentes países. Esto hace pensar que se tiene un futuro más promisorio si se salvan barreras de tipo político, económico y social que, muchas veces, impiden el libre desarrollo de los programas de mejoramiento en cada país.

Además, se están buscando nuevas fuentes de alimentos vegetales ricos en proteína, como la avena, la cebada, el centeno, la lenteja, el sorgo, la soya, las algas, levaduras del petróleo, etc.; que si bien, no son por ahora tan importantes en la alimentación común, pueden llegar a complementar y hasta a sustituir a los tradicionales alimentos.

Otro aspecto que abre amplios derroteros en el mejoramiento de los alimentos es la suplementación de los mismos con aminoácidos como la lisina; lo cual acarrea otros problemas, pero que, una vez superados, proporciona alimentos de buena calidad.

En cuanto a las formas de medir la lisina, que es algo muy importante para resultados rápidos y precisos, se han desarrollado buenas técnicas como la del fluorodinitrobenceno (FDNB) para lisina disponible (este concepto de lisina disponible es básico en nutrición, por lo que se ha estudiado con detalle en la tesis en el capítulo de "Determinación de lisina disponible") y la de ninhidrina, para lisina total.

Con este trabajo se ha pretendido hacer notar la amplia gama de posibilidades que hay de mejorar los alimentos y, por ende, la nutrición humana; así como tener una fuente de datos elementales y bibliográficos sobre el aminoácido lisina.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- "Bioquímica". Laguna, J. 1a ed. La Prensa Médica Mexicana. 1960. - Pág. 280.
- 2.- "Bioquímica". Lehninger, A.L. Ediciones Omega, S.A. 1972. Págs. 63, 78-80, 135.
- 3.- "Bioquímica médica". Manzur, A. y B. Harrow. 1a ed. Edit. Interamericana, S.A. 1970. Págs. 13-35.
- 4.- "Textbook of Biochemistry". Harrow, B. y A. Manzur. 7a ed. 1958. - Págs. 56, 57.
- 5.- "Bioquímica Fundamental". Conn, E.E. y P.K. Stumpf. 1a ed. Edit. Li musa-Wiley, S.A. 1965. Págs. 67-87.
- 6.- "Curso de Química Biológica". Deulofeu, V. y A.D. Marenzi. 8a ed. - El Ateneo Pedro García, S.A. 1958. Págs. 144-196.
- 7.- "Principles of Biochemistry". White, A. 2a ed. Ms. Graw-Hill Book Company, Inc. 1959. Págs. 116, 117, 119.
- 8.- "Food Chemistry". Meyer, L.H. Reinhold Publishing Company. 1960. - Págs. 114, 115.
- 9.- "Food Chemistry". Aurand, L.W. The AVI Publishing Company, Inc. - 1973. Pág. 162.
- 10.- "Foods, Diet and Nutrition". Jones, Shainberg, Byer. Canfield Press. 1975. Pág. 9.
- 11.- "La Ciencia de los Alimentos". Potter, N.N. 1a ed. The AVI Publi - shing Company, Inc. 1973. Pág. 71.
- 12.- "Tratado de Nutrición". Lang, K. y R. Schoen. Editorial Aguilar. - Págs. 135-137.
- 13.- "Contenido en aminoácidos de los alimentos y datos biológicos sobre las proteínas". FAO: Estudios sobre Nutrición. 1970. Pág. 14.
- 14.- "Protein and amino acid nutrition". Albanese, A.A. Academic Press - Inc. 1959. Págs. 283, 284, 286, 291-295.
- 15.- "Valor nutritivo de los alimentos" (Tablas). Instituto Nacional de la Nutrición.

- 16.- "Chemistry of the amino acids". Greenstein, J.P. Págs. 2097-2115.
- 17.- "Organic Chemistry". Rakoff, H. y N.C. Rose. Collier-MacMillan Student E. 1967. Pág. 801.
- 18.- "Tratado y prácticas de Bioquímica". Harrow. 2a ed. 1950. Pág. 62.
- 19.- "Handbuch Der Pflanzenanalyse". Klein, G. Vol. IV/III. Pág. 65.
- 20.- "Obtención de lisina y estudio de sus propiedades". Sandoval, M.V. Tesis. UNAM. 1951. Págs. 23-36.
- 21.- Szecheile, F.P., Jr. y B.L. Brannaman. "Simplified Method for Lysine Content of Wheat and Rice Seeds by Gas Chromatography". Analytical Biochemistry, 49: 442-454. 1972
- 22.- Concon, J.M. "The chemical determination of critical amino acids in cereal grains and other food products". Abstracts of Papers, American Chemical Society, 168, AGFD 6. 1974  
Gehrke, C.W. "Chromatographic and automated methods for amino acids". Abstracts of Papers, American Chemical Society, 168, AGFD 7. - 1974
- 23.- Szecheile, F.P., Jr. y B.L. Brannaman. "Use of a simplified method - for lysine by gas chromatography". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 22 (3): 537-538. 1974
- 24.- Manzyuk, V.Y. y V.P. Shkumat. "Methods for evaluation of barley protein quality and their use in selection". Vestnik Sel'skokhozyaistvennoi Nauki, Moscow, USSR, 9: 84-87. 1975
- 25.- Ussary, J.P. "Quantitative determination of amino acids by gas-liquid chromatography". Food Product Development, 7 (7): 84-88. 1973
- 26.- Jellum, E.; Close, V.A., Patton, W., Pereira, W. y B. Halpern. Analytical Biochemistry, 31: 227. 1969. "A gas-liquid chromatographic method for the determination of phenylalanine in serum".
- 27.- Bell, J.A. y V.C. Mason. "A rapid chromatographic method for the estimation of lysine". Journal of Chromatography, (46): 317. 1970
- 28.- Davies, R.L. "The determination of lysine and ornithine using acid ninhydrin". Journal of Chromatography, (71): 564-566. 1972
- 29.- Beckwith, A.C.; J. Paulis y J. Wall. "Direct estimation of lysine - in corn meals by the ninhydrin color reaction". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 23 (2): 194-196. 1975

- 30.- Mertz, E.T.; P.S. Misra y R. Jambunathan. "Rapid ninhydrin color - test for screening high-lysine mutants of maize, sorghum, barley and other cereal grains". Cereal Chemistry, 51 (2): 304-307. 1974
- 31.- Rhodes, A.P. "A comparison of two rapid screening methods for the selection of high-lysine barleys". Journal of the Science of Food and Agriculture, 26 (11): 1703-1710. 1975
- 32.- Brunckhorst, K.; G. Röbbelen y M. Zoschke. "Determination of lysine content and selection of the Hiproly character after back-crossing - in barley. I. Testing and development of methods of analysis". Zeitschrift für Pflanzenzüchtung, (73): 269-283. 1974
- 33.- Bock, H.D.; J. Wünsche y E. Borgmann. "Possibilities of utilizing a dye-binding method for determining protein and lysine in rye". Nahrung, 17 (8): 829-836. 1973
- 34.- Concon, J.M. "Rapid method for the determination of lysine content - in cereal grains without hydrolysis". Analytical Biochemistry, 66 (2): 460-480. 1975
- 35.- Wall, L.L. y C.W. Gehrke, "Automated enzymatic determination of L-lysine in grain". Journal of the Association of Official Analytical - Chemists, 57 (5): 1098-1103. 1974
- 36.- Paulis, J.W. y J.S. Wall. "Protein quality in cereals evaluated by - rapid estimation of specific protein fractions". Abstracts of Papers, American Chemical Society, 168, AGGD 21. 1974
- 37.- Mazurek, J.; W. Dlugosz y O. Lubkiewicz. "Visual method for asses - ment of lysine content of wheat, rye and barley". Hodowla Roslin, - Aklimatyzacja i Nasiennictwo, 18 (3): 221-227. 1974
- 38.- Dennison, C. "Sodium chloride in buffers for amino acid analysis. - Application to the analysis of lysine in maize samples". Journal of Chromatography, 89 (1): 84-86. 1974
- 39.- Brandt, A. y H. Erbersdobler. "Determination of furosine in foods - and feeds". Landwirtschaftliche Forschung, 25 (28/II Sonderheft): - 115-119. 1973
- 40.- Klein, K.A.; W.J. Schön y H. Brunckhorst. "The quality of cereal pro - teins from the plant breeder's viewpoint". Qualitas Plantarum - Plant Foods for Human Nutrition, 23 (1/2/3): 311-324. 1973

- 41.- Friedman, M. y J.W. Finley. "Chemical Methods for available lysine". ✓  
Cereal Chemistry, 50 (1): 101-103. 1973
- 42.- Fomeranz, Y. y B. Miller. "Determination of lysine in cereals". Jour  
nal Official of the Agricultural Chemists, (46): 399. 1963
- 43.- Bender, A.E.; R. Kihlberg, B. Löfquist y L. Munck. "Nutritional eva-  
luation of proteins by chemical methods from evaluation of novel pro  
tein products". Pergamon Press, New York (1968). Pág. 161.
- 44.- Blom, L.; P. Hendricks y J. Caris. "Determination of available lysine  
in foods". Analytical Biochemistry, (21): 382. 1967 ✓
- 45.- Kakade, M.L. y I.E. Liener. "Determination of available lysine in -  
foods". Analytical Biochemistry, (27): 273. 1969 ✓
- 46.- Carpenter, K.J. "The estimation of the available lysine in animal- -  
protein foods". Biochemical Journal, (77): 604. 1960
- 47.- Roach, A.G.; P. Sanderson y D.R. Williams. Journal of the Science of  
Food and Agriculture, (18): 274. 1967 *Lisina disponible*
- 48.- Allison, R.M.; W.M. Laird y R.L.M. Syngé. "Notes on a deamination me  
thod proposed for determining 'chemically available lysine' of pro -  
teins". Agricultural Research Council's Food Research Institute, Col  
ney Lane, Norwich NOR7OF
- 49.- Kuck, J.C. y V.L. Frampton. "Improvement in determination of availa-  
ble lysine in cottonseed meals". Journal of the American Oil Chemis-  
ts' Society, 52 (6): 214. 1975
- 50.- Conkerton, E.J. y V.L. Frampton. "Reaction of gossypol with free ep-  
silon-amino groups of lysine in proteins". Archives of Biochemistry  
and Biophysics, (81): 130-134. 1959
- 51.- Boctor, A.M. y A.E. Harper. "Measurement of available lysine in hea-  
ted and unheated foodstuffs by chemical and biological methods". Jo-  
urnal of Nutrition, (94): 289-296. 1968 ✓
- 52.- Floridi, A.; R. Coli y M.S. Simonetti. "Food protein quality. II. -  
Semi-automatic determination of available lysine". Scienza e Tecnolo  
gia degli Alimenti, 3 (1): 25-27. 1973
- 53.- Bailey, C.J. "Automated analysis of available lysine and tyrosine in  
foodstuffs". Journal of the Science of Food and Agriculture, 25 (8):  
1007-1014. 1974

- 54.- Couch, J.R. "Collaborative study of the determination of available lysine in proteins and feeds". Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 58 (3): 599-601. 1975
- 55.- Hussein, L.A. "Comparison of methods for the determination of available lysine value in animal protein concentrations". Journal of the Science of Food and Agriculture, 25 (2): 117-120. 1974
- 56.- Holsinger, V.H. y L.P. Posati. "Chemical estimation of 'available' lysine in dehydrated dairy products: a review". Abstracts of Papers, American Chemical Society, 168, AGFD 11. 1974
- 57.- Lakin, A.L. "The estimation of protein & the evaluation of protein quality". IFST Proceedings, 6 (2): 80-83. 1973
- 58.- Landers, R.E. "Relationship between available lysine and protein quality of food products using Tetrahymena bioassay techniques". Abstracts of Papers, American Chemical Society, 168, AGFD 52. 1974
- 59.- Scott, J.A. y H. Smith. "Microbiological assay of protein quality with 'Tetrahymena pyriformis W.' 4. Measurement of available lysine, methionine, arginine and histidine". British Journal of Nutrition, (20): 663. 1966
- 60.- Ramírez, J.E.; J.R. Cavanaugh, K.S. Schweizer y P.D. Hoagland. "The determination of free epsilon-amino groups of lysine in proteins using <sup>19</sup>F NMR spectroscopy". Analytical Biochemistry, 63 (1): 130-134 - 1975
- 61.- Friedman, M. y J.W. Finley. "Vinyl compounds as reagents for measuring available lysine in proteins". Abstracts of Papers, American Chemical Society, 168, AGFD 12. 1974
- 62.- Hurrell, R.F. y K.J. Carpenter. "Mechanisms of heat damage in proteins. IV. The reactive lysine content of heat-damaged material as measured in different ways". British Journal of Nutrition, 32 (3): 589-604. 1974
- 63.- Frampton, V.L. y J.C. Kuck. "Sources of error in determination of available lysine in cottonseed and peanut meals". Journal of the American Oil Chemists' Society, 50 (8): 304-306. 1973
- 64.- Flores, J.; F. Pinaga, E. Primo y E. Miro. "Freeze drying of infant foods. II. Storage stability of freeze-dried foods". Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, 14 (2): 296-306. 1974

- 65.- Flores, J.; E. Miro, F. Pinaga y E. Primo. "Freeze-drying of baby - foods. I. Influence of process parameters on drying rate and food - quality". *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 13 (4): 596-608. 1973
- 66.- Aho, L. y P. Koivistoinen. "Amino acid composition of rye breads with special reference to lysine". *Acta Agriculturae Scandinavica*, 24 (2): 143-146. 1974
- 67.- Vuyst, A. de; W. Vervack; M. Foulon y L. Timmerman. "Effect of industrial processing of pork on the amino acid composition and content of available lysine". *Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires*, 28 (4): 145-149. 1973
- 68.- Huss, W. "Temporal development of lysine damage during storage of dried skim-milk under various conditions". *Landwirtschaftliche Forschung*, 27 (3/4): 199-210. 1974
- 69.- Castaing, J. y M. Leuillet. "Effects of low soybean meal contents, with or without added lysine, in growing and finishing diets for pigs". *Journées de la Recherche Porcine en France*, pp. 15-26. 1975
- 70.- Taira, H. "Heat destruction of amino acids in soybean products". *JARQ (Japan Agricultural Research Quarterly)*, 7 (4): 267-273. 1973
- 71.- Ruckemann, H.; H. Kummer y P. von Polheim. "The quality of dried whey". *Landwirtschaftliche Forschung*, 28 (II, Sonderheft): 64-70. 1973
- 72.- Huss, W. "Amino acid damage during processing and storage of whey and whey powder". *Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde*, 34 (1): 60-67. 1974
- 73.- Bourdonnaye, A. de la. "Utilization of whey - its nutritional value and future". *Revue Laitière Française* (323): 541-567. 1974
- 74.- Holsinger, V.H.; L.P. Posati; E.D. Devilbiss y M.J. Pallansch. "Variation of total and available lysine in dehydrated products from cheese wheys by different processes". *Journal of Dairy Science*, 56 (12): 1498-1504. 1973
- 75.- Anon. "Effects of protein content on the distribution and properties of rice protein". *Nutrition Reviews*, 32 (3): 85-86. 1974
- 76.- Juliano, B.O. y H.M. Beachell. "Status of rice improvement". Inter-

national Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.

- 77.- Eggum, B.O. y B.O. Juliano. "Higher protein content from nitrogen - fertilizer application and nutritive value of milled-rice protein". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26 (4): 425-427. - 1975
- 78.- Rao, P.H.; R.P. Rani, K.S. Srinivasan y S.R. Shurpalekan. "Proximate analysis and essential amino acid composition of improved varieties of oats". *Journal of Food Science and Technology, India*, 11 (4): 190-191. 1974
- 79.- Ingversen, J. y B. Koie. "Lysine-rich proteins in high-lysine *Hordeum vulgare* grain". *Phytochemistry*, 12 (5): 1107-1111. 1973
- 80.- Rhodes, A.P. y G. Jenkins. "The effect of varying nitrogen supply on the protein composition of a high lysine mutant of barley". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26, (6): 705-709. 1975
- 81.- Fritz, A.; M. Baumer y E. Ulonska. "Effect of increased N fertilization on protein content and quality of summer barley". *Mühle + Mischfuttertechnik*, 112 (16): 215-217. 1975
- 82.- Rhodes, A.P. y J.C. Mathers. "Varietal differences in the amino acid composition of barley grain during development and under varying nitrogen supply". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, - 25 (8): 963-972. 1974
- 83.- Sonntag, C. y G. Michael. "The effect of late nitrogen dressing on the protein content and composition of normal and high-lysine corn and barley". *Zeitschrift für Acker- und Pflanzenbau*, 138 (2): 116-128. 1973
- 84.- Helm, J.H.; R.J. Metzger y W.E. Kronstad. "Inheritance of high lysine in Hiproly barley and its association with the Hiproly endosperm gene". *Crop Science*, 14 (5): 637-640. 1974
- 85.- Kies, C. y H. Metz. "Protein nutritional value of opaque-2 corn grain for human adults". *The Journal of Nutrition*, 102 (6): 757-765. - 1972
- 86.- Stierwalt, T.R. "The nutritional quality and inheritance of various endosperm mutants in maize, *Sea mays L.*". *Dissertation Abstracts International*, B 35 (1) 22: Order no. 74-15162. 1974

- 87.- Mertz, E.T.; L.S. Bates y O.E. Nelson. "Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm" Science, 145: 279-280. 1964
- 88.- Un proyecto mundial del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. "Investigaciones y capacitación para la elaboración de maíz rico en lisina". PNUD-CIMMYT.
- 89.- Tsai, C.-Y.; L.W. Hansel y O.E. Nelson. "A colorimetric method of screening maize seeds for lysine content". Cereal Chemistry, 49 (5): 572-579. 1972
- 90.- Mertz et al. "Rapid ninhydrin color test for screening high-lysine mutants of maize, sorghum, barley and other cereal grains". Cereal Chemistry, 50 (6): 304-307. 1973
- 91.- Quicke, G.V. y H.O. Gevers. "Higher lysine levels and improved protein quality of opaque-2 maize". South African Medical Journal, (46): 1679-1684. 1972
- 92.- Choe, B.-H. "Inheritance of lysine synthesis and associated kernel characteristics in corn (*Zea mays* L.)". Dissertation Abstracts International, B 34 (11) 5285: Order no. 74-9918. 1974
- 93.- Ribeiral, U.C. "Effects of modified opaque-2 kernels on yield and protein quality and quantity of maize (*Zea mays*, L.)". Dissertation Abstracts International, B 35 (1) 20-21: Order no. 74-15227. 1974
- 94.- Misra, P.S.; E.T. Mertz y D.V. Glover. "Studies on corn proteins. - VI. Endosperm protein changes in single and double endosperm mutants of maize". Cereal Chemistry, 52 (2): 161-166. 1975
- 95.- Pesev, N.; D. Jelenic y V. Sukalovic. "Some genetic and biochemical characteristics of a new source of maize opaque-2 mutant". Theoretical and Applied Genetics, 43 (1): 23-26. 1973
- 96.- Banigo, E.O.I.; J.M. deMan y C.L. Duitschaever. "Utilization of high-lysine corn for the manufacture of ogi using a new, improved processing system". Cereal Chemistry, 51 (5): 559-572. 1974
- 97.- Bookwalter, G.N.; K. Warner; O.L. Brekke y E.L. Griffin, Jr. "High-lysine corn fractions and their characteristics". Journal of Food Science, 39 (1): 166-170. 1974
- 98.- Paez, A.V. y M.S. Zuber. "Protein quality study with the endosperm corn mutant genes opaque-2 and floury-2". Canadian Journal of Plant



Science, 53 (4): 715-720. 1973

- 99.- Yañez, E.; S. Guijuelos; D. Ballester y F. Monckeberg. "Chemical - composition, amino acid content and biological quality of opaque-2 corn". Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 23 (1): 113-121. - 1973
- 100.- Young, V.R.; I. Ozalp; B.V. Cholakos y N.S. Scrimshaw. "Protein value of colombian opaque-2 corn for young adult men". The Journal of Nutrition, 101: 1475-1482. 1971
- 101.- Informe del CIMMYT sobre Mejoramiento de Maíz. 1973
- 102.- Tsai, C.Y.; A. Dalby y R.A. Jones. "Lysine and tryptophan increases during germination of maize seed". Cereal Chemistry, 52 (3, part 1) 356-360. 1975
- 103.- Gómez, G.G.; J.H. Maner; Z. Flores y C.A. Francis. "A comparison of vitreous and soft endosperm high-lysine and common maize in diets - for growing rats and pigs". Journal of Animal Science, 41 (6): 1638 -1644. 1975
- 104.- Pleshkov, B.P.; V.F. Volobueva y E.I. Sinyagin. "Changes during ripening in protein composition of ordinary maize and its high-lysine analogue". Vestnik Sel'skokhozyaistvennoi Nauki, (4): 68-74. 1975
- 105.- Gevers, H.O. "A note on the correlation between lysine and tryptophan content in maize kernel endosperms". Cereal Chemistry, 52 (1): 115-118. 1975
- 106.- Paez, A.V. "Protein quality and kernel properties of modified opaque-2 endosperm corn involving a recessive allele at the sugary-2 locus". Crop Science, 13 (6): 633-636. 1973
- 107.- Wu, Y.V. y K.R. Sexson. "Protein concentrate from normal and high-lysine corns by alkaline extraction: composition and properties". - Journal of Food Science, (41): 512-515. 1976
- 108.- Wu, Y.V. y K.R. Sexson. "Protein concentrate from normal and high-lysine corns by alkaline extraction: preparation". Journal of Food Science, (41): 509-511. 1976
- 109.- Mehta, S.L.; M.L. Lodha y P.C. Mali. "Characterization of polysomes and incorporation in vitro of leucine and lysine in normal and opaque-2 Zea mays endosperm during development". Phytochemistry, (12): 2815-2820. 1973

- 110.- Murphy, J.J. y A. Delby. "Changes in the protein fractions of developing normal and opaque-2 maize endosperm". Cereal Chemistry, 48 (3): 336-349. 1971
- 111.- Paulis, J.W.; J.S. Wall y W.F. Kwolek. "A rapid turbidimetric analysis for zein in corn and its correlation with lysine content". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 22 (2): 313-317. 1974
- 112.- Ma, Y. y O.E. Nelson. "Amino acid composition and storage proteins in two new high-lysine mutants in maize". Cereal Chemistry, 52 (3): 412-419. 1975
- 113.- Choe, B.-H.; B.G. Cumbie y M.S. Zuber. "Association of zein body - classification with lysine content of corn (Zea mays L.) endosperm". Crop Science, 14 (2): 187-190. 1974
- 114.- Beckwith, A.C.; J.W. Paulis y J.S. Wall. "Direct estimation of lysine in corn meals by the ninhydrin color reaction". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 23 (2): 194. 1975
- 115.- Paulis, J.W.; J.S. Wall, W.F. Kwolek y G.L. Donaldson. "Selection of high-lysine corns with varied kernel characteristics and composition by a rapid turbidimetric assay for zein". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 22 (3): 318-323. 1974
- 116.- Tsen, C.C.; C.N. Mojibian y G.E. Inglett. "Defatted corn-germ flour as a nutrient fortifier for bread". Cereal Chemistry, 51 (2): 262-271. 1974
- 117.- Klein, R.G.; W.M. Beeson; T.R. Cline y E.T. Mertz. "Lysine availability of opaque-2 corn for rats". Journal of Animal Science, 35 (3): 551-555. 1972
- 118.- Maner, J.H.; W.G. Pond; J.T. Gallo, A. Henao, R. Portela y F. Linares. "Performance of rats and swine fed colombian floury-2, colombian opaque-2 or normal corn". Journal of Animal Science, 33 (4): 791-796. 1971
- 119.- Pond, W.G.; J.H. Maner y F.A. Linares. "Limiting amino acids in colombian floury-2 corn for growth of young rats". Journal of Animal Science, 33 (4): 787-790. 1971
- 120.- Thomas, V.W.; W.M. Beeson y T.W. Perry. "Effect of normal vs opaque-2 vs roasted normal corn and normal vs opaque-2 corn silage for finishing beef cattle". Journal of Animal Science, 41 (2): 641-646. -

1975

- 121.- Coburn, S.P.; E.W. Schaltenbrand; R.J. Clausman, E.M. Pauly, H. de Lesstine y D. Robinson. "Use of a low protein diet based on high-lysine corn in the management of phenylketonuria". Nutrition reports international, 7 (4): 229-239. 1973
- 122.- Jambunathan, R.; E.T. Mertz y J.D. Axtell. "Fractionation of soluble proteins of high-lysine and normal sorghum grain". Cereal Chemistry, 52 (1): 119-121. 1975
- 123.- Rana, B.S. y B.R. Murthy. "Heterosis and components of genetic variation for protein and lysine content in some grain sorghums". Theoretical and Applied Genetics, 45 (6): 225-230. 1975
- 124.- Mukuru, S.Z. "Estimation of genetic components, heritability, genetic advance and interrelationships of kernel weight and volume, protein, lysine and oil content and certain other traits in four segregating populations of grain sorghum". Dissertation Abstracts International, B 35 (1) 20: Order no. 74-15215. 1974
- 125.- Hosenev, R.C.; A.B. Davis y L.H. Harbers. "Pericarp and endosperm structure of sorghum grain shown by scanning electron microscopy". Cereal Chemistry, 51 (5): 552-558. 1974
- 126.- Eastoe, J.E. y R.H. Taylor. "Composition of protein of sorghum grain grown in Botswana". Journal of the Science of Food and Agriculture, 25 (5): 563-569. 1974
- 127.- Singh, R. "Effect of high-lysine (hl) and sugary (su) mutant genes on improved nutritional quality of sorghum grain". Dissertation Abstracts International, B 34 (8) 3593: Order no. 74-5050. 1974
- 128.- Singh, R. y J.D. Axtell. "High lysine mutant gene (hl) that improved protein quality and biological value of grain sorghum". Crop Science, 13 (5): 535-539. 1973
- 129.- Worede, M. "Genetic improvement of quality and agronomic characteristics of durum wheat for Ethiopia". Dissertation Abstracts International, B 35 (8) 3720: Order no. 75-3456. 1975
- 130.- Diehl, A.L. "Inheritance of grain protein and lysine in crosses of three high-protein wheats (Triticum aestivum L.)". Dissertation Abstracts International, B 35 (8) 3708-3709: Order no. 75-3418. 1975

- 131.- Yadav, S.P.; B.M. Lal y Y.P. Gupta. "Chemical composition and protein quality of improved varieties of Indian wheat (*Triticum aestivum* Linn)". *Indian Journal of Nutrition and Dietetics*, 10 (4): 178-181. 1973
- 132.- Ahuja, V.P. y A. Austin. "Amino acid composition of some improved wheats". *Indian Journal of Nutrition and Dietetics*, 10 (6): 286-291 1973
- 133.- Siddiqui, K.A. y H. Doll. "Screening for improved protein quality mutants in wheat". *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 70 (2): 143-147. 1973
- 134.- Tarkowski, C.; L. Tochman y E. Kimsa. "Variability of protein and lysine contents in Triticale grains". *Hodowla Roslin, Aklimatyzacja i Nasiennictwo*, 18 (5): 351-358. 1974
- 135.- Sotelo López, A.; A.M. Ostos del Río y M. Rodríguez F. "Contenido de lisina disponible y triptófano en concentrados proteicos". *Archivos de Investigación Médica*, 3 (2). 1972
- 136.- Kodagoda, L.P. "Isolation and functional properties of protein fractions from rapessed flour (*Brassica campestris* var. Echo)". *Dissertation Abstracts International*, B 33 (12, Part 1) 5901. 1973
- 137.- El-Nockrashy, A.S.; Khalil, A.H. y A.M. Gad. "Degossypolisation of cottonseed meal. IV. Effect of cottonseed pigment glands and intraglandular pigments on the lysine availability of cottonseed protein". *Grasas y Aceites*, 24 (4): 215-221. 1973
- 138.- Sastry, J.; E. Miro, F. Pinaga y E. Primo. "Freeze-drying. Effect of dehulling and heat processing on nutritional value of sesame proteins". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 51 (4): 115-118. 1974
- 139.- Prabhavathi, C.; M.S. Usha y G.S. Bains. "Effect of baking on the protein quality of high protein biscuits". *Indian Journal of Nutrition and Dietetics*, 10 (2): 91-95. 1973
- 140.- Evdokimova, G.I.; V.A. Yakovenko; L.R. Laliev y L. Yu Isarova. "Amino acid composition of lentil proteins". *Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii, Pishchevaya Tekhnologiya*, (4): 10-12. 1974
- 141.- Sands, D.G. y L. Hankin. "Selecting lysine-excreting mutants of *Lactobacilli* for use in food and feed enrichment". *Applied Microbiology*

gy, 28 (3): 523-524. 1974

142.- Orlova, L.P.; E.P. Koz'mina y A.I. Danilova. "Amino acid composition of almonds, filberts, cashew nuts froundnuts as well as of pas try based on them". Izveztiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii, Fishche vaya Tekhnologiya, (2): 128-129. 1973

143.- Aho, L. y P. Vuyst. "Amino acid composition of some cheeses". Lait, 53 (529/530): 625-635. 1973

144.- Bijok, F. "Effect of certain technological processes on the contents of sulphur compounds and lysine in processed cheeses". XIX International Dairy Congress, 1E, 706-707. 1974

145.- Sala Trepas, F.J. y J. Burgos. "Ripening of 'Cabrales' cheese. Changes in free amino acids during ripening". Anales de Bromatologia, - 24 (1): 61-82. 1972

146.- Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd. "Enriched rice". Japanese Patent 4 834 - 222. 1973

147.- Shoup, F.K. y W.E. Henry. "Lysine fortification of commercial bulgur". Cereal Chemistry, 50 (5): 571-575. 1973

148.- Yarov, I.; E. Kalinnikova y A. Kirichenko. "Exploitation of feeding ration energy and the quality of pork as depending on lysine source". Myasnaya Industriya SSSR, 44 (9): 40-42. 1973

149.- Nazarov, N.I.; N.N. Shebershneva; N.A. Rudakova y L.A. Pogorelova. "Enrichment of pasta with soybean protein concentrates". Khlebopekarnaya i Konditerskaya Promyshlennost' (1): 26-27. 1975

150.- Cheigh, H.S.; Y.R. Pyun y T.W. Kwon. "Lysine fortification of milssal and some observations on the fortified product". Korean Journal of Food Science and Technology, 6 (2): 109-115. 1974

151.- Keon, T.W. y H.S. Cheigh. "Fortification of the Milssal (a processed wheat grain) as a potential vehicle of providing lysine in the Korean food system". IV International Congress of Food Science and Technology 8a, 12-13. 1974