

CALIDAD NUTRICIONAL DE LAS PROTEINAS DE SOYA Y CASEINA, DAÑADAS TERMICAMENTE, Y DETERMINADA *in vivo* POR UN METODO ENZIMATICO¹

N. Millán², O. Brito³ y P. Hevia⁴

Departamento de Tecnología de Procesos Biológicos y Bioquímicos,
Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela

RESUMEN

Se estudió la posibilidad de usar la actividad de la enzima nucleósido fosforilasa (EC. 2. 4. 2. 1), proveniente del hígado del pollo, como un indicador de la calidad de la proteína dietaria. Para ello se indujo un deterioro a la caseína y a la proteína de soya mediante un tratamiento térmico en presencia de glucosa (121°C), de duración variable (de 10 a 40 minutos). Este tratamiento indujo pérdidas en la disponibilidad de lisina y de la calidad proteínica de la soya y de la caseína, la que se midió en pollos a través de ensayos de crecimiento (PER, NPR) o de ganancia de nitrógeno (NPU, NR).

Los resultados de estos ensayos se compararon luego con la actividad hepática de la nucleósido fosforilasa en los mismos animales. Los ensayos de ganancia de nitrógeno fueron más sensibles que los de crecimiento en detectar variaciones de calidad proteínica inducidas por el calor, e indicaron que un tratamiento térmico corto mejora la calidad de la caseína, mientras que tratamientos más prolongados la reducen, tanto en el caso de la caseína, como de la soya. La actividad de la nucleósido fosforilasa hepática fue tan sensible como los métodos de retención de nitrógeno en detectar cambios en la calidad de la proteína dietaria, y muestra un buen potencial como indicador de la calidad proteínica.

Manuscrito modificado recibido: 4-10-84.

- 1 Esta investigación fue financiada en parte por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT), mediante la Subvención SI-1242, por el Instituto de Investigación y Desarrollo Industrial (INVEDI), y por el Decanato de Investigaciones de la Universidad Simón Bolívar.
- 2 Presentado como parte de los requisitos para optar a una Maestría en Ciencia de los Alimentos, con opción Nutrición, por la Dra. Brito, Profesora Asistente del Departamento de Biología Celular de la Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.
- 3 Profesor Agregado del Departamento de Tecnología de Procesos Biológicos y Bioquímicos, Universidad Simón Bolívar.
- 4 Profesor Asociado del Departamento en referencia, Universidad Simón Bolívar, Apartado 80659, Caracas 1080-A, Venezuela, a quien debe dirigirse toda correspondencia referente a este artículo.

INTRODUCCION

Existen numerosos métodos biológicos para determinar la calidad proteínica de los alimentos. Tradicionalmente, éstos incluyen procedimientos basados en el crecimiento de animales experimentales, como son el índice de eficiencia proteínica, PER (1), la relación proteínica neta, NPR (2), el valor proteínico relativo, RPV (3) y otros que se basan en la ganancia de nitrógeno, tales como el valor biológico, BV (4), y la utilización proteínica neta, NPU (5). Sin embargo, estos métodos son inadecuados, principalmente debido a que la obtención de resultados requiere tiempos de experimentación largos (de 10 a 28 días), el tamaño de la muestra problema es grande y su costo es elevado.

Por estas razones, el presente trabajo tuvo como objetivo investigar la factibilidad de aplicar un método para determinar la calidad proteínica, que se base en la determinación de la actividad de la enzima púrica nucleósido fosforilasa proveniente del hígado, en pollos.

Hevia y Clifford (6, 7) en estudios previos establecieron mediante una serie de experimentos, que cuando se incrementaba el consumo de un aislado de soya en pollos, aumentaba la excreción de ácido úrico, así como las actividades de las enzimas nucleósido fosforilasa, xantina dehidrogenasa, y adenilato succinato sintetasa. Además, en esos experimentos la excreción de ácido úrico y la actividad enzimática correlacionó alta e inversamente con el índice de eficiencia proteínica (PER) de las mismas dietas.

Por estas razones, en el trabajo objeto de este artículo se estudió la respuesta de la nucleósido fosforilasa a cambios en la calidad de la proteína dietaria y su correlación con indicadores tradicionales de calidad proteínica como el PER, NPR, NPU y la retención de nitrógeno.

La novedad de este trabajo con respecto a los estudios ya citados (6, 7) es que la eficiencia de la proteína dietaria no se modificó con el simple aumento de la concentración de la proteína en la dieta, sino que se usaron proteínas de diferentes calidad incorporadas a la dieta a una misma concentración. Así, el factor determinante de la inducción enzimática fue la calidad proteínica y no su cantidad en la dieta como en los estudios citados.

Las proteínas utilizadas fueron la caseína o un aislado de soya, cuya calidad se modificó por medio de un tratamiento térmico, realizado en presencia de glucosa. Este tratamiento induce la producción de complejos carbohidrato-aminoácidos, conocidos como compuestos de Maillard (8). Los aminoácidos que participan en la formación de estos complejos pierden su disponibilidad nutritiva y por lo tanto la calidad de la proteína así tratada disminuye (9). Uno de los aminoácidos más afectados por este proceso es la lisina (10). Es por ello que la pérdida en la disponibilidad de este aminoácido se usa normalmente para detectar el deterioro térmico de los alimentos proteínicos (9, 10).

Por último, la calidad de la proteína de soya y la caseína, con y sin tratamiento térmico de severidad variable, se determinó en pollos, aplicando los métodos de PER, NPR, NPU y de retención de nitrógeno. Los resultados de estos ensayos se compararon luego con la actividad de la nucleósido fosforilasa en los mismos ejemplares.

METODOS

Tratamiento Térmico

Con el fin de reducir la calidad proteínica de la caseína, se prepararon mezclas de caseína y glucosa (1:1) las que se trataron térmicamente en vasos de precipitar (bloques de 10.5 cm diámetro x 14.0 cm de altura) a 121°C durante 0, 10, 20 y 40 minutos. Las mezclas molidas y tamizadas se incorporaron a la dieta basal tal como se indica en la Tabla 1.

TABLA 1
COMPOSICION DE LA DIETA BASAL

	o/o
Proteína ¹ :glucosa (1:1)	39.7
Almidón de maíz	47
Aceite de maíz	4
Minerales ²	3.5
Vitaminas ²	2
Ca ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	3.5
Metionina	0.3

- 1 La proteína fue caseína o soya (ICN - Pharmaceuticals) con 84.9 y 82.7% de proteína, respectivamente.
- 2 Las mezclas de vitaminas y minerales se describen en la referencia (12).

A estas mezclas se les determinó la calidad proteínica, usando pollos, en el Experimento 1. Como los resultados de este ensayo indicaron que el tratamiento térmico no había producido un deterioro de la calidad proteínica tan severo como se esperaba, se calentaron mezclas de caseína:glucosa (1:1) y de soya:glucosa (1:1) en capas de 24.5 cm de ancho x 2.5 cm de alto y 30 cm de largo en bandejas pyrex, a 121°C por 0, 10, 20 y 40 minutos. Luego, las mezclas se homogeneizaron cada 10 min durante el calentamiento para producir un deterioro uniforme en toda la mezcla. Las mezclas molidas y tamizadas se incorporaron a la dieta que se detalla en la Tabla 1, usándose estas mezclas en el Experimento 2.

Experimento 1

Se acondicionaron con pollarina, durante una semana, 28 pollos macho (Warren) de 10 días, adquiridos en una incubadora local. Luego se distribuyeron al azar en jaulas individuales provistas de bombillos de 100 vatios y se separaron en cuatro grupos de siete pollos cada uno, suministrándose a cada grupo una de las mezclas calentadas ya descritas, incorporadas a la dieta basal (Tabla 1).

Los pollos tuvieron libre acceso al agua y las dietas también las consu-

mieron *ad libitum*, registrándose diariamente el consumo de alimento, y el crecimiento cada tres días, para las determinaciones del índice de eficiencia proteínica (PER).

Experimento 2

En este caso se usaron 63 pollos macho (Warren), de ocho días de edad, adquiridos igualmente en una incubadora local, y acondicionándose por una semana con pollarina. Durante este período se vacunaron con virus atenuado de New Castle y se les suministró terramicina (1 g/lit) en el agua de bebida, para evitar posibles infecciones. Luego se distribuyeron al azar en nueve grupos de siete pollos cada uno, los que se alojaron en jaulas provistas con bombillos de 100 vatios. A cada grupo se le asignó una de las ocho mezclas calentadas, ya descritas. Se incluyó, además, un grupo que consumió una dieta libre de proteína.

A los pollos se les suministró alimento y agua *ad libitum* por el término de 14 días, registrándose diariamente el consumo de alimento por grupo, y el incremento de peso individual cada tres días. Al final del experimento los pollos fueron sacrificados por dislocación cervical; se extrajeron los hígados, y se congelaron a -20°C .

El carcás con plumas se dividió longitudinalmente en dos secciones aproximadamente iguales, y en una de éstas se determinó nitrógeno corporal para establecer el nitrógeno retenido. Se determinó la actividad de la nucleósido fosforilasa en los hígados, aproximadamente 30 días después de colectados.

En estos pollos se determinaron los siguientes indicadores de calidad: PER, NPR, NPU, y nitrógeno retenido.

Técnicas Analíticas

El contenido de lisina disponible de las mezclas caseína:glucosa o soya:glucosa, con y sin calentamiento, se determinó esencialmente en la forma descrita por Kakade y Liener (11). La concentración de nitrógeno corporal fue establecida usando una modificación del método de Shahinian y Reinhold (12), propuesto para determinar nitrógeno en suero. Para este propósito las muestras corporales se predigirieron en 50 ml de H_2SO_4 concentrado, y se calentaron en matraces Kjeldahl hasta que el tejido se disolvió formándose una suspensión homogénea (aproximadamente 10 minutos).

La suspensión se llevó a 500 ml con agua, y se digirió una alícuota (150 μl) con 1 ml de la mezcla de digestión propuesta en la referencia original en tubos de ensayo (150 x 16 mm) dispuestos en bloques de aluminio, calentados en una plancha a 450°C . El amoníaco formado se determinó con la reacción de indofenol, esencialmente como lo describe la referencia original.

La nucleósido fosforilasa se midió esencialmente en un homogeneizado de hígado, según el procedimiento de Hevia y Clifford (7). Dado que la actividad de esta enzima depende del consumo de nitrógeno (7), —y en vista de que, a pesar de ser la concentración de proteína en la dieta, la misma, en todos los casos se detectaron diferencias en cuanto a consumo— la actividad de la enzima se dividió por el nitrógeno consumido. La

actividad de la nucleósido fosforilasa se definió como μ moles de ácido úrico formado por gramo de hígado, por hora.

Todos los resultados se analizaron estadísticamente usando el análisis de varianza (13), y las medias se compararon mediante el método de los rangos múltiples de Duncan (14). El nivel de confiabilidad para significancia estadística se fijó en ambos casos en 95%.

RESULTADOS Y DISCUSION

Experimento 1

El propósito de este experimento fue establecer las condiciones en que debían calentarse mezclas de caseína:glucosa (1:1) para inducir reducciones crecientes en sus niveles de lisina disponible y en su calidad proteínica, medida en pollos por el método del PER. Los resultados revelaron que el calentamiento de estas mezclas a 121°C durante 10 minutos, no indujo una reducción detectable en lisina disponible, y que al aumentar este tiempo a 20 y 40 minutos, las pérdidas en la disponibilidad de este aminoácido fueron de sólo 7.6 y 15.4%, respectivamente.

En la Tabla 2 se detalla el peso inicial, el consumo de alimento y la ganancia ponderal de los pollos alimentados con dietas elaboradas con estas mezclas calentadas. Se muestran también los resultados de eficiencia proteínica (PER) de la caseína presente en estas mezclas después de calentar por el término de 0, 10, 20 y 40 minutos. De acuerdo con los hallazgos de disponibilidad de lisina ya descritos, los datos indican que el aumento del tiempo de calentamiento de 10 a 40 minutos no redujo ni el crecimiento ni el consumo de alimento de los pollos alimentados con estas mezclas, ni el PER de la caseína en las mismas. Sin embargo, los datos en la Tabla muestran claramente que los pollos que consumieron las dietas calentadas, comieron y crecieron más que los que recibieron la dieta control, sin calentar. Esto sugiere que, en el caso de estos pollos, la calidad de la caseína mejoró con el calentamiento. De acuerdo con este hallazgo, los valores de PER de la caseína calentada tanto durante 10, 20 ó 40 minutos, fue mayor que los de la caseína sin calentar.

Estas diferencias en PER, sin embargo, no fueron estadísticamente significativas. Es posible que esta falta de significancia estadística haya resultado de una magnificación de los errores asociados con las mediciones de crecimiento y con el consumo de proteínas, ya que el PER es el cociente entre estos dos factores. Otra posibilidad es que el PER no haya sido lo suficientemente sensible como para detectar pequeños cambios en la calidad de la caseína, asociados con el calentamiento. Como se verá más adelante, los resultados del Experimento 2 apoyan esta posibilidad.

Una posible explicación de este sorpresivo mejoramiento de la calidad de la caseína, asociado con un calentamiento moderado, se relaciona con la observación de que un exceso de lisina en dietas suministradas a pollos, afecta negativamente tanto el consumo de alimentos como el crecimiento (15). Este efecto se debe al antagonismo existente entre los aminoácidos lisina y arginina. Así, en dietas que contienen un exceso de lisina, aumentan los requerimientos de arginina del pollo que, por ser una especie uricotelica, no sintetiza este aminoácido.

TABLA 2

PESO INICIAL, CONSUMO, GANANCIA DE PESO E INDICE DE EFICIENCIA PROTEINICA (PER), EN POLLOS¹ QUE CONSUMIERON MEZCLAS DE CASEINA:GLUCOSA (1:1) CALENTADAS DURANTE 0, 10, 20 ó 40 MINUTOS A 121°C
(Experimento 1)

Tiempo de calentamiento (minutos)	0	10	20	40
Peso inicial (g)	105.0± 7.3 ^a	109.5± 5.0 ^a	110.1± 6.9 ^a	109.4± 1 ^a
Consumo (g/15 días)	273.8±21.8 ^a	366.5±16.5 ^b	327.1±40.6 ^b	354.1±33.8 ^b
Ganancia de peso (g/15 días)	75.5±15.6 ^a	124.2±15.3 ^b	110.2±27.2 ^b	123.7± 26.0 ^b
PER	1.4± 0.3 ^a	1.8±0.16 ^a	1.7± 2 ^a	1.8± 0.2 ^a

1 Los pollos (Warren) consumieron durante 15 días las dietas que contenían las mezclas de caseína:glucosa (1:1) calentadas por 0, 10, 20 ó 40 minutos.

Los valores en la Tabla representan las medias, y el error estándar de siete pollos. Las medias en la misma línea horizontal, con letras diferentes, son estadísticamente diferentes al 95% de confiabilidad, de acuerdo con el método de rangos múltiples de Duncan.

De acuerdo con esta observación en cuanto a los requerimientos del pollo, la caseína es deficiente en arginina y contiene un exceso de lisina. Además, otros estudios con pollos alimentados con caseína no suplementada con arginina, han revelado cierta depresión en la velocidad del crecimiento (15, 16). Así, en base a estas observaciones, es posible que el aumento de consumo de alimento y crecimiento, detectados en los pollos que consumieron las dietas calentadas, se deba a que el calentamiento —al reducir los niveles de lisina disponible— mejore el aprovechamiento de la arginina, aliviando así el antagonismo entre estos dos aminoácidos.

Los datos en cuanto a pérdida de lisina de las dietas usadas en este experimento inicial, sugirieron, además, la necesidad de intensificar las condiciones de calentamiento, a modo de obtener mezclas de proteína: glucosa con un menor contenido de lisina disponible que el de estas dietas. Las proteínas en cuestión, así degradadas, se usarían entonces en estudios de calidad, a realizar en pollos, aplicando el método propuesto en el presente trabajo, en el que se usa la inducción de la enzima púrica nucleósido fosforilasa como un indicador de la calidad proteínica.

Por esta razón, en el experimento siguiente las mezclas de proteína: glucosa se calentaron en capas delgadas, tal como se describe en la Sección de "Métodos". Se consideró importante también determinar la lisina disponible directamente en la mezcla proteína:glucosa y no en las dietas, debido a que el alto contenido de almidón de las últimas interfiere con la determinación (11).

Experimento 2

Este segundo experimento tuvo como objetivo comparar el valor predictivo de la nucleósido fosforilasa hepática con el de los ensayos tradicionales de determinación de calidad proteínica (PER, NPR, NPU y retención de nitrógeno) en establecer el deterioro térmico de dietas elaboradas a base de soya: glucosa, y de caseína: glucosa (1:1).

Se incluyó la soya en este experimento con el fin de profundizar conocimientos relativos al efecto benéfico que el calentamiento ejerce sobre la calidad de la caseína, observado en el experimento anterior. En el Experimento 1 se concluyó que éste resulta de un aumento en la relación arginina/lisina de esta proteína, debido a que el calentamiento reduce la disponibilidad de la lisina que contiene.

En el caso de la proteína de soya, donde la relación entre estos aminoácidos es más del doble que el de la caseína (arg/lis de soya = 2.1, arg/lis de caseína = 0.87) (17), este mejoramiento asociado con el calentamiento moderado no debería producirse.

Según se observa en la Figura 1, con las modificaciones en el espesor de la película de las mezclas glucosa:proteína y el mezclamiento esporádico de las muestras durante el calentamiento, el tratamiento térmico fue efectivo en cuanto a reducir el contenido de lisina disponible, tanto en la

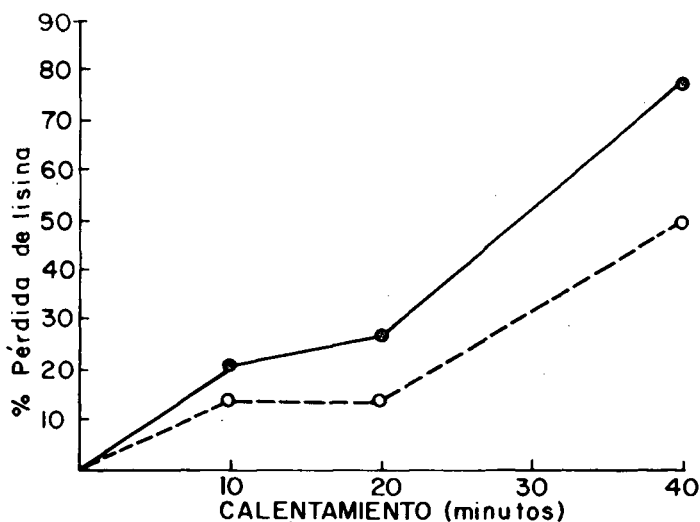


FIGURA 1

Pérdidas de lisina disponible, asociadas con el calentamiento de mezclas de caseína: glucosa (●—●) o soya: glucosa (○—○) (1:1) en el Experimento 2. Las mezclas se calentaron en autoclave a 121°C durante 0, 10, 20 ó 40 minutos, en bandejas de 30 cm de largo, 24.5 cm de ancho, y 2.5 cm de altura. Luego se homogeneizaron cada 10 minutos

soya como en la caseína. Así, aplicado en esta forma, el calentamiento más severo (40 min) indujo pérdidas de lisina disponible que en la caseína alcanzaron casi 80^o/o. Estas pérdidas, usando la modalidad descrita en el Experimento 1, sólo alcanzaron el valor de 15.4^o/o. No obstante, este deterioro se produjo casi exclusivamente después de los primeros 20 min de calentamiento, ya que antes la caseína perdió sólo 28^o/o, y la soya 12^o/o de la lisina disponible original, tal y como muestra la Figura 1. La mayor susceptibilidad de la lisina de la caseína que la de la soya en perder su disponibilidad en respuesta al tratamiento térmico se observó consistentemente en todos los tiempos de calentamiento.

De acuerdo con los resultados descritos en la Tabla 3, se aprecia que el tratamiento térmico de las mezclas de caseína:glucosa o de soya:glucosa menores de 20 min no afectaron el crecimiento ni el consumo de alimento de los pollos. Al aplicar tratamientos de 40 min, sin embargo, se produjo un descenso en el consumo y crecimiento, que fue substancial en el caso de la proteína de soya, y dramática en el caso de la caseína.

El efecto del calentamiento sobre la calidad proteínica de la caseína y la soya, medida por medio de las técnicas del PER (A), NPR, (B), NPU (C) y la retención de nitrógeno (D), se observa en la Figura 2. De su examen se desprende que los dos métodos usados para determinar la calidad proteínica, basados en las variaciones de crecimiento (PER y NPR), indicaron que ni la calidad de la soya ni la de la caseína varió con un calentamiento de 0 a 20 minutos. Esta calidad se redujo sólo con el calentamiento de 40 min, siendo la reducción más severa para la caseína que para la soya.

Estos resultados, que se basan en ensayos de crecimiento, parecen contradecir las conclusiones del experimento anterior en el que se postuló un efecto benéfico del tratamiento térmico moderado, en la calidad de la caseína. La Figura 2 (C) y (D), que ilustra gráficamente las variaciones en la calidad proteínica de la caseína y de la soya, asociadas con el calentamiento pero determinadas con métodos que miden la ganancia de nitrógeno en vez del crecimiento, señalan que esto no fue así. Según las gráficas, la utilización proteínica neta (NPU) de la caseína calentada por 10 min, fue el doble de la caseína exenta de calentamiento. Al mismo tiempo, el calentamiento durante 10 y 20 min aumentó la retención de nitrógeno asociada con el consumo de caseína en cuatro y dos y media veces, respectivamente.

En contraste con estos resultados, y apoyando la hipótesis aquí planteada, la calidad de la proteína de soya no mejoró con el tratamiento térmico, independientemente del método usado para medirla.

La Figura 3 (A, B, C y D) —que muestra la forma en que la reducción de lisina disponible (inducida por el calor) afectó la calidad proteínica de la caseína y la soya— ilustra aún más claramente cómo la calidad de estas dos proteínas respondió de manera diferente a los cambios de disponibilidad de dicho aminoácido. Así, tanto el PER, como la NPR y NPU, al igual que la retención de nitrógeno de la soya, disminuyeron al aumentar las pérdidas de lisina disponible. Esta reducción no fue substancial, con pérdidas de lisina disponible de hasta 25^o/o, pero sí fue significativa cuando esa pérdida alcanzó 50^o/o. En contraste, la NPU y la retención de nitrógeno medidas en los pollos que consumieron caseína, aumentaron considerablemente, con una reducción en la disponibilidad de la lisina de 20^o/o, aproximadamente. Esta diferencia en respuesta al tratamiento

TABLA 3

PESO INICIAL, CONSUMO Y GANANCIA DE PESO EN POLLOS¹ QUE CONSUMIERON MEZCLAS DE CASEÍNA:GLUCOSA (1:1) Y SOYA:GLUCOSA (1:1), CALENTADAS DURANTE 0, 10, 20 ó 40 MINUTOS A 121°C

(Experimento 2)

Proteína	Soya				Caseína			
	0	10	20	40	0	10	20	40
Tiempo de calentamiento (min)								
Peso inicial (g)	103.2 ^a ± 5.0	99.1 ^a ± 3.5	97.3 ^a ± 6.7	101.0 ^a ± 4.3	100.6 ^a ± 6.9	96.8 ^a ± 7.3	98.8 ^a ± 8.0	101.0 ^a ± 5.7
Ganancia de peso (g/15 días)	58.7 ^a ± 6.4	64.7 ^a ± 5.5	59.0 ^a ± 2.5	8.6 ^b ± 0.9	54.8 ^a ± 10.1	48.0 ^a ± 5.3	55.7 ^a ± 6.8	18.6 ^c ± 1.3
Consumo (g/15 días)	252.7	270.4	266.6	194.7	244.9	224.8	234.9	145.6

1 Los pollos (Warren), consumieron las dietas que contenían las mezclas de caseína:glucosa (1:1) o soya:glucosa (1:) durante 15 días.

Los valores en la Tabla representan las medias y el error estándar de siete pollos.

Las medias en la misma línea horizontal con letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de confiabilidad, de acuerdo con el método de rangos múltiples de Duncan.

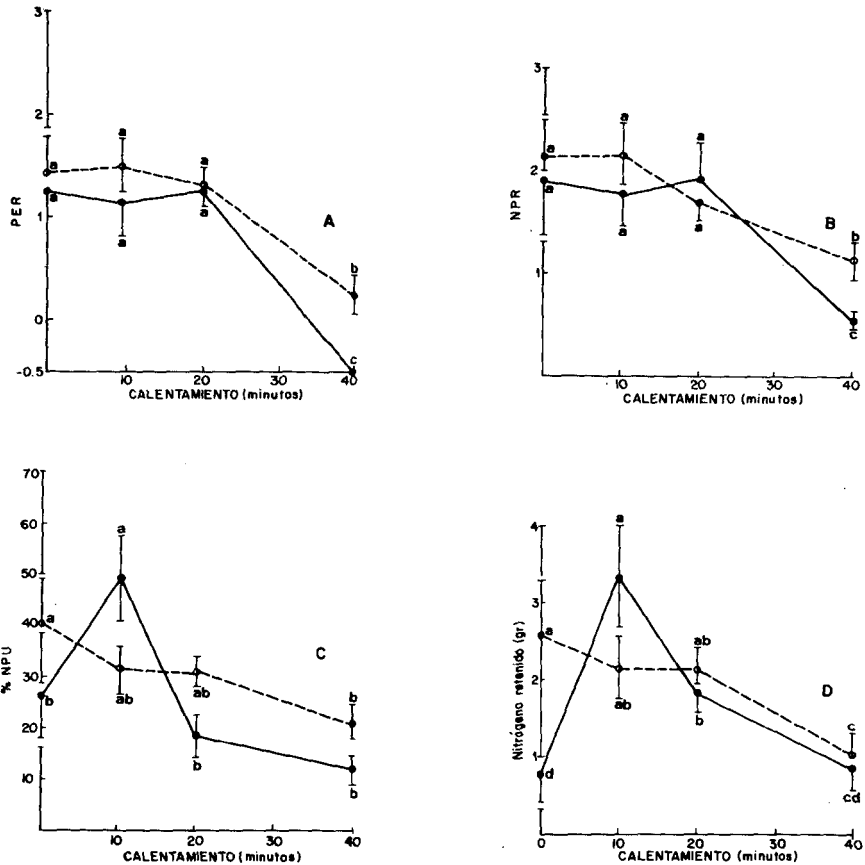


FIGURA 2

Efecto del tratamiento térmico en la calidad proteínica de mezclas caseína:glucosa (●—●)¹ y soya:glucosa (○--○), medida en pollos² por medio de los métodos de PER, NPR, NPU y de retención de nitrógeno (Experimento 2)

- 1 Los símbolos representan la media y el error estándar de siete pollos. Las medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de confiabilidad, de acuerdo al método de rangos múltiples de Duncan.
- 2 Los pollos (Warren), consumieron las dietas elaboradas en base a caseína:glucosa (1:1) o soya:glucosa (1:1), calentadas a 121°C durante 0, 10, 20 ó 40 minutos, por el término de 15 días.

térmico de dos proteínas con diferente cociente arginina/lisina, apoyan la hipótesis de que los pollos aprovecharon mejor la caseína calentada por tiempos cortos que la no calentada. Ello se debe a que al reducirse la dis-

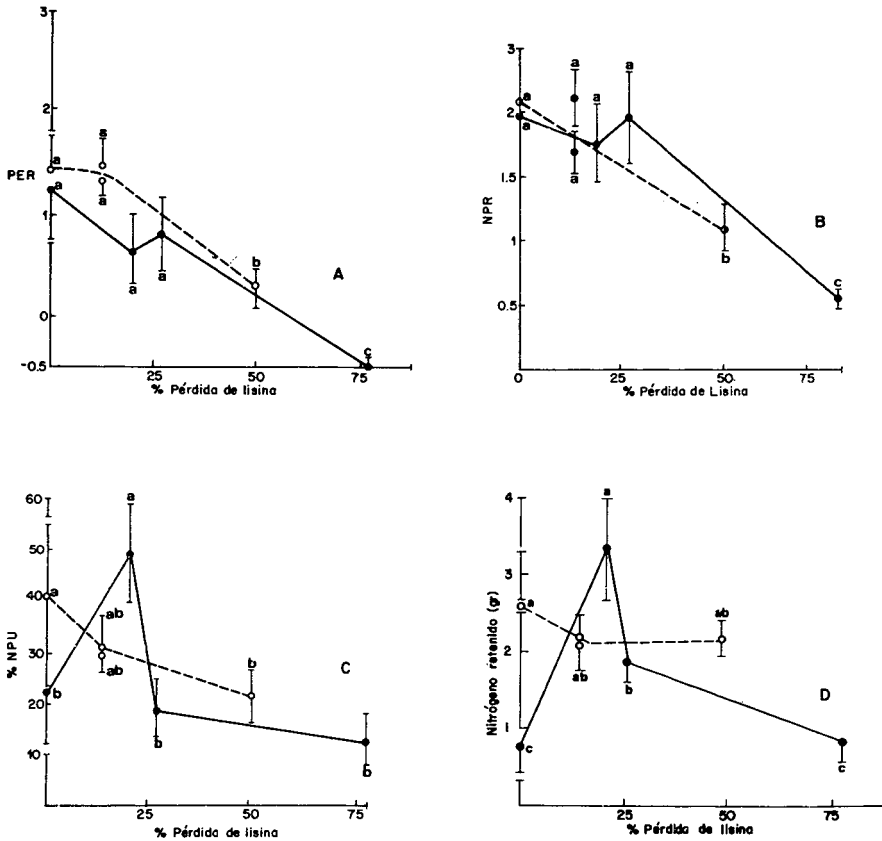


FIGURA 3

Relación entre las pérdidas de lisina ocasionadas por el calentamiento de mezclas caseína:glucosa (●—●)¹ o soya:glucosa (○--○) y la calidad proteínica de las mismas, medidas en pollos² por los métodos de PER, NPR, NPU y de retención de nitrógeno (Experimento 2)

- 1 Los símbolos representan el punto de corte de la media de la calidad proteínica medida en siete pollos, y la determinación de lisina disponible, realizada por triplicado en las mezclas de soya:glucosa, o de caseína:glucosa (1:1). El error graficado corresponde al error estándar de la determinación de calidad proteínica. Los símbolos con letras diferentes son estadísticamente diferentes al 95% de confiabilidad de acuerdo al método de rangos múltiples de Duncan.
- 2 Los pollos (Warren) consumieron las dietas en base a caseína:glucosa (1:1) o soya:glucosa (1:1), calentadas a 121°C durante 0, 10, 20 ó 40 min, por el término de 15 días.

ponibilidad de la lisina en la caseína su cociente arginina/lisina disponible aumentó, aliviando así el antagonismo entre estos dos aminoácidos.

Es importante destacar que Kratzer *et al.* (18) también informaron que al mezclar caseína calentada con caseína sin calentar, la eficiencia alimentaria de esta proteína aumentaba. Asimismo, dichos autores postularon que ello podría deberse a un alivio en el antagonismo lisina:arginina que afecta a los pollos, debido a la esencialidad de la arginina para esta especie.

El efecto del tratamiento térmico de las proteínas de soya y caseína sobre la actividad de la nucleósido fosforilasa hepática de los pollos que consumieron estas proteínas calentadas con glucosa, se aprecia en la Tabla 4. Según muestran los datos, la actividad de esta enzima no varió en los hígados de los pollos que consumieron la soya calentada de 0 a 20 minutos, pero aumentó 2.5 veces al prolongar el calentamiento a 40 minutos. Esta respuesta de la actividad de la nucleósido fosforilasa al calentamiento de la soya concuerda con las variaciones en su calidad proteínica que se ilustra en las Figuras 2 y 3, y con los resultados de Hevia y Clifford (13). Dichos investigadores indicaron que una reducción en el PER está asociada con un aumento en la actividad de esta enzima.

TABLA 4

ACTIVIDAD HEPATICA DE LA NUCLEOSIDO FOSFORILASA DEL HIGADO DE POLLOS¹ QUE CONSUMIERON DIETAS ELABORADAS A BASE DE CASEINA:GLUCOSA (1:1) Y SOYA:GLUCOSA (1:1) CALENTADAS, Y GANANCIA DE NITROGENO DE LOS QUE CONSUMIERON LAS DIETAS BASADAS EN CASEINA:GLUCOSA (1:1)

(Experimento 2)

	Tiempo de calentamiento (minutos)			
	0	10	20	40
<i>Actividad enzimática</i> ²				
Soya	89.5±36.5 ^a	65.2±26.6 ^a	88.2±19.2 ^a	221.1±26.5 ^b
Caseína	225.8±26.7 ^a	152.2±29.8 ^b	97.8±35.1 ^b	317.9± 4.4 ^a
<i>Ganancia de nitrógeno</i>				
(g/15 días)				
Caseína	0.77± 0.3 ^a	3.3±0.7 ^b	1.9±0.3 ^c	0.85±0.3 ^a

1 Los pollos (Warren), consumieron las dietas que contenían las mezclas de caseína: glucosa (1:1) o de soya:glucosa (1:1) durante 15 días. Los valores en la Tabla representan las medias y el error estándar de siete pollos. Las medias en la misma línea horizontal, con letras diferentes, son estadísticamente diferentes al 95% de confiabilidad, de acuerdo con el método de rangos múltiples de Duncan.

2 $\frac{\mu\text{moles de ácido úrico producido/g de hígado/hora}}{\text{g de N consumido/día}}$

Los datos en la Tabla 4 revelan, además, que la respuesta de la actividad hepática de la nucleósido fosforilasa al consumo de caseína calentada, fue diferente al observado con la soya. Así, en el hígado de los pollos que consumieron la caseína sin calentar, se detectó una actividad enzimática mucho más alta que en los pollos que consumieron la soya sin calentar. Esta actividad disminuyó con el aumento en el tiempo de calentamiento de la caseína hasta 20 minutos, y luego se incrementó substancialmente cuando el tratamiento alcanzó 40 minutos.

En la Tabla 4 se incluye, además, la retención de nitrógeno de estos mismos pollos. Puede observarse que cada vez que se detectó un aumento en la actividad enzimática de los pollos que consumieron caseína, éste coincidió con una reducción en la retención de nitrógeno. La utilización proteínica neta (NPU) determinada en estos mismos pollos (Figura 2 C), también muestra la misma tendencia.

Estos resultados indican, pues, que la actividad hepática de la nucleósido fosforilasa reflejó muy bien los cambios en la calidad proteínica de la soya asociados con el tratamiento térmico y medidos por cualquiera de los métodos utilizados en nuestro estudio. En el caso de la caseína, en cambio, la actividad de esta enzima correlacionó mejor con los métodos que miden calidad proteínica, pero que se basan en la ganancia de nitrógeno.

Los resultados de un estudio de correlación entre la calidad proteínica de la proteína de soya y la caseína medidos por los métodos tradicionales aplicados en nuestro caso, y la actividad hepática de la nucleósido fosforilasa que se muestra en la Tabla 5, ilustra mejor estas observaciones. Es aparente que en el caso de la soya tratada térmicamente, la correlación entre la actividad de la nucleósido fosforilasa y todos los métodos usados aquí para determinar la calidad proteínica fue alta, con un rango entre 0.70 y 0.98. En el caso de la caseína, en cambio, los métodos basados en el crecimiento como son el PER y la NPR, correlacionaron mal con la actividad enzimática ($r = -0.21$ y $r = -0.20$, respectivamente), pero los procedimientos basados en la ganancia de nitrógeno, la NPU y la retención de nitrógeno, por ejemplo, correlacionaron mucho mejor con un coeficiente de correlación de -0.63 y -0.82 , respectivamente.

Este comportamiento anómalo de la caseína concuerda con la observación que sólo los métodos basados en la ganancia de nitrógeno detectaron el mejoramiento de calidad de esta proteína, asociado con el tratamiento térmico. Así, como lo muestra la Figura 2 (C) y (D), la calidad de la caseína sin calentar, determinada por estos métodos, fue tan mala como la de la tratada térmicamente por 40 min, y aunque esto no lo detectaron ni el PER ni la NPR, sí lo detectó la enzima. Por esta razón, al eliminar del análisis de correlación los pollos que consumieron caseína, la correlación entre la calidad proteínica medida con los procedimientos basados en el crecimiento (PER, NPR) y la actividad enzimática, aumentó considerablemente (valores con asteriscos en la Tabla 5). Esto indica que la actividad de la nucleósido fosforilasa en pollos puede reflejar bien la calidad proteínica de la dieta que consumen.

Los resultados de estos experimentos destacan, por una parte, que el tratamiento térmico moderado de la caseína, puede mejorar la calidad proteínica, debido a un descenso en la disponibilidad de la lisina, y un alivio en el antagonismo lisina-arginina que afecta a los pollos. Por otra parte, los hallazgos indican que la actividad hepática de la nucleósido fos-

TABLA 5

COEFICIENTE DE CORRELACION LINEAL (r) ENTRE LA ACTIVIDAD HEPATICA DE LA NUCLEOSIDO FOSFORILASA¹ Y LOS INDICADORES DE CALIDAD PROTEINICA PER, NPR, NPU Y NITROGENO RETENIDO MEDIDOS EN LOS POLLOS² DEL EXPERIMENTO 2

Proteína	Indice de calidad proteínica	(r)
Soya	PER	-0.96
	NPR	-0.98
	NPU	-0.70
	Nitrógeno retenido (g)	-0.86
Caseína	PER	-0.21
	PER ³	-0.64*
	NPR	-0.20
	NPR ³	-0.95*
	NPU	-0.63
	Nitrógeno retenido (g)	-0.82

1 $\frac{\mu\text{moles de ácido úrico producido/g de hígado/hora}}{\text{g de N consumido/día}}$

2 Los pollos (Warren), consumieron las dietas que contenían las mezclas de caseína: glucosa (1:1) calentadas durante 0, 10, 20 ó 40 minutos, por el término de 15 días.

* Excluye tiempo 0 min, ya que ni el PER ni la NPR detectaron la mala calidad de la caseína sin calentar.

forilasa constituye, al parecer, un buen potencial para la predicción de la calidad de alimentos proteínicos. De estos experimentos se desprende, además, que aun cuando la caseína es la proteína que usualmente se usa como referencia para determinar la calidad proteínica en ratas, no es adecuada cuando el animal experimental utilizado es el pollo.

Debido a que el método enzimático aquí en estudio, reveló cierto potencial como un sistema alternativo a los métodos de uso tradicional para determinar la calidad proteínica es conveniente continuar evaluándolo. En base a la principal crítica que afecta a los métodos tradicionales, un área que es esencial explorar en relación al método enzimático es establecer si los resultados pueden obtenerse en tiempos más cortos que los utilizados en el trabajo aquí comentado.

SUMMARY

NUTRITIONAL QUALITY OF SOY AND CASEIN PROTEINS, THERMICALLY DAMAGED, AND DETERMINED BY AN *in vivo* ENZYMIC METHOD

In this study, the potential of the hepatic activity of the enzyme nucleoside

phosphorylase (E. C. 2.4.2.1) as an indicator of dietary protein quality was tested in chickens. For this purpose, a thermal damage of increasing severity was induced on the proteins of casein and soy by heating them in an autoclave (121°C) for 10 to 40 minutes in the presence of glucose. These treatments resulted in variable losses of available lysine, measured chemically, and protein quality, measured by growth assays (PER and NPR) or assays based on nitrogen gained (NPU and nitrogen retained) with chickens. These measurements were then compared with the hepatic activity of the nucleoside phosphorylase measured in the same chicks. The data revealed that the NPU and nitrogen retained procedures were more sensitive than PER or NPR in detecting changes in the protein quality associated with a heat treatment. Moreover, NPU, nitrogen retained and the activity of nucleoside phosphorylase showed that a mild heat treatment of casein, improved the quality of this protein. More prolonged heat treatments, however, caused a reduction in the quality of soy or casein protein as determined by all the methods for measuring protein quality used here, including the enzymatic method. The high correlation coefficients found in this study between the enzymatic method and those based on nitrogen gain or growth, indicate that this method may have a potential as a predictor of the quality of dietary protein.

BIBLIOGRAFIA

1. Osborne, T. B., L. B. Mendel & E. L. Ferry. A method of expressing numerically the growth value of proteins. *J. Biol. Chem.*, 37:223-229, 1919.
2. Bender, A. E. & D. S. Miller. A new brief method of estimating net protein value. *Biochem. J.*, 53:vii, 1953.
3. Samonds, K. W. & D. M. Hegsted. *Evaluation of Proteins for Humans*. C. E. Bodwell (Ed.). Westport, Conn., The Avi Publishing Co., 1975, p. 68-80.
4. Mitchell, H. H. A method of determining the biological value of protein. *J. Biol. Chem.*, 58:873-922, 1924.
5. Bender, A. E. & D. H. Doell. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. *Brit. J. Nutr.*, 11:138, 1957.
6. Hevia, P. & A. J. Clifford. Protein intake, uric acid metabolism and protein efficiency ratio in growing chicks. *J. Nutr.*, 107:959-964, 1977.
7. Hevia, P. & A. J. Clifford. Chicken hepatic purine enzyme activities in relation to the quality of dietary protein. *Nutr. Repts. Internat.*, 6:825-830, 1977.
8. Maillard, L. C. Action des acides aminés sur les sucres. Formation des melanoïdines par voie methodologique. *C. R. Acad. Sci.*, 154:66, 1912.
9. Carpenter, K. J. Estimation of the available lysine in animal protein foods. *Biochem. J.*, 77:604-610, 1960.
10. Mitchell, H. H. & R. J. Block. Some relations between the amino acid contents of proteins and their nutritive values for the rat. *J. Biol. Chem.*, 163:599, 1946.
11. Kakade, M. L. & E. F. Liener. Determination of available lysine in proteins. *Anal. Biochem.*, 27:273, 1969.
12. Shahinian, S. & P. Reinhold. Application of the phenol-hypochlorite reaction to measurement of ammonia concentration in Kjeldahl digest of serum and various tissues. *Clin. Chem.*, 17:1077, 1971.
13. Daniel, W. W. *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*. New York, N. Y., John Wiley & Sons, Ltd., 1978.
14. Duncan, D. B. Multiple range and multiple F test. *Biometrics*, 11:1-6, 1955.
15. Jones, J. D. Lysine toxicity in the chick. *J. Nutr.*, 73:107, 1964.

16. Statter, M. Competitive interrelationship between lysine and arginine in rat liver under normal conditions and in experimental hyperammonemia. *Life Sci.*, **22**: 2097-2101, 1978.
17. U. S. Department of Agriculture. Home Economics Research. **Amino Acid Content of Foods**. Report No. 4, 1968.
18. Kardivel, R. & F. H. Kratzer. Effect of heating casein and glucose on the growth and development of chicks. *Nutr. Reps. Internat.*, **24**:379-387, 1981.