ESTUDIO ELECTROFORETICO DE ALGUNAS PROTEINAS ALIMENTICIAS DE ORIGEN VEGETAL

MA. DEL CARMEN GARCIA MIJARES Y CUETO

MEXICO, D. F. 1988

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

FACULTAD DE QUIMICA

Estudio Electroforético de Algunas Proteinas Alimenticias de Origen Vegetal.

T E S I S

Que para obtener el título de:

Q U I M I C O

p r e s e n t a :

MA. DEL CARMEN GARCIA MIJARES Y CUETO

MEXICO, D. F. 1966

A mis padres.

Mi agradecimiento a la Srita. Q. F. B.
Guadalupe Vélez Pratt,
por la ayuda prestada durante la realización de este trabajo.

I N D I C E.

	Página
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	34
RESULTADOS	43
RESULTADOS Y CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFIA	47

Página

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

A.- QUIMICA DE PROTEINAS 2

DEFINICION Y PROPIEDADES GENERALES 2

CLASIFICACION DE LAS PROTEINAS 2

ALGUNAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS 5

Diálisis 5
Desnaturalización 6

B.- AISLAMIENTO DE PROTEINAS 7

PRINCIPIOS GENERALES 9

Desnaturalización 10
Acción de las enzimas 13
Presencia de compuestos complejos 14
Otros cambios 14

METODO DE AISLAMIENTO DE PROTEINAS 14

CONCENTRACION, PURIFICACION, PRESERVACION Y ESTABILIZACION DE PROTEINAS. 15

Eliminación de agua 15
Eliminación de materiales no proteicos 17
Esterilización 19
Preservación y estabilización de proteínas 19

SEPARACION DE PROTEINAS POR SU SOLUBILIDAD. 20

Principios 20
Eliminación de iones y control del pH 22
"Salting-in" y "Salting-out" 22
Extracción con solventes orgánicos 23

PROTEINAS VEGETALES 24

C.- LAS PROTEINAS EN LA DIETA 25

ALGUNOS CONCEPTOS FUNDAMENTALES 25

Proteína patrón 27
Necesidad según las edades 28

Página

Necesidades de aminoácidos 29
Evaluación de la calidad de las proteínas 32

PROTEINAS L A DIETA Y SINTESIS DE PROTEINAS TISUL ES 33

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

Uno de los aspectos más importantes en el desarrollo de un país, lo -- constituye el estudio de las dietas adecuadas. En una dieta balanceada, -- las proteínas juegan un papel sumamente importante. Es necesario saber cuales son las proteínas más adecuadas a la dieta y de que fuente se pueden - obtener.

El presente trabajo intenta ser una ayuda a este estudio, para el --- cual se han recopilado datos concernitentes a las proteínas en general, a- su aislamiento y purificación. Se han estudiado algunas de ellas, que son- básicas en la alimentación del mexicano y otras, aún no muy explotadas en- este aspecto.

La revisión de algunas de sus características y propiedades permite - tener presente su actividad biológica y lo que ésta puede alterarse durante procesos (de preparación de alimentos) mejorando o empobreciendo su valor biológico.

A.- QUIMICA DE PROTEINAS.

DEFINICION Y PROPIEDADES GENERALES.

Las proteínas pueden ser definidas como compuestos de alto peso molecular, consistentes de cadenas de α aminoácidos unidos con enlaces peptídicos. Los aminoácidos constituyentes pueden obtenerse por hidrólisis de las proteínas. Las proteínas contienen, en general, veintitres aminoácidos, presentes en proporciones y uniones características en secuencia específica en cada proteína.

El peso molecular de una proteína varía desde cerca de 13 000 hasta varios millones. La mayoría de las proteínas, dependiendo de su tamaño molecular, no son difusibles a través de membranas semipermeables, como el celofán, son de dimensiones coloidales y presentan las propiedades asociadas con el estado coloidal de la materia.[4]

CLASIFICACION DE LAS PROTEINAS.

La clasificación de las proteínas usada hoy generalmente es la basada en las proposiciones del comité de la British Physiological Society y de

la American Physiological Society de 1907 y 1908 respectivamente.[4] Esta clasificación está basada en su solubilidad.

1.- Albúminas.- Solubles en agua y en soluciones salinas.

2.- Globulinas.- Poco solubles en agua pero solubles en soluciones - salinas.

3.- Prolaminas.- Solubles en etanol al 70 - 80 % pero insolubles en agua o en alcohol absoluto.

4.- Glutelinas.- Insolubles en los otros solventes arriba citados pe ro solubles en álcali o ácido.

5.- Escleroproteínas.- Insolubles en solventes acuosos (se disuelven en reactivos que causan considerables alteraciones- en su estructura).

Se clasifican también de acuerdo con su composición en:

I.- Proteínas simples.

a) Albúminas
b) Globulinas
c) Prolaminas
d) Glutelinas
e) Escleroproteínas.

II.- Proteínas conjugadas.

a) Nucleoproteínas
b) Fosfoproteínas
c) Porfirinoproteínas
    1.- Hemoproteínas
    2.- Clorofiloproteínas
d) Glucoproteínas
e) Lipoproteínas
f) Flavoproteínas

g) Metaloproteínas miscelaneos

III.- Proteínas derivadas

a) Productos de proteínas conjugadas

1.- Protaminas

2.- Histonas

3.- Otras

b) Proteínas desnaturalizadas

c) Productos de hidrólisis

1.- Proteosas

2.- Peptonas

3.- Péptidos.

Sin embargo este sistema de clasificación es un tanto relativo, porque se ha visto, al avanzar los estudios sobre bioquímica, que proteínas que se encuentran clasificadas como proteínas simples se encuentran en realidad unidas a carbohidratos como parte integral de su molécula.

Las proteínas conjugadas se clasifican de acuerdo con el grupo no proteico que está unido a la molécula, el cual se llama "grupo prostético".

Es posible clasificar a las proteínas en base a otros criterios, pero se ha visto que, a pesar de sus defectos, el sistema de clasificación de las proteínas de acuerdo con su composición y solubilidad es el más útil actualmente. (4)

GRUPOS CARGADOS EN LAS PROTEINAS.

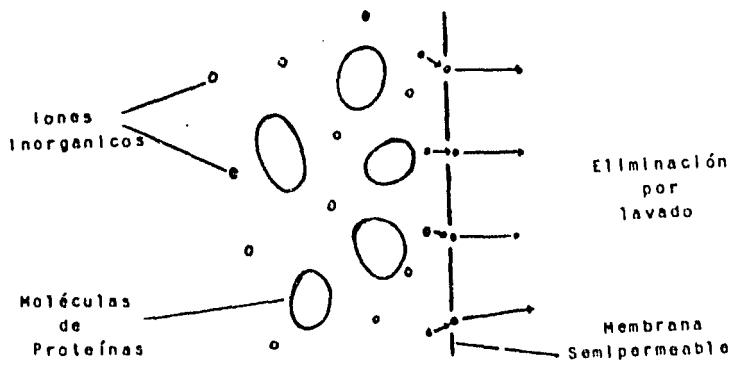
Las moléculas de proteínas presentan grupos cargados en su superficie, lo cual es de mucha importancia en muchos fenómenos biológicos. La carga eléctrica de la molécula de proteína depende de sus grupos ionizables, los que son todos ácidos y bases débiles ya que un grupo amino y un carboxilo de los aminoácidos se encuentran formando las largas cadenas de polipéptidos de las proteínas, estos grupos no son ionizables. Hay solo dos tipos de grupos ionizables: los grupos amino y carboxilo terminales de la-

proteína, y los grupos laterales de los aminoácidos que no participan en la unión peptídica. Estos últimos son los más importantes. Debido a estos grupos ionizables las proteínas actúan como soluciones reguladoras en los rangos fisiológicos de pH, que es de gran importancia en el organismo. Como resultado de las reacciones del metabolismo intermedio, se producen normalmente varios ácidos en cantidades significativas y en cantidades excesivas en ciertas condiciones anormales. Las proteínas tienen mucha importancia en la regulación del pH durante estos procesos, tanto como los fosfatos o bicarbonatos. Con exceso de alcalinidad ocurre lo mismo. (4)

ALGUNAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.

Diálisis.

Las dimensiones coloidales de las proteínas hacen posible la utilización de técnicos que son útiles en el laboratorio. La diálisis, por ejemplo, elimina partículas cristalinas más pequeñas (u otros coloides) por difusión selectiva a través de una membrana de permeabilidad apropieda.



Así, las sales usadas en la extracción o precipitación de una proteína, pueden eliminarse suspendiendo las proteínas y las sales en agua dentro

de un saco de celofán, sumergiendo este saco en un gran volumen de agua y cambiando el agua exterior hasta que no se detecten iones de la sal en el agua.[4]

Desnaturalización.

(a) Características.- La desnaturalización puede definirse como un cambio en las propiedades físicas, químicas y biológicas de una proteína en su estado nativo, caracterizada por un desdoblamiento de la molécula.

Parece improbable que dicho cambio pueda ser reversible, ya que el estado nativo de muchas proteínas, se caracteriza por una organización muy específica; sin embargo se ha encontrado que puede llevarse a cabo la conversión de ciertas proteínas desnaturalizadas a su estado original, aún encontrándose en forma prácticamente indestinguibles de sus formas nativas.

Este fenómeno puede ser excepcional y ocurre solamente en el caso de proteínas que no tienen una organización nativa muy específica.

(b) Agentes desnaturalizantes.- Muchos agentes pueden causar desnaturalización. Se incluyen agentes físicos, tales como calor, acción superficial, luz ultravioleta, presión elevada, y agentes químicos tales como disolventes orgánicos, ácidos, álcalis, urea, guanidina y detergentes.

(c) Alteraciones químicas. Entre las propiedades químicas alteradas de la proteína desnaturalizada está la gran disminución de su solubilidad en su punto isoeléctrico. Muchas proteínas que son muy solubles en todo el rango del pH y solo presentan una ligera disminución de su solubilidad en el punto isoeléctrico, se vuelven altamente insolubles a ese pH después de la desnaturalización. Como un resultado del proceso de desdoblamiento en la desnaturalización, muchos grupos químicos que se encuentran inactivos debido a que están encerrados en su estado nativo, salen a la superficie de la proteína y son fácilmente detectados.

Entre éstos están el grupo sulfhidrilo de la cisteína, el grupo di--

sulfuro de la cistina y el grupo fenólico de la tirosina, y otros.

(d) Alteraciones físicas. Una consecuencia de la conversión de la estructura nativa, compacta, a las cadenas dispersas de la proteína desnaturalizada es un incremento en la viscosidad de la solución. Simúltaneamente, la relación de difusión de las moléculas de proteína disminuye. Muchas proteínas especialmente del tipo globular, pueden cristalizarse en su estado nativo. Ya que la formación de un cristal depende del alto grado de organización de las moléculas, las proteínas desnaturalizadas no pueden ser cristalizadas.

(e) Alteraciones biológicas. En el caso de ciertas Proteínas desnaturalizadas se ha encontrado un aumento en la digestibilidad por enzimas proteolíticas. Las alteraciones más marcadas en las propiedades biológicas son las sufridas por aquellas proteínas que en el estado nativo tienen alguna función biológica específica. Por ejemplo, durante la desnaturalización es destruída completamente la actividad hormonal o enzimática. Las actividades antígeno o anticuerpo son frecuentemente alteradas. (4)

B.- AISLAMIENTO DE PROTEINAS.

Las proteínas comunmente se encuentran en mezclas complejas. En algunas de estas mezclas el número de proteínas es relativamente pequeño y predomina a menudo alguna variedad, como la caseína en la leche, o la albúmina en la clara de huevo. En otras, particularmente aquellas que componen las células de los tejidos animales y microorganismos, el número de proteínas puede ser muy grande. La mayor proporción de ésta son probablemente las proteínas enzimáticas, muchas de las cuales están presentes en muy pequeña cantidad. En casi cada clase de mezcla de proteínas hay también comunmente lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y otras sustancias orgánicas, así como muchas variedades de iones inorgánicos; cualquiera de éstos puede estar libre o asociado más o menos íntimamente con las proteínas.

El aislamiento de una proteína de una mezcla en la cual se encuentra -

requiere tanto la separación de los materiales no proteicos (con consideraciones apropiadas para aquellos que pueden estar combinados con las proteínas), como la separación de las otras múltiples proteínas que están presentes. La facilidad con la cual estas separaciones pueden llevarse a cabo, a cualquier grado de integridad, varía enormemente. En la práctica la separación no ha sido siempre completa, ya sea, porque no existen los métodos adecuados, o por que para los propósitos deseados se ha considerado satisfactoria una separación parcial. (11)

Son diversos los propósitos para los cuales se lleva a cabo una separación de proteínas. La investigación de la estructura, composición y propiedades de las moléculas de proteínas requieren sustancias que sean puras y homogéneas, al menos dentro de límites definidos. El estudio de la actividad biológica de las proteínas requiere que se separe el material con una sola clase de actividad, de ser posible sin pérdida de esa actividad, de los materiales que tengan otras clases de actividades. Para el estudio de la estructura biológica y la función es importante separar sustancias suave y sistemáticamente para preservar al máximo las relaciones que existían antes de hacer la separación. (11)

El establecimiento de las relaciones nutricionales, por otro lado, puede requerir el estudio de la mezcla completa de proteínas, como ocurre en alimentos, y de fracciones de proteínas purificadas de composición conocida. El uso industrial de proteínas en plásticos, fibras, adhesivos y pinturas, por ejemplo, requiere gran cantidad de productos estables, uniformes y bien caracterizados, y no necesariamente limitados a una clase de molécula de proteína.

Las dificultades que se han encontrado para el asilamiento y caracterización de proteínas han sido mayores que las que se presentaron en el estudio de la mayoría de los compuestos orgánicos. Hasta hace poco, muy pocas proteínas habían sido asiladas en un estado que pudiera considerarse como aproximadamente puro y homogeneo originándose serias dudas concernientes a la existencia de muchas proteínas como entidades químicas.

Mejorando los métodos se ha demostrado que muchos de los productos -- obtenidos inicialmente eran mezclas, algunas de las cuales han sido resueltas en sus componentes.

La comparación de las propiedades de los materiales aislados con aquellos de la mezcla original ha revelado, a menudo, la evidencia de la existencia independiente de las proteínas individuales en la mezcla. La electroforesis y ultracentrifugación han probado tal evidencia.

En muchos ejemplos, sin embargo, hay también evidencias de que las -- proteínas existen en la naturaleza en forma de asociaciones complejas con otras sustancias, reconocidas quizás como entidades funcionales, tales como fibras, membranas, mitocondrias u otra estructura granular dentro de -- las células vivas. Para muchas clases de investigaciones, por lo tanto, es importante disecar las estructuras vivas con cuidado, para aislar estos -- complejos funcionales sin modificar su forma. Esta ha sido referida como - su "estado en la naturaleza".

En la práctica muchos de los métodos empleados tienden a romper las - débiles asociaciones que se cree que existen al estado natural. (11)

Principios generales.

Precauciones necesarias para evitar alteraciones en los materiales -- proteicos.

La molécula de proteína está compuesta de una o más cadenas de polipéptidos. El número de residuos de cada aminoácido, el arreglo lineal de estos residuos a lo largo de cada cadena (los cuales pueden ser idénticos o no) y el arreglo en tres dimensiones producido por el doblamiento y la formación en espiral de las cadenas de péptidos, y su arreglo con respecto a las otras, todo contribuye a la estructura de la molécula de proteína. Las propiedades biológicas y químicas de la proteína dependen sobre todo de la integridad - de su estructura. Estas propiedades también pueden depender, a menudo en -- alto grado, de la presencia dentro de la molécula de porciones no proteicas,

más o menos unidas firmemente a las cadenas de polipéptidos.

Ya que un pequeño cambio en la estructura de la molécula de proteínapuede alterar sus propiedades,, es importante evitar, o controlar los cambios en la molécula durante el proceso de aislamiento. Tales cambios pueden ocurrir:

a) a través de reacciones químicas que rompan algunas de las uniones-covalentes en la molécula.

b) a través de cambios en los puentes de hidrógeno y puentes salinos, los cuales soportan la estructura tridimensional de la molécula, o a los-cuales está ligada la estructura de la proteína.

c) por un cambio en la asociación con otras proteínas o materiales no proteicos.

Como ha sido señalado, los cambios de la última clase puede ocurrir - sin modificaciones obligatorias de la molécula de proteína en sí, y aún -- cuando a la larga deben ser considerados, especialmente en relación con la-estructura celular, no son siempre de importancia en el problema de aislamiento de proteínas.

Por lo tanto debe evitarse en el aislamiento de proteínas nativas intactas el primero de los dos tipos de cambio, El significado de un cambio-de estructura particular puede diferir de una proteína a otra, también puede diferir bastante la resistencia al cambio entre las diferentes proteínas. En ausencia de información específica, generalmente es más satisfactorio emplear, cuando sea posible, solo aquellos procedimientos que se sabe-que no producen alteraciones en la estructura. (11)

Durante un proceso de aislamiento de proteínas es necesario tener encuenta ciertos factores que influyen sobre la estructura de una proteína - y que pueden alterar su actividad biológica.

Desnaturalización.

Se considera generalmente como cualquier cambio en la estructura de -

una molécula de proteína, lo cual conduce a un cambio detectable en sus -- propiedades, que produce alteraciones en la composición, o de ruptura de - las uniones covalentes, como hidrólisis de un péptido en sí. Son varios -- las causas que producen cambios no hidrolíticos que causan generalmente -- cambios profundos en las propiedades, incluyendo pérdida de la actividad - biológica. Se considerarán solamente aquellas condiciones y procedimientos que deben evitarse durante el aislamiento de proteínas, se estudiarán los- mismos para minimizar alteraciones en la proteína.

La temperatura debe mantenerse tan baja como sea posible todo el tiempo. Es conocida la coagulación e inactividad de los materiales proteicos - a temperaturas elevadas, y debe notarse que éstos son solo ejemplos extremos de la tendencia más general de las proteínas a desnaturalizarse a temperaturas altas especialmente si son favorables otras condiciones ambientales. En vista del alto coeficiente de temperatura del calor de desnaturalización, una diferencia de pocos grados puede ser altamente crítica.

Es importante, en general, mantener la temperatura baja aunque en la- fuente original una proteína determinada puede aparecer estable a altas -- temperaturas. Debe recordarse que una proteína preparada de una célula viva puede haber estado sufriendo constantes reabastecimientos dentro de la- célula, y que las condiciones ambientales en la célula son probablemente - más favorables para la existencia de la proteína nativa que aquellas condiciones a las cuales la ha expuesto el investigador.

La estabilidad de las proteínas al calor varía dentro de amplios límites; algunas proteínas son conocidas por ser resistentes a las temperaturas elevadas, inclusive a la ebullición. Esto se ha usado, a veces, en la purificación de proteínas resistentes a la temperatura para separarlas de -- acompañantes de estabilidad menor. Tales procedimientos deben emplearse -- con discreción y con la evidencia experimental de que la proteína aislada- ha permanecido sin afectar por el tratamiento en calor.

Son convenientes también las bajas temperaturas porque retardan el --

crecimiento de microorganismos, así como la acción de las enzimas destructoras que pueden estar presentes.

Deben evitarse en general, los extremos de pH. La mayoría de las proteínas son solo estables en un intervalo de pH relativamente limitado y se desnaturalizan rápidamente si sus soluciones se hacen más ácidas o básicas. El pH de máxima estabilidad es comunmente el rango cercano a la neutralidad y no es necesariamente el del punto isoeléctrico de la proteína. Se conocen también excepciones: la pepsina, por ejemplo, es más estable a un pH cercano a 5 y se destruye al pH neutro.

Ya que muchas proteínas se desnaturalizan rápidamente en presencia de solventes orgánicos solubles en agua, tales como etanol o acetona, el uso de estos solventes para propósitos de fraccionamiento requiere un cuidado particular en el mantenimiento de la temperatura, tan baja como sea posible. Por otro lado muchas proteínas son bastante estables en soluciones de glicerol.

Es importante en la adición de reactivos, particularmente de ácidos, bases o solventes orgánicos, evitar excesos con los cuales puede alcanzarse la desnaturalización. Los reactivos deben ser diluídos, los ácidos y álcalis deben ser soluciones amortiguadoras, y la adición debe tener lugar a través de una membrana de diálisis o a través de un orificio pequeño, lentamente y con agitación adecuada.

Debe ponerse atención a los efectos desnaturalizantes de superficies, películas y especialmente espumas. En la superficie de una solución acuosa o en una interfase, la proteína tiende a esparcirse en forma de película de proteína desnaturalizada. Bull (11) demostró que la película de una proteína desnaturalizada es eliminada continuamente de la superficie, y continúa la desnaturalización con la formación de más película. Si se permite que se forme espuma, la cantidad de proteínas desnaturalizadas puede se considerable y, con soluciones deluídas puede constituir una proporción apreciable de la proteína total. De aquí que sea aconsejable trabajar con-

soluciones concentradas, y particularmente evitar la formación de espuma.- El uso de reactivos antiespumantes puede ser, a veces, una práctica conveniente, pero no necesariamente previene la desnaturalización en la superficie.

Desde hace mucho se sabe que muchas proteínas son más estables en soluciones concentradas que en diluídas. Soluciones diluídas de sales neutras también incrementan la estabilidad de las proteínas, aún en soluciones diluídas.

Ya que la estabilidad de diferentes proteínas, aún en alguna mezcla,- puede variar grandemente, es evidente que el asilamiento de cada proteína- envuelve un estudio de sus peculiaridades especiales propias para conocer- las precauciones que deben tomarse. (11)

Acción de las enzimas.

Las enzinas que hidrolizan proteínas, o que atacan componentes no proteicos de proteínas conjugadas, pueden ser liberadas o activadas cuando -- los componentes de una mezcla son llevados a solución antes del fraccionamiento. Si esto se permite, los componentes que se van a necesitar de una mezcla pueden ser alterados o destruídos.

La importancia de la inactivación de la enzima proteolítica del pán-- creas para el asilamiento de la insulina es bien conocida. Aún si una enzima se presenta inicialmente en baja concentración, puede llegar a concentrarse en una fracción particular y así causar un daño excesivo.

Los microorganismos son evidentemente indeseables en soluciones de -- proteínas, ya que su actividad puede modificar la proteína o añadir complejos en la mezcla al introducir componentes adicionales. (11)

Los productos del metabolismo de microorganismos pueden modificar la- estructura de la proteína, y el microorganismo en sí puede destruirla to-- tal o parcialmente.

PRESENCIA DE COMPUESTOS COMPLEJOS.

Los compuestos complejos de proteínas con otras sustancias pueden requerir precauciones especiales, dependiendo de la naturaleza del componente no proteico y de la clase de ligadura que mantiene la unión. Se ha visto que las lipoproteínas son sensibles a la congelación. Otras clases de grupos prostéticos pueden ser alterados por acción química o enzimática, siendo más importante por un lado, la alteración de las propiedades biológicas específicas del material, y por otro, los cambios en solubilidad o en otras propiedades de la proteína conjugada. (11)

Otros cambios.

Otros cambios en la estructura o composición de proteínas incluyen cambios en el estado de oxidación de los grupos sulfhidrilo de la cisteína con un cambio resultante en las propiedades de la proteína; combinación con metales pesados, lo cual puede inactivar ciertas enzimas; o la pérdida de cofactores dializables u otros componentes de sistemas biológicamente activos.

Mientras el último puede incluir solamente una cuestión de astucia en la prueba de la actividad biológica, tales cambios no pueden ser ignorados en el curso de un proceso de aislamiento. (11)

METODOS DE AISLAMIENTO DE PROTEINAS.

Los métodos para la separación de entidades químicas pueden ser divididos en dos categorías. El primero incluye los métodos en los cuales varios constituyentes de una mezcla se distribuyen entre dos o más fases distintas físicamente y que se pueden separar en una forma mecánica. Esto requiere que las relaciones de distribución de algunos de los constituyentes difieran unos de otros. El segundo grupo incluye métodos en los cuales los constituyentes se distribuyen en regiones diferentes en una sola fase, en respuesta a la aplicación de un campo físico de fuerzas.

Debido a que las proteínas son solubles solamente en agua o en solu-

ciones acuosas de sales o de ciertos solventes polares tales como etanol,- y como las proteínas no pueden ser fundidas ni evaporadas, las fases entre las cuales pueden distribuirse las proteínas se limitan a sólido y solu--- ción. Pocos casos se han descrito en los cuales se pueden usar dos fases - de líquidos no miscibles.

La solubilidad de las proteínas, por otro lado, puede variar dentro - de amplios límites en soluciones acuosas de diferente composición. El número de variables que influyen en la solubilidad de las proteínas en estas - condiciones es tan grande que es posible, encontrar condiciones en las cuales predomina una de las siguientes situaciones:

(a) La proteína buscada es insoluble, mientras los otros componentes- proteicos permanecen en solución; (b) una proteína permanece en solución - mientras las otras precipitan.

Las principales variables que afectan la solubilidad de diferentes -- proteínas son: (a) temperatura, (b) pH, (c) fuerza iónica y concentración- y (d) constante dieléctrica. (II)

CONCENTRACION, PURIFICACION, PRESERVACION y ESTABILIZACION DE PROTEINAS.

Eliminación de agua.

Se requieren en general, soluciones de proteínas concentradas por varias razones. Las proteínas son generalmente más estables en soluciones -- concentradas; cristalizan a menudo, mejor de soluciones concentradas. Las- soluciones concentradas son usadas también en propósitos terapéuticos, por ejemplo, albúmina de plasma humano. Se pueden usar varios procesos para concentrar soluciones de proteínas, pero teniendo en cuenta todas las precauciones necesarias para evitar la desnaturalización.

En el proceso ordinario de laboratorio es a veces conveniente concentrar las proteínas simplemente por precipitación seguida por un redisolu--

ción a la concentración deseada. Esto no es económico si se usa gran cantidad de sal y presenta la desventaja, si es necesario eliminar el exceso de sal, de hacer una diálisis prolongada.

La concentración puede hacerse por diálisis bajo presión reducida. - Se han dado otros métodos, que aunque son satisfactorios, consumen mucho tiempo. Un método rápido para eliminar el agua consiste en permitir la -- evaporación del agua a través de una membrana. Esta técnica, llamada "pervaporación" fue descubierta por Kober. (11) La solución de proteína se coloca dentro de una bolsa hecha de celofán, que se expone a una corriente de aire, en un cuarto frío si se desea. El agua se elimina a menudo más - rápidamente que se congele la solución en la bolsa. Debe evitarse exponerla a aire que contenga vapores nocivos o partículas de polvo.

Las soluciones de proteínas pueden concentrarse también por eliminación de hielo. Si una solución se congela y se le permite deshelarse lentamente, se elevan a la superficie cristales de hielo que pueden eliminarse de la solución de proteína concentrada que queda abajo.

Las preparaciones de proteínas secas poseen ventajas obvias en estabilidad, manejo y en preparación de soluciones. El secado de proteínas generalmente requiere precauciones especiales si la condición original es que sean preservadas. Unas pocas proteínas, tales como caseína, se pueden secar para usos industriales de una manera excitosa, directamente como un -- precipitado húmedo. La mayoría de las proteínas tienden a desnaturalizarse al ser secadas por tales procedimientos y convertidas en masas duras que - son difíciles de manejar. Las proteínas que van a ser usadas para determinaciones analíticas, por lo tanto, primero deben ser coaguladas por calentamiento o con alcohol, lavadas y después secadas al aire.

La mayoría de las proteínas pueden secarse a partir del estado de congelación, con pequeña o ninguna pérdida de actividad. Ha sido informado--- (11), que algunas proteínas se desnaturalizan con el proceso, algunas se - destruyen simplemente por congelación. Las proteínas secadas así son poro-

sas, quebradizas y se extraen facilmente con solventes de lípidos. También se disuelven rápidamente cuando se humedecen con el solvente; esto se facilita si se añade el solvente en un recipiente al vacío que contenga la proteína.

El proceso de secado a partir del estado de congelación ha sido llamado liofilización. (11)

Eliminación de materiales no proteicos.

Los constituyentes no proteicos de una mezcla deben eliminarse de la preparación de proteínas cuando pueda demostrarse claramente que están presentes como compuestos coincidentales. Para propósitos estrictamente analíticos es costumbre eliminar sustancias no proteicas tan completamente como sea posible antes del análisis o incluir procedimientos analíticos adecuados para su determinación.

Durante los procedimientos usuales de fraccionamiento, el lípido libre puede separarse de la fracción proteica, simplemente en virtud de su solubilidad relativa, pero también puede eliminarse por extracción con solventes apropiados en cualquier momento. Los lípidos que están unidos pueden eliminarse después que la proteína ha sido alterada ya sea por desnaturalización con alcohol, o calor, o por congelación. Los lípidos son eliminados de lipoproteínas del plasma por extracción con etanol o etanol éter, a bajas temperaturas, por el procedimiento de Hardy y Gardiner y Mcfarlane. (11)

Los polisacáridos son difíciles de eliminar por procedimientos de fraccionamiento ordinarios. Se pueden separar de invertasa por adsorción en bentonita y de catalsa viva (o activa) por digestión con amilasa. (11) También se puede emplear la electroforésis para eliminar polisacáridos neutros, los cuales no emigran en un campo eléctrico.

Los ácidos nucleicos que están asociados con una proteína por medio de un puente salino pueden eliminarse por precipitación con una proteína básica como la protamina, a valores de pH donde ésta última forma un ácido

nucleico y la proteína no, por ejemplo, a un pH mayor o menor que el punto isoeléctrico de la proteína.

Las pequeñas moléculas y iones son eliminados frecuentemente por diálisis o electroforésis. Esto se requiere antes de la determinación del peso seco si se quieren evitar las correcciones, y generalmente se prefiere antes de usar otro procedimiento analítico (químico o biológico). También se usa la diálisis para eliminar los iones para la precipitación de euglobulinas.

La diálisis generalmente se lleva a cabo con ayuda de una membrana de colodión o celofán. La velocidad de la diálisis a través de las paredes del tubo de celofán es relativamente lenta. Parece que se puede incrementar el tamaño de los poros con un tratamiento con solución acuosa de $ZnCl_2$. Las proteínas de peso molecular pequeño, cerca de 13 000, como citocromo C, generalmente se pierden a través de los poros de la membrana. (11)

Las últimas trazas de iones pueden eliminarse por electroforésis.

El pH de una solución que contenga la proteína junto con electrolitos difusibles, puede cambiar de una forma marcada durante el estado inicial de la diálisis si uno de los miembros del par amortiguador se elimina mucho más rapidamente que el otro. En algunos casos se ha encontrado que el pH varía, a veces tanto como 2 ó 3 unidades de pH. La diferencia en la velocidad de la diálisis se ha atribuído a la naturaleza electroquímica de la membrana y se han sugerido modos de modificarla. En diálisis de solución de proteínas que contenga sulfato de amonio, y regulada a pH 7 con amoniaco, la caída en el pH puede prevenirse añadiendo amoniaco al líquido exterior (11)

Ocasionalmente la eliminación de iones conduce a la precipitación de algunas proteínas y a la inactivación de otras; en tales casos es preferible llevar a cabo la diálisis contra soluciones diluídas de sales. Por otro lado la inestabilidad puede aparecer por la eliminación de un cofactor.

Se están usando resinas de intercambio iónico para la eliminación de iones de soluciones de proteínas. (11)

Esterilización.

Siempre es deseable y a veces necesario proteger las preparaciones de proteínas contra contaminaciones microbianas. Deben evitarse particularmente los productos de acción microbinana en materiales que vayan a ser usados para administrar al hombre y animales.

Las bajas temperaturas y la presencia de sales o solventes orgánicos en concentraciones moderadas retardan el desarrollo de microorganismos. Los antisépticos deben usarse a discreción debido a que causan inactivación.

Se han usado compuestos orgánicos mercuriales en la preservación de plasma humano, pero son inapropiados para la preparación de albúmina de plasma por el proceso de alcohol, ya que los compuestos orgánicos mercuriales se vuelven indebidamente concentrados en la fracción de albúminas.

Se han empleado antibióticos como la penicilina en donde se ha podido demostrar que no interfieren en las reacciones enzimáticas que tienen lugar. Se ha encontrado que el tolueno es uno de los antisépticos más útiles ya que no interfiere en la mayoría de las reacciones químicas o enzimáticas. (11)

Las soluciones de proteínas pueden ser liberadas de microorganismos filtrándolas a través de almohadillas de filtro sin dañar la mayoría de las proteínas. Este es un paso esencial en la preparación de materiales biológicos para usos terapéutico. (11)

Preservación y estabilización de proteínas.

Las proteínas se preservan muy bien tanto por enfriamiento como por secado a partir del estado de enfriamiento (liofilización), excepto aquéllas que son alteradas por estos procedimientos, La mayoría de las proteínas también pueden ser almacenadas en forma de precipitados húmedos. Las

proteínas en solución se desnaturalizan generalmente y están sujetas a la acción de las enzimas y microorganismos. Por lo tanto, las soluciones de proteínas deben almacenarse bajo condiciones de esterilidad y asepsia, en soluciones concentradas y en presencia de sales u otra sustancia estabilizante.

Se ha visto que la albúmina cristalina de plasma humano contiene pequeñas cantidades de ácidos grasos. Cuando éstos son eliminados de la proteína, ésta es menos estable y la desnaturalización de estas albúminas se retarda bastante por la presencia de aniones de ácidos grasos, mandelato de sodio o triptofano. Por otro lado la γ globulina del plasma no se estabiliza con estas sustancias pero se estabiliza con azúcar o glicina.(11)

SEPARACION DE PROTEINAS POR SU SOLUBILIDAD.

Principios.

La solubilidad de las diferentes proteínas varía grandemente, lo cual ha ayudado a la separación de las mismas. Algunas, que se pueden encontrar en estructuras organizadas, son solubles solamente después de la extracción del lípido. Algunas, como las prolaminas, son solamente solubles en alcohol al 60 - 80 %. La mayoría de las otras proteínas son más o menos solubles en agua o en soluciones acuosas diluídas de sales a valores moderados de temperatura y pH y en soluciones acuosas diluídas de solventes orgánicos. en la mayoría de los otros solventes las proteínas son insolubles; a extremos de pH y temperatura, o en muchos solventes orgánicos, se desnaturalizan rápidamente, Dentro de estos límites de estabilidad, cualquier proteína dada puede mostrar amplias variaciones en solubilidad, dependiendo de las condiciones externas. La diferencia de solubilidad representa uno de los principales medios para la separación de las proteínas.

La solubilidad de una proteína depende de la proporción de los grupos nos polares hidrofóbicos y los grupos polares hidrofílicos en la molécula y de su arreglo, y el momento dipolar resultante. Los grupos con carga polar interaccionan electrostáticamente uno con otro en la misma molécula --

o moléculas adyacentes, pero estas fuerzas se ven disminuídas en agua como resultado de la alta constante dieléctrica, al mismo tiempo que se presentan las interacciones entre los grupos polares y las moléculas de agua, -- favoreciendo la solubilidad. La adición de un solvente al agua, como etanol, baja la constante dieléctrica y también desplaza algunas de las moléculas de agua; como resultado, las proteínas que son muy solubles en agua, son mucho menos solubles en mezclas de agua-etanol.

Como resultado de la interacción entre los grupos cargados de una molécula de proteína y los iones de las sales disueltas, muchas proteínas -- que son muy insolubles en agua pura, se disuelven en presencia de pequeñas cantidades de sales neutras.

La adición de un ión dipolar, como glicina, también aumenta la solubilidad de las proteínas. El efecto es algo menor que el producido por una - concentración equivalente de NaCl y es aproximadamente igual con diferentes iones polares en soluciones que tengan las mismas constantes dieléctricas.

Las proteínas son sustancias anfotéricas multivalentes que contienen grupos cargados positiva y negativamente, el número de los cuales varía -- con el pH. En ausencia de sales se tiene generalmente la menor solubilidad en el pH isoiónico de la proteína donde la carga neta es cero, y es mayor a valores de pH mayores o menores.

Como se observa en soluciones diluídas de sales, el pH de mínima solubilidad no coincide necesariamente con el punto isoiónico si la proteína - interacciona con uno de los componentes iónicos de la sal.

No hay regla general que describa el efecto de la temperatura sobre - la solubilidad de las proteínas. La solubilidad de muchas proteínas aumenta con la temperatura, algunas en soluciones de sales diluídas y otras --- en solución concentrada, tan bien como en mezclas etanol-agua. Por otro -- lado, la solubilidad de una proteína a menudo disminuye fuertemente cuando se eleva la temperatura.

Las proteínas forman sales ligeramente solubles con varios aniones - o cationes, incluyendo otras proteínas y macromoléculas al igual que simples iones. También pueden formar compuestos relativamente insolubles con sustancias neutras (11).

Eliminación de iones y control del pH.

Las globulinas presentes en semillas de la gran mayoría de plantas - comunes han sido investigadas extensamente por Osborne (11). Una gran mayoría de éstas ha sido preparada, muchas en forma cristalina, aprovechando su solubilidad en soluciones de sal neutra. Las globulinas pueden ser extraídas de semillas secas, molidas, libres de grasa, por una solución - al 5 - 10 % de NaCl, frecuentemente a una temperatura ligeramente elevada para incrementar su solubilidad. La edestina puede precipitarse en forma cristalina simplemente por enfriamiento del extracto caliente. La globulina cristalina de la semilla de las cucurbitáceas, que se ha propuesto --- como un útil sustituto de la edestina, se extrae con NaCl al 10 %, y se - precipita diluyendo cuatro veces con enfriamiento. Las concanavalinas se preparan de un extracto salino de harina de frijol (después de la extracción de la ureasa con acetona). La concentración de la sal debe bajarse - por diálisis, aproximadamente a pH 7, hasta la cristalización de la concanavalina A. La forma B se separa entonces, como cristales, al ajustar el pH a 5.1 (11).

La β lactoglobulina, de suero vegetal, cristaliza solamente después de la eliminación casi completa de la sal por una diálisis exhaustiva en - el punto isoeléctrico, cerca de pH 5.2 (11).

"Salting-in" y "salting-out."

El sulfato de amonio se ha usado ampliamente como agente de "Salting-out" dado que es bastante efectivo y suficientemente soluble. La solubilidad limitada del sulfato de sodio tiende a restringuir su uso, mientras -- que el sulfato de magnesio tiene una efectividad relativamente baja. El --

sulfato de potasio es un precipitante efectivo pero no es lo suficientemente soluble para cada necesidad. Otras sales tienen un uso ocasional (11)

La solubilidad de una proteína en agua en ausencia de sal, decrece -- suficientemente por la adición de un solvente orgánico. Bajo estas condiciones, el incremento en la solubilidad producida por la adición de sales, es decir, la magnitud de su disolución salina (" Salting-in"), es especialmente grande ya que la disminución de la constante dieléctrica no solamente reduce la solubilidad de la proteína en ausencia de sal, sino que -- también aumenta las interacciones electrostáticas entre los grupos cargados de la molécula de proteína y los iones de la sal.

Extracción con solventes orgánicos.

Ciertas proteínas, especialmente las encontradas en semillas, las prolaminas, son poco solubles en agua (con o sin sal) o en alcoholes puros, - pero se disuelven en soluciones acuosas que contengan 60 - 80 % de un solvente orgánico, como etanol o propanol. El procedimiento usual para el --- aislamiento de estas proteínas consiste en la extracción con la mezcla de solventes y precipitación por dilución con agua. Las proteínas preparadas por este método, tales como gliadina y zeína, permanecen inhomogéneas, aún después de refraccionamiento extensivo.

Otras proteínas son precipitadas de soluciones acuosas en presencia de concentraciones moderadas de etanol o solventes similares. A temperaturas bajas, lo cual es importante para prevenir la desnaturalización (0° C o menos), y a un pH de solubilidad mínima, es suficiente etanol de 40 % para precipitar la mayoría de las proteínas. Muchas son precipitadas a concentraciones menores; el fibrinógeno por ejemplo, precipita a concentraciones de etanol menores del 10 % a 0° ó - 2° C. La adición de etanol a una

mezcla compleja (como plasma) precipita sucesivamente los componentes en - orden de sus sulubilidades; la mayoría de las globulinas precipitan más rápidamente que las albúminas. Un control apropiado de las variables adicionales, tales como pH, fuerza iónica y temperatura, permite una discriminación mayor entre los diferentes componentes del sistema.

En un sistema que contenga suficiente etanol para bajar la solubilidad de muchas de las proteínas presentes, puede usarse un ajuste apropiado del pH y fuerza iónica para separar proteínas que difieran en su punto --- isoeléctrico y en características de "salting-in". Puede lograrse la separación de pseudoglobulinas solubles en agua y albúminas por medio de precipitación isoeléctrica a baja fuerza iónica.[11]

PROTEINAS VEGETALES.-

Todas las células de las plantas contienen proteínas; las semillas de las plantas leguminosas y de varios cereales son particularmente ricas en- ellas. Estas proteínas pueden ser fraccionadas por extracción con varios- solventes, o por "salting-out". La mayoría de las proteínas de las plantas son globulinas o prolaminas. Las fracciones de albúminas no son cantidades mayores de 0.5 a 1 % del material orgánico total. Es interesante- que algunas de las albúminas de las plantas, particularmente de las leguminosas, son tóxicas a los animales y causan aglutinación de las células rojas de la sangre.

Nuestro conocimiento de las globulinas de las plantas está basado -- principalmente en los trabajos de Osborne y Mendel[9] (1924). Muchas glo-

bulinas pueden ser extraídas de las semillas por una solución salina de 2- al 10 %, y recristalizadas de esta solución hipertónica por dilución con - agua.

La globulina de las plantas más investigada es la edestina, la globulina de la semilla de cáñamo.

Si una solución de una globulina de plantas es dializada contra agua-destilada, la proteína se hace insoluble y se obtiene como un precipitado, frecuentemente como cristales.

El peso molecular de las globulinas vegetales es aproximadamente de - 200 000 a 300,000. Es posible que estas moléculas grandes sean polímeros- de subunidades más pequeñas.

En contraste con la edestina y otras globulinas similares que son insolubles en etanol, algunas de las globulinas de las plantas, particularmente de cereales, son solubles en etanol del 50 al 80 %, pero insolubles- en concentraciones mayores o menores. Estas son llamadas prolaminas porque son particularmente ricas en prolina.

Las prolaminas contienen muy pequeñas cantidades de aminoácidos básicos y cisteína, y algunas de ellas están completamente desprovistas de lisina.

Una gran porción de molécula de prolamina, como 40 %, están obtenidas a partir de glutamina.

Ninguna de las prolaminas ha sido obtenida como cristales; aún las -- preparaciones más puras se han encontrado que son mezclas de dos o más proteínas. Su peso molecular varía de 20 000 a 50 000.(9)

C.- LAS PROTEINAS EN LA DIETA.-

ALGUNOS CONCEPTOS FUNDAMENTALES.-

El fin primario de las proteínas en una dieta es el de suministrar --

los aminoácidos en las combinaciones adecuadas para la síntesis económica de las proteínas y de las otras sustancias nitrogenadas esenciales al organismo y para otras varias funciones metabólicas y fisiológicas. El valor nutritivo de una proteína se determina por su capacidad para satisfacer estos objetivos.

El suministro de aminoácidos para la síntesis de las proteínas celulares es de capital importancia. Para que este proceso se verifique es necesario que más de 20 aminoácidos se ordenen en las posiciones justas y en el tiempo exacto. El organismo puede hacer la síntesis de algunos de los aminoácidos necesarios para esa función, pero de otros sólo lo hace en cantidades insuficientes y por ello tienen que ser suministrados en la dieta. Estos últimos son los aminoácidos "esenciales" o "indispensables".[14]

El equilibrio nitrogenado se puede establecer solamente cuando la dieta, además de los aminoácidos indispensables, proporciona nitrógeno en cantidad suficiente para la síntesis de los otros requeridos para distintos procesos metabólicos en el organismo. Los aminoácidos indispensables, además de suministrar los componentes de los tejidos pueden ser necesarios también para otros procesos metabólicos importantes.

La cantidad de aminoácidos necesarios por unidad de peso corporal varían a veces considerablemente durante distintas edades de la vida humana. Los estados de salud y enfermedad pueden además requerir diferentes necesidades de aminoácidos.

La proteína de un alimento tiene gran valor nutritivo cuando, después de la digestión y absorción gastrointestinales, suministra aminoácidos en las proporciones requeridas para subvenir a las necesidades del organismo.

La medida más directa del valor nutritivo de las proteínas es lo que se llama "balance nitrogenado". Si se suministra una determinada proteína, el balance nitrogenado será la diferencia entre las cantidades de nitrógeno incorporadas y las excretadas. Cuando este balance es positivo, quiere decir que el sujeto gana nitrógeno, y si es negativo, que lo pierde. Cuan

do el resultado es cero se dice que el organismo se encuentra en un estado de equilibrio nitrogenado.

Podría darse el caso de que una proteína contuviera todos los aminoácidos indispensables en la combinación favorable para la síntesis de las proteínas celulares y que, a pesar de ello, su valor nutritivo fuera escaso, a causa de que la digestión no pudiera liberar los aminoácidos ni el organismo absorberlos en las justas cantidades ni proporciones.

Ciertas formas de preparación de los alimentos y aún la propia cocción, pueden cambiar el valor proteínico de los alimentos, aumentándolos o disminuyéndolos y esto, algunas veces, sin cambio perceptible en su composición química. Este fenómeno es, con frecuencia, el resultado de cambios en el ritmo o en el grado en que la hidrólisis enzimática es completa. Algunas veces se puede mejorar la digestibilidad de estas sustancias mediante la destrucción por el calor de una enzima inhibitoria; en otros la función digestiva resulta dificultada por cambios en los enlaces químicos de la proteína. Por consiguiente se debe tener en cuenta la digestibilidad de una proteína en la dieta, calculando la utilización general del alimento.

La utilización de los aminoácidos depende de la naturaleza de la dieta en conjunto, de la distribución en el tiempo de las comidas y de la eficiente digestión y absorción gastroentéricas.(14)

Las necesidades mínimas, en el adulto, corresponden a la más pequeña cantidad de proteínas que es suficiente para mantener el equilibrio nitrogenado, siempre que la dieta sea adecuada en otros aspectos.(14)

PROTEINA PATRON.-

Dada la gran diferencia que existe en el valor nutritivo de las distintas proteínas, o de sus combinaciones, la expresión de sus necesidades debe relacionarse con alguna proteína de calidad específica bien definida. Por esta razón se expresan las necesidades en términos de una "proteína de alto valor nutritivo". Se propone una "combinación de aminoácidos" seme-

jante a las proteínas de la leche y los huevos, y se parte del supuesto de que una proteína cualquiera que tuviera tal combinación de aminoácidos, -- tendría alto valor biológico. A esta combinación teórica de aminoácidos - se llamó "proteína patrón".[14]

NECESIDADES SEGUN LAS EDADES.-

Se estima que 2 g de proteína por kilo de peso es una cantidad sufi-- ciente para subvenir las necesidades de los niños después del primer mes - hasta el sexto mes de edad, si se proveen como leche materna o de vaca su- mistrada en forma fácilmente digerible por el niño.

Las necesidades de las proteínas van en disminución desde la infancia hasta la iniciación de la pubertad.

Se considera que en esta fase de la vida las necesidades en términos- de la proteína patrón no deben fijarse en menos de 0.8 g por kilo de peso.

Se sugiere para los adultos la cifra de 0.35 g por kilo de peso como- promedio de las necesidades mínimas en términos de la proteína patrón.

Al señalar todas estas cantidades se supone que están totalmente sa-- tisfechas las necesidades calorífficas.

Mujer embarazada.- Exceso de 10 g diarios sobre las necesidades nor males del adulto.

Mujeres lactantes.- Exceso de 30 g diarios.[14]

Las distintas proteínas o combinaciones de éstas, contienen los ami-- noácidos indispensables en proporciones variadas. Esto quiere decir que- el problema de satisfacer las necesidades proteicas consiste, más que en aumentar el total de proteínas ingeridas, en suministrar los aminoácidos - indispensables en cantidades y proporciones adecuadas. Así por ejemplo, - el valor de las mezclas de proteínas de ciertas dietas o las de los princi pales cereales alimenticios se pueden mejorar frecuentemente agregándoles- pequeñas cantidades de otras proteínas. Hay ciertas de éstas que, sea --- cualquiera la cantidad que de ellas se ingiera, no pueden satisfacer las -

necesidades; pero pueden, sin embargo, aumentar el valor nutritivo de ciertos tipos de dietas mejorando su combinación de aminoácidos.(14)

NECESIDADES DE AMINOACIDOS.-

El conocimiento sobre las necesidades humanas de aminoácidos indispensables es todavía fragmentario y está basado en un número relativamente escaso de observaciones realizadas, parte en niños y parte en adultos.

Para mantener el equilibrio nitrogenado en el adulto, resultan indispensables solamente 8 aminoácidos: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano y valina.(14)

Aunque los aminoácidos indispensables son de primordial importancia para determinar el valor nutritivo de las proteínas también puede tener cierta importancia la distribución de los otros aminoácidos.

Los aminoácidos no indispensables cistina y tirosina tienen la capacidad de economizar, respectivamente, buena parte de metionina y fenilalanina; esta característica debe tenerse presente cuando se trata de evaluar las necesidades de los últimos.

Puede tener significado el desequilibrio entre los diferentes aminoácidos. En ciertas circunstancias, el exceso de uno puede disminuir la utilización de otro que se encuentra presente en la dieta en cantidades normalmente adecuada. Así se han obtenido pruebas de que la cantidad de leucina que contiene el maíz puede ser lo bastante grande comp para determinar un aumento en las necesidades de isoleucina.

Esto indica que los datos relativos a las necesidades humanas en aminoácidos esenciales deben ser usados con cautela y prestando la debida atención a la profusión de factores que hacen complejo el asunto. Sin embargo se considera que se puede abordar razonablemente el problema de satisfacer las necesidades humanas por lo que respecta a la calidad de las proteínas, comparando la combinación de aminoácidos indispensables en los alimentos y en las dietas, con una combinación ideal basada en los conoci-

mientos de las necesidades de aminoácidos indispensables en las personas sanas.

Valor biológico de una proteína es la fracción de nitrógeno absorbido de la alimentación que se retiene en el organismo.[14].

La calidad de una proteína depende de su digestibilidad y de la combinación de los aminoácidos en la proteína.[14]

Tiene grandes ventajas el concepto de combinación-tipo ideal de aminoácidos esenciales. Comparando los datos referentes al contenido en aminoácidos de las combinaciones de alimentos, con la adoptada como tipo, se puede, en múltiples situaciones, determinar si una dieta es deficiente, y cuales son los métodos para corregirla. Aunque sean de carácter aproximativo, se pueden hacer comparaciones directas mediante el empleo de datos que indican el contenido en aminoácidos indispensables de los alimentos, independientemente de las proporciones en que cada uno de éstos últimos entren en la dieta. Debe advertirse que no hay pruebas experimentales de que la combinación-tipo provisional, basada en los conocimientos actuales de las necesidades mínimas, sea superior a las combinaciones de los aminoácidos que se pueden observar en las buenas proteínas alimenticias, tales como las de la leche y los huevos.[14]

Combinación-tipo provisional de aminoácidos indispensables calculada del promedio de las necesidades mínimas de personas:[14]

Isoleucina	3.0
Leucina	3.4
Lisina	3.0
Fenilalanina	2.0
Metionina	1.6
Cistina	1.4
Treonina	2.0

Triptofano	1.0
Valina	3.0

Utilizando esta combinación-tipo provisional de aminoácidos como guía, una dieta teórica que contenga 40 % de proteína de maíz más 30 % de proteínas de frijoles blancos más 30 % de proteínas de ajonjolí es una dieta bastante completa; proporciona lisina y los aminoácidos sulfonados en un nivel satisfactorio y el triptofano en bastante cantidad.

Sin embargo el valor nutritivo de estas combinaciones alimenticias, hechas a base de tales cálculos, deben ser siempre objeto de confirmación biológica.(14)

El cómputo proteínico indica la proporción en que un alimento o combinación de alimentos contienen su aminoácido limitante en comparación con la combinación-tipo provisional.

Pero dado lo incompleto de los conocimientos actuales acerca de las necesidades de aminoácidos en el hombre y del contenido de ellos en los alimentos, no puede esperarse que exista una perfecta concordancia entre los cómputos proteínicos y los valores biológicos.

Experimentalmente se ha demostrado que los alimentos o mezclas de alimentos cuyo valor biológico es por lo menos de 70, resultan satisfactorios para el mantenimiento y crecimiento de la persona; y no lo son si el valor biológico es de 60 o menor.

En algunos alimentos o mezclas de ellos, el desequilibrio entre los aminoácidos puede dar como resultado que su valor biológico sea inferior a lo que pudieran indicar los cómputos proteínicos.

Los conceptos de la combinación-tipo provisional de aminoácidos y de los cómputos proteínicos ofrecen, sin embargo, un método posible de estimar el valor nutritivo de una dieta, partiendo de su compisición de aminoácidos.(14)

La proteína de huevo tiene un valor biológico cercano a 100, es decir, la proteína es casi completamente absorbida y no hay pérdida de nitrógeno por la orina sobre la pérdida normal en dietas libres de proteína.[1]

Medida del valor nutritivo de proteínas:

Hay varios métodos que permiten medir el valor biológico de una proteína[1] y solo se mencionan a continuación.

1.- Método de crecimiento de animales de laboratorio

2.- Método de balance de nitrógeno

3.- Método de repleción

4.- Método de "Chemical scoring".

EVALUACION DE LA CALIDAD DE LAS PROTEINAS.

El contenido de proteínas en los alimentos se estima conveniente de su contenido de nitrógeno, estimado por el método de Kjeldahl.

Los niveles de aminoácidos determinados después de la hidrólisis ácida de alimentos predice su valor potencial en nutrición. Para algunos materiales, y algunos métodos de preparación, el valor efectivo es significativamente menor. Para ciertos materiales que no se calientan, por ejemplo los cereales, se ha sugerido la evidencia que la lisina es parcialmente no utilizable. Los materiales ricos en carbohidratos pueden reducir su valor nutritivo por calentamiento, y después restaurado el valor por adición de lisina. También hay disminución en la utilización de lisina cuando los concentrados de proteínas que contienen poco o nada de carbohídratos se sujetan a un calentamiento severo. Un tratamiento térmico severo de concentrados de proteínas se ha demostrado también que reduce la utilización de los aminoácidos que contienen azufre. Existe muy poca información concerniente a la utilización de otros aminoácidos aparte de lisina y metionina, pero la observación de que la isoleucina, un aminoácido con una cadena lateral de -

tipo hidrocarburo no reactivo, es inutilizable en ciertas proteínas purificadas sugiere que otros aminoácidos también pueden estar presentes en una forma no utilizable.[13]

PROTEINAS DE LA DIETA Y SINTESIS DE PROTEINAS TISULARES.-

El valor nutritivo de una proteína intacta no depende solamente de la presencia de los aminoácidos esenciales, sino también de las velocidades relativas a las cuales son liberados por las enzimas digestivas.

Por lo tanto ha sido sugerido por Melnick et al (1964) [1] que el incremento del valor biológico de las proteínas del frijol de soya después del calentamiento, es debido a la mayor facilidad de liberación del aminoácido limitante, metionina.

Es decir, la presencia de todos los aminoácidos esenciales en una dieta de proteínas es un prerrequisito para la nutrición adecuada. Por otro lado, si todo lo que se requiere es una fuente adecuada de todos los aminoácidos esenciales en el sitio apropiado, la deficiencia en proteínas pobres con bajo contenido de ciertos aminoácidos esenciales puede ser suplida por un aumento de la dieta o por un suplemento de los aminoácidos deficientes.[1]

MATERIAL Y METODOS.

Se estudiaron durante el transcurso de este trabajo las proteínas de las siguientes semillas: alubia, calabaza, frijol, haba, lenteja, maíz, soya, garbanzo y trigo. Todas éstas, perfectamente secas y molidas, se extrajeron con cuatro tipos de solventes:

1.- etanol al 70 %

2.- sulfato de amonio en solución saturada

3.- cloruro de sodio al 1 %

4.- cloruro de sodio al 10 %

En cada uno de los casos se pesaron 50 g de muestra y se extrajeron con 200 ml del solvente empleado. Las técnicas seguidas en cada una de las extracciones fueron las siguientes:

Extracción de las muestras con etanol al 70 %

1.- Se extrajeron las muestras con el etanol durante 24 horas en un cuarto frío.

2.- Filtración de las muestras.

3.- Se trató de hacer la electroforesis poniendo en cada tubo de gel- 0.1 ml del extracto alcohólico mezclado con 0.1 ml de solución de urea al- 5 %. Sin embargo no se pudo hacer la electroforésis debido a la menor -- densidad del extracto, lo cual provocaba que al añadir la solución amortiguadora a la cuba superior, ascendiera el extracto mezclándose con ella.

4.- Se aumentó la densidad del extracto añadiendo glicerina en tal -- cantidad que quedara una solución de glicerina al 30 %.

5.- Se practicó la electroforésis de todas las muestras siguiendo la- técnica descrita antes.

Extracción de las muestras con solución saturada de sulfato de amonio

1.- Extracción de las muestras con la solución de sulfato de amonio,- durante 24 horas, en frío.

2.- Filtración de las muestras.

3.- Se trató de hacer la electroforésis, pero no emigraron las mues-- tras debido a que, por la alta concentración de sulfato de amonio, se encontraban las proteínas en su punto isoeléctrico.

4.- Eliminación del sulfato de amonio por diálisis contra agua destila da durante 15 días, con cambio periódico del agua, en frío.

5.- Electroforesis de las muestras poniendo en los tubos de gel 0.1 - ml del extracto con 0.1 ml de la solución de urea al 5 %.

Extracción de las muestras con solución de cloruro de sodio al 1 %

1.- Se pusieron las muestras 24 horas con etanol al 50 %, en frío, pa ra eliminar las grasas.

2.- Se filtraron las muestras eliminándose el etanol y se dejaron se- car las semillas molidas en el cuarto frío.

3.- Extracción de las muestras con la solución de cloruro de sodio, -

durante 24 horas, a 27° C.

4.- Filtración de las muestras.

5.- Electroforésis de las muestras, practicada como en los casos anteriores.

Extracción de las muestras con solución de cloruro de sodio al 10 %

1.- Eliminación de grasas con etanol al 50 % durante 24 horas en frío.

2.- Se filtraron las muestras y se dejaron secar las semillas en el -- cuarto frío.

3.- Extracción de las muestras con la solución de cloruro de sodio durante 24 horas a 27° C.

4.- Filtración de las muestras.

5.- Se trato de hacer la electrofotésis pero las muestras no emigraron por estar las proteínas en su punto isoeléctrico.

6.- Eliminación del cloruro de sodio por diálisis contra agua destilada durante una semana en frío. Hubo precipitación de proteínas -- con la diálisis en las siguientes muestras: soya, calabaza, lenteja, garbanzo, haba, frijol y alubia, que se redisolvieron por adición de cloruro de sodio. La cantidad de cloruro de sodio añadida para redisolver las proteínas fue tal que quedó en cada caso -- una solución de cloruro de sodio al 4 %.

7.- Electroforesis de las muestras recuperadas en las condiciones ya - descritas.

Hidrólisis por calor.

Después de las extracciones se sometieron todas las muestras a calentamiento en autoclave a 120° C y 1 Kg/cm^2 de presión. Exceptuando las muestras extraídas con sulfato de amonio, todas las demás muestras precipitaron

debido a una completa desnaturalización de las proteínas. Se repitió el -- calentamiento de los otros tres tipos de extracción, esta vez en autoclave abierta a 100°C.

Se hizo la electroforésis de todas las muestras sometidas al calentamiento.

Hidrólisis enzimática.

Se sometieron después las muestras a una hidrólisis enzimática con --- tripsina a 27° C con una solución que contenía 1 mg de tripsina por ml, añadiendo 1 ml de esta solución por cada 10 ml de solución de proteína.

Al cabo de una hora se suspendió la hidrólisis con 0.1 ml de una solución 2 x 10^{-2} M de diisopropil fluorofosfato (de los laboratorios Sigma).[16]

A todas las muestras hidrolizadas con tripsina se les hizo la electroforesis.

ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA DE LAS PROTEINAS
Y LOS PRODUCTOS HIDROLIZADOS.

Soluciones amortiguadoras.-

En principio, los máximos rendimientos en electroforesis de proteínas se obtienen con soluciones amortiguadoras de la más baja conductividad práctica al pH correcto. Se usa consecuentemente un sistema de glicina-Tris-HCl, pero con el componente HCl muy reducido (se pueden usar el veronal u otras soluciones de alta conductividad, pero se obtiene una pobre separación entre las zonas). Como se describe más adelante, el HCl se omite enteramente en la preparación del gel.[5]

Disposición de la muestra.-

No se recomienda el uso de un gel superior o de un gel esparcidor. En lugar de ésto la muestra libre de sales se mezcla con urea al 5 % (u otro componente neutro) y se coloca un volumen apropiado en el compartimento superior de un tubo de gel. Se cubre entonces con un electrolito evitándo-

se cualquier mezcla subsecuente insertándose un tapón de algodón humedecido.[5]

Condición de polimerización.-

La concentración de sólidos en el gel (la más baja) se ha fijado al 5 % con 3 % de logaduras cruzadas. (Tales geles tienen blandura óptima y capacidad para separar las globulinas.). La expansión lineal es raramente mayor del 3 %. TEMED-perdulfato de amonio activado, bajo las condiciones citadas, dan una polimerización completa aproximadamente en 20 minutos. Deben evitarse los inhibidores (ferricianuros), y se omite el HCl a causa de que parece tener propiedades de transferencia de cadenas. Puede prepararse cualquier tamaño del gel.[5]

Electroforesis.-

Para tubos de vidrio de 6 mm de diámetro interior por 75 mm de largo, se obtienen los óptimos rendimientos de electroforesis (vertical) con aproximadamente 5 mA y 250 - 300 volts. El colorante indicador (componente más rápido) viaja aproximadamente 5 cm cada media hora.[5]

Colorantes.-

Para las proteínas es suficiente una solución al 0.1 % de azul negro de naftol (amidoschwartz) en ácido acético al 7 % por media hora.[5]

Decolorantes.-

En la mayoría de los casos es suficiente un lavado de toda la noche con agua (agitada). En el caso del azul negro de naftol (proteínas), los geles se pueden decolorar electrolíticamente, en aproximadamente 20 minutos, con ácido acético al 3 %, a aproximadamente 10 mA y 200 volts. (No es necesario usar poliacrilamida con propósitos decolorantes)[5]

Almacenamiento.-

Los geles decolorados pueden almacenarse bajo agua. Si se desea las muestras pueden secarse al aire obteniéndose cuerdas con aspecto de alam-

bre, que pueden recuperarse a su tamaño original por inmersión en agua.

Procedimiento.-

Se usan tubos Pyrex siliconizados, de 6 mm de diámetro interior por 75 mm, pulidos sus bordes a la flama y con cuatro marcas colocadas a 1 y 2 cm. de cada extremo del tubo. Con una pipeta se llenan hasta 1.8 cm. del borde con ligeramente menos de 2 ml. de la solución del gel sin polimerizar. Dentro de un intervalo de pocos minutos, y antes de la formación del gel, se llena el espacio remanente con agua, cuidadosamente con un tubo estirado en forma de capilar, formando una capa diferente. La mezcla entre las dos capas debe ser la mínima posible. La polimerización empieza después de 5 a 8 minutos, lo que se nota por una ligera opalescencia y formándose una interfase claramente definida en la marca de 2 cm. La polimerización está completa después de media hora (según fue determinado por la producción de calor en gran cantidad de gel) [5]. El agua que sobrenada se elimina (sacudiendo) y los tubos se guardan en un recipiente cerrado, húmedo, hasta que se necesiten. (Si es necesario los geles pueden sacarse de los tubos, equilibrados con cualquier electrolito deseado, y reinsertados por succión. Alternativamente los geles se pueden limpiar por electroforesis antes de cargarlos con la muestra.

Componentes del gel.

Solución monómera		2 volúmenes
acrilamida	30 g	
N, N' metilen bisacrilamida	1.0 g	
agua (a 150 ml)	123 ml	
TEMED (tetrametiletilen diamina)		1 volumen
0.28 ml por 100 ml de agua		
Persulfato de amonio		4 volúmenes
0.14 g por 100 ml de agua		
Sol. amortiguadora glicina-TRIS		1 volumen

glicina	29 g
TRIS	6 g
Agua	980 ml

(Se ha omitido el componente HCl)

Al espacio vacío en la parte superior del tubo se le añaden 0.2 ml. de solución de urea al 5 % que contenga de 2.5 a 3 μ l de solución de proteínas (de 5 a 100 μg de una proteína individual). Esto se cubre con una solución de electrolito en tal forma que la mezcla sea la mínima entre las dos capas.

Se inserta entonces el tubo en los tapones de la cuba superior y se añade el electrolito remanente.

El compartimento de electrodos superiores se preparará perforando un recipiente de plástico e insertando en las perforaciones tubos de hule en los que se colocan los tubos de gel. El compartimento de electrodos inferior se preparó con un recipiente semejante al anterior en el que se introducen los tubos de gel.

Los compartimentos de electrodos deben llenarse hasta el borde con un electrolito y no es necesario cubrirlos durante una electrofóresis.

Se pueden usar cualquier fuente de corriente directa capaz de proporcionar hasta 25 mA a 400 volts. No se requieren fuentes de corriente constante o voltaje constante debido a la tendencia de la corriente a mantenerse estable durante una prueba electroforética.

Como electrolito es apropiado usar una dilución de 1:10 de la solución amortiguadora glicina-TRIS-HCl:

Glicina	29 g
TRIS	6 g
HCl 1 N	5 ml
Agua (a un litro)	975 ml

Para obtener los mejores resultados debe prepararse especialmente para cada prueba. Como colorante marcador se añaden 0.05 ml de solución al 0.5 % de azul de bromofenol en ácido acético al 1 % por cada 100 ml de la solución amortiguadora diluída. El pH final es 8.1

La electroforesis (el ánodo o polo positivo en el compartimento inferior) se lleva a cabo en posición vertical, con el tubo de gel sumergido aproximadamente 1/4 de pulgada. Deben evitarse las burbujas de aire en la punta y en la base del tubo de gel. Se necesitan aproximadamente 30 minutos para que el colorante marcador azul, que se forma rápidamente en la interfase del gel si se usa una corriente de 5 MA a 250 - 300 volts, alcance la marca colocada a 2 cm. del fondo del tubo de gel. En caso de duda si se observa más de un anillo marcador del colorante, se toma como referencia al anillo más fuerte y más veloz.

El tubo se quita del soporte y se sumerge en un recipiente con agua; el gel se desprende tanto de la punta y del fondo con ayuda de una aguja de acero y se saca del tubo de vidrio soplando suavemente con la boca. Los geles se sumergen inmediatamente en por lo menos 10 ml de solución al 0.1% de azul negro de naftol en ácido acético al 7 % y se dejan reposar por media hora (se requiere una velocidad razonable a causa de la tendencia de la difusión a distorsionar las bandas antes del teñido).

El desmanchado electrolítico puede realizarse insertando el gel enjuagado y teñido dentro de un tubo de vidrio de 7 mm de diámetro interior por 80 mm que ha sido adelgazado en uno de sus extremos. Como electrolito se emplea una solución al 3 % de ácido acético y se necesitan aproximadamente 10 mA y 200 volts durante 20 minutos para decolorarlo completamente. Los geles se calientan ligeramente durante este período pero sin daño notable.

Los geles claros terminados, con las bandas de proteínas, deben almacenarse bajo agua en tubos de ensaye tapados de 10 x 75 mm.

La intensidad de la banda puede ser cuanteada por un contador espe---

cial.[5]

Todas las electroforesis se hicieron a 300 volts y 50 mA y se decoloraron con acético al 3 %, con 200 volts y 50 mA.

DETERMINACION DE NITROGENO.-

A las muestras obtenidas de los diferentes tipos de extracción se les determinó el contenido de proteínas totales por el método de Kjeldahl.

R E S U L T A D O S.

Las figuras 1 a 18 representan:

I.- Esquemas de los geles de acrilamida con las bandas de proteína - después de la migración electroforética de las muestras especificadas en cada figura, extraídas con el solvente indicado al lado del origen de la muestra.

II.- Esquemas de los geles de acrilamida con las bandas de proteína - después de la migración electroforética de las mismas muestras - después del calentamiento.

III.- Esquemas de los geles de acrilamida con las bandas de proteína - después de la migración electroforética de las mismas muestras - después de la hidrólisis enzimática.

También se señala el tiempo de duración de cada electroforesis.

Los esquemas, tanto el tamaño de las barras como el de las bandas de proteínas, están representados al tamaño original.

En la siguiente tabla se informan las concentraciones de proteínas -

en cada una de las muestras de semillas, según el solvente usado en la extracción.

	ETANOL	$(NH_4)_2SO_4$	NaCl 1 %	NaCl 10 %
Alubia	------	0.65 %	1.17 %	3.86 %
Calabaza	- ---	0.69 %	0.68 %	4.44 %
Frijol	------	2.79 %	1.20 %	1.55 %
Garbanzo	------	0.50 %	0.88 %	1.28 %
Haba	0.32 %	0.13 %	0.82 %	1.97 %
Lenteja	-----	1.67 %	0.81 %	4.97 %
Maíz	0.28 %	1.29 %	0.13 %	0.37 %
Soya	------	5.44 %	1.28 %	7.40 %
Trigo	0.49 %	2.01 %	0.43 %	0.18 %

RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

La primera extracción con etanol fue pobre, pues solo se extrajeron - proteínas del maíz, trigo y haba. No fue posible extraer proteínas de las otras semillas lo que muestra una similitud en las proteínas extraíbles con etanol de las tres semillas mencionadas y la carencia de este tipo de proteína en el resto de ellas.

La extracción con sulfato de amonio, a pesar de que es ésta una solución muy empleada para la extracción de diversas proteínas (en tejidos animales por ejemplo), no fue muy buena. El más alto porcentaje de proteína - con esta sal fue el de la soya con 5.44 %, el frijol con 2.73 % y el trigo con 2.01 %. Los demás están bastante por debajo de estas cifras.

La diversidad de proteínas extraídas con solución de NaCl al 1 % fue considerable comparando con las escasas especies proteicas obtenidas con -- otros agentes. Comparando esta extracción con una solución más concentrada de NaCl (10 %) se obtuvo en general mayor cantidad de proteínas y mayor número de especies proteínas.

Es de hacer notar desde la extracción inicial con estos diferentes -- agentes de extracción, la diferencia en la riqueza de proteínas de las se--

millas escogidas. En todos los casos de extracciones, el maíz se muestra pobre en proteínas, en cambio la soya, el garbanzo, la lenteja y el haba, son de los más ricas en proteínas, siguiendo las demás en grado un poco menor como puede observarse. Esto es importante siendo la mayor parte de ellas básicas en la dieta mexicana, como en el caso del maíz, trigo, frijol, lenteja, haba y gasbanzo; la alubia, semilla de calabaza y la soya son menos empleadas.

Sabiendo que una proteína después de la hidrólisis (desnaturalización) que sufre al ser sometida a cocción durante la elaboración de los alimentos, queda en forma más asequible para ser aprovechada, se realizó una hidrólisis de este tipo (ya especificada en el capítulo anterior) y las proteínas que se pudieron detectar por medio de electroforesis posterior a la hidrólisis fueron, en algunos casos, mayores; en otros casos, en la alubia, semilla de calabaza, frijol, soya, lenteja y haba, estas proteínas parecen ser menores, cuando la muestra ha sido extraída con sulfato de amonio.

La hidrólisis enzimática mostró dn algunos casos mayor número de especies proteicas: en semilla de calabaza, en trigo y en maíz extraído con NaCl al 1 % y en garbanzo extraído con NaCl al 10 %.

En el caso de la soya, la lenteja y el haba extraídas con NaCl al 10%, siempre se obtuvo una gran cantidad de proteínas y después de la hidrólisis enzimática aparecen numerosas bandas de proteínas, lo que hace pensar que la especie proteica proveniente de estas semillas es asequible a ser aprovechada por la facilidad con que es digerida por enzimas proteolíticas.

Vemos que estos resultados son interesantes al tratar de correlacionar el comportamiento de estas proteínas con el valor biológico que de ellas se ha determinado y que se menciona en el capítulo precedente.

B I B L I O G R A F I A.

(1) ALBANESE, A.A.

Protein and Amino Acid Nutrition. Academic Press. Nueva York 1959

(2) ANSON, M.L. y EDSALL, J.T. ed.

Advances in Protein Chemistry. Vol. I. Academic Press, Inc. Nueva York. 1944

(3) BLOEMENDAL

Zone Electrophoresis in blocks and columns. Elsevier Publishing Co. Amsterdam. 1963.

(4) CANTARROW, A. y SCHEPARTZ, B.

Biochemistry. W.B. Saunders Company. Phyladelphia y Londres. 1954

(5) CLARKE, J. T.

Simplified Procedure for Acrylamide-gel Electrophoresis of Proteins. Refs. L. Ornstein and B.J. Davies. Disc. Electrophoresis.

(6) COLE, W.H.

Some aspects of Amino Acids Supplementation. Rutgers University Press. Nueva Jersey. 1956.

(7) COLE, W. H.

Amino Acids malnutrition. Rutgers University Press. Nueva Jersey. 1957.

(8) FRUTON, J. S. y SIMMONDS, S.
General Biochemistry. 2a ed. John Wiley & Sons, Inc. Nueva York. 1959.

(9) HAUROWITZ, F.

Biochemistry. John Wiley & Sons Inc. Nueva York. 1955.

(10) KUNKEL, H.G.

Zone Electrophoresis. Methods of Biochemical Analysis. Vol. I. Intrscience Publishers. Inc. Nueva York. 1957.

(11) NEURATH, H. y BAILEY, K.
The Proteins. Vol. I-A. Academic Press Inc. Publishers. Nueva York. 1953.

(12) OSBORNE, T.B.

The Proteins of the Wheat Kernel. Cornigie Institute of Washigton. Washington D. C. 1907.

(13) Evaluation of Protein Quality

National Academy of Sciences. National Research Council Publicación 1100

(14) Necesidades en Proteínas.

Informe del comité de la FAO para el estudio de las necesidades en proteínas. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Roma. 1958

(15) Gel Electrophoresis.

Annuals of New York Academy of Sciences. Vol. 121. Art. 2 Dic. 28, 1964. Pags. 305-650.

(16) HANSON, L.A. Nature, 187; 599 (1960).

Fig. 1

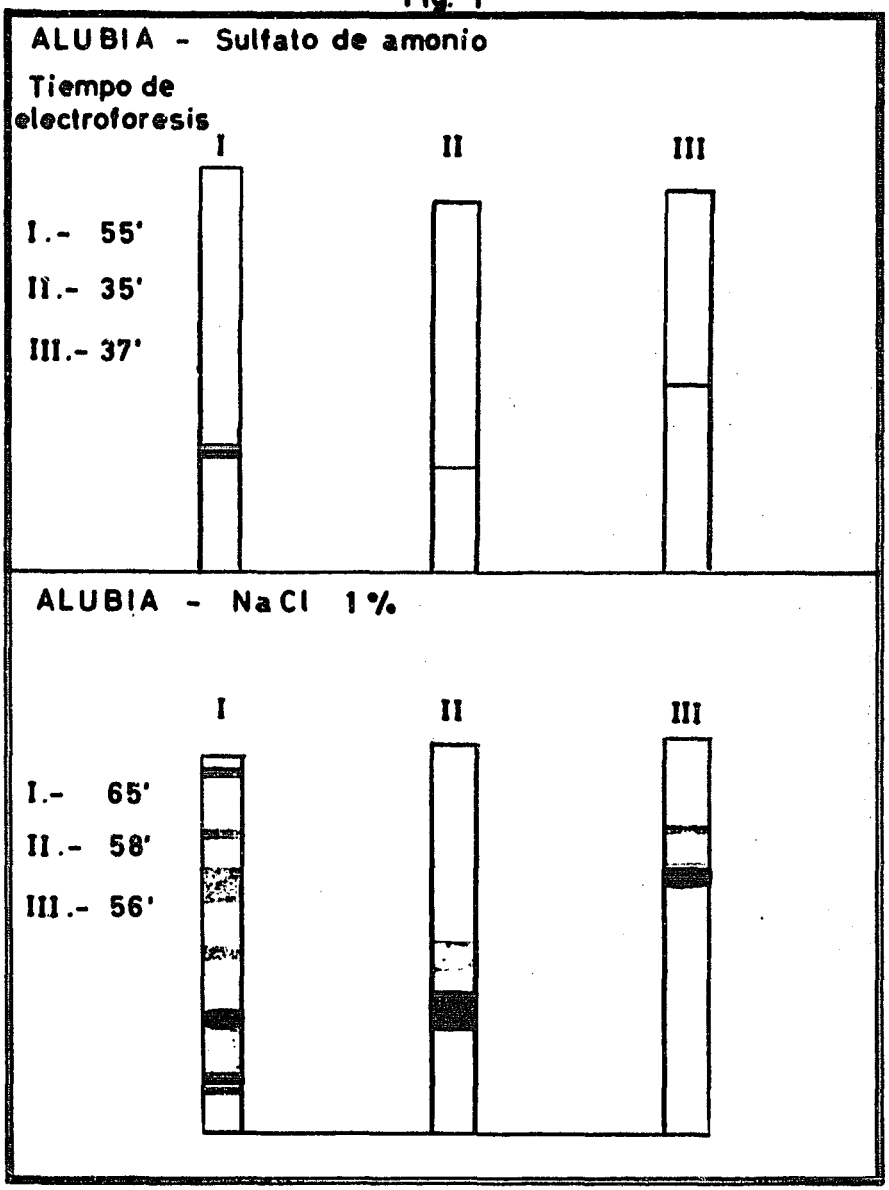

ALUBIA - Sulfato de amonio
Tiempo de electroforesis
I
II
III
I.- 55'
II.- 35'
III.- 37'
ALUBIA - NaCl 1%
I
II
III
I.- 65'
II.- 58'
III.- 56'

Fig. 2

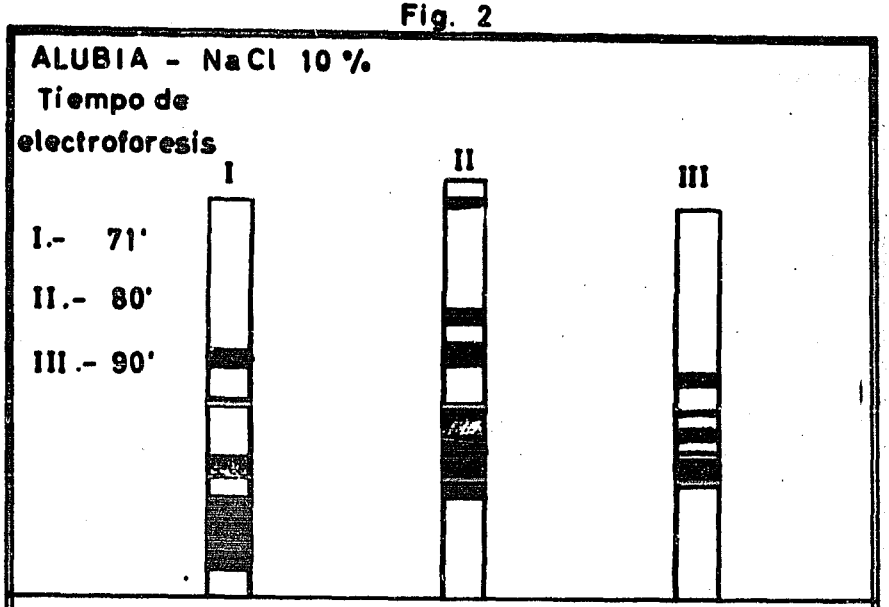

ALUBIA - NaCl 10 %
Tiempo de electroforesis
I.- 71'
II.- 80'
III.- 90'
I
II
III

Fig. 3

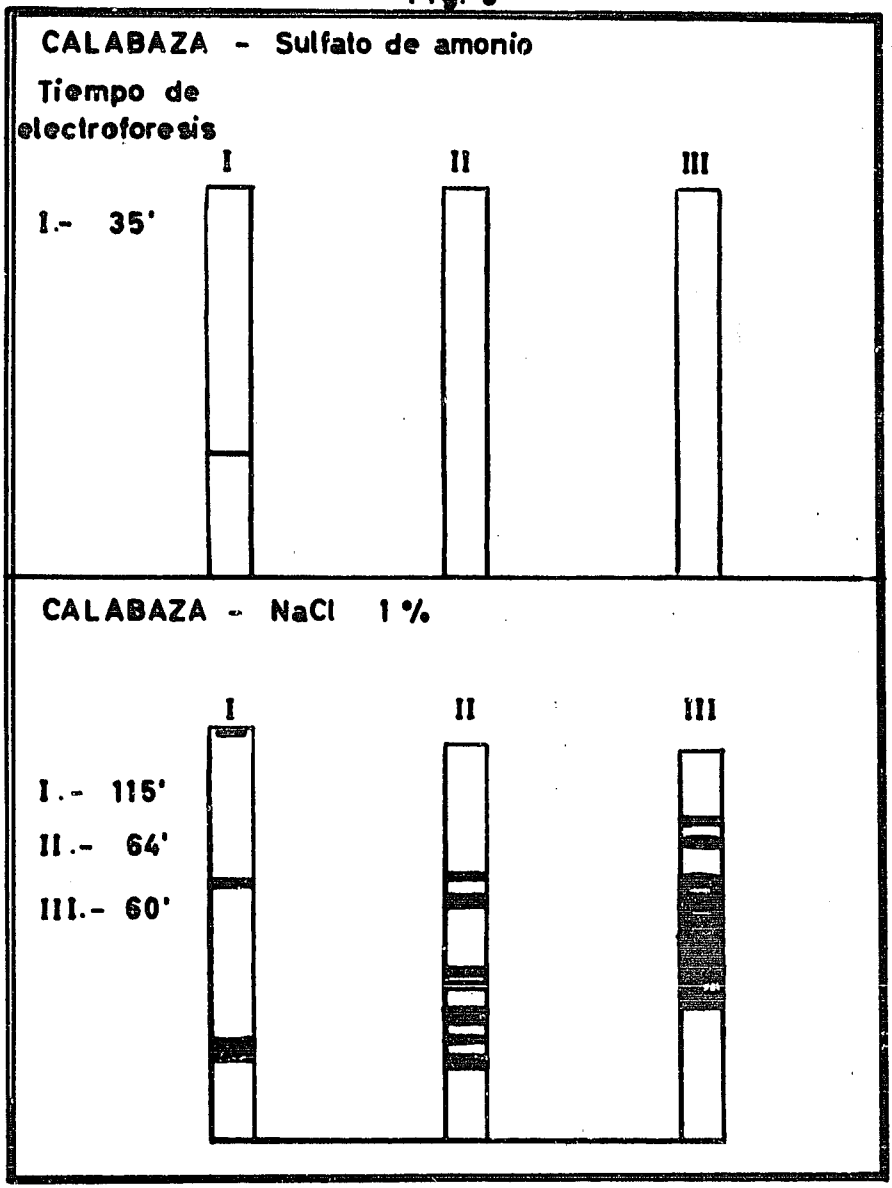

CALABAZA - Sulfato de amonio
Tiempo de electroforesis
I
II
III
I.- 35'
CALABAZA - NaCl 1 %
I
II
III
I.- 115'
II.- 64'
III.- 60'

Fig. 4

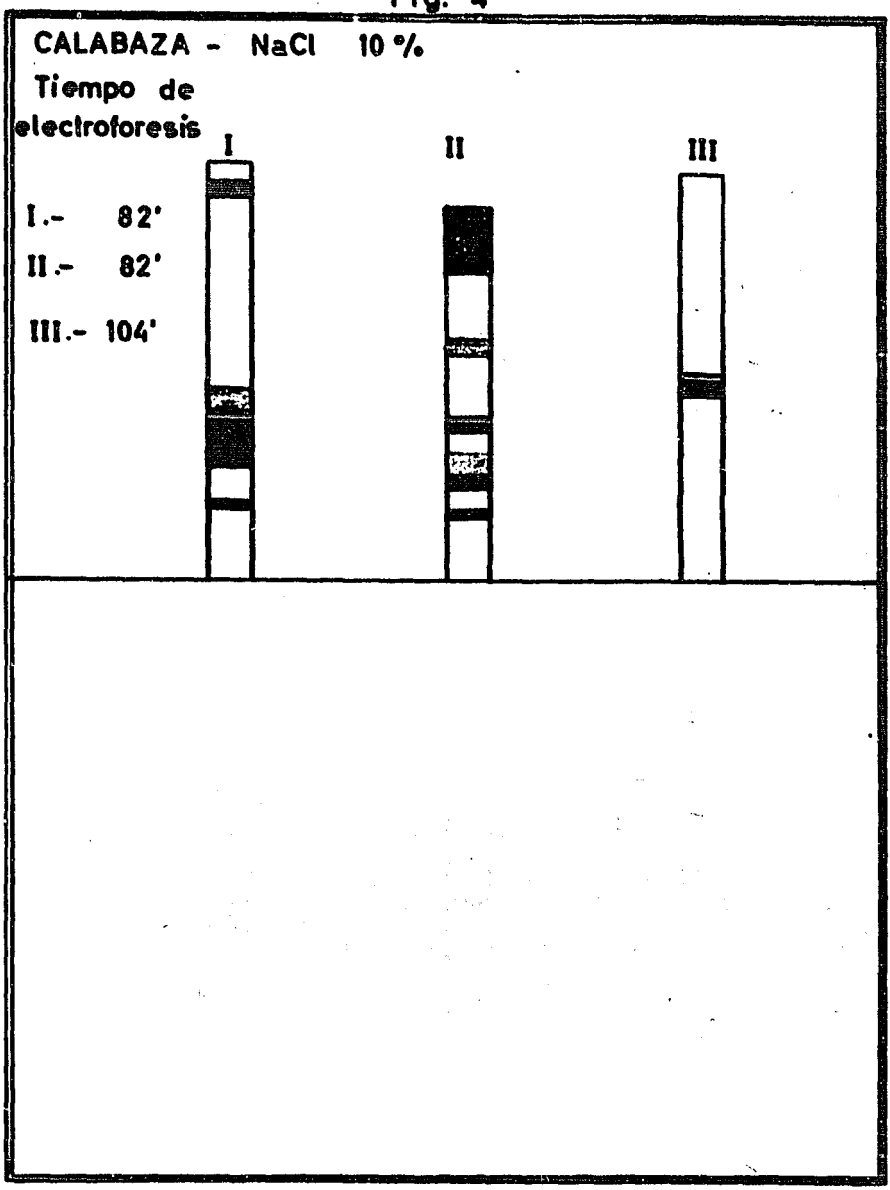

CALABAZA - NaCl 10 %
Tiempo de electroforesis
I.- 82'
II.- 82'
III.- 104'
I
II
III

Fig. 5

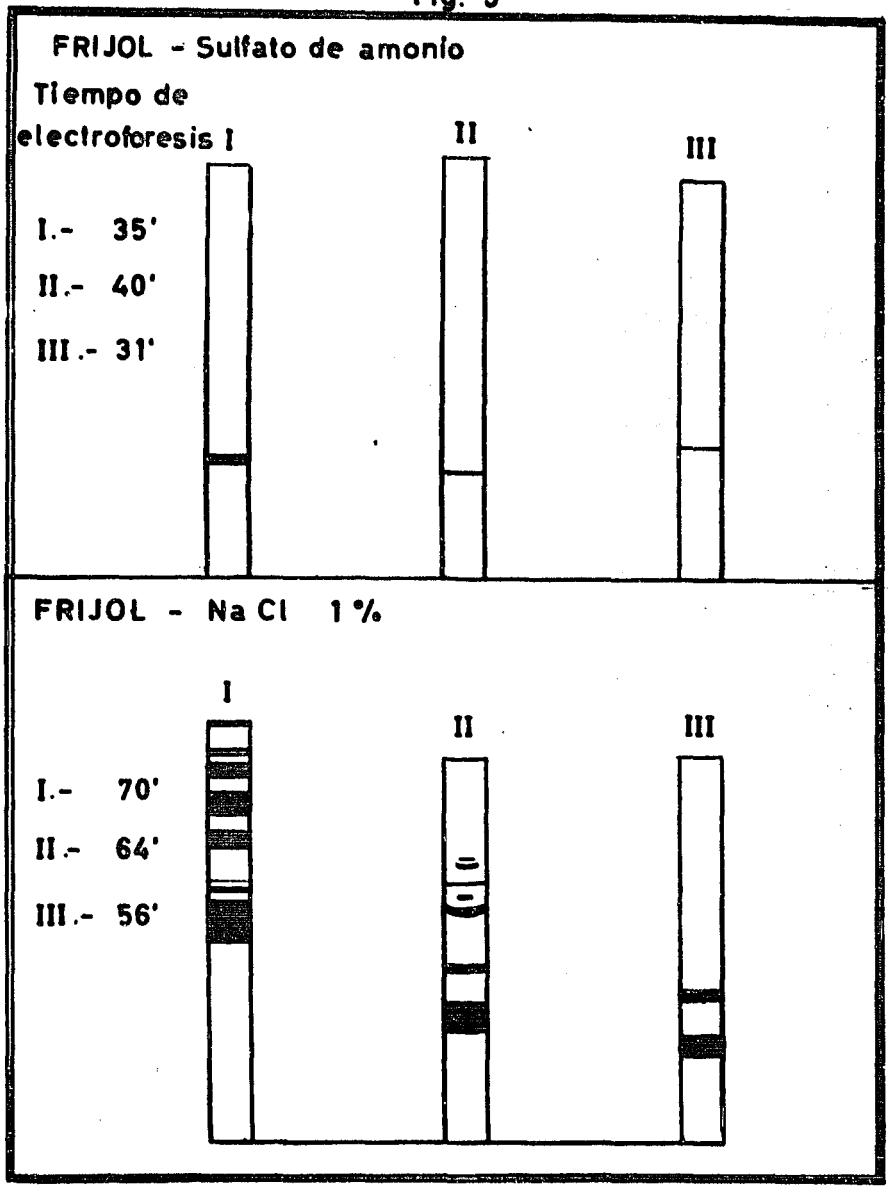

FRIJOL - Sulfato de amonio
Tiempo de electroforesis I
II
III
I.- 35'
II.- 40'
III.- 31'
FRIJOL - Na Cl 1 %
I
II
III
I.- 70'
II.- 64'
III.- 56'

Fig. 6

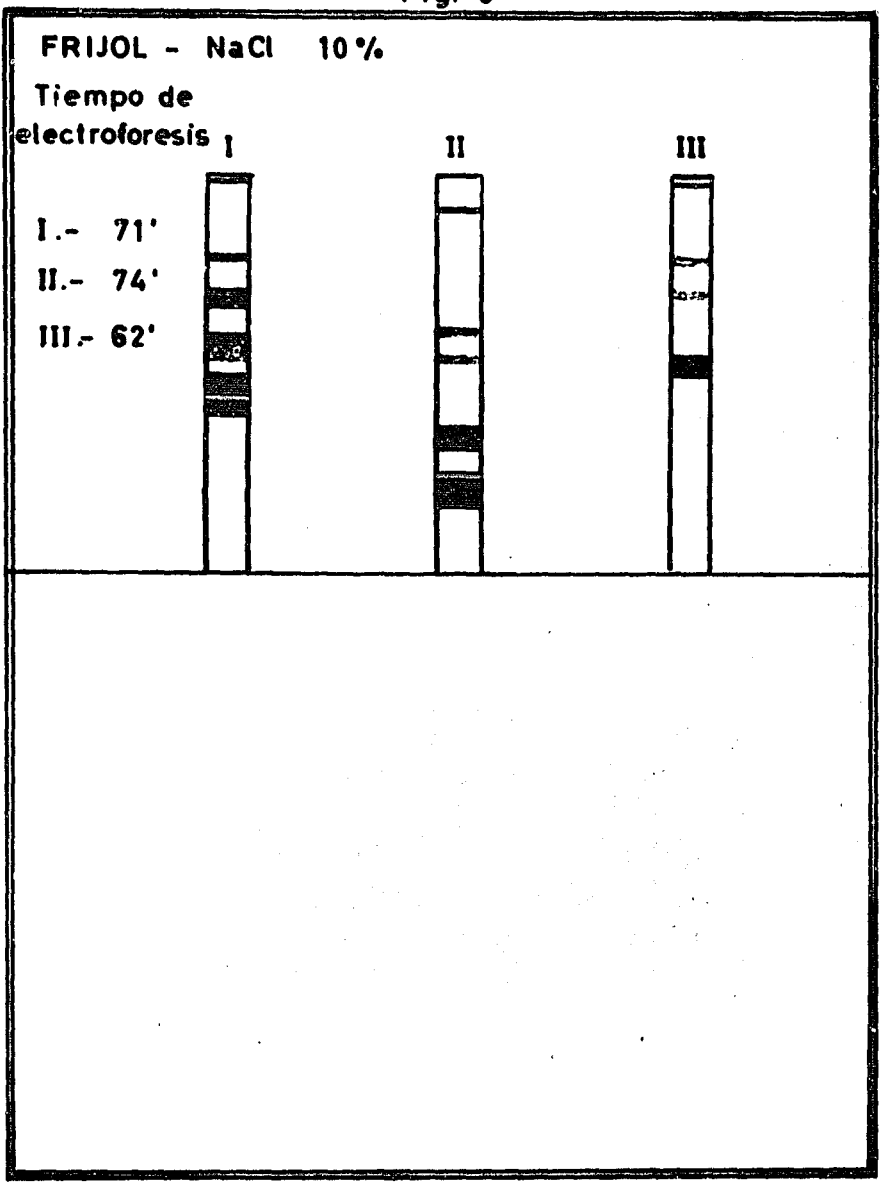

FRIJOL - NaCl 10 %
Tiempo de electroforesis
I.- 71'
II.- 74'
III.- 62'
I
II
III

Fig. 7

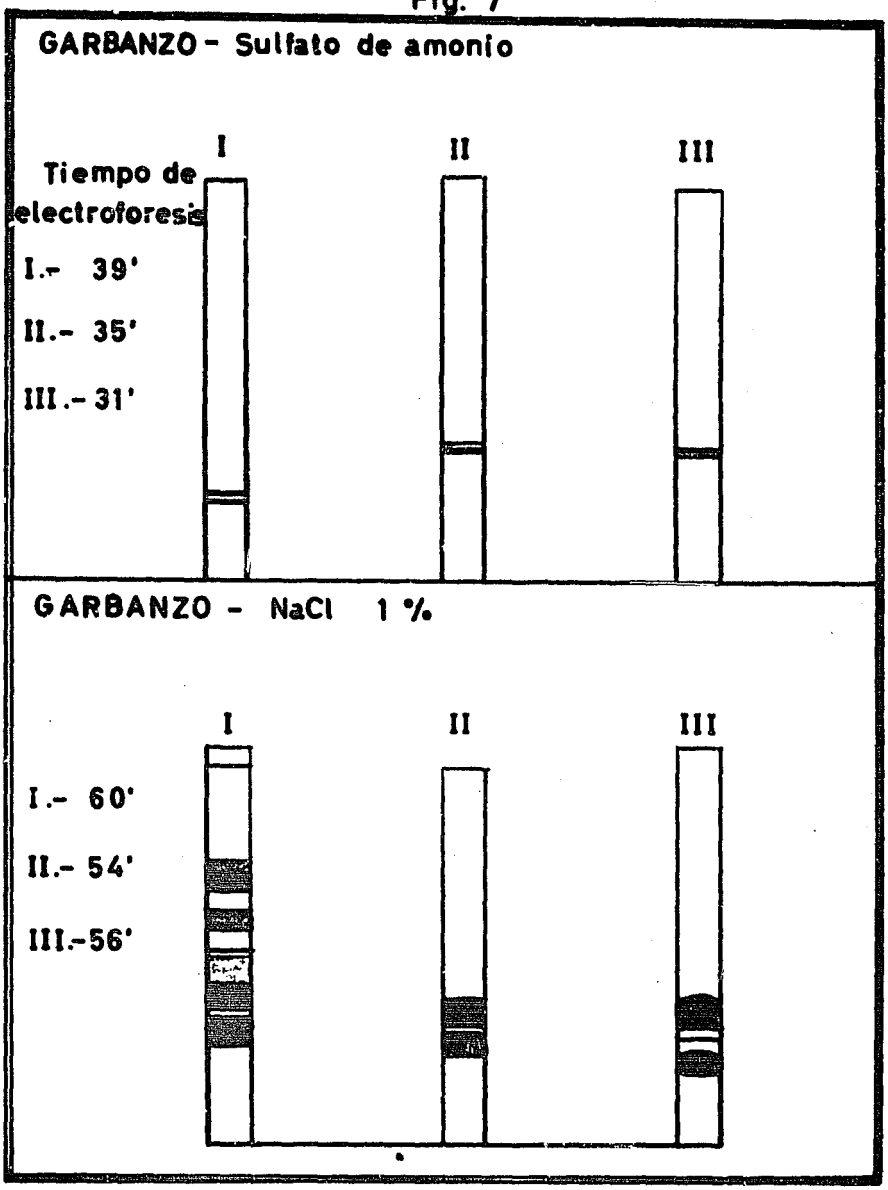

GARBANZO - Sulfato de amonio
Tiempo de electroforesis
I.- 39'
II.- 35'
III.- 31'
I
II
III
GARBANZO - NaCl 1 %
I.- 60'
II.- 54'
III.-56'
I
II
III

Fig. 8

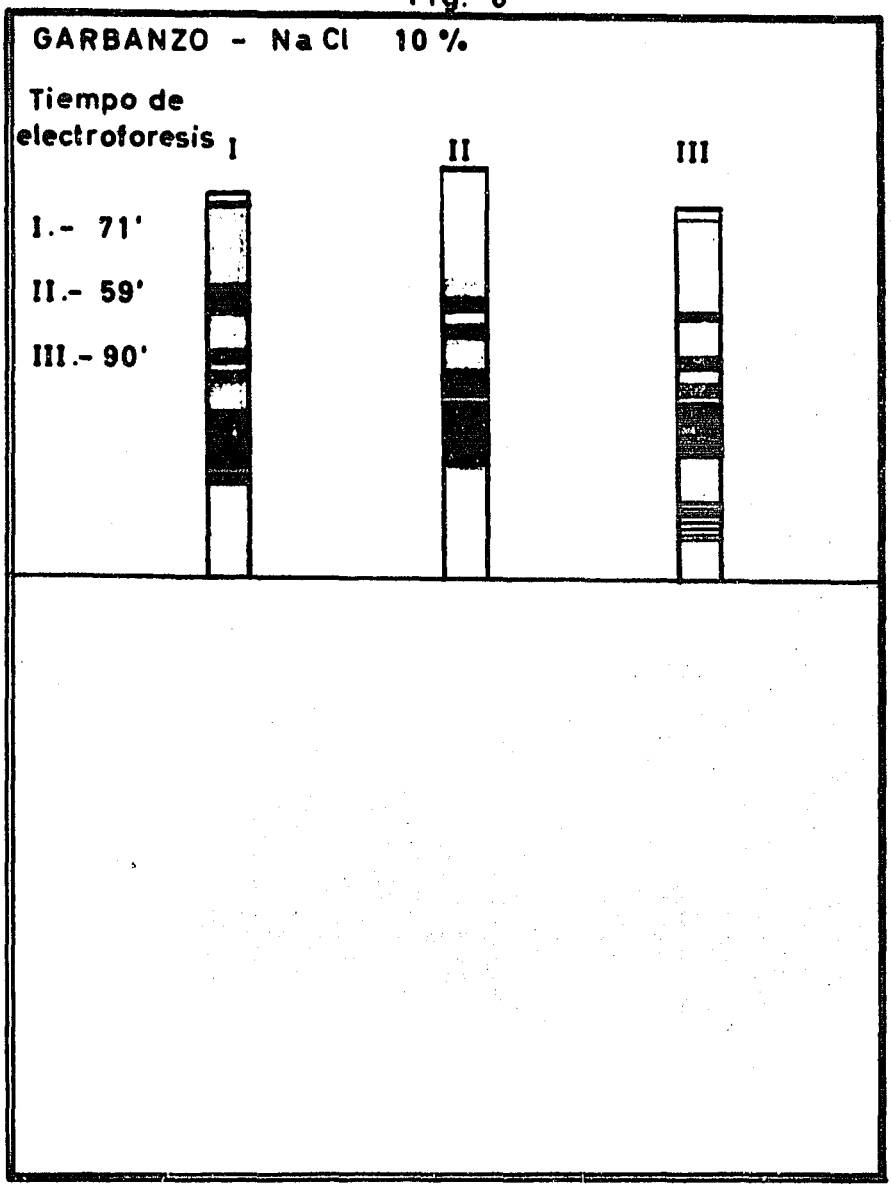

GARBANZO - Na Cl 10 %
Tiempo de electroforesis
I.- 71'
II.- 59'
III.- 90'
I
II
III

Fig. 9

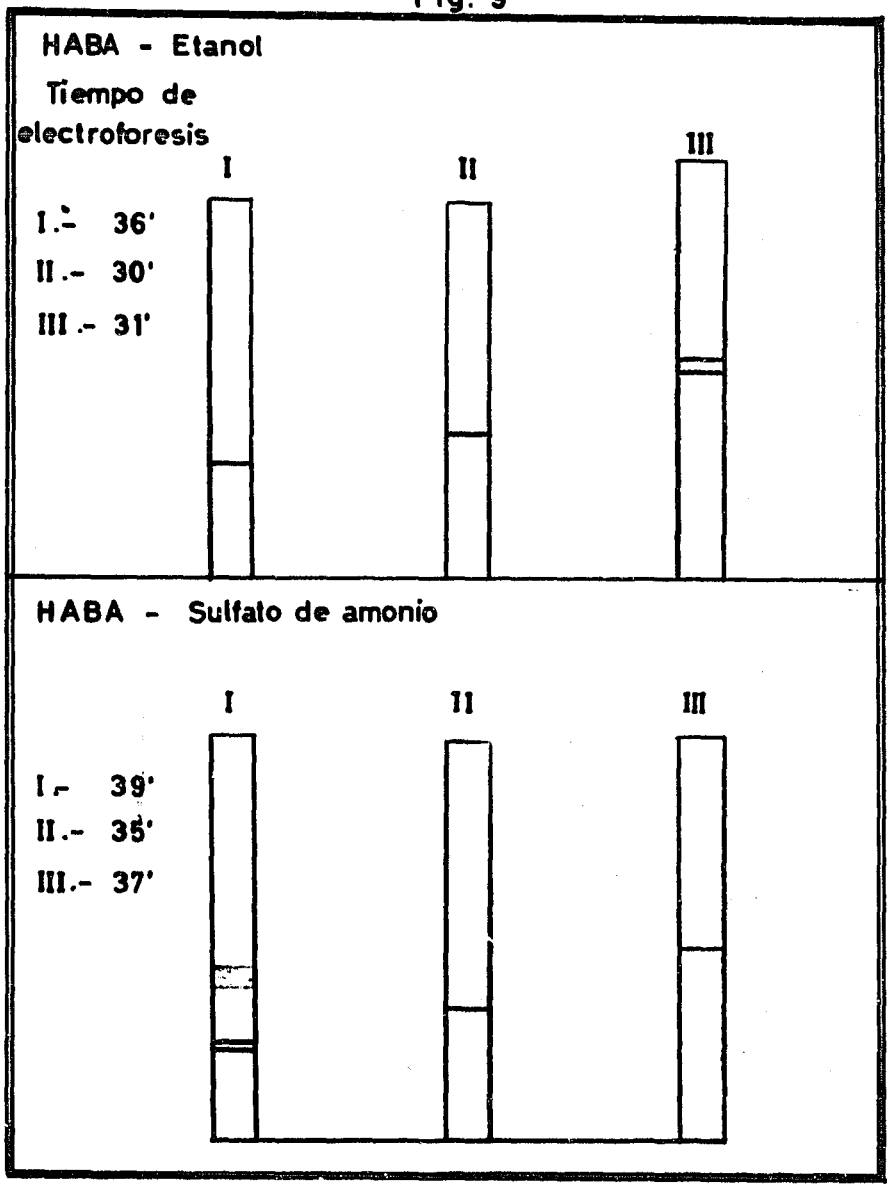

HABA - Etanol
Tiempo de electroforesis
I.- 36'
II.- 30'
III.- 31'
I
II
III
HABA - Sulfato de amonio
I.- 39'
II.- 35'
III.- 37'
I
II
III

Fig. 10

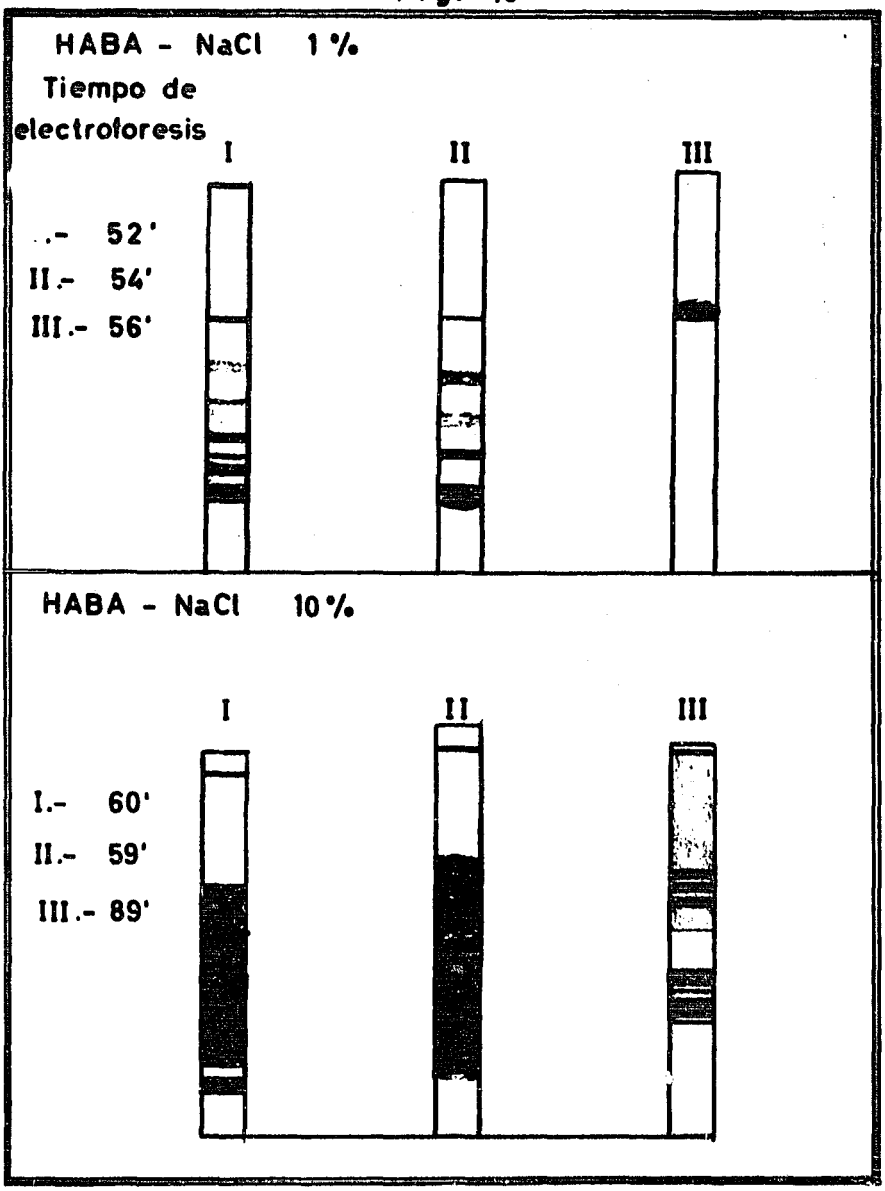

HABA - NaCl 1 %
Tiempo de electroforesis
I
II
III
.- 52'
II.- 54'
III.- 56'
HABA - NaCl 10 %
I
II
III
I.- 60'
II.- 59'
III.- 89'

Fig. 11

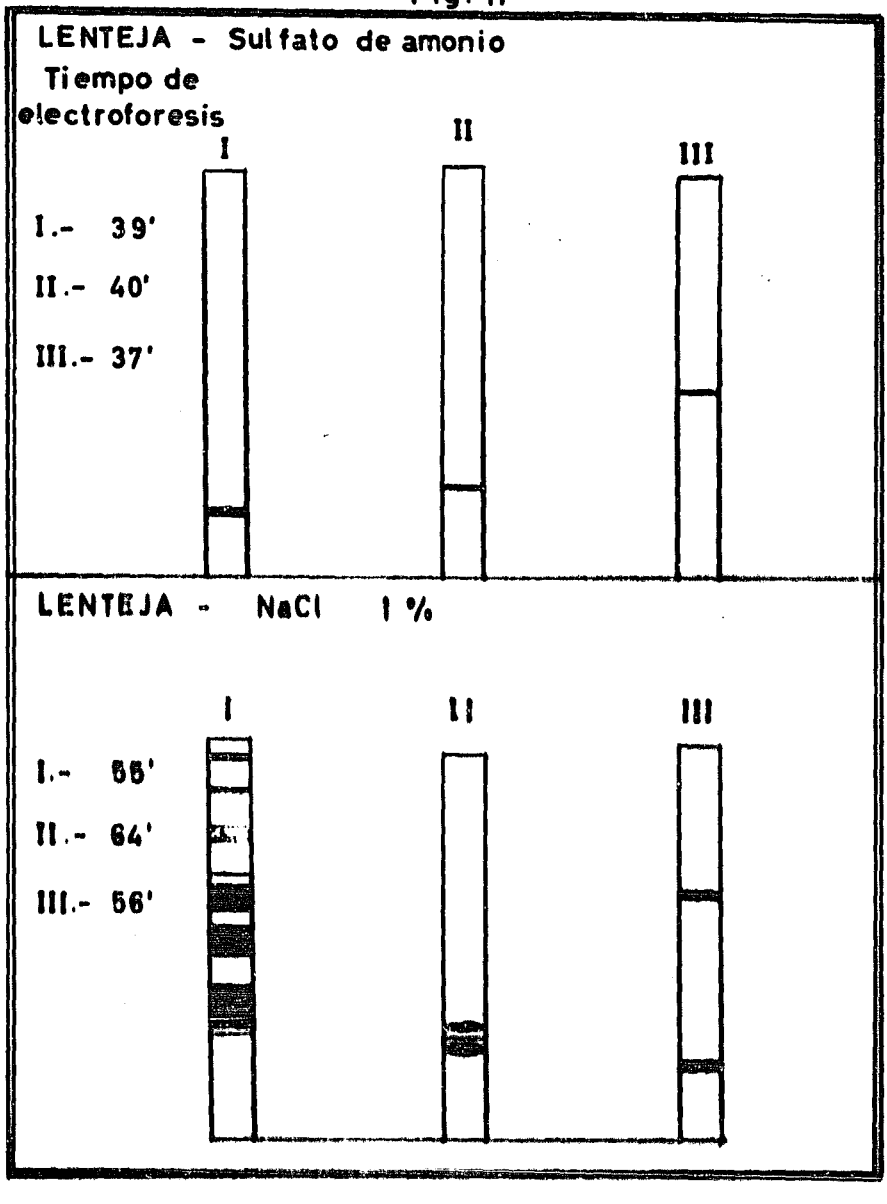

LENTEJA - Sulfato de amonio
Tiempo de electroforesis
I
II
III
I.- 39'
II.- 40'
III.- 37'
LENTEJA - NaCl 1 %
I
II
III
I.- 55'
II.- 64'
III.- 56'

Fig. 12

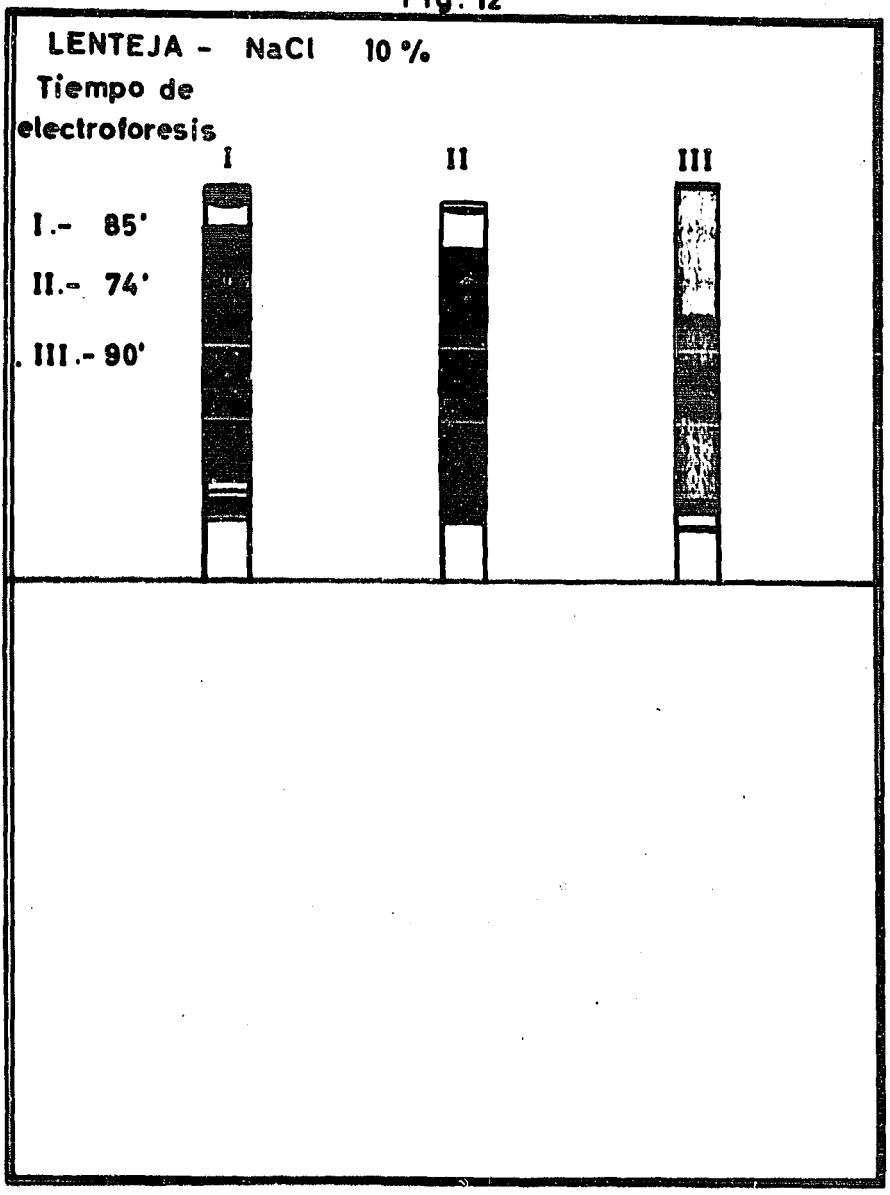

LENTEJA - NaCl 10 %
Tiempo de electroforesis
I.- 85'
II.- 74'
III.- 90'
I
II
III

Fig. 13

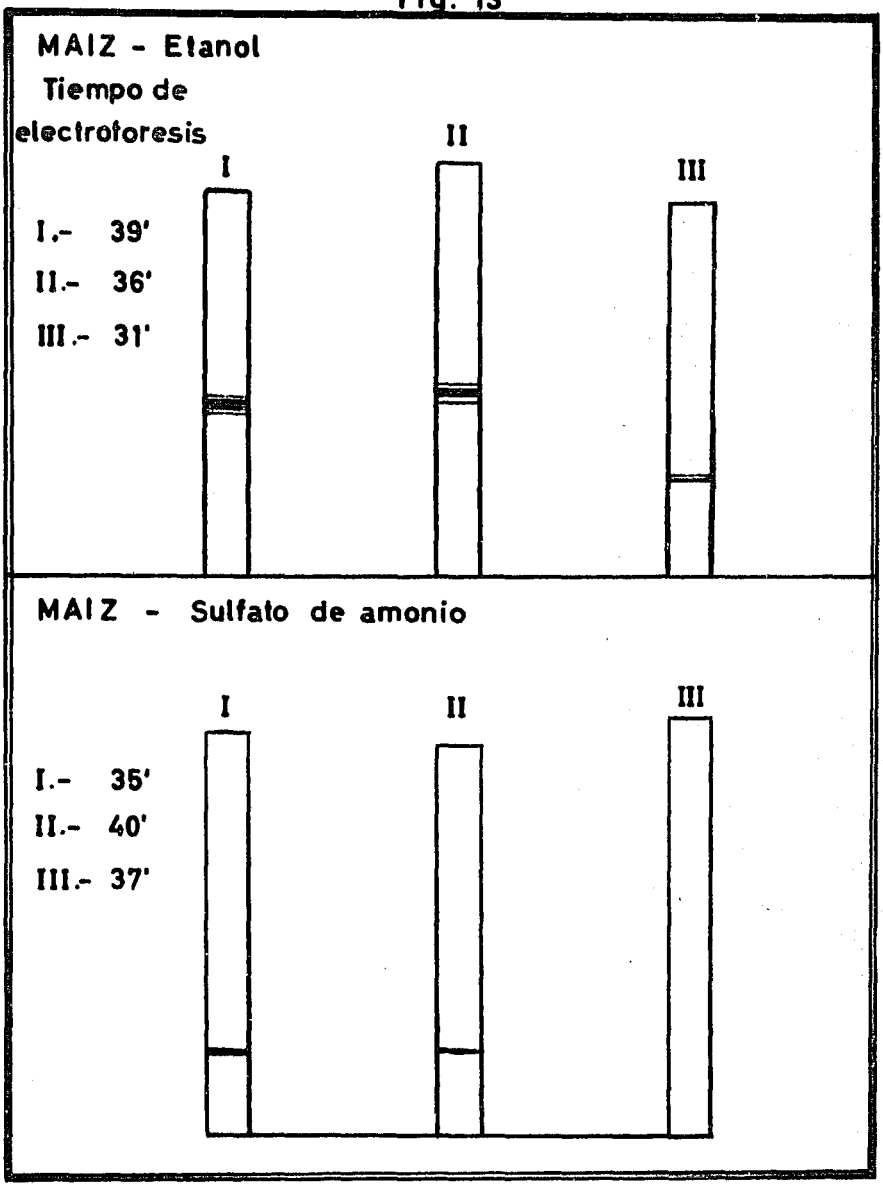

MAIZ - Etanol
Tiempo de electroforesis
I.- 39'
II.- 36'
III.- 31'
I
II
III
MAIZ - Sulfato de amonio
I.- 35'
II.- 40'
III.- 37'
I
II
III

Fig. 14

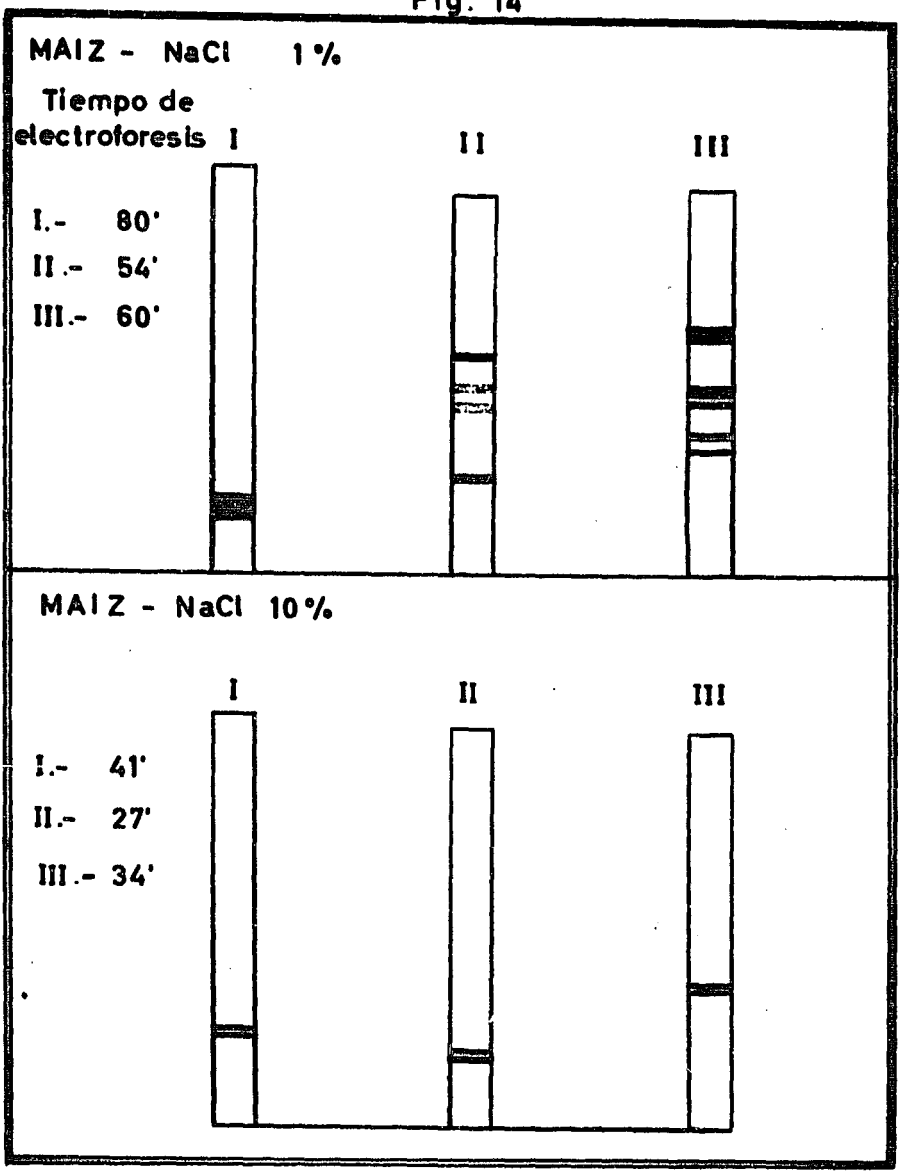

MAIZ - NaCl 1 %
Tiempo de electroforesis
I
II
III
I.- 80'
II.- 54'
III.- 60'
MAIZ - NaCl 10 %
I
II
III
I.- 41'
II.- 27'
III.- 34'

Fig. 15

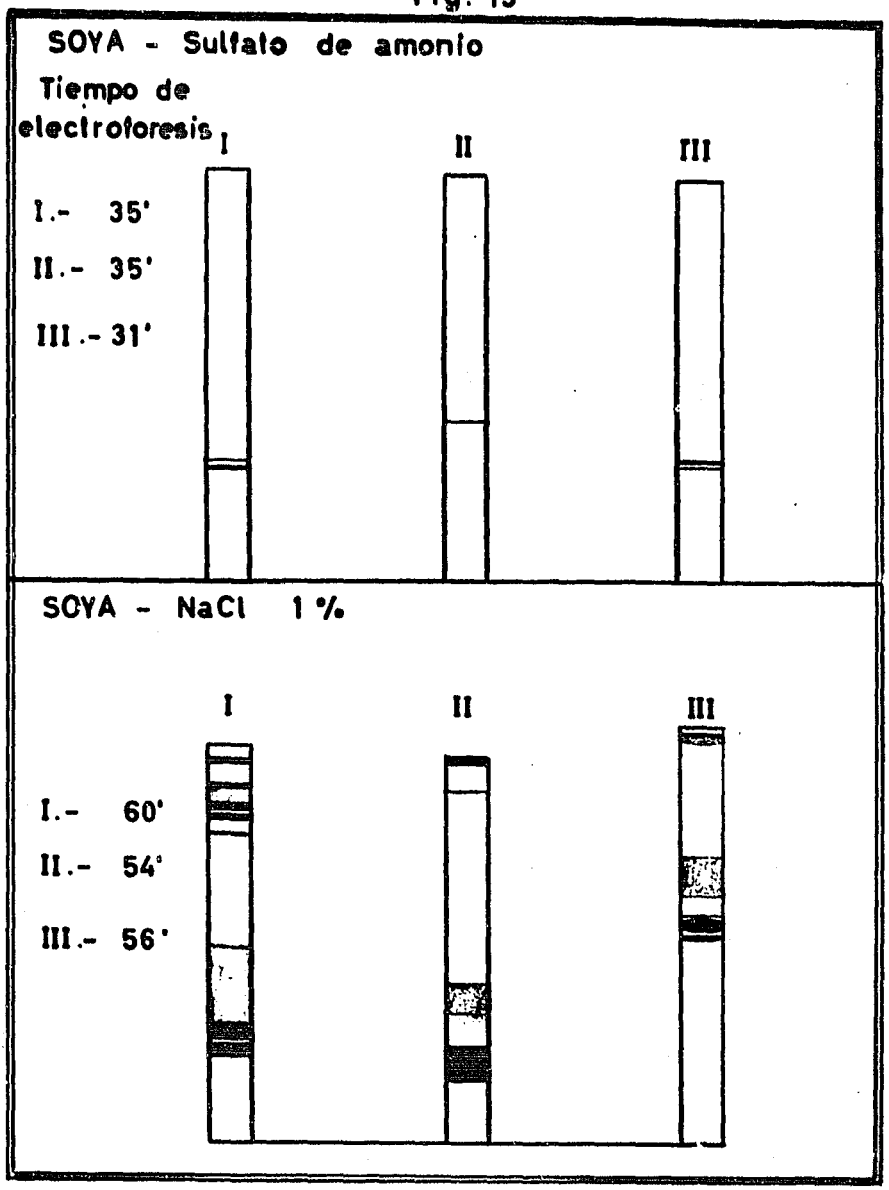

SOYA - Sulfato de amonio
Tiempo de electroforesis
I
II
III
I.- 35'
II.- 35'
III.- 31'
SOYA - NaCl 1 %
I
II
III
I.- 60'
II.- 54'
III.- 56'

Fig.16

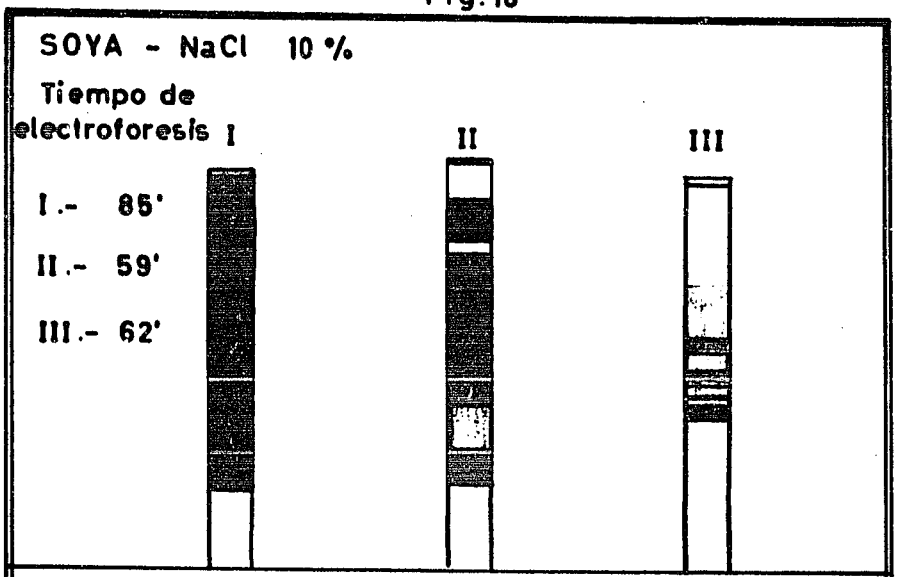

SOYA - NaCl 10 %
Tiempo de electroforesis
I
II
III
I.- 85'
II.- 59'
III.- 62'

Fig. 17

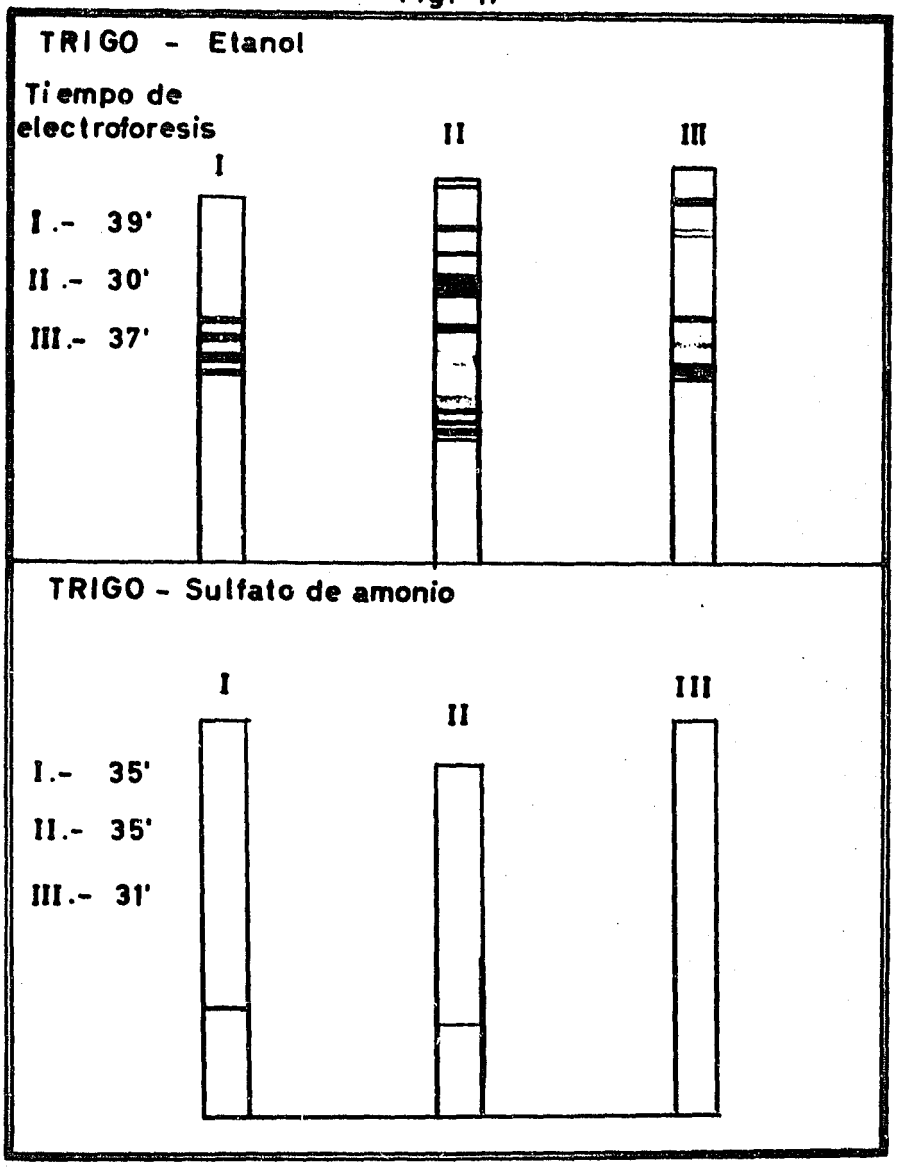
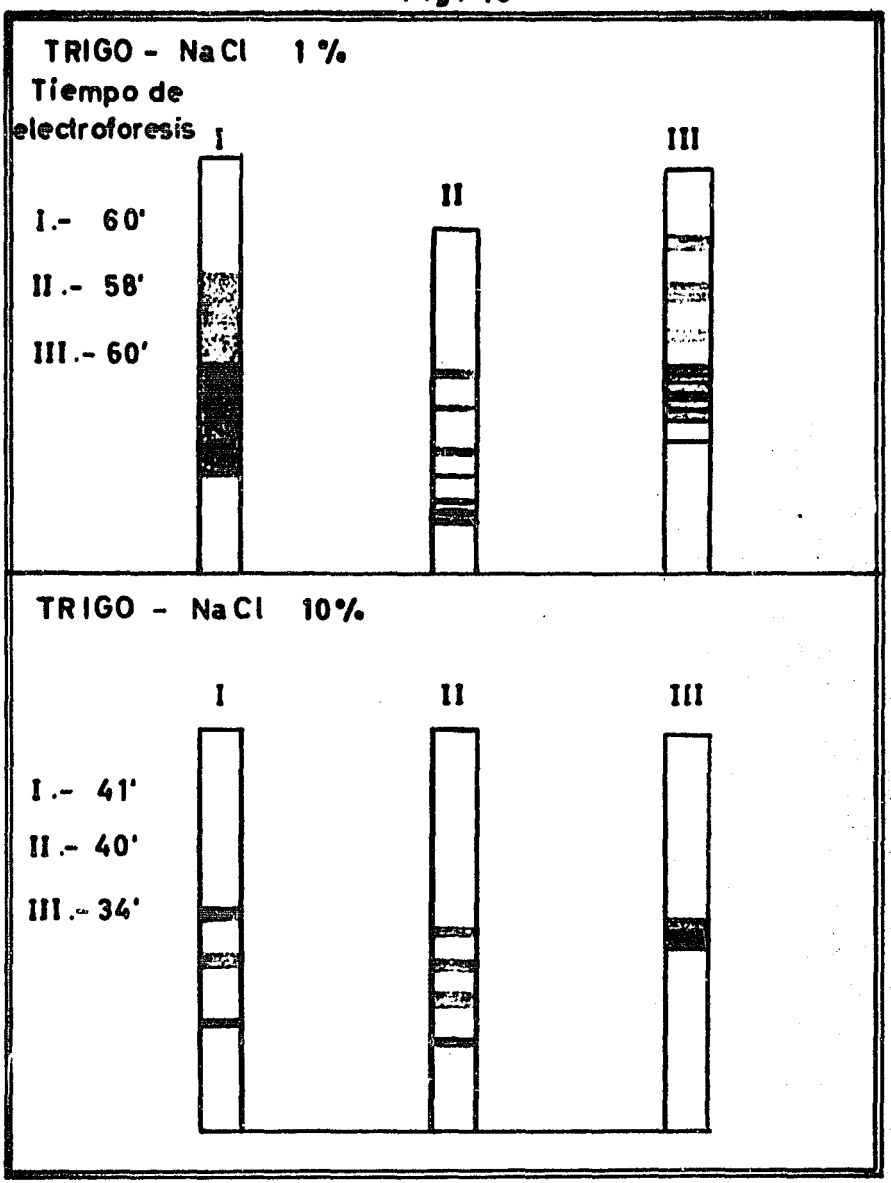

TRIGO - Etanol
Tiempo de electroforesis
I
II
III
I.- 39'
II.- 30'
III.- 37'
TRIGO - Sulfato de amonio
I
II
III
I.- 35'
II.- 35'
III.- 31'

Fig. 18


TRIGO - NaCl 1 %
Tiempo de electroforesis
I
II
III
I.- 60'
II.- 58'
III.- 60'
TRIGO - NaCl 10%
I
II
III
I.- 41'
II.- 40'
III.- 34'