

**METODOS QUIMICOS USADOS EN EL CIMMYT
PARA DETERMINAR LA CALIDAD
DE LA PROTEINA DEL MAIZ**

Evangelina Villegas

Edwin T. Mertz



**CENTRO INTERNACIONAL DE MEJORAMIENTO DE MAIZ Y TRIGO
INTERNATIONAL MAIZE AND WHEAT IMPROVEMENT CENTER
MEXICO**

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCION	1
METODOS	2
Preparación de la muestra para el análisis del endospermo	2
Determinación de la proteína	3
Determinación del triptofano	4
Determinación de la lisina	12
DISCUSION	13
REFERENCIAS	13

AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan su agradecimiento al Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (Fondo Especial), por el apoyo dado a la investigación sobre proteínas en el CIMMYT como parte del Proyecto Global de Investigación No. 1, y a USAID por el financiamiento otorgado a la investigación cooperativa sobre proteínas llevada a cabo por el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Purdue, como parte del contrato AID/csd-2809 con la Universidad de Purdue.

MÉTODOS QUÍMICOS USADOS EN EL CIMMYT PARA DETERMINAR LA CALIDAD DE LA PROTEÍNA DEL MAÍZ

Evangelina Villegas* y Edwin T. Mertz**

INTRODUCCION

En 1964, Mertz, Bates y Nelson (1) encontraron que el gene mutante opaco-2 del maíz modifica el balance de aminoácidos de la proteína del endospermo e incrementa el contenido de lisina y triptofano. Este descubrimiento abrió nuevos horizontes para los fitomejoradores y los nutriólogos.

Las pruebas de alimentación con dietas a base de solamente maíz opaco-2 ó harinoso-2, otro mutante que condiciona un aumento en el contenido de lisina descubierto posteriormente, han confirmado que tanto los humanos como los animales, particularmente los jóvenes, pueden aumentar de peso más rápidamente que si se les alimenta con dietas de maíz normal. Las implicaciones de este descubrimiento fueron claramente obvias para muchos científicos, de manera que los mecanismos bioquímicos, genéticos y fisiológicos de los mutantes del maíz se convirtieron en sujetos de estudios detallados.

El descubrimiento del maíz mutante con alto contenido de lisina ofrece la posibilidad de incorporar la característica de proteína de alta calidad a líneas agrónomicamente superiores, que pueden utilizarse dentro de la estructura agrícola tradicional en vastas regiones del mundo.

Los nombres descriptivos "opaco" y "harinoso", indican la apariencia opaca, suave y sin lustre de los granos, apariencia por la cual estos mutantes se aislaron e identificaron originalmente. Estas características representan un obstáculo en su aceptación por parte de los agricultores, acostumbrados a sembrar granos de tipo cristalino y dentado, con apariencia limpia, brillante y lustrosa. En aquellos lugares donde se cultivan tradicionalmente los granos de tipo harinoso —por ejemplo en las altas mesetas y valles de la zona andina de Sudamérica— esto no constituirá problema alguno; sin embargo, estos tipos harinosos no se cultivan en la mayoría de las áreas maiceras del mundo para la alimentación humana ni para la alimentación de animales.

* Jefa del Laboratorio de Calidad de Proteínas, CIMMYT, México.

** Profesor del Departamento de Bioquímica, Universidad de Purdue, Lafayette, Indiana, E.U.A.

La identificación de líneas con alto contenido de lisina en poblaciones de maíz depende de análisis químicos cuidadosos. Hasta hace poco, la mayor parte de la identificación se hacía ya sea mediante la selección de granos opacos —lo cual, desafortunadamente, excluye cualquier oportunidad de obtener un mejor tipo de grano— o por el análisis químico de una pequeña cantidad de muestra a granel (masal), aunque este procedimiento tendía a oscurecer la útil variabilidad genética que contenía la combinación genotípica deseable.

En años pasados se han recomendado varios métodos químicos, pero algunos de ellos son complicados y laboriosos, y por lo tanto, son inapropiados para evaluar y separar grandes poblaciones, en tanto que otros procedimientos no indican realmente los niveles de aminoácidos; tal ocurre, por ejemplo, en una población segregante de opaco-2 en la cual actúan ciertos genes modificadores.

En un intento de ofrecer técnicas sencillas y apropiadas para evaluar y separar un gran número de muestras pequeñas, en el Laboratorio de Calidad de Proteínas del CIMMYT y en el Laboratorio de Bioquímica de la Universidad de Purdue, se han estudiado y reevaluado diferentes métodos analíticos que se usan ordinariamente para determinar el contenido de lisina y de triptofano. Después de esta reevaluación, se hacen las recomendaciones que se anotan enseguida para la evaluación rutinaria de las poblaciones y de los materiales segregantes producidos por los programas de mejoramiento de maíz.

MÉTODOS *

1. Preparación de la muestra para el análisis del endospermo

Para identificar rápidamente los materiales que contienen proteína de calidad mejorada, se aconseja llevar a cabo el análisis en el endospermo de la muestra. El endospermo del maíz es deficiente en lisina y triptofano, en tanto que el embrión tiene una composición relativamente constante y bien balanceada de aminoácidos, independientemente de la genealogía de la muestra. Igualmente, cuando se analiza el grano completo, el pericarpio puede dar pigmentos indeseables que interfieren con las determinaciones colorimétricas. Si se desea hacer un análisis en grano completo, estos factores deben tomarse en consideración.

a) Para la evaluación de familias genéticas

(i) Tomar al azar una muestra de 10 granos como representativos de cada mazorca.

(ii) Lavar cualquier vestigio de insecticida con agua destilada si es que las semillas han sido tratadas; si no, eliminar este paso.

(iii) Remojar las semillas en agua destilada durante 30 minutos aproximadamente. Eliminar con pinzas y bisturí el pericarpio y el germen.

* El Laboratorio de Calidad de Proteínas del CIMMYT puede proporcionar la lista del equipo necesario para efectuar estas pruebas cuando se le solicite.

El resto del grano es considerado como tejido del endospermo. Dejar secar al aire el endospermo durante la noche.

- (iv) Moler el endospermo seco en un molino pequeño de rodillo.
- (v) Desengrasar con hexano las muestras molidas en un extractor continuo tipo soxhlet durante 6 horas.
- (vi) Sacar las muestras al aire y pulverizarlas finamente con un amalgamador tipo Wig-L-Bug.

b) Para análisis de un solo grano

En algunos casos, como por ejemplo cuando una familia de maíz con endospermo duro (tipo normal) se identifica como poseedora de altos niveles de triptofano en la proteína, se recomienda que se analice grano por grano en una submuestra, a fin de identificar si hay segregación dentro de la familia, y si existe, cuáles granos contienen los mayores niveles de triptofano. El procedimiento siguiente no destruye el embrión del grano analizado y, por lo tanto, permite la germinación y el crecimiento de los granos con el mayor nivel de triptofano que se han seleccionado, a fin de llevar a cabo futuros análisis genéticos. Este procedimiento fue iniciado en 1968 por Bates, en el Laboratorio de Calidad de Proteínas del CIMMYT.

- (i) Tomar al azar 5 ó 6 granos de cada familia y lavarlos para eliminar cualquier insecticida, y dejarlos secar.
- (ii) Una pequeña porción del endospermo de diferentes partes del grano se perfora con un taladro eléctrico usando una broca de 1/16 de pulgada.
- (iii) Desengrasar con hexano.
- (iv) Secar la muestra y pulverizarla finamente con un amalgamador Wig-L-Bug.

2. Determinación de la proteína

El contenido de nitrógeno puede evaluarse mediante el método de microkjeldahl (2) y el porcentaje de la proteína se calcula usando el factor 6.25.

a) Reactivos

- (i) Acido sulfúrico concentrado (38 %); ($d = 1.84$), libre de nitrógeno.
- (ii) Mezcla de catalizadores: 99.0 g de K_2SO_4 ; 4.1 g de HgO y 0.8 g de $Cu SO_4$.
- (iii) Solución de hidróxido de sodio - Tiosulfato de sodio. Disolver 50 g de $NaOH$ y 5 g de $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ en agua destilada y aforar a 100 ml.
- (iv) Solución de ácido bórico al 4%.
- (v) Solución indicadora de rojo de metilo en verde de bromocresol. Mezclar una parte de solución etanólica de rojo de metilo al 0.2% con 5 partes de solución etanólica de verde de bromocresol al 0.2%.
- (vi) Solución de ácido clorhídrico - 0.02N.

b) Procedimiento

(i) Pesar de 30-40 mg. de muestra en un matraz de digestión. Añadir 1.0 g. de la mezcla de catalizadores y 2 ml. de ácido sulfúrico concentrado.

(ii) Digerir 40 minutos, enfriar y añadir la mínima cantidad de agua destilada para disolver los sólidos formados, enfriar y poner en la boca del matraz una pequeña cantidad de vaselina.

(iii) Transferir esta solución al aparato de destilación lavando el matraz de 5 a 6 veces con 1-2 ml. de agua destilada.

(iv) Poner un matraz erlenmeyer de 125 ml. con 6 ml. de solución de ácido bórico y 3 gotas de solución indicadora debajo del condensador, asegurando que la terminal de éste quede dentro de la solución.

(v) Añadir al aparato de destilación 8 ml. de solución de hidróxido de sodio - tiosulfato de sodio, y empezar la destilación hasta obtener 50 ml. del destilado.

(vi) Titular con el ácido clorhídrico hasta obtener la formación del color gris o la primera aparición del color violeta.

(vii) Efectuar la determinación de un blanco usando la misma cantidad de reactivos y el mismo proceso de digestión, destilación y titulación.

(viii) Calcular el porcentaje de nitrógeno.

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

$$\% \text{ proteína} = \% \text{ de nitrógeno} \times 6.25$$

3. Determinación del triptofano

Debido a la relación observada por Hernández y Bates (3) entre triptofano y lisina en la proteína del endospermo del maíz (aprox. 1 a 4), el triptofano se puede usar como un solo parámetro para evaluar la calidad del maíz.

La determinación del triptofano por el método de Opienska-Blauth modificado por Hernández y Bates (3) se recomienda por su exactitud y rapidez, puesto que es posible analizar hasta 75 muestras con duplicado cada día.

a) Reactivos

(i) Se disuelven 270 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 0.5 ml de agua destilada y se afora a un litro con ácido glacial.¹ (Reactivo A.)

(ii) Solución de H_2SO_4 , 30 N. (Reactivo B.)

(iii) Mezclar los reactivos A y B (1:1 v/v), 1 a 2 horas antes de usarse. (Reactivo C.)

¹ En cada frasco de ácido acético se debe hacer la prueba de desarrollo de color en presencia del triptofano.

De cada mazorca se toman 10 granos al azar para llevar a cabo la evaluación de la familia genética.





Arriba: Para obtener una muestra del endospermo se pelan los granos y se elimina el germen.

Abajo: Cuando se hace el análisis de un solo grano se perfora el grano con una broca fina. El endospermo que se obtiene es el que se analiza.



Página 7

Arriba: Las muestras se desengrasan con hexano en un extractor soxhlet.

Abajo: Las muestras se pulverizan finamente en un amalgamador tipo Wig-L-Bug.







Arriba izquierda: Digestión en micro-kjeldahl con objeto de determinar el nitrógeno.

Centro: Un paso en la determinación de la proteína es la destilación del nitrógeno.

Derecha: Para la hidrólisis de la proteína se añade una solución de papaína.

Abajo izquierda: En la evaluación colorimétrica del triptofano se pipetea una alícuota del hidrolizado.





Arriba izquierda: Los complejos de cobre de los amino-ácidos se agitan vigorosamente al efectuar la determinación colorimétrica de la lisina.

Abajo izquierda: El exceso del reactivo que se usa en la determinación colorimétrica de la lisina se extrae en la fase del acetato de etilo con una jeringa adaptada a un tubo de polietileno.

Arriba derecha: Al llevar a cabo la determinación de lisina o de triptofano, la absorción se lee en un aparato Spectronic 20.

(iv) Solución de Papaina.² Disolver la enzima (4 mg/ml) en solución reguladora de acetato de sodio, 0.1N, pH = 7.0. La solución de papaina debe ser preparada antes de usarse.

b) Procedimiento

(i) Pesar entre 90 y 100 mg. de muestra desengrasada y pulverizada en un tubo y añadir 4 ml de solución de papaina. Se tapan los tubos y se agitan cuidadosamente procurando que la muestra quede totalmente mojada dentro de la solución (Un tubo con únicamente solución de papaina es el blanco que se lleva durante todo el procedimiento).

(ii) Las muestras son incubadas a 65°C durante la noche (16 horas)

(iii) Los hidrolizados se sacan de la estufa y se agitan, dejándolos enfriar a la temperatura ambiente, después de lo cual el sobrenadante debe estar claro. (Si el sobrenadante no está claro, se debe centrifugar.)

(iv) Se pipetea un ml de hidrolizado a un tubo de ensaye que contiene 4 ml del reactivo C. Se agita vigorosamente y se incuba a 65°C durante 15 minutos para que desarrolle el color.

(v) Dejar enfriar las soluciones coloreadas y transferirlas luego a tubos de colorímetro calibrados. Las lecturas se hacen en el fotocolorímetro Bausch & Lomb Spectronic 20 a una longitud de onda de 545 m μ .

(vi) Se prepara una curva standard con un rango de 0 a 40 μ g/ml de DL-Triptofano.

(vii) El contenido de triptofano de la muestra se calcula a partir de la curva estándar y se reporta en base a la proteína.

4. Determinación de la lisina

La determinación de lisina solamente se hace en aquellos materiales que se han seleccionado porque presentan altos niveles de triptofano determinados mediante procedimientos colorimétricos, o cuando se desea conocer el contenido de lisina además del de triptofano.

Se recomienda el método colorimétrico desarrollado por Tsai (Universidad de Purdue) y modificado por Villegas (CIMMYT). Con este método se pueden analizar hasta 60 muestras por duplicado al día.

a. Reactivos

(i) Solución de papaina (4 mg de papaina por ml de solución reguladora de fosfato 0.03M con pH 7.4).

(ii) Solución reguladora de carbonatos 0.05 M, con pH 9.0.

(iii) Solución reguladora de boratos 0.05 M, con pH 9.0.

(iv) Suspensión de fosfato de cobre. Solución A): pesar 2.8 de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y disolverlos en 100 ml de agua destilada. Solución B): pesar 13.6 g de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y disolverlos en 200 ml de agua destilada.

² Papaina — grado comercial, Nutritional Biochemical Corp. (Cleveland, Ohio).

Mezclar A y B agitando, centrifugar a 2000 r.p.m. durante 5 minutos y descartar el sobrenadante. El precipitado se resuspende a 3 veces con 15 ml de solución reguladora de boratos, centrifugando cada suspensión. Después de la tercera lavada, el precipitado se resuspende en 80 ml de solución reguladora de boratos. Este reactivo puede ser usado solamente una semana.

(v) Solución HCl, 1.2N.

(vii) Mezcla de aminoácidos.

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

Pesar 100 mg de la mezcla de aminoácidos y disolverlos en 10 ml de solución reguladora de carbonatos.

b) Procedimiento

(i) Pesar 100 mg de muestra desengrasada y pulverizada en un tubo de ensaye y adicionar 5 ml de solución de papaina. Asegurarse de que la muestra esté completamente mojada y agitar 2 veces durante la primera hora de incubación. Preparar blanco con solución de papaina.

(ii) Incubar a 65°C durante 16 horas. Agitar y enfriar a temperatura ambiente, cuando las muestras estén frías, el sobrenadante debe de ser claro, o centrifugar si está turbio (una alícuota de 1 ml de este hidrolizado puede usarse para la determinación de triptofano).

(iii) Pipetear una alícuota de 1 ml en un tubo de centrífuga y añadir 0.5 ml de solución reguladora de carbonatos y 0.5 ml de suspensión de fosfato de cobre.

(iv) Agitar durante 5 minutos y centrifugar a 2000 r.p.m.

(v) Pipetear una alícuota de 1 ml del sobrenadante en un tubo de ensaye y añadir 0.1 ml de solución de 2-cloro-3, 5 dinitropiridina. Agitar vigorosamente.

(vi) Dejar los tubos durante dos horas a temperatura ambiente agitando cada 30 minutos.

(vii) Añadir 5 ml de HCl - 1.2N a cada tubo y agitar.

(viii) Añadir 5 ml de acetato de etilo. Tapar los tubos, mezclar invirtiendo los tubos 10 veces, extraer la fase superior con una jeringa que tenga adaptado un tubo de polietileno. Este paso debe repetirse 3 veces.

(ix) Transferir la fase acuosa de colorímetro calibrados y leer en el fotocolorímetro "Spectronic 20" a una longitud de onda de 390 m μ contra el blanco.

(x) Calcular el contenido de lisina de las muestras por comparación con la curva estándar y reportar en base a la proteína.

d) Curva Estándar

Preparar una curva estándar con un rango de 0 a 200 μg de lisina por ml. Solución stock de lisina: pesar 62.5 mg de lisina monohidroclorhídrica y aforar a 20 ml de solución reguladora de carbonatos (2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Preparar la curva con las siguientes concentraciones de lisina: 0, 250, 500, 750 y 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

De cada una de estas soluciones, tomar 1 ml y añadir 4 ml de solución de papaina (5 mg de papaina/ml de solución reguladora de fosfato).

Pipetear 1 ml de cada solución en un tubo de centrifuga, añadir 0.5 ml de mezcla de aminoácido y 0.5 ml de suspensión de fosfato de cobre.

Continuar el procedimiento a partir del inciso (iv) de la parte B.

DISCUSION

En promedio, el análisis de endospermo da valores colorimétricos de:

a) Maíz normal, alrededor de 0.45 g de triptofano y 1.8 g de lisina por 100 g de proteína (con aproximadamente 9.0% de proteína en la muestra), y

b) Maíz opaco-2, alrededor de 0.85 g de triptofano y 3.6 g de lisina en 100 g de proteína (con aproximadamente 8.0% de proteína en la muestra).

Los valores indicados pueden variar debido a la genealogía de la muestra o debido al contenido de proteína en la muestra. Se pueden encontrar valores intermedios de triptofano y lisina en la proteína en materiales con el gene de harinoso-2, o en algunas muestras con endospermo duro. Usando los métodos analíticos antes mencionados para evaluar y separar gran cantidad de muestras de maíz, es posible coordinar el trabajo del laboratorio con el de los fitomejoradores puesto que los informes del laboratorio deben ser utilizados por los fitogenistas como un medio para seleccionar el germoplasma deseable a fin de continuar el programa de mejoramiento.

Los resultados de los análisis deben ser informados oportunamente a los fitomejoradores. En la actualidad, estas técnicas se usan en gran escala dentro del programa de maíz del CIMMYT.

REFERENCIAS

1. Mertz, E. T., Bates, L. S., and Nelson O. E., Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science* 145:279-280. (1964).
2. A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 10th Ed. 744-745 (1965).
3. Hernández H. and Bates L. S., Modified method for rapid tryptophan analysis of maize. *Research Bull. No. 13, CIMMYT*, (1969).

Traducción: Francisco J. Rodríguez Boreo
Edición: Gregorio Martínez Valdés.



CENTRO INTERNACIONAL DE MEJORAMIENTO DE
MAIZ Y TRIGO

INTERNATIONAL MAIZE AND WHEAT IMPROVEMENT
CENTER

londres 40, méxico 6, d. f., méxico.

