

MATERIAL Y METODOS

METODO MICROBIOLOGICO

El empleo de microorganismos para el ensayo de aminoácidos surgió como una consecuencia lógica después de su uso en la determinación de vitaminas. Wood et al., (20) fueron los primeros en sugerir que los microorganismos podrían ser usados para la determinación cuantitativa de aminoácidos. Sin embargo en ese tiempo (1940), no se tenía el conocimiento necesario de los requerimientos para el crecimiento de microorganismos adecuados para dicho ensayo. Usando 17 aminoácidos en lugar del hidrolizado ácido de caseína y un eluado de jugo de tomate como fuente de factores de crecimiento, Kuiken et al., (15). reportaron que 9 aminoácidos fueron esenciales para el crecimiento de Lactobacillus arabinosus 17-5, y que los aminoácidos: leucina, insoleucina y valina, podrían ser determinados cuantitativamente por técnicas microbiológicas similares a las previamente utilizadas para el ensayo de vitaminas. Esto se ha extendido a la determinación de 18 aminoácidos, con un buen grado de precisión, exactitud y especificidad.

Los métodos microbiológicos para determinar aminoácidos se basan en la observación de que algunos microorganismos con características bien definidas,

pueden multiplicarse y producir ciertos productos metabólicos únicamente en presencia de determinados aminoácidos cuando se cultivan en un medio nutritivo-óptimo.

En el presente trabajo las muestras a analizar fueron: harinolina (harina de semilla de algodón), harina de soya y harina de pescado comerciales, las cuales antes de ser ensayadas por este método, se sometieron a hidrólisis ácida previa, con HCl, 6N a temperatura de 121° C durante 12 horas, el término de las cuales el hidrolizado se neutralizó a pH 7 utilizando NaOH 6N (sol. acuosa).

El aminoácido a determinar fue lisina y el microorganismo usado para ello Leuconostoc mesenteroides ATCC 8042, el cual fué conservado en Micro Assay Culture Agar (DIFCO), (4), y resembrado en Micro Inoculum Broth (DIFCO) (4), para la elaboración del inóculo. El medio basal empleado para el ensayo fué Lysina Assay Medium (DIFCO) (4).

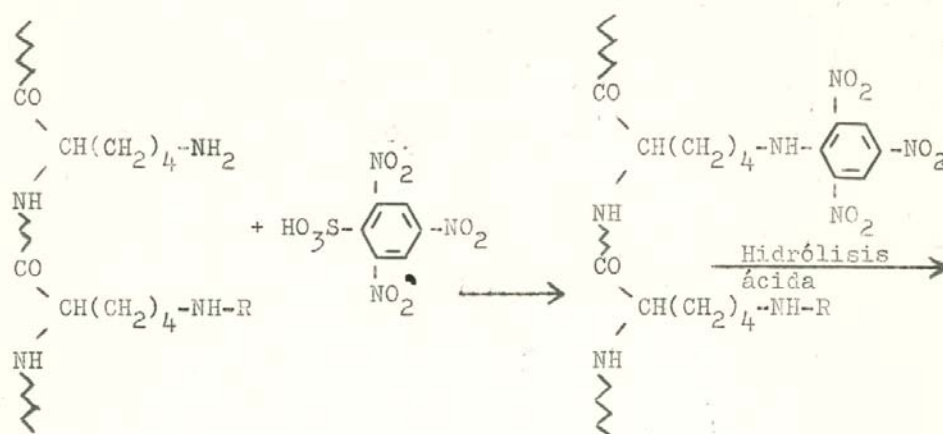
El método que se siguió fué el siguiente: se preparó medio basal conteniendo todos los constituyentes específicos y estimulantes requeridos por el microorganismo, con excepción del aminoácido que se ensayó. Alicuotas de las soluciones problemas, que se encon-

traban dentro del rango de ensaye, se colocaron en -- tubos de ensayo así como cantidades conocidas del es- tandard por triplicado, completando a un volumen de - terminado con agua, adicionándose enseguida el medio- basal. Posteriormente se esterilizaron durante 10 mi- nutos a 15 libras de presión, los tubos de la curva - estandard y los de las muestras,. Después se llevó - a cabo la inoculación según el método propuesto por - Kavanagh (13), incubándose enseguida las muestras pro- blemas y la curva estandard por un período de 72 horas de acuerdo con las recomendaciones de Barton-Wright (2), para el ensayo microbiológico de Lisina. la can- tidad del aminoácido presente en las muestras se cal- culó a partir de la curva estandard .

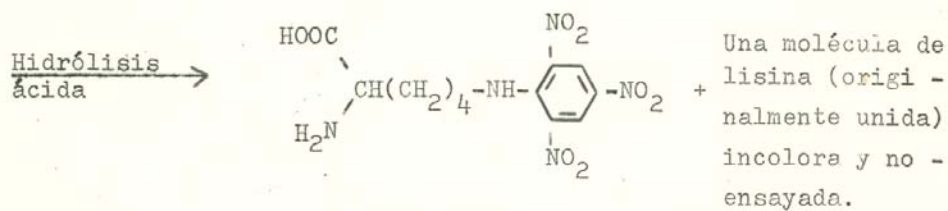
METODO QUIMICO.

Experimentos con proteínas purificadas sugieren- que la disponibilidad reducida de la lisina se debe - en gran parte a su grupo E-NH₂ combinado con otros - grupos activos, ya que bajo condiciones de calor hú e- medo forman una unión que resiste la hidrólisis enzi- mática (6). Esta hipótesis de que solo las moléculas- de lisina con grupos E-NH₂ reactivos son nutricionalmen- te aprovechables, es la base de un procedimiento desa- rrollado recientemente, en el cual el ácido 2,4,6, tri

nitro -bencén-sulfónico se hace reaccionar con grupos -NH₂ libres en la proteína intacta y la trinitro fenil lisina liberada por subsecuente hidrólisis ácida se mide colorimétricamente (16). El principio se ilustra a continuación:



Una molécula colorida de:



ε - TNF- lisina

BIOENSAYO

La multitud de caminos metabólicos involucrados en la utilización biológica de aminoácidos, hace muy difícil una evaluación de disponibilidad en términos absolutos. La función biológica más importante de los aminoácidos esenciales es, en términos cuantitativos, la síntesis proteica. Por consiguiente es claro que el bioensayo de un aminoácido esencial es mejor llevado a cabo en términos de la habilidad de promover la síntesis proteica y la evaluación de ganancia de nitrógeno corporal (ó retención), es la medida más apropiada de síntesis. Sin embargo hay dificultades técnicas en la determinación de nitrógeno total corporal y balance nitrogenado, que reducen la utilidad potencial de tal procedimiento.

En los animales en crecimiento la acumulación de nitrógeno corporal está generalmente correlacionada con la ganancia en peso. Desviaciones a tal correlación se encuentran cuando hay un cambio en la composición corporal; por ejemplo en el contenido de grasa. Sin embargo esto no invalida el criterio de ganancia en peso como un índice indirecto de disponibilidad de aminoácidos, es decir, como un procedimiento estandar que mida la potencia de un material prueba, con

respecto a un patrón establecido (10).

Para llevar a cabo el bioensayo seleccionaron pollos de 6 días de edad, que habían sido alimentados con una dieta a base de soya-maíz antes de ser usados en este estudio. Al séptimo día se les suspendió el alimento durante la noche y al siguiente día, después de ser pesados individualmente, se distribuyeron de acuerdo con su peso, en 8 tratamientos, 5 de los cuales fueron asignados para establecer la curva de respuesta tipo y los 3 restantes a cada uno de los alimentos a probar. Los pollos así distribuidos fueron alimentados con las dietas experimentales por un período de 7 días. El alimento fué suministrado ad libitum y la ganancia en peso fué anotada diariamente así como el consumo del alimento.

Como ya se mencionó fué necesario obtener una curva de respuesta tipo, llevándose a cabo la incorporación del aminoácido prueba (lisina), en 5 niveles de la dieta basal dada a conocer por Dean y Scott (3) y que se muestra a continuación.

Dieta basal de aminoácidos cristalinos

Almidón de maíz	Var.
Mezcla de aminoácidos	Var.
Aceite de Maíz	15.00
Mezcla de Sales	5.37
Celulosa	3.00
NaHCO ₃	1.00
Cloruro de Colina	0.20
Vitaminas (2g/Kg) (14)	+
	<u>100.00</u>

Harina de soya, harina de semilla de algodón y harina de pescado comerciales fueron las fuentes de proteína a ensayas, las cuales se adicionaron a la dieta basal en proporción de 5% de su contenido de proteína, evitando el aminoácido prueba. Estas adiciones fueron hechas a expensas del almidón de maíz. Sin embargo fué necesario adicionar una pequeña cantidad de lisina en forma cristalina a la dieta, a fin de llevar el crecimiento del pollo al segmento lineal de la curva de respuesta.

El contenido total de lisina de las fuentes de proteína se estableció por cromatografía, llevándose a cabo estas determinaciones en la Universidad de Arizona. La cuantificación de proteínas se hizo según el método Kjeldahl (1).

Los cálculos se basaron en el conocimiento de la composición química así como en el consumo de la proteína intacta durante los 7 días de la prueba. La can

tividad del aminoácido consumido, que se expresó como --
crecimiento del pollo, fué determinado sustituyendo --
el aumento en peso en la recta obtenida.

La disponibilidad del aminoácido proporcionado --
por la proteína intacta se calculó suponiendo que el --
aminoácido suplementado fué utilizado 100% (18).