

Un método para la determinación de aminoácidos aplicable a problemas de suplementación, fitomejoramiento y bioquímica nutricional

ROBERTO A. GÓMEZ BRENES¹ y RICARDO BRESSANI²
Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP),
Guatemala, C. A.

RESUMEN

Se presenta un método analítico para la determinación de aminoácidos, basado en una combinación de métodos de cromatografía y electroforesis en papel a bajo voltaje. Las muestras que contienen los aminoácidos se aplican a cintas de papel de filtro, y luego son fraccionados por electroforesis, en aminoácidos básicos, neutros y ácidos, a un pH de 5.3. Tendiendo la mitad de la cinta con solución de ninhidrina es factible localizar las diferentes fracciones que contienen los aminoácidos, las que a su vez pueden cortarse de la otra mitad de la cinta que no ha sido teñida. La separación individual de los aminoácidos básicos se consigue por medio de electroforesis a un pH de 11.5, y la de los neutros, por cromatografía descendente con butanol, ácido acético y agua. En el caso de ciertos aminoácidos que son difíciles de separar en la forma mencionada es necesario aplicar primero la cromatografía y después la electroforesis, a un pH de 1.85. Se citan ejemplos de la aplicación de este método en problemas de suplementación y fitomejoramiento, así como en la determinación de aminoácidos libres en tejidos, dándose a conocer sus ventajas y limitaciones en relación con otros métodos analíticos.

1 Científico de la División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos, INCAP.

2 Jefe de la misma División.

Publicación INCAP E-702.

Recibido: 7-12-1972.

I. INTRODUCCION

El mejoramiento del valor nutritivo de los alimentos básicos a través de la suplementación con proteínas de buena calidad o mediante el agregado de aminoácidos puros, es una técnica que progresa rápidamente, evidenciándose su aplicación práctica en la mayor disponibilidad comercial de alimentos suplementados para consumo humano o animal (1-7).

Por otro lado, los fitomejoradores trabajan intensamente en la selección y producción de variedades de semillas de alto valor nutritivo. Estos mejoramientos genéticos han dado ya resultados positivos, como es el caso del maíz opaco-2, cuyo contenido de lisina es superior al del maíz común y su concentración de zeína inferior a la de cualquier otro maíz que no contenga este gene (8-10). Los progresos logrados por la ciencia de los alimentos y la genética exigen también avances rápidos en las técnicas analíticas a fin de que éstas permitan detectar los cambios que pueden ocurrir en los alimentos durante su preparación culinaria (11-13), los procesos industriales (14) y el almacenamiento (15) a que se someten estos alimentos antes de ser consumidos por el público. Asimismo, el control de los procesos genéticos mediante análisis químico es de suma importancia para obtener o detectar los cambios deseables o indeseables que se desea investigar.

El propósito de este trabajo fue desarrollar un método analítico rápido en comparación con otros métodos disponibles, y de bajo costo para el análisis de hidrolizados proteínicos y aminoácidos libres en sueros y tejidos animales y vegetales.

II. METODOLOGIA

A. Reactivos

1. Mezcla de solventes para cromatografía:

N-butanol: ácido acético glacial: agua
(450: 50: 125 v/v/v)

2. Buffers para electroforesis:

(a) Piridina - ácido acético, a un pH de 5.3

(1% de piridina en solución acuosa de ácido acético al 0.4% (v/v))

- (b) *Carbonato de sodio*, a un pH de 11.5
(solución acuosa de carbonato de sodio anhidro al 0.53%)
- (c) *Fosfato*, a un pH de 6.0
(0.129 g% de Na_2HP_4 en solución acuosa de KH_2PO_4 al 0.906%)
- (d) *Acido fórmico - acético*, a un pH de 1.85
(2.5% de ácido fórmico en solución acuosa de ácido acético al 7.8% (v/v))

3. *Soluciones de ninhidrina:*

- (a) *Neutra* - 0.20 g% de ninhidrina en acetona + 5 ml de agua destilada
- (b) *Acida* - 0.20 g% de ninhidrina en acetona + 5 ml de agua destilada + 5 ml de ácido acético glacial
- (c) *Alcalina* - 0.20 g% de ninhidrina en etanol + 0.5 ml de KOH 1.0 N

B. *Aparatos*

1. *Cromatografía*

Para este estudio se usó un tanque rectangular equipado con cubetas de vidrio de aproximadamente 200 ml de capacidad. El fondo de este tanque se cubrió con la mezcla de solventes utilizada para desarrollar las cintas, con el objeto de mantener saturada la atmósfera interior del tanque.

2. *Electroforesis*

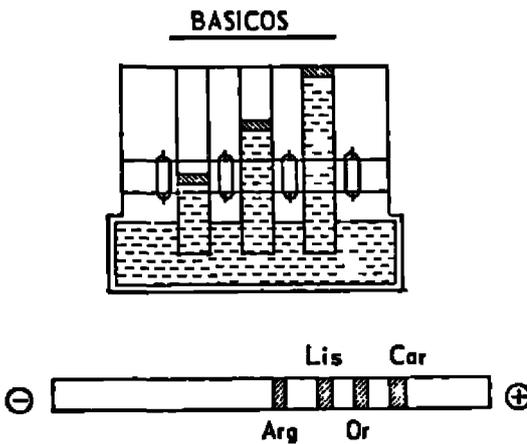
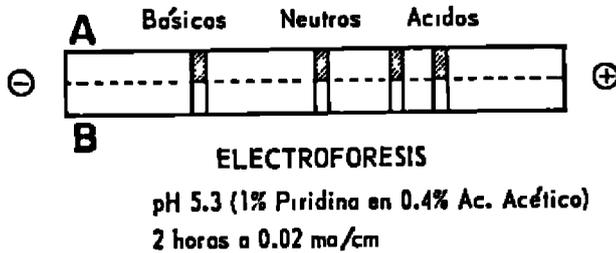
Para las separaciones de los aminoácidos por electroforesis se utilizaron celdas tipo "Durrum" de la Casa Beckman.

C. *Procedimiento*

Para cuantificar los aminoácidos de un hidrolizado proteínico o de una mezcla, se procede en varias etapas:

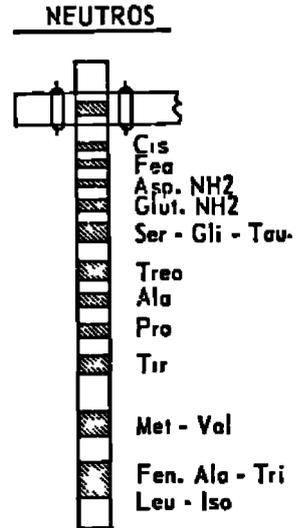
- 1. *Separación de los aminoácidos en los grupos básicos, neutros y ácidos por medio de electroforesis, a un pH de 5.3 (Gráfica 1).*

La muestra se aplica a cintas de papel de filtro Whatman No. 1, que miden 30 cm de largo por 6 cm de ancho. Cuando el propósito es aplicar la muestra en forma de banda para obtener una mejor separación de los aminoácidos, es necesario usar un aplicador de 6 cm; sin embargo, para este trabajo sólo se contaba con un aplicador de 3 cm de ancho.



ELECTROFORESIS

pH 11.5 (5.3 ‰ Na₂CO₃)
 15 horas a 0.005 ma/cm



CROMATOGRAFIA

18 horas (3 veces)
 N-BuOH: Ac. Acético: Agua
 (350: 50: 125 V/V/V)

Incap 70-389

Gráfica 1. Esquema de separación de aminoácidos por electroforesis y cromatografía.

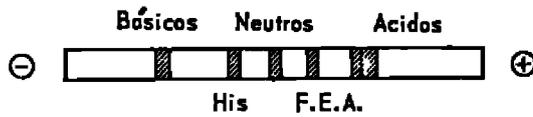
Por las razones apuntadas hubo necesidad de hacer un agujero en la parte media de la cinta a fin de aplicar la muestra a ambos lados del agujero, y repartirla así uniformemente en todo el ancho de la cinta. Las cintas se colocan después en una celda de electroforesis tipo "Durrum" y equilibradas con un buffer de piridina y ácido acético a un pH de 5.3. Luego se les somete a una corriente constante de 0.02 ma/cm, durante dos horas, lo cual separa los aminoácidos en básicos, neutros, y ácidos, orientados del cátodo hacia el ánodo, respectivamente, con el ácido aspártico moviéndose más rápido que el ácido glutámico. Después de la electroforesis, las cintas de papel se secan en un horno a 90° C durante 10 minutos. Luego se corta cada cinta por la mitad a lo largo, obteniéndose así dos cintas: A y B, de 3 cm de ancho cada una.

La cinta A se tiñe con una solución de ninhidrina neutra y se desarrolla el color a 95° C durante 5 minutos, con lo cual las fracciones que contienen los aminoácidos se hacen visibles.

Esta cinta A, teñida en la forma descrita, se coloca junto a la cinta B para reconstruir la cinta ancha original. Las fracciones que contienen los aminoácidos básicos y neutros se cortan de la cinta B usando como guía la cinta teñida con los aminoácidos según se aprecia en la Figura 1, la cual muestra una cinta ancha después de someterse a electroforesis, a un pH de 5.3.

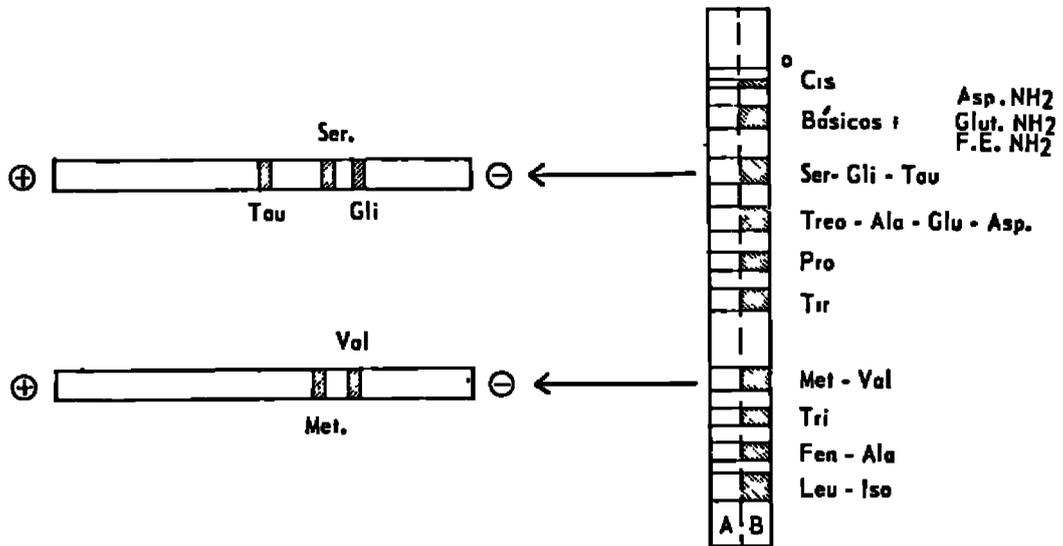
2. *Separación de los aminoácidos básicos por electroforesis, a un pH de 11.5 (Gráfica 1)*

Los trocitos de papel que contienen las fracciones de los aminoácidos básicos obtenidos previamente a un pH de 5.3, se prensan contra nuevas cintas de papel de filtro entre dos planchas de vidrio de 4 cm de ancho. Estas últimas se mantienen unidas por medio de bandas de hule, ya que el propósito es que el trocito de papel que contiene la muestra se mantenga en íntimo contacto con la nueva cinta de papel de filtro. Todo esto se coloca en las celdas de electroforesis, con un buffer de carbonato de sodio a un pH de 11.5 y cuando éste asciende por capilaridad en la nueva cinta, arrastra automáticamente los aminoácidos básicos. Estos últimos pueden separarse individualmente aplicando una corriente constante de 0.005 ma/cm durante 15 horas, teniendo cuidado de colocar el polo



ELECTROFORESIS

pH 6.0 (1.29% $\text{Na}_2\text{H PO}_4$ en 9.06% $\text{KH}_2\text{ PO}_4$)
 4 horas a 0.03 m^2/cm



ELECTROFORESIS

pH 1.85 (2.5% Ac. Fórmico
 en 7.8% Ac. Acético)
 4 horas a 0.02 mA/cm

CRGματοGRAFIA

24 horas
 N - BuOH: Ac. Acético: Agua
 (350: 50: 125 $\text{V}_2/\text{V}/\text{V}$)

Incap 70-388

Gráfica 2. Esquema de separación de aminoácidos por cromatografía y electroforesis.

positivo hacia donde van a migrar los aminoácidos, o sea al extremo de las cintas que no están prensadas con los vidrios.

3. Separación de los aminoácidos neutros por cromatografía descendente (Gráfica 1)

La fracción de los aminoácidos neutros obtenida a un pH de 5.3 se prensa a una nueva cinta de papel de filtro Whatman No. 1, de 3 cm de ancho por 80 cm de largo, entre dos placas de vidrio que se mantienen juntas por bandas de hule; luego se corre cromatografía descendente con una mezcla de

butanol, ácido acético y agua, durante 18 horas. Al final de este período las cintas se secan a temperatura ambiente con ayuda de un ventilador y el proceso cromatográfico se repite dos veces más, con la misma mezcla de solventes, y secando las cintas después de cada irrigación.

4. *Separación de histidina (Gráfica 2)*

En el proceso descrito anteriormente para la separación de los aminoácidos básicos a un pH de 11.5, la histidina corre fuera de la cinta al compartimiento del buffer. Cuando se desea determinar este aminoácido y fosfoetanolamina, o ambos, puede emplearse electroforesis a un pH de 6.0, localizándose la histidina entre la fracción de los aminoácidos básicos y los neutros, en la mitad de la cinta correspondiente al cátodo; la fosfoetanolamina, por su parte, se encuentra entre la fracción de los aminoácidos neutros y ácidos, en la mitad de la cinta correspondiente al ánodo.

5. *Separación de ciertos aminoácidos neutros difíciles de obtener solo por electroforesis o cromatografía (Gráfica 2)*

Los aminoácidos serina, glicina, taurina, metionina y valina forman grupos al tratar de separarlos por cromatografía o electroforesis. Sin embargo, esa separación es factible si se emplea primero cromatografía y luego electroforesis. Cuando se usa como mezcla de solventes, butanol, ácido acético, y agua durante 24 horas, es posible obtener por cromatografía descendente la separación que se muestra al lado derecho de la Gráfica 2 con los grupos de serina-glicina-aurina y de metionina-valina. Si se procede a cortar y teñir la mitad de las cintas, como se mencionó anteriormente para la separación de los aminoácidos básicos después de electroforesis a un pH de 5.3, pueden aislarse las fracciones que contienen dichos aminoácidos. Estas pueden ser separadas en sus componentes individuales aplicando electroforesis a un pH de 1.85 durante 4 horas, a 0.02 ma/cm.

D. *Estimación Cuantitativa*

Una vez se ha llevado a cabo la cromatografía o la electroforesis, las cintas se secan en un horno a 95° C durante 10 mi-

nutos; luego se tiñen por inmersión en la solución de ninhidrina más apropiada:

1. *Solución de ninhidrina neutra* para las cintas desarrolladas en cromatografía con N-BuOH, ácido acético y agua, y las desarrolladas en electroforesis a un pH de 4.0 a 6.0.
2. *Solución de ninhidrina ácida* para las cintas desarrolladas en electroforesis a un pH mayor de 6.0.
3. *Solución de ninhidrina alcalina* para las cintas desarrolladas en electroforesis a un pH menor de 4.0.

Las cintas teñidas se secan al aire por 20 minutos; seguidamente se colocan en el horno a la temperatura de 95° C durante 5 minutos, con lo cual aparece el color producto de la reacción de la ninhidrina con los aminoácidos. Se dejan en reposo durante 30 minutos para que se equilibren con las condiciones ambientales del laboratorio y luego se procede a cortar las fracciones que contienen los aminoácidos, y una parte de la cinta sin aminoácidos que es la que servirá de control.

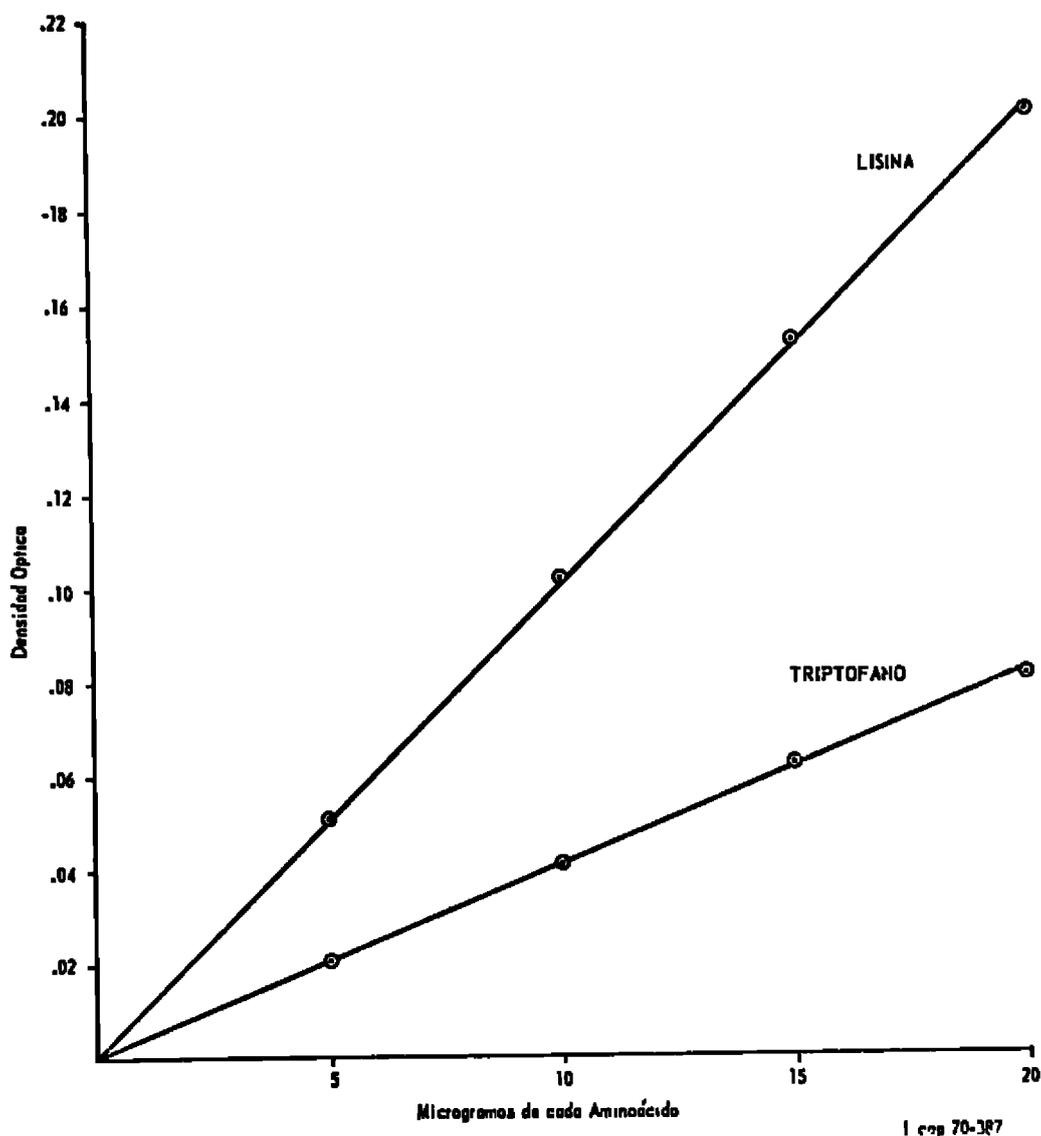
Para la extracción del color, los trocitos de papel recién cortados se ponen dentro de una jeringa de plástico a la cual se le coloca previamente un filtro de algodón en la punta; éste debe estar comprimido en tal forma que deje pasar líquido solamente por centrifugación.

Las jeringas (sin émbolos) con los trocitos de papel se colocan dentro de un tubo de centrífuga; luego se introducen 3 ml de etanol al 75% en cada una de ellas, se agitan por 10 minutos y se centrifugan por otros 10 minutos a 1,500 rpm, con lo cual todo el alcohol en el que se ha disuelto el color de los aminoácidos pasa al tubo de centrífuga. Esta extracción se repite una vez más en la misma forma y la densidad óptica del extracto se mide en un colorímetro a 540 μ , usando el extracto del trocito de papel sin aminoácidos, como control.

La Figura 2 muestra las jeringas de plástico dentro de los tubos de centrífuga y el extracto alcohólico coloreado que se obtiene después de la centrifugación.

Las concentraciones de los aminoácidos se calculan de una curva estándar en la región donde las densidades ópticas siguen la ley de Beer-Bouger, la cual se construye usando aminoácidos puros.

A título ilustrativo, la Gráfica 3 muestra las curvas estándar de lisina y triptofano obtenidas por el método descrito. Según puede observarse, aun usando 5 microgramos de estos aminoácidos es factible conseguir lecturas que permitan calcular su concentración en las muestras.



Gráfica 3. Curva estándar de lisina y triptofano.

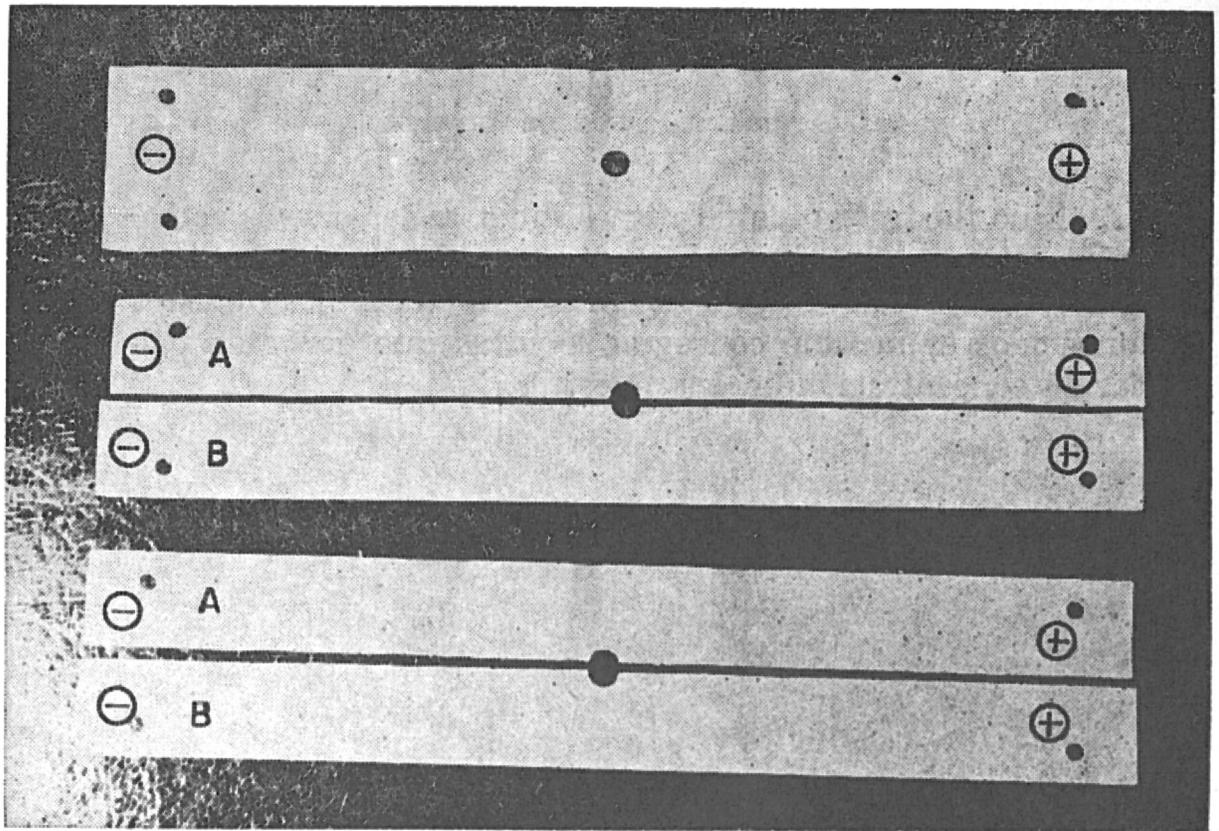


Figura 1. Cintas de papel filtro despues de electrorresis mostrando las fracciones y el corte longitudinal para separar las dos mitades A y B.

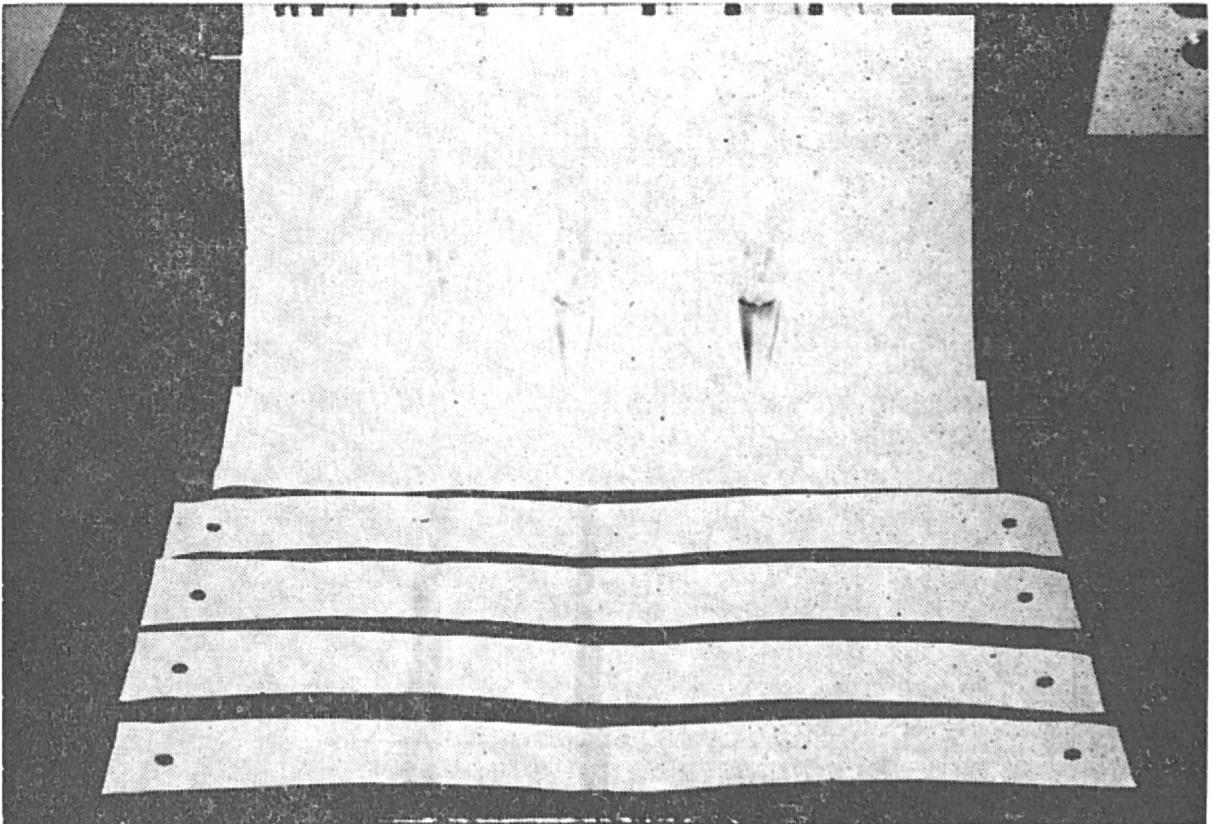


Figura 2. Jeringas de plástico dentro de los tubos y el extracto alcohólico obtenido después de centrifugación.

III. APLICACION DE ESTE METODO A PROBLEMAS DE SUPLEMENTACION

Los cambios o pérdidas que pueden ocurrir en los alimentos suplementados durante su preparación culinaria, los procesos industriales, y el almacenamiento a que se someten, han sido objeto de numerosos estudios por Bressani y colaboradores (1, 11-14, 16). Con el propósito de comprobar la utilidad del método que aquí se presenta, en el control de estos cambios, se obtuvieron muestras de masa de maíz libres de suplemento y suplementadas con levadura torula, lisina y triptofano, las cuales serían utilizadas en otro estudio por Elías y Bressani (17). Muestras en duplicado fueron extraídas con ácido clorhídrico 0.1 N, de manera similar a la ya citada en la sección precedente al abordarse el tema de extracción del color, o sea colocando 1.5 g de la muestra dentro de una jeringa de plástico de 10 ml, y extrayendo los aminoácidos suplementados, por agitación y centrifugación, con tres porciones de 8 ml de HCl 0.1 N para luego llevarla a volumen de 25.0 ml con agua destilada.

Aprovechando el hecho de que el triptofano es un aminoácido neutro cuyo punto isoeléctrico ocurre al pH de 5.9, y que la lisina es un aminoácido básico con un punto isoeléctrico al pH de 9.7, la separación de estos dos aminoácidos suplementarios mediante electroforesis fue relativamente sencilla al pH de 5.3. Como puede apreciarse en la parte inferior de la Figura 2, el triptofano está situado en medio de la cinta, y la lisina al lado izquierdo de la misma.

Se extrajeron también con HCl, y se separaron, muestras libres de suplemento, restándose las densidades ópticas de las fracciones obtenidas de las muestras ya suplementadas; dichas fracciones representaban los aminoácidos libres de la masa de maíz y eran comunes a ambas muestras, es decir, las no suplementadas y las suplementadas.

Con el fin de evitar que durante la electroforesis hubiese contaminación de los aminoácidos suplementarios con cualquier cantidad de proteína extraída por el HCl, las muestras fueron aplicadas a una pulgada del centro de la cinta en la mitad correspondiente al ánodo. Los aminoácidos migraron así hacia el cátodo, y siendo las proteínas moléculas de mayor

tamaño, la velocidad de movimiento fue menor que la de los aminoácidos. Para comparar estos resultados con los obtenidos por métodos microbiológicos se hicieron extracciones con ácido clorhídrico en muestras similares. Luego, los extractos fueron analizados, siguiendo las técnicas y usando los medios de cultivo recomendados por Steele *et al* (18).

Resultados

Las recuperaciones de lisina y triptofano de las muestras suplementadas, obtenidas por métodos microbiológicos y por electroforesis, se comparan en el Cuadro No. 1, notándose que los resultados de ambas determinaciones son similares. Sin embargo, en general las obtenidas por electroforesis son ligeramente mayores que las que rindieron los métodos microbiológicos, excepto en la recuperación del triptofano que se agregó a la tortilla sometida a seis minutos de cocción.

IV. APLICACION EN PROBLEMAS DE FITOMEJORAMIENTO

Se hidrolizaron en el autoclave durante 8 horas, a 16 libras de presión y a una temperatura de 121°C, muestras de diversas variedades de maíces, algunas de las cuales ya tenían incorporado el gene opaco-2. Para ello se pesaron 2.0 g de muestra y se les agregó 25 ml de HCl 6 N a cada una de ellas. A dos de las muestras se les agregó 100 mg de lisina pura antes de hidrolizarlas, con el objeto de calcular el porcentaje de recuperación del aminoácido agregado. Después de la hidrólisis las muestras se filtraron, se llevaron a un pH de 6.8 y a un volumen de 100 ml. Una parte de los hidrolizados se usó para la determinación de lisina por métodos microbiológicos (18), y la otra para la determinación de lisina por el método de electroforesis aquí comentado.

Resultados

En el Cuadro No. 2 donde se comparan los dos métodos, se observan los resultados de estas pruebas, siendo evidente su similitud. Asimismo, puede apreciarse la mayor concentración de lisina en los maíces a los que se incorporó el gene opaco-2.

CUADRO N° 1

COMPARACION DE LAS RECUPERACIONES DE LISINA Y TRIPTOFANO COMO SUPLEMENTOS DE MASA DE MAIZ Y TORTILLAS, POR METODOS MICROBIOLÓGICOS Y ELECTROFORETICOS

Muestras	Recuperación*, %			
	Microbiológicos		Electroforéticos	
	Lisina	Triptofano	Lisina	Triptofano
Masa de maíz + 0.3% lisina + 0.1% triptofano	106.3	95.2	107.8	110.7
Tortilla 3 minutos + 0.3% lisina + 0.1% triptofano	103.2	94.0	106.7	100.0
Tortilla 4.5 minutos + 0.3% lisina + 0.1% triptofano	97.7	117.8	103.2	111.4
Tortilla 6 minutos + 0.3% lisina + 0.1% triptofano	98.8	117.8	107.9	74.3
Masa de maíz + 3% torula + 0.15% lisina	96.5	—	111.0	—
Tortilla 3 minutos + 3% torula + 0.15% lisina	101.9	—	111.7	—
Tortilla 4.5 minutos + 3% torula + 0.15% lisina	92.0	—	103.1	—
Tortilla 6 minutos + 3% torula + 0.15% lisina	104.1	—	113.0	—

* De dos muestras.

CUADRO N° 2

COMPARACION DE LOS RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE LISINA POR ELECTROFORESIS Y POR METODOS MICROBIOLOGICOS EN HIDROLIZADOS ACIDOS DE MAICES*

Muestras	Electroforesis g%	Microbiológicos g%
Tuxpeño, grano duro	0.181	0.198
Bolita x 0 ₂ sibbed	0.378	0.353
Tuxpeño V 520 C	0.212	0.280
Ceroso chalqueño	0.214	0.218
Pepitilla x 0 ₂ 5055 No. Tep 66 B	0.422	0.378

* En duplicado.

Los hallazgos resultantes de la determinación de lisina por electroforesis, en los maíces a los que se adicionó 100 mg de lisina antes de la hidrólisis, se presentan en el Cuadro No. 3, observándose que las recuperaciones fueron de 100 y 117% en las dos muestras analizadas, respectivamente.

CUADRO N° 3

RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE LISINA POR ELECTROFORESIS EN HIDROLIZADOS ACIDOS DE MAICES*

Muestras	Lisina g%	Recuperación %
Tuxpeño, grano duro	0.192	—
Tuxpeño, grano duro + 100 mg lisina	0.292	100
Bclita x 0 ₂ sibbed	0.380	—
Tuxpeño V 520 C	0.172	—
Tuxpeño V 520 C + 100 mg lisina	0.289	117
Ceroso chalqueño	0.225	—
Pepitilla x 0 ₂ 5055 No. Tep 66 B	0.404	—

* En duplicado.

V. APLICACION EN LA DETERMINACION DE AMINOACIDOS LIBRES, EN SUERO Y EN TEJIDOS

Los aminoácidos libres del suero o de un homogeneizado de tejidos al 20%, pueden obtenerse por precipitación de la proteína con 4 ml de etanol absoluto por cada 0.5 ml de muestra. Después de 15 minutos de centrifugación a 2,000 rpm se separa el sobrenadante, al cual se le agregan 3 volúmenes de cloroformo. Luego se agita fuertemente y se centrifuga durante el mismo tiempo y a la misma velocidad, con lo cual se separan dos capas líquidas en el tubo de centrifuga: la superior, que es acuosa y contiene los aminoácidos libres, y la inferior que es la mezcla del alcohol con cloroformo y contiene la grasa del suero o de los tejidos. La capa superior se separa con un gotero de vidrio llevándose a sequedad en un horno con aire a 65°C; seguidamente se redisuelve en una cantidad conveniente de agua destilada, por lo general de 30 a 60 microlitros, y se usa para la separación de los aminoácidos.

Resultados

En el Cuadro No. 4 se presentan los resultados que se obtuvieron al aplicar el método descrito en la determinación de los aminoácidos individuales de 10 muestras del mismo homogeneizado de riñón. Según puede apreciarse, los resultados obtenidos tanto con el método de extracción de los aminoácidos libres con etanol y cloroformo, así como su determinación por la combinación de electroforesis y cromatografía, son bastante constantes.

VI. DISCUSION

Si bien es cierto que muchas de las técnicas que se utilizan en la actualidad para el análisis de aminoácidos, como son los métodos microbiológicos (18), la cromatografía de gas (19-23), o las resinas de intercambio iónico (24-26), así como la electroforesis de alto voltaje (27, 28), etc., permiten excelentes separaciones de aminoácidos. También hay que reconocer que adolecen de uno o varios de los siguientes inconvenientes: requieren equipos costosos; el precio por análisis es elevado; el número de muestras que pueden completarse du-

CUADRO N° 4
ANALISIS DE DIEZ MUESTRAS DEL MISMO HOMOGENEIZADO
DE RIÑON

Aminoácidos	Micromoles/g de riñón		
Esenciales			
Lisina	2.88	±	0.12*
Treonina	3.70	±	0.20
Valina	4.19	±	0.32
Leucina-isoleucina	5.72	±	0.14
Fenilalanina	1.85	—	0.10
Metionina	1.50	±	0.09
Histidina	2.26	—	0.18
Arginina	1.63	±	0.08
Total	23.73	±	0.47
No esenciales			
Ornitina	1.05	±	0.08
Serina	5.75	±	0.22
Glicina	4.58	±	0.25
Cistina	0.96	±	0.08
Asparagina	3.52	±	0.12
Glutamina	2.47	±	0.15
Alanina	7.84	±	0.24
Prolina	8.45	±	0.30
Tirosina	2.07	±	0.10
Acido aspártico	3.36	±	0.14
Acido glutámico	4.82	±	0.16
Total	44.87	±	0.98
Esenciales	0.52	±	0.03
No esenciales			

* Error Estándar. Cada valor es el promedio de diez diferentes análisis.

rante el día es limitado, y la obtención de aminoácidos individuales presenta dificultades.

El método descrito en este trabajo tiene la ventaja de que requiere un equipo relativamente barato como son las celdas de electroforesis a bajo voltaje y tanques de cromatografía

que —además de ser utilizados para la determinación de aminoácidos— pueden usarse para diferentes análisis. Por otro lado, el costo por análisis y el tiempo empleado son inferiores a los requeridos por cualquier otro método, y el número de muestras que pueden completarse por día, es superior. Además, para separar los aminoácidos que son de interés para el investigador, puede escogerse la combinación más apropiada de electroforesis y cromatografía, o viceversa, ya que en muchos casos solo se necesita conocer la concentración de uno solo de estos compuestos.

Como ventaja adicional cabe destacar que los problemas que se presentan con los métodos microbiológicos debido a la racemización de ciertos aminoácidos, en particular triptofano, durante la hidrólisis alcalina no surgen con el método descrito en esta comunicación, ya que siendo este último un método químico, no es afectado por tales cambios. Asimismo, la presencia de proteínas en los extractos ácidos de los alimentos suplementados con aminoácidos puros, no tiene importancia, pues siendo las proteínas moléculas más grandes que los aminoácidos, migran a velocidades menores en el campo eléctrico, permitiendo así la separación de estos últimos.

Una de las críticas a los métodos de cromatografía y electroforesis en papel, ha sido la dificultad de cuantificar el color de los aminoácidos después de su reacción con ninhidrina. Ello aplica especialmente cuando no se cuenta con un densitómetro apropiado que mida directamente la mancha del papel; sin embargo, consideramos que este problema puede solucionarse con el uso de jeringas y de centrifugación para extraer el color, como ya se describió, puesto que dos extracciones con etanol al 75% bastan para obtener en forma líquida el 100% del color del aminoácido teñido. Esto permite el uso de un colorímetro corriente para su estimación cuantitativa.

El examen de los datos aquí presentados indica que este método tiene muy buena reproducibilidad, siendo sus resultados comparables a los obtenidos por métodos microbiológicos.

A pesar de las limitaciones de este método para la determinación individual de leucina e isoleucina, los autores consideran que esta técnica puede ser de gran utilidad para algunas de nuestras universidades latinoamericanas. Por limitaciones económicas y falta de equipo de laboratorio, muchas

veces sucede que en ellas no se aprovecha al máximo el potencial humano que poseen para emprender investigaciones de orden científico que conduzcan a la solución de problemas específicos del área.

SUMMARY

A method for amino acid determination applicable to supplementation, plant improvement, and nutritional biochemistry problems

An analytical method for the determination of amino acids, based on paper chromatography and electrophoresis at low voltage is presented. Samples containing the amino acids are applied to filter paper strips and then fractionated by electrophoresis in basic, neutral and acidic amino acids, at a pH of 5.3. Dyeing of half of the strip with a ninhydrin solution allows observation of the different fractions containing the amino acids, which can be cut out from the other half of the strip that has not been dyed. The individual separation of the basic amino acids is achieved by electrophoresis at a pH of 11.5, and the neutral amino acids by descendent chromatography with butanol, acetic acid and water. In the case of certain amino acids which are difficult to obtain in the above-mentioned form, it is necessary to apply first, the chromatography and then the electrophoresis at a pH of 1.85. Examples of the application of this method on supplementation and plant improvement problems are shown, as well as in the determination of free amino acids in tissues, showing the advantages and limitations of the method in relation to other analytical procedures.

BIBLIOGRAFIA

1. Bressani, R. & L. G. Elías. Processed vegetable protein mixtures for human consumption in developing countries. En: *Advances in Food Research*. Vol. 16. C. O. Chichester, E. M. Mrak & G. F. Stewart, eds. New York, Academic Press Inc., 1968, p. 1-103.
2. Graham, R. P., A. I. Morgan Jr., M. R. Hart & J. W. Pence. Mechanics of fortifying cereal grains & products. *Cereal Sci. Today*, 13: 224-227, 253, 1968.
3. Bressani, R. & R. A. Gómez Brenes. Amino acid supplementation of cereal grains in mixed diets. *Fed. Proc.*, 27: 252, 1968 (Extracto 203).
4. Bressani, R., R. A. Gómez Brenes, F. Viteri & J. Alvarado. Amino acid supplementation of rice and corn fed alone and as components of human diets. *Fed. Proc.*, 26: 630, 1967 (Extracto 2089).
5. Bressani, R., L. G. Elías & J. E. Braham. Suplementación, con amino-ácidos, del maíz y de la tortilla. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, 18: 123-134, 1968.

6. Elías, L. G., R. Jarquín, R. Bressani & C. Albertazzi. Suplementación del arroz con concentrados proteicos. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, 18: 27-38, 1968.
7. Jarquín, R., P. Noriega & R. Bressani. Enriquecimiento de harinas de trigo, blanca e integral, con suplementos de origen animal y vegetal. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, 16: 89-103, 1966.
8. Mertz, E. T., L. S. Bates & O. E. Nelson. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science*, 145: 279-280, 1964.
9. Mertz, E. T., O. A. Veron, L. S. Bates & O. E. Nelson. Growth of rats fed on opaque-2 maize. *Science*, 148: 1741-1742, 1965.
10. Bressani, R., L. G. Elías & R. A. Gómez Brenes. Protein quality of opaque-2 corn. Evaluation in rats. *J. Nutrition*, 97: 173-180, 1969.
11. Bressani, R. & N. S. Scrimshaw. Lime-heat effects on corn nutrients. Effect of lime treatment on in vitro availability of essential amino acids and solubility of protein fractions in corn. *J. Agric. Food Chem.*, 6: 774-778, 1958.
12. Bressani, R., R. Paz y Paz & N. S. Scrimshaw. Corn nutrient losses. Chemical changes in corn during preparation of tortillas. *J. Agric. Food Chem.*, 6: 770-774, 1958.
13. Bressani, R., L. G. Elías & A. T. Valiente. Effect of cooking and of amino acid supplementation on the nutritive value of black beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Brit. J. Nutr.*, 17: 69-78, 1963.
14. Espigares Fong, M. I. Efecto del Procesamiento en la Preparación de Harinas Precocidas de Frijol, sobre su Composición Química y Valor Proteico. Tesis de graduación de Licenciado en Química y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, julio de 1969.
15. Ferrel, R. E., A. D. Shepherd & D. G. Guadagni. Storage stability of lysine in lysine-fortified wheat. *Cereal Chem.*, 47: 33-37, 1970.
16. Bressani, R. & L. G. Elías. Cambios en la composición química y en el valor nutritivo de la proteína de la harina de semilla de algodón durante su elaboración. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, 18: 319-339, 1968.
17. Elías, L. G. & R. Bressani. Efecto del procesamiento sobre la estabilidad de suplementos de lisina y triptofano en maíz y tortilla. Presentado en: Primer Simposio sobre Proteínas Alimenticias, Buenos Aires, Argentina, 18 al 21 de mayo de 1970.
18. Steele, B. F., H. E. Sauberlich, M. S. Reynolds & C. A. Baumann. Media for *Leuconostoc mesenteroides* P-60 and *Leuconostoc citrovorum* 8081. *J. Biol. Chem.*, 177: 533-544, 1949.

19. Hagen, P. B. & W. Black. Gas chromatographic method for the separation and estimation of amino acids derivatives. *Canad. J. Biochem.*, 43: 309-315, 1965.
20. Darbre, A. & K. Blau. Gas chromatography of volatile amino acid derivatives. I. Alanine, glycine, valine, leucine, isoleucine, serine, and threonine. *J. Chromatog.*, 17: 31-49, 1965. (cf. *Nutr. Abst. Revs* 35: 607, 1965, Abst. 3400).
21. Gil-Av, E., R. Charles & G. Fisher. Resolution of amino acids by gas chromatography. *J. Chromatog.*, 17: 408-410, 1965.
22. Casagrande, D. J. Gas-liquid chromatography of thirty-five amino acids and two amino sugars. *J. Chromatog.*, 49: 537-540, 1970.
23. Teuwissen, B. & A. Darbre. Preparation of volatile derivatives of amino acids on a solid support followed by direct injection into the gas chromatography column. *J. Chromatog.*, 49: 298-300, 1970.
24. Spackman, D. H., W. H. Stein & S. Moore. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, 30: 1190-1206, 1958.
25. Hamilton, P. B. Ion exchange chromatography of amino acids-Micro-determination of free amino acids in serum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 102: 55-75, 1962-63.
26. Mondino, A. Automatic ion-exchange chromatography of amino acids. Experimental studies for optimizing resin column dimensions. *J. Chromatog.*, 50: 260-273, 1970.
27. Corfield, M. C. & E. C. Simpson. A sensitive semi-quantitative method for amino-acid analysis. *J. Chromatog.*, 17: 420-425, 1965.
28. Peterson, P. J. & L. Fowden. Separation of acidic amino acids by high-voltage electrophoresis and chromatography. *J. Chromatog.*, 48: 575-576, 1970.